

Svibanj 2023.

ISSN 1847-2273 (tiskana inačica)

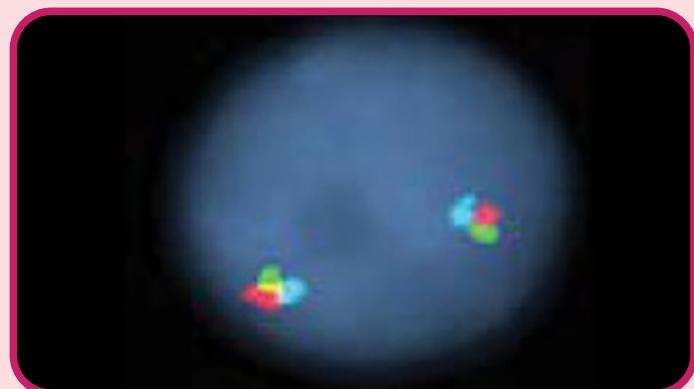
ISSN 2584-7244 (mrežna inačica)

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem

Hrvatske smjernice za stečeni TTP u odraslih

Četrdeset godina od prve transplantacije koštane srži u Hrvatskoj



Volumen 15., Broj 1.

KroHem

Impresum

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem

Volumen 15., Broj 1., Svibanj 2023.

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:

Igor Aurer	Inga Mandac Smoljanović
Ernest Bilić	Marija Miloš
Ana Boban	Zdravko Mitrović
Désirée Coen Herak	Damir Nemet
Lana Desnica	David Ozretić
Sara Dejanović Bekić	Goran Pavliša
Sunčana Divošević	Dražen Pulanić
Margareta Dobrenić	Margareta Radić Antolic
Ivana Franić Šimić	Delfa Radić - Krišto
Davor Galušić	Marko Radoš
Slavko Gašparov	Sunčica Ries
Koraljka Gjadrov Kuveždić	Goran Rinčić
Hrvoje Holik	Dunja Rogić
Martina Horvat	Iva Semren
Ana Hrkać Pustahija	Jasminka Sinčić-Petričević
Mirjana Mariana Kardum Paro	Mila Stazić
Petra Korać	Zoran Šiftar
Marko Kralik	Željka Tkalcic Švabek
Ivan Krečak	Toni Valković
Ivana Lapić	Renata Zadro
Marko Lucijanić	Viktor Zatezalo

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

Objavljeni tekstovi predstavljaju stav autora i Uredništvo se ne mora slagati s iznešenim mišljenjima.

Svi dosadašnji brojevi Biltena Krohema u potpunosti su dostupni su na web stranicama Krohema: www.krohem.hr

Opis slike na naslovnici:

Slike interfazne jezgre urednog nalaza i u kojoj se dogodila delekcija CHIC2 gena te je došlo do stvaranja fuzijskog gena PDGFRA::FIP1L1, priređeno ljubaznošću Ivane Franić Šimić i Ive Semren, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

Sadržaj

Igor Aurer: Uvodnik	2
Margareta Dobrenić, Marko Kralik, Sunčana Divošević: Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma - zaključci Radne skupine za slikovnu dijagnostiku	3
Ana Hrkać Pustahija, David Ozretić, Goran Pavliša, Marko Radoš: Neuroradiologija u obradi bolesnika s limfomima	8
Inga Mandac Smoljanović: Nije zlato sve što sja; trebamo li nove biljege u KLL?	10
Mila Stazić, Toni Valković: Učestalost "B simptoma" u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od multiplog mijeloma	13
Željka Tkalcic Švabek, Zoran Šiftar, Viktor Zatezalo, Mirjana Mariana Kardum Paro: Slučaj JAK2 V617F pozitivnog B-NHL – prikaz slučaja	17
Marko Lucijanić, Ivan Krečak u ime Radne skupine Krohema za Ph negativne mijeloproliferativne neoplazme: Aktivnost radne skupine Krohema za Ph(-) mijeloproliferativne neoplazme	20
Ivana Franić Šimić, Iva Semren: Eozinofilija	25
Koraljka Gjadrov Kuveždić, Sunčica Ries: Zašto je dokazivanje ekstrahemoglobinskog željeza najčešća citokemijska metoda našeg Odjela?	27
Dražen Pulanić, Ana Boban, Désirée Coen Herak, Davor Galušić, Hrvoje Holik, Ivan Krečak, Marija Miloš, Zdravko Mitrović, Delfa Radić-Krišto, Goran Rinčić, Jasminka Sinčić Petričević, Toni Valković: Hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje stečene imunosne trombotične trombocitopenične purpure u odraslih	30
Ivana Lapić, Margareta Radić Antolic, Sara Dejanović Bekić, Ernest Bilić, Ana Boban, Désirée Coen Herak, Dunja Rogić, Renata Zadro: Reevaluacija dijagnoze von Willebrandove bolesti u hrvatskoj pedijatrijskoj i odrasloj kohorti – pilot studija	42
Lana Desnica: Svečano obilježavanje 40. godišnjice prve alogenične transplantacije koštane srži u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb	46
Damir Nemet: Dodjela godišnje nagrade Zaklade Krohema u 2022. godini	49
Novo vodstvo Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora	52
Slavko Gašparov, Petra Korać: In memoriam prof. dr. sc. Mara Dominis	53

Uvodnik

Drage kolegice i kolege, članice i članovi Krohem-a i svi ostali čitatelji!

Eto mene opet pred proljetni sastanak na Malom Lošinju, jednom mjestu u kojem još nismo bili. Mislim da nikoga ne treba uvjeravati da je Lošinj prekrasan, možda tek podsjetiti da se ne tako davno, zbog blage klime i zaštićenosti od bure, smatrao odličnim prirodnim lječilištem, prvenstveno za plućne bolesnike i osobe sklone alergijama.

Što se događalo u šest mjeseci od zadnjeg uvodnika i jesenskog sastanka u Osijeku? Hrvatska je prešla na EUR-o. Krohem je svoj cjenik morao prilagoditi tome, ali i inflaciji i povećanju cijena smještaja, najma dvorana i inih usluga potrebnih za uspješnu organizaciju sastanaka. Za sada nismo primijetili smanjen interes farmaceutskih tvrtki za suradnju, ali ako se stvari ovako nastave, možda ćemo uskoro ponovno morati mijenjati cijene.

Obilježili smo 40. godišnjicu transplantacije matičnih krvotvornih stanica u Hrvatskoj svečanim simpozijem s međunarodnim sudjelovanjem na kojem smo se podsjetili na te pionirske dane i ljude koji su uveli metodu koja se tada primjenjivala u vrlo malom broju zemalja i centara u Europi, velikane na čijim ramenima mi sada stojimo. Osnivača i prvog predsjednika Krohema prof. dr. Borisa Labara predsjednik je Republike Hrvatske g. Zoran Milanović tom prigodom odlikovao Redom Ante Starčevića. Meni, a čini mi se i mnogim drugima, posebno je zanimljivo bilo čuti predavanje prof. dr. Milivoja Boranića o njegovim pokusima s eksperimentalnom transplantacijom koštane srži u miševa iz šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog stoljeća koji su pokazali mogućnost odvajanja GvHD i GvL reakcije, ali i nagovijestili neke vrlo suvremene trendove poput korištenja posttransplantacijskog ciklofosfamida za prevenciju GvHD-a.

Radna skupina za multipli mijelom je održala vrlo dobro posjećen i koristan sastanak u Opatiji, objavljena su nam tri rada u međunarodnim znanstvenim časopisima i konačno smo uspjeli u onom što je inače glavna aktivnost kooperativnih grupa, a to je uključiti bolesnika u međunarodno intervencijsko kliničko ispitivanje čiji je sponzor u Hrvatskoj upravo Krohem.

Nije da nema problema. Odobravanje novih lijekova ide nešto sporije, i u nekim segmentima, npr. ALL, značajno zaostajemo za svijetom. Agonisti TPO receptora i inhibitori ABL kinaze su skinuti s Liste posebno skupih lijekova i propisuju se na teret bolničkog budžeta. Kakav će to utjecaj na liječenje naših bolesnika imati, tek ostaje da se vidi. U tri velike zagrebačke bolnice, KBC Zagreb, KB Merkur i KBC Sestara milosrdnica, gotovo istovremeno započela je strukturalna obnova zbog čega je smanjen broj bolničkih postelja, ali i pogoršani uvjeti smještaja za hematološke bolesnike. Zbog toga je povećano opterećenje drugih hematoloških centara, prvenstveno KB Dubrava i KBC Split. Za očekivati je da će to dovesti do povećane učestalosti komplikacija i odgađanja terapije. Kako vrag nikada nije tako crn kako izgleda, to bi moglo potpomoći diverzifikaciji hematologije u Hrvatskoj.

Naposljetu, na ovom sastanku trebamo održati izbornu skupštinu. Iako većina članova Upravnog odbora ide u reizbor, dobar dio nas će u ne tako dalekoj budućnosti u mirovinu. Vrijeme je da srednja generacija počne razmišljati o tome tko će preuzeti vodstvo pojedinih radnih skupina i Krohema u cjelini i polako se pripremati da nas zamijeni bez značajnijih potresa. Na žalost, prijedlog da se novi predsjednik bira nekoliko godina unaprijed i tako mu se da vremena da se upozna sa svim aspektima funkciranja organizacije, kao što je uobičajeno u velikim međunarodnim stručnim društvima poput EHA-e, navodno nije u skladu s hrvatskim propisima pa ga nismo mogli uvrstiti u statut. Kako bi skupština tekla glatko i da zbog nje ne bismo morali odgađati predavanja dva vrhunska svjetska hematopatologa, molim sve redovne članove Krohema da prije sastanka prouče izvješća i planove Upravnog odbora, radnih skupina i Nadzornog odbora objavljene na našoj mrežnoj stranici i da dođu u dvoranu na vrijeme!

Puno vas pozdravljam i radujem se skorom druženju

Vaš predsjednik
Prof. dr. Igor Aurer

Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma - zaključci Radne skupine za slikovnu dijagnostiku

Margareta Dobrenić^{1,2}, Marko Kralik³, Sunčana Divošević⁴

¹ Klinička zavod za nuklearnu medicinu, KBC Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³ Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, KBC Zagreb

⁴ Poliklinika Medikol

Smjernice iznesene u ovom konsenzusu odnose se na kliničku praksu u zdravstvenom sustavu Republike Hrvatske za bolesnike s dokazanim limfomom. Ove smjernice se ne primjenjuju u kliničkim istraživanjima.

Indikacije za radiološke i nuklearno-medicinske preglede

Radiološki i nuklearno-medicinski pregledi u dijagnostici i liječenju limfoma imaju nekoliko ciljeva, odnosno indikacija.

Prva skupina indikacija je izravno povezana s dijagnostikom i liječenjem limfoma:

- procjena inicijalne proširenosti bolesti,
- procjena učinkovitosti liječenja u tijeku liječenja (evaluacijski ili interim pregledi),
- procjena učinkovitosti liječenja nakon završenog liječenja (reevaluacijski pregledi),
- praćenje, s ciljem ranog otkrivanja recidiva ili progresije bolesti.

U drugoj skupini indikacija se ove metode pregleda koriste za navođenje pri punkciji ili biopsiji, sa ciljem dobivanja biološkog materijala za citološku ili histološku analizu.

U trećoj skupini indikacija se ove metode koriste za planiranje polja terapijskog zračenja.

U četvrtoj skupini indikacija se metode koriste kod komorbiditetnih stanja i komplikacija liječenja.

Radiološke metode pregleda

Od radioloških metoda u dijagnostici i liječenju limfoma najčešće se koristi kompjutorizirana tomografija (CT), a rjeđe ultrazvuk (UZV) i magnetska rezonancija (MR).

CT pregled se koristi za morfološku (anatomsku) analizu limfnih čvorova, parenhimatoznih i ostalih organa vrata, prsišta, trbuha i zdjelice. Može se koristiti i za planiranje polja zračenja, kao i za slikovno navođenje pri punkciji i biopsiji limfnih čvorova/ekstranodalnih lezija.

Monofazni protokol CT pregleda u ovom kon-

senzuu znači snimanje 70 do 90 sekundi nakon intravenske aplikacije jodnog kontrastnog sredstva (obično u koncentraciji 300 i više mg joda po miliilitru) u dozi ne većoj od 1,5 ml/kg. Kad god je moguće, zbog potrebe uniformnosti pregleda i optimalnih geometrijskih (vremenskih i koncentracijskih) karakteristika kontrastnog sredstva u intravaskularnom i ekstracelularnom ekstravaskularnom prostoru, kontrastno sredstvo treba aplicirati automatskim injektorom, brzinom 3-5 ml/s, uz neposredni naknadni bolus fiziološke otopine u dozi 20-40 mL. Ukoliko ne postoji mogućnost uporabe automatskog injektora, kontrastno sredstvo se aplicira manualno, u bolusu, bez naknadnog bolusa fiziološke otopine.

MR pregled je metoda izbora za procjenu zahvaćenosti središnjeg živčanog sustava limfomom. DVI (oslikavanje difuzije molekula vode) je standardna sekvenca kod oslikavanja limfoma mozga. Prema dosad objavljenim radovima, upitna je vrijednost rutinskog dugotrajnog praćenja pomoću MR pregleda nakon završenog liječenja primarnog ili sekundarnog limfoma mozga. UZV se najčešće koristi za slikovno navođenje pri punkciji i biopsiji limfnih čvorova.

Smjernice za analizu CT i MR pregleda

U radiološkim nalazima se mjerenja izvode u aksijalnim (transverzalnim) presjecima i unidimenzionalna su, odnosno mjeri se samo jedna, najveća dimenzija (duži promjer) limfnog čvora odnosno ekstranodalne lezije, u skladu s konsenzusom Međunarodne radne skupine o evaluacijskim kriterijima kod limfoma (RECIL 2017).

Značajke limfomom zahvaćenog limfnog čvora uključuju: duži promjer $> 1,5$ cm, poprimanje sfroidnog oblika, homogena struktura (prije terapije limfomom zahvaćeni limfni čvorovi rijetko imaju kalcifikacije i područja nekroze), neoštra ograničenost i sklonost oblikovanju nakupina međusobno neodvojivih limfnih čvorova (konglomerata), hipo-vaskularnost u odnosu na normalan limfni čvor i

sklonost okruživanju krvnih žila.

Ciljne lezije (eng. *target lesions*) koje se mijere i navode u radiološkom nalazu su najveći limfni čvori odnosno najveće ekstranodalne lezije čije se dimenzije mogu reproducibilno mjeriti, u pravilu one dužeg promjera $> 1,5$ cm.

Mjeri se duži promjer najvećeg limfnog čvora u svakoj regiji, do najviše 5 regija, u inicijalnom i ponavljanim pregledima. Ako je moguće, odnosno ako su povećani limfni čvorovi i u ostalim regijama, izbjegava se mjerjenje čvorova pazuha, periportalnog područja i prepona jer su čvorovi u navedenim regijama fiziološki često tanki, ali izduženi, dužeg promjera $> 1,5$ cm.

Limfni čvorovi dužeg promjera 1 – 1,4 cm nisu fiziološki, ali ne bi trebali biti navedeni kao ciljne lezije. Limfni čvorovi čiji je duži promjer < 1 cm su normalni.

Konglomerati limfnih čvorova mijere se na isti način (duži promjer u aksijalnim presjecima), kao jedinstvena tumorska masa.

Za velike, obično infiltrativne tumorske mase, koje se ne mogu dovoljno precizno izmjeriti, potrebno je navesti granice širenja u odnosu na okolne anatomske strukture kao što su parenhimski organi, kosti ili velike krvne žile. Ukoliko postoji, uvijek je potrebno u radiološkom nalazu navesti i odnos limfomske tumorske mase prema okolnim anatomskim strukturama (djelomično ili potpuno okruživanje, infiltracija, kompresija i pomak).

U radiološkom nalazu potrebno je navesti i ekstranodalne pojavnosti limfoma. Za ekstranodalno širenje limfoma treba navesti radi li se o difuznoj ili žarišnoj zahvaćenosti pojedinog organa te u slučaju žarišne zahvaćenosti navesti duži promjer najveće lezije.

Kod zahvaćanja probavne cijevi limfomom, potrebno je navesti debljinu stijenke i opseg zahvaćenosti probavne cijevi.

Dimenzije slezene se izuzetno mijere u koronarnim presjecima, pri čemu je povećana slezena vertikalnog kraniokaudalnog promjera > 13 cm.

Ostale, tzv ne-ciljne lezije (eng. *nontarget lesions*) potrebno je navesti u radiološkom nalazu i okarakterizirati kao takve, bez potrebe za mjerjenjem njihove veličine. U kontrolnim pregledima se i one analiziraju i kompariraju, a u radiološkom nalazu navode kao prisutne, odsutne ili u progresiji.

Nuklearno-medicinske metode pregleda

Od nuklearno-medicinskih metoda se u dijagnostici i liječenju limfoma koristi pozitronska emis-

sijska tomografija/kompjutorizirana tomografija (PET/CT), s radiofarmakom fluorodeoksiglukozom (FDG), analogom glukoze obilježenim s F-18 (F-18 FDG).

Pojačano nakupljanje F-18 FDG-a u tumorskim stanicama uvjetovano je njihovim značajno većim metabolizmom u odnosu na normalno tkivo. Osim u tumorskim stanicama, F-18 FDG se nakuplja i u drugim područjima pojačanog metabolizma, npr. kod upale (neinfektivne upale, infekcije, granulomatozne bolesti) ili cijeljenja tkiva (nakon frakture, traume mekih tkiva, kirurških zahvata). Stoga je potrebno imati na umu da pojačano nakupljanje F-18 FDG-a nije specifično za tumore.

PET/CT se može rabiti u dijagnostici i liječenju svih limfoma koji nakupljaju FDG – svi tipovi Hodgkinovog limfoma i većina non-Hodgkin limfoma (izuzetak su limfom malih stanica, limfoplazmocitni limfom/Waldenstroemova makroglobulinemija, mycosis fungoides i limfom marginalne zone).

Intenzitet akumulacije F-18 FDG-a je u pravilu proporcionalan biološkom ponašanju limfoma, s intenzivnim nakupljanjem kod agresivnih, a slabog intenziteta kod indolentnih limfoma.

PET/CT se može koristiti za usmjeravanje mjesta biopsije kod sumnje na transformaciju indolentnih limfoma.

Priprema bolesnika i protokoli snimanja PET/CT pregleda

Bolesnici prije početka pretrage, odnosno injiciranja radiofarmaka trebaju biti natašte 4-6 sati. Vrijednost serumske glukoze smije biti do 11 mmol/l, ista se određuje glukometrom neposredno prije početka pretrage. Infuzije glukoze i parenteralna prehrana se ne smiju primjenjivati minimalno 4 sata prije injiciranja radiofarmaka, dok se infuzije NaCl-a smiju davati bez ograničenja. Dijabetičari (na peroralnoj terapiji i inzulinu) uz obrok trebaju uzeti antidiabetičke lijekove, nakon čega moraju biti natašte minimalno 4 sata prije početka pretrage. Ostali peroralni lijekovi se smiju uzimati s vodom u uobičajeno vrijeme.

Radiofarmak (F-18 FDG) se primjenjuje intravenski u dozi 2,3-3,4 MBq/kg tjelesne mase. Nakon injiciranja radiofarmaka bolesnik miruje (sjedi ili leži) 50-90 minuta u prostoriji zagrijanoj na sobnoj temperaturi. Potom slijedi snimanje u trajanju 15-30 minuta, ovisno o visini bolesnika i apliciranoj aktivnosti radiofarmaka.

Ako je potrebno suprimirati fiziološko nakupljanje F-18 FDG-a u smeđem masnom tkivu, 60 minu-

ta prije injiciranja radiofarmaka peroralno se uzima 40 mg propranolola ili 2-10 mg diazepama.

Budući da različiti oblici liječenja limfoma mogu mijenjati metabolizam tumora odnosno uzrokovati upalu u njegovom mikrookolišu, zbog izbjegavanja lažno negativnog i lažno pozitivnog PET nalaza, potreban je vremenski razmak od završetka liječenja do PET/CT pregleda. Stoga se PET/CT izvodi 3 tjedna nakon završetka kemoterapije, 4 tjedna nakon imunoterapije (osim kod rituksimaba gdje je razmak 5-6 tjedana), 6 tjedana nakon kirurškog zahvata i 3 mjeseca nakon zračenja. Kod interim studije se PET/CT izvodi između 2. i 4. ciklusa kemoterapije, neposredno prije početka sljedećeg ciklusa.

U ovom se konsenzusu pod PET/CT-om podrazumijeva PET i CT snimanje od baze lubanje do gornje trećine natkoljenica.

CT u sklopu PET/CT pregleda može biti učinjen u niskodoznom (eng. *low-dose*) ili punodoznom (eng. *full-dose*) načinu snimanja. U punodoznom načinu se snima CT kod utvrđivanja inicijalne proširenosti limfoma ili kliničke sumnje na relaps. Ako je kod bolesnika unutar nekoliko tjedana prije PET/CT pregleda učinjen punodozni CT zbog drugog razloga, može se snimiti samo niskodozni CT u sklopu PET/CT pregleda. Kod utvrđivanja odgovora na liječenje dovoljno je snimiti niskodozni CT.

Smjernice za analizu PET/CT pregleda

Osnova interpretacije nakupljanja F-18 FDG-a je vizualna, pri čemu je uvjerljivo PET pozitivna lezija ona čiji je intenzitet nakupljanja F-18 FDG-a veći od onog u jetri.

Semikvantitativno izražavanje intenziteta nakupljanja radiofarmaka izražava se pomoću SUV (eng. *standardized uptake value*), brojčane vrijednosti koja označava aktivnost u jedinici volumena ($\mu\text{Ci}/\text{ml}$), korigirano tjelesnom masom bolesnika i primjenjenom dozom F-18 FDG-a. U kliničkoj praksi se koristi SUVmax, pri čemu je vrijednost SUVmax viša što je intenzitet nakupljanja F-18 FDG veći.

Načelno, što je limfom agresivniji, intenzitet nakupljanja FDG-a je veći, odnosno vrijednost SUVmax viša.

Kod utvrđivanja inicijalne proširenosti limfoma ili sumnje na relaps je u PET nalazu potrebno navesti SUVmax u najintenzivnijem limfnom čvoru svake zahvaćene skupine. Kod ekstranodalne bolesti potrebno je uz SUVmax navesti je li zahvaćnost organa difuzna ili žarišna. Kod žarišnih lezija određuje se SUVmax u najintenzivnijoj leziji svakog zahvaćenog organa.

PET/CT zamjenjuje biopsiju koštane srži kod svih tipova Hodgkinovog limfoma i pozitivnog PET nalaza kod difuznog B-velikostaničnog limfoma. Pozitivan PET nalaz u koštanoj srži je definiran fokalnim nakupljanjem F-18 FDG-a.

Intenzivno fiziološko nakupljanje F-18 FDG-a u mozgu, njegovo izlučivanje mokraćnim sustavom i vrlo varijabilna raspodjela u probavnom sustavu ograničavaju točnost PET/CT pregleda u utvrđivanju zahvaćenosti navedenih organa limfomom ili odgovora na liječenje u istima.

Kod utvrđivanja odgovora na liječenje (interim i reevaluacijske studije) se PET interpretira na temelju Deauville kriterija.

Za analizu odgovora na liječenje potrebna je usporedba s PET/CT ili CT pregledom kojim je utvrđena inicijalna proširenost bolesti. U PET nalazu potrebno je navesti SUVmax i Deauville kriterij najintenzivnijeg limfnog čvora iz svake inicijalno zahvaćene skupine te najintenzivnije ekstranodalne lezije svakog inicijalno zahvaćenog organa.

U zaključku PET/CT nalaza potrebno je navesti radi li se o kompletnoj metaboličkoj remisiji (Deauville 1-3) ili različitim kategorijama metabolički aktivne bolesti (Deauville 4 i 5).

Ako je interim PET/CT negativan (Deauville 1-3), nije potrebno raditi PET/CT nakon završetka liječenja (reevaluacijsku studiju).

Kod dijagnosticiranja relapsa ili progresije limfoma koriste se ista načela očitavanja PET/CT pregleda kao kod utvrđivanja inicijalne proširenosti bolesti. Limjni čvor ili ekstranodalna lezija sumnjiva na relaps je dužeg promjera $\geq 1,5$ cm odnosno lezija čiji je SUVmax veći od SUVmax jetre.

CT u sklopu PET/CT-a se očitava u skladu s preporukama za očitavanje CT pregleda.

Procjena odgovora na liječenje

Po RECIL prijedlogu je za mjerjenje tumorske mase dovoljno izmjeriti duži promjer limfnih čvorova i/ili ekstranodalnih lezija i zbrojiti njihove duže promjere.

Hrvatski stručnjaci predlažu da se procjena odgovora na liječenje CT-om bazira na mjerenu prema RECIL kriterijima, odnosno da se procjena odgovora na liječenje slikovnom dijagnostikom klasificira na sljedeći način:

Kompletna remisija (KR):

1. PET/CT: sva sijela bolesti su PET negativna (Deauville 1-3) uz regresiju veličine tumorske mase (zbroja dužih promjera ciljnih lezija) $\geq 30\%$.

2. CT: svi inicijalno zahvaćeni limfni čvorovi su < 1,5 cm i žarišne promjene u parenhimskim organima, ako ih je bilo, su nestale.

Parcijalna remisija (PR):

1. PET/CT: pozitivan PET nalaz (Deauville 4 i 5)
2. CT: smanjenje tumorske mase $\geq 30\%$.

Stabilna bolest (SB):

1. PET/CT: pozitivan PET nalaz (Deauville 4 i 5)
2. CT: nisu ispunjeni kriteriji ni za KR ili PR, niti za PB.

Progresivna bolest (PB):

1. PET/CT: pozitivan PET nalaz (Deauville 5 – povećanje intenziteta inicijalno zahvaćene lezije ili novonastala lezija).
2. CT: povećanje tumorske mase $> 20\%$
ili
porast veličine limfnog čvora na $> 1,5$ cm uz povećanje njegove veličine za barem 0,5 cm ili
pojava nove lezije > 1 cm.

Čvorovi, odnosno fokalne promjene moraju biti PET pozitivne ako se radi o B velikostaničnom limfomu, Hodgkinovom limfomu, folikularnom limfomu ili su prije početka liječenja bile PET pozitivne. PET pozitivna lezija je ona čiji je SUVmax veći od SUVmax jetre.

Tijekom imunoterapije ili neposredno nakon njenog završetka moguće je prolazno povećanje veličine limfomom zahvaćenih lezija i/ili povećanja intenziteta nakupljanja F-18 FDG-a u njima (eng. *tumor flare*), vjerojatno zbog upalne reakcije u tumoru kao posljedici liječenja. Također je moguć i usporen odgovor na liječenje. Zbog navedenog, slikovnom dijagnostikom i kliničkim pregledom nije moguće razlučiti radi li se o upalnoj reakciji, sporom odgovoru na liječenje ili pravoj progresiji bolesti pa je kod bolesnika na imunoterapiji uvedena dodatna kategorija odgovora na liječenje – neodređen odgovor (NO).

Neodređen odgovor (NO):

1. PET/CT: povećanje intenziteta nakupljanja F-18 FDG-a u inicijalno zahvaćenoj leziji bez povećanja veličine lezije.
2. CT: povećanje veličine jedne ili više inicijalno zahvaćenih lezija, s ili bez novonastalih lezija.

Ukoliko se radi o neodređenom odgovoru na liječenje (NO 1 pregled), potrebno je učiniti kontrolni PET/CT ili CT pregled za 3 mjeseca. Radi se o pro-

gresiji bolesti ako na kontrolnom pregledu bude prisutan porast veličine PET pozitivne lezije ili pojava nove lezije odnosno ako je na CT-u vidljivo dodatno povećanje veličine $\geq 50\%$ barem jedne od ciljnih lezija.

Ako nisu zadovoljeni kriteriji za progresiju bolesti, odgovor na liječenje je i dalje neodređen. Liječenje se nastavlja, a svaki sljedeći PET/CT ili CT pregled se uspoređuje s NO 1 pregledom do utvrđivanja progresije bolesti ili odgovora na liječenje (KR, PR ili SB).

Praćenje bolesnika s limfomom

Praćenje asimptomatskih bolesnika s limfomom u remisiji CT ili PET/CT pregledima nije opravdano.

Razmjena slikovnog materijala

Pri ponavljanim pregledima za procjenu progresije ili regresije bolesti nužno je priložiti slikovni materijal i pisane nalaze svih prethodnih radioloških i nuklearno-medicinskih pregleda jer je samo temeljem usporedbe slikovnog materijala moguće donijeti jasne zaključke o eventualnim morfološkim i metaboličkim promjenama.

Doze ionizirajućeg zračenja i štetnost radioloških kontrastnih sredstava

Kliničari koji upućuju bolesnike na radiološke i nuklearno-medicinske pregledne te radiolozi i specijalisti nuklearne medicine koji te pregledne izvode dužni su voditi računa o dozi ionizirajućeg zračenja koju primaju bolesnici s limfomom pažljivim razmatranjem indikacija za izvođenje pregleda, odbirom optimalnog modaliteta snimanja (punodozni ili niskodozni CT u sklopu PET/CT-a) te prilagođavanjem parametara snimanja dobi, tjelesnoj masi i kliničkom stanju bolesnika. Potrebno je snimati odgovarajuće, što je moguće manje, volumene tijela. Za kvalitativno dostatnu procjenu upalnih promjena plućnog parenhima u većini je slučajeva dovoljno učiniti niskodozni CT područja prsišta.

U bolesnika s renalnom insuficijencijom intravenska jedna kontrastna sredstva zbog njihove nefrotoksičnosti ne treba primjenjivati, osim u iznimnim slučajevima, kada se drugom metodom ne može odgovoriti na klinički upit. Isto vrijedi i za primjenu paramagnetskih kontrastnih sredstava sa spojevima gadolinija zbog moguće indukcije sustavne nefrogene skleroze. Za intravensku primjenu kontrastnih sredstava primjenjuju se smjernice Europskog društva za urogenitalnu radiologiju (eng. *European Society of Urogenital Radiology - ESUR*).

