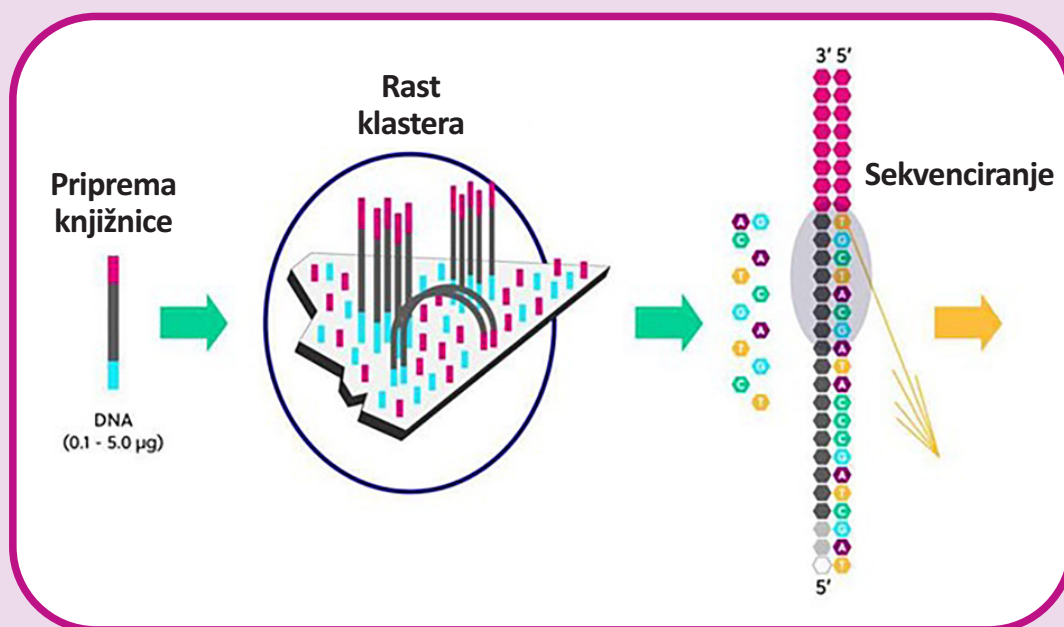


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem

Smjernice za molekularno-dijagnostički postupak sekvenciranja nove generacije (NGS)



Volumen 17., Broj 1.

Impresum

Bilten Krohema
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem
Volumen 17., Broj 1., svibanj 2025.

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:

Dražan Pulanić

Tajnica Uredništva:

Lana Desnica

Uredništvo:

Davor Galušić

Ivan Krečak

Inga Mandac Smoljanović

Zinaida Perić

Vlatka Periša

Mario Piršić

Tajnica Krohema:

Dijana Perčin

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 iznesenim mišljenjima.

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

Opis slika na naslovnici:

Tijek metode sekvenciranja nove generacije: ekstrakcija nukleinskih kiselina, priprava knjižnice, sekvenciranje (ljubaznošću tvrtke iRepertoire, Inc. te uz pomoć prof. dr. sc. Renate Zadro, Specijalna bolnica Sv. Katarina.)

Sadržaj

Igor Aurer:

Uvodnik	2
---------------	---

Margareta Radić Antolic, Monika Kolundžić, Branimir Gizdić, Ivona Arić Zrna, Klara Zubčić, Mirjana Suver Stević, Saška Marci, Rajko Kušec, Irena Drmić Hofman, Renata Zadro:

Smjernice za molekularno-dijagnostički postupak sekvenciranja nove generacije (NGS) – Radna skupina za laboratorijsko-dijagnostičku hematologiju Krohema – 2025. godina	3
--	---

Margareta Radić Antolic:

Sekvenciranje nove generacije – dodatak u otkrivanju genetičkih promjena ili perspektiva prema ciljanju terapiji limfoproliferativnih bolesti	16
--	----

Zoran Šiftar:

Imunofenotipizacija u dijagnostici limfoproliferativnih bolesti	21
---	----

Ana Franjević, Iva Semren, Ivana Franić Šimić, Sanja Davidović-Mrsić:

Citogenetika poremećaja plazma stanica	24
--	----

Marija Stanić Damić:

Uloga crijevne mikrobiote u patogenezi i liječenju multiplog mijeloma	30
---	----

Toni Valković:

Sustavna mastocitoza: kratki pregled bolesti	34
--	----

Inga Mandac Smoljanović:

Luspatercept u liječenju anemije u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom niskog rizika	38
--	----

David Zima, Lucija Mucavac, Sara Dejanović Bekić, Ernest Bilić:

Anemija srpolikih stanica	42
---------------------------------	----

Damir Nemet:

Dodjela godišnje nagrade Zaklade Krohema u 2024. godini	52
---	----

Ana Zelić Kerep:

Sekcija mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora – vizija i planovi za budućnost	56
--	----

Uvodnik

Drage Krohemovke, Krohemovci i ostali čitatelji Biltena,

vrijeme leti, stiže i svibanj i naš proljetni sastanak. Ovaj put ćemo se naći na otoku sv. Nikola pred Porečom, prekrasnom mjestu kojeg sam upoznao držeći predavanje na kongresu medicinskih vještaka HZZO-a. Nadam se da će nas vrijeme poslužiti i da ćemo moći uživati, ne samo u stručnim i znanstvenim prikazima, već i u prirodnim ljepotama.

Ovaj sastanak pada na polovicu mog drugog, zadnjeg, mandata kao predsjednika Krohema. Polako dolazi vrijeme da počnemo razmišljati o tome tko će me naslijediti. No osim toga će u iduće dvije godine i sastav Upravnog odbora pretrpjeti značajne promjene. Već na ovogodišnjoj skupštini, koja je zbog toga izborna, moramo zbog odlaska ili skorog odlaska u mirovinu zamijeniti 4 člana Upravnog odbora. To su prof. dr. Slobodanka Ostojić Kolonić, voditeljica RS za mijelodisplazije, prof. dr. Renata Zadro, voditeljica RS za laboratorijsku hematologiju, prof. dr. Rajko Kušec, voditelj RS za Ph- mijeloproliferacije i prof. dr. Vlatko Pejša, voditelj RS za kroničnu limfocitnu leukemiju. Sve su to doajeni naše hematologije koji su odigrali ogromnu ulogu u stvaranju i rastu Krohema. O njihovom doprinosu bi se mogle ispisati stranice Biltena i nadam se da će za jesenski broj netko, npr. njihovi nasljednici, to i učiniti. S moje strane moram reći da mi je bio užitek surađivati s njima, bez njih Krohem ne bi bio ovako uspješan, tužan sam što odlaze sa svojih položaja, no nadam se da će i dalje naći vremena i volje da sudjeluju na našim sastancima i u našim aktivnostima.

Prošli sastanak u Vinkovcima je kao i obično donio puno zanimljivih medicinskih novosti, ali i druženja i uživanja u ljepotama naše domovine. Dodijeljene su godišnje nagrade Zaklade Krohema, koje su zbog svojih zasluga u razvoju i popularizaciji hrvatske hematologije dobili prof. dr. Ana Boban i dr. sc. Branimir Gizdić. Koristim i ovu priliku da im na tome čestitam. Što se poslovične hrvatske raznolikosti tiče, tamo sam naučio da se u vinkovački fiš, za razliku od baranjskog, ne stavlja ljuta paprika!

Od tada je nekoliko naših RS održalo zasebne sastanke, svi su bili jako posjećeni i vrlo uspješni s puno zanimljivih prikaza i rasprava za koje na plenarnom sastanku često nema vremena. Možda bismo ponovno trebali razmisliti o tome, trebamo li imati plenarne sastanke Krohema dvaput godišnje

ili bi bilo bolje da se takav sastanak održava jednom godišnje, a da svaka RS ima poseban godišnji sastanak. Znanstvena produkcija nam se polako ustaljuje, međunarodna suradnja uspješno funkcionira, iako nam i dalje nedostaju organizacijske osnove za provođenje kliničkih ispitivanja na način kako se to radi u razvijenijem dijelu Europe, preko zasebnih organizacijskih cjelina u bolnicama sa svojim administratorima, medicinskim sestrama i bolničkim i polikliničkim odjelima.

Što se dostupnosti lijekova tiče, stvari se kreću u pozitivnom smjeru, no povremeno s neočekivanim teškoćama. Tako smo ovaj put dobili proširenje indikacije za tisagenlekleucel na FL, ali uz uvjet da su tumorske stanice CD19 pozitivne. Nitko ne zna kako i zašto se taj kriterij pojavio u smjernici! Naime, to je biljeg kojeg hematopatolozi ne rabe rutinski, a studije su pokazale da imunohistokemijski određen izražaj CD19 ne utječe na odgovor na CAR-T. Glofitamab je došao na listu za 3. i kasnije linije B-velikostaničnog limfoma, ali na dnu smjernice piše da se bolesnicima koji su na teret fonda PSL dobili glofitamab, ne može na teret tog fonda dati tisagenlekleucel. Isto takvo pravilo, samo obratno (glofi poslije tisa-cela) se pojavilo na dnu smjernice za primjenu tisagenlekleucela. Na stranu to da za to nema medicinskog opravdanja i da bolesnici, koji će bez tih lijekova umrijeti od svog limfoma, možda nisu najpodesnija skupina za štednju, meni je posve nejasno zašto je pravilo o primjeni glofitamaba stavljeno u smjernicu za tisagenlekleucel i obratno. Ima kod nas još nekih neobičnosti. Tako ravnateljica jedne opće bolnice smatra da hematolozi ne trebaju dobiti koeficijent koji im je vladinom odlukom pripao i samovoljno ga je smanjila. Ne znam je li stvar u osobnom animoziteti ili dotična gospođa ne zna čime se hematolozi bave.

Uglavnom, eto ponovno stvari zbog kojih ćemo se imati priliku dopisivati s HZZO-om, Ministarstvo zdravstva i sličnim ustanovama, sve u dogovoru i suradnji s našom sestrinskom organizacijom Hrvatskim društvom za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora.

Toliko ovaj put od mene.

Do skorog viđenja sve vas pozdravlja

Vaš predsjednik
Prof. dr. Igor Aurer

Smjernice za molekularno-dijagnostički postupak sekvenciranja nove generacije (NGS) – Radna skupina za laboratorijsko-dijagnostičku hematologiju Krohema – 2025. godina

Margareta Radić Antolic¹, Monika Kolundžić¹, Branimir Gizdić², Ivona Arić Zrna³, Klara Zubčić³, Mirjana Suver Stević^{4,5}, Saška Marcz^{4,5}, Rajko Kušec⁶, Irena Drmić Hofman⁷, Renata Zadro⁸

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

² Klinički zavod za patologiju, KB Dubrava, Zagreb, Hrvatska

³ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KB Dubrava, Zagreb, Hrvatska

⁴ Laboratorij za molekularnu i HLA dijagnostiku, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Osijek, Hrvatska

⁵ Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KB Dubrava, Zagreb, Hrvatska

⁷ Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet Split, Hrvatska

⁸ Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Specijalna bolnica Sveta Katarina, Zagreb, Hrvatska

Napredak u razumijevanju molekularne patogeneze hematoonkoloških bolesti, otkriće novih terapijskih rješenja, kao i razvoj analitičkih tehnologija, promijenio je klinički pristup i dijagnostičku perspektivu hematoonkologije. Prema posljednjim europskim i svjetskim smjernicama, tehnologija sekvenciranja nove generacije (eng. *next generation sequencing*, NGS) neizostavni je alat u dijagnostici hematoonkološke bolesti i kliničkom vođenju bolesnika.

Sve veća prisutnost metode NGS u dijagnostici nameće potrebu za standardizacijom i stoga Radna skupina za laboratorijsko-dijagnostičku hematologiju Krohema predlaže smjernice za molekularno-dijagnostički postupak NGS-a. Kreirane smjernice sistematično i jasno definiraju predanalitičke, analitičke i poslijeanalitičke zahtjeve. Osim standardizacije, cilj je ovih smjernica pomoći kliničaru i laboratorijskom stručnjaku u razumijevanju metode i njezinoj primjeni, olakšati uvođenje postupka u laboratorijsku rutinu te, u konačnici, harmonizirati hematoonkološki nalaz dobiven NGS-om na nacionalnoj razini.

NGS u dijagnostici akutne mijeloične leukemije

Pravodobno mutacijsko profiliranje bolesti, odabir ciljane terapije te stratifikacija rizika bolesti akutne mijeloične leukemije (AML) danas su gotovo nemogući bez tehnologije sekvenciranja nove generacije. Osim pri početnoj evaluaciji bolesti, kada govorimo o dijagnostičkom uzorku (prije uvođenja bilo kakve terapije), NGS se primjenjuje i kod recidiva i reevaluacije bolesti. Recidiv kod bolesnika najčešće podrazumijeva klonalnu evoluciju u vidu stjecanja novih dodatnih genskih promjena, gubitka starih, promjene postojećih ili kombinaciju svega navedenog. Nadalje, pri kliničkom odlučivanju za

alogeničnu transplantaciju hematopoetskih stanica, nalaz dobiven NGS-om nerijetko odnosi prevagu u procjeni rizika i koristi za bolesnika.

Budući da je koštana srž mjesto razvoja i nastanka AML-a, uzima se kao primarni uzorak za NGS dijagnostiku. Iznimno, kao uzorak za dobivanje kvalitetne DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) tumorskog podrijetla može poslužiti i periferna krv i to u slučajevima otežane punkcije koštane srži, ili bilo koji drugi uzorak koji sadrži dovoljan broj mijeloidnih blasta (Tablica 1.1.). Primjerice, takav uzorak koristit će se u situacijama kada stanice AML-a infiltriraju u druge organske sustave (npr. likvor).

U dijagnostici somatskih mutacija preporučena metoda NGS-a jest ciljani genski panel (Tablica 1.2.). Priprema knjižnice za panel gena i sama metoda sekvenciranja osiguravaju visoku osjetljivost i specifičnost za dokazivanje varijanti koje u uzorku mogu biti zastupljene u niskoj učestalosti (npr. do 5 %). O postignutoj dubini čitanja ovisi osjetljivost sekvenciranja. Ove smjernice reguliraju određivanje isključivo varijanti u tipu točkastih mutacija (engl. *single nucleotide variant*, SNV) i malih insercija i delecija (engl. *insertion/deletion polymorphism, indels*), a ne obuhvaćaju varijacije broja kopija (engl. *copy number variation*, CNV) te velike strukturne promjene gena. U tablici 1.2. navedeni su obvezni geni koje treba sadržavati panel za dijagnostičko određivanje mutacijskog profila AML-a, kao i dodatno preporučeni geni, a prema zadnjim smjernicama Europske leukemijske mreže iz 2022. godine.

Klasifikacija somatskih varijanti podijeljena je na dvije ocjene, ocjena patogenosti varijante i ocjena kliničke važnosti varijante. Prema smjernicama Li MM i sur. i Horak P i sur., na nalazu se izvještavaju isključivo o patogenim i vjerojatno patogenim

varijantama, dok je izvještavanje o varijantama nepoznatog značenja (engl. *variant of uncertain significance*, VUS) dopušteno uz primjerenu opasku koja objašnjava potencijalno značenje navedene varijante (Tablica 1.3.). Klinička ocjena varijante objedinjuje dijagnostičko, prognostičko i terapijsko značenje varijante. Klasifikacija varijanti prema njihovu kliničkom značenju zahtijeva sveobuhvatnu informiranost o trenutačnim spoznajama koje su dostupne za pojedinu varijantu kroz literaturne podatke te javne baze podataka. Klinička ocjena varijante označava interpretaciju značenja varijante u kontekstu bolesti koja je prisutna kod bolesnika (u analiziranom uzorku) i potencijal njezine kliničke implikacije. Dakle, varijanta je važna utoliko ukoliko ona utječe na di-

jagnozu, prognozu bolesti, odabir terapije te smjer kliničke odluke.

Nasljedne varijante nije moguće definitivno razlikovati od somatskih bez potvrdne analize istom metodom u drugom tkivu (npr. stanice fibroblasta). Također, pri interpretaciji nalaza važno je obratiti pozornost na ograničenja i osjetljivost metode (Tablica 1.3.). Primjerice, ako je osjetljivost metode > 5 %, to znači da se varijante koje su u uzorku zastupljene u manjem udjelu istom metodom ne mogu sa sigurnošću odrediti. Isto tako, ako kod bolesnika nisu pronađene patogene klinički važne varijante, to ne isključuje potencijalnu prisutnost molekularnih biljega bolesti koji korištenom metodom nisu obuhvaćeni.

Tablica 1.1.

PREDANALITIČKA FAZA				
	AML	MDS	MPN	KLL/SLL/MCL
vrsta uzorka	koštana srž/ periferna krv (ovisno o sadržaju/postotku blasta)	prema smjernicama Radne skupine za MDS	koštana srž/ periferna krv	periferna krv/koštana srž/ limfni čvor/različiti izljevi/ punktati 3 – 5 rezova FFPE (SLL, MCL) debljine 10 mikrona (ovisno o količini stanica i ukloplje- nog materijala)
	uzorak koji sadrži dovoljan broj neoplastičnih stanica			
sadržaj stanica	minimalno 5 % blasta	prema smjernicama Radne skupine za MDS	/	više od 70 % B-limfocita (KLL stanica)
spremnik uzorka	K ₂ EDTA (ljubičasta) epruveta			
volumen uzorka	minimalno 1 mL koštane srži / minimalno 1 epruveta periferne krvi			3 – 5 mL (više ako je u uzorku mali broj KLL/MCL stanica te je potrebno ra- diti izolaciju CD19 pozitivnih stanica)
vrijeme uzorkovanja	dijagnostički (prije početka terapije), u recidivu, pri reevaluaciji bolesti	prema smjernicama RG za MDS	dijagnostički	dijagnostički, prije uvođenja terapije, pri reevaluaciji bolesti
koncentracija DNA	minimalno 50 ng/μL			
čistoća DNA	A260/A280 omjer između 1.8 i 2.0, A260/A230 omjer iznad 2.0			

FFPE (engl. *Formalin Fixed Paraffin Embedded*) – rezovi tkiva fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin

NGS u dijagnostici mijeloproliferacijskih neoplazmi

Specifične somatske mutacije u hematopoetskim matičnim stanicama koštane srži dovode do prekomjerne proizvodnje određenih tipova krvnih stani-

ca mijeloidne loze. Mijeloproliferacijske neoplazme (engl. *myeloproliferative neoplasms*, MPN) jesu klonalni poremećaji, što znači da potječu iz jedne matične stanice zahvaćene patogenom mutacijom. Posljedično dolazi do pojačane proliferacije mije-

loidnih stanica u koštanoj srži te povišenog broja cirkulirajućih stanica u perifernoj krvi. Ovisno o specifičnom tipu MPN-a, dolazi do povećanja broja eritrocita, trombocita ili leukocita. Dijagnostika MPN-a temelji se na kliničkim značajkama, morfološkoj analizi bioptata koštane srži i molekularnoj dijagnostici. Razlikovanje pojedinih entiteta ključno je za izbor terapijske strategije i prognozu bolesti. Molekularna osnova nastanka MPN-a poznata je u više od 95 % slučajeva, pri čemu se fenotip bolesti može objasniti somatskim mutacijama u genima *JAK2* (engl. *Janus kinase 2*), *MPL* (engl. *myeloproliferative leukemia virus*) i *CALR* (engl. *calreticulin*). Ove mutacije dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta JAK-STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), koji je ključan za proliferaciju mijeloidnih stanica. U preostalih ~ 5 % slučajeva molekularna podloga nije poznata – takvi se slučajevi nazivaju „trostruko negativnim” (engl. *triple-negative*) MPN-ovima. Dodatne mutacije u epigenetskim regulatorima, genima povezanim s popravkom DNA i kontrolom staničnog ciklusa, mogu utjecati na progresiju bolesti i razvoj mijelofibroze ili transformaciju u akutnu leukemiju. Rjeđe se pojavljuju mutacije regulatora spajanja (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*) ključnih za uklanjanje introna i spajanje egzona, što može

dovesti do aberantnih proteina i poremetiti diferencijaciju hematopoetskih stanica. Također, mutacije zahvaćaju gene odgovorne za strukturu kromatina, epigenetske funkcije i staničnu signalizaciju, kao što su *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *KRAS*, *NRAS*, *STAG2* i *TP53*, koji mogu dodatno doprinijeti klonalnoj evoluciji i heterogenosti bolesti. Kao posljedica mutacija u genima *JAK2*, *CALR* i *MPL* nastaju tri glavna tipa Ph-negativnih mijeloproliferacijskih neoplazmi: policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET) i primarna mijelofibroza (PMF). Među njima je PV najčešći, a PMF najagresivniji i najmanje čest oblik bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) i Međunarodna klasifikacija (engl. *International Consensus Classification*, ICC) objavile su 2022. godine nove, neovisne klasifikacije koje uključuju glavne i dodatne laboratorijske te morfološke kriterije za dijagnozu PV, ET i PMF. Za molekularnu potvrdu dijagnoze preporučuje se korištenje visoko osjetljivih metoda detekcije: za *JAK2* V617F mutaciju s osjetljivošću od 1 % te za *CALR* i *MPL* mutacije s osjetljivošću u rasponu od 1 do 3 %, što se može postići osjetljivim NGS tehnikama.

Primarni uzorak za molekularnu dijagnostiku mutacija u genima *JAK2*, *CALR* i *MPL* jest koštana srž ili periferna krv (Tablica 1.1.). Preporučena

Tablica 1.2.

ANALITIČKA FAZA				
	AML	MDS	MPN	KLL/SLL/MCL
vrsta NGS metode	ciljani genski panel			
paneli gena	odabrani prema najnovijim smjernicama; sadrže gene ključne za dijagnostičku evaluaciju bolesti, stratifikaciju rizika bolesti, odabir terapije			
	obvezni: <i>CEBPA</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3*</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>DDX41</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i> dodatno preporučeni: <i>ANKRD26</i> , <i>BCORL1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i> , <i>CSF3R</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>JAK2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>NF1</i> , <i>PHF6</i> , <i>PPM1D</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAD21</i> , <i>SETBP1</i> , <i>TET2</i> , <i>WT1</i> * <i>FLT3</i> ITD- analiza fragmenata		<i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i>	<i>TP53</i> , <i>BTK</i> , <i>BCL2</i> , <i>PLCG2</i>
priprema knjižnice	ovisno o panelu koji se koristi (<i>amplicon/capture</i>)			
minimalni zahtjevi za validaciju metode	usporedba s referentnom metodom (sekvenciranje prema Sangeru, alel-specifični PCR) uključenost u program vanjske kontrole kvalitete (UK NEQAS, ERIC) međulaboratorijska usporedba (razmjena izolata DNA, FASTQ podataka)			
međulaboratorijska usporedba	2x godišnje razmjena FASTQ datoteka, a 1x godišnje razmjena 1 – 2 uzorka izolata DNA			

metoda analize jest sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS), pri čemu je ključno obuhvatiti: egzon 9 gena *CALR*, egzone 12 do 15 gena *JAK2* te egzon 10 gena *MPL* (Tablica 1.2.). U nalazu se prikazuju isključivo patogene i vjerojatno patogene varijante. Varijante nepoznatog kliničkog značenja (engl. *variant of uncertain significance*, VUS) ne navode se, osim u slučajevima kada je to posebno zatraženo od mjerodavnog liječnika (Tablica 1.3.). Tihe mutacije i benigni polimorfizmi koji ne utječu na funkcionalnost proteina ne uključuju se u izvještaj.

NGS u dijagnostici B-KLL/SLL/MCL

Tumorski protein p53, poznat i kao „čuvar genoma“, ima središnju ulogu u očuvanju stabilnosti genoma i sprječavanju mutacija. Poremećaj funkcije p53 koji dovodi do nestabilnog genoma povezan je s brojnim tumorima uključujući i hematološke (kronična limfocitna leukemija, akutne leukemije, nehodgkinovi limfomi, multipli mijelom i sl.) te ima važnu ulogu u progresiji bolesti i rezistenciji na liječenje. U kroničnoj limfocitnoj leukemiji (KLL) nefunkcionalni p53 protein povezan je s lošijom prognozom i rezistencijom na kemoterapiju, a klinička važnost aberacije *TP53* kao prognostičkoga i prediktivnog čimbenika u KLL-u pokazana je u mnogim studijama. Razvoj novih lijekova koji inhibiraju B-stanične signalne putove te antiapoptotične proteine pokazao se uspješnim u liječenju bolesnika koji nose aberacije *TP53*. Iz tog razloga analiza aberacija *TP53* danas je vrlo važan biološki biljeg u KLL-u. Gen *TP53* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 17 (17p13.1). Nefunkcionalni protein p53 nastaje zbog delecije 17p13 i/ili zbog mutacije u *TP53* genu. Istraživanja su pokazala da je inaktivacija *TP53* lokusa zbog del17p u više od 60 % slučajeva povezana s mutacijom *TP53* gena u drugom *TP53* alelu, dok se kod bolesnika koji nemaju deleciju 17p mutacija u *TP53* genu pojavljuje do u 30 % slučajeva. S obzirom na važnost aberacija *TP53* kao prognostičkoga

i prediktivnog čimbenika te znatan udio slučajeva s aberacijom bez delecije 17p, analiza mutacije *TP53* trebala bi se provesti svaki put prije početka liječenja ili kod prije neliječenih bolesnika ili kod kasnijih linija liječenja zbog toga jer se mutacija *TP53* može pojaviti na početku ili tijekom bolesti, a isto tako može se i izgubiti tijekom liječenja. Učestalost aberacija *TP53* prije 1. linije liječenja može biti i do 10 % dok kod idućih linija i znatno više što ovisi i o do tada provedenom liječenju.

Materijal za analizu mutacije *TP53* najčešće je periferna krv, međutim, mogu se koristiti i drugi uzorci poput koštane srži, punktata limfnog čvora, različitih izljeva ili parafinske kocke ako je udio limfocita u perifernoj krvi manji od 70 % (Tablica 1.1.). Prije izolacije DNA iz uzorka potrebno je izdvojiti mononukleare centrifugiranjem na gradijentu gustoće te, ako je potrebno, dodatno izdvojiti KLL limfocite s pomoću magnetnih kuglica ili korištenjem staničnog razvrstača. Preporučena metoda sekvenciranja jest NGS ciljani genski panel zbog visoke osjetljivosti. U tablici 1.2. navedeni su i dodatni geni koji se mogu uključiti u analizu, a mutacije u tim genima važne su kod korištenja različitih BTK i/ili BCL2 inhibitora. Prema preporukama za *TP53*, sekvencirati bi se trebali egzoni 2 – 11 da se pokrije cijela kodirajuća regija, a također je potrebno pokriti i područje +/-2 do 10 nukleotida uzvodno i nizvodno od regije egzona čime se detektiraju mutacije unutar regije introna koje mogu dovesti do grešaka u izrezivanju egzona.

Pri interpretaciji nalaza treba provjeriti *TP53* baze podataka navedene u tablici 1.3. koje navode koje mutacije dovode do nefunkcionalnog proteina p53. Na nalazu se izvještava o patogenim i vjerojatno patogenim varijantama, dok se varijante nepoznatog značenja ne navode osim u dogovoru s mjerodavnim liječnikom. Tihe mutacije i polimorfizmi koji se pojavljuju i ne dovode do nefunkcionalnog p53 proteina ne prijavljuju se na nalazu.

Tablica 1.3.

POSILIJEANALITIČKA FAZA				
	AML	MDS	MPN	KLL/SLL/MCL
analiza podataka (engl. <i>alignment, variant calling</i>)	odabrani bioinformatički alati			
minimalni VAF/ osjetljivost metode	5 %		1 %	
minimalni broj očitanja varijante (engl. <i>variant read</i>)	10			
minimalna dubina čitanja (engl. <i>read depth/ coverage</i>)	500		3000	
kategorizacija i interpretacija varijanti	literatura – stručno odobreni radovi i studije			
	javne baze za interpretaciju varijanti			
	Varsome, COSMIC, gnomAD, Franklin, itd.		mrežne stranice: https://tp53.isb-cgc.org/ ; http://p53.fr/	
vrste genskih varijanti	točkaste mutacije (engl. <i>single nucleotide variant, SNV</i>), male insercije/delecije (engl. <i>indels</i>)			
	prema ishodu: <i>missense, nonsense, frameshift, stop gain, stop loss</i>			
	prema poziciji: u egzonu (kodirajuće i nekodirajuće (UTR) regije), u intronu (<i>splice site</i> regije)			
kategorije varijanti na nalazu	patogene, vjerojatno patogene, varijante nepoznatog značenja (VUS) – uz napomenu koja objašnjava izvještavanje o njima			
ocjena kliničkog značenja varijante (engl. <i>Tier</i>)	razina dokaza kliničkog značenja varijante obuhvaća dijagnostički, prognostički, terapijski i preventivni utjecaj varijante na kliničku odluku			
	<i>Tier I, Tier II, Tier III</i>			
sadržaj nalaza	ime i prezime bolesnika, datum rođenja, MBOO, klinika/odjel, radna dijagnoza, vrsta uzorka, laboratorijska oznaka uzorka, datum uzorkovanja, datum izdavanja nalaza, metodologija (kemija i tehnologija sekvenciranja, bioinformatički alati, baze podataka), reference/smjernice za kategorizaciju varijanti, tablično prikazane varijante (naziv prema HGVS nazivlju; referentna sekvenca, transkript, protein, klasa patogenosti, ocjena kliničkog značenja (<i>Tier</i>), VAF (%), ID patogena (npr. “rs” broj, COSMIC broj), popis gena uključenih u panel, osjetljivost metode, ograničenja metode, objašnjenja uz varijantu važna za kliničku interpretaciju			
TAT - vrijeme do izdavanja nalaza (engl. <i>turnaround time</i>)	od trenutka postavljanja indikacije za dijagnostički postupak NGS			

Zahvala: Zahvaljujemo prof. Nikoli Habuzinu na lektoriranju teksta.

Literatura

- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H i sur. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140:1345-77. doi:10.1182/blood.2022016867
- Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1703–19.
- Horak P, Griffith M, Danos AM, Pitel BA, Madhavan S, Liu X i sur. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med*. 2022;24:986-98. doi:10.1016/j.gim.2022.01.001
- Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S i sur. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a Joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1720–48. doi:10.1038/s41375-022-01620-2
- Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee, EW, Lincoln SE i sur. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a Joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2018;20:4-27. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.11.003
- Koeppel F, Muller E, Harlé A, Guen C, Sujobert P, Trabelsi Grati O i sur. Standardisation of pathogenicity classification for somatic alterations in solid tumours and haematologic malignancies. *Eur J Cancer* 2021;159:1–15.
- Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J i sur. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a Joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:341-65. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.01.011
- Cho YU. The role of next-generation sequencing in hematologic malignancies. *Blood Res* 2024;59:11. doi:10.1007/s44313-024-00010-0
- Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T i sur. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018;32:1070-80. doi:10.1038/s41375-017-0007-7
- Malcikova J, Pavlova S, Baliakas P, Chatzikonstantinou T, Tausch E, Catherwood M i sur. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia - 2024 update. *Leukemia* 2024;38:1455–68. doi:10.1038/s41375-024-02267-x
- van de Haar J, Roepman P, Andre F, Balmaña J, Castro E, Chakravarty D i sur. ESMO Recommendations on clinical reporting of genomic test results for solid cancers. *Ann Oncol* 2024;(35):954 - 67. doi:10.1016/j.annonc.2024.06.018
- Crooks KR, Farwell Hagman KD, Mandelker D, Santani A, Schmidt RJ, Temple-Smolkin RL i sur. Recommendations for next-generation sequencing germline variant confirmation: a Joint report of the Association for Molecular Pathology and National Society of Genetic Counselors. *J Mol Diagn* 2023;25:411-27 doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.12
- Rehder C, Bean LJH, Bick D, Chao E, Chung W, Das S i sur. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2021;23:1399-415. doi:10.1038/s41436-021-01139-4.
- Dameshek W. Editorial: some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-5. doi: 10.1182/blood.V6.4.372.372
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR i sur. Proposals for the classification of the acute leukaemias of the French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol* 1976;33:451–8. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
- Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med* 1979;30:135–43. doi: 10.1146/annurev.me.30.020179.001031.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM i sur. International Consensus Classification of myeloid neoplasms and acute leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022;140:1200–28. doi: 10.1182/blood.2022015850.
- Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood* 2017;129:1607-16. doi: 10.1182/blood-2016-10-696005
- Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K i sur. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014;123:3247-54. doi:10.1182/blood-2014-01-546150
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L i sur. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-16. doi:10.1056/NEJM200012283432602
- Moia R, Boggione P, Mahmoud AM, Kodipad AA, Adhinaveni R, Sagiraju S i sur. Targeting p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Ther Targets* 2020;24:1239-50. doi:10.1080/14728222.2020.1832465
- Bomben R, Rossi FM, Vit F, Bittolo T, D'Agaro T, Zucchetto A i sur. TP53 mutations with low variant allele frequency predict short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2021;27:5566-75. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0701
- Sedlarikova L, Petrackova A, Papajik T, Turcsanyi P, Kriegova E. Resistance-associated mutations in chronic lymphocytic leukemia patients treated with novel agents. *Front Oncol* 2020;10:894. doi:10.3389/fonc.2020.0089

Prilog 1. Primjer nalaza dobivenog NGS-om**Nalaz dobiven sekvenciranjem nove generacije (NGS)**

IME I PREZIME:

Datum rođenja:

Broj uzorka:

MBOO:

Datum uzorkovanja:

Vrsta uzorka:

Datum izdavanja nalaza:

Metoda:

Knjižnice za sekvenciranje pripremljene su primjenom reagensa proizvođača Agilent Technologies; Myeloid Custom Panel, a sekvenciranje izvedeno na Illumina MiSeq platformi za sekvenciranje.

Baze podataka:

Varsome (<https://clinical.varsome.com/>), COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>), TP53 (<https://TP53.isb-cgc.org>), ClinGen (<https://clinicalgenome.org/>)

Gen	Referentna sekvenca	Transkript	Protein	Kliničko značenje*	VAF	ID patogena
TP53	NM_000546.5	c.833C>G	p.(Pro278Arg)	<i>Tier I</i>	18 %	COSV52661225 rs876659802
KIT	NM_000222.3	c.1255_1257del	p.(Asp419del)	<i>Tier I</i>	32,6 %	COSV55387136 rs2109760516
GATA2	NM_032638.5	c.962T>A	p.(Leu321His)	<i>Tier II</i>	45,1 %	COSV62003239 rs2107670378

**Tier I* – varijante od snažnoga kliničkog značenja koje se dovode u vezu s bolesti, terapijom i sl.

Tier II – varijante koje se povezuju s bolesti, ali su slabijega kliničkog značenja

Tier III – varijante nepoznatoga kliničkog značenja (engl. *variant of uncertain significance*, VUS)

Interpretacija rezultata:

Sekvenciranjem su utvrđene varijante u navedenim genima klasificirane prema kliničkom značenju *Tier I* i *Tier II*, a za sve ostale gene **nisu utvrđene varijante** klasificirane kao patogene, vjerojatno patogene ili VUS, a prema kliničkom značenju kao *Tier I*, *Tier II* i *Tier III*. Varijante gena kliničkog značenja *Tier IV*, odnosno benigne varijante nisu prikazane na nalazu. Negativan rezultat ne isključuje genski uzrok bolesti s obzirom na to da se mutacija može nalaziti u dijelu genoma koji nije obuhvaćen ovom metodom. Referentne su sekvence promjenjive i stoga je ključan datum izvješća o utvrđenim varijantama.

Popis analiziranih gena u panelu:

<i>ABL1</i> <i>ASXL1</i> <i>ANKRD26</i>	<i>CEBPBA</i> <i>CSF3R</i>	<i>HRAS</i> <i>IDH1</i>	<i>MYD88</i> <i>NOTCH1</i> <i>NF1,</i>	<i>SF3B1</i> <i>SMC1A</i>
<i>ATRX</i> <i>BCOR</i>	<i>CUX1</i> <i>DNMT3A</i> <i>DDX41</i>	<i>IDH2</i> <i>IKZF1</i>	<i>NPM1</i> <i>NRAS</i>	<i>SMC3</i> <i>SRSF2</i>
<i>BCORL1</i> <i>BRAF</i>	<i>ETV6/TEL</i> <i>EZH2</i>	<i>JAK2</i> <i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i> <i>PHF6</i> <i>PPM1D</i>	<i>STAG2</i> <i>TET2</i>
<i>CALR</i> <i>CBL</i>	<i>FBXW7</i> <i>FLT3</i>	<i>KDM6A</i> <i>KIT</i>	<i>PTEN</i> <i>PTPN11</i>	<i>TP53 (p53)</i> <i>U2AF1</i>
<i>CBLB</i> <i>CBLC</i>	<i>GATA1</i> <i>GATA2</i>	<i>KRAS</i> <i>MLL</i>	<i>RAD21</i> <i>RUNX1</i>	<i>WT1</i> <i>ZRSR2</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>GNAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SETBP1</i>	

Napomena:

U pretraživanje su uključeni svi kodirajući egzoni sekvenciranih gena te dijelovi introna uzvodno i nizvodno od egzona. Ako je pronađena varijanta u genu, naznačena je u tablici s rezultatima. Na nalazu nisu navedeni neutralni polimorfizmi, tihe i nepatogene varijante. Ograničenja metode jesu nemogućnost dokazivanja varijanti čija je učestalost manja od 0,05 (5 %), varijacija broja kopija te velikih strukturnih promjena gena.