Radiološki i nuklearno-medicinski pregledi u nedokazanom limfomu

Smjernice iz ovog konsenzusa se ne primjenjuju kod obrade bolesnika s kliničkom sumnjom na limfom koji nije dokazan histološki ili barem citološki, odnosno kada je postojanje limfoma samo jedna od mogućnosti u bolesnika sa širokom diferencijalnom dijagnozom ili se od radiologa i specijalista nuklearne medicine traži da isključi postojanje povećanih limfnih čvorova. Ukoliko CT (kao zasebna pretraga ili u sklopu PET/CT-a) nije očitan na navedeni način, a obradom se dokaže limfom, radiolog ili specijalist nuklearne medicine treba ponovno očitati nalaz CT-a u skladu s navedenim smjernicama, odnosno očitava se duži promjer limfnih čvorova i/ili ekstranodalnih lezija. Slike PET pregleda nije potrebno dodatno očitati jer nema specifičnosti u analizi inicijalne proširenosti limfoproliferativne bolesti od ostalih tumorskih i netumorskih stanja.

Literatura:

1. Younes A, Hilden P, Coiffier B, et al. International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Ann Oncol* 2017;28:1436–1447.
2. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014;32:3059–3068.
3. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* 2014;32:3048-3058.
4. Cheson BD, Ansell S, Schwartz L, et al. Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood* 2016;128:2489-2496.

Neuroradiologija u obradi bolesnika s limfomima

Ana Hrkać Pustahija, David Ozretić, Goran Pavliša, Marko Radoš
Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku neuroradiologiju, KBC Zagreb

Neuroradiološka prezentacija limfoma

CNS limfomi se dijele na primarne (PCNSL) i sekundarne (SCNSL). PCNSL se odnose na limfome koji zahvaćaju mozak, leptomeninge, kralježničnu moždinu ili oči, bez postojanja drugih sijela limfoma izvan CNS-a. SCNSL prema definiciji obuhvaćaju sekundarnu infiltraciju CNS-a kod sistemskih limfoma. Tipična MR prezentacija primarnih PCNSL-a je tvorba periventrikularne lokacije koja se intenzivno i homogeno imbibira kontrastom. SCNSL se češće prezentiraju leptomeningealnom infiltracijom, a nešto rjeđe parenhimskom infiltracijom¹.

Kod inicijalnog MR pregleda treba obratiti pažnju na karakteristike koje su lošiji prognostički faktori, a to su veličina (promjer ili volumen) tumora, kao i infratentorialna lokacija. Nizak ADC (apparent diffusion coefficient) prije terapije je također prediktivan za kraće vrijeme preživljjenja i kraći interval bez progresije (progression-free survival)¹. Broj tumorskih lezija, meningealna infiltracija i supratentorialna lokacija su faktori koji nisu povezani s prognozom ishoda liječenja².

MR protokoli

Standardni MR pregled u dijagnosticiranju limfoma bi trebao uključivati sljedeće sekvence: T1W, T2W, DWI, SWI, postkontrastno: izotropni 3D volumni tankslojni FLAIR, T1W, T1W IR GRE^{1,2,3}. U praćenju, naročito asimptomatskih pacijenta, se mogu koristiti kraći protokoli (T1W i FLAIR prije i nakon kontrasta)³.

Korištenje naprednijih sekvenci (MR perfuzija i spektroskopija) u MR protokolu nije obavezno, no može pomoći u diferenciranju limfoma od drugih lezija, kao npr. glioma visokog gradusa, metastaza, infektivnih ili inflamatornih neinfektivnih lezija. Ovo naročito vrijedi kod imunokompromitiranih pacijenata kada se limfomi ne prezentiraju tipičnom radiološkom slikom, a kod takvih pacijenata češće su i patologije koje mogu sličiti limfomima⁴.

Za limfome je kod MR perfuzije specifično da imaju ili normalne ili tek blago povišene rCBV vrijednosti, što ih bitno razlikuje od drugih tumora. Što se tiče progostičke vrijednosti, niži rCBV se povezuje s lošijim odgovorom na terapiju⁴.

MR spektroskopija kod limfoma pokazuje povi-

šene vrijednosti lipida, kao i povišen omjer kolina/kreatina. Ovakav nalaz nije sasvim specifičan za limfome, može se naći npr. i kod glioblastoma, no može pomoći u diferenciranju limfoma od drugih lezija¹.

Praćenje limfoma – MR kriteriji

U praćenju odgovora na terapiju najčešće se koriste kriteriji International Primary CNS Collaborative Group (IPCG)⁵. Prema ovim kriterijima odgovor na provedenu terapiju na MR pregledu se može kategorizirati u sljedeće skupine, uz uzimanje u obzir i ostalih kliničkih parametara (oftalmološki status, analiza likvora, primjena kortikosteroidne terapije):

1. potpuna regresija = potpuna regresija svih kontrastom imbibirajućih lezija, uz prekid primjene kortikosteroidne terapije barem 2 tjedna prije MR pregleda.
2. nepotvrđena potpuna regresija = potpuna regresija svih kontrastom imbibirajućih lezija, no uz prisutnu primjenu kortikosteroida manje od 2 tjedna prije MR pregleda; ili u slučaju postojanja malih područja perzistirajuće postkontrastne imbibicije, često u blizini područja biopsije, dok se u ostalim dijelovima tumora nalazi potpuna regresija imbibicije; ovakva područja često s vremenom pokazuju regresiju veličine ili potpuni nestanak.
3. parcijalna regresija = smanjenje veličine imbibirajućih lezija za $\geq 50\%$.
4. progresija bolesti: rast veličine imbibirajućih lezija za $\geq 25\%$ ili pojava novih lezija.

Kao što je vidljivo, praćenje odgovora na provedenu terapiju se temelji na praćenju promjena područja patološke intrakranijalne postkontrastne imbibicije.

No, u inicijalnom definiranju tumorske mase kao i u definiranju odgovora na provedenu terapiju treba uzeti u obzir i T2/FLAIR hiperintenzivne promjene koje su bez postkontrastne imbicije, a veće su od 10 mm i udaljene od tumora. Takve lezije se mogu smanjiti nakon provedene terapije i odgovaraju tumorskoj infiltraciji. Problem kod takvih lezija je da su često nespecifične, često prisutne kod starijih, a

teško ih je razlikovati i od vaskularne ili kemoterapijom izazvane leukoencefalopatije. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se objektiviziralo i standardiziralo ove lezije i eventualno uključilo u redefinirane kriterije dijagnosticiranja i praćenja².

Praćenje limfoma – intervali i trajanje

Što se tiče intervala i duljine neroradiološkog praćenja CNS limfoma, za pacijente koji su uključeni u klinička istraživanja, postoje jasne IPCG preporuke za neuroradiološko praćenje nakon provedene terapije:

- prve 2 godine MR svaka 3 mjeseca,
- sljedeće 3 godine svakih 6 mjeseci,
- sljedećih 5 godina jednom godišnje.

No, kod asimptomatskih pacijenata koji su u kliničkoj remisiji, a nisu u kliničkim istraživanjima, ne postoji sasvim jasna preporuka o optimalnim intervalima i trajanju neuroradiološkog praćenja. Pojedine studije pokazuju da su postotci asimptomatskih/predkliničkih relapsa otkriveni redovnim MR pregledima mali (do 3%)⁶. S druge strane, postoje studije koje govore u prilog tome da otkrivanje recidiva MR pregledom kod asimptomatskih pacijenata dovodi do boljeg ishoda liječenja⁷, što bi značilo da je regularno praćenje asimptomatskih pacijenata preporučljivo. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se jasno definiralo ovo pitanje⁸.

Literatura:

1. Haldorsen IS, Espeland A, Larsson EM. Central nervous system lymphoma: characteristic findings on traditional and advanced imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Jun-Jul;32(6):984-92. doi: 10.3174/ajnr.A2171. Epub 2010 Jul 8. PMID: 20616176; PMCID: PMC8013157
2. Tabouret E, Houillier C, Martin-Duverneuil N, Blonski M, Soussain C, Ghesquière H, Houot R, Larrieu D, Soubeyran P, Gressin R, Gyan E, Chinot O, Taillandier L, Choquet S, Alentorn A, Leclercq D, Omuro A, Tanguy ML, Hoang-Xuan K. Patterns of response and relapse in primary CNS lymphomas after first-line chemotherapy: imaging analysis of the ANOCEF-GOELAMS prospective randomized trial. *Neuro Oncol*. 2017 Mar 1;19(3):422-429. doi: 10.1093/neuonc/now238. PMID: 27994065; PMCID: PMC5464299.
3. Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, Hottinger AF, Preusser M, Rudà R, Schlegel U, Siegal T, Soussain C, Abacioglu U, Cassoux N, Deckert M, Dirven CM, Ferreri AJ, Graus F, Henriksson R, Herrlinger U, Taphorn M, Soffietti R, Weller M; European Association for Neuro-Oncology Task Force on Primary CNS Lymphoma. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. *Lancet Oncol*. 2015 Jul;16(7):e322-32. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00076-5. PMID: 26149884.
4. Kwok HM, Li KY, Chan RLS, Chan CH, Wong SKH, Lee CM, Cheng LF, Ma JKF. Different facets of intracranial central nervous system lymphoma and its imaging mimics. *J Clin Imaging Sci*. 2022 Feb 4;12:4. doi: 10.25259/JCIS_135_2021. PMID: 35242450; PMCID: PMC8888189.
5. Schlegel U, Korfel A. The challenge of adequate imaging surveillance in primary central nervous system lymphoma. *Neuro Oncol*. 2017 Mar 1;19(3):307-308. doi: 10.1093/neuonc/now273. PMID: 28025387; PMCID: PMC5464301.
6. Tao K, Wang X, Tian X. Relapsed Primary Central Nervous System Lymphoma: Current Advances. *Front Oncol*. 2021 Apr 29;11:649789. doi: 10.3389/fonc.2021.649789. PMID: 33996566; PMCID: PMC8118624.
7. Langner-Lemercier S, Houillier C, Soussain C, et al. Primary CNS lymphoma at first relapse/progression: characteristics, management, and outcome of 256 patients from the French LOC network. *Neuro Oncol*. 2016;18(9):1297–1303.
8. Fossard G, Ferlay C, Nicolas-Virelizier E, Rey P, Ducray F, Jouanneau E, Faurie P, Belhabri A, Sunyack MP, Chassagne-Clément C, Thiesse P, Sebban C, Biron P, Blay JY, Ghesquière H. Utility of post-therapy brain surveillance imaging in the detection of primary central nervous system lymphoma relapse. *Eur J Cancer*. 2017 Feb;72:12-19. doi: 10.1016/j.ejca.2016.10.036. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28012348.

Nije zlato sve što sja; trebamo li nove biljege u KLL?

Inga Mandac Smoljanović

KB Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Uvod

U zadnjih 50 godina učinjeno je mnogo u identifikaciji prognostičkih i prediktivnih biomarkera u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji (B-KLL). Prognostički biomarkeri izdvajaju skupine bolesnika s B-KLL i definiraju ishode neovisno o izboru liječenja. Prediktivni biomarkeri daju informaciju o mogućoj koristi specifičnog liječenja i koriste se u postupku kliničke odluke o terapiji.

U B-KLL dobro su definirani prognostički biomarkeri vezani uz karakteristike bolesnika (lošija prognoza uz stariju dob, komorbiditete, muški spol), B-stanični receptor (povoljni mutirani IGHV, VH 4-34; lošiji nemutirani IGHV, VH 1-69, VH 3-21), citogenetske promjene (povoljna del 13q, intermedijarna 12+, nepovoljna kompleksni kariogram, del 11q, del 17p, translokacije), protočnu citometriju (nepovoljnije uz izražaj CD38, CD49d, ZAP-70), mutacije gena (povoljna MYD88, nepovoljne ATM, BIRC3, NOTCH1, SF3B1, TP53), biokemiju (nepovoljni visok LDH, beta 2 mikroglobulin).

Epigenetski potpis se sve više uvlači u dijagnostičku i prognostičku sliku B-KLL, a posebno mjesto zauzimaju i izražaji mikro RNA (miRNA).

Mikro-RNA u B-KLL

MiRNA su male jednolančane RNA približne veličine 22 nukleotida kodiranih od strane različitih gena. Nalaze se u mikrovezikulama (egzosomima) koje otpuštaju tumorske stanice i u kojima cirkuliraju od jedne do druge stanice. MiRNA se ne prepisuju u proteine, već reguliraju ekspresiju drugih gena režući, ili češće, smanjujući translaciju njihove mRNA. Identifikacija specifičnih miRNA i praćenje promjena u njihovom izražaju u stanicama ili tkivima je važna u razumijevanju regulacije gena, kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima.

Ne-kodirajuće male miRNA reguliraju vise od 1/3 ljudskih gena djelujući na posttranskripcionskoj razini i utječući na izražaj proteina smanjujući translaciju, ili destabilizirajući ciljanu Mrna (59,60).

Oko 50% poznatih miRNA gena je smješteno na fragilnim mjestima koja se dovode u vezu s nastankom tumora. Cirkulirajuće i stabilne miRNA mogu se naći su različitim tjelesnim tekućinama: plazmi, serumu, slini, cerebrospinalnom likvoru te majči-

nom mlijeku. Imaju važnu ulogu u brojnim razvojnim procesima koji uključuju metabolizam, apoptozu, stanični rast, diobu matičnih stanica, diferencijaciju miocita te morfogenezi mozga.

MiRNA geni se prepisuju u jezgri i nazivaju se primarne miRNA s više od 1000 parova baza.

Cirkulirajuća miRNA se pasivno otpušta iz stanica zbog fiziološkog obnavljanja i apoptoze te se prenosi proteinima nosačima poput Ago i nukleofosmina 1 (eng. nucleophosmin (NPM)), ili se aktivno izlučuje inkapsulirana unutar mikrovezikula/egzosoma ciljući ostale stanice ili tkiva.

Koncentracija miRNA u plazmi se mjeri kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (eng. *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR)).

Konačan rezultat koncentracije miRNA ovisi o stabilnosti miRNA u odabranom uzorku. Nekoliko je studija potvrdilo veću stabilnost miRNA u plazmi, nego u serumu, a kad se analizira plazma, ključan je izbor antikoagulansa. Plazma je tekući dio krvi i prenosi krvne stanice, ali i razne bjelančevine, čimbenike zgrušavanja krvi.

Etilendiamintetraacetat (EDTA) kalijeve soli (K2 i K3) koje se mogu ukloniti iz lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* (PCR)) su se zasad pokazale kao najbolji antikoagulans u analizi cirkulirajuće miRNA.

U zadnjih nekoliko godina objavljeni su brojni rezultati o utjecaju aberantnog izražaja miRNA u malignim poremećajima, pri čemu su se miRNA pokazali kao tumor supresorski geni ili onkogeni.

U pojedinim su tumorima miRNA prepoznate kao dijagnostički i prognostički čimbenici, te mogući terapijski ciljevi.

Prvi rad koji je povezao izražaj miRNA u malignim poremećajima, bio je upravo iz područja hematologije u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji.

Calin i suradnici su identificirali dvije miRNA (miR-15a i miR-16) koje su bile smještene u kromosomalnoj regiji 13q14. Ova genomska regija je izbrisana kod većine slučajeva B-kronične limfocitne leukemije, a dvije navedene miRNA su slabijeg izražaja kod oko 70% nositelja ove delecije.

MiR-15 i miR-16 su tumor-supresorske miRNA, i njihov izražaj obrnuto korelira sa izražajem anti-apoptotskog proteina BCL2, pa će pojačan izražaj

obje miRNA pojačati apoptozu u leukemijskim stanicama. Isto tako, delecija miR-15 i miR-16, pojačava leukemogenezu izbjegavanjem apoptoze

Još jedan miRNA klaster koji se često briše u KLL-u je miR-34b/c klaster na kromosomu 11q.

miR-34a je smanjeno reguliran u KLL i miR-34a i miR3 su mete P53. Posljedično, P53 inducira apoptozu djelomičnom aktivacijom miR-34-BCL2 osovine, a gubitak ekspresije tih miRNA povezan je s rezistencijom protiv apoptoze posredovane P53.

KLL prikazuje heterogeni spektar bioloških značajki i kliničkih manifestacija. Zbog kliničke interindividualne heterogenosti, identifikacija prognostičkih čimbenika od velike je važnosti predviđanju tijeka bolesti kao i izbora optimalne terapije.

Klinički najznačajniji pokazatelji lošeg ishoda je nemutirani teški lanac imunoglobulina (IGHV), delecija kromosoma 11q ili 17p, izražaj ZAP-70 (zeta-associated protein 70) i CD38.

Ponavljajuće genetske abnormalnosti, kao što su TP53, ATM, NOTCH1, mutacije SF3B1, BIRC3 i MYD88 povezane su s prognozom bolesti, a neke od njih mogu utjecati na odluke o liječenju.

Među različitim biomarkerima, miRNA su se pojavile kao novi dijagnostički i terapijski biomarkeri u bolesnika s KLL-om.

Neki od njih, poput miR-15a, miR-16-1, miR-155, miR-181b i članovi klastera miR-17~92 igraju ključne uloge u KLL-u kod dijagnoze i tijekom progresije bolesti.

Klaster miR-17~92 (također nazvan oncomiR-I) sastoji se od šest miRNA: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a i miR-92a-1.

Izražaj klastera miR-17/92 povezan je a miRNA kontrolom u ranim fazama razvoja limfocita, najvažniji u diferencijaciji i razvoju B i T limfocita. MiR-17 i 19b su pojačanog izražaja u B-staničnim kulturama od bolesnika s B-KLL, a miR-20 se analizira kao važan biomarker B-KLL.

Nedavno istraživanje pokazalo je značajno višu razinu ekspresije miR-17-5p u skupini s KLL-om s visokim rizikom progresije (stadij III/IV) u usporedbi sa skupinom niskog rizika, tj. stadij 0. S druge strane, značajno više razine ekspresije miR-19a-3p i miR-20a-5p primjećeni su u skupini niskog rizika u usporedbi sa skupinom visokog rizika.

Uočena je slaba pozitivna korelacija između broja leukocita i ekspresije miR-17-5p u leukemijskim B limfocitima, slaba pozitivna korelacija između broja limfocita i izražaja miR-17-5p i miR-18a-5p. Izražaj miR-92a-1-5p negativno je korelirao s brojem B lim-

focita i leukocita.

Pacijenti s delecijom 11q22.3, trisomijom 12 i/ili 17p13.1 delecijom pokazali su značajno višu ekspresiju miR-17-5p u B limfocitima u usporedbi s pacijentima bez ovih aberacija.

S druge strane, miR-19a-3p i miR-92a-1-5p bile su značajno veće u bolesnika s del(13q14) u usporedbi s pacijentima koji nose deleciju 11q22.3, trisomiju 12 i/ili 17p13.1 deleciju.

del(13q14) u FISH analizi bila je povezana sa značajno nižim miR-17-5p i višim miR-19a-3p i miR-92a-1-5p u usporedbi s pacijentima s nepovoljnijim genetskim aberacijama.

Uočeno je i da je niska ekspresija miR-20a i miR-19a-3p snažno povezana s nižim vremenom do liječenja (VDL).

Više razine ekspresije miR-19a-3p i miR-20a-5p zabilježeni su u skupini bolesnika s B-KLL niskog rizika.

miRNA profili mogu razlikovati zdravi B-limfocit od B-limfocita u KLL.

Opisani su različiti miRNA koji mogu razlikovati agresivne od indolentnih KLL.

Pacijenti s visokim miR-21 i miR-155 imaju višu smrtnost u odnosu na pacijente s nižim izražajem navedenih miRNA.

miRNA-148a, miR-222 i miR-21 povećanog su izražaja kod pacijenata koji imaju lošiji terapijski odgovor, niža razina miR-34a povezana je s rezistenčijom na terapiju neovisno o p53 mutaciji. Aktivacija B-staničnog receptora smanjuje razine miR-29c, miR-150, miR-181b, miR-223, a niži izražaj ovih miRNA povezan je s kraćim preživljnjem i kraćim vremenom potrebnim za početak liječenja.

MiR-223 i miR-125a kao tumor supresor geni ciljaju multiple transkripcione faktore poput STAT3.

Klaster miR 17/92 sastoji se od miR-18a-5p, miR-19b-1-5p i miR-92a-1-5p, a dosadašnjim istraživanjima uočen je prekomjerni izražaj svih članova tog klastera u KLL bolesnika u usporedbi sa zdravim kontrolama.

miR-19a-3p, miR-20a-5p i miR-92a-1-5p koreliraju dobro s prognostičkim čimbenicima, uključujući ekspresiju ZAP-70 i CD38. miR-20a-5p korelira s vremenom od postavljanja dijagnoze do liječenja kod KLL-a i stoga može potencijalno poslužiti kao krvni biomarker.

miR-92a iz miR-17/92 klastera više od 3 puta je veća kod pacijenata s B-KLL u KR i nepotvrđenom MRD u koštanoj srži, nego u bolesnika bez KR i detektibilne MRD u koštanoj srži. Izražaj miR-181b smanjen je kod pacijenata s progresivnom B-KLL,

ali ne i kod onih sa stabilnom bolešću. Značajno više razine miR-181a, miR-221 i 223, uočene su kod B-KLL niskog rizika, u odnosu na visoki rizik. miR-15a i miR-29c značajno su više izražene kod pacijenata sa B-KLL i TP53, u usporedbi s bolesnicima bez TP53. Iz dosad navedenog, miR-15/16 klaster, miR-34b/c, miR-29, miR-181b, miR 17/92, miR-150 i miR-155 su najčešće promijenjene miRNA u KLL i reguliraju brojne važne gene koji su ključni u progresiji bolesti.

Zaključak

Analizirajući stare prognostičke indekse u B-KLL; Rai (1975.), Binet (1977), TTM (1981.), i noviji CLL-IPI (2016.) uočeno je kako navedeni indeksi ne mogu zadovoljiti dinamiku praćenja odgovora na terapiju niti biti pouzdani prognostički putokazi u eri novih ciljnih lijekova. Prognostički biomarkeri koji su korišteni u razdoblju kad je imunokemoterapija zauzimala najveći dio terapijskog izbora, danas nisu najidealniji u procjeni odgovora na ciljanu terapiju poput BTK ili Bcl2 inhibitora.

Postizanje MRD kod pacijenata na terapiji venetoklaksom ima prognostičku važnost više nego kod onih liječenih ibrutinibom ili idelalisibom. Stocene mutacije na BTK i Bcl2 su i dobri pokazatelji skupine pacijenata koja nije ni kandidat za tu vrstu terapije.

Stoga ne iznenađuje činjenica da se hematološki svijet i u KLL okreće novijim neinvazivnim biomarkerima čija će razina izražaja pratiti određenu dinamiku od same dijagnoze, preko postupnog rasta bolesti te početka liječenja, a kasnije i praćenja odgovora na terapiju, dužinu trajanja odgovora i ponovnu progresiju.

Vrijeme će pokazati hoće li prediktivni modeli ishoda liječenja oslonjeni na miRNA zauzeti svoje mjesto u galeriji dinamičnih indeksa u B-KLL.

Literatura:

- Mollstedt J, Mansouri L, Rosenquist R. Precision diagnostics in chronic lymphocytic leukemia: Past, present and future. *Front Oncol.* 2023;13:1146486.
- Iyer P, Wang L. Emerging Therapies in CLL in the Era of Precision Medicine. *Cancers (Basel).* 2023;15(5):1583.
- Chocholska S, Zarobkiewicz M, Szymańska A, Lehman N, Woś J, Bojarska-Junak A. Prognostic Value of the miR-17~92 Cluster in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1705.
- Braga TV, Evangelista FCG, Gomes LC, Araújo SSDS, Carvalho MDG, Sabino AP. Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacother.* 2017 ; 92:864-869.
- Yilmaz M, Kuru RD, Erdogan I, Soysal T, Hacihanefioglu S, Baykara O. Investigation of 13q14.3 deletion by cytogenetic analysis and FISH technique and miRNA-15a and miRNA-16-1 by real time PCR in chronic lymphocytic leukemia. *Afr Health Sci.* 2022;22(3):173-182.
- Pepe F, Rassenti LZ, Pekarsky Y, Labanowska J, Nakamura T, Nigita G, Kipps TJ, Balatti V, Croce CM. A large fraction of trisomy 12, 17p-, and 11q- CLL cases carry unidentified microdeletions of *miR-15a/16-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(4):e2118752119.
- Souza OF, Popi AF. Role of microRNAs in B-Cell Compartment: Development, Proliferation and Hematological Diseases. *Biomedicines.* 2022 Aug 18;10(8):2004.
- Grenda A, Filip AA, Wąsik-Szczepanek E. Inside the chronic lymphocytic leukemia cell: miRNA and chromosomal aberrations. *Mol Med Rep.* 2022 Feb;25(2):65.
- Duroux-Richard I, Gagez AL, Alaterre E, Letestu R, Khalifa O, Jorgensen C, Leprêtre S, Tchernonog E, Moreaux J, Cartron G, Apparailly F. miRNA profile at diagnosis predicts treatment outcome in patients with B-chronic lymphocytic leukemia: A FILO study. *Front Immunol.* 2022 Oct 17;13:983771.
- Van Roosbroeck K, Calin GA. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: miRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? *Semin Oncol.* 2016 Apr;43(2):209-14.
- González-Gascón-Y-Marín I, Muñoz-Novas C, Rodríguez-Vicente AE, Quijada-Álamo M, Hernández-Sánchez M, Pérez-Carretero C, Ramos-Ascanio V, Hernández-Rivas JÁ. From Biomarkers to Models in the Changing Landscape of Chronic Lymphocytic Leukemia: Evolve or Become Extinct. *Cancers (Basel).* 2021;13(8):1782.

Učestalost "B simptoma" u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od multiplog mijeloma

Mila Stazić¹, Toni Valković²

¹ Thalassotherapia Opatija, Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma

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

Uvod

Multipli mijelom (MM) je maligna hematološka neoplazma koju karakterizira monoklonalno nakupljanje plazma stanica. Stanice MM nastaju mali-gnom transformacijom plazma stanica post-germinalnih centara limfnih čvorova. MM je karakteriziran nakupljanjem monoklonalnih protutijela i oštećenjem organa (engl. „end-organ damage“)¹. Oštećenje organa opisuje akronim „CRAB“ odnosno hiperkacemija (od engl. *calcium elevation*); bubrežna insuficijencija (od engl. *renal insufficiency*); anemija; i koštana bolest (od engl. *bone disease*)².

Na početku bolesti klinička slika je nespecifična. Najčešći simptomi i/ili klinički znakovi su; simptomi anemijske hipoksije (73%), bol u kostima (58%), povišeni kreatinin (48%), hiperkacemija (28%), te gubitak tjelesne težine (24%)³. U manjeg broja pacijenata inicijalna klinička slika pokazuje manje česte tzv. "non-CRAB simptome": neuropatiju, ekstramedularnu bolest, sindrom hiperviskoznosti, amiloidozu, hemoragije, koagulopatiju, plazma staničnu leukemiju, infekcije, krioglobulinemiju i sekundarni giht⁴. "B-simptomi" definirani kao febrilitet kojem nije uzork infekcija, noćno znojenje i gubitak tjelesne težine simptomi su koji se najčešće javljaju u uznapredovalim limfomima s velikom tumorskom masom, ali se mogu javiti i u drugim hematološkim novotvorinama.

Svrha rada

U literaturnim podacima se rijetko prikazuje kojom se učestalosti u inicijalnoj kliničkoj slici javljaju "B simptomi" u pacijenata oboljelih od MM. Posebno rijetko prikazana je učestalost noćnog znojenja i febriliteta. Stoga je svrha ovog retrospektivnog istraživanja bila odrediti kojom se učestalostijavljaju simptomi u novootkrivenih bolesnika s MM, s posebnim osvrtom na "B simptome".

Ispitanici i metode

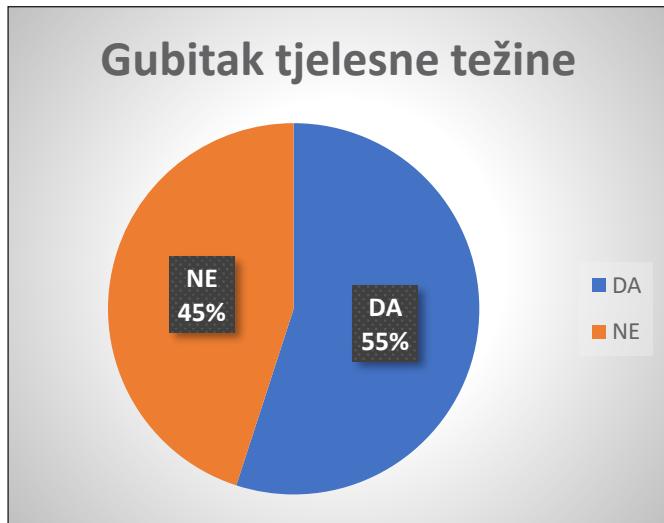
Ovim retrospektivnim istraživanjem obuhvaćen je 81 pacijent, od čega 34 muškaraca (42%) i 47 žena (58%), s otkrivenim MM, dijagnosticiran i kasnije liječen na Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci, u razdoblju od 2011. do 2020. godine. Raspon dobi bolesnika kretao se od 35 do 85 godina, a medijan dobi iznosio je 63 godine. Podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije Bolničkog informacijskog sustava (BIS), odnosno pretraživanjem povijesti bolesti. Analizirani su podaci u trenutku postavljanja dijagnoze, prije započinjanja bilo kakvog liječenja. Podaci za mršavljenje, noćno znojenje, povišenu tjelesnu temperaturu iznad 38°C, postojanje slabosti i bolova u kostima uzeti su binarno, tj. je li bolesnik imao ili nije imao taj simptom u svojoj anamnezi. U ovom radu hiperkalcijemija je definirana vrijednostima ukupnog kalcija u serumu višeg od 2.55 mmol/L. Bubrežno zatajenje definirano je kao vrijednost serumskog kreatinin iznad 90 µmol/L za žene te 104 µmol/L za muškarce. Anemija je za potrebe ovog istraživanja definirana kao vrijednost hemoglobina niža od 119 g/L za žene i 139 g/L za muškarce. Također su izdvojeni ispitanici s koncentracijom hemoglobina nižom za 20 g/L od donje granice normale, što je "CRAB" kriterij za anemiju. Bolesnika. Podaci su, zatim, deskriptivno statistički prikazani.

Rezultati

1. Mršavljenje

Gubitak težine kao jedan od "B simptoma" navelo je 45 pacijenata (55%) prilikom postavljanja dijagnoze.

Slika 1. Učestalost mršavljenja u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



2. Noćno znojenje

Noćno znojenje kao dio inicijalne kliničke slike imalo je 11 pacijenta (14%).

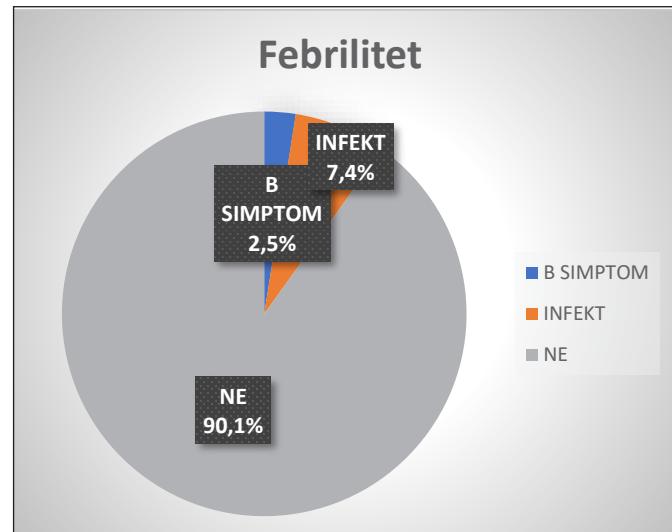
Slika 2. Učestalost noćnog znojenja u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



3. Febrilitet

Višednevni febrilitet je imalo 8 pacijenata, odnosno 9.9 % ispitanika. Od toga u dva pacijenta (2.5%) bio je prisutan febrilitet koji je dosegao 38°C i trajao najmanje 2 tjedna za koji nije utvrđena infektološka podloga te koji što se može shvatiti kao "B-simptom", dok je febrilitet kao posljedica infektivnog zbivanja pronađen u 6 pacijenata (7.4%): u dva pacijenta febrilitet kao posljedica infekcije mokraćnog sustava, u jedne pacijentice febrilitet kao posljedica respiratorne infekcije, u jedne pacijentice zbog sepsa (*S. pneumoniae*), u jednog pacijenta febrilitet je bio povezan s mastoiditisom, dok je u jedne pacijentice febrilitet bio uzrokovani akutnim kolecistitism.

Slika 3. Učestalost febriliteta u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



4. Ostali simptomi

4.1 Hiperkalcemija

U 20 pacijenata, odnosno 24.7 %, utvrđena je hiperkalcijemija, prilikom inicijalne obrade, prije početka terapije. U 2 pacijenta, odnosno 2.5% bila je prisutna hipokalcijemija.

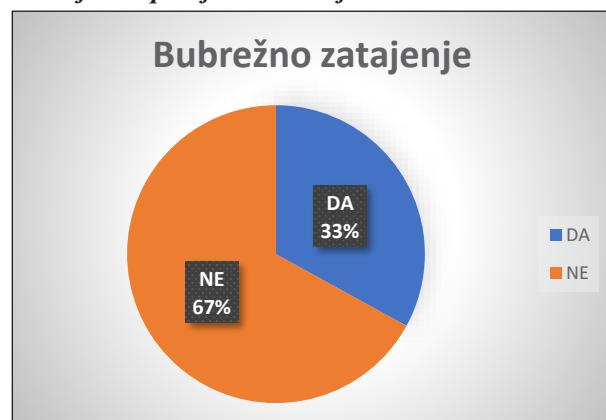
Tablica 1. Serumske vrijednosti kalcija prije terapije

Koncentracija kalcija	Broj (N) i postotak pacijenata
Hipokalcijemija >2.14	2 (2.5 %)
Normokalcijemija 2.14 – 2.53	59 (72.8 %)
Hiperkalcijemija <2.53	20 (24.7 %)

4.2 Bubrežno zatajenje

Bubrežno zatajenje definirano kao klirens kreatinin iznad $90 \mu\text{mol/L}$ za žene te $104 \mu\text{mol/L}$ za muškarce, u vrijeme postavljanja dijagnoze imalo je 27 pacijenata (33%).

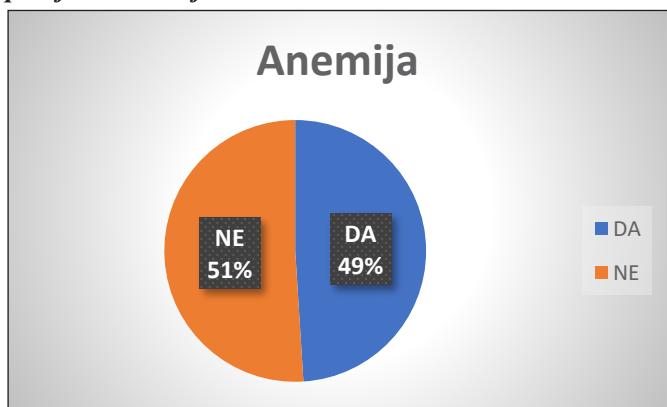
Slika 4. Učestalost bubrežnog zatajenja u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



4.3 Anemija

Anemija je kao dio "CRAB" simptoma (definirana vrijednostima hemoglobina nižim od 20 g/L od normalnih vrijednosti) u naših pacijenata prije početka terapije bila izražena u 40 osoba (približno 49%), Slabost kao osnovni simptom anemijске hipoksije bio je pak izražen u 35 pacijenata (43%).

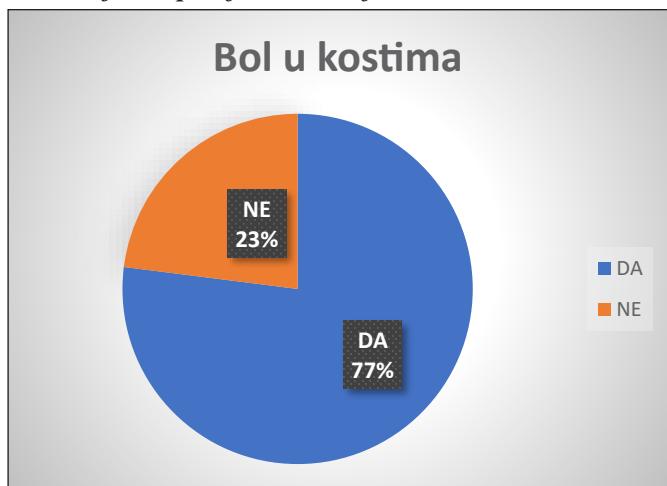
Slika 5. Učestalost anemije u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



4.4 Prisutnost боли у kostima

Od 81 pacijenta, 62 (77%) navodilo je bol u kostima kao jedan od inicijalnih simptoma.

Slika 6. Učestalost боли у kostima u inicijalnoj kliničkoj slici pacijenata oboljelih od MM



Rasprava

Mršavljenje je u ovoj studiji bilo prisutno u 55% pacijenata, što je znatno više nego u literaturnim podacima gdje se mršavljenje navodi u učestalosti od 2% do 24%^{4,3}. Razlog diskrepance može biti u tome što za potrebe ovog rada nije uziman precizni podatak koliko je kilograma bolesnik izgubio u točno određenom vremenskom razdoblju (definicija mršavljenja kao "B simptoma" je gubitak barem 10% tjelesne težine unutar 6 mjeseci), već je samo retrospektivno binarno ispitavano prisutstvo ili odсутство značajnijeg mršavljenja po subjektivnoj procjeni koju je pacijent navodio prilikom uziamanja anamneze. No, rezultati našeg istraživanja ukazuju da je gubitak tjelesne težine, kao jedne od sastavnica "B simptoma", češće prisutan pri inicijalnoj prezentaciji bolesti nego li se do sada mislilo, a uzrok samog mršavljenja moglo bi biti lučenje proupalnih citokina (prvenstveno IL-6) iz mikrookolišta tumora koji dovodi do redukcije masnog i mišićnog tkiva, ali i gubitak teka zbog trpljenja kronične boli ili prisustva bubrežnog zatajenja^{2,5}.

Noćno znojenje u našem radu navodi 14% pacijenata. Radovi koji opisuju učestalost noćnog znojenja kao dijela inicijalne kliničke slike MM su oskudni, a u rijetkim koji se bave ovim pitanjem noćno znojenje opisuje se s učestalosti od 0.02%⁵. Noćno znojenje obično je posljedica hipermetabolizma uzrokovanih brzo rastućom tumorskom masom, što je vjerojatno bio slučaj i u naših bolesnika. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da 9.9% pacijenta u inicijalnoj kliničkoj slici ima febrilitet, od čega je 2.5% vrućica nepoznatog podrijetla što zadovoljava kriterij "B simptoma". U literaturnim navodima se febrilitet nepoznatog uzroka kao inicijalna prezentacija bolesti spominje s učestalosti od 0.02% do 1%^{3,5}. Gledajući patogenezu MM, jedan od glavnih citokina koji je zaslужan za rast mijelomske stanice je interleukin-6, koji je ujedno i pirogen. Također, interleukin 1β i čimbenik nekroze tumora β, citokini odgovorni za patogenezu MM, također djeluju kao pirogeni⁵. Literatura zaključno navodi da, iako rijetko, febrilitet nepoznatog uzroka može biti prezentacija MM⁵. Učestalost uobičajenih (CRAB) simptoma u našem uzorku načelno je vrlo slična dosadašnjim literaturnim podacima¹⁻⁴, osim što se anemija i simptomi anemije rijeđe javljaju u našoj ispitivanoj skupini u odnosu na literaturne podatke za što nemamo jasnog objašnjenja, osim možda isuviše malog uzorka.

Zaključak

Zajedno, rezultati ovog preliminarnog istraživanja na vrlo ograničenom broju bolesnika govore da su tzv. "B-simptomi" češći u inicijalnoj prezentaciji MM nego li se to navodi u postojećoj literaturi pa je pri uzimanju anamneze pacijenata u slučaju utvrđivanja nekog od "B simptoma" u diferencijalnoj dijagnostici potrebno misliti i na MM.

Literatura:

1. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med Sci (Basel)*. 2021;9(1):3. Published 2021 Jan 20. doi:10.3390/medsci9010003
2. Jacob P Laubach. Multiple myeloma: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis. U: UpToDate, Rajkumar SV ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2022
3. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33. doi:10.4065/78.1.21
4. Talamo G, Farooq U, Zangari M, et al. Beyond the CRAB symptoms: a study of presenting clinical manifestations of multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010;10(6):464-468. doi:10.3816/CLML.2010.n.080
5. Mueller PS, Terrell CL, Gertz MA. Fever of unknown origin caused by multiple myeloma: a report of 9 cases. *Arch Intern Med*. 2002;162(11):1305-1309. doi:10.1001/archinte.162.11.1305

Slučaj JAK2 V617F pozitivnog B-NHL – prikaz slučaja

Željka Tkalčić Švabek¹, Zoran Šiftar¹, Viktor Zatezalo², Mirjana Mariana Kardum Paro¹

¹Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur

²Zavod za hematologiju, Klinika za unutrašnje bolesti, Klinička bolnica Merkur

Uvod

JAK / STAT (*Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*) signalni put smatra se jednim od središnjih u međustaničnoj komunikaciji, a njegova pretjerana funkcija ili mutacija JAK / STAT komponenata dovodi do upalnih i malignih bolesti. Poznate su i detaljno istražene 4 Janus tirozin kinaze (JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2), te 7 STAT aktivatora transkripcije (STAT 1-4, 5a, 5b, 6). Ujedno je opisano više od 50 citokina i faktora rasta koji sudjeluju u signalnom putu¹.

Vezanje aktiviranog izvanstaničnog liganda na receptore stanične membrane dovodi do podražaja i fosforilacije tirozin kinaza koje su nekovalentnim vezama povezane s receptorima. Transfosforilirani JAK potom fosforilira nizvodne supstrate uključujući receptore i STAT proteine. Aktivirani dimerizirani STAT proteini prenose se u jezgu, vežu za promotorskou regiju DNA i aktiviraju transkripciju ciljnih gena uključenih u regulaciju rasta stanica².

U mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN) abnormalna aktivacija JAK / STAT signalizacije obično je praćena mutacijama u tirozin kinazama. U stanicama koje nose točkastu mutaciju JAK2 V617F poremećene su inhibičke funkcije pseudokinazne domene JH2, što rezultira prekomjernom aktivacijom JAK / STAT puta^{2,3}.

Točkasta mutacija JAK2 V617F prisutna je kod MPN sa negativnim Philadelphia kromosomom (Ph-MPN) uključujući policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET) i idiopatsku mijelofibrozu (MF). Također je dokazana u malom broju drugih mijeloičnih zločudnih bolesti (akutnoj mijeloičnoj i kroničnoj mijeloičnoj leukemiji i mijelodisplastičnom sindromu), a rijde u limfoproliferativnim poremećajima^{3,4}.

Prikaz slučaja

Prikazujemo slučaj 74- godišnjeg muškarca hospitaliziranog u siječnju 2022. godine na Zavodu za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničke bolnice Merkur radi neutropenije praćene febrilitetom. U lipnju 2021. godine, nakon preboljenja akutne infekcije COVID-19, pacijentu je dijagnosticirana kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) praće-

na normocitnom anemijom, leukopenijom i trombocitopenijom u krvnoj slici. Pri prijemu se pacijent žalio na opću slabost u trajanju od nekoliko dana, a radi prisutne pancitopenije od strane liječnika opće medicine je upućen na hitni prijem.

Pri hitnom prijemu je u krvnoj slici (brojač krvnih stanica Sysmex XN-2000) prisutna leukopenija (Lkc $1,07 \times 10^9/L$, referentni interval $3,4-9,7 \times 10^9/L$) trombocitopenija (Trc $12 \times 10^9/L$, referentni interval $158-424 \times 10^9/L$) i normocitna anemija (Erc $2,95 \times 10^{12}/L$, referentni interval $4,34-5,72 \times 10^{12}/L$) uz koncentraciju hemoglobina od 88 g/L (referentni interval $138-175 \text{ g/L}$) i prosječan volumen eritrocita (MCV) od $87,1 \text{ fL}$ (referentni interval MCV $83,0-97,2 \text{ fL}$).

U citološkom razmazu periferne krvi nađeni su segmentirani neutrofili (53%) i limfociti (33%). Citočitološki razmaz koštane srži pokazao je da se radi o normocelularnoj do hipocelularnoj koštanoj srži sa granulopoezom na donjoj granici normale, ali morfološki urednoj sa svim razvojnim stadijima i bez umnoženih blasta. Eritropoeza je dobro zastupljena, normoblastična uz megakariocite hiperlobularnih jezgara koji otpuštaju trombocite. Limfociti su blago umnoženi, imunocitokemijski većim dijelom CD20 pozitivni što odgovara infiltraciji stanicama Ne-Hodgkinovog limfoma B stanica (NHL-B).

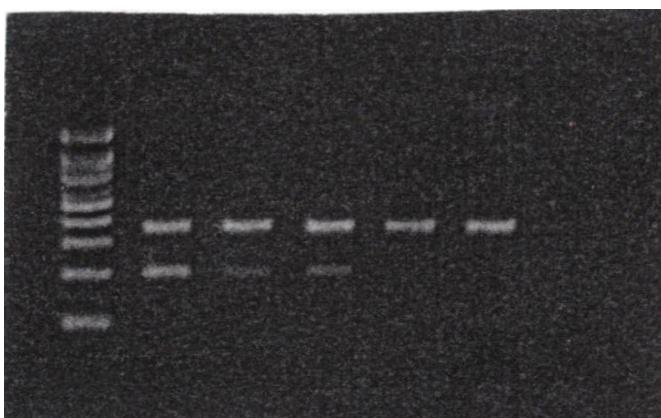
Imunofenotipizacijom koštane srži unutar limfocitne ograda nađen je uvećani udio B limfocita (u odnosu na sve leukocite čini 29% stanica) abnormalnog fenotipa: KAPPA klonalna populacija B limfocita sa pozitivnim izražajem biljega zrelih stanic, normalne razine CD45, CD19, CD20, CD22, CD81, CD79b, negativnim izražajem biljega CD5, CD10, CD23, CD43, ROR1, pozitivnim CD200 i uz graničan dio stanica pozitivnih na biljeg CD38 (29%). Fenotipski su isključeni slijedeći entiteti: B-kronična limfocitna leukemija, limfom plaštene zone, folikularni limfom, triholeukemija i varijanta triholeukemije. Zaključno je postavljena dijagnoza Ne-Hodgkinovog limfoma B stanica (NHL-B) (bez subtipa).

Molekularnom analizom koštane srži metodom alel- specifične lančane reakcije polimeraze (AS-

PCR) dokazano je prisustvo točkaste mutacije JAK2 V617F (Slika 1.).

Slika 1. Molekularna analiza točkaste mutacije JAK2 V617F (elektroforetsko razdvajanje produkata umnažanja; 2% agarozni gel).

M K+ P1 P2 P3 P4 K-



Legenda: M - biljeg veličine fragmenta (100 parova baza); K+ - kontrolni uzorak pozitivan na točkastu mutaciju JAK2 V617F (umnoženi i mutacijski (203 pb) i interni kontrolni produkt umnažanja (364 pb)); P1- P3 – uzorci pacijenata; K- kontrolni uzorak negativan na točkastu mutaciju JAK2 V617F (umnožen samo interni kontrolni produkt umnažanja (364 pb)).

Pacijent je hospitaliziran i smješten u Jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) radi klinički lošeg općeg stanja, neutropenije praćene febrilitetom i septičkog šoka, po stabilizaciji je premješten na Zavod za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti radi daljnje hematološke obrade i liječenja sa više linija antibiotske terapije (piperacilin- tazobaktom, meropenem, metronidazol). Perzistentni febrilitet prati stalna pancitopenija, anemija je korigirana odgovarajućim dozama koncentrata eritrocita, a trombocitopenija odgovarajućim dozama koncentrata filtriranih trombocita. Tjedan dana po hospitalizaciji pacijent je premješten u JIL radi razvoja plućnog edema i slike refraktornog septičkog šoka kada nastupa i smrtni ishod.

Zaključak

Točkasta mutacija JAK2 V617F je dokazano prisutna u stanicama mijeloične loze, dok je njena potencijalna prisutnost u stanicama limfoidne loze danas još uvijek nedovoljno istražena. U istraživanju Larsena i sur. u podskupini bolesnika sa Ph- MPN, točkasta mutacija JAK2 V617 je dokazana i u B- i T- limfocitima metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qRT- PCR) što ukazuje na moguću prisutnost točkaste mutacije JAK2 V617F već u ranim matičnim stanicama s po-

tencijalnom diferencijacijom i u limfoidne i mijeloidne stanice⁶.

Prisustvo dviju kroničnih mijeloidnih i limfoidnih neoplazmi u bolesnika povećava mogućnost nastanka neoplazmi iz iste pluripotentne matične stanice koje mogu biti i samo slučajnost. Aktivacija JAK-STAT signalnog puta je u limfoidnim zloćudnim bolestima dokazana, te je predloženo da točkasta mutacija JAK2 V617F u limfocitima može uzrokovati konstitutivne aktivacije JAK-STAT signalnog puta što naknadno uzrokuje staničnu proliferaciju u odsutnosti normalne stimulacije citokina, povećan broj stanica i potencijalno ukazuje na novi mehanizam nastanka B-KLL-a⁵.

Primarne JAK2 mutacije dovode do mijeloidnog, a ne limfoidnog malignog fenotipa te su u radu Kodali et al. pokazali prisutnost JAK2 mutacije u CD34+ progenitornim stanicama, stanicama mijeloidne loze, megakariocitima, B limfocitima, ali ne i u T limfocitima. Kodali et al. stoga zaključuju da uobičajena pluripotentna (mijeloidna i B limfoidna) progenitorna stanica koja ne uključuje T limfoidne stanice može dovesti do koegzistencije KLL-a i MPN-a. Za mehanizam po kojem jedan genetski događaj koji uključuje ove zajedničke mijeloidne i B limfoidne progenitorske stanice može dovesti do dva različita fenotipa KLL-a i MPN-a potrebna su daljnja istraživanja⁷.

Klonalna ekspanzija abnormalne pluripotentne hematopoetske matične stanice mogla bi biti odgovorna i za PV i NHL. Recentne studije sugeriraju moguću uključenost dva različita klona. Klinički značaj i uloga točkaste mutacije JAK2 u bolesnika s NHL- om, uključujući i difuzni B velikostanični limfom (DLBCL), još uvijek su nepoznati. Daljnje genetske i kliničke studije tek moraju ukazati na zajedničke mutacije gena za dvije bolesti i njihovu povezanost s ponašanjem bolesti tijekom liječenja⁸.

Zaključno, postojanje točkaste mutacije JAK2 V617F u limfocitima revidirano je u radovima, te pacijenti mogu ali i ne moraju pokazivati fenotip Ph- MPN.

Literatura:

1. Ayele TM, Muche ZT, Teklemariam AB, Kassie AB, Abebe EC. Role of JAK2/STAT3 Signaling Pathway in the Tumorigenesis, Chemotherapy Resistance, and Treatment of Solid Tumors: A Systemic Review. *J Inflamm Res.* 2022; 15: 1349–1364.
2. Hu X, li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Nov 26;6(1):402.
3. Chen E, Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2014) 2014 (1): 268–276.
4. Gou P, Zhang W , Giraudier S. Insights into the Potential Mechanisms of JAK2V617F Somatic Mutation Contributing Distinct Phenotypes in Myeloproliferative Neoplasms. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 18;23(3):1013.
5. Yang YN, Qin YW, Wang C. JAK2 V617F detected in two B-cell chronic lymphocytic leukemia patients without coexisting Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: A report of two cases. *Oncol Lett.* 2014 Aug; 8(2): 841–844.
6. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2007 Mar;136(5):745-51.
7. Kodali S, Chen C, Rathnasabapathy C, Wang JC. jAK2 mutation in a patient with CLL with coexistent myeloproliferative neoplasm (MPN). *Leuk Res.* 2009 Dec;33(12):e236-9.
8. Popov VM, Dobrea CM, Popescu M, Pleșe IE et al. Diffuse large B-cell lymphoma and polycythemia vera discovered at the onset - a rare association and its possible importance in lymphoma prognosis. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(1):313-8.

Aktivnost radne skupine Krohema za Ph(-) mijeloproliferativne neoplazme

Marko Lucijanić^{1,2} i Ivan Krečak^{3,4} u ime Radne skupine Krohema za Ph negativne mijeloproliferativne neoplazme

¹ Zavod za hematologiju KB Dubrava, Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

³ Odjel za unutarnje bolesti, Opća bolnica Šibenik, Šibenik

⁴ Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Kronične Philadelphia kromosom negativne kronične mijeloproliferativne neoplazme (MPN) zločudne su bolesti krvotvorne matične stanice, a karakterizirane su povišenim brojem obično morfološki neupadljivih, zrelih krvnih stanica u perifernoj krvi. Budući da je riječ o dugogodišnjim kroničnim bolestima koje se često slučajno otkriju u sklopu vađenja nalaza radi drugih razloga, često se čak i među hematolozima koji se bave drugim segmentima maligne hematologije ne doživljavaju kao kronične neoplazme, već neopravdano kao benigna stanja. Da pače, ponekad je vrlo teško razlikovati ove bolesti od reaktivnih stanja koja rezultiraju leukocitozom, poliglobulijom ili trombocitozom u perifernoj krvi, ali ovo je važno radi liječenja i kontroliranja rizika vezanih uz ove bolesti. Tri su klasična MPN entiteta, policitemija vera (PV) esencijalna trombocitemija (ET) i primarna mijelofibroza (PMF). U sklopu višegodišnjeg trajanja PV i ET, a zbog upalne i profibogene aktivnosti malignog klena, može doći do razvoja sekundarne mijelofibroze (SMF), dok puno razvijenoj slici PMF prethodi isto tako višegodišnja, često ne-prepoznata faza rane, odnosno pre-fibrotske PMF. Dominantan rizik ovih bolesti je neočekivano visoka sklonost arterijskim i venskim trombotskim incidentima. Procjena rizika i liječenje bolesnika s PV i ET usmjereni su na kontroliranje trombotskih događaja [1]. S druge strane u bolesnika s razvijenom fibrozom koštane srži dominira procjena rizika smrti i kontrola iscrpljujućih konstitucijskih simptoma i splenomegalije [2]. Shvaćanju biologije ovih bolesti i značajnom razvoju polja MPN pridonijela je i radna skupina Krohema za Ph(-) mijeloproliferativne neoplazme. Članovi ove radne skupine zajedničkim su angažmanom i međusobnim udruživanjem postigli izuzetnu međunarodno prepozнатu znanstvenu i stručnu aktivnost. Samo u periodu od 2018. do 2022. godine (posljednjih 5 godina) objavili su više od 55 publikacija koje se odnose na područje kroničnih Ph-negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi u časopisima indeksiranim u Current Contents / Web of Science bazama podataka, a koji

većinom pripadaju u prve dvije kvartile po utjecaju u svojim znanstvenim područjima (uključujući časopise Leukemia [3-5], Blood [6], Blood cancer journal [7,8], Blood advances [9], Thrombosis research [10], Annals of hematology [11-15] i druge).

Među najznačajnije stručne i znanstvene međunarodne doprinose ove radne skupine spomenuli bi:

Prepoznavanje kronične bubrežne bolesti kao važnog čimbenika trombotskog rizika i potencijalne renalne manifestacije samog MPNa [14,16-22].

Prepoznavanje i definiranje značajnog trombotskog rizika vezanog uz MPN u stadiju mijelofibroze, pogotovo u post-PV-SMF bolesnika, što je često zanemaren i do sada nedovoljno definiran aspekt bolesti [12,14,23-25]

Definiranje RDW, NLR i PLR u dijagnozi PV i prognostikaciji PV i MF [12,26-33] što su recentno prepoznale i druge međunarodne grupe stručnjaka.

Osobitosti kardiovaskularnih bolesti u MPN bolesnika, prepoznavanje međusobnog utjecaja biologije samog MPN i kardiovaskularnih faktora rizika, te definicija optimalnih ciljnih vrijednosti pojedinih metaboličkih parametara kao što su kolesterol, urati i drugi [1,34,35,24,36,37,10,38-44].

Istraživanje unutar-staničnih signalnih puteva i cirkulirajućih medijatora upale u bolesnika s MPN [45-50,15,51-56].

Osobitosti COVID-19 i drugih upalnih stanja u bolesnika s MPN, kao i specifičnosti pojedinih podgrupa bolesnika i lijekova korištenih u MPN bolesnika [57,8,58,9,23,11,5,7,3,13,59-61,41,39,44,10,2,62,6,63].

Ova izuzetna znanstvena aktivnost popraćena je aktivnim angažmanom članova radne skupine na međunarodnim i domaćim kongresima, te članovi redovito nastupaju na Europskom hematološkom kongresu s prihvaćenim posterima i na Krohemu s predavanjima s originalnim znanstvenim rezultatima. To je prepoznato i od strane Zaklade Krohema koja je na jesenskom sastanku Krohema 2022. godine u Osijeku radnoj skupini Krohema za Ph(-) mijeloproliferativne neoplazme dodijelila godišnju na-

gradu za izvrsnost i znanstvena i stručna postignuća u hematologiji. Nagradu je u ime radne skupine primio prof. dr. sc. Rajko Kušec koji je dugogodišnji voditelj i pokretač njene iznimne aktivnosti. Prof. Kušec dio svoje profesionalne aktivnosti posvetio je razvoju novih molekularno-genetičkih analiza upravo u području MPN, kao što su mutacijske analize CALR i MPL te ekson 12 JAK2 gena. Službeno prijavljeni članovi radne skupine su (abecednim redom) Ivona Arić, Petra Berneš, Ana Boban, Filip Brusić, Josipa Budimir, Dubravka Čaržavec, Barbara Dreta, Irena Drmić-Hofman, Amina Fazlić Džankić, Tajana Grenko, Renata Gutt Nuk, Ivana Horvat, Stjepan Kovačević, Ivan Kralj, Ivan Krečak, Marin Kursar, Rajko Kušec, Luka Kužat, Ana Livun, Eva Lovrić, Marko Lucijanić, Martina Marjanović, Marko Martinović, Marin Međugorac, Zdravko Mitrović, Vlatka Periša, Nika Popović, Pavle Rončević, Anica Sabljić, Martina Sedinić, Dubravka Sertić, Ena Sorić, Tajana Stoos-Veić, Dejan Strahija, Željka Tkaličić Švabek, Ružica Tokalić, Toni Valković, Tamara Vasilj, Josipa Vlasac Glasnović, Renata Zadro i Silva Zupančić-Šalek. Iako nisu formalni članovi radne skupine, brojni drugi hematolozi i članovi Krohema također su aktivni koautori i začetnici mnogih radova.

Kvaliteta i značaj rada radne skupine Krohema za Ph-negativne mijeloproliferativne neoplazme posebno se očituje u tome da su mladi hematolozi aktivni članovi koji su uključeni i aktivni nosioci stručne i znanstvene aktivnosti. Veselimo se uključivanju i aktivnosti novih članova, a pozivamo i sve ostale na suradnju koja svijetu prikazuje hrvatsku hematologiju u najboljem mogućem svijetu.