Promjene u sekvenci koje se interpretiraju kao mutacija definirane su prema referentnom ljudskom genomu (GRCh37/hg19) i imenuju se prema standardnom nazivlju *Human Genome Variation Society* (HGVS). Dubina čitanja dokazanih varijanti bila je > 500x.

Metoda ne može razlikovati somatske i nasljedne varijante.

Klasifikacija varijanti prema:

Horak P, Griffith M, Danos AM, Pitel BA, Madhavan S, Liu X i sur. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med* 2022;24:986-98. doi: 10.1016/j.gim.2022.01.001.

Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S i sur. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002

Pretragu izradio/la:

Odgovorna osoba:

Prilog 2. Informirani pristanak za molekularno-dijagnostički postupak NGS**INFORMIRANI PRISTANAK - SUGLASNOST**

Ime i prezime pacijenta:		
Datum rođenja:		
Spol (zaokružiti)	muški	ženski
Mjesto rođenja:		
Adresa stanovanja:		
MBO:		
Ime i prezime zakonskog zastupnika/skrbnika:		

(preporučeni molekularno-dijagnostički postupak)

	Izjavljujem da dajem suglasnost za molekularno-dijagnostički postupak/postupke preporučen/e od liječnika.
	Potvrđujem da sam obaviješten/a o medicinskim indikacijama za primjenu genetičkoga dijagnostičkog testiranja te o namjeni, svojstvima i ograničenjima preporučenog postupka. Potvrđujem da sam pročitao/pročitao obrazac "Informirani pristanak – obavijest" te da sam pritom liječniku mogao/la postaviti pitanja u svrhu razjašnjavanja nejasnoća. Potvrđujem da razumijem navedene informacije.
	Razumijem da postoji mogućnost da ću biti zamoljen/a za novi uzorak zbog zahtjeva medicinske dijagnoze ili zbog potrebe za specifičnim kvalitativnim i kvantitativnim svojstvima uzorka koji moraju biti zadovoljeni za potrebe molekularno-dijagnostičkog postupka.

Vlastoručni potpis pacijenta/zakonskog zastupnika/skrbnika: _____

Suglasnost za dodatnu primjenu u svrhu kontrole kvalitete i znanstveno-istraživačke svrhe:

	Suglasan/suglasna sam da se višak genetičkog materijala, te računalni podaci testiranja u obliku elektroničke datoteke, šifrirano pohrane i koriste u svrhu programa međulaboratorijske kontrole kvalitete i za validaciju novih molekularno-dijagnostičkih postupaka.
	Suglasan/suglasna sam da se dobiveni rezultati testiranja bez otkrivanja identiteta koriste za statističku obradu podataka u znanstveno-istraživačke svrhe i u svrhu praćenja stanja zdravlja stanovništva, sukladno Zakonu o podacima i informacijama u zdravstvu (NN 14/19) i Zakonu o zaštiti prava pacijenata (NN 169/04 i 37/08) Republike Hrvatske koji jamče zaštitu identiteta i osobnih podataka pacijenata.

Potpis i faksimil doktora medicine: _____

Mjesto i datum: _____

Prilog 3. Izjava o odbijanju molekularno-dijagnostičkog postupka**IZJAVA O ODBIJANJU MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKOG POSTUPKA**

Izjavljujem da slobodnom voljom, utemeljenom na potpunoj obaviještenosti o preporučenom molekularno-dijagnostičkom postupku koju sam dobio/la i u pisanom obliku, odbijam:

(preporučeni dijagnostički postupak)

Ime i prezime pacijenta:	
Datum rođenja:	
Spol (zaokružiti)	muški ženski
Mjesto rođenja:	
Adresa stanovanja:	
MBO:	
Ime i prezime zakonskog zastupnika/skrbnika:	

Vlastoručni potpis pacijenta/zakonskog zastupnika/skrbnika:

Potpis i faksimil doktora medicine: _____

Mjesto i datum: _____

Prilog 4. Informirani pristanak – obavijest

INFORMIRANI PRISTANAK – OBAVIJEST

Opis postupka

Pri upisu u bolnički informacijski sustav (BIS) dodijelit će Vam se jedinstveni identifikacijski broj. Njime će se obilježiti i šifrirati Vaš uzorak i tako osigurati povjerljivost Vašeg identiteta. U svrhu provođenja molekularno-dijagnostičkog postupka pristupit ćete uzorkovanju periferne krvi i/ili koštane srži, ovisno o preporučenom molekularno-dijagnostičkom postupku. Iz uzorka će se izolirati genetički materijal nakon čega slijedi preporučeni molekularno-dijagnostički postupak analize ciljanog panela gena metodom sekvenciranja nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS). Primijenjeni test omogućava dokazivanje genskih varijanti ključnih za dijagnostičku evaluaciju bolesti, stratifikaciju rizika bolesti i odabir terapije. Interpretacija i klasifikacija genskih varijanti prema patogenosti i kliničkom značenju provodi se u skladu s vrijedećim smjernicama. Ne testiraju se geni koji nisu uključeni u panel. Nalaz s rezultatima analize bit će oblikovan u elektroničkom obliku i dostupan liječniku specijalistu koji je zatražio dijagnostički postupak i Vašem liječniku obiteljske medicine.

Mogući rizici postupka i zamjena za preporučeni postupak

Fizički rizik od molekularno-dijagnostičkog postupka jest minimalan. Uzorkovanje periferne krvi/koštane srži obavlja se standardiziranim postupkom nakon kojeg možete osjetiti lagani bol zbog uboda iglom. Na mjestu uboda moguća je pojava crvenila ili modrice te slabije krvarenje koje u većini slučajeva vrlo brzo prestaje na jači pritisak. Nema prikladnih zamjena za prikupljanje uzoraka u svrhu provođenja hematološkoga molekularno-dijagnostičkog postupka. Molekularno-dijagnostička metoda sekvenciranja dio je standardne kliničke skrbi u području hematoonkoloških bolesti te je s obzirom na analitička i bioinformatička svojstva složenosti, osjetljivosti i specifičnosti najnapredniji dijagnostički postupak u ovom trenutku.

Koristi i ograničenja dijagnostičkog postupka NGS

Korist primjene molekularno-dijagnostičkog postupka metodom NGS očituje se u poboljšanju osobne zdravstvene skrbi za pacijenta. Rezultat dijagnostičkog postupka može utjecati na terapijski postupak te poboljšati ishode liječenja. Ograničenja metode NGS odnose se na nemogućnost otkrivanja genskih varijanti čija je alelna učestalost manja od 5 % u ispitivanom uzorku te na nemogućnost određivanja pojedinih delecija/insercija i većih ponavljajućih genskih sekvenci. Metodom NGS ne možemo razlikovati stečene (somatske) od naslijeđenih genskih promjena. Moguće su promjene u klasifikaciji genskih varijanti prema patogenosti i/ili kliničkom značenju zbog kontinuiranog napretka u poznavanju genske podloge bolesti. Ovom analizom nije moguće otkriti varijante gena koji nisu uključeni u primijenjeni ciljani genski panel.

Identifikacija genskih varijanti nepoznatog značenja i genskih varijanti zametne linije

Analizom genskog materijala primjenom metode NGS u hematoonkološkim testiranjima ponajprije se ispituju somatske (stečene) genske varijante koje su klinički važne. Pritom postoji mogućnost detekcije varijanti u genima uključenim u primijenjeni panel za koje nije poznato kliničko značenje. Zbog prirode same metode sekvenciranja moguće je otkriti i genske

varijante koje su potencijalno nasljedne genske varijante (varijante zametnih stanica). Genska varijanta može se smatrati naslijeđenom ako se prisutnost varijante utvrdi u drugom tkivu istog pacijenta.

Privatnost i povjerljivost medicinskih podataka

Privatnost i povjerljivost Vaših osobnih podataka, uključujući zdravstvene podatke, zaštićeni su primjenom Zakona o zdravstvenoj zaštiti, Zakona o zaštiti prava pacijenata, Zakona o podacima i informacijama u zdravstvu.

Obrazac Informirani pristanak – suglasnost

Obrazac Informirani pristanak – obavijest

Obrazac Izjava o odbijanju molekularno-dijagnostičkog postupka

Literatura

1. Zakon o zaštiti prava pacijenata Republike Hrvatske ("Narodne novine", broj 169/04 i 37/08). Dostupno na adresi: <https://www.zakon.hr/z/255/zakon-o-za%C5%A1titi-prava-pacijenata>
2. Pravilnik o obrascu suglasnosti te obrascu o odbijanju pojedinog dijagnostičkog, odnosno terapijskog postupka ("Narodne novine", broj 10/08). Dostupno na adresi: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_01_10_305.html
3. Zakon o podacima i informacijama u zdravstvu Republike Hrvatske ("Narodne novine", broj 14/19). Dostupno na adresi: <https://www.zakon.hr/z/1883/zakon-o-podacima-i-informacijama-u-zdravstvu>
4. Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske ("Narodne novine", broj 100/18, 125/19, 147/20, 119/22, 156/22, 33/23, 36/24). Dostupno na adresi: <https://www.zakon.hr/z/190/zakon-o-zdravstvenoj-za%C5%A1titi>
5. Marron JM. Informed consent for genetic testing in hematology. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2020;1:213-8. doi:10.1182/hematology.2020000107.
6. Rego S, Grove ME, Cho MK, Ormond KE. Informed Consent in the Genomics Era. Cold Spring Harb Perspect Med 2020;10:a036582. doi:10.1101/cshperspect.a036582

Sekvenciranje nove generacije – dodatak u otkrivanju genetičkih promjena ili perspektiva prema ciljanoj terapiji limfoproliferativnih bolesti

Margareta Radić Antolic

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

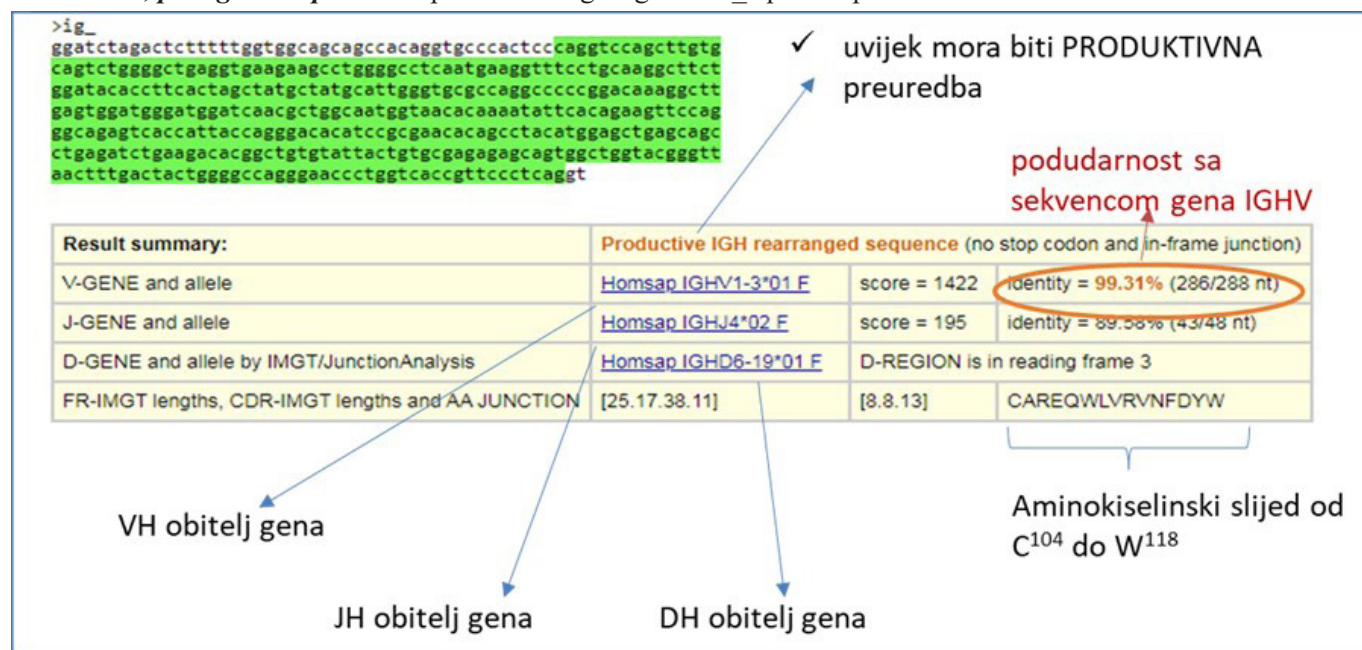
Sekvenciranje nove generacije (NGS – engl. *Next generation sequencing*) sve se više rutinski koristi u molekularnoj dijagnostici uključujući tako i kliničke laboratorije za hematologiju. Zasluge za to velikim dijelom pripadaju novim klasifikacijama leukemija i limfoma iz 2022. godine. Naime, Svjetska zadravstvena organizacija je revidirala prethodne klasifikacije te objavila 5. izdanje dok je paralelno ICC (engl. *International Consensus Classification*), objavila svoju klasifikaciju limfoidnih i mijeloidnih neoplazmi. Obje se klasifikacije temelje na sve jačem utjecaju molekularnih biljega bilo da se radi o citogenetskim promjenama ili molekularnim promjenama na razini pojedinih gena nego na morfološkim kriterijima koji su bili temelj prethodnih klasifikacija.

Dijagnostika limfoidne neoplazme počinje odabirom odgovarajućeg uzorka, bilo da se radi o perifernoj krvi ili koštanoj srži za cirkulirajuću limfoproliferaciju ili bioptatu (punktatu) limfnog čvora u slučaju sumnje na limfom. Odabir uzorka izuzetno je važan dio predanalitičkog procesa jer upravo o kvaliteti i sadržaju uzorka (udio neoplastičnih stanica) ovisi i osjetljivost izvedene analize. Odabir antikoagulant (EDTA – ljubičasta epruveta) te transport na temperaturi između 2°C i 8°C unutar 24h od uzorkovanja osigurava očuvanje nukleinskih kiselina koje su osnova molekularne dijagnostike. Medicinska dokumentacija je također korisna pogotovo ako laboratoriju nije dostupna kroz bolnički informatički sustav te valjano ispunjen Zahtjev koji se nalazi na stranici Krohema (<https://www.krohem.hr/kronicna-limfocitna-leukemija-kll/>). Predanalitički laboratorijski postupci većinom se temelje na obogaćivanju uzorka, izdvajanju nukleinskih kiselina,

dok analitički dio obuhvaća ciljano sekvenciranje panela gena za koje je dokazano da se dovode u vezu s kliničkom slikom bolesti ili imaju utjecaj na odabir terapije. Pritom se koriste odabrani bioinformatički alati za pretraživanje poznatih i novootkrivenih varijanti koje se koriste za potvrdu dijagnoze, stratifikaciju rizika bolesti te odabir ciljane terapije. Ciljano sekvenciranje nove generacije je moćan, ali i financijski isplativ alat za rutinsku molekularnu dijagnostiku.

Najučestalija limfoproliferacija u populaciji odraslih, kronična limfocitna leukemija (KLL), dnevno nije bila ovisna o molekularnoj dijagnostici, dok je danas nezamislivo pristupiti liječenju bez podataka o mutacijskom statusu varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (IGHV) te mutacijskom statusu *TP53*. IGHV mutacijski status je povezan s prognozom bolesti te utječe na odluku o terapijskom pristupu, dok mutacijski status *TP53* direktno utječe na odabir vrste terapijskog pristupa kod dijagnoze i u relapsu bolesti. IGHV mutacijski status određuje se umnažanjem klonotipske preuredbe gena IGHV-IGHD-IGHJ, koristeći Sangerovo sekvenciranje ili NGS i procjenu postotka identičnosti s najbližijim genom IGHV zametnih stanica. Granična vrijednost podudarnosti sa sekvencom gena IGHV za svrstavanje slučajeva KLL u prognostičke skupine je 98% stoga je mutacijski status gena IGHV definiran kao nemutirani ukoliko je podudarnost sa sekvencom gena IGHV veća od 98% odnosno kao mutirani ako je podudarnost manja od 98% (Slika 1.). Tako KLL bolesnici s IGHV nemutiranom preuredbom spadaju u skupinu nepovoljnog rizika dok oni s mutiranim IGHVom imaju povoljnu prognozu bolesti.

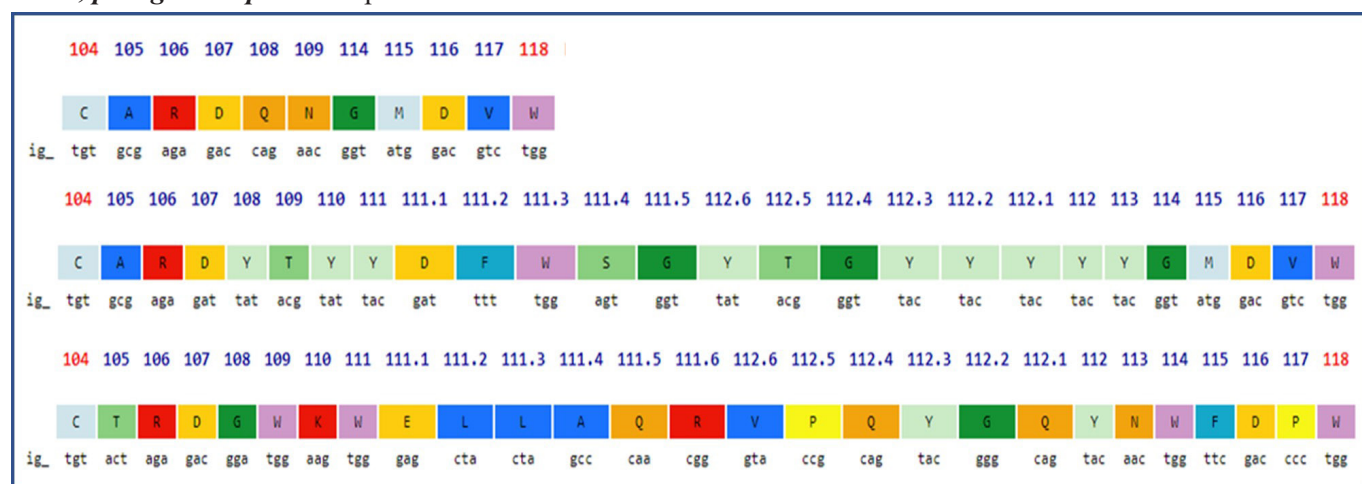
Slika 1. Primjer rezultata bioinformatičke analize utvrđivanja podudarnosti IGHV klona s referentnom sekvencom, prilagođeno prema https://www.imgt.org/IMGT_vquest/input.



Nadalje, karakterističan slijed aminokiselina unutar varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (VH CDR3) može se dodijeliti stereotipnim podskupinama (engl. *subset*) karakteriziranih specifičnom kliničkom prezentacijom i ishodom bolesti

te može pridonijeti točnijoj stratifikaciji rizika KLL bolesnika. Pritom se ističu četiri najvažnije podskupine; #1, #2 i #8 koje su nepovoljnog rizika neovisno o mutacijskom statusu IGHV gena te podskupina #4 povoljnog rizika.

Slika 2. Podtipovi B staničnog receptora (VH CDR3) karakterizirani su slijedom aminokiselina između C104 i W118, prilagođeno prema <https://station2.arrest.tools/subsets/>.



Uz obavezno određivanje mutacijskog statusa *TP53* pri svakoj promjeni terapije, poželjno je još i određivanje mutacija u genima *BTK*, *PLCG2* i *BCL2* koje mogu biti uzrok rezistencije na inhibitore Burtonove tirozin kinaze (BTK) te *BCL2* inhibitore. Sve navedeno opravdava nezaobilaznu upotrebu NGS u rutinskom laboratoriju, a u službi modernog pristupa liječenju bolesnika s KLL-om.

Uloga NGS-a u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici limfoma također zauzima važno mje-

sto posebice ako se radi o morfološki sličnim entitetima, subklasifikaciji ili oskudnom uzorku za patohistološku dijagnostiku. U tu svrhu koriste se ciljani genski paneli (Tablica 1.) za dokazivanje pojedinačnih varijanti jednog nukleotida (SNP – engl. *single nucleotide polymorphism*), malih insercija i delecija (engl. *indel*), ali i promjena broja kopija gena (CNA – engl. *copy number alteration*) te dokazivanja strukturnih varijanti kojima se omogućava bolja subklasifikacija limfoma, stratifikacija rizika

bolesnika i predviđanje odgovora na terapiju. Sve je popularnije korištenje cirkulirajuće tumorske DNA (ctDNA) iz krvne plazme zbog dostupnosti uzorka i neinvazivnosti pri uzorkovanju. U kombinaciji s

NGS-om visoke osjetljivosti ctDNA se čini se valjanom alternativom biopsiji tkiva za dijagnozu, ali i u praćenju mjerljive ostatne bolesti (MRD engl. *measurable residual disease*).

Tablica 1. Preporučeni NGS paneli za B i T stanične limfome, prilagođeno prema Sánchez-Beato, Margarita et al (2024): 1043-1062. doi:10.1007/s12094-023-03307-1

B- stanični limfomi						
obaveznii		preporučeni		CNAs		
<i>B2M</i>	<i>KTM2D</i>	<i>ARID1A</i>	<i>MEF2B</i>	<i>ATM</i>	CN gain	11p
<i>BCL10</i>	<i>MYC</i>	<i>ARID1B</i>	<i>MKLN1</i>	<i>BCL2</i>	CN gain	18q21.33
<i>BCL2</i>	<i>MYD88</i>	<i>ATM</i>	<i>NFKBIE</i>	<i>BCL6</i>	CN gain	3q27.3
<i>BCL6</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>CD79A</i>	<i>NSD2</i>	<i>CDKN2A</i>	CN loss	9p21.3
<i>BIRC3</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>CSFR2B</i>	<i>P2RY8</i>	<i>FOXO1</i>	CN gain	13q
<i>BTG1</i>	<i>PIM1</i>	<i>DDX3X</i>	<i>PLEKHG1</i>	<i>MYC</i>	CN gain	8q24.21
<i>BTK</i>	<i>PIM2</i>	<i>FBXW7</i>	<i>POT1</i>	<i>TP53</i>	CN loss	17p13.1
<i>CARD11</i>	<i>PLCG2</i>	<i>FOXO1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>CCND1</i>	CN gain	11q13
<i>CCND3</i>	<i>POU2AF1</i>	<i>HIVEP2</i>	<i>S1PR2</i>	<i>Del (7q)</i>	CN loss	7q31–32
<i>CD58</i>	<i>PRDM1</i>	<i>IGLL5</i>	<i>SIN3A</i>	<i>TRISOMY 3</i>	CN gain	
<i>CD70</i>	<i>SF3B1</i>	<i>IKBK</i>	<i>RPS15</i>	<i>TRISOMY 12</i>	CN gain	
<i>CD79B</i>	<i>SGK1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>TRAF2</i>	<i>TRISOMY 18</i>	CN gain	
<i>CHD2</i>	<i>SOCS1</i>	<i>ITPKB</i>	<i>TRAF3</i>			
<i>CREBBP</i>	<i>STAT3</i>	<i>LYN</i>	<i>XP01</i>			
<i>DTX1</i>	<i>STAT6</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>ZMYM3</i>			
<i>EP300</i>	<i>TCF3</i>	<i>MAP3K14</i>	<i>ZNF292</i>			
<i>EZH2</i>	<i>TET2</i>					
<i>GNA13</i>	<i>TNFAIP3</i>					
<i>HIST1H1E</i>	<i>TNFRSF14</i>					
<i>IRF8</i>	<i>TP53</i>					
<i>ID3</i>	<i>UBE2A</i>					
<i>KLF2</i>	<i>IGHV</i>					

T- stanični limfomi						
obavezni		preporučeni		CNAs		
<i>CD28</i>	<i>RHOA</i>	<i>ARID1A</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>TP53</i>	CN loss	17p13.1
<i>DNMT3A</i>	<i>SETD2</i>	<i>CTCF</i>	<i>PREX2</i>	<i>MYC</i>	CN gain	8q24.21
<i>IDH2</i>	<i>STAT3</i>	<i>FYN</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>CDKN2A</i>	CN loss	9p21.3
<i>JAK1</i>	<i>STAT5B</i>	<i>IN080</i>	<i>RB1</i>			
<i>JAK3</i>	<i>TET1</i>	<i>LCK</i>	<i>TET3</i>			
<i>PI3KCD</i>	<i>TET2</i>	<i>NFAT5</i>	<i>TRRAP</i>			
<i>PLCG1</i>	<i>TP53</i>	<i>NFATC2</i>				
<i>PRDM1</i>	<i>VAV1</i>					

Klasifikacijska nomenklatura akutne limfoblastične leukemije (ALL) iz 2022, stavlja naglasak na molekularne promjene (fuzije), a ne na citogenetske promjene (translokacije), kako bi se omogućila primjena različitih tehnika za njihovo dokazivanje. Tako uz klasične molekularne alate poput ugnježdenog PCR (engl. *polymerase chain reaction*) te PCR u stvarnom vremenu koji se rutinski koriste u dokazivanju poznatih fuzijskih prijepisa poput *BCR::ABL1*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3 (E2A)::PBX1* i preuredbe *KMT2A (MLL)*, sve više laboratorija koristi prednosti NGS tehnologije. Pritom je moguće dokazati i fuzije kojima je partner gen nepoznat ili neuobičajen, ali

se bolest odlikuje značajkama sličnim *BCR::ABL1* (*BCR::ABL1 like*) ili *ETV6::RUNX1* (*ETV6::RUNX1 like*) pozitivnim ALL, a bolesnik u tom slučaju može imati koristi i od ciljanih terapija. (Tablica 2.) U toj skupini od oko 30% ALL potrebno je dokazati pojačanu ekspresiju *CRLF2* zatim fuzije *ABL1*, fuzije *JAK2* ili *EPOR*, *TYK2* preraspodjele, mutacije *RAS* signalnog puta ili neobične fuzije drugih gena pomoću sekvenciranja transkriptoma. Rijetke T-stanične ALL imaju povoljni prognostički učinak u slučaju komutacija u *NOTCH1/FBXW7* uz negativan mutacijski status *PTEN/RAS* gena u vidu ranog odgovora i dugoročnog povoljnog ishoda liječenja.

Tablica 2. Primjer fuzijskih partnera kod *BCR::ABL1 like ALL* prilagođeno prema Tasian, Sarah K et al. Blood vol. 130,19 (2017): 2064-2072. doi:10.1182/blood-2017-06-743252

Kinaza	TKI	5` Fuzijski partner
<i>ABL1</i>	Imatinib/dasatinib	<i>CENPC, ETV6, FOXP1, LSM14A, NUP153, NUP214, RANBP2, RCSD1, SFPQ, SNX1, SNX2, SPTNA1, ZMIZ1</i>
<i>ABL2</i>	Imatinib/dasatinib	<i>PAG1, RCSD1, ZC3HAV1</i>
<i>CSF1R</i>	Imatinib/dasatinib	<i>MEF2D, SSBP2, TBL1XR1</i>
<i>PDGFRA</i>	Imatinib/dasatinib	<i>FIP1L1</i>
<i>PDGFRB</i>	Imatinib/dasatinib	<i>ATF7IP, EBF1, ETV6, SNX29, SSBP2, TNIP1, ZEB2, ZMYND8</i>
<i>LYN</i>	Imatinib/dasatinib	<i>GATAD2A, NCOR1</i>
<i>CRLF2</i>	JAK2 inhibitor	<i>CSF2RA, IGH, P2RY8</i>
<i>JAK2</i>	JAK2 inhibitor	<i>ATF7IP, BCR, EBF1, ETV6, GOLGA5, HMBOX1, OFD1, PAX5, PCM1, PPFIBP1, RFX3, SMU1, SNX29, SSBP2, STRN3, TERF2, TPR, USP25, ZBTB46, ZNF274, ZNF340</i>
<i>EPOR</i>	JAK2 inhibitor	<i>IGH, IGK, LAIR1, THADA</i>
<i>TSLP</i>	JAK2 inhibitor	<i>IQGAP2</i>
<i>TYK2</i>	TYK2 inhibitor	<i>MYB, SMARCA4, ZNF340</i>
<i>IL2RB</i>	JAK1/JAK3 inhibitor	<i>MYH9</i>
<i>NTRK3</i>	TRK inhibitor	<i>ETV6</i>
<i>PTK2B</i>	FAK inhibitor	<i>KDM6A, STAG2, TMEM2</i>
<i>FGFR1</i>	Ponatinib	<i>BCR</i>
<i>FLT3</i>	FLT3 inhibitor	<i>ZMYM2</i>
<i>DGKH</i>		<i>ZFAND3</i>
<i>BLNK</i>		<i>DNTT</i>
<i>CBL</i>		<i>KANK1</i>

Klonalna preuredba gena za teški lanac imunoglobulina (IgH) i T-staničnog receptora (TCR – engl. *T cell receptor*) vrlo su specifični za pacijentov neoplastični klon i stoga izvrstan alat za praćenje MRD-a, najmoćniji neovisni čimbenik rizika od recidiva i dugoročnog preživljenja. Korištenje visoko specifičnog i osjetljivog PCR u stvarnom vremenu

za IgH i TCR za dokazivanje ostatne limfoproliferativne bolesti bilo je izuzetno komplicirano, zahtjevalo je utvrđivanje pruređene sekvence IgH/TCR neoplastičnog klona kod dijagnoze te sintezu specifične probe za mjerenje u točkama praćenja, što je u rutinskom laboratorijskom radu bilo izuzetno zahtjevno. Ujedno je metoda bila dugotrajna i skupa, a

istovremeno nije davala dodatni doprinos praćenju (pogotovo ako je istovremeno bila dostupna protočna citometrija).

Visokoosjetljiva NGS tehnologija omogućuje kvantitativno praćenje IgH/TCR klona i pouzdana je metoda za procjenu MRD-a koji se sve više koristi u kliničkoj praksi zbog svoje visoke osjetljivosti. Razvoj novih terapija limfoproliferativnih poremećaja sve će više koristiti MRD kao kriterij za promjenu intenziteta terapije kako bi se spriječio recidiv bolesti, smanjio morbiditet i smrtnost povezani s liječenjem.

Zaključno, NGS se čini moćnim dijagnostičkim alatom za otkrivanje genskih promjena kojih je svakim danom sve više klinički značajno, ali je upotrebljivost dobivenih informacija ponekad dodatni izazov u kontekstu personaliziranog pristupa liječenju bolesnika.

Literatura

1. Alaggio, Rita et al. "The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms." *Leukemia* vol. 36,7 (2022): 1720-1748. doi:10.1038/s41375-022-01620-2
2. Campo, Elias et al. "The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee." *Blood* vol. 140,11 (2022): 1229-1253. doi:10.1182/blood.2022015851.
3. de Leval, Laurence et al. "Genomic profiling for clinical decision making in lymphoid neoplasms." *Blood* vol. 140,21 (2022): 2193-2227. doi:10.1182/blood.2022015854
4. Migita, Natacha Azussa et al. "Classification and genetics of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia by targeted RNA sequencing." *Blood advances* vol. 7,13 (2023): 2957-2971. doi:10.1182/bloodadvances.2022009179.
5. Roberts, Kathryn G et al. "High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 35,4 (2017): 394-401. doi:10.1200/JCO.2016.69.0073
6. Bardelli, Valentina et al. "T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness." *Genes* vol. 12,8 1118. 23 Jul. 2021, doi:10.3390/genes12081118
7. Brüggemann, Monika et al. "Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study." *Leukemia* vol. 33,9 (2019): 2241-2253. doi:10.1038/s41375-019-0496-7
8. Roberts, Kathryn G. "Genetics and prognosis of ALL in children vs adults." *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* vol. 2018,1 (2018): 137-145. doi:10.1182/asheducation-2018.1.137
9. Tasian, Sarah K et al. "Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia." *Blood* vol. 130,19 (2017): 2064-2072. doi:10.1182/blood-2017-06-743252
10. Sánchez-Beato, Margarita et al. "A genetic profiling guideline to support diagnosis and clinical management of lymphomas." *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* vol. 26,5 (2024): 1043-1062. doi:10.1007/s12094-023-03307-1

Imunofenotipizacija u dijagnostici limfoproliferativnih bolesti

Zoran Šiftar

Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, KB Merkur

Uvod

Primjena imunofenotipizacije stanica protočnom citometrijom moguća u raznim granama medicine, ali najzastupljenija je u hematologiji i imunologiji.

Imunofenotip stanice može upućivati na širok spektar benignih (infektivnih, reaktivnih) ili zloćudnih bolesti hematopoeze, a nalaz imunofenotipa monomorfne populacije stanica može dodatno pomoći u njihovoj daljnjoj diferencijalnoj dijagnostici.

Od samih početaka klasifikacije tumora hematolimfoidnog tkiva Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) integrirana dijagnoza klinički značajnih entiteta hematolimfoidnih tumora temelji se na kliničkim značajkama, te morfološkim, citokemijskim, genetskim i imunofenotipskim obilježjima stanica (1).

Imunofenotipska karakterizacija zasniva se na usporedbi imunofenotipa leukemijskih/limfomskih stanica s imunofenotipom normalnih stanica hematopoeze. Aberantni imunofenotip povezan s leukemijom/limfomom je karakteriziran stjecanjem novih ili gubitkom određenih staničnih antigena izraženih na normalnim stanicama.

Prema najnovijoj WHO klasifikaciji tumora hematolimfoidnog tkiva (WHO-HAEM5, 5. izdanje, 2024.) (2) i Međunarodnoj konsenzusnoj klasifikaciji limfoidnih i mijeloidnih neoplazmi (ICC, 2025.) (3), dvije osnovne vrste limfoma uzrokovane malignom, klonalnom transformacijom i zrelih i nezrelih B ili T/NK stanica su Hodgkinov limfom (HL) i ne-Hodgkinov limfom (NHL) razvrstane u više od 60 podtipova koji se razlikuju prema stupnju malignosti i vrsti stanica. Klinički tijek varira od indolentnog (limfomi koji potječu iz B stanica) do agresivnog (limfomi koji potječu ili od B ili T stanica). Među NHL-ovima B stanica u zapadnim zemljama, najčešći agresivni podtipovi su difuzni limfom velikih B stanica (DLBCL; 31%), limfom stanica plašta (MCL; 6%) i Burkittov limfom (BL; 2%), a najčešći indolentni podtipovi su folikularni limfom (FL; 22%), limfom marginalne zone (MZL; 8%), kronična limfocitna leukemija/limfocitni limfom malih stanica (CLL/SLL; 6%) i limfoplazmocitni limfom

(LPL; 1%). Među T-staničnim NHL-ovima, uobičajeni podtipovi (10-15%) uključuju periferni T-stanični limfom (PTCL; 6%) i kožni T-stanični limfom (CTCL; 4%). Obje klasifikacije se i dalje temelje na morfološkim kriterijima, no značaj molekularnih biljega, bilo citogenetskih bilo molekularnih promjena na razini gena nadvladava zahvaljujući novim molekularnim tehnikama, naročito sekvenciranju nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) sa mogućnošću integrirane analize podataka velikih razmjera. Klasifikacija i dijagnostički pristup limfoproliferativnim bolestima prihvaćen je i od hrvatskih hematologa 2022. na održanom sastanku pod nazivom 4. Hematološki konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma (4).