Literatura:

1. Krecak I, Lucijanic M, Verstovsek S (2022) Advances in Risk Stratification and Treatment of Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. Current hematologic malignancy reports 17 (5):155-169. doi:10.1007/s11899-022-00670-8
2. Lucijanic M, Krecak I, Soric E, Galusic D, Holik H, Perisa V, Moric Peric M, Zekanovic I, Kusec R (2023) Palpable spleen size is differently prognostic in primary and secondary myelofibrosis. Leuk Lymphoma:1-4. doi:10.1080/10428194.2023.2179360
3. Lucijanic M, Kusec R (2021) Ruxolitinib withdrawal due to the COVID-19. Leukemia 35 (4):1218. doi:10.1038/s41375-021-01214-4
4. Lucijanic M, Skelin M, Kusec R (2019) Second primary malignancies in myeloproliferative neoplasms and the role of aspirin. Leukemia 33 (10):2554. doi:10.1038/s41375-019-0553-2
5. Barbui T, Iurlo A, Masciulli A, Carobbio A, Ghirardi A, Carioli G, Sobas MA, Elli EM, Rumi E, De Stefano V, Lunghi F, Marchetti M, Daffini R, Gasior Kabat M, Cuevas B, Fox ML, Andrade-Campos MM, Palandri F, Guglielmelli P, Benevolo G, Harrison C, Foncillas MA, Bonifacio M, Alvarez-Larran A, Kiladjian JJ, Bolaños Calderón E, Patriarca A, Quiroz Cervantes K, Griessammer M, Garcia-Gutierrez V, Marin Sanchez A, Magro Mazo E, Ruggeri M, Hernandez-Boluda JC, Osorio S, Carreno-Tarragona G, Sagues Serrano M, Kusec R, Navas Elorza B, Angona A, Xicoy Cirici B, Lopez Abadia E, Koschmieder S, Cattaneo D, Bucelli C, Cichocka E, Masternak Kulikowska de Nałęcz A, Cavalca F, Borsani O, Betti S, Benajiba L, Bellini M, Curto-Garcia N, Rambaldi A, Vannucchi AM (2022) Second versus first wave of COVID-19 in patients with MPN. Leukemia 36 (3):897-900. doi:10.1038/s41375-022-01507-2
6. Pagano L, Salamanca-García J, Marchesi F, Blennow O, Gomes da Silva M, Glenthøj A, van Doesum J, Bilgin YM, López-García A, Itri F, Nunes Rodrigues R, Weinbergerová B, Farina F, Dragonetti G, Berg Venemyr C, van Praet J, Jaksic O, Valković T, Falces-Romero I, Martín-Pérez S, Jiménez M, Dávila-Valls J, Schönlein M, Ammatuna E, Meers S, Delia M, Stojanoski Z, Nordlander A, Lahmer T, Imre Pinczés L, Buquicchio C, Piukovics K, Ormazabal-Vélez I, Fracchiolla N, Samarkos M, Méndez GA, Hernández-Rivas J, Espigado I, Cernan M, Petzer V, Lamure S, di Blasi R, Marques de Almedia J, Dargenio M, Biernat MM, Sciumè M, de Ramón C, de Jonge N, Batinić J, Ajayeb A, Marchetti M, Fouquet G, Fernández N, Zambrotta G, Sacchi MV, Guidetti A, Demirkiran F, Prezioso L, Rácil Z, Nucci M, Mladenović M, Liévin R, Hanáková M, Gräfe S, Sili U, Machado M, Cattaneo C, Adžić-Vukičević T, Verga L, Labrador J, Rahimli L, Bonanni M, Passamonti F, Pagliuca A, Corradini P, Hoenigl M, Koehler P, Busca A, Cornely OA (2022) Breakthrough COVID-19 in vaccinated patients with hematologic malignancies: results from the EPICOVIDEHA survey. Blood 140 (26):2773-2787. doi:10.1182/blood.2022017257
7. Lucijanic M, Krecak I, Soric E, Sedinic M, Sabljic A, Derek L, Jaksic O, Kusec R (2021) Thrombocytosis in COVID-19 patients without myeloproliferative neoplasms is associated with better prognosis but higher rate of venous thromboembolism. Blood cancer journal 11 (11):189. doi:10.1038/s41408-021-00585-2
8. Barbui T, Carobbio A, Ghirardi A, Iurlo A, De Stefano V, Sobas MA, Rumi E, Elli EM, Lunghi F, Gasior Kabat M, Cuevas B, Guglielmelli P, Bonifacio M, Marchetti M, Alvarez-Larran A, Fox L, Bellini M, Daffini R, Benevolo G, Carreno-Tarragona G, Patriarca A, Al-Ali HK, Andrade-Campos MMM, Palandri F, Harrison C, Foncillas MA, Osorio S, Koschmieder S, Magro Mazo E, Kiladjian JJ, Bolaños

- Calderón E, Heidel FH, Quiroz Cervantes K, Griesshammer M, Garcia-Gutierrez V, Sanchez AM, Hernandez-Boluda JC, Lopez Abadia E, Carli G, Sagues Serrano M, Kusec R, Xicoy Cirici B, Guenova M, Navas Elorza B, Angona A, Cichocka E, Kulikowska de Nałęcz A, Cattaneo D, Bucelli C, Betti S, Borsani O, Cavalca F, Carbonell S, Curto-Garcia N, Benajiba L, Rambaldi A, Vannucchi AM (2022) Breakthrough infections in MPN-COVID vaccinated patients. *Blood Cancer J* 12 (11):154. doi:10.1038/s41408-022-00749-8
9. Sobas M, Kiladjian JJ, Beauverd Y, Curto-Garcia N, Sadjadian P, Shih LY, Devos T, Krochmalczyk D, Galli S, Bieniaszewska M, Seferynska I, McMullin MF, Armatys A, Spalek A, Waclaw J, Zdrenghea M, Legros L, Girodon F, Lewandowski K, Angona Figueras A, Samuelsson J, Abuin Blanco A, Cony-Makhoul P, Collins A, James C, Kusec R, Lauermannova M, Noya MS, Skowronek M, Szukalski L, Szmigelska-Kaplon A, Wondergem M, Dudchenko I, Gora Tybor J, Laribi K, Kulikowska de Nalecz A, Demory JL, Le Du K, Zweegman S, Besses Raebel C, Skoda R, Giraudier S, Griesshammer M, Harrison CN, Ianotto JC (2022) Real-world study of children and young adults with myeloproliferative neoplasms: identifying risks and unmet needs. *Blood Adv* 6 (17):5171-5183. doi:10.1182/bloodadvances.2022007201
10. Krečak I, Holik H, Zekanović I, Morić Perić M, Marketin T, Coha B, Gverić-Krečak V, Vodanović M, Lucijanić M (2022) Thrombotic risk in secondary polycythemia resembles low-risk polycythemia vera and increases in specific subsets of patients. *Thrombosis research* 209:47-50. doi:10.1016/j.thromres.2021.11.025
11. Krečak I, Celić-Bunić S, Skelin M, Lucijanić M, Verstovsek S, Kušec R (2022) Concomitant multiple sclerosis and polycythemia vera successfully treated with glatiramer acetate. *Ann Hematol* 101 (8):1885-1886. doi:10.1007/s00277-022-04839-2
12. Lucijanic M, Krecak I, Verstovsek S, Soric E, Galusic D, Holik H, Perisa V, Peric MM, Zekanovic I, Kusec R (2021) Higher red blood cell distribution width predicts thrombosis risk in primary and secondary myelofibrosis. *Annals of hematology*. doi:10.1007/s00277-021-04724-4
13. Lucijanic M, Galusic D, Soric E, Sedinic M, Cubela M, Huzjan Korunic R, Pejsa V, Kusec R (2020) Ruxolitinib treatment improves muscle mass in patients with myelofibrosis. *Annals of hematology* 100 (4):1105-1106. doi:10.1007/s00277-020-04243-8
14. Lucijanic M, Galusic D, Krecak I, Sedinic M, Holik H, Perisa V, Moric Peric M, Zekanovic I, Stoos-Veic T, Kusec R (2020) Reduced renal function strongly affects survival and thrombosis in patients with myelofibrosis. *Annals of hematology* 99 (12):2779-2785. doi:10.1007/s00277-020-04239-4
15. Lucijanic M, Livun A, Tupek KM, Stoos-Veic T, Pejsa V, Kusec R (2018) Higher Sclerostin/SOST expression is associated with lower percentage of circulatory blasts and better prognosis in patients with myelofibrosis. *Ann Hematol* 97 (7):1293-1294. doi:10.1007/s00277-018-3294-9
16. Krecak I, Holik H, Martina MP, Zekanovic I, Coha B, Gverić-Krečak V (2020) Chronic kidney disease could be a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *International journal of hematology* 112 (3):377-384. doi:10.1007/s12185-020-02898-7
17. Lucijanic M, Krecak I, Kusec R (2022) Renal disease associated with chronic myeloproliferative neoplasms. *Expert review of hematolgy* 15 (2):93-96. doi:10.1080/17474086.2022.2039117
18. Krečak I, Lucijanić M (2021) Modifying the Effects of Cytoreductive Drugs on Kidney Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Pharmacology* 106 (7-8):451-452. doi:10.1159/000516894
19. Krečak I, Morić Perić M, Zekanović I, Holik H, Coha B, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2021) Beneficial effect of ACE inhibitors on kidney function in polycythemia vera. *Wiener klinische Wochenschrift*. doi:10.1007/s00508-021-01812-3
20. Krečak I, Holik H, Morić Perić M, Zekanović I, Coha B, Lucijanić M (2022) Chronic Kidney Disease has a Higher Prevalence in Polycythemia Vera than in Secondary Polycythemia, a Matched Case-Control Analysis. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. doi:10.1007/s12288-022-01624-z
21. Lucijanic M, Krecak I (2023) Chronic kidney disease and thrombotic risk in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *J Thromb Thrombolysis*. doi:10.1007/s11239-023-02779-w
22. Krečak I, Holik H, Lucijanić M (2022) The Prevalence of Simple Kidney Cysts in Polycythemia Vera and Its Clinical Associations. *Indian J Hematol Blood Transfus* 38 (2):429-431. doi:10.1007/s12288-021-01515-9
23. Lucijanic M, Krecak I, Soric E, Sabljic A, Galusic D, Holik H, Perisa V, Moric Peric M, Zekanovic I, Kusec R (2022) Patients with post polycythemia vera myelofibrosis might experience increased thrombotic risk in comparison to primary and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia research* 119:106905. doi:10.1016/j.leukres.2022.106905
24. Lucijanic M, Krecak I, Galusic D, Sedinic M, Holik H, Perisa V, Moric Peric M, Zekanovic I, Stoos-Veic T, Pejsa V, Kusec R (2022) Higher serum uric acid is associated with higher risks of thrombosis and death in patients with primary myelofibrosis. *Wien Klin Wochenschr* 134 (3-4):97-103. doi:10.1007/s00508-020-01802-x
25. Lucijanic M, Krecak I, Soric E, Sabljic A, Galusic D, Holik H, Perisa V, Peric MM, Zekanovic I, Kusec R (2022) MPN-541 Estimated Plasma Volume Status in Patients With Primary Myelofibrosis and Associated Thrombotic and Mortality Risks. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 22 Suppl 2:S341-s342. doi:10.1016/s2152-2650(22)01467-7
26. Krečak I, Holik H, Morić Perić M, Zekanović I, Coha B, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2022) High platelet-to-lymphocyte ratio may differentiate polycythemia vera from secondary polycythemia. *Wien Klin Wochenschr* 134 (11-12):483-486. doi:10.1007/s00508-022-02027-w
27. Krečak I, Holik H, Morić Perić M, Zekanović I, Coha B, Valović Krečak M, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2022) Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as prognostic biomarkers in polycythemia vera. *Int J Lab Hematol* 44 (4):e145-e148. doi:10.1111/ijlh.13786
28. Lucijanic M, Cicic D, Stoos-Veic T, Pejsa V, Lucijanic J, Fazlic Dzankic A, Vlasac Glasnovic J, Soric E, Skelin M, Kusec R (2018) Elevated Neutrophil-to-Lymphocyte-ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Myelofibrosis: Inflammatory Biomarkers or Representatives of Myeloproliferation Itself? *Anticancer Res* 38 (5):3157-3163. doi:10.21873/anticancres.12579
29. Krečak I, Lucijanić M (2023) Can we use platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) to differentiate JAK2-unmutated erythrocytosis from polycythemia vera? *Eur J Intern Med* 108:120-121. doi:10.1016/j.ejim.2022.09.023
30. Krečak I, Lucijanić M (2022) Platelet-to-lymphocyte ratio and accelerated atherosclerosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 32 (8):2010-2011. doi:10.1016/j.numecd.2022.05.001
31. Lucijanic M, Pejsa V, Jaksic O, Mitrovic Z, Tomasovic-Loncaric C, Stoos-Veic T, Prka Z, Pirsic M, Haris V, Vasilj T, Kusec R (2016) The Degree of Anisocytosis Predicts Survival

- in Patients with Primary Myelofibrosis. *Acta haematologica* 136 (2):98-100. doi:10.1159/000445247
32. Krečak I, Krečak F, Gverić-Krečak V (2020) High red blood cell distribution width might predict thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood cells, molecules & diseases* 80:102368. doi:10.1016/j.bcmd.2019.102368
 33. Holik H, Krečak I, Gverić-Krečak V, Vučinić Ljubić I, Coha B (2021) Higher red blood cell distribution width might differentiate primary from secondary polycythemia: A pilot study. *International journal of laboratory hematology* 43 (2):e68-e71. doi:10.1111/ijlh.13373
 34. Krecak I, Sabljic A, Lucijanic M (2022) Understanding and modifying thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms. *J Cardiol.* doi:10.1016/j.jcc.2022.12.009
 35. Krečak I, Holik H, Coha B, Perić MM, Zekanović I, Krečak MV, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2021) Low-density lipoprotein (LDL) and the risk of thrombotic events in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Annals of hematology* 100 (5):1335-1336. doi:10.1007/s00277-021-04431-0
 36. Krecak I, Lucijanic M, Gveric-Krecak V, Durakovic N (2020) Hyperuricemia might promote thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Leukemia & lymphoma*. doi:10.1080/10428194.2020.1731503
 37. Krečak I, Holik H, Morić Perić M, Zekanović I, Coha B, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2022) Serum osmolarity in polycythemia vera and its clinical associations. *Int J Lab Hematol* 44 (5):e191-e194. doi:10.1111/ijlh.13844
 38. Krečak I, Zekanović I, Holik H, Morić Perić M, Coha B, Gverić-Krečak V (2022) Estimating plasma volume using the Strauss-derived formula may improve prognostication in polycythemia vera. *International journal of laboratory hematology* 44 (2):e69-e71. doi:10.1111/ijlh.13716
 39. Krečak I, Holik H, Zekanović I, Morić-Perić M, Coha B, Gverić-Krečak V (2021) Autoimmune disorders and the risk of thrombotic events in polycythaemia vera. *Leuk Res* 110:106667. doi:10.1016/j.leukres.2021.106667
 40. Krečak I, Morić Perić M, Zekanović I, Holik H, Coha B, Gverić-Krečak V, Lucijanić M (2021) No Impact of the Increased Number of Cardiovascular Risk Factors on Thrombosis and Survival in Polycythemia Vera. *Oncology research and treatment* 44 (4):201-203. doi:10.1159/000514347
 41. Krečak I, Holik H, Morić-Perić M, Zekanović I, Coha B, Gverić-Krečak V (2020) The impact of statins on the intensity of phlebotomies in polycythemia vera. *Annals of hematology* 99 (4):911-912. doi:10.1007/s00277-020-03950-6
 42. Horvat I, Boban A, Zadro R, Antolic MR, Serventi-Seiwerth R, Roncetic P, Radman I, Sertic D, Vodanovic M, Pulanic D, Basic-Kinda S, Durakovic N, Zupancic-Salek S, Vrhovac R, Aurer I, Nemet D, Labar B (2019) Influence of Blood Count, Cardiovascular Risks, Inherited Thrombophilia, and JAK2 V617F Burden Allele on Type of Thrombosis in Patients With Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 19 (1):53-63. doi:10.1016/j.clml.2018.08.020
 43. Hatalova A, Schwarz J, Gotic M, Penka M, Hrubisko M, Kusec R, Egyed M, Griesshammer M, Podolak-Dawidziak M, Hellmann A, Klymenko S, Niculescu-Mizil E, Petrides PE, Grosicki S, Sever M, Cantoni N, Thiele J, Wolf D, Gisslinger H (2018) Recommendations for the diagnosis and treatment of patients with polycythaemia vera. *Eur J Haematol.* doi:10.1111/ejh.13156
 44. Krečak I, Lucijanić M, Zekanović I, Holik H, Morić Perić M, Šupe M, Coha B, Gverić-Krečak V (2022) Hematocrit to hemoglobin ratio as a prognostic marker in polycythemia vera. *Wiener klinische Wochenschrift* 134 (3-4):110-117. doi:10.1007/s00508-021-01967-z
 45. Galusic D, Lucijanic M, Livun A, Radman M, Lucijanic J, Drmic Hofman I, Kusec R (2022) CDC25c expression in patients with myelofibrosis is associated with stronger myeloproliferation and shorter overall survival. *Wien Klin Wochenschr* 134 (1-2):83-85. doi:10.1007/s00508-020-01738-2
 46. Galusic D, Lucijanic M, Livun A, Radman M, Blaslov V, Vicelic Cutura L, Petric M, Miljak A, Lucijanic J, Drmic Hofman I, Kusec R (2020) Higher AURKA and PLK1 expression are associated with inferior overall survival in patients with myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis* 81:102396. doi:10.1016/j.bcmd.2019.102396
 47. Lucijanic M, Livun A, Tupek KM, Stoos-Veic T, Pejsa V, Jonjic Z, Dzankic AF, Ivic M, Kusec R (2020) Neutral effect of Glioma-associated oncogene-1 expression on survival in myelofibrosis. *Wien Klin Wochenschr* 132 (15-16):464-466. doi:10.1007/s00508-019-01572-1
 48. Krecak I, Gveric-Krecak V, Roncetic P, Basic-Kinda S, Gulin J, Lapic I, Fumic K, Illic I, Horvat I, Zadro R, Holik H, Coha B, Peran N, Aurer I, Durakovic N (2018) Serum chitotriosidase: a circulating biomarker in polycythemia vera. *Hematology* 23 (10):793-802. doi:10.1080/10245332.2018.1498157
 49. Lucijanic M, Galusic D, Krecak I, Sedinic M, Soric E, Holik H, Perisa V, Moric Peric M, Zekanovic I, Stoos-Veic T, Kusec R (2020) C reactive protein to albumin ratio as prognostic marker in primary and secondary myelofibrosis. *Leukemia & lymphoma* 61 (12):2969-2974. doi:10.1080/10428194.2020.1789627
 50. Lucijanic M, Cicic D, Stoos-Veic T, Pejsa V, Rahelic D, Lucijanic T, Vasilj T, Ivic M, Sedinic M, Kusec R (2018) Combining information on C reactive protein and serum albumin into the Glasgow Prognostic Score strongly discriminates survival of myelofibrosis patients. *Blood cells, molecules & diseases* 72:14-16. doi:10.1016/j.bcmd.2018.06.001
 51. Lucijanic M, Prka Z, Pejsa V, Stoos-Veic T, Lucijanic J, Kusec R (2018) Prognostic implications of low transferrin saturation in patients with primary myelofibrosis. *Leukemia research* 66:89-95. doi:10.1016/j.leukres.2018.01.017
 52. Lucijanic M, Veletic I, Rahelic D, Pejsa V, Cicic D, Skelin M, Livun A, Tupek KM, Stoos-Veic T, Lucijanic T, Maglicic A, Kusec R (2018) Assessing serum albumin concentration, lymphocyte count and prognostic nutritional index might improve prognostication in patients with myelofibrosis. *Wiener klinische Wochenschrift* 130 (3-4):126-133. doi:10.1007/s00508-018-1318-z
 53. Lucijanic M, Livun A, Stoos-Veic T, Pejsa V, Jaksic O, Cicic D, Lucijanic J, Romic Z, Orebovec B, Aralica G, Miletic M, Kusec R (2018) High absolute basophil count is a powerful independent predictor of inferior overall survival in patients with primary myelofibrosis. *Hematology* 23 (4):201-207. doi:10.1080/10245332.2017.1376843
 54. Krečak I, Krečak F, Gverić-Krečak V, Bilandžija I, Rončević P, Fumić K, Batinić J, Duraković N, Radman M (2019) Serum calprotectin: A circulating biomarker of the inflammatory state in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood Cells Mol Dis* 79:102344. doi:10.1016/j.bcmd.2019.102344
 55. Krečak I, Gverić-Krečak V, Lapić I, Rončević P, Gulin J, Fumić K, Krečak F, Holik H, Duraković N (2021) Circulating YKL-40 in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Acta Clin Belg* 76 (1):32-39. doi:10.1080/17843286.2019.1659467
 56. Krečak I, Peran N, Lapić I, Gverić-Krečak V, Krečak F, Rončević P, Duraković N (2021) Serum procalcitonin

- in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Wien Klin Wochenschr 133 (1-2):62-64. doi:10.1007/s00508-020-01651-8
57. Hasselbalch H, Skov V, Kjær L, Larsen MK, Knudsen TA, Lucijanić M, Kusec R (2022) Recombinant Interferon- β in the Treatment of Polycythemia Vera and Related Neoplasms: Rationales and Perspectives. *Cancers (Basel)* 14 (22). doi:10.3390/cancers14225495
58. Barbui T, Carobbio A, Ghirardi A, Iurlo A, Sobas MA, Elli EM, Rumi E, De Stefano V, Lunghi F, Marchetti M, Daffini R, Gasior Kabat M, Cuevas B, Fox ML, Andrade-Campos MM, Palandri F, Guglielmelli P, Benevolo G, Harrison C, Foncillas MA, Bonifacio M, Alvarez-Larran A, Kiladjian JJ, Bolaños Calderón E, Patriarca A, Quiroz Cervantes K, Griesshammer M, Garcia-Gutierrez V, Marin Sanchez A, Magro Mazo E, Carli G, Hernandez-Boluda JC, Osorio S, Carreno-Tarragona G, Sagues Serrano M, Kusec R, Navas Elorza B, Angona A, Xicoy Cirici B, Lopez Abadia E, Koschmieder S, Cattaneo D, Bucelli C, Cichocka E, de Nałcz AK, Cavalca F, Borsani O, Betti S, Bellini M, Curto-Garcia N, Rambaldi A, Vannucchi AM (2022) Determinants of early triage for hospitalization in myeloproliferative neoplasm (MPN) patients with COVID-19. *Am J Hematol* 97 (12):E470-e473. doi:10.1002/ajh.26732
59. Heibl S, Gisslinger B, Jäger E, Barna A, Gurbisz M, Stegemann M, Bettelheim P, Machherndl-Spandl S, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Uyanik G, Hoermann G, Stauder R, Thaler J, Kusec R, Valent P, Gisslinger H, Geissler K (2020) Clinical, Hematologic, Biologic and Molecular Characteristics of Patients with Myeloproliferative Neoplasms and a Chronic Myelomonocytic Leukemia-Like Phenotype. *Cancers (Basel)* 12 (7). doi:10.3390/cancers12071891
60. Asp J, Skov V, Bellosillo B, Kristensen T, Lippert E, Dicker F, Schwarz J, Wojtaszewska M, Palmqvist L, Akiki S, Aggerholm A, Tolstrup Andersen M, Girodon F, Kjær L, Oppliger Leibundgut E, Pancrazzi A, Vorland M, Andrikovics H, Kralovics R, Cassinat B, Coucelo M, Eftimov A, Haslam K, Kusec R, Link-Lenczowska D, Lodé L, Matiakowska K, Naguib D, Navaglia F, Novotny GW, Percy MJ, Sudarikov A, Hermouet S, Pallisgaard N (2019) International external quality assurance of JAK2 V617F quantification. *Ann Hematol* 98 (5):1111-1118. doi:10.1007/s00277-018-3570-8
61. Lucijanic M, Mitrovic Z, Cicic D, Prka Z, Pejsa V, Livun A, Stoos-Veic T, Romic Z, Zivkovic M, Lucijanic I, Fabris Z, Kusec R (2018) Increased mean platelet volume (MPV) is an independent predictor of inferior survival in patients with primary and secondary myelofibrosis. *International journal of hematology* 107 (2):166-172. doi:10.1007/s12185-017-2348-4
62. Sertić Z, Lucijanić M, Bašić-Kinda S, Serventi Seiwerth R, Periša V, Sertić D, Coha B, Pulanić D, Perić Z, Desnica L, Mikulić M, Vodanović M, Radman-Livaja I, Šegulja D, Rogić D, Valković T, Aurer I, Duraković N (2022) Non-Myelofibrosis Chronic Myeloproliferative Neoplasm Patients Show Better Seroconversion Rates after SARS-CoV-2 Vaccination Compared to Other Hematologic Diseases: A Multicentric Prospective Study of KroHem. *Biomedicines* 10 (11). doi:10.3390/biomedicines10112892
63. Pagano L, Salmanton-García J, Marchesi F, Busca A, Corradini P, Hoenigl M, Klimko N, Koehler P, Pagliuca A, Passamonti F, Verga L, Višek B, İlhan O, Nadali G, Weinbergerová B, Córdoba-Mascuñano R, Marchetti M, Collins GP, Farina F, Cattaneo C, Cabrita A, Gomes-Silva M, Itri F, van Doesum J, Ledoux MP, Čerňan M, Jakšić O, Duarte RF, Magliano G, Omrani AS, Fracchiolla NS, Kulasekararaj A, Valković T, Poulsen CB, Machado M, Glenthøj A, Stoma I, Ráčil Z, Piukovics K, Navrátil M, Emarah Z, Sili U, Maertens J, Blennow O, Bergantim R, García-Vidal C, Preziosi L, Guidetti A, Del Principe MI, Popova M, de Jonge N, Ormazabal-Vélez I, Fernández N, Falces-Romero I, Cuccaro A, Meers S, Buquicchio C, Antić D, Al-Khabori M, García-Sanz R, Biernat MM, Tisi MC, Sal E, Rahimli L, Čolović N, Schönlein M, Calbacho M, Tascini C, Miranda-Castillo C, Khanna N, Méndez GA, Petzer V, Novák J, Besson C, Duléry R, Lamure S, Nucci M, Zambrotta G, Žák P, Seval GC, Bonuomo V, Mayer J, López-García A, Sacchi MV, Booth S, Ciceri F, Oberti M, Salvini M, Izuzquiza M, Nunes-Rodrigues R, Ammatuna E, Obr A, Herbrecht R, Núñez-Martín-Buitrago L, Mancini V, Shwaylia H, Sciumè M, Essame J, Nygaard M, Batinić J, Gonzaga Y, Regalado-Artamendi I, Karlsson LK, Shapetska M, Hanakova M, El-Ashwah S, Borbényi Z, Çolak GM, Nordlander A, Dragonetti G, Maraglino AME, Rinaldi A, De Ramón-Sánchez C, Cornely OA (2021) COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICOVIDEHA). *J Hematol Oncol* 14 (1):168. doi:10.1186/s13045-021-01177-0

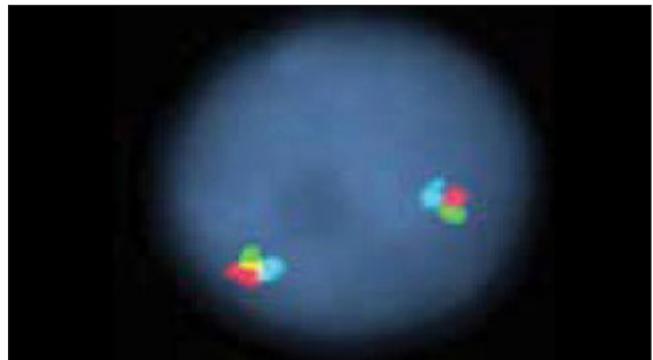
Eozinofilija

Ivana Franić Šimić, Iva Semren

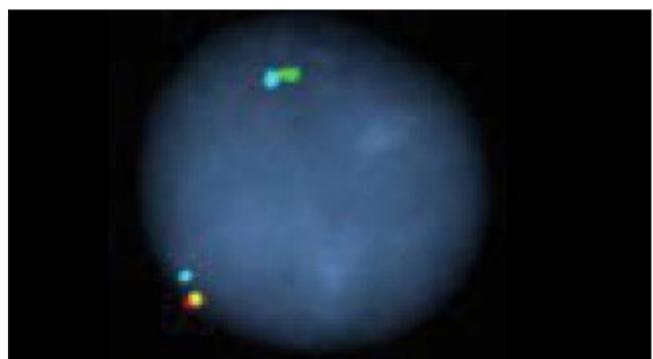
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

Hipereozinofilija je stanje definirano brojem eozinofila većim od $1,5 \times 10^9$ u perifernoj krvi. Zbog povišenog broja eozinofila postoji mogućnost infiltracije organa te posljedičnog oštećenja organa. Eozinofilije dijelimo na primarne (klonalnog porijekla), sekundarne (reaktivnog porijekla) te nasljedne (familijarne). Pri dijagnozi hipereozinofilije, potrebno je u prvom redu isključiti sekundarne uzroke. Dijagnostika primarne eozinofilije temelji se na citologiji (morfologiji), imunofenotipizaciji, klasičnoj citogenetici, flourescentnoj in situ hibridizaciji (FISH), te molekularnoj dijagnostici klonalnosti staničnog receptora T. Prema klasifikaciji svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization, WHO*) iz 2016 godine¹, primarni poremećaji se mogu definirati prema tipu promjene koja se detektira metodom klasične citogenetike i/ili FISH-a. Potrebno je isključiti rearanžmane PDGFRA, PDGFRB, FRGFR1 i JAK2 gena^{1,2}. Ako se nađe određena promjena ovim metodama, klasificiraju se u skupine definirane prema WHO; mijeloidne/limfoidne novotvorine sa PDGFRA rearanžmanom, mijeloidne/limfoidne novotvorine sa PDGFRB rearanžmanom, mijeloidne/limfoidne novotvorine sa FGFR1 rearanžmanom, te zasebni entitet: mijeloidne/limfoidne novotvorine sa PCM1::JAK2¹. Klasična citogenetika je probirna metoda koja nam daje uvid u cijelokupni genom te nam omogućuje morfološku analizu kromosoma. Ograničenje metode je da su vidljive samo velike promjene (delecije, adicije) te da nisu vidljive kriptične translokacije koje mogu biti zastupljene kod eozinofilije. Kao komplementarna metoda klasičnoj citogenetici nastupa FISH metoda, koja je vrlo specifična te nam u ovom slučaju može biti od pomoći za detektiranje rekurentnih translokacija u eozinofiliji. Kod PDGFRA gena, najčešća promjena je stvaranje PDGFRA::FIP1L1 fuzijskog gena kojoj prethodi submikroskopska delecija (800 kb) koja nije vidljiva klasičnom citogenetikom³ (Slika 1. i Slika 2.).