Neoplazme B limfocita

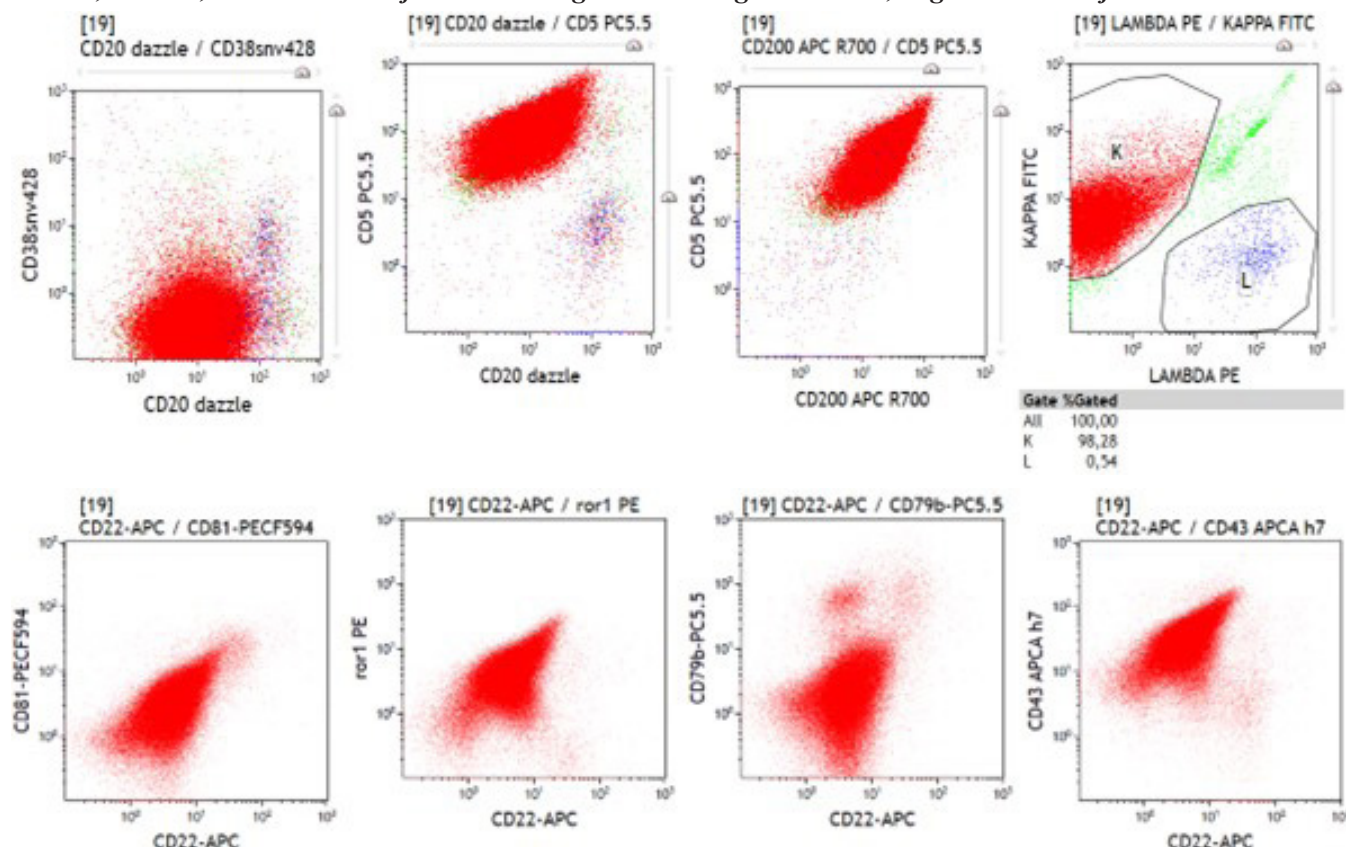
Tipizacija stanica B limfocitne loze je relativno jednostavnija od drugih. Pretraživanjem na fenotipske anomalije iskazane kao smanjenje ili gubitak normalno prisutnih određenih staničnih antigena ili pojavnost drugih koji im ne pripadaju ili ne pripadaju tom stadiju zrelosti razlikuje se normalna stanica od promijenjene. Uz dodatnu analizu izražaja lakih lanaca imunoglobulina (kappa ili lambda) može se utvrditi da li postoji ili ne klonalna preuredba.

Prema Delphi studiji koja je provedena među korisnicima protočne citometrije u Velikoj Britaniji 2024. kao obvezatni su istaknuti biljezi: CD45, CD19, CD20, KAPPA, LAMBDA, CD5 i CD10, a dalje preporučeni CD79b, CD23, CD200, CD103, CD11c, CD25, CD43, CD38 i CD123 (5).

Entitet B-kronična limfocitna leukemija /Limfom malih stanica (B-KLL/SLL)

Odavno je uvriježen Matutes bodovni sustav za brzo razlikovanje B-KLL/SLL- a od drugih B-NHL-a. Zasniva se na bodovanju rezultata izražaja biljega CD5, CD23, CD79b i razine izražaja lakih lanaca imunoglobulina (6). Proširenjem broja testiranih staničnih biljega na CD200 i CD43, sama podjela na tipičan i atipičan B-KLL/SLL je puno točnija (7).

Slika 1. Prikaz tipičnog fenotipa stanica B-KLL-a: snižena razina biljega CD20, CD81 i CD22, CD5+, CD200+, CD43+, ROR1+, klonalan izražaj KAPPA lakog lanca niskog intenziteta, negativan izražaj CD79b.

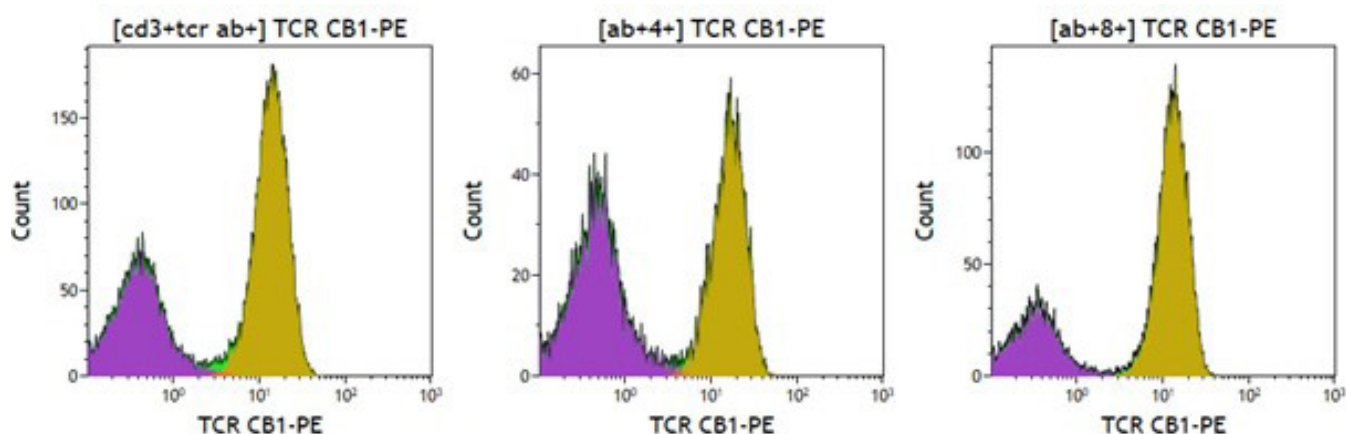


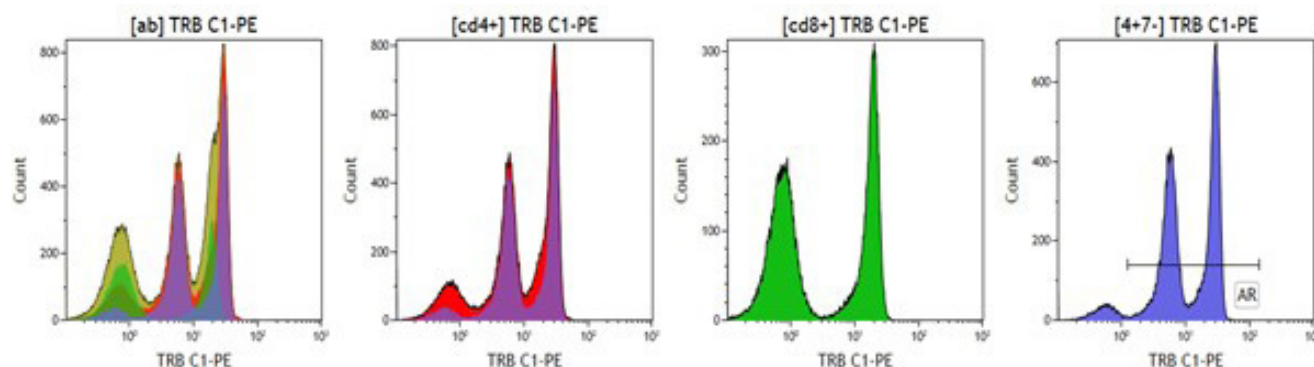
Na putu harmonizacije analize B-KLL-a protočnom citometrijom mnoštvo je završenih ili projekata u tijeku koji prate stalan instrumentalni napredak, otkrića novih antigena, protutijela i furokoroma stvarajući podlogu za postizanje reproducibilnih i smanjenja broja nepodudarnih rezultata među laboratorijima. Jedna od njih i ERIC studija kojom su definirani osnovni biljezi: CD19, CD20, CD5, CD23 i laki lanci imunoglobulina, i poželjni: CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 i ROR1 za postavljanje dijagnoze. Za praćenje minimalne ostatne bolesti odabrani su najinformativniji biljezi: CD19, CD20, CD5, CD79b, CD81, CD43, CD200 i ROR1 (8).

Neoplazme T limfocita

Imunofenotipizacija je manje uspješna nego kod B-limfocitnih neoplazmi. Uglavnom se dokazuje fenotipska anomalija u izražaju staničnih biljega u usporedbi sa normalnim stanicama. Za dokazivanje T-limfoma prema spomenutoj Delphi studiji kao osnovni istaknuti su biljezi: CD45, CD3, CD4, CD8, CD7 i CD2, a preporučeni: CD5, CD56, CD16, CD57, CD25, CD26, TCRgd, TCRab, CD10, CD30, što je ponekad nedostavno, i novo predloženi biljeg TRB-C1 (i TRB-C2) kojim se pokušava utvrditi klonalnost stanica (5,9).

Slika 2. Prikaz izražaja TRB-C1 na normalnim (gornja slika) i abnormalnim T-limfocitima (fenotip: CD3+TCRab+CD4+CD7-) (donja slika)





Kao uzorak za analizu mogu se koristiti sva tekuća tkiva (puna krv, citološki punkat koštane srži), ekstravaskularne tekućine (cerebrospinalna tekućina, pleuralni izljev, ascites), citološki punktat limfnog čvora i/ili solidnog tkiva gdje su stanice razdvojene jedna od druge.

Kvaliteta analize i samog nalaza izravno su ovisne o dosljednoj primjeni zahtjeva za uzorkovanje, distribuciji, transportu i skladištenju. Jedan od njih je opisan u postupniku biltena Krohema 2021.godine (10).

Zaključak

Procjena vrste i zrelosti specifične subpopulacije normalnih, odnosno maligno promijenjenih stanica, kao i otkrivanje promijenjenog izražaja pojedinih antigena ovisi isključivo o istovremenom proučavanju više staničnih antigena i njihovih međusobnih odnosa štoje moguće dobiti analizom protočne citometrije. Imperativ za dobivanje točnog i nedvosmislenog reproducibilnog nalaza je striktna primjena smjernica koje uvažavaju nove spoznaje i tehnološka postignuća.

Literatura

1. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J.* 2000;1(1):53-66
2. Haematolymphoid Tumours: WHO Classification of Tumours 5th Edition, WHO, ISBN: 978-92-832-4520-9, IARC, Lyon, 2024.
3. The International Consensus Classification of Myeloid and Lymphoid Neoplasms. Arber D.A, Borowitz M.J., Cook J.R., de Leval L., Goodlad J.R., Hasserjian R. P., King R.L., Kvasnicka H.M., Orazi A. ISBN: 978-1-975222-59-8, Walters Kluwer, Mexico, 2025.
4. Četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma. Bilten-KROHEM- Volumen 14., Broj 2., Studeni 2022
5. Qureshi I., McGregor A., Bloxman D., Brzezinski L.C., Clarke K., Cooper A., Couzens S., Detute R., Doig A., Dunlop A., Duraising S., Johansson U., Johnson T., Lawton D., McIver-Brown N., Nadal Melsio E., Orfinada K., Niti S., Rawstron A., Wheeler L., Whitby L., Freeman S. Recommended Cell Markers in Lymphoproliferative Diagnosis: A Delphi Pool. British Society for Haematology, 2024
6. Moreau, E.J., Matutes, E., A'Hern, R.P., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Seon, B.K. & Catovsky, D. (1997) Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology*, 108, 378–382.
7. Šiftar Z., Taradi I., Kardum Paro M.M. Radić Krišto D., Planinc Peraica A., Gredelj Šimec Nj., Mandac Rogulj I., Ostojić Kolonić S., Jelić Puškarić B., Kaić G., Kardum-Skelin I., Škrčić A., Gašparov S., Flegar Meštrić Z. Diagnostic utility of CD200 and CD43 in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Biochemia Medica* 28/(Suppl 1), 2018
8. Reproducible Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia by Flow Cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation Project. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 121–128
9. Horna H., Shi M., Olteanu H., Johansson U. Emerging Role of T-cell Receptor Constant β Chain-1 (TRBC1) Expression in the Flow Cytometric Diagnosis of T-cell Malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 1817-1836.
10. Upute korisnicima laboratorijskih usluga vezano za pretrage koje se izvode u dijagnostičkim laboratorijima iz područja citologije, imunofenotipizacije, citogenetike, molekularne dijagnostike i tipizacije tkiva Bilten-KROHEM- Volumen 13., Broj 1., Svibanj 2021

Citogenetika poremećaja plazma stanica

Ana Franjević, Iva Semren, Ivana Franić Šimić, Sanja Davidović-Mrsić

Odjel za citogenetiku, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

Poremećaji plazma stanica očituju se prevelikom produkcijom plazma stanica u koštanoj srži.

Normalne plazma stanice razvijaju se iz B-limfocita aktiviranim antigenom u limfnim organima kao što su koštana srž, slezena i limfni čvorovi.

Iako se prije mislilo da je jedina funkcija plazma stanica sekrecija antitijela, danas je poznato da plazma stanice reguliraju imunološki odgovor inhibicijom razvoja folikularnih T-stanica (1). Folikularne pomoćničke T –stanice pak luče IL-21, protein odgovoran za zrenje afiniteta vezanja, postojanost germinalnog centra i terminalnu diferencijaciju B-limfocita (2,3), što upućuje na postojanje antigen-specifične negativne povratne sprege kojom se modificira produkcija plazma stanica minimalizirajući njihovu nepotrebnu i potencijalnu patološku preokupiranost.

Najnezreliji oblik plazma stanice je plazmoblast koji može proliferirati i lučiti male količine antitijela, za razliku od zrele plazma stanice koja ne proliferira i luči stotine tisuća molekula antitijela u sekundi.

Otklon od normalne proliferacije plazma stanica uzrokuje brojne kliničke patologije; neoplazme plazma stanica i imunodeficienciju plazma stanica.

Neoplazme plazma stanice karakterizira aberantna proliferacija klonalnih plazma stanica koje proizvode monoklonalni imunoglobulin, M protein (4).

Monoklonalna gamopatija neodređenog značaja (engl. Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) je asimptomatsko stanje spektra monoklonalnih poremećaja plazma stanica (diskrazija). Kod ovakvog stanja klonalne plazma stanice luče imunoglobulin, no razina M proteina je <30 g/L, ima <10% monoklonalnih plazma stanica u koštanoj srži i nema dokaza organskog oštećenja, kao što su hiperkalcemija, bubrežna insuficijencija, anemija i koštane lezije kao posljedica poremećaja proliferacije plazma stanica.

70% slučajeva MGUS-a je IgG, 15% IgM, 12% IgA, a 3% je biklonalno (5). Prema tipu imunoglobulina MGUS se svrstava u dvije kategorije s različitim potencijalom kliničke progresije; IgM MGUS može progredirati u limfoblastičnu leukemiju ili Waldenström makroglobulinemiju, a ne-IgM MGUS u šumljajući (engl. smoldering multiple myeloma, SMM) ili multipli mijelom (MM).

Rana citogenetska promjena koja osigurava imortalizaciju plazma stanica i početak klonalnosti je hiperdiploidija koja se može detektirati u koštanoj srži kod oko polovice pacijenata. Numeričke kromosomske promjene kod MGUS-a jednake su kao i kod MM-a.

Mutacije u genima *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *BRAF*, *FAM46C* i *DIS3* smatraju se pokretačkim za transformaciju prema multiplom mijelomu, no isto tako za takvu su progresiju više značajne vrste mutacija od njihovog broja. Pokretačke mutacije osiguravaju bolje preživljenje takvih stanica i njihovu selektivnu prednost, te izbjegavanje odgovora mikrookoline i imunološkog sustava. Progresija prema MM-u ovisi o preživljenju takvih subklonova, no asimptomatsko stanje može potrajati i nekoliko desetljeća (6).

Mnogo MGUS-a nikada ne prijeđe u malignu bolest. Ipak, ukoliko se nastavi aberantna proliferacija plazma stanica i nadiđu se kriteriji za MGUS, bolest progredira u SMM, također asimptomatski poremećaj plazma stanica, no s vrijednostima M proteina ≥ 30 g/L i ≥ 10 % monoklonalnih plazma stanica u koštanoj srži, bez dokaza organskog oštećenja.

Za razliku od MGUS-a, kod kojeg 1% slučajeva godišnje progredira u simptomatski MM, vjerojatnost progresije SMM u MM je 10% godišnje u prvih pet godina, 3% godišnje u sljedećih 5 godina, a nadalje 1% godišnje (7).

Daljnje nagomilavanje mutacija osigurava selektivnu prednost aberantnih plazma stanica i predstavlja pokretačku platformu za razvoj simptomatskog MM-a. Stanice počinju rasti difuzno, no još uvijek sporo u prvome stadiju. Važni inicijalni događaj u razvoju MM-a je preuredba lokusa teškog lanca imunoglobulina (IGH). Oko 40% pacijenata pri prezentaciji ima translokacije IGH lokusa (8). Translokacije t(4;14), t(14;16) i t(14;20) povezuju se s lošom prognozom i visokorizičnom bolešću. S druge strane, pacijenti s t(11;14) i t(6;14) i/ili trisomijama imaju bolest standardnog rizika. Važno je naglasiti da fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH) ima veću osjetljivost od konvencionalne citogenetike u otkrivanju abnormalnosti zbog niske stope proliferacije plazma stanica (9).

Gubitak kratkog kraka (p) kromosoma 17 najvažniji je čimbenik rizika kod multiplog mijeloma koji upućuje na visoki rizik progresije bolesti, s medijanom vremena do progresije kod SMM (engl. time to progression, TTP) od 2 godine i medijanom ukupnog preživljenja kod MM-a od 3 godine (10). Bitno je naglasiti važnost određivanja delecije 17p metodom FISH pri inicijalnoj dijagnozi MM i u slučaju sumnje na relaps/refraktornu bolest jer u kariotipizaciji može promaknuti zbog ograničene osjetljivosti metode. U pozadini ove delecije jest gubitak tumor supresorskog gena *p53*, uključenog u kontrolu staničnog ciklusa, pri čemu takve stanice gube mogućnost staničnog zastoja kod apoptoze, senescencije, popravka DNA ili promjena u metabolizmu, što im omogućuje nekontroliranu proliferaciju, uz nago milavanje ostalih mutacija.

Još jedna citogenetska abnormalnost ukazuje na lošu prognozu: dobitak ili amplifikacija kromosomske regije 1q, koja se pojavljuje prilikom inicijalne dijagnoze MM-a u oko 40% slučajeva (11). Smatra se da ovakva promjena prati napredovanje bolesti, često putem skakajućih translokacija (translokacija istog fragmenta donorskog kromosoma na 2 ili više kromosoma primatelja), čime se s vremenom povećava broj kopija. Više gena pogođeno je ovakvom abnormalnošću; *CKS1B* je potencijalni gen pokretač, a opisan je i potencijalni značaj gena *ADAR1* i *MCL1* (12). *CKS1B* dio je obitelji ciklin-kinaza CKS1 koje su u interakciji s ciklin-ovisnim kinazama, te je neizostavan dio staničnog ciklusa, a njegov se dobitak/amplifikacija povezuje s visokim rizikom od progresije SMM, medijanom TTP-a od 2 godine i medijanom ukupnog preživljenja kod MM-a od 5 godina (10).

Ukupno gledajući, citogenetski pokazatelji visokog rizika kod MM su t(4;14), t(14;16) i t(14;20), delecija 17p i dobitak/amplifikacija kromosomske regije 1q.

Solitarni plazmocitom je rijetki oblik diskrazije plazma stanica koji se prezentira kao jedinstvena masa monoklonalnih plazma stanica koja može biti smještena ekstramedularno ili unutar kosti, bez ili s minimalnom plazmacitozom koštane srži, te samo sa simptomima koji potječu od primarne lezije. Prema dostupnim podacima, oko 8-36% ekstramedularnih plazmocitoma razvije se u multipli mijelom, u usporedbi sa 60% solitarnih medularnih plazmocitoma (13). Gledano citogenetski, plazmocitom i MM su slični, no do sada nisu identificirane citogenetske podgrupe plazmocitoma koje bi ukazivale na rizik od progresije.

Ostale diskrazije plazma stanice uključuju AL amiloidozu, najčešći tip sistemske amiloidoze, koju karakterizira odlaganje vlakana lakih lanaca imunoglobulina, najčešće lambda, iz klonalnih nisko proliferirajućih plazma stanica. Takva vlakna sačinjavaju amiloid.

Na početku obično mali i indolentni klon B-stanica može proizvoditi lake lance (u 80% slučajeva lambda), s mutacijama u varijabilnoj regiji, što uzrokuje kinetičku nestabilnost lakih lanaca, te njihovu agregaciju. Daljnje interakcije s mikrookolinom rezultiraju stvaranjem oligomera koji posjeduju toksičnu funkciju jer narušavaju funkciju i vijabilnost stanica unutar organa. Oligomeri stvaraju dobro organizirane vlaknaste strukture širine 10-12 nm koje zauzimaju parenhim i na taj način oštećuju vitalne organe poput bubrega, srca, živčanog i probavnog sustava, te uzrokuju različite simptome, u ovisnosti o stupnju infiltracije (14).

Najvažniji citogenetski čimbenik prognoze kod AL amiloidoze je translokacija t(11;14) koju je moguće detektirati kod oko 40% pacijenata, a povezuje se sa kraćim periodom bez (pojave) događaja (engl. event-free survival, EFS) i lošijim odgovorom na terapije bazirane na bortezomibu (15,16). Pojačana ekspresija ciklina D1 kod takve translokacije i posljedično proteina bcl-2 vodi ka sprečavanju programirane stanične smrti (apoptoze), odnosno imortalizaciji. No, kako su terapijske opcije za AL amiloidozu napredovale, citogenetska analiza dobivala je sve više na važnosti. Takvi pacijenti pokazuju dobar odgovor na selektivni inhibitor bcl-2 venetoklaks, te se svakako preporučuje citogenetska (FISH) analiza na ovu translokaciju pri dijagnozi i u slučaju relapsa/refraktorne AL amiloidoze (17).

Pacijenti i metode

U analizu su uključeni svi uzorci koji su ušli u citogenetski protokol za multipli mijelom tijekom cijele 2023. godine i zaključno s 4. ožujkom 2024. godine. Citogenetski protokol uključuje izolaciju plazma stanica iz uzorka koštane srži metodom imunomagnetske selekcije CD138⁺ pozitivnih stanica.

Na uzorcima je rutinski rađena konvencionalna citogenetika (kariotipizacija) i FISH na izoliranim plazma stanicama.

Retrospektivna baza podataka uključuje 163 uzorka. Tablica 1 prikazuje dijagnoze prilikom upućivanja uzorka.

Tablica 1. Dijagnoze pristiglih uzoraka.

Dijagnoza	Broj	Postotak	Muškarci/žene	Prosječna dob (g)
MGUS	33	20,2%	15/18	67,3
SMM	8	4,9%	4/4	61,0
MM	98	60,1%	58/40	66,1
Plazmocitom	5	3,1%	2/3	58,6
AL Amiloidoza	5	3,1%	4/1	64,4
Ostalo	14	8,6%	7/7	61,9
Ukupno	163	100%	90/73	63,2

Rezultati

Većini pacijenata je, prema indikaciji, rađena imunofenotipizacija kojom je utvrđen postotak plazma stanica/aberrantnih plazma stanica.

Tablica 2 prikazuje uzorke prema dijagnozama, pronađene citogenetske abnormalnosti i broj uzoraka s aberrantnim plazma stanicama detektiranim na imunofenotipizaciji.

Tablica 2. Uzorci prema dijagnozama, pronađene citogenetske abnormalnosti i broj uzoraka s aberrantnim plazma stanicama detektiranim na imunofenotipizaciji.

Dijagnoza	Broj uzoraka	Broj/postotak uzoraka s aberrantnim plazma stanicama detektiranim na imunofenotipizaciji		Dokazana citogenetska abnormalnost (u odnosu na broj analiziranih uzoraka)
		Nije rađeno/neadekvatan uzorak	Positivno (u odnosu na broj analiziranih uzoraka)	
MGUS	33	3 (9,1%)	21 (70,0%)	1 (3,0%)
SMM	8	0	5 (62,5%)	2 (25,0%)
MM	98	19 (19,4%)	69 (70,4%)	43 (43,9%)
Plazmocitom	5	0	3 (60,0%)	2 (40%)
AL Amiloidoza	5	0	4 (80,0%)	0
Ostalo	14	3 (21,4%)	4 (36,4%)	1 (7,1%)

Kod multiplog mijeloma najviše pacijenata s citogenetskim abnormalnostima ima 1 promjenu (53,5%), zatim ih slijede pacijenti sa 3 ili više promjena (25,6%), te pacijenti s 2 promjene (20,9%). Od promjena najzastupljenije su aneuploidije/hiperplodije, abnormalnosti *IGH* lokusa, delecija *p53*, dobitak *1q*, a ostale abnormalnosti nalaze se u niskom postotku.

Testiranjem korelacije između postotka aberrantnih plazma stanica na protočnoj citometriji i broja CG abnormalnosti kod svih dijagnoza ($N=138$, izbačeni uzorci bez imunofenotipizacije) otkriva umjerenu korelaciju (koeficijent korelacije=0.5534, $p<0,05$). Kada se u analizu unesu samo pacijenti s dijagnozom MM ($N=79$), ta korelacija je visoka (koeficijent korelacije=0.6270, $p<0,05$).

Rasprava

Kod MGUS-a uočena je izrazito slaba stopa citogenetskog (CG) pozitiviteta (3,0%, tablica 2). Radi se o muškarcu u dobi od 74 godine s gubitkom kromosoma Y, promjenom nespecifičnom za diskraziju plazma stanica, koja može biti posljedica dobi. Iz literature je vidljivo da je gubitak kromosoma Y (engl. loss of Y, LOY) uobičajen u procesu starenja muškaraca; do 80% starijih muškaraca nema Y kromosom (18).

Također, gubitak Y kromosoma uobičajen je kod mijelioidnih hematoloških neoplazmi. Gore spomenuti LOY može se vrlo lako povezati s dobno vezanim gubitkom, tako da se u konačnici ne može sa sigurnošću promatrati kao pozitivan nalaz kod MGUS-a.

Trenutne smjernice za MGUS ne uključuju citogenetsku analizu jer citogenetske promjene, koje

znaju biti vrlo slične onima kod MM, ne mogu identificirati podgrupu visokog rizika progresije u MM. Naši rezultati pokazuju nedostatak citogenetskog pozitiviteta, uz odsutstvo korelacije imunofenotipizacije i citogenetskog nalaza. Iz svega je razvidno da ne postoji razlog citogenetskog praćenja MGUS-a.

Iako premali broj uzoraka (8), SMM pokazuje CG pozitivitet kod oko četvrtine uzoraka (Tablica 2). Detaljnijim uvidom radi se o dva pacijenta; jedan 67-godišnji muškarac pokazuje LOY u 28% interfaznih jezgara na FISH-u, što se ponovno može pripisati dobi, i druga pacijentica koja ima translokaciju t(4;14) detektiranu u 20% stanica FISH-om. Zapravo se ovdje može govoriti o CG pozitivitetu od samo 12.5%. Translokacija t(4;14) kod SMM povezana je s većim rizikom od progresije u MM, i, ono što je zanimljivo, nije u korelaciji s invazijom koštane srži plazma stanicama (19, što je jasno i iz naših rezultata, jer je 62,5% SMM imalo aberantne plazma stanice na imunofenotipizaciji, što nije rezultiralo jednakim CG pozitivitetom. Kako je rizik od progresije u prvih 5 godina od dijagnoze SMM-a 10 puta veći od onoga kod MGUS-a, posljednji objavljeni algoritam preporuča FISH na del(17p), t(4;14), dobitak 1q i del(13q) kod diferencijalne dijagnoze (20).

Multipli mijelomi pokazuju 43,9% CG pozitiviteta, no uvidom u analize FISH-a, dolazimo do zaključka da nisu uvijek napravljene sve analize koje su trebale biti napravljene na osnovi rezultata konvencionalne citogenetike i smjernica. Razlog leži u činjenici da u laboratorij nije došla dovoljna količina uzorka, te je osoblje bilo prisiljeno birati analizu koja će se napraviti, uz izostanak seta analiza koji bi dao bolji uvid u biologiju MM-a. Prema podacima, 38 (38,8%) pacijenata prošla je, uz kariotipizaciju, samo analizu preuredbe *IGH* lokusa na FISH-u, 10 (10,2%) uz *IGH* još 1 analizu (*p53*, testiranje hiperplodije, ili testiranje translokacija *IGH* lokusa), 6 (6,1%) druge analize koje ne uključuju lokus *IGH* (1q, *p53*), 20 (20,4%) analizu preuredbe *IGH* u kombinaciji s drugim probama, a njih 12 (12,2%) testirano je ciljano na translokacije donorskog gena *IGH*. Ostatak otpada na ostale analize. 8 pacijenata (8,2%) ima samo kariotipizaciju.

Kod nedostatnog uzorka odlučeno je da se napravi analiza preuredbe *IGH* umjesto ciljane analize translokacija t(4;14), t(14;16) i t(11;14).

Izazovi predanalitičke faze citogenetske analize leže u biopsiji koštane srži, jer bi optimalni uzorak za CG analizu trebao biti prvi aspirat. Prema standardima, potrebno je izolirati plazma stanice u svim slučajevima gdje ih je u uzorku manje od 30%.

Laboratorij u tu svrhu radi magnetsku separaciju CD138 stanica.

Često za citogenetsku analizu pristižu suboptimalni uzorci; oni koji imaju vrlo niske razine aberantnih plazma stanica ($\leq 10\%$), te uzorci u kojima nisu niti detektirane monoklonalne plazma stanice. Prema našim podacima postotak takvih uzoraka je 61,2%. Suboptimalnost koštane srži može proizlaziti i iz fokalne distribucije mijeloma unutar koštane srži (21).

Prema zajedničkim smjernicama Europske hematološke asocijacije i Europskog društva za medicinsku onkologiju (engl. European hematology association, EHA; European society for medical oncology, ESMO), pri inicijalnoj dijagnozi potrebno je napraviti kariotipizaciju, te FISH na ciljane translokacije; t(4;14), t(14;16) i t(11;14), del(17p) i dobitak/amplifikaciju 1q (22). Zbog nedostatnog uzorka, laboratorij je odlučio zamijeniti translokacije *IGH* gena analizom preuredbe *IGH*, kako u slučaju negativiteta ne bi bilo potrebno raditi daljnje analize čime se štedi uzorak. Razumno je za očekivati da sve gore spomenute promjene nije vjerojatno detektirati kod izrazito niske razine aberantnih plazma stanica, jer sama metoda FISH ima svoj prag osjetljivosti i lažnog pozitiviteta, tako da u slučaju npr. 1-2% aberantnih plazma stanica taj postotak odgovara laboratorijskom pragu, te se abnormalnosti detektirane na FISH-u ne mogu u tom postotku izraziti kao pozitivne.

Prema smjernicama nema preporuke za CG analizu uzoraka koštane srži multiplog mijeloma kao procjene odgovora na terapiju, niti u praćenju pacijenta. Preporučuje se CG analiza kod sumnje na relaps, i to samo: del(17p), amplifikacija/dobitak 1q i t(11;14), očekivano zbog loše prognoze kod delecije *p53*, visokog rizika kod amp(1q), odnosno pogodnosti za terapiju venetoklaxsom i standardnog rizika kod t(11;14) (22,23).

Poštivanjem gore navedenih preporuka zasigurno bi se mogao povećati CG pozitivitet MM-a, jer bi se prvenstveno trebale poštivati indikacije za CG analizu.

Broj plazmocitoma (5) premali je za bilo kakvu raspravu. Iako se FISH-om mogu potvrditi CG abnormalnosti kod plazmocitoma (gubitak 13q, preuredba *IGH* i hiperdiploidija), do sada prema literaturi nije bilo moguće identificirati prognostičke skupine kao kod MM-a, te iz tog razloga ne postoje preporuke za CG analizu plazmocitoma. Plazmocitomi često imaju nisku razinu klonalnih plazma stanica, što potvrđuju i naši podaci; raspon od 0-10% aberantnih plazma stanica.

rarantnih plazma stanica detektiranih na protočnoj citometriji. S tim u vezi nije niti moguće očekivati odgovarajuću senzitivnost CG dijagnostike.

5 pacijenata oboljelih od AL amiloidoze nije pokazalo nikakvu CG pozitivnost, iako ih je oko trećine imalo monoklonalne plazma stanice (Tablica 2). Uvidom u postotak aberantnih plazma stanica detektiran imunofenotipizacijom, raspon od 0-3,5%, premali je za pouzdanu CG analizu.

Sukladno smjernicama Američkog društva za kliničku onkologiju (engl. American Society of Clinical Oncology, ASCO), citogenetika ima značajnu ulogu u inicijalnoj prognostifikaciji AL amiloidoze, no isto tako je jasno da se CG analiza može adekvatno izvesti samo kod značajnog broja aberantnih plazma stanica. Također, preporuke su da se kod relapsa/refraktorne AL amiloidoze napravi FISH analiza na translokaciju t(11;14) zbog terapije venetoklaksom (17). Iz svega navedenog prozlaži da CG analiza uvelike ovisi o samome uzorku, te je zapravo na citogenetičaru da odluči ima li smisla i mogućnosti uz konvencionalnu citogenetiku napraviti i FISH.

Pacijenti u grupi „ostalo“ (N=14) imali su različite dijagnoze, od metastatskih karcinoma, MDS-a i benignih koštanih promjena, a vjerojatno su upućeni na CG analizu zbog preklapajućih simptoma s MM-om. Uzorci su pokazali CG pozitivnost u samo jednom slučaju; pacijent s MDS-om imao je kompleksni kariotip. Za očekivati je da će u laboratorij i dalje stizati određeni broj uzoraka s preklapajućim simptomima.

Zaključak

Djelomično zbog nejasnih indikacija, a poglavito zbog neadekvatnosti uzorka bioptata koštane srži udio pacijenata sa citogenetskim promjenama kod multiplog mijeloma u ovoj analizi iznosi 43.9%. Zbog jasnoće i maksimalnog benefita dijagnostike potrebno je naglasiti indikacije za CG analizu, a isto tako i važnost primarnog uzorka. Izostanak prvog aspirata koštane srži obično rezultira malim brojem aberantnih plazma stanica što uzrokuje slabu osjetljivost citogenetike, a kada se u to ubroji i nedostatna količina uzorka, pacijenti ne mogu dobiti sve CG analize koje im prema smjernicama pripadaju. Daljnji koraci morat će uključivati detaljan dogovor između operatera koji izvode biopsiju koštane srži i osoblja Odjela za citogenetiku.

S druge strane, treba se voditi međunarodnim smjernicama za plazma diskrazije. Dosta veliki udio MGUS-a (oko 1/5 uzoraka) upućuje na slanje uzoraka po inerciji, pogotovo imajući u vidu podatak da

samo oko 1% MGUS-a progredira u MM i činjenicu da nam citogenetika ne može pomoći prilikom određivanja podgrupa visokog rizika.

Općenito, citogenetska analiza trebala bi se provoditi kod multiplih mijeloma i AL amiloidoze, i to pri dijagnozi i kod refraktorne bolesti/relapsa. Slijedeći smjernice na taj način možemo dati relevantne informacije klinici kako bi pacijenti osjetili najveću dobit dijagnostike i dobili tretman najviše prilagođen njihovim potrebama.