Slika 1. Slika interfazne jezgre urednog nalaza Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe. Metodom I-FISH-a nije dokazana delecija CHIC2 gena te stvaranje fuzijskog gena PDGFRA::FIP1L1.



Slika 2. Slika interfazne jezgre u kojoj se dogodila delecija CHIC2 gena (crvena boja) u jednoj fuziji te je došlo do stvaranja fuzijskog gena PDGFRA::FIP1L1, dokazano Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe.



Najčešće se javlja u mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN) s eozinofilijom, blastičnoj transformaciji MPN-a, akutnoj mijeloičnoj leukemiji (AML). Kod PDGFRB gena najčešća promjena je ETV6::PDGRB fuzijski gen. Najčešće se javlja u MPN-u, MPN/MDS-u, kroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji (cMMol), juvenilnoj mijelomonocitnoj leukemiji (JMMol), atipičnoj kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (aCML), AML. Rearanžman FRGFR1 gena javlja se češće kod mlađih osoba, te je povezan sa težom kliničkom slikom te agresivnijim oblikom bolesti. Najčešće se javlja u MPN-u, AML-u te T limfoblastičnim limfomima. PCM1::JAK2 je 2016 uvršten u klasifikaciju kao zasebni entitet jer je povezan sa lošim odgovorom na terapiju te težim oblikom bolesti. Osim PCM1::JAK2, opisane su i ETV6::JAK2, BCR::JAK2.

Kao zaključak možemo navesti da je stanje hiperozinofilije heterogena bolest kojoj je najprije potrebno isključiti sekundarne uzroke, kako bi bili sigurni da je bolest klonalnog porijekla. Cjelokupnom hematološkom dijagnostikom (citologijom, imunofenotipom, citogenetikom te molekularnom) potrebno je pronaći uzrok klonalnih promjena. Otkrivanjem određenih fuzijskih prijepisa omogućena je klasifikacija bolesti prema WHO (2). Neke promjene nam mogu dati uvid u to kako će pacijent odgovoriti na terapiju (npr. promjene PDGFRA i PDGFRB gena dovode do boljeg odgovora na terapiju). Metoda molekularne dijagnostike (eng. Next generation sequencing) tek se treba otkriti prognostički značaj određenih gena, promjena te mutacija.

Literatura:

1. Shomali W, Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2019;94(10):1149-1167.
2. Andreas Reiter, Jason Gotlib; Myeloid neoplasms with eosinophilia. *Blood* 2017; 129 (6): 704–714.
3. Bain BJ. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1. *Haematologica.* 2010;95(5):696-8.
4. Michael Bartoschek, Kristian Pietras, PDGF family function and prognostic value in tumor biology, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 503, Issue 2, 2018, Pages 984-990.

Zašto je dokazivanje ekstrahemoglobinskog željeza najčešća citokemijska metoda našeg Odjela?

Koraljka Gjadrov Kuveždić, Sunčica Ries

Odjel za hematološku citologiju, citologiju dojke, urološku, ORL citologiju, citologiju štitnjače, Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

Uvod

Citomorfološki kriteriji dijagnoze mijelodisplastičnog sindroma(MDS) i njegovih podtipova jasno su definirani, pogotovo uz pozitivnu reakciju dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza.

Ekstrahemoglobinsko željezo nalazi se u cito-plazmi eritroblasta u obliku siderotičnih zrnca ispu-njenih željezom za sintezu hema. Takvi sideroblasti redovito se nalaze u koštanoj srži i moguće ih je do-kazati citokemijskom reakcijom berlinskog modrila. Snižen broj sideroblasta ili njihov nestanak pronala-zimo kod bolesnika s velikim nedostatkom željeza. Broj sideroblasta je povećan kod bolesnika s pore-mećajem iskorištavanja željeza, u megaloblastičnoj i sideropeničnoj anemiji; kod ubrzane razgradnje eritrocita, u hemolitičkim anemijama, nakon sple-nektomije; prilikom otrovanja olovom.

Prstenasti sideroblasti imaju najmanje pet sidero-tičnih zrnaca koji okružuju minimalno dvije trećine opsega jezgre, u mitohondrijima perinuklearno po-loženim u obliku prstena; sa visokom specifičnošću upućuju na postojanje mijelodisplastičnog sindroma s ring sideroblastima (MDS-RS), a nalaze se i u kon-genitalnim nasljednim sideroblastičnim anemijama.

Odjel za hematološku citologiju, citologiju dojke, urološku, ORL citologiju, citologiju štitnjače Klinič-kog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb godišnje postavi citomorfološku dijagnozu oko 80 akutnih leukemija i oko 30 MDS-a, od kojih su pet do sedam godišnje dijagnosticirani kao MDS-RS neovisno radi li se o MDS-RS sa displazijom jedne ili dviju i/ili više loza(MDS-RS-SLD ili MDS-RS-MLD). Sukladno tome broj citokemijskih reakcija osnovnog razvrstavanja pri dijagnostici akutnih le-ukemija trebao bi uvelike premašiti broj citokemij-skih reakcija dokazivanja ekstrahemoglobinskog že-ljeza pri dijagnostici MDS-a, no u praksi je obrnuto. Iz toga proizlazi pitanje zašto je tako; stoga smo odlučili istražiti opravdanost naših analiza u odnosu na raspon kliničkih upita vezanih uz pojedine uzorce.

Uzorci i metode

U istraživanje su uključeni bolesnici koji su upu-ćeni u naš Odjel od strane hematologa, onkologa, internista imunologa i u manjoj mjeri liječnika osta-lih specijalnosti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kao i ostalih centara u Republici Hrvatskoj i izvan nje. Uzorci koštane srži aspirirani su na prsnoj kosti ili prednjoj kristi sjedne kosti, s iglom veličine 16G i bojeni May Gruenwald Giemsom (MGG, Merck) kao standardnim bojenjem. Reakcija dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza izvedena je s kom-pletom za bojanje slobodnog ionskog željeza (Fe^{3+}) Hematognost Fe^{TM} (Merck) u slučajevima gdje je uočena displazija na jednoj ili više hematopoeznih loza ili u slučaju kliničke sumnje (uputne dijagnoze) MDS-a. U obrađenim uzorcima željezo je ana-lizirano u eritroblastima, kao i u fagocitima strome koštane srži i ekstracelularno. Dijagnoza MDS-a postavljena je prema kriterijima 4. revidiranog izda-nja klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije (SZO); pozitivnom reakcijom dokazivanja ekstra-hemoglobinskog željeza podrazumijeva se posto-janje ring sideroblasta u više od 15% promatranih eritroblasti, ukoliko je moguće izbrojati najmanje 200 eritroblasti. Kao kontrolna reakcija korišten je uzorak koštane srži urednog izgleda i odnosa među stanicama¹.

Rezultati

Tijekom petogodišnjeg perioda (od siječnja 2017. do prosinca 2021.) analizirali smo 13149 uzoraka koštane srži; dokazivanje ekstrahemoglobinskog že-ljeza rađeno je u 877/13149 uzoraka, gdje je uočena displazija barem jedne hematopoezne loze (najčešće eritrocitopoeze) u svim uzorcima. U 5/877 slučaja uzorak je bio neadekvatan za analizu (nije pronađen dovoljan broj eritroblasti za analizu). Reakcija je bila pozitivna u 73/877 uzoraka te je postavljena dijagnoza MDS-RS-a. U 14/73 slučaja postojala je i klinička sumnja na MDS; u ostalim slučajevima uputna dijagnoza bila je anemija, infiltracija koštane srži stranim stanicama, dijagnoza pojedinih auto-imunih i neuroloških bolesti itd. (Tablica 1).

Tablica 1. Uputna dijagnoza pri pozitivnoj reakciji dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza.

Uputna dijagnoza	Broj pozitivnih reakcija
MDS i/o-	14
anemija	12
makrocitna anemija	2
megaloblastična anemija	3
pancitopenija	11
razno (Ca, melanoma, CVI, MS)	31
UKUPNO	73

MDS-mijelodisplastični sindrom; Ca-karcinom;
CVI – cerebro vaskularni inzult; MS – multipla skleroza

Dijagnoza MDS-RS je potvrđena i drugim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima. Reakcija je bila negativna u 794/877 slučaja.

U 65/794 slučajeva postotak ring sideroblasta iznosio je između 3% i 14%, što čini negativan nalaz prema kriterijima klasifikacije SZO; u 19/65 slučajeva postavljena je dijagnoza MDS-a (najčešće MDS s viškom blasta (MDS-EB) i MDS-MLD), koja je potvrđena kliničkim i drugim laboratorijskim pokazateljima; u 15/19 slučaja postojala je i klinička sumnja na MDS, a ostale uputne dijagnoze prikazane su na Tablici 2.

Tablica 2. Uputne dijagnoze pri citomorfološki dijagnosticiranom MDS-u uz negativnu reakciju dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza.

Uputna dijagnoza	Broj negativnih reakcija	Citomorfološka dijagnoza MDS-a (N)
anemija (gravis, makrocitna, mikrocytina, hemolitička, megaloblastična)	97	5
MDS (io, susp)	90	31
pancitopenija	68	6
trombocitopenija	30	2
akutna leukemija	16	3
imunološke bolesti (SLE, RA, sclerodemija, sy Sjoegren)	19	2
razno (Ca, melanoma, CVI, MS, derma, bez dg)	409	3
UKUPNO	729	52

MDS – mijelodisplastični sindrom; SLE – sistemni lupus eritematodes; RA – reumatoidni artritis; Ca- karcinom; CVI – cerebrovaskularni inzult; MS – multipla skleroza; derma – dermatološke bolesti; dg - dijagnoza

U 2/65 slučaja, uz uputnu dijagnozu MDS-a postavljena je citomorfološka sumnja na MDS, a drugim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima postavljena je dijagnoza MDS-a. U preostalih 729 negativnih slučajevima (nije dokazan niti jedan prstenasti eritroblast) u 52/729 smo postavili dijagnozu MDS-a, najčešće MDS-EB i MDS-MLD, što je potvrđeno i drugim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima; u 31/52 slučaja bila je postavljena i klinička sumnja na MDS; ostale uputne dijagnoze prikazane su u Tablici 3. Sve reakcije očitane su uz očekivane rezultate kontrolnih reakcija.

Tablica 3. Uputne dijagnoze pri citomorfološki dijagnosticiranom MDS-u uz postotak ring sideroblasta 3-14%.

Uputna dijagnoza	Broj reakcija uz postotak ring sideroblasta 3-14%	Citomorfološka dijagnoza MDS-a (N)
MDS	15	7
Pancitopenija	11	2
anemija	10	2
Megaloblastična anemija	4	1
Akutna leukemija	2	2
Razno (Ca, SLE, MS, CVI)	23	5
UKUPNO	65	19

MDS – mijelodisplastični sindrom; Ca- karcinom; SLE-sistemni lupus eritematodes; MS-multipla skleroza; CVI-cerebrovaskularni inzult

Rasprijava

Iskusnom citomorfologu koji se drži postavljenih kriterija dijagnoza MDS-a ne predstavlja problem, pogotovo u slučaju dokazanih ring sideroblasta u više od 15% promatranih eritroblasti koji nedvojbeno određuju podtip MDS-RS. Većinu populacije čine bolesnici starije životne dobi kod kojih je MDS dijagnosticiran kao hematološka bolest *de novo*, kao sekundarna hematološka bolest ili kao hematološka bolest koja se javlja uz već postojeće komorbiditete. To se posebno odnosi na bolesnike na dugotrajnoj kemoterapiji, terapiji kortikosteroidima ili biološkoj terapiji pa ne čudi činjenica da je najviše kliničkih upita u toj skupini bolesnika. Promjene na stanicama, poput diseritrocitopoeze uzrokovane dugotrajnim uzimanjem pojedinih lijekova, kao i citopenija jedne ili dviju loza imitira hematološku bolest i

bez pobliže citomorfološke analize koštane srži nije moguće razlučiti radi li se zaista o MDS-u ili o reaktivnom stanju. Kod pojedinih bolesnika pozitivna reakcija dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza može potvrditi citomorfološku dijagnozu MDS-a, no negativna reakcija neće biti razlučni faktor u slučajevima izraženih displastičnih promjena na sve tri hematološke loze, naročito na trombocitopoezi. Druga najčešća uputna dijagnoza se odnosi na različite vrste anemija. U obzir ponovno treba uzeti činjenicu da se analiziraju uzorci bolesnika s krovičnim bolestima na dugotrajnoj terapiji, no reakcija dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza pomaže citomorfologu u diferencijalnoj dijagnozi makrocitnih anemija. Čak i s negativnom reakcijom ekstrahemoglobinskog željeza citomorfološka procjena rezervi željeza predstavlja upotrebljivu informaciju o procjeni stanja bolesnika. U rijetkim slučajevima kada je jedini jasni klinički upit mogući MDS kod bolesnika, a analizom koštane srži nisu nađeni znakovi dishematopoeze, reakcija dokazivanja ekstrahemoglobinskog željeza, u slučaju da nisu pronađeni ring sideroblasti, potvrđuje negativan citomorfološki nalaz.

Ovaj prikaz rađen je prema kriterijima 4. revidiranog izdanja klasifikacije SZO iz 2017. godine, gdje je MDS-RS definiran citopenijom i displazijom jedne ili više hematopoeznih loza, s manje od 5% blasta u razmazu koštane srži i bez blasta u razmazu periferne krvi, s nalazom ring sideroblasta u više od 15% promatranih eritroblasti u razmazu koštane srži; ukoliko je pridružena i SF3B1 mutacija (većina slučajeva) dijagnoza se može postaviti pri nalazu 5% ring sideroblasta. U predstojećem 5. izdanju klasifikacije SZO MDS se definira kao mijelodisplastična neoplazma, a kao posebna skupina izdvajaju se MDS-i sa citogenetičkim nepravilnostima. Ta grupa uključuje MDS s niskim brojem blasta i SF3B1 mutacijom (MDS-SF3B1), gdje je „cut off“ više od 5% ring sideroblasta; termin MDS s niskim blastima i ring sideroblastima može se koristiti u slučajevima kad je broj ring sideroblasta prisutan u više od 15% promatranih eritroblasti (uz *wild type* SF3B1)². Prema ovim kriterijima skupina bolesnika u kojoj je broj ring sideroblasta iznosio između 3 i 14%, uz odgovarajuće molekularno testiranje, vjerojatno bi bila uvrštena u kategoriju MDS-a s citogenetičkim nepravilnostima i broj potvrđenih slučajeva MDS-a u toj skupini bio bi značajno viši nego što smo prikazali.

Reakcija ekstrahemoglobinskog željeza jednostavna je i pristupačna metoda koja u slučaju po-

zitivnog nalaza određuje dijagnozu i vrijedna je citomorfološka metoda pri dijagnostičkoj dilemi. U našem Odjelu primjenjuje se ne samo za dijagnostiku MDS-a već i pri procjeni hematološkog statusa bolesnika na dugotrajnim terapijama, što objašnjava činjenicu da broj izvedenih analiza premašuje broj citokemijskih analiza usko specifičnih za dijagnostiku hematoloških bolesti (akutnih leukemija).

Literatura:

1. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H i sur: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izd. Lyon: IARC; 2017, str.97.
2. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio JF, Bejar R i sur: The %th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumors: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. Leukemia 2002;36:1703-1719.

Hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje stečene imunosne trombotične trombocitopenične purpure u odraslih

Dražen Pulanić^{1,2}, Ana Boban^{1,2}, Désirée Coen Herak^{3,4}, Davor Galušić⁵, Hrvoje Holik⁶, Ivan Krečak⁷, Marija Miloš^{3,8}, Zdravko Mitrović^{2,9}, Delfa Radić-Krišto^{2,10,11}, Goran Rinčić¹², Jasminka Sinčić Petričević¹³, Toni Valković^{14,15}

¹ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb

⁴ Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁵ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Split

⁶ Odjel za hematologiju OB Josip Benčević Slavonski Brod

⁷ Odjel za hematologiju OB Šibenik

⁸ Farmaceutski fakultet Sveučilišta u Mostaru

⁹ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KB Dubrava

¹⁰ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KB Merkur

¹¹ Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

¹² Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Sestre milosrdnice

¹³ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Osijek

¹⁴ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Rijeka

¹⁵ Medicinski fakultet i Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci

Sažetak

Trombotična trombocitopenična purpura (TTP) je rijetka bolest obilježena trombocitopenijom, mikroangiopatskom hemolitičkom anemijom, neurološkim poremećajima, oslabljenom bubrežnom funkcijom te vrućicom. Uzrok TTP-a je nedostatak enzima ADAMTS13 koji cijepa von Willebrandov faktor. Nedostatak ADAMTS13 je najčešće stečen u odraslih i nastaje kao rezultat stvaranja anti-ADAMTS13 antitijela. Bolest ima šaroliku kliničku sliku s trombozama u malim krvnim žilama i posljedičnom ishemijom različitih organa, potrebna je žurna dijagnostička obrada i hitno liječenje kako bi se spriječila inače visoka smrtnost. Posljednjih nekoliko godina u Hrvatskoj je značajno unaprijeđena dijagnostika TTP-a, a postaju nam dostupne i nove terapijske mogućnosti. Stoga su Radna skupina za benigne hematološke bolesti Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem i Hrvatsko društvo za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) izradili su hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje stečenog imunosnog TTP-a u odraslih.

Ključne riječi: trombotična trombocitopenična purpura, ADAMTS13, smjernice, plazmafereza, rituksimab, kaplacizumab

1. Uvod

Posljednjih nekoliko godina u Hrvatskoj je značajno unaprijeđena dijagnostika trombotične trombocitopenične purpure (TTP), bolesti koja u akutnoj prezentaciji ima visoku smrtnost, posebno ako se

odmah ne prepozna i ne započne s liječenjem. Također, postaju nam dostupne i nove terapijske mogućnosti u liječenju TTP-a. Prepoznavši potrebu ujednačavanja dijagnostike i terapije TTP-a u Hrvatskoj, Radna skupina za benigne hematološke bolesti Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem i Hrvatsko društvo za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) izradili su hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje stečenog imunosnog TTP-a u odraslih.

TTP je rijetka mikroangiopatija karakterizirana pojavom trombocitopenije, mikroangiopatske hemolitičke anemije, poremećaja bubrežne funkcije, neuroloških poremećaja te febriliteta¹. Bolest nastaje zbog teškog manjka ADAMTS13, metaloproteinaze koja cijepa von Willebrandov faktor (VWF) te na taj način inaktivira velike multimerne VWF-a. Veliki multimeri VWF-a rezultiraju stvaranjem mikrotromba i ishemijom i oštećenjem različitih organa. Nedostatak ADAMTS13 je najčešće stečeni i posljedica je pojave anti-ADAMTS13 autoantitijela koja uzrokuju stečeni imunosno posredovani TTP. Postoji i nasljedni kongenitalni TTP kao rezultat mutacije gena koji kodiraju ADAMTS13.

TTP je rijetka bolest s procijenjenom incidencijom od 1,5-6 slučajeva na milijun ljudi¹. Najčešće se pojavljujeiza četrdesete godine života, ali i u djece kada se najčešće radi o kongenitalnom obliku bolesti. Smrtnost TTP-a bez primjene terapije doseže i 90%, a čak i uz odgovarajuću terapiju iznosi 10-15%¹.

2. Postavljanje dijagnoze TTP-a

TTP je prije početka liječenja izmjenom plazme bio definiran klasičnom pentadom (povišena temperatura, mikroangiopatska hemolitička anemija, trombocitopenija, neurološki deficit i bubrežna insuficijencija)². Danas se smatra dovoljnim za posumnjati na TTP ako su prisutni mikroangiopatska hemolitička anemija i trombocitopenija ($<100 \times 10^9/L$) bez jasnog uzroka¹. Ukoliko postoji klinička sumnja na TTP, tada bismo trebali uz pomoć PLASMIC zbroja (engl. score) procijeniti vjerojatnost dijagnoze TTP-a³.

PLASMIC zbroj sastoji se od sedam laboratorijskih i anamnističkih parametara od kojih svaki nosi jedan bod (Tablica 1.). Neovisnom evaluacijom potvrđena je senzitivnost od 90% i specifičnost od 92% za teški deficit ADAMTS13 ako je zbroj bodova veći ili jednak od šest⁴. U tom slučaju, potrebno je što prije poslati uzorak za ADAMTS13 testiranje i planirati plazmaferezu.

Tablica 1. PLASMIC zbroj.

Parametar	Zbroj
Broj trombocita $< 30 \times 10^9/L$	(+1)
Kreatinin $< 177 \mu\text{mol}/L$	(+1)
Hemoliza: indirektni bilirubin $> 34 \mu\text{mol}/L$ ili broj retikulocita $> 2,4\%$ ili nemjerljiv haptoglobin	(+1)
Bez aktivne maligne bolesti unazad godinu dana	(+1)
Bez transplantacije solidnih organa ili krvotvornih matičnih stanica	(+1)
INR $< 1,5$	(+1)
MCV $< 90 \text{ fL}$	(+1)
Rezultat: zbroj ≥ 6 znači visoki rizik za teški deficit ADAMTS13	

Učestalost kliničkih manifestacija kod bolesnika s TTP-om varira: neurološki poremećaji (39-80%), povišena tjelesna temperatura (10-72%), gastro-intestinalne smetnje (35-39%) i bubrežna ozljeda (10-75%)⁵. Dio kliničke slike mogu biti i bolovi u prsima. Anemija je prisutna kod gotovo svih bolesnika s prosječnom vrijednošću hemoglobina od 80 g/L, dok je trombocitopenija teška s prosječnom vrijednošću oko $20 \times 10^9/L$ ⁶. Hemolizu potvrđujemo povišenom vrijednošću retikulocita, laktat dehidrogenaze (LDH) te ukupnog i nekonjugiranog bilirubina. Haptoglobin je nemjerljivo nizak, a direktni

Coombsov test negativan⁷. Bubrežna ozljeda je najčešće praćena mikrohematurijom i proteinurijom i vrijednost kreatinina je blago povišena, no rijetko iznad $177 \mu\text{mol}/L$. Kod 50% bolesnika možemo naći pozitivna antinuklearna protutijela (ANA). Protrombinsko vrijeme, fibrinogen i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme su urednih vrijednosti. Povišena vrijednost troponina upućuje na ozljedu miokarda⁸.

U citološkom razmazu periferne krvi nalazimo shistocite, prosječno 4-8% od svih eritrocita⁵. Potrebno je broj shistocita izbrojati na 1000 eritrocita, a više od 1% shistocita upućuje na mikroangiopatsku hemolitičku anemiju⁹. Patohistološki vidljivi su amorfni trombi i subendotelijalni hijalini depoziti u malim arteriolama i kapilarama različitih organa (srce, gušterića, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, možak)¹⁰. No, središnje mjesto u dijagnostici TTP-a u današnje vrijeme ima mjerjenje plazmatske aktivnosti ADAMTS13.

2.1. Laboratorijska dijagnostika TTP-a

S obzirom kako je funkcionalna aktivnost ADAMTS13 ključni test za razlikovanje TTP-a od ostalih trombotskih mikroangiopatija od presudne su važnosti:

- izbor optimalne metode za određivanje aktivnosti ADAMTS13
- pravilno uzorkovanje, pažljivo postupanje s uzorcima i njihova pohrana kako bi se izbjegao gubitak aktivnosti *in vitro*
- u bolesnika sa sumnjom na novootkriveni TTP uzorkovanje provesti prije postupka plazmafereze (izmjene plazme), kako bi se osiguralo dobivanje pouzdanog rezultata početne (bazalne) aktivnosti ADAMTS13 s obzirom da aktivnosti ADAMTS13 mogu biti lažno povišene ako je uzorkovanje provedeno nakon plazmafereze¹¹.

2.1.1. Uzorkovanje i postupanje s uzorcima

Jedini pogodni uzorak za određivanje funkcionalne aktivnosti ADAMTS13, inhibitora i protutijela na ADAMTS13 citratna je plazma. Krv ispitanika potrebno je prikupiti u epruvetu (spremnik) s puferiranim trinatrijevim citratom kao antikoagulantom u koncentraciji od 105-109 mmol/L (tj. 3,2%-tni trinatrijev citrat, *epruveta s plavim čepom - koagulacijska epruveta*). Važno je naglasiti kako se nikako ne smije rabiti EDTA kao antikoagulant (*epruveta s ljubičastim čepom*) jer EDTA nepovratno snažno

inhibira enzimsku aktivnost ADAMTS13¹¹. U tom slučaju rezultati aktivnosti ADAMTS13 su lažno izrazito sniženi ili čak dolazi do potpunog izostanka aktivnosti, što za posljedicu može imati pogrešno postavljanje dijagnoze TTP-a. Nakon uzorkovanja, potrebno je što je prije moguće, uzorak pune citratne krvi ispitniku (1 epruveta s plavim čepom) dostaviti u koagulacijski laboratorij Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb, s tim što je najmanji prihvatljivi volumen krvi 3 mL. Do transporta u laboratorij epruvetu treba pohraniti u uspravnom položaju isključivo na sobnoj temperaturi.

2.1.2. Postupak slanja krvi za određivanje ADAMTS13 iz drugih bolnica (ustanova)

Postupak slanja krvi za određivanje ADAMTS13 iz drugih bolnica (ustanova) ovisan je o vremenskom roku u kojem je moguće dostaviti uzorak.

- Ukoliko je uzorak moguće dostaviti u laboratorij Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) KBC Zagreb unutar maksimalno 4 sata od uzorkovanja, potrebno je uz prethodnu najavu dostaviti 1 epruvetu s plavim čepom (najmanji prihvatljivi volumen krvi je 3 mL) i ako je ikako moguće dostaviti još i 1 epruvetu s ljubičastim čepom. Nakon uzorkovanja, preporučljivo je osigurati dostavu uzorka u najkraćem mogućem razdoblju, ako je ikako izvedivo.
- U slučaju kada nije moguće dostaviti uzorak unutar 4 sata nakon uzorkovanja potrebno je u dogovoru s laboratorijem bolnice (ustanove) iz koje se uzorak šalje za analizu, pripremiti i pohraniti uzorak do slanja u KZLD KBC Zagreb na sljedeći način:

- uzorak citratne krvi potrebno je odmah nakon zaprimanja centrifugirati dva puta po 15 minuta na sobnoj temperaturi na 2000 g, što približno odgovara 4000 okretaja po minuti
- nakon centrifugiranja, plazmu je potrebno u što kraćem roku, odvojiti od staničnog dijela i prenijeti u najmanje dva polipropilenska spremnika (odgovarajući volumen: 0,5 - 1,0 mL)
- svaki spremnik treba označiti punim imenom i prezimenom ispitniku, datumom rođenja i identifikacijskim brojem (matični broj osiguranika i/ili jedinstveni identifikacijski broj u laboratoriju), te obvezno navesti

informaciju o vrsti uzorka (npr. citratna plazma), datumu i vremenu uzorkovanja¹²

- pripremljene uzorke citratne plazme odmah zamrznuti, po mogućnosti na -70 °C, a ukoliko to nije moguće, poželjno je na temperaturi nižoj od -40 °C¹³, a u iznimnom slučaju za kratkotrajnu pohranu na najmanje -20 °C
- u slučaju ako je uzorak citratne plazme vidljivo hemoliziran zbog hemolize *in vitro*, potrebno je ponoviti uzorkovanje i postupiti prema prethodnim uputama
- uzorci zamrznute plazme trebaju se obvezno transportirati na suhom ledu^{13,14} (brzom poštom) tijekom radnog tjedna, od ponedjeljka do petka, kako bi zaprimljeni uzorci ostali čvrsto zamrznuti.

Prilikom slanja uzorka za određivanje ADAMTS13 potrebno je ispuniti obrazac za određivanje ADAMTS13 (Slika 1.) koji je dostupan na mrežnim stranicama (Krohem, Hrvatsko društvo za hematologiju HLZ-a, KZLD KBC Zagreb) te ispunjeni poslati zajedno s uzorcima i/ili na adresu e-pošte: mmilos@kbc-zagreb.hr ili dcoen@kbc-zagreb.hr.

Slika 1. Obrazac za slanje uzorka za određivanje ADAMTS13.