Literatura

1. Pelletier N, McHeyzer-Williams LJ, Wong KA, Urlich E, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol.* 2010; 11(12):1110-8.
2. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity.* 2003; 19(4):607-20.
3. Wang X, Hao GL, Wang BY, Gao CC, Wang YX, Li LS, et al. Function and dysfunction of plasma cells in intestine. *Cell Biosci.* 2019; 9:26.
4. Kaseb H, Durer C, Fazal S, Babiker HM. Plasma Cell Cancer. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): 2022. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556082/>. [Pristupljeno: 26. travnja 2024]
5. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002; 21;346(8):564-9.
6. Dutta AK, Fink JL, Grady JP et al. Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia.* 2019; 33:
7. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007; 21;356(25):2582-90.
8. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2, 175–187.
9. Abdallah N, Rajkumar SV, Greipp P. et al. Cytogenetic abnormalities in multiple myeloma: association with disease characteristics and treatment response. *Blood Cancer J.* 2020; 10: 82
10. Rajkumar VS. Updated diagnostic criteria and staging system for multiple myeloma. U: *ASCO Educational book.* ASCO; 2016, str. e418-e423.
11. Gu H, Zhong Y, Zhang E, Cao L, Cai Z, He J. Gain or Amplification of Chromosome 1q Mediate Multiple Myeloma Resistant to Xpo-1 Inhibitor Selinexor Via Transcription Factor ETV3. *Blood* 2023; 142 (Supplement 1): 6579.
12. Schmidt, TM, Barwick BG, Joseph N et al. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J.* 2019; 9, 94.
13. Motyckova G, Rahemtullah A, Vaghela N, Vallet S, Ackerman A, Mukherjee S, et al. Molecular Profiling of Extramedullary and Medullary Plasmacytomas. *Blood* 2008;

- 112 (11): 5111.
14. Merlini G. AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017; 1:1-12.
 15. Fotiou D, Theodorakakou F, Gavriatopoulou M, et al. Prognostic impact of translocation t(11;14) and of other cytogenetic abnormalities in patients with AL amyloidosis in the era of contemporary therapies. *Eur J Haematol*. 2023; 111(2): 271-278.
 16. Dumas B, Yameen H, Sarosiek S, Sloan JM, Sanchorawala V. Presence of t(11;14) in AL amyloidosis as a marker of response when treated with a bortezomib-based regimen. *Amyloid*. 2020; 27(4): 244–249.
 17. Dima D, Mazzoni S, Anwer F, Khouri J, Samaras C, Valent J, et al. Diagnostic and treatment strategies for AL amyloidosis in an era of therapeutic innovation. *JCO Oncology practice*. 2023, 19(5): 265-275.
 18. Leslie M. Men lose Y chromosomes as they age. It may be harming their hearts. *Science* [online]. 2022 [oko 2 str]. Dostupno na: <https://www.science.org/content/article/men-lose-y-chromosomes-they-age-it-may-be-harming-their-hearts>. [Pristupljeno: 2. svibnja 2024]
 19. Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013 Aug;27(8):1738-44.
 20. Rajkumar SV, Kumar S, Lonial S, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal*. 2022; 12: 129-135.
 21. Cho EH, Lee S-M, Eom H-S, Kim I-S, Lee G-W, Kong S-Y. Fluorescent in Situ Hybridization Analysis at Bone Marrow Biopsy Section in Multiple Myeloma. *Blood*. 2009; 114 (22): 4898.
 22. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2021; 32(3): 309-322.
 23. Dingli D, Ailawadhi S, Bergsagel L, Buadi FK, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. *Mayo Clin Proc*. 2017; 92(4) 578-598.

Uloga crijevne mikrobiote u patogenezi i liječenju multiplog mijeloma

Marija Stanić Damić

Klinički bolnički centar Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Uvod

Crijevna mikrobiota čini ekosustav od desetak bilijuna mikrobnih stanica koje žive u našim crijevima, a sastoji se od 500 do 1500 različitih vrsta bakterija. Procijenjeno je da mikrobiom ljudskih crijeva čini više od 5 milijuna različitih gena (D'Argenio i Salvatore, 2015). Zanimljivo je da geni kodirani mikrobiomom sadrže informacije za proteine potrebne za preživljavanje domaćina, ali nisu prisutni u ljudskom genomu, zbog čega se mikrobiom ponekad naziva našim „zaboravljenim organom“. Mikrobiom je izuzetno dinamičan i na njega mogu utjecati brojni čimbenici poput dobi, prehrane, hormonalnih ciklusa, terapije i bolesti. Smanjen broj korisnih bakterija (simbionata) i povećan broj štetnih bakterija (patobionata) označava disbiozu crijevne mikrobiote. Postoji tzv. alfa raznolikost koja čini mikrobiotu pojedinca te beta raznolikost koju čini mikrobiota skupine/zajednice.

Dostupni su pojedini dokazi o utjecaju prehrane i drugih intervencija u načinu života na crijevni mikrobiom i na rizik od nastanka plazmastičnih diskrazija/multiplog mijeloma, ishode liječenja i kvalitetu života. Podaci dobiveni iz ovih studija mogu pomoći u formuliranju smjernica utemeljenih na dokazima za pružatelje zdravstvenih usluga za savjetovanje pojedinaca u riziku, poput onih s monoklonskom gamopatijom neodređenog značaja (MGUS), šuljajućim multiplim mijelomom (SMM) i aktivnim multiplim mijelomom (MM) u pogledu njihovih prehrambenih navika.

Plazmastične diskrazije povezane su s progresivnom crijevnom disbiozom u usporedbi sa zdravim kontrolama

Kineska retrospektivna studija na 40 novodijagnosticiranih pacijenata s MM-om i 17 zdravih kontrola provedena je u svrhu procjene sastava i raznolikosti mikrobioma. Alfa raznolikost (raznolikost vrsta unutar jednog uzorka) značajno je smanjena u skupini MM u usporedbi sa zdravim kontrolama. Procjena sastava crijeva mikrobiote između pacijenata s MM-om i zdravih kontrola otkrila je više razine *Bacteroides*a, Rodova *Faecalibacterium* i *Roseburia* u skupini MM. Razina bakterije *Clostridium leptum* of *F. Prausnitzii* značajno korelira s ISS

stadijem ($R = 0,138$, $p = 0,017$), a ona je dominantna vrsta koja proizvodi butirate s protuupalnim svojstvima (1). U druge dvije studije s kontrolama, pacijenti s MGUS-om ili MM-om u odnosu na zdrave kontrole imali su kvalitativno viši medijan mikrobnih raznolikosti, a relativno manju brojnost bakterija koje proizvode butirat u odnosu na zdrave kontrole (2,3).

Odnos prehrambenih navika i crijevne mikrobiote

Američka kohortna studija o prehrambenim navikama zasnovanima na biljnoj prehrani provedena 2020. godine utvrdila je da prehrana može smanjiti rizik od razvoja MM-a i rizik od smrti nakon što se MM razvije (4). Manjkavost studije je nedostatak podataka o prehrani nakon postavljanja dijagnoze i ograničeni klinički podaci o riziku i liječenju. U britanskoj kohortnoj studiji koja je uključila više od 30 000 mesojeda te više od 18 000 vegetarijanaca, utvrđeno je da postoji znatno niži rizik od razvoja multiplog mijeloma kod onih koji jedu ribu, vegetarijanaca i vegana, u usporedbi s mesojedima (5). Povrće ima povoljan utjecaj na crijevni mikrobiom jer sadrži flavonoide koji inhibiraju razvoj raka kod laboratorijskih životinja te sadrže vitamin C, antioksidans koji smanjuje endogeno stvaranje radikala bez kisika. Biljna prehrana bogata je topivim vlaknima s višim razinama bakterija iz skupine *Bacteroidetes*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* i *Clostridium* klastera XIVa i IV. Potonje skupine sadrže *Eubacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, koje razgrađuju vlakna i proizvode kratkolančane masne kiseline (short-chain fatty acids - SCFA), kao što su butirat, acetat i propionate (6). Zapadna prehrana ima manje topivih vlakana što rezultira manjom proizvodnjom SCFA, a one imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru, sprječavanju upalnih stanja i povezane su s poboljšanim ishodima liječenja MM (7,8). Konzumacija voća i povrća, posebice zelenog lisnatog, nosi manji rizik od razvoja MGUS-a i progresije MGUS u MM. Jedan mogući mehanizam mogao bi biti pozitivan utjecaj na bakterije koje proizvode butirat (9). Vlakno pektin čini 35% stanične stijenke vlakana voća i pokazalo se da povećava količinu mikrobiote koja proizvodi butirat kao što je *Clostridium* cluster XIV.

Inulin u voću (npr. banana) povećava *Faecalibacterium prausnitzii*, već spomenutu bakteriju koja proizvodi butirat. Više razine svih SCFA primijećene su kod pojedinaca koji se pridržavaju mediteranske prehrane (10,11).

Debljina i inzulinska rezistencija također nose određeni na rizik od nastanka plazmastaničnih diskrazija. Inzulin i inzulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1) uključeni su u patogenezu MM-a promicanjem rasta plazma stanica u MM-u. Zbog toga se preporuča konzumacija cjelovitih žitarica koje imaju niži glikemijski indeks, s posljedičnim nižim porastom inzulina i IGF-1 (12) te redukcija tjelesne mase. Konzumacija alkohola u umjerenim količinama poboljšava osjetljivost na inzulin što zauzvrat smanjuje rizik od nastanka dijabetesa i pretilosti koji su povezani s poremećajima plazma stanica (12). Druga hipoteza kako alkohol djeluje povoljno na mikrobiotu je da crno vino sadrži antioksidanse kao što je resveratrol koji neizravno modulira crijevnu mikrobiotu i potiskuje indukciju T limfocita (13), što je relevantno u patogenezi MM-a.

U istraživanju odabranom kao nagrada ASH Scholar 2023. godine, NUTRIVENTION-2 studija, dr. Shah i kolege detaljno su opisali rezultate prvog ispitivanja dijetetske intervencije provedenog na pacijentima (N=23) s plazmastaničnom diskrazijom. Pretilost, nizak nivo adiponektina, visok nivo leptina, visok nivo inzulina i prehrana u kojoj nedostaje biljne hrane faktori su rizika za nastanak plazmastaničnih diskrazija. Pacijenti s MGUS-om i SMM-om i povišenim indeksom tjelesne mase (BMI) imaju dvostruko veću vjerojatnost da će napredovati do MM-. Postoje dokazi o disbiozi mikrobioma u bolesnika s PSD-om, a promjene u prehrani mogu utjecati na promjene u mikrobiomu. Stoga postoje temelji za proučavanje intervencije u prehrani, poglavito uvođenje biljne prehrane, kako bi se potencijalno utjecalo na progresiju MGUS-a ili SMM-a (14).

Vitamin D – partner u imunološkom odgovoru

Primarna je uloga vitamina D održavanje konstantne razine kalcija i fosfata u plazmi tako da potiče njihovu apsorpciju putem probavnog trakta. Također su posljednjih godina utvrđene i druge brojne dobrobiti ovog najstarijeg hormona na Zemlji, a njegov nedostatak povezuje se sa sklonošću infekcijama, alergijskim i autoimunim bolestima pa čak i malignim bolestima (dojka, kolorektum, prostata) (15). Većina dokaza nije pokazala povezanost između vitamina D i bolesti kostiju, iako je dobro utvrđeno da ima ulogu u zdravlju kostiju. To može biti dje-

lomično zbog složene interakcije između vitamina D i drugih esencijalnih hranjivih tvari za održavanje zdravlja kostiju, ali kada se doda kalcij, primijećeni su korisni učinci na muskuloskeletni i imunološki sustav domaćina (16,17). Vitamin D i mikrobiota sudjeluju u zajedničkom održavanju homeostaze crijevnog imunološkog sustava. U kineskoj studiji provedenoj na 129 pacijenata s MM-om, skupina s nedostatkom vitamina D imala je znatno lošiji PFS (2-godišnji PFS 44,8% prema 66,9%, $p = 0,008$) i OS (2-godišnji OS 47,2% prema 74,2%, $p = 0,024$), u usporedbi sa skupinom bez nedostatka vitamina D. U univarijantnoj analizi, nedostatak vitamina D pokazao je potencijalnu povezanost i sa ISS stadijem. U skupini s nedostatkom vitamina D ($n = 36$), 27 pacijenata (75%) primalo je suplementaciju vitaminom D te se u toj skupini pokazao trend prema boljem OS-u u usporedbi sa skupinom koja nije uzimala suplementaciju vitaminom D (2-godišnja stopa OS-a 51,9% u odnosu na 33,3% ($p = 0,140$)) (18). Na kvalitetu života pacijenata s MM-om, između ostalog, značajno utječe nastanak periferne neuropatije tijekom liječenja. Nedostatak vitamina D povezan je s povećanom incidencijom periferne neuropatije u pacijenata sa SMM-om i MM-om (19). Niska razina vitamina D u serumu javlja se često među pacijentima s multiplim mijelomom koji se liječe bortezomibom i/ili talidomidom i povezana je s teškom neuropatijom (20). Stoga, na kvalitetu života pacijenata s MM-om koji imaju perifernu neuropatiju mogli bismo utjecati ovom jeftinom intervencijom, ali za sada nema intervensijskih studija niti jasnih smjernica o primjeni vitamin D u pacijenata oboljelih od MM-a te se vitamin D primjenjuje ovisno o procjeni kliničara.

Probiotici – da ili ne?

Iako je uporaba probiotika česta, do danas nije bilo intervensijskih kliničkih studija u MM populaciji. Stoga nema dovoljno podataka za preporuku uzimanja probiotičkih dodataka u bolesnika s MM-om s obzirom na poznate rizike od bakterijemije uzrokovane sojevima probiotika (21) i nepotpuni oporavak crijevnog mikrobioma nakon primjene antibiotika (21,22). Potrebne su daljnje kliničke studije za sustavno proučavanje rizika i dobrobiti upotrebe probiotika na mikrobiom u MM-u te na rizik i ishode MM-a, a jedna studija vezana uz SMM je u tijeku (14).

Crijevna mikrobiota i naši stari dobri lijekovi za multipli mijelom

Uz terapiju bortezomibom vežu se nuspojave poput periferne neuropatije i gastrointestinalnih poremećaja. Jedan od mogućih mehanizama nastanka ovih nuspojava je da bortezomib mijenja raznolikost crijevne mikrobiote (23). Nadalje, ispitivani su pacijenti s MM-om u terapiji održavanja lenalidomidom te je kod njih utvrđeno da je prehrana bogata fitokemikalijama povezana s koncentracijom butirata ($p = 0,008$) i raznolikosti mikrobioma ($p = 0,03$). Dugotrajna negativna minimalna ostatna bolest (MRD) kod multiplog mijeloma povezana je s butiratom u stolici i biljnom prehranom. U pacijenata sa MM u terapiji održavanja lenalidomidom prehrana bogata povrćem i morskim plodovima korelira sa razinama butirata tijekom 3 mjeseca ($p = 0,009$) i MRD negativitetom ($p = 0,05$). Konzumacija flavonoida koji imaju antioksidativni učinak korelira s koncentracijom butirata u stolici sugerirajući važnost biljne prehrane u promjenama crijevnog mikrobioma i dugoročnim odgovorima (24). U tijeku je studija koja proučava učinak prebiotičkih suplemenata na mikrobiom u MM-u i limfomu nakon ASCT-a (NCT05135351).

Može li disbioza mikrobiote utjecati na progresiju multiplog mijeloma?

Na mišjim modelima, *Prevotella heparinolytica* može ubrzati progresiju MM-a tako što potiče kolonizaciju cijeva Th17 stanicama koje pak migriraju u koštanoj srži. Liječenje miševa antitijelima protiv IL-17 smanjilo je nakupljanje Th17 stanica i eozinofila u koštanoj srži i odgodilo napredovanje bolesti. Također je primijećeno da više razine IL-17 u koštanoj srži pacijenata sa šuljajućim mijelomom predviđaju bržu progresiju bolesti (25). Kod ljudi, usporedba između mikrobiote 19 novodijagnosticiranih pacijenata s MM-om i 18 zdravih kontrolnih ispitanika pokazala je da u pacijenata s MM-om prevladavaju *Klebsiella* i *Streptococcus*, poznate kao bakterije koje recikliraju dušik. Transplantacija fekalne mikrobiote u 5TGM1 mišve sugerira da bakterije koje recikliraju dušik ubrzavaju progresiju MM-a. Utvrđeno je da *Klebsiella pneumoniae* potiče progresiju MM-a putem *de novo* sinteze glutamina (pospješene hvatanjem dušika) u miševa. Važno je da metabolizam glutamina potiče Th17 stanice, a miševi hranjeni prehranom s nedostatkom glutamina pokazali su sporije napredovanje MM-a što dodatno podupire ideju da ciljane dijetetske intervencije mogu promijeniti tijek MM-a (25,26).

Zaključak

Disbioza crijevne mikrobiote u plazmatsaničnim diskrazijama može biti povezana s progresijom bolesti, učinkovitošću i toksičnošću liječenja. Konzumacija povrća, posebno zelenog povrća, cjelovitih žitarica i plodova mora kao i redukcija tjelesne mase povezuju se sa smanjenim rizikom od nastanka i progresije MM-a. Visoka učestalost nedostatka vitamina D primjećena je u bolesnika s MM-om te je opravdana procjena potencijalnog utjecaja vitamina D kao jeftine intervencije u smislu smanjenja rizika od MM-a, utjecaju na imunitet, napredovanje bolesti i nuspojave liječenja. Bortezomib mijenja raznolikost crijevne mikrobiote, a za sada nema dokaza kako to utječe na ishode liječenja. Dugotrajno negativan MRD u MM-u povezan je s butiratom u stolici i biljnom prehranom kod pacijenata liječenih lenalidomidom. Studije su u tijeku kako bi se procijenio učinak intervencija u prehrani i dodacima prehrani na crijevnju mikrobiotu u pacijenata oboljelih od plazmatsaničnih diskrazija.