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB			
KLINIČKI ZAVOD ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU			
Odjel za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju			
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb			
Telefon: (01) 2367 262			
OBRAZAC ZA SLANJE UZORKA ZA ODREĐIVANJE ADAMTS13			
PODATCI O LIJEĆNIKU KOJI JE NARUČIO ANALIZU		PODATCI O BOLESNIKU ZA KOJEG SE TRAŽI ANALIZA	
LIJEĆNIK: _____	IME I PREZIME: _____	NAZIV USTANOVE: _____	SPOL: M Ž
KONTAKT LIJEĆNIKA:	DATUM I GODINA RODENJA: _____	Telefon: _____ e mail: _____	Krvna grupa: _____
<input type="checkbox"/> HITNO (AKUTNO STANJE, 1. određivanje) <input type="checkbox"/> Uzorak uzet prije plazmafereze DA NE <input type="checkbox"/> KONTROLNI UZORAK		VRSTA POSLJANIH UZORKA ZA ADAMTS13 <input type="checkbox"/> PUNA CIRATNA KRV* (1 epruveta / plavi čep; najmanje 3 mL) *ako je uzorak krvi moguće dostaviti unutar maksimalno 4 sata od uzorkovanja <input type="checkbox"/> CITRATNA PLAZMA** (poželjno najmanje 2 alikvota od 0,5 - 1 mL) **ako nije moguće dostaviti uzorak pune krvi unutar 4 sata od uzorkovanja (priprema plazme: odvojiti plazmu nakon centrifugiranja pune citratne krvi na sobnoj temperaturi 2 x 15 min na 4000 okr/min i zamrznuti što prije, po mogućnosti na -70 °C) Obvezno je obilježjene uzorke zamrznute plazme transportirati na suhom ledu (brzom poštom) tijekom radnog tjedna od ponedjeljka do petka.	
<input type="checkbox"/> Kontaktirati koagulacijski laboratorij KZLD, KBC Zagreb na telefonski broj 01 2367 262 ili doc. dr. sc. Mariju Miloš (mob: 091 492 2230) doc. dr. sc. Désirée Coen Herak (mob: 098 589 107)		<input type="checkbox"/> PUNA EDTA KRV*** (1 epruveta s ljubičastim čepom) ***poželjno poslati uz punu citratnu krvi ako je uzorak krvi moguće dostaviti unutar maksimalno 4 sata od uzorkovanja Datum i vrijeme uzimanja uzorka: _____ Datum i vrijeme slanja uzorka: _____	
PRETRAGA:		Uzorci se šalju na adresu:	
<input type="checkbox"/> (P) ADAMTS13 AKTIVNOST (kvantitativna metoda) <input type="checkbox"/> (P) INHIBITORI NA ADAMTS13 (test miješanja) <input type="checkbox"/> (P) PROTUTIJELA NA ADAMTS13 IgG (metoda ELISA)		Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Koagulacijski laboratorij KBC Zagreb Kišpatićeva 12 10 000 Zagreb	
Inhibitori na ADAMTS13 izvode se samo u slučaju ako je aktivnost ADAMTS13 < 0,20 kU/L (< 20%). PODATCI O LABORATORIJSKIM NALAZIMA BOLESNIKA (koji su dostupni)			
• Broj trombocita ($\times 10^9/L$) _____ • LDH (U/L) _____ • Direktni Coombs-ov test _____ • Hemoglobin (g/L) _____ • Haptoglobulin (g/L) _____ • Indirektni Coombs-ov test _____ • Broj retikuločita ($\times 10^9/L$) _____ • Ukipni bilirubin ($\mu mol/L$) _____ • Ostalo _____ • Broj leukocita ($\times 10^9/L$) _____ • Ureja (mmol/L) _____ • Shistocit (%) ili po vidiom polju _____ • Kreatinin ($\mu mol/L$) _____			
Popunjeni obrazac poslati zajedno s uzorkom i/ili na e-mail mmilos@kbc-zagreb.hr ili dcoen@kbc-zagreb.hr			

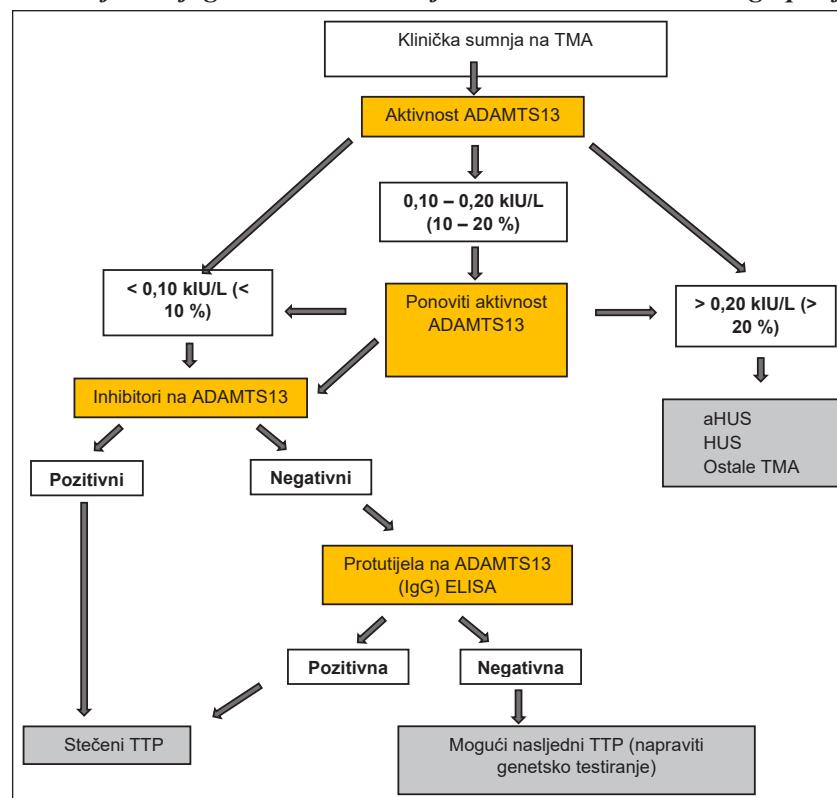
2.2. Laboratorijska dijagnostika ADAMTS13

Metode za mjerjenje aktivnosti ADAMTS13 uključuju dva koraka: u prvom se koraku ispitivani uzorak inkubira sa supstratom (peptidni supstrat koji sadrži domenu A2 VWF i cijepno mjesto ADAMTS13) pri čemu ADAMTS13 iz uzorka proteolitički cijepa supstrat, a u drugom koraku se kvantitativno određuje nastali produkt koji je proporcionalan aktivnosti ADAMTS13 u ispitivanom uzorku. Metode kvantitativnog mjerjenja nastalog proteolitičkog produkta imaju različite izvedbe, ali se danas najčešće koristi tzv. FRET tehnologija (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) i kromogena ELISA metoda^{5,13,15}.

Metode za određivanje inhibitora / protutijela na ADAMTS13 (IgG) omogućavaju potvrdu dijagnoze stečenog imunosnog TTP-a. Ovisno o specifičnosti prema različitim domenama proteina ADAMTS13 protutijela mogu i ne moraju imati inhibitorni učinak na funkciju ADAMTS13. Inhibitorna protutijela se dokazuju testom miješanja ili Bethesda metodom a negativan nalaz ne isključuje stečeni TTP jer je moguća prisutnost inhibitora u niskom titru ili prisutnost ne-inhibitornih protutijela. Ne-inhibitorna protutijela su IgG imunoglobulini koji su također klinički značajni jer ubrzavaju klijens ADAMTS13 iz cirkulacije. Najčešće se određuju ELISA metodom^{5,13,15}.

Metode za mjerjenje antigena ADAMTS13 imaju manji dijagnostički značaj a potencijalno mogu

Slika 2. Algoritam laboratorijske dijagnostike kod sumnje na trombotsku mikroangiopatiju (TMA).



- Za longitudinalno praćenje bolesnika s TTP-om u svrhu odluke o terapiji potrebno je uvijek koristiti istu metodu za mjerjenje aktivnosti ADAMTS13.
- Praćenje aktivnosti ADAMTS13 je nužno tijekom remisije bolesti jer trajno niska vrijednost povećava rizik relapsa.
- Nužna je bliska suradnja između kliničara i laboratorijskih stručnjaka kako bi se osigurala pravodobna primjena odgovarajuće metode za laboratorijsko mjerjenje ADAMTS13 i kako bi se izbjeglo nepotrebno testiranje.

2.3. Laboratorijska dijagnostika ADAMTS13 u Hrvatskoj danas

Koagulacijski laboratorij Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb provodi laboratorijsku dijagnostiku ADAMTS13 za cijelu Hrvatsku. Postupnik je opisan u 2.1.2. a Obrazac za slanje uzoraka u laboratorij, koji se iz udaljenih ustanova popunjeno šalje zajedno s uzorkom, prikazan je na Slici 1.

U laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb se izvode sljedeće analize:

• Mjerjenje aktivnosti ADAMTS13

automatiziranim kvantitativnom metodom na analizatoru Ceveron s100 (Technoclone, Austrija) (FRET tehnologija, kalibrator sljediv prema Internacionalmu standardu SZO).

- Referentni interval je 0,60 – 1,21 kIU/L (60 – 121%) a donja granica detekcije 0,01 kIU/L (1,0 %).
- Vrijeme izrade nalaza u hitnim situacijama – radnim danom unutar 24h ili po dogovoru.
- Vrijeme izrade nalaza u praćenju – unutar 5 radnih dana ili po dogovoru.

• Određivanje inhibitora na ADAMTS13

testom miješanja. Nalaz se izdaje kao pozitivan / negativan, vrijeme izrade nalaza po dogovoru.

• Određivanje protutijela na ADAMTS13 (IgG ELISA metodom (rezultat < 12 kU/L negativan; 12 – 15 kU/L graničan; > 15 kU/L pozitivan).

S obzirom na metodologiju analiza se izvodi u serijama, kad se prikupi veći broj uzoraka.

3. Liječenje stečenog imunosnog TTP-a u odraslih

3.1. Liječenje stečenog imunosnog TTP-a u odraslih u prvoj liniji

Cilj liječenja TTP-a je u što kraćem vremenu postići remisiju bolesti kako bi se izbjegle teške i potencijalno smrtonosne komplikacije bolesti, te dugoročno smanjio rizik ponovne pojave bolesti. Liječenje treba započeti što ranije, te ne treba čekati definitivnu dijagnozu potvrđenu određivanjem aktivnosti ADAMTS13, već je za početak liječenja dovoljna čvrsta klinička sumnja na TTP ili pozitivan PLASMIC zbroj¹⁶.

Standardno liječenje stečenog imunosnog TTP-a u odraslih temelji se na izmjeni plazme uz imunosupresivnu terapiju¹⁷. Izmjena plazme uključuje plazmaferezu i infuziju svježe smrznute plazme u volumenu 1,5-2,0 puta većem od volumena bolesnikove plazme. Ovim postupkom se iz krvotoka odstranjuju protutijela na ADAMTS13 i ultra-veliki multimeri VWF, te istovremeno nadoknađuje ADAMTS13. Postupak se provodi svakodnevno do stabilnog oporavka broja trombocita i normalizacije vrijednosti LDH, te se tada nastavlja s postupkom izmjene plazme svaki drugi dan kroz sljedećih nekoliko dana¹⁶.

Kao prva linija imunosupresivne terapije koriste se kortikosteroidi, najčešće metil-prednizolon u dozi od 1-1,5 mg/kg tjelesne težine, te se nakon postizanja odgovora doza postupno reducira do potpunog ukidanja¹⁷.

Dodatak rituksimaba imunosupresivnoj terapiji u prvoj liniji terapije ima ulogu prvenstveno preventivni relaps bolesti¹⁷. Međutim, mnogi bolesnici s TTP-om neće razviti relaps bolesti, neovisno o inicijalnom liječenju, te njegova primjena nije indicirana kod svih bolesnika. Rituksimab se u prvoj liniji liječenja može primijeniti kod bolesnika s visokim rizikom bolesti, te u kasnijim linijama u slučaju primarno refraktorne bolesti, te egzacerbacije ili relapsa bolesti¹⁸. Visoki rizik bolesti imaju bolesnici koji kod prezentacije bolesti imaju niske vrijednosti albumina i ukupnih proteina, visoki troponin, izrazito povišen LDH i produženo aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV). Višu smrtnost također imaju bolesnici koji uz standardnu terapiju ne oporave broj trombocita unutar sedam dana ili ne normaliziraju LDH unutar pet dana od početka liječenja¹⁹. Standardna doza rituksimaba je 375 mg/m² jednom tjedno kroz četiri tjedna²⁰, ali se mogu primjenjivati i intermedijarne (500 mg jednom tjedno

kroz četiri tjedna) ili niske doze rituksimaba (100 ili 200 mg, također jednom tjedno kroz četiri tjedna)²¹. Budući da se 65% rituksimaba odstranjuje plazmaferezom, lijek je potrebno dati neposredno nakon završenog postupka plazmafereze.

Primjena kaplaczumaba u prvoj liniji liječenja stečenog imunosnog TTP-a uz standardnu terapiju (izmjenu plazme i imunosupresiju) značajno ubrzava oporavak broja trombocita, te smanjuje rizik pojave komplikacija bolesti, tromboembolijskih epizoda i smrtnosti uzrokovane TTP-om, a također smanjuje i rizik egzacerbacije bolesti²². Kaplaczumab je humanizirano bivalentno nanotijelo koje se veže na A1 domenu VWF, čime sprječava vezanje VWF za Gp Ib-IX-V receptor trombocita, te time inhibira interakciju između trombocita i VWF²³. Lijek je registriran za liječenje epizode stečene TTP (u odraslih i adolescenata od navršenih 12 i više godina koji imaju najmanje 40 kg tjelesne težine) u kombinaciji s izmjrenom plazme i imunosupresijom²⁴ te ga je indicirano primijeniti kod svih takvih bolesnika s akutnom epizodom TTP-a. Prvu dozu kaplaczumaba idealno treba primijeniti prije prvog postupka izmjene plazme u dozi od 10 mg intravenski. Terapija se nastavlja svakodnevno nakon plazmafereze, 10 mg supkutano, do 30 dana nakon zadnjeg postupka

plazmafereze. Ukoliko aktivnost ADAMTS13 ostane niska, terapija se može nastaviti do maksimalno sveukupno 64 dana terapije²².

Bolesnici s akutnom epizodom TTP-a trebali bi biti zbrinuti na odjelima s mogućnošću intenzivnog praćenja (jedinice intenzivnog liječenja), a nakon stabilizacije na odjelima hematologije.

3.2. Liječenje refraktornog i relapsnog stečenog TTP-a u odraslih

Nakon započinjanja liječenja akutne epizode TTP-a potrebno je dnevno pratiti vrijednosti trombocita, LDH i klinički status. **Refraktori TTP** definira se perzistentnom trombocitopenijom, bez održivog porasta trombocita ili trombociti $<50 \times 10^9/L$ i perzistentno povišena razina LDH ($>1,5x$ iznad gornje granice normale) unatoč pet plazmafereza i primanja adekvatne doze glukokortikoida^{11,25}. Ako broj trombocita ostane ispod $30 \times 10^9/L$, bolest se klasificira kao "teški" refraktori TTP¹¹. Dijagnoza refraktorne bolesti može biti izazovna, i potrebno je temeljito evaluirati druge uzroke koji mogu doprinijeti neuspjehu prve linije liječenja TTP-a (sistemska infekcija, zločudna bolest ili trombotična mikroangiopatija izazvana lijekovima). U Tablici 2. navedene su definicije terapijskih odgovora stečenog TTP-a.

Tablica 2. Definicije terapijskih odgovora stečenog TTP-a (prilagođeno prema Cuker i sur.²⁵).

Ishod	Definicija	Implikacije
Klinički odgovor	Održani broj trombocita $> 150 \times 10^9/L$ i LDH $< 1,5 \times$ gornje granice normale, bez kliničkih pokazatelja nove ili progresije postojeće ishemiske ozljede organa.	Plazmafereza se može prekinuti ubrzo nakon postizanja kliničkog odgovora.
Egzacerbacija	Broj trombocita $< 150 \times 10^9/L$ nakon postizanja kliničkog odgovora i prije kliničke remisije, uz isključenje drugih uzroka trombocitopenije, s ili bez kliničkog dokaza nove ili progresivne ishemiske ozljede organa, a unutar 30 dana od prestanka plazmafereze ili anti-VWF terapije (kaplaczumaba).	Teški nedostatak ADAMTS13 nakon postizanja kliničkog odgovora povezan je s povećanim rizikom od kliničke egzacerbacije.
Klinička remisija	Održani klinički odgovor s ili bez plazmafereze ili bez anti-VWF terapije (kaplaczumaba) > 30 dana ili s postizanjem ADAMTS13 remisije (parcijalne ili potpune), što god prvo nastane.	Klinička remisija može nastupiti s ili bez remisije ADAMTS13.
Remisija ADAMTS13	Parcijalna: ADAMTS13 $> 20\%$ ($> 0,20$ kIU/L), ali ispod donje granice normale Potpuna: ADAMTS13 $>$ donje granice normale	
Klinički relaps	Smanjenje broja trombocita $< 150 \times 10^9/L$ nakon kliničke remisije, uz isključenje drugih uzroka trombocitopenije, s ili bez kliničkog dokaza nove ili progresivne ishemiske ozljede organa.	Klinički relaps mora biti potvrđen dokumentiranim nedostatkom ADAMTS13.
Relaps ADAMTS13	$< 20\%$ ($< 0,20$ kIU/L) razine ADAMTS13 nakon potpune ili parcijalne remisije ADAMTS13.	
Refraktorna TTP	Perzistentna trombocitopenija, izostanak povećanja broja trombocita ili broj trombocita $< 50 \times 10^9/L$ uz trajno povišen LDH $> 1,5 \times$ gornje granice normale ili progresija postojeće, odnosno pojava nove ishemiske ozljede organa, a unatoč liječenju, odnosno provođenju pet plazmafereza i adekvatne steroidne terapije.	

Refraktornu bolest treba liječiti agresivno, nastavkom ranije započete terapije i dodatkom novih lijekova, ukoliko isti nisu ranije započeti, a to uključuje plazmaferezu, kortikosteroide, započinjanje ili nastavak primjene kaplaczumaba, započinjanje ili nastavak primjene rituksimaba^{17,22}. Terapijska izmjena plazme (plazmafereza) uključuje izmjenu plazme svakodnevno dok broj trombocita ne dosegne $>150 \times 10^9/L$, a LDH blizu normale dva do tri uzastopna dana²⁶. Kod teških oblika bolesti može se razmotriti terapijska izmjena plazme dva puta dnevno²⁷. Od kortikosteroidne terapije najčešće primjenjujemo metilprednizolon 1 mg/kg/dnevno^{28,29}, a potrebno je razmotriti i visoke doze kortikosteroida npr. metilprednizolon 1000 mg i.v. kroz 3 dana³⁰ +/- u nastavku prednizon 1 - 2,5 mg/kg/dnevno³¹. Kaplaczumab se primjenjuje kao udarna iv doza od 10 mg, potom s.c. 10 mg /dnevno (zaključno 30 dana nakon završetka terapijske izmjene plazme)²². Kod refraktorne bolesti preporučamo primjenu rituksimaba u dozi od 375 mg/m^2 jednom tjedno kroz 4 - 8 tjedana³⁰ ili 375 mg/m^2 na dane 1,4,8,15²⁹.

Kod pojedinaca koji ne mogu primiti kaplaczumab i/ili kod onih koji imaju trajni teški nedostatak ADAMTS13 i/ili tešku kliničku sliku potrebno je razmotriti iduće linije terapije. Važno je naglasiti da su podaci idućih linija terapija o refraktornoj stečenoj TTP oskudni, ponekad kontradiktorni i ograničeni na prikaze pojedinačnih slučaja ili malih serija slučajeva. Ti drugi terapijski izbori uključuju: bortezomib³² (npr. 1 mg/m^2 i.v./s.c.³³ ili $1,3 \text{ mg/m}^2$ ^{34,35}); daratumumab (npr. 16 mg/kg tjedno 4-6 tjedana)^{32,36}; mikofenolat mofetil (npr. 250-750 mg dva puta dnevno³⁷⁻³⁹); ciklofosfamid (npr. pulsna doza 600 mg/m^2 /tjedno, potom mjesečno⁴⁰ ili 1 - 1,2 g/m² jednokratno^{41,42}); ciklosporin (npr. 2-3 mg/m² u 2 dnevne doze kroz 6 mjeseci^{43,44}); obinutuzumab⁴⁵; N-acetil cistein⁴⁶. Liječenje TTP-a je napredovalo posljednjih godina. Velik broj bolesnika postigne remisiju bolesti, no kod određenih bolesnika koji postignu klinički odgovor na inicijalno liječenje može se vidjeti pad trombocita unutar 30 dana, a ponekad i čak već tri do pet dana od zadnje terapijske izmjene plazme. Ukoliko se isključe drugi uzroci pada trombocita tada se radi o egzacerbaciji bolesti. **Egzacerbacija TTP-a** definira se kao sniženje broja trombocita ispod donje granice referentnih vrijednosti (trombociti manji od $150 \times 10^9/L$, uz isključenje drugih uzroka trombocitopenije) nakon što se prethodno postigao klinički odgovor, s ili bez kliničkih dokaza novih ili progresivnih ishemijskih oštećenja organa, unutar 30 dana od zadnje plazmafereze ili prima-

nja terapije protiv VWF (tj. kaplaczumaba) (Tablica 2).²⁵ Egzacerbaciju TTP-a liječimo kao refraktornu bolest, kako je ranije navedeno. **Relaps TTP-a** dijelimo na klinički relaps i na relaps ADAMTS13²⁵ (Tablica 2.). **Klinički relaps TTP-a** definiran je smanjenjem broja trombocita $<150 \times 10^9/L$ nakon postizanja kliničke remisije, s isključenim drugim uzrocima trombocitopenije, s ili bez kliničkog dokaza nove ili progresivne ishemijskе ozljede organa. Klinički relaps mora biti potvrđen dokumentiranim nedostatkom ADAMTS13²⁵. **Relaps ADAMTS13** definiran je smanjenjem $<20\%$ ($<0,20 \text{ kIU/L}$) razine ADAMTS13 nakon potpune ili parcijalne remisije ADAMTS13²⁵ (Tablica 2.). Glavni čimbenik rizika za klinički relaps TTP-a je trajni teški nedostatak ADAMTS13 ili relaps ADAMTS13. Klinički relaps mora biti potvrđen dokumentiranim nedostatkom ADAMTS13. S obzirom na biološku varijabilnost ADAMTS13 i varijabilnost u laboratorijskom mjerenu preporuča se učiniti dva nezavisna testa razine ADAMTS13²⁵. Nakon postavljanja dijagnoze relapsnog TTP-a preporučamo započeti liječenje plazmaferezom, kortikosteroidima, rituksimabom i kaplaczumabom, kao u prvoj akutnoj epizodi. Kod bolesnika koji su prethodno imali dobar odgovor samo na plazmaferezu i kortikosteroide, ili kod onih koji u prethodnoj epizodi nisu imali odgovor na rituksimab, može se razmotriti izostavljanje rituksimaba. Također, može se razmotriti izostavljanje rituksimaba i kod pojedinaca kod kojih je nedavno primjenjen, kod onih koji već primaju drugu imunosupresivnu terapiju ili u slučaju trudnoće. Kod određenih bolesnika s multiplim relapsima, uz standardno liječenje akutne epizode, mogla bi biti prikladna splenektomija⁴⁰ i/ili održavanje rituksimabom svaka tri mjeseca.

4. Praćenje stečenog TTP-a

Ne postoje jasne preporuke o praćenju bolesnika koji su postigli remisiju stečenog TTP-a¹⁷. Iako postoje izvješća o povećanoj učestalosti relapsa nakon obustavljanja plazmafereza, u prospektivnim i retrospektivnim analizama nije potvrđena učinkovitost provođenja plazmafereza u rjeđim vremenskim intervalima nakon postizanja remisije bolesti⁴⁷. Nakon otpusta iz bolnice nužne su učestale kontrole, kao i edukacija bolesnika i obitelji o kliničkim simptomima koji bi mogli upućivati na relaps bolesti. Budući da je relaps najčešći u prvim tjednima nakon postizanja remisije, svakako je preporučljivo u tom periodu planirati češće kontrole bolesnika. U prvih mjesec dana od otpusta iz bolnice postupno se sni-

žava terapija glukokortikoidima i završava terapija rituksimabom (ako je bila primijenjena). U tom periodu potrebne su tjedne kontrole laboratorijskih nalaza, uključujući parametre hemolize, bubrežne funkcije i aktivnost ADAMTS13 (ako se već nije postigla normalizacija aktivnosti ADAMTS13). Daljnje kontrole ovise o kliničkom stanju, stilu života bolesnika i o kliničkoj prosudbi nadležnog liječnika. Naša preporuka je da se osnovni laboratorijski nalazi i ADAMTS13 aktivnost kontroliraju svaka tri mjeseca tijekom dvije godine, a nakon toga jednom godišnje. Nužno je prepoznati bolesnike koji imaju povećan rizik za relaps. Bolesnici čija je kontrolna aktivnost ADAMTS13 niža od 10% imaju znatno veći rizik od relapsa unutar dvije godine od bolesnika s vrijednostima aktivnosti višim od 20%⁴⁸. Takvim bolesnicima opravdano je provoditi i češće kontrole, a preemptivna terapija rituksimabom trebala bi se ordinirati svim bolesnicima kojima je kontrolna aktivnost ADAMTS13 niža od 20%^{49,50}. Preporuka je ordinirati rituksimab u dozi od 375 mg/m² te kontrolirati ADAMTS13 aktivnost za mjesec dana. Ukoliko nije postignut porast aktivnosti preko 40%, mogu se ordinirati još tri tjedne aplikacije rituksimaba u istoj dozi. U bolesnika koji u kontrolnim intervalima učestalo imaju aktivnost ADAMTS13 manju od 10%, može se razmotriti i terapija održavanja rituksimabom u dozi od 375 mg/m² svaka tri mjeseca⁵¹. Bolesnici u remisiji TTP-a imaju povećan rizik za nastanak arterijske hipertenzije i ostalih kardiovaskularnih komplikacija^{52,53}. Rizik je posebno naglašen u bolesnika u kojih se u kontrolnim intervalima prati niža ADAMTS13 aktivnost⁵⁴. Bolesnicima se treba preporučiti profilaksa acetilsalicilnom kiselinom uz redovno kontroliranje kardiovaskularnog rizika i reduciranje ostalih čimbenika rizika. S obzirom da je TTP multisistemska bolest, ovisno o kliničkoj prezentaciji i nastalim komplikacijama, multidisciplinarni pristup je poželjan u zbrinjavanju komplikacija i praćenju bolesnika.

5. TTP povezan s trudnoćom

Gotovo polovica slučajeva TTP-a javlja se u žena reproduktivne dobi, uglavnom u trećem i četvrtom desetljeću života, a trudnoća je prepoznata kao važan precipitirajući čimbenik. Štoviše, TTP povezan s trudnoćom čini i do 30% svih slučajeva bolesti, a u kongenitalnom TTP-u prva manifestacija bolesti često se javlja upravo u trudnoći, uglavnom nakon 30. tjedna trudnoće^{55,56}. Zanimljivo, blago snižena plazmatska aktivnost ADAMTS13 (~20-40%) može se naći i u normalnim trudnoćama, hemolitičko-

uremičkom sindromu (HUS) povezanom s trudnoćom i HELLP sindromu (engl. *Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets syndrome*)⁵⁷⁻⁵⁹. Ipak, treba naglasiti kako tek vrlo niska plazmatska aktivnost ADAMTS13 (<20%) jasno definira TTP povezan s trudnoćom⁵⁶ s prevalencijom 1 na 17.000-200.000^{60,61}, što TTP čini vrlo rijetkom komplikacijom trudnoće.

Patofizološki, pojava TTP-a u trudnoći uzrokovana je multifaktorijalno, različitim hemostatskim, imunološkim, hormonalnim i genetskim promjenama. Napredovanjem trudnoće i hemostatskom pripremom za porod postupno raste cirkulirajuća koncentracija VWF-a, a smanjuje se aktivnost ADAMTS13. S druge strane, postpartalna dinamika imune tolerancije često dovodi do relapsa podležecih (npr. sistemskog lupusa eritematodesa) ali i do pojave sasvim novih autoimunosnih bolesti (npr. stečenih inhibitora na faktor VIII), pa tako i stečenog imunosnog TTP-a. Naposljetku, na dinamiku TTP-a u trudnoći sasvim sigurno utječe i hormonalne promjene (npr. estrogenom potaknuta hiperkoagulnost) kao i određena genetska predispozicija (npr. tip mutacije i polimorfizmi gena ADAMTS13), no ti patofiziološki mehanizmi nisu potpuno razjašnjeni.^{56,62}

Dijagnostika i liječenje TTP-a povezanog s trudnoćom zahtjeva multidisciplinarni pristup koji uključuje liječnika specijaliziranog za intenzivnu medicinu, hematologa, transfuziologa, opstetričara, neonatologa i ekspertni laboratorijski tim s poznavanjem koagulacijskih posebitosti TTP jer je ispravna i pravodobna dijagnoza ključna za optimalni ishod majke i djeteta. U neliječenih trudnica često dolazi i do poremećaja u placentalnoj cirkulaciji uslijed mikrotromboza, ishemije i infarkta posteljice, što može uzrokovati zastoj u rastu ploda, pobačaj ili porod mrtvorodenog djeteta^{55,56}. S obzirom na nedostatak podataka iz randomiziranih kliničkih studija, preporuke za liječenje TTP-a povezanog s trudnoćom uglavnom se temelje na retrospektivnim podacima velikih svjetskih centara i mišljenjima međunarodnih ekspertnih skupina.

5.1. Diferencijalna dijagnoza

Diferencijalna dijagnoza TTP-a u trudnoći uključuje HELLP, HUS, diseminiranu intravaskularnu koagulaciju (DIK) i katastrofalni antifosfolipidni sindrom (kAPS)^{56,62}. Najčeći uzrok trombotičke mikroangiopatije u trudnoći je HELLP sindrom. Potrebno je napomenuti da PLASMIC zbroj nije validiran u trudnica, pa se u ovom kontekstu ne preporuča za korištenje. Konačna dijagnoza TTP-a postavlja se

određivanjem plazmatske aktivnosti ADAMTS13 i inhibirajućih protutijela na ADAMTS13. Treba naglasiti da klinički simptomi (glavobolja ili druge neurološke smetnje, mučnina, povraćanje i bolovi u trbuhu ili prsima) nisu dovoljno specifični za razlikovanje pojedinih entiteta. Ukoliko se radi o ranoj trudnoći, TTP je najvjerojatnija dijagnoza, dok postpartalno u obzir mogu doći TTP, DIK i kAPS^{56,62}. Trombocitopenija je zajednička značajka svih entiteta, no teška trombocitopenija (trombociti $<30 \times 10^9/L$) ipak se najčešće nađe u bolesnika s TTP-om. Mikroangiopska hemolitička anemija izrazita je u TTP-u i HUS-u, dok je znatno blaža

Tablica 3. Diferencijalna dijagnoza TTP-a u trudnoći.

Dijagnoza	MAHA	Tromboci-topenija	Bubrežna ozljeda	Arterijska hipertenzija	Proteinurija i edemi	Jetrena ozljeda	Koagulacija	Ključni laboratorijski dokazi
TTP	+++	+++	+	+/-	-	-	-	ADAMTS13 $<20\%$, autotutijela u imunosnom TTP-u
HUS	+++	++	+++	++	+	-	-	ADAMTS13 $\geq 20\%$, kreatinin $>177 \mu\text{mol}/\text{L}$, trombociti >30
HELLP	+/-	+	-	+++	+++	+++	+/-	AST↑, ALT↑ ($>40 \text{ IU}/\text{L}$)
DIK	+/-	++	+/-	+/-	-	-	+++	PV↑, aPTV↑, fibrinogen↓
kAPS	+/-	++	+/-	+/-	+/-	+/-	++	LAC, anti-beta2GPI (IgG i IgM), aCL (IgG i IgM)

MAHA=mikroangiopska hemolitička anemija, TTP=trombotička trombocitopenična purpura, HUS=hemolitičko-uremički sindrom, HELLP=Hypertension, Elevated Liver enzymes and Low Platelet syndrome, DIK=diseminirana intravaskularna koagulacija, kAPS=katastrofalni antifosfolipidni sindrom, AST= apartat aminotransferaza, ALT=alanin aminotranferaza, IU/L=internacionalne jedinice po litri, PV=protrombinsko vrijeme, aPTV=aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

5.2. Planiranje trudnoće

Prije svake trudnoće potrebno je bolesnice s ranjom anamnezom TTP-a educirati o posebitostima TTP-a povezanog s trudnoćom, njegovom nepredvidivom kliničkom tijeku, potencijalnim rizicima za majku i dijete te saznati preferencije bolesnice vezane uz mogućnosti liječenja. Treba naglasiti kako rizik relapsa nije vezan uz anamnezu prebjelog stečenog TTP-a već uz plazmatsku aktivnost ADAMTS13 koju se preporuča odrediti prije samog planiranja trudnoće i potom serijski pratiti, barem

u HELLP-u, DIK-u i kAPS-u. Bubrežna ozljeda, periferni edemi i arterijska hipertenzija česti su u HUS-u i HELLP-u, a povišeni jetreni enzimi dominiraju u HELLP sindromu. Naposljetku, koagulacijski poremećaji (produženo protrombinsko vrijeme i aPTV te snižen fibrinogen) glavna su karakteristika DIK-a i često kAPS-a, a nisu tipični za TTP, HUS i HELLP. Klinički je kAPS najteže razlikovati, no sindrom se može potvrditi koagulacijskim testovima i serološkim metodama. U Tablici 3. prikazani su klinički znakovi i laboratorijski poremećaji koji mogu pomoći u razlikovanju navedenih entiteta.

jednom u trimestru, no isplativost ovog pristupa nije jasno utvrđena⁵⁶. Kod bolesnica s od ranije poznatom anamnezom stečenog TTP-a i plazmatskom aktivnošću ADAMTS13 $<20\%$ preporuča se primjena rituksimaba (375 mg/m², 1 do 4 ciklusa u tjednim intervalima) s ciljem postizanja plazmatske aktivnosti ADAMTS13 $\geq 20\%$. Rituksimab je najbolje primjeniti 6-12 mjeseci prije planirane trudnoće da se smanji potencijalna izloženost fetusa lijeku^{49,56,62,63}.

Liječenje akutnog TTP-a povezanog s trudnoćom se ne razlikuje od onog van trudnoće i po-

trebno ga je započeti odmah, ako je ikako moguće prije toga uzorkovati krv za određivanje aktivnosti ADAMTS13. Primjena rituksimaba u trudnoći se općenito ne preporuča, no lijek se može primijeniti postpartalno u refraktornih bolesnica. Isto tako, u slučaju refraktornog TTP-a koji kompromitira preživljenje majke i/ili djeteta, potrebno je inducirati porod i primijeniti rituksimab^{56,62}. Nema dovoljno podataka o sigurnosti primjene kaplaczumaba u trudnoći.

Slično kao i u općoj populaciji, kompletne remisije trudnica postižu se u ~80-90% slučajeva, a rano prepoznavanje i liječenje TTP-a povezanog s trudnoćom ključni su za povoljan ishod majke i djeteta^{55,56,62}. Prekid trudnoće se preporuča samo u bolesnica koje ne reagiraju na liječenje i u slučajevima fetalnog distresa. Načelno, transfuzije trombocita je potrebno strogo izbjegavati, a prije procedura s određenim rizikom od krvarenja (npr. postavljanje centralnog venskog katetera ili carski rez) i vrlo niskih vrijednosti trombocita, isti se mogu transfudirati, no uz konkomitantnu primjenu svježe smrznute plazme ili uz plazmaferezu. Primjena malih doza acetilsalicilne kiseline (75-100 mg) i/ili niskomolekularnog heparina nije nužna, no može se razmotriti kod broja trombocita $\geq 50 \times 10^9/L$ s ciljem da se dodatno poboljša placentalna cirkulacija i generalno smanji trombotski rizik⁶².

Porođaj se uobičajeno inducira oko 37. tjedna trudnoće. Opisani su vrlo rijetki prijenosi protutijela na ADAMTS13 preko majčinog mlijeka i posteljice, no bez razvoja kliničke bolesti u djeteta^{64,65}.

6. Zaključak

Posljednjih nekoliko godina u Hrvatskoj je značajno unaprijeđena dijagnostika TTP-a, a postaju nam dostupne i nove mogućnosti liječenja TTP-a. Ove nacionalne smjernice namijenjene su kliničarima u Hrvatskoj kako bi se olakšala dijagnostika i odabir najoptimalnijeg liječenja pojedinog odraslog bolesnika sa stečenim TTP-om, a periodično će se dopunjavati ovisno o novim saznanjima o toj bolesti.

Literatura:

1. Sukumar S, Lämmle B, Cataland SR. Thrombotic thrombocytopenic purpura: Pathophysiology, diagnosis, and management. *J Clin Med.* 2021;10(3):536; <https://doi.org/10.3390/jcm10030536>
2. Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Report of 16 cases and Review of the Literature. *Medicine.* 1966;45:139–59.
3. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, Marques MB, Waldo SW, Li A i sur. Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study. *Lancet Haematol.* 2017;4:e157–64.
4. Li A, Khalighi PR, Wu Q, Garcia DA. External validation of the PLASMIC score: a clinical prediction tool for thrombotic thrombocytopenic purpura diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost.* 2018;16:164–9.
5. Chiasakul T, Cuker A. Clinical and laboratory diagnosis of TTP: an integrated approach. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;1:1530–8.
6. Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2010;115:1500–11.
7. Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med.* 1991;325:398–403.
8. Hughes C, McEwan JR, Longair I, Hughes S, Cohen H, Machin S i sur. Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: Association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS13. *J Thromb Haemost.* 2009;7:529–36.
9. Saha M, McDaniel JK, Zheng XL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics. *J Thromb Haemost.* 2017;15:1889–900.
10. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1985;38:469–79.
11. Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J i sur. International Working Group for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost.* 2017;15:312–22.
12. Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Nacionalne preporuke za postupke uzorkovanja, pripreme i analize uzoraka te izvještavanje rezultata probirnih koagulacijskih pretraga protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D-dimera. Zagreb: Mediaprint Tiskara Hrastić d.o.o, svibanj 2019.
13. Mackie I, Mancini I, Muia J, Kremer Hovinga J, Nair S, Machin S i sur. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of ADAMTS13. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(6):685–96.
14. Langley K, Fretwell R, Kitchen S, MacDonald S, Dutt T, Baker P i sur. Multiple centre evaluation study of ADAMTS13 activity and inhibitor assays. *Int J Lab Hematol.* 2018;40:21–5.
15. Favaloro EJ, Pasalic L, Henry B, Lippi G. Laboratory testing for ADAMTS13: Utility for TTP diagnosis/exclusion and beyond. *Am J Hematol.* 2021;96:1049–1055.

16. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2017;129(21):2836-2846.
17. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, Coppo P, Geldziler B, Iorio A, i sur. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2020;18(10):2496-2502.
18. Scully M, Cohen H, Cavenagh J, Benjamin S, Starke R, Killick S i sur. Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol*. 2007;136(3):451-61.
19. Staley EM, Cao W, Pham HP, Kim CH, Kocher NK, Zheng L i sur. Clinical factors and biomarkers predict outcome in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2019;104(1):166-175.
20. Sayani FA, Abrams CS. How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2015;125(25):3860-7.
21. Westwood JP, Thomas M, Alwan F, McDonald V, Benjamin S, Lester WA i sur. Rituximab prophylaxis to prevent thrombotic thrombocytopenic purpura relapse: outcome and evaluation of dosing regimens. *Blood Adv*. 2017;1(15):1159-1166.
22. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga JA i sur; HERCULES Investigators. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*. 2019;380(4):335-346.
23. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knöbl P, Wu H i sur; TITAN Investigators. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*. 2016;374(6):511-22.
24. Sažetak opisa svojstava lijeka Cablivi (caplacizumab), posljednji odobreni sažetak. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cablivi-epar-product-information_en.pdf (Pristupljeno 20.4.2023.)
25. Cuker A, Cataland SR, Coppo P, i sur. Redefining outcomes in immune TTP: an international working group consensus report. *Blood*. 2021;137(14):1855-1861.
26. Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N i sur. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice - Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher*. 2019;34(3):171-354.
27. Soucemarianadin M, Benhamou Y, Delmas Y i sur. Twice-daily therapeutic plasma exchange-based salvage therapy in severe autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Eur J Haematol*. 2016;97(2):183-91.
28. Cataland SR, Kourlas PJ, Yang S, Geyer S, Witkoff L, Wu H i sur. Cyclosporine or steroids as an adjunct to plasma exchange in the treatment of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv* 2017;1:2075-82.
29. Coppo P, Bubenheim M, Azoulay E i sur. A regimen with caplacizumab, immunosuppression, and plasma exchange prevents unfavorable outcomes in immune-mediated TTP. *Blood*. 2021;137(6):733-742.
30. Scully M, McDonald V, Cavenagh J i sur. A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2011;118(7):1746-53.
31. Balduini CL, Gugliotta L, Luppi M i sur. High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann Hematol*. 2010;89(6):591-6.
32. Chen M, Shortt J. Plasma Cell Directed Therapy for Immune Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (iTTP). *Transfus Med Rev*. 2022;36(4):204-214.
33. Patriquin CJ, Thomas MR, Dutt T, McGuckin S, Blombery PA, Cranfield T i sur. Bortezomib in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2016;173(5):779-85.
34. Ratnasingam S, Walker PA, Tran H i sur. Bortezomib-based antibody depletion for refractory autoimmune hematological diseases. *Blood Adv*. 2016;1(1):31-35.
35. Pandey MR, Vachhani P, Ontiveros EP. Remission of Severe, Relapsed, and Refractory TTP after Multiple Cycles of Bortezomib. *Case Rep Hematol*. 2017;2017:9681832.
36. van den Berg J, Kremer Hovinga JA, Pfleger C, Hegemann I, Stehle G, Holbro A i sur. Daratumumab for immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv*. 2022;6(3):993-997.
37. Fioredda F, Cappelli E, Mariani A i sur. Thrombotic thrombocytopenic purpura and defective apoptosis due to CASP8/10 mutations: the role of mycophenolate mofetil. *Blood Adv*. 2019;3(21):3432-3435.
38. Ahmad HN, Thomas-Dewing RR, Hunt BJ. Mycophenolate mofetil in a case of relapsed, refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2007;78(5):449-52.
39. Al-Husban N, Al-Kuran O. Post-Partum Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) in a Patient with known Idiopathic (Immune) Thrombocytopenic Purpura: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*. 2018;12(1):147.
40. Beloncle F, Buffet M, Coindre JP i sur. Thrombotic Microangiopathies Reference Center. Splenectomy and/or cyclophosphamide as salvage therapies in thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Transfusion*. 2012;52(11):2436-44.
41. Zheng X, Pallera AM, Goodnough LT, Sadler JE, Blinder MA. Remission of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with cyclophosphamide and rituximab. *Ann Intern Med*. 2003;138(2):105-8.
42. Stein GY, Zeidman A, Fradin Z, Varon M, Cohen A, Mittelman M. Treatment of resistant thrombotic thrombocytopenic purpura with rituximab and cyclophosphamide. *Int J Hematol*. 2004;80(1):94-6.
43. Cataland SR, Jin M, Lin S i sur. Cyclosporin and plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura: long-term follow-up with serial analysis of ADAMTS13 activity. *Br J Haematol*. 2007;139(3):486-93.
44. Nosari A, Redaelli R, Caimi TM, Mostarda G, Morra E. Cyclosporine therapy in refractory/relapsed patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2009;84(5):313-4.
45. Robertz J, Andres M, Mansouri Taleghani B i sur. Obinutuzumab in two patients suffering from immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura intolerant to rituximab. *Am J Hematol*. 2019;94(10):E259-E261.
46. Rottenstreich A, Hochberg-Klein S, Rund D, Kalish Y. The role of N-acetylcysteine in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41(4):678-83.
47. Raval JS, Mazepa MA, Rollins-Raval MA, Kasthuri RS, Park YA. Therapeutic plasma exchange taper does not decrease exacerbations in immune thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Transfusion*. 2020;60(8):1676-1680.

48. Hie M, Gay J, Galicier L, Provôt F, Presne C, Poullin P i sur.; French Thrombotic Microangiopathies Reference Centre. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2014;124(2):204-10.
49. Jestin M, Benhamou Y, Schelpe AS, Roose E, Provôt F, Galicier L i sur.; French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. Preemptive rituximab prevents long-term relapses in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2018;132(20):2143-2153.
50. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Rituximab reduces risk for relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2016;127(24):3092-4.
51. Saleem R, Rogers ZR, Neunert C, George JN. Maintenance rituximab for relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report. *Transfusion*. 2019;59(3):921-926.
52. Sukumar S, Brodsky M, Hussain S, Yanek L, Moliterno A, Brodsky R i sur. Cardiovascular disease is a leading cause of mortality among TTP survivors in clinical remission. *Blood Adv*. 2022;6(4):1264-1270.
53. Deford CC, Reese JA, Schwartz LH, Perdue JJ, Kremer Hovinga JA i sur. Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2013;122(12):2023-9; quiz 2142.
54. Uperti H, Kasmani J, Dane K, Braunstein EM, Streiff MB, Shanbhag S i sur. Reduced ADAMTS13 activity during TTP remission is associated with stroke in TTP survivors. *Blood*. 2019;134(13):1037-1045.
55. Scully M, Thomas M, Underwood M, Watson H, Langley K, Camilleri RS i sur. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood*. 2014;124(2):211-9.
56. Fakhouri F, Scully M, Provôt F, Blasco M, Coppo P, Noris M i sur. Management of thrombotic microangiopathy in pregnancy and postpartum: report from an international working group. *Blood*. 2020;136(19):2103-2117.
57. Sánchez-Luceros A, Farías CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C i sur. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost*. 2004;92(6):1320-6.
58. Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica*. 2003;88(9):1029-34.
59. Stepanian A, Cohen-Moatti M, Sanglier T, Legendre P, Ameziane N, Tsatsaris V i sur. Von Willebrand factor and ADAMTS13: a candidate couple for preeclampsia pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(7):1703-9.
60. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, Boisseau P, Galicier L, Azoulay E i sur. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2012;119(24):5888-97.
61. Delmas Y, Helou S, Chabanier P, Ryman A, Pelluard F, Carles D i sur. Incidence of obstetrical thrombotic thrombocytopenic purpura in a retrospective study within thrombocytopenic pregnant women. A difficult diagnosis and a treatable disease. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015;15:137.
62. Ferrari B, Peyvandi F. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Blood*. 2020;136(19):2125-2132.
63. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2010;8(6):1201-8.
64. Rottenstreich A, Kalish Y, Tvtio A, Hauschner H, Arad A. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy: The role of placental and breast-milk mediated transfer of ADAMTS13-autoantibodies. *Thromb Res*. 2017;156:80-81.
65. Gerth J, Schleussner E, Kentouche K, Busch M, Seifert M, Wolf G. Pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 2009;101(2):248-51.

Reevaluacija dijagnoze von Willebrandove bolesti u hrvatskoj pedijatrijskoj i odrasloj kohorti – pilot studija

Ivana Lapić¹, Margareta Radić Antolić¹, Sara Dejanović Bekić², Ernest Bilić^{2,3},

Ana Boban^{3,4}, Désirée Coen Herak^{1,5}, Dunja Rogić^{1,5}, Renata Zadro⁶

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

²Zavod za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica, Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb

³Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

⁴Odjel za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

⁵Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

⁶Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Specijalna bolnica Sv. Katarina Zagreb

Von Willebrandova bolest (VWB) najčešći je nasljedni poremećaj zgrušavanja koji nastaje zbog kvantitativnog manjka ili kvalitativnih promjena von Willebrandova faktora (VWF), uzrokovanih mutacijama u genu za VWF¹. VWF je najveći poznati ljudski plazmatski glikoprotein koji cirkulira kao složeni kompleks multimera male, srednje i velike molekularne mase (od 800 do 20 000 kDa). VWF omogućava adheziju i agregaciju trombocita na mjestu ozljede krvne žile posredovanjem interakcije kolagena u subendotelu s trombocitnim receptorom glikoproteinom Ib (GPIb) te je nositelj i stabilizator faktora zgrušavanja VIII (FVIII) u cirkulaciji^{1,2}. Gen odgovoran za sintezu VWF-a nalazi se na kraju kratkog kraka kromosoma 12 (12p13.2), veličine je 178 kb, a sastoji se od 52 egzona. Do danas je poznato više od 700 različitih mutacija u genu za VWF koje su rasprostranjene duž čitavog gena, uključujući promotorsknu regiju, svih 52 egzona te intronske regije. Izražaj bolesti ovisi o vrsti mutacije, njenoj lokalizaciji unutar gena te učinku na funkciju i/ili strukturu VWF-a³.

Bolesnici s VWB-om imaju povećanu sklonost krvarenjima čija vrsta i intenzitet ovise o funkcionalnoj aktivnosti ostatnog VWF-a u krvi. Zbog osnovnog poremećaja primarne hemostaze, glavni simptomi jesu krvarenja u sluznice i kožu, a najčešće se očituju povećanom sklonošću modricama, krvarenjima iz nosa (epistaksama), prekomjernim krvarenjima nakon manjih ozljeda, vađenja zuba ili operacijskih zahvata (npr. tonzilektomije). Kod žena se dodatno mogu javiti obilna i produljena menstrualna krvarenja (menoragija) te prekomjerno krvarenje pri porodu. Teški, životno ugrožavajući oblici krvarenja koji obuhvaćaju krvarenja u zglobove, mišiće i mozak su rijetki i ograničeni na teške oblike bolesti⁴.

Važeća klasifikacija VWB, definirana od strane Međunarodnog udruženja za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*, ISTH), temelji se na fenotipskim obilježjima bolesti i dijeli VWB u tri osnovne skupine: tip 1 kao najčešći oblik karakteriziran djelomičnim kvantitativnim manjkom VWF-a, kvalitativni tip 2 koji se dijeli u 4 podskupine (2A, 2B, 2M i 2N) ovisno o vrsti strukturnog i funkcionalnog poremećaja VWF-a, te tip 3 koji je najteži, ali i najrjeđi oblik potpunog nedostatka VWF-a⁵. Kod tipa 1 i tipa 3 VWB-a uzročne mutacije mogu se naći duž cijelog gena za VWF, dok su kod podtipova tipa 2 ograničene na određene regije gena i zahvaćaju samo pojedine domene VWF-a³.

Sumnja na VWB postavlja se na temelju pozitivne osobne i/ili obiteljske anamneze krvarenja, a dijagnoza se potvrđuje laboratorijskom dijagnostikom. Zbog višestruke uloge VWF-a u sustavu zgrušavanja, složenosti njegove strukture, brojnih mutacija u genu za VWF i raznolikosti kliničke slike primjenjuje se složen i postupan dijagnostički pristup⁶.

U Republici Hrvatskoj dijagnoza VWB-a do sada se temeljila isključivo na kliničkoj slici krvarenja i laboratorijskoj dijagnostici koja je uključivala određivanje sposobnosti VWF-a da veže trombocitni GPIb (aktivnost VWF-a) te koncentracije antiga VWF-a (VWF:Ag). Na temelju tih rezultata moguće je odrediti radi li se kod bolesnika o djelomičnom ili potpunom kvantitativnom manjku, ili o kvalitativnom poremećaju VWF-a. Međutim, u svrhu precizne diferencijalne dijagnostike podtipova VWB-a potreban je čitav niz dodatnih, specifičnih koagulacijskih pretraga kojima se ispituju strukturna i funkcionalna svojstva VWF-a. U te pretrage se ubrajaju analiza multimera VWF-a, ispitivanje sposobnosti vezanja kolagena VWF-a (engl. *von Willebrand fac-*

tor collagen binding assay, VWF:CBA), ristocetinom potaknuta agregacija trombocita te ispitivanje sposobnosti vezanja FVIII. Molekularna dijagnostika VWB-a zahtjevna je zbog veličine gena za VWF, brojnih mutacija koje su rasprostranjene duž čitavog gena te različitim obrazaca nasljeđivanja, pa stoga još uvijek nije dio standardnih dijagnostičkih postupnika za VWB. Metoda izbora za molekularnu dijagnostiku VWB-a kojom je omogućeno sekvenciranje čitavog gena tijekom jedne analize u kratkom vremenskom roku jest sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS), a radi se o molekularnoj metodi kojom se pouzdano mogu dokazati točkaste mutacije, te male delecije i insercije. Ovom tehnologijom moguće je istodobno sekvencirati i više različitih gena. U dijagnostici VWB-a korisno je, osim gena za VWF, sekvencirati i gen za FVIII u svrhu razlikovanja VWB-a od blage hemofilije A. Dodatno, za dokazivanje velikih delecija i duplikacija kod bolesnika kod kojih mutacije nisu dokazane tehnologijom NGS-a, a imaju jasne kliničke i laboratorijske pokazatelje VWB-a, potrebno je provesti dodatnu analizu metodom višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA).

U istraživanju provedenom od siječnja 2020. do svibnja 2021. godine u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, u suradnji sa Zavodom za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti te Zavodom za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica Klinike za pedijatriju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, primijenjen je cijelovit pristup u dijagnostici VWB-a u 83 ispitanika (29 pedijatrijskih i 54 odrasla) iz 60 obitelji. Ispitanici su obuhvatili bolesnike kojima je ranije postavljena dijagnoza VWB-a, bolesnike nejasnih fenotipova između VWB-a i blage hemofilije A, kao i članove obitelji bolesnika koji imaju znakove i simptome pojačanog krvarenja. Svim ispitanicima je tijekom redovnog liječničkog pregleda uzorkovana krv za potrebe laboratorijske dijagnostike te su provedene sljedeće koagulacijske pretrage: aktivnost VWF-a, VWF:Ag, aktivnost FVIII, VWF:CBA i analiza multimera VWF-a. Molekularna dijagnostika obuhvatila je sekvenciranje čitavih gena za VWF i FVII-tehnologijom NGS-a te primjenu MLPA metode kod onih ispitanika kod kojih tehnologijom NGS-a nisu nađene mutacije u analiziranim genima, a koagulacijski nalazi su upućivali na poremećaj VWF-a.

Rezultati ovog istraživanja ukazali su na izražitu laboratorijsku, kliničku i genetičku heterogenost

VWB-a u izabranoj skupini hrvatskih bolesnika. Sekvenciranjem gena za VWF i FVIII tehnologijom NGS i dodatnim pretraživanjem gena za VWF kod odabranih ispitanika tehnologijom MLPA utvrđeno je postojanje mutacija kod ukupno 53 (64 %) ispitanika koji pripadaju 38 obitelji. Mutacije u genu za VWF nađene su kod 48 ispitanika, u genu za FVII kod četiri ispitanika, dok je kod jedne ispitanice utvrđeno postojanje mutacija u oba analizirana gena. Među ukupno 48 ispitanika s pronađenim mutacijama samo u genu za VWF, 38 ispitanika bili su heterozigoti, sedam složeni heterozigoti i tri homozigoti. Ukupno je utvrđeno 36 različitih mutacija u genu za VWF, od kojih je 25 mutacija pogrešnog smisla (engl. *missense mutation*), šest besmislenih mutacija (engl. *nonsense mutation*), tri mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) i to delecije, dok se dvije mutacije odnose na greške prekravanja unutar intronskih regija. Posebna vrijednost ovog istraživanja jest otkriće 13 do sada neopisanih mutacija u genu za VWF, te dvije novootkrivene mutacije u genu za FVIII^{7,8}.

Na temelju rezultata koagulacijskih pretraga i genetičke analize, dijagnoza tipa 1 VWB-a postavljena je kod 19 ispitanika, tipa 3 kod šest ispitanika, dok je od 23 ispitanika koji su dijagnosticirani s tipom 2 VWB-a za njih 15 dodijeljena dijagnoza tipa 2A, za 7 tipa 2B i za jednog bolesnika dijagnoza tipa 2N VWB-a. Među bolesnicima s tipom 1 VWB-s je heterogenost genetičke osnove i koagulacijskih nalaza bila najizraženija, što je posljedica rasprostranjenosti mutacija duž čitavog gena i različitih učinaka na razinu VWF-a u cirkulaciji. Aktivnosti VWF-a bile su u rasponu od 7,8%, što odgovara teškom obliku tipa 1 VWB-a, do potpuno urednih rezultata (83,7%, referentni interval: 50 -187 %). Svi su bolesnici s tipom 1 imali omjer aktivnosti VWF-a i VWF:Ag iznad 0,6 te uredne raspodjele multimera uz jednakojerno sniženje svih frakcija, što potvrđuje da se radi o djelomičnom kvantitativnom manjku VWF-a koji ima urednu funkciju i strukturu. U ovoj je podskupini nađeno ukupno 15 različitih mutacija, od kojih su osam novootkrivene. Od ranije opisanih mutacija, u jednom je slučaju nađena tzv. Vicenza varijanta (c.3614G>A, p.Arg1205His) koja uzrokuje teški oblik tipa 1 VWB-a, a snižena razina VWF-a posljedica je njegova ubrzanog uklanjanja iz cirkulacije⁹. Također, u jednom je slučaju nađena mutacija pogrešnog smisla c.4751A>G (p.Tyr1584Cys) koja je u više istraživanja na populacijama iz različitih geografskih područja bila najzastupljenija mutacija povezana s tipom 1 VWB-a, a ovim istraživanjem

je potvrđena njezina prisutnost i unutar hrvatske populacije bolesnika^{10,11}. U slučaju besmislene mutacije c.4975C>T (p.Arg1659Ter) ispoljavanje učinka se pokazalo ovisnim o genotipu, ali i drugim biološkim čimbenicima. Navedena mutacija nađena je u heterozigotnom obliku kod dvije ispitanice koje nisu rodbinski povezane, čime je prepostavljena kao uzrok tipa 1 VWB-a, dok se u homozigotnom obliku kod jedne ispitanice očitovala nemjerljivo niskim razinama VWF-a i teškom kliničkom slikom krvarenja, što je karakteristični fenotip tipa 3 VWB-a. U spomenutim dvama slučajevima tipa 1 VWB-a uočen je vrlo različit laboratorijski fenotip, pri čemu je u jednom slučaju utvrđen teški oblik tipa 1 VWB-a (aktivnost VWF-a 7,8%; VWF:Ag 9,7%), dok je u drugom slučaju laboratorijski fenotip bio blag (aktivnost VWF-a 43,4%; VWF:Ag 55,4%). Niže razine VWF-a u prvom slučaju mogu biti posljedica dječje dobi i krvne grupe 0, za razliku od druge ispitanice koja je odrasla i ima krvnu grupu A, što fiziološki povisuje VWF. Dodatna zanimljivost među ispitanicima s tipom 1 VWB-a jest da je jedna novootkrivena mutacija (c.6596G>A, p.Cys2199Tyr) nađena kod dvoje ispitanika koji nisu rodbinski povezani, što upućuje na prisutnost jedinstvenih genskih promjena unutar hrvatske populacije bolesnika s VWB-om. Složenost genetičke osnove tipa 1 VWB-a potvrđena je i otkrivanjem uzročnih mutacija unutar introna te delecija u po dva slučaja. Važno je istaknuti da se u jednom slučaju radilo o velikoj heterozigotnoj deleciji u području egzona 1 do 6 koja je otkrivena tek dodatnom analizom tehnologijom MLPA.

Kod bolesnika kod kojih je potvrđen neki oblik tipa 2 VWB-a bili su prisutni tipični obrasci promjena koagulacijskih pretraga, a potvrđene su i dosadašnje spoznaje da tip 2 najčešće uzrokuju mutacije lokalizirane unutar egzona 28 gena za VWF³. Mutacije unutar egzona 28 nađene su kod svih ispitanika s tipom 2 VWB-a s iznimkom jednog slučaja složenoga heterozigotnog genotipa s varijantama u egzonima 17 i 20, a samo su dvije mutacije novootkrivene. U većini slučajeva se podtip tipa 2 VWB-a mogao definirati na temelju proširenog panela koagulacijskih pretraga, pri čemu je za razlikovanje tipa 2A, 2B i 2M ključna analiza multimera zbog karakterističnih promjena profila multimera kod pojedinih oblika, a molekularna dijagnostika služi za identifikaciju genske promjene koja je u podlozi poremećaja VWF-a. Međutim, za pravilnu diferencijalnu dijagnostiku tipa 2N koji je dokazan u jednom slučaju molekularna dijagnostika je bila ključna, s obzirom da su rezultati koagulacijskih pre-

traga bili neupadljivi, uz aktivnost VWF-a od 57,9 %, VWF:Ag 53,6 % i urednu raspodjelu multimera VWF-a. Sekvenciranjem gena za VWF dokazano je da je fenotip produljenog krvarenja posljedica složenog heterozigotnog genotipa, koji je uključivao najčešću poznatu mutaciju povezану s tipom 2N c.2561G>A (p.Arg854Gln) te mutaciju c.2278C>T (p.Arg760Cys).

Ispitanici s tipom 3 VWB-a bili su homozigoti ili složeni heterozigoti za besmislene mutacije i/ili mutacije pogrešnog smisla, a od utvrđenih mutacija tri su novootkrivene. Kod dvoje ispitanika s tipom 3 VWB-a koji nisu u krvnom srodstvu nađena je najčešća mutacija među stanovništвом središnje i sjeverne Europe koja uzrokuje tip 3 VWB-a, a radi se o deleciji c.2435delC (p.Pro812ArgfsTer31)¹².

Istodobno sekvenciranje gena za VWF i FVIII omogućilo je jednoznačno razlikovanje bolesnika s VWB-om od oboljelih i nositeljica hemofilije A, a koji se na temelju laboratorijskih nalaza i kliničke slike krvarenja nisu mogli jasno razlikovati. Od pet ispitanika koliko je identificirano s mutacijama u genu za FVIII, troje su iz iste obitelji i radi se o majci i dva sina. Kod svih troje nađena je do sada neopisana mutacija pogrešnog smisla c.6253G>A (p.Glu2085Lys), pri čemu su sinovi homozigoti i stoga oboljni od blage hemofilije A, dok je majka kao heterozigot nositeljica hemofilije A. Preostale dvije ispitanice s mutacijama u genu za FVIII također su klasificirane kao nositeljice hemofilije A, pri čemu je kod jedne dodatno nađena i mutacija u genu za VWF, što dodatno doprinosi kliničkoj slici krvarenja i otežava pravilno razlučivanje poremećaja krvarenja samo na temelju osnovnih koagulacijskih pretraga u dijagnostici VWB-a.

U ovom istraživanju, jednako kao i u svim pretходним istraživanjima genetičke osnove VWB-a, kod određenog broja ispitanika nisu utvrđene mutacije u genu za VWF. Od ukupno 30 ispitanika bez utvrđenih mutacija, devet je imalo aktivnost VWF-a ispod 50 %. Takav rezultat u skladu je sa spoznajama da je samo 65 % slučajeva sniženog VWF-a povezano s prisutnoшću mutaciju u genu za VWF, a vjerojatnost da je sniženi VWF posljedica postojanja mutacije raste što je razina VWF-a niža (1). Zbog toga se bolesnici s vrijednostima VWF-a od 30 do 50 % i bez uzročne mutacije izdvajaju kao zasebni entitet koji se naziva tzv. „niski VWF“¹³. Preostalih 21 ispitanika bez mutacija u genu za VWF imali su uredne nalaze svih koagulacijskih pretraga te je kod njih dijagnoza VWB-a isključena.

Provedenim istraživanjem unaprijeđen je dife-

rencijalno dijagnostički algoritam VWB-a u istraženoj kohortnoj skupini bolesnika u Republici Hrvatskoj. Postojeći laboratorijski pristup proširen je odabranim specifičnim koagulacijskim pretragama i molekularnom dijagnostikom, čime je omogućena jednoznačna identifikacija uzroka fenotipa krvarenja, pravilno postavljanje dijagnoze VWB-a te diferencijalno dijagnostičko razlučivanje od blage hemofilije A.

Literatura:

1. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood*. 2013;122:3735-40.
2. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus*. 2011;9:s3-8.
3. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev*. 2010;24:123- 34.
4. James PD, Tosetto A. Clinical aspects of von Willebrand: bleeding history. U: Federici AB, Lee CA, Berntorp EE, Lillicrap D, Montgomery RR, urednici. Von Willebrand Disease: Basic and Clinical Aspects. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011:91-9.
5. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2103-14.
6. Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood*. 2015;125:2029-37.
7. EAHAD Coagulation Factor Variant Databases: von Willebrand factor. Dostupno na: https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF (pristupljeno 20. veljače 2022.)
8. EAHAD FVIII Gene Variant Database. Dostupno na: <https://f8-db.eahad.org/> (pristupljeno 20. veljače 2022.)
9. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, Cattini MG, Gallinari L, Bertomoro A, et al. Identifying type Vicenza von Willebrand disease. *J Lab Clin Med*. 2006;147:96-102.
10. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMMD-1VWD). *Blood*. 2007;109:112-21.
11. O'Brien LA, James PD, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley CR, et al. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood*. 2003;102:549-57.
12. Schneppenheim R, Krey S, Bergmann F, Bock D, Budde U, Lange M, et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet*. 1994;94:640-52.
13. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv*. 2021;5:280-300.

Svečano obilježavanje 40. godišnjice prve alogenične transplantacije koštane srži u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb

Lana Desnica
KBC Zagreb

Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica jedina je metoda izlječenja za mnoge malične i nemaligne hematološke bolesti. Godine 1957. dobitnik Nobelove nagrade dr. E. D. Thomas učinio je prvu singeničnu transplantaciju u bolesnika s leukemijom, a 1959. g. Mathé učinio je prvu transplantaciju koštane srži u žrtava nuklearne nesreće. Značajan napredak u HLA tipizaciji dovodi do prve uspješne HLA podudarne srodne transplantacije u bolesnika sa SCID-om 1968. g. O prvom potpunom "engraftmentu" i preživljenu dužem od jedne godine prvi su pisali Mathé i suradnici, a dali su i opis akutne i kronične bolesti presatka protiv primatelja (eng. Graft-versus-Host Disease, GvHD). Zamah kliničkih transplantacija koštane srži počeo je 1970-ih: početkom desetljeća dr. Thomas prvi je učinio uspješnu transplantaciju koštane srži za tešku aplastičnu anemiju, a 1977. je stotinu bolesnika s akutnom leukemijom liječeno kemoterapijom, zračenjem cijelog tijela i alogeničnom transplantacijom koštane srži od HLA podudarnog srodnog davatelja; potpuni oporavak imala su 94 bolesnika, a samo je jedan odbacio transplantat. Načelo liječenja maličnih hematoloških bolesti alogeničnom transplantacijom koštane srži je da se alogeničnim, imunološki kompetentnim stanicama dopusti da djeluju protiv leukemijskih stanica primatelja. Takav se učinak može postići primjenom kemoterapije velike doze koja je dio kondicioniranja prije alogenične transplantacije koštane srži. Imunološki sustav davatelja prepoznaće preostale tumorske stanice kao strane te ih uništava reakcijom davatelja protiv leukemije (eng. Graft-versus-Leukemia, GvL). U razdoblju od 1980-ih do 2000-ih došlo je do unapređenja u supportivnoj terapiji, profilaksi GvHD-a, boljem zbrinjavanju komplikacija, molekularnoj HLA tipizaciji, uvođenju novih i manje toksičnih protokola kondicioniranja što je sve skupa dovelo do poboljšanih ishoda liječenja transplantacijom.

Prva alogenična transplantacija koštane srži u Hrvatskoj i u ovom dijelu Europe učinjena je u KBC Zagreb – Rebro pod vodstvom prof. dr. sc. Borisa Labara i prim. dr. Vinka Bogdanića 8. veljače 1983. u bolesnika s aplastičnom anemijom od srodnog HLA identičnog davatelja. U Austriji je prva transplantacija učinjena godinu dana kasnije, a Mađarska se tek pripremala. Također je pet godina nakon prve alogene učinjena prva autologna transplantacija u Hrvatskoj (također u KBC Zagreb - Rebro) pod vodstvom prof. dr. sc. Damira Nemeta. Početkom devedesetih godina u KBC Zagreb učinjena je prva transplantacija krvotvornih matičnih stanica iz umbilikalne krvi u djevojčice s kroničnom mijeloičnom leukemijom koja je ujedno bila i prva takva transplantacija u svijetu. Prva nesrodna transplantacija u Hrvatskoj učinjena je na Rebru 1991. godine, prva transplantacija od hrvatskog darivatelja 2010. godine, a prva haploidentična transplantacija učinjena je 2012. g. Zahvaljujući naporima Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica i Zakladi Ana Rukavina broj potencijalnih donora danas broji više od 60 000. Do danas je u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb na Rebru učinjeno više od 1500 alogeničnih transplantacija. Naravno, ništa od ovoga ne bi bilo moguće bez medicinskih sestara, cijenjenih kolega iz transfuzijske medicine, HLA tipizacije, mikrobiologije, citologije i patologije, imunofenotipizacije, citogenetike, molekularne dijagnostike, te radioterapije.

Ove je godine u veljači svečanim simpozijem u Preporodnoj dvorani palače Narodnog doma na zagrebačkom Gornjem gradu obilježena 40. godišnjica od prve alogenične transplantacije koštane srži u Hrvatskoj (Slika 1.).

Slika 1. Program povodom 40 godina prve transplantacije koštane srži u Hrvatskoj u KBC Zagreb.



Na simpoziju su uz velikane hrvatske transplantacije sudjelovali uvaženi hematolozi iz inozemstva među kojima su bili prof. dr. Didier Blaise, prof. dr. Robert Peter Gale, te prof. dr. Ana Sureda, aktualna predsjednica EBMT-a. Simpozij je započeo emotivnim presjekom kroz početke transplantacije vrlo zanimljivim govorom prof. dr. Milivoja Boranića, pionira GvL reakcije, sve do prekrasnog govora prof.

Slika 2. Prof. dr. Labar prima odlikovanje Red Ante Starčevića od predsjednika Milanovića.



dr. Borisa Labara koji je s nama podijelio uspomene i značajne trenutke u povijesti zagrebačke transplantacije. O sadašnjosti i o akceleraciji transplantacije govorili su kolege hematolozi iz Zavoda za hematologiju pokazavši impresivne rezultate i suverenost te jednakost s drugim velikim i srednje velikim europskim transplantacijskim centrima.

Posebno mjesto u programu i u povijesti transplantacije zauzeli su naši dragi prijatelji koji žive i rade u Sjedinjenim Američkim Državama prof. dr. Živko Pavletić zaslužan za unaprijeđenje liječenja i klasifikaciju kroničnog GvHD-a, te prof. dr. Leo Lznik, pionir haploidentične transplantacije u svijetu.

Simpozij je bilo vrlo dobro posjećen te medijski popraćen. Lijepo riječi sadašnjim i bivšim članovima transplantacijskog tima KBC Zagreb uputili su i ravnatelj KBC Zagreb prof. dr. Ante Čorušić, predsjednik Hrvatske liječničke komore doc. dr. Krešimir Luetić, dekan Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prof. dr. Slavko Orešković, predstavnik Ministarstva zdravstva, te predstavnica Grada Zagreba i drugi. Kraj simpozija obilježili su bolesnici sa svojim iskustvima, te prvi nesrodnici hrvatski darivatelj i primatelj. Njihova priča i put kroz proces donacije odnosno transplantacije nikoga nije ostavio ravnodušnim.

Ovako velika dostignuća prepoznao je i predsjednik Republike Hrvatske Zoran Milanović, te je odlikovao Redom Ante Starčevića akademika Andriju Kaštelana i prof. dr. Borisa Labara (Slika 2.) za iznimian doprinos i osobite zasluge u zdravstvu te razvoju transplantacije krvotvornih maticnih stanica u Republici Hrvatskoj.

Također, predsjednik Milanović dodijelio je Povelju Republike Hrvatske za iznimani doprinos i osobite zasluge u razvoju transplantacije krvotvornih matičnih stanica u Republici Hrvatskoj Timu za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica i sta-

ničnu terapiju KBC Zagreb. U ime Tima za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica i staničnu terapiju KBC Zagreb Povelju Republike Hrvatske preuzeo je prof. dr. Radovan Vrhovac (Slika 3.).

Slika 3. Prof. dr. Vrhovac u ime Tima za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica i staničnu terapiju KBC Zagreb prima povelju Republike Hrvatske od predsjednika Milanovića.



Broj alogeničnih transplantacija kontinuirano raste, a bolesnici se u današnje doba prate 10 i više godina nakon transplantacije. Recentne studije pokazuju da se smanjuje smrtnost povezana s alogeničnom transplantacijom, a da se poboljšava dugotrajno preživljenje zbog znatnog napretka u vidu smanjenja toksičnosti terapije i oštećenja organa,

boljeg liječenja i dijagnostike infekcija te značajnog napretka u liječenju bolesti presatka protiv primatelja. Međutim, unatoč velikom napretku i dalje značajan broj bolesnika razvija dugoročne komplikacije transplantacije kao što su kronični GvHD, metaboličke i endokrinološke abnormalnosti, ima smanjenu kvalitetu života te razvije sekundarne malignitete.

Dodatak godišnje nagrade Zaklade Krohema u 2022. godini



Na jesenskom sastanku Krohema u Osijeku 4. studenog 2022. dodijeljena je ponovno Godišnja nagrada Zaklade Krohema za najbolja postignuća u području hematologije.

- Nagrada je ove godine dodijeljena u obliku:
 - Plakete i diplome
 - Novčanog iznosa od **40.000,00 kn**
- Zaklada Krohema je 1. kolovoza 2022. raspisala natječaj za dodjelu **GODIŠNJE NAGRADE ZAKLADE** za izvrsnost i postignuća u znanstvenom i stručnom radu u području hematologije u 2021. godini
- Upravno vijeće Zaklade je imenovalo Povjerenstvo za izradu prijedloga za dodjelu Godišnje nagrade Zaklade u sastavu:
 - Prof.dr.sc. Antica Duletić Načinović
 - Prof.dr.sc. Nives Jonjić
 - Prof. emeritus Boris Labar
 - Prof.dr.sc. Damir Nemet
 - Prof.dr.sc. Slobodanka Ostojić Kolonić

Povjerenstvo je razmatralo dva prijedloga za Nagradu:

1. **RAJKO KUŠEC** iz KB Dubrava ispred Radne skupine Krohema za Ph1 negativne mijeloproliferativne neoplazme - za znanstvenu i stručnu aktivnost.
Predlagači su Marko Lucijanić i Ivan Krečak iz KB Dubrava i OB Šibenik

- **OPIS I OBRAZLOŽENJE PRIJEDLOGA**
- Radna skupina Krohema za Ph1 negativne mijeloproliferativne neoplazme (MPN) voditelj koje je Rajko Kušec u posljednjih je 5 godina ostvarila izuzetnu međunarodno prepozнатu znanstvenu i stručnu aktivnost.
- U periodu od 2018. do 2022. godine članovi radne skupine objavili su ukupno 55 publikacija u časopisima indeksiranim u Current Contents / Web of Science
- Također su članovi Radne skupine svojim

radovima i kongresnim priopćenjima vrlo aktivni na međunarodnim i domaćim kongresima, na Europskom hematološkom kongresu i na KROHEM-u s originalnim znanstvenim rezultatima.

- Članovi radne skupine su svojim znanstvenim i stručnim radom značajno doprinijeli razvoju koncepta kronične renalne bolesti kao dijela kliničke slike kroničnih Ph-neg. MPN i omogućili bolje razumijevanje patofizioloških procesa ovih bolesti.
- **ZNANSTVENI I STRUČNI DOPRINOS, UTJECAJ NA ZNANOST I STRUKU I ODRŽIVOST:**
- Rezultati ove radne skupine temelje se na podacima bolesnika liječenih u RH i plod su kvalitetne međuinstitucionalne, a također i međunarodne suradnje. Članovi ove grupe dio su međunarodnih timova stručnjaka te sudjeluju u donošenju međunarodnih smjernica za liječenje kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi.
- Voditelj radne skupine, Rajko Kušec, dio svoje profesionalne aktivnosti posvetio je razvoju novih molekularno-genetičkih analiza u području kroničnih mijeloproliferacija, kao što su mutacijske analize CALR i MPL te ekson 12 JAK2 gena.
- Rajko Kušec je u svibnju 2022. izabran za dopredsjednika Srednjoeuropske grupe za MPN za sjedištem u Beču (CEMPO), a od 2018. godine je član radne skupine za MPN Europskog hematološkog društva (SWG-MPN EHA).

2. **DOMINIK LOZIĆ** iz Kliničkog bolničkog centra Split ispred Tima za autotransplantaciju KBC Split za znanstveni ili stručni projekt: Transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica. Predlagač je

prof. prim. dr. sc. Julije Meštrović iz KBC Split.

- **OPIS I OBRAZLOŽENJE PRIJEDLOGA**
- Dr. Dominik Ložić je od početka uključen u realizaciju projekta transplantacije autognih matičnih stanica u KBC Split što je započeto prije više od 20 godina.
- Aktivno je sudjelovao i imao je vodeću ulogu u pripremi dokumentacije za odobrenje projekta, planiranju svih aktivnosti, pisanju protokola transplantacije i SOP-ova te koordinacije svih službi uključenih u provedbu transplantacije.
- Naposljetku je organizirao i proveo prvu transplantaciju u veljači 2021. te nastavio provoditi liječenje hematoloških bolesnika transplantacijom matičnih stanica
- **ZNANSTVENI I STRUČNI DOPRINOS, UTJECAJ NA ZNANOST I STRUKU I ODRŽIVOST:**
- Odlukom Upravnog vijeća KBC Split za ostvarivanje projekta transplantacije krvotvornih matičnih stanica Dominik Ložić je napisao Elaborat o opravdanosti Projekta, a zatim i postupnik za provođenje transplantacije te sve potrebne SOP-ove koji se odnose na provedbu liječenja transplantacijom
- Do sada je učinjeno 17 uspješnih transplantacija autognih matičnih stanica
- Osim navedenog dr. Dominik Ložić je ostvario i prihvatanje Transplantacijskog tima KBC Split u Europsku grupu za transplantaciju (EBMT) kao redovitog člana
- Uvođenjem transplantacije krvotvornih matičnih stanica u KBC Split kao jedinoj ustanovi izvan Zagreba u kojoj se ona provodi, bolesnicima Splitsko-dalmatinske i susjednih županija, omogućeno je liječenje blizu mjesta stanovanja, smanjuje se pritisak na ustanove u Zagrebu, a bolesnicima se olakšava provođenje hematoloških kontrola blizu mjesta stanovanja. Time je značajno podignuta razina kvalitete pružanja zdravstvene zaštite u KBC Split.

ZAKLJUČAK POVJERENSTVA

- **Radna skupina Krohema za Ph1 negativne mijeloproliferativne neoplazme na čelu s Rajkom Kušecom,** svojom je konstantnom znanstvenom aktivnošću, koja je iznimno dobro dokumentirana objavljenim publikacijama u visoko rangiranim međunarodnim časopisima, postigla vrijedan utjecaj na hrvatsku hematologiju kao i na afirmaciju hrvatske hematologije u svijetu.
- **Tim za transplantaciju autognih matičnih stanica KBC Split na čelu s Dominikom Ložićem** učinio veliki napor i postigao značajan napredak u liječenju hematoloških bolesnika uvođenjem ove važne metode liječenja bolesnika čime je bitno unaprijeđeno liječenje hematoloških bolesnika Splitsko-dalmatinske i susjednih županija.

Povjerenstvo je zaključilo da su oba prijedloga vrlo vrijedan doprinos hrvatskoj hematologiji dodjeljuje DVIZE ravnopravne Godišnje nagrade Zaklade u ukupnom iznosu od 40.000,00 kn i to:

- **NAGRADA U IZNOSU OD 20.000,00 KN RAJKU KUŠECU IZ KB DUBRAVA ISPRED RADNE SKUPINE KROHEM-a ZA PH1 NEGATIVNE MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZME**



Članovi Radne skupina za Ph1 negativne mijeloproliferativne neoplazme KROHEM-a:
Dubravka Čaržavec, Davor Galušić, Dragana Grohovac, Hrvoje Holik, Ivan Krečak, Marin Kursar, Marko Lucijanic, Marko Martinović, Vlatka Periša, Pavle Rončević, Ranka Serventi Seiwerth, Jasmina Sinčić Petričević



Upravitelj Zaklade prof.dr.sc. Damir Nemet dodjeljuje Godišnju nagradu Zaklade prof.dr.sc. Rajku Kušecu

- NAGRADA U IZNOSU OD 20.000,00 KN
DOMINIKU LOŽIĆU IZ KLINIČKOG
BOLNIČKOG CENTRA SPLIT ISPREĐ
TIMA ZA AUTOTRANSPLANTACIJU
KBC-a SPLIT**



Članovi Tima za autotransplantaciju KBC-a Split

Davor Galušić, Sanja Madunić, Viktor Blaslov, Dejan Bogdanić, Jelena Lukačević Krstić
Ana Parlov, Marija Rajić, Petra Grgić, Mirela Zec, Nada Bilopavlović, Branka Prančić



Upravitelj Zaklade prof.dr.sc. Damir Nemet dodjeljuje Godišnju nagradu Zaklade prim. dr. Dominiku Ložiću

ČESTITAMO DOBITNICIMA NAGRADE NA POSTIGNUĆIMA U NAPRETKU DIJA- GNOSTIKE I LIJEČENJA BOLESNIKA S HE- MATOLOŠKIM BOLESTIMA

Upravitelj Zaklade Krohema
Prof.dr.sc. Damir Nemet

Novo vodstvo Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora

Hrvatsko društvo za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) je stručno društvo hrvatskih hematologa, ali i drugih stručnjaka koji se bave dijagnostikom i liječenjem bolesnika s hematološkim bolestima. Ovo je društvo osnovano 2016. godine, a slijednik je Hrvatskog društva za hematologiju i transfuzijsku medicinu koje je čitav niz godina aktivno djelovalo te se naposlijetku odlukom svojih članova podijelilo u dva samostalna društva zbog izrazitog napretka i širenja obje struke. Za prvog predsjednika Hrvatskog društva za hematologiju izabran je Prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med. Na izbornoj skupštini Društva u prosincu 2022. godine za novog predsjednika društva izabran je Prof. dr. sc. Toni Valković, dr. med. Misija društva je unaprijeđivanje dijagnostike i liječenja hematoloških bolesti primjenom najsvremenijih znanja i postignuća, poticanje znanstvenih istraživanja, edukacija članova, posebno mlađih, populariziranje struke i suradnja s drugim domaćim i međunarodnim hematološkim organizacijama, udrugama bolesnika te zdravstvenim vlastima uz istovremeno unapređenje staleškog položaja hematologa.

Društvo predstavlja i promovira svoju djelatnost u HLZ-u i potiče suradnju s drugim društvima i sekcijama koji su od interesa za hematološku struku.

Ono potiče i stremi dalnjem promicanju etičkih kodeksa i načela medicinske deontologije vezano kako za sve aspekte liječenje bolesnika, tako i znanstvena istraživanja u sklopu hematologije.

Nadalje, Društvo nastoji poticati znanstvenu i stručnu publicistiku, a na međunarodnom planu zadatak Hrvatskog društva za hematologiju je da bude prisutno i aktivno u svim relevantnim međunarodnim hematološkim organizacijama, posebno u Europskoj hematološkoj udruzi.

Novo vodstvo Hrvatskog društva za hematologiju HLZ-a:

- **Predsjednik:** Prof. dr. sc. Toni Valković, KBC Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- **Prvi dopredsjednik:** Prof. dr. sc. Dražen Pulanić, KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- **Drugi dopredsjednik:** Prof. dr. sc. Ozren Jakšić, KB Dubrava i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- **Tajnica:** Prim. dr. sc. Inga Mandac Smoljanović, KB Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- **Rizničar:** Prim. Goran Rinčić, dr. med., KBC Sestre milosrdnice

Upravni odbor:

- Prof. dr. sc. Toni Valković (KBC Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci)
- Prof. dr. sc. Dražen Pulanić (KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Prof. dr. sc. Ozren Jakšić (KB Dubrava i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Prim. dr. sc. Inga Mandac Smoljanović (KB Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Prim. Goran Rinčić, dr. med. (KBC Sestre milosrdnice)
- Prof. dr. sc. Nadira Duraković (KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Dr. med. Hrvoje Holik (OB Slavonski Brod)
- Dr. sc. Davor Galušić (KBC Split)
- Prim. Ranka Serventi Seiwerth, dr. med. (KBC Zagreb)
- Prof. dr. sc. Ana Boban (KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)
- Prof. dr. sc. Igor Aurer (KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

In memoriam



prof. dr. sc. Mara Dominis
(7. studenoga 1941. – 27. siječnja 2023.)

Prof. dr. sc. Mara Dominis rođena je 7. studenoga 1941. godine u Zagrebu, gradu u čijim je školama i Sveučilištu ostvarila vlastito obrazovanje, ali i sudjelovala i utjecala na obrazovanje mnogih dolazećih generacija. Nakon završene gimnazije (1960.), a potom i diplome na Medicinskom fakultetu (1966.), iako joj se pružila mogućnost specijalizacije iz anesteziologije, kao i dalnjeg školovanja u Grazu, započela je s usavršavanjem u laboratoriju za citologiju i hematologiju Interne klinike Opće bolnice „Dr. Ozren Novosel“, gdje je radila od 1968. do 1970. Tijekom toga perioda završila je poslijediplomski studij iz citodiagnostike (1969.), no znanstveni interes, potreba za unaprjeđenjem zdravstvenog sustava i društva te pokretačka snaga i konstantna potreba da napreduje i što bolje razumije stanične procese, pogotovo u području tumorigeneze, vodila ju je ka specijalizaciji u Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskoga fakulteta (od 1970. do 1974.). Magistarski rad s temom „Citološke i citokemijske promjene jetrenih stanica štakora u toku trovanja tetraklorugljikom“ obranila je 1973. godine, dok je 1978. godine obranila doktorsku disertaciju na Medicinskom fakultetu pod nazivom „Citologija i citokemija kroničnih upalnih bolesti jetre“.

1974. godine u Općoj bolnici „Dr. Ozren Novosel“, danas Kliničkoj bolnici „Merkur“ Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, osnovala je Odjel za kliničku patologiju i citologiju, a kroz godine učinila ga je Kliničkim zavodom. Zavod je bio velik dio njenog života i centralni dio njene karijere. Na njemu se usavršavao velik broj citologa

i patologa iz Hrvatske i okolnih zemalja, nastajali su znanstveni radovi u području hematopatologije koji su stajali uz bok svjetskim radovima toga područja i tu je stasao veliki broj doktora znanosti koji su svojom dalnjom ekspertizom mijenjali i unaprijeđivali hrvatski zdravstveni i znanstveni sustav. Kao predstojnica Odjela za kliničku patologiju i citologiju / Kliničkog zavoda za citologiju i patologiju, tijekom čitavog radnog vijeka, prof. Dominis je unaprijeđivala Zavod, uvodila inovacije u skladu s najnovijim spoznajama u području, posvećivala se obrazovanju mlađih kolega, radila je na konstantnom osvremenjivanju i osiguravala maksimalan standard. Sva energija i snaga koja joj je bila potrebna da beskompromisno poboljšava, usmjerava naprijed i omogućava najbolje pacijentima i novim generacijama, uvijek je dolazila iz istog izvora – njenog Biograda i maslinika.

Osim stručnog napretka, prof. Dominis radila je i na unapređenju nastave: od 1984. predavala je na Katedri za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu u svojstvu docentice, od 1986. kao izvanredna profesorica, a od 1996. kao redovita profesorica. Funkciju zamjenice predstojnika iste katedre počela je obnašati 1991. godine, a od 2000. – 2004. godine bila je prodekanica za poslijediplomsku nastavu na Medicinskom fakultetu. Na Višoj školi za zdravstvene tehničare u Zagrebu predavala je od 1985. godine.

Često se usavršavala u međunarodnim institucijama, ali se uvijek vraćala u Zagreb (i Biograd)

ostvarivši suradnje, prijateljstva i dovodeći svjetske stručnjake kao potporu razvoju hrvatske medicine.

Neka od njenih usavršavanja uključuju boravke na institucijama poput Wistar Institute, Philadelphia, 1977. i 1978.; Jefferson Medical School, Philadelphia, 1992. i 1996. te Institute of Pathology Medical School Hannover Camp; Institute of Pathology Carl Albrecht University, 1988. i 1989. Kao gost-profesor 1999. godine boravila je u Institutu Max Planck u Freiburgu.

Neprijepornim entuzijazmom i upornošću, radom u svako doba dana, vikendom i praznicima te nastojanjem da se naglasi značenje citološke i patološke dijagnostike u zdravstvenoj skrbi proširivala je odjel, povećavala broj djelatnika, nabavljala novu opremu u skladu s aktualnim otkrićima i postignućima na području hepatologije, hematopatologije i dijela gastroenterologije te održavala nastavu specijalizantima citologije i patologije iz drugih ustanova i gradova.

Kao suradnik i voditelj radila je na mnogim istraživačkim projektima čije je rezultate objavila u više od 120 radova, od kojih je većina objavljena u visokoindeksiranim časopisima. Bila je i jedna od koautorica udžbenika Patologija.

Doprinijela je osnutku i radu Krohema, Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti, iz perspektive hematoloških malignih bolesti. Bila je članica Udruge za patologiju i voditeljica Sekcije za citologiju i imunocitokemiju, kao i članica međunarodnih društva: International Academy of Cytology, European Society of Pathology, Adriatic Society of Pathology, European lymphoma study group i European bone marrow study group. Obnašala je dužnost predsjednice Hrvatskoga društva bolničkih liječnika u dopunskome radu Hrvatskoga liječničkog zbora.

Njena cjelokupna djelatnost obuhvaća širok raspon raznovrsnih stručnih i znanstvenih aktivnosti, čiji kontinuitet nije prekinut odlaskom u mirovinu – zadnji znanstveni rad koji je objavila izašao je u studenom 2022. godine.

Svojim radom i ustrajnošću u unaprjeđenju patološke i citološke struke, uspješne znanstvene karijere, kao i neprestane usmjerenosti ne samo na vlastito obrazovanje i usavršavanje već i na upućivanje suradnika, kolega i mlađih naraštaja u edukativne prednosti i mogućnosti, u okviru mnogih djelokruga, nezaobilazno je ime hrvatske medicinske patologije i citologije.

No, važniji od svih pisanih tragova njene djelatnosti, oni su koje je ostavila u ljudima oko sebe. Bila je poznata po svome znanju, svestranosti, ljubavi prema umjetnosti, podršci mlađima, poticanju kolega da stalno čine korak naprijed, kao i neponovljivoj pašticadi i pečenim maslinama. Predstavljala je čvrstu točku suradnicima, uvijek je bila tu za sve studente, kolege i suradnike, nije poznavala nerješive probleme, nalazila je načine napretku, bila je daleko više od mentora konstantno tražeći puno, ali dajući još i više, i nikada ne odstupajući od svojih načela – priznavanja autoriteta isključivo u znanju i ljudskosti, i nikada i ni pod koju cijenu ne popuštajući pod raznim pritiscima. Od svojeg Zavoda stvorila je obitelj kojoj će izuzetno nedostajati, no zauvijek će dio nje živjeti u svima nama koji smo je poznavali, koje nas je formirala i kojima je prije svega bila prijatelj i podrška.

prof. dr. sc. Slavko Gašparov

izv. prof. dr. sc. Petra Korać