Literatura

1. Zhang B, Gu J, Liu J, Huang B, Li J. Fecal microbiota taxonomic shifts in Chinese multiple myeloma patients analyzed by quantitative polymerase chain reaction (QPCR) and 16S rRNA high-throughput sequencing. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2019;25:8269–80.
2. Antoine Pepeljugoski C, Morgan G, Braunstein M. Analysis of intestinal microbiome in multiple myeloma reveals progressive dysbiosis compared to MGUS and healthy individuals. *Blood.* 2019;134:3076.
3. Jian X, Zhu Y, Ouyang J, Wang Y, Lei Q, Xia J, et al. Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria. *Microbiome.* 2020;8:74. [PubMed: 32466801]
4. Lee DH, Fung TT, Tabung FK, Marinac CR, Devore EE, Rosner BA, et al. Pre-diagnosis dietary pattern and survival in patients with multiple myeloma. *Int J Cancer.* 2020;147:1823–30.
5. Key TJ, Appleby PN, Crowe FL, Bradbury KE, Schmidt JA, Travis RC. Cancer in British vegetarians: updated analyses of 4998 incident cancers in a cohort of 32,491 meat eaters, 8612 fish eaters, 18,298 vegetarians, and 2246 vegans. *Am J Clin Nutr.* 2014;100:378s–85s. [PubMed:24898235]
6. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014;505:559–63. [PubMed:24336217]
7. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2020;382:822–34.[PubMed: 32101664]
8. Shah UA, Maclachlan KH, Derkach A, Salcedo M, Barnett K, Caple J, et al. Sustained minimal residual disease negativity in multiple myeloma is associated with stool butyrate and healthier plant-based diets. *Clin Cancer Res.* 2022; 28:5149–55.

9. Brevi A, Cogrossi LL, Lorenzoni M, Mattorre B, Bellone M. The insider: impact of the gut microbiota on cancer immunity and response to therapies in multiple myeloma. *Front Immunol.* 2022;13:845422. [PubMed: 35371048]
10. Thordardottir M, Lindqvist EK, Lund SH, Costello R, Burton D, Steingrimsdottir L, et al. Dietary intake is associated with risk of multiple myeloma and its precursor disease. *PLoS One.* 2018;13:e0206047. [PubMed: 30383820]
11. Joseph JM, Tang L, Hillengass J, Moysich K, Landgren O, Usmani S, et al. Low intake of fruits and vegetables and high intake of processed meats and juices are associated with risk of mgus in the national health and nutrition examination survey (NHANES) database. *Blood.* 2022;140:12556–8.
12. Parikh R, Tariq SM, Marinac CR, Shah UA. A comprehensive review of the impact of obesity on plasma cell disorders. *Leukemia.* 2022;36:301–14. [PubMed: 34654885]
13. Alrafas HR, Busbee PB, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Resveratrol modulates the gut microbiota to prevent murine colitis development through induction of Tregs and suppression of Th17 cells. *J Leukoc Biol.* 2019;106:467–80. [PubMed: 30897248]
14. Castro F, Sweeney NW, Derkach A, Traore K, Anuraj A, Guttentag L, et al. Microbial changes in response to a plant-based diet and/or supplements in SMM patients: a national multi-arm randomized prospective telehealth study via healthtree: the nutrition prevention (NUTRIVENTION-2) study. *Blood.* 2022;140:13079–81
15. Seraphin G, Rieger S, Hewison M, Capobianco E, Lisse TS. The impact of vitamin D on cancer: A mini review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023 Jul;231:106308. doi: 10.1016/j.jsmb.2023.106308. Epub 2023 Apr 11. PMID: 37054849; PMCID: PMC10330295.
16. Mirhosseini N, Psihogios A, McLaren MD, Seely D. Vitamin D and Multiple Myeloma: A Scoping Review. *Curr Oncol.* 2023 Mar 11;30(3):3263–3276. doi: 10.3390/curroncol30030248. PMID: 36975461; PMCID: PMC10047650.
17. Protiva P, Pendyala S, Nelson C, Augenlicht LH, Lipkin M, Holt PR. Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulate genes of immune and inflammatory pathways in the human colon: a human crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 2016 May;103(5):1224–31. doi: 10.3945/ajcn.114.105304. Epub 2016 Mar 23. PMID: 27009752; PMCID: PMC4841933.
18. Sejin Kim, Hyungwoo Cho, Miyoung Kim, Yoon Seok Choi, Dok Hyun Yoon; Prognostic Significance of Vitamin D Level in Patients with Multiple Myeloma. *Blood* 2022; 140 (Supplement 1): 7154–7155. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-166387>
19. Oortgiesen BE, Kroes JA, Scholtens P, Hoogland J, Dannenberg-de Keijzer P, Siemes C, et al. High prevalence of peripheral neuropathy in multiple myeloma patients and the impact of vitamin D levels, a cross-sectional study. *Support Care Cancer.* 2022;30:271–8. [PubMed: 34273034]
20. Wang J, Udd KA, Vedisheva A, Swift RA, Spektor TM, Bravin E, et al. Low serum vitamin D occurs commonly among multiple myeloma patients treated with bortezomib and/or thalidomide and is associated with severe neuropathy. *Support Care Cancer.* 2016;24:3105–10. [PubMed:26902977]
21. Yelin I, Flett KB, Merakou C, Mehrotra P, Stam J, Snesrud E, et al. Genomic and epidemiologic evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nat Med.* 2019;25:1728–32. [PubMed: 31700189]
22. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell.* 2018;174:1406–23.e16. [PubMed: 30193113]
23. Jacqui Scott. Dissecting the causal contribution of the gut microbiota to the neurological and gastrointestinal side effects of the myeloma drug, bortezomib. #MASCC24
24. Shah UA, Maclachlan KH, Derkach A, Salcedo M, Barnett K, Caple J, et al. Sustained minimal residual disease negativity in multiple myeloma is associated with stool butyrate and healthier plant-based diets. *Clin Cancer Res.* 2022; 28:5149–55. [PubMed: 36170461]
25. Calcinotto A, Brevi A, Chesi M, Ferrarese R, Garcia Perez L, Grioni M, et al. Microbiota-driven interleukin-17-producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression. *Nat Commun.* 2018;9:4832. [PubMed: 30510245]
26. Jian X, Zhu Y, Ouyang J, Wang Y, Lei Q, Xia J, et al. Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria. *Microbiome.* 2020;8:74. [PubMed: 32466801]

Sustavna mastocitoza: kratki pregled bolesti

Toni Valković

Specijalna bolnica Medico, Rijeka

Odjel za internističku onkologiju s hematologijom, Služba za internu medicinu, Opća bolnica Pula

Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci

Uvod

Mastociti su stanice mijeloidnog porijekla koje se stvaraju u koštanoj srži, ali se većinom nalaze u drugim tkivima i organima, posebno u koži te sluznici probavnog i dišnog sustava. Ove stanice su dio imunološkog sustava i sudjeluju u obrani organizma, posebno od parazita, ali i u alergijskim reakcijama. Kada se aktiviraju, iz svojih granula otpuštaju različite medijatore upale, kao što su histamin, neki prostaglandini, leukotrieni i interleukini te drugi biološki aktivni spojevi (1). Jedna od važnih biološki aktivnih tvari koju luče normalni i neoplastički mastociti je triptaza. Mastociti na svojoj površini imaju tirozin kinazni receptor nazvan KIT (CD117) čija je aktivacija odgovorna za njihovu proliferaciju i preživljenje (2).

Mastocitoza je bolest u kojoj dolazi do patološke akumulacije mastocita u tijelu. Dijeli se na kožnu mastocitozu u kojoj se mastociti nakupljaju samo u koži (ovom bolešću se bave dermatolozi), mastocitni sarkom (koji je je vrlo rijetka destruktivna vrsta sarkoma koja se liječi kombinacijom kirurgije, kemoterapije i zračenja) te na sistemsku mastocitozu kojom se bave hematolozi i o kojoj će biti riječi u daljnjem tekstu (1,3).

Sistemska mastocitoza (SM) je rijetka klonalna neoplastička bolest mastocita koji su morfološki i imunofenotipski različiti od normalnih mastocita te koji se u multifokalnim nakupinama (klasterima) akumuliraju u koštanoj srži i drugim organima. Ovakvi neoplastički vretenasti mastociti najčešće imaju izraženu mutaciju KIT D816V (2,3). Rijetko, mogu biti izražene i druge KIT mutacije kao što su V560G, D815K, D816Y, insVI815-816, D816F, D816H te D820G (2,3). U uznapredovalim oblicima SM mogu se naći i druge mutacije kao što su TET2, SRSF2, ASXL1, RUNX1, JAK2, N/KRAS, CBL i EZH2 (2,3).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) klasificirala je SM u nekoliko kategorija (gotovo istu podjelu bolesti obznanio je i *International Consensus Classification- ICC*): **neuznapredovala sistemska mastocitoza** (engl. *non-Advanced Systemic Mastocytosis* – NAdvSM) koja uključuje mastocitozu

koštane srži (engl. *Bone Marrow Mastocytosis* – BMM), indolentnu sistemsku mastocitozu (ISM) i šuljajuću sistemsku mastocitozu (engl. *Smoldering Systemic Mastocytosis* - SSM) te **uznapredovala sistemsku mastocitozu** (engl. *Advanced Systemic Mastocytosis* - AdvSM) koja se dijeli u agresivnu sistemsku mastocitozu (ASM), mastocitnu leukemiju (engl. *Mastocyt Cell Leukemia* - MCL) te sistemsku mastocitozu povezanu s drugim hematološkim (mijeloidnim) neoplazmama (engl. *Systemic Mastocytosis with an Associated Hematologic (Myeloid) Neoplasm* - SMAHN) (4,5).

U prisutnosti eozinofilije u krvi i proliferacije mastocita u koštanoj srži potrebno je učiniti probir za FIP1L1-PDGFR α , korištenjem metode FISH ili RT-PCR (konvencionalna citogenetika koristi se za utvrđivanje slučajeva s PDGFRB preuređivanjem). Ovi slučajevi s PDGFR α /PDGFRB preuredbama, eozinofilijom u perifernoj krvi i mastocitozom u koštanoj srži razlikuju se od SM i prikladno su klasificirani kao “mijeloidne ili limfoidne neoplazme s eozinofilijom i fuzijom gena tirozin kinaze” prema ICC i WHO klasifikacijama (3). Klinička prezentacija ovog entiteta je raznolika.

Epidemiologija

Rezultati danskog registra utvrdili su prevalenciju svih oblika mastocitoze od 27,4/100000 stanovnika, dok je prosječna incidencija mastocitoze u praćenom periodu od 1997. do 2021. godine procijenjena na oko 1,2/100000 stanovnika. Međutim, incidencija SM (dakle kada izuzmemo oboljele od kožne mastocitoze i mastocitnog sarkoma) iznosila je samo 0,56 na 100000 stanovnika (6). Prema danskim podacima najveću prevalenciju/incidenciju ima kožna mastocitoza (prevalencija 16,23/100000, incidencija 0,65/100000), manju prevalenciju/incidenciju ima ISM (prevalencija 9,4/100000, incidencija 0,43/100000), dok je prevalencija/incidencija ASM iznosila samo 0,13/100000 tj. 0,01/100000, SM-AHN 1,72/100000 tj. 0,12/100000 te MCL 0/100000 tj. <0,01/1000000 stanovnika (6). Zahvaljujući publiciranim podacima Radne skupine za Ph-negativne mijeloproliferativne bolesti Krohema postoje

recentni podaci o učestalosti, kliničkoj prezentaciji i načinu liječenja bolesnika sa SM u našoj zemlji. Ti podaci pokazuju da su u Hrvatskoj ISM i SSM značajno češći nego li ASM i SMAHN (oko 70% svih slučajeva SM otpada na ISM i SSM, a samo 30% na ASM i SMAHN) (7).

Klinička slika

Klinička prezentacija bolesti je varijabilna i moguće zahvaća brojne organe što otežava prepoznavanje bolesti i produljuje vrijeme do postavljanja dijagnoze. Simptomi su posljedica infiltracije tkiva i organa patološkim mastocitima te lučenja biološki aktivnih spojeva koje otpuštaju mastociti. Pacijenti mogu biti ugroženi teškim i po život opasnim anafilaktičkim reakcijama, urtikarijama, drugim kožnim promjenama, sinkopama, hipotenzijom, tahikardijom, poremećajima svijesti, proljevima, bolovima u trbuhu, mučninom, povraćanjem, osteoporoza, lomovima kosti, glavoboljom, depresijom, kognitivnim poremećajima, poremećajima spavanja, dok transformacija u MCL predstavlja izuzetno težak oblik bolesti s lošim ishodom liječenja (3). Nerijetko su izraženi konstitucionalni simptomi, napose mršavljenje (3).

Dijagnostika

Za dijagnozu SM koriste se specifični kriteriji koji se dijele na veliki i male kriterije, sukladno preporukama SZO-e (vrlo slične dijagnostičke kriterije dao je i ICC) (3).

Veliki kriterij odnosi se na prisustvo multifokalnih gustih infiltrata mastocita (≥ 15) u biopsiji koštane srži i/ili drugim ekstrakutanim organima.

Mali kriteriji uključuju:

1. da je $>25\%$ mastocita u infiltratu vretenastog oblika, atipične morfologije ili da je 25% svih mastocita u razmazu aspirata koštane srži nezrelo i atipično
2. prisutnost aktivirajuće KIT točkaste mutacije u kodonu 816 u koštanoj srži, krvi ili drugom ekstrakutnom organu
3. ekspresiju CD25 i/ili CD2 na mastocitima iz koštane srži, krvi ili drugog ekstrakutnog organa uz ekspresiju normalnih markera mastocita
4. razinu serumske triptaze >20 ng/mL (osim u slučaju prisutnosti pridruženog mijeloidnog poremećaja kada ovaj parametar nije valjan).

SM se dijagnosticira kada je prisutan veliki i jedan mali kriterij ili tri mala kriterija (4).

Dakle, u kliničkoj praksi postavljanje dijagnoze

SM-a, osim na kliničkoj slici, počiva na tri ključne laboratorijske pretrage: biopsiji kosti ili drugog tkiva u kojoj se vide fokusi umnoženih mastocita abnormalne morfologije, povišenoj koncentraciji triptaze u serumu koju proizvode umnoženi mastociti te molekularnoj analizi koja dokazuje KIT D816V mutaciju, najčešće u koštanoj srži, rjeđe perifernoj krvi.

Dokaz mutacije KIT D816V sve je važniji, jer osim za potvrdu dijagnoze, s pojavom KIT-inhibitora može imati ulogu u krojenju terapije. Sve ove tri pretrage moguće je obaviti u našim kliničkim zdravstvenim ustanovama.

Za definitivnu dijagnostiku pojedinih podtipova AdvSM koriste se u cijelom svijetu i u našoj zemlji tzv. B- i C-nalazi (1,3).

B-NALAZI	C-NALAZI
• $>30\%$ mastocita u biopsiji koštane srži (fokalne, guste nakupine) i/ili serumska triptaza > 200 ng/mL • displazija i/ili mijeloproliferacija u ne-mastocitnom odjeljku koštane srži, no bez kriterija za pridruženu hematološku bolest, s normalnim ili diskretno abnormalnim krvnim nalazima • hepatomegalija bez poremećaja funkcije jetre i/ili splenomegalija bez hipersplenizma i/ili limfadenopatija utvrđena palpacijom ili imaging-om (>2 cm)	• disfunkcija koštane srži očitovana jednom ili više vrsta citopenija/pancitopenije ($ANC < 1 \times 10^9/L$, $Hgb < 10$ g/dL, $Trc < 100 \times 10^9/L$) • splenomegalija s narušenom jetrenom funkcijom, ascitesom i/ili portalnom hipertenzijom • hipersplenizam • osteolize i/ili patološke frakture • malapsorpcija i gubitak na tjelesnoj težini

Ako pacijent nema C kriterije i ima manje od 2 B kriterija postavlja se dijagnoza ISM-a, ako ima 2 ili više B kriterija riječ je o SSM-u, a ako ima neki od C kriterija tada se postavlja dijagnoza ASM-a. Ukoliko pacijent ima laboratorijske kriterije za udruženu mijeloidnu neoplazmu tada je riječ o SMAHN-u, a ako ima 20% ili više atipičnih mastocita u koštanoj srži tada se radi o MCL-u.

Liječenje

U našoj zemlji terapija SM-a se u ovom trenutku još uvijek svodi na simptomatsko liječenje antihistaminicima, inhibitorima protonske pumpe, bisfosfonatima, glukokortikoidima, a oni koji imaju simptome anafilaksije liječe se adrenalinom kojeg bi morali imati uvijek uz sebe. U slučaju AdvSM-a pacijenti se često liječe nekim vidom citoreduktivne terapije kao što su interferon-alfa, hidroksiureja ili kladribin (7). Imatinib može biti učinkovit u slučaja-

ju negativne KIT D617V mutacije (kao i kod eozinofilije s FIP1L1/PDGFR α mutacije). Alogenična transplantacija krvotovornih matičnih stanica koristi se rijetko kao metoda liječenja (3). U Hrvatskoj trenutno nisu dostupne ciljane terapije usmjerene na KIT D816V mutaciju i to je svakako nezadovoljena klinička potreba.

Ciljani lijek avapritinib koji pokazuje visoku specifičnost u slučaju KIT D617F mutacije je ispitan u dvije kliničke studije. U kliničkoj studiji faze 1 Explorer avapritinib je procijenjen u različitim dozama (od 30-400 mg) jednom dnevno u 86 bolesnika, 69 s potvrđenim AdvSM-om. Najčešće uočene nuspojave bile su periorbitalni edem (69%), anemija (55%), proljev (45%), trombocitopenija (44%) i mučnina (44%). Intrakranijalno krvarenje javilo se u ukupno 13%, ali u samo 1% bolesnika bez teške trombocitopenije (trombociti $<50 \times 10^9/l$). U 53 bolesnika čiji se odgovor mogao adekvatno procijeniti, ukupna stopa odgovora bila je 75%. Stopa kompletne remisije bila je 36%. Avapritinib je izazvao smanjenje mastocita u koštanoj srži i triptaze u serumu za $\geq 50\%$ u 92%, odnosno 99% bolesnika. Avapritinib je izazvao duboke i trajne odgovore, uključujući molekularnu remisiju u bolesnika s AdvSM te se dosta dobro podnosio u preporučenoj dozi od 200 mg dnevno (8). U kliničkoj studiji faze 2 Pathfinder postignut je ukupni odgovor u 75% pacijenata (ukupan broj ispitanika bio je 32), uključujući 19% kompletnih remisija ili kompletnih remisija s djelomičnim hematološkim oporavkom. Uočeno je smanjenje od $\geq 50\%$ u odnosu na početnu vrijednost u serumskoj triptazi (93% ispitanika), mastocitima koštane srži (88% ispitanika) i mutacije KIT D816V (60% ispitanika). Najčešće nuspojave stupnja ≥ 3 bile su neutropenija (24%), trombocitopenija (16%) i anemija (16%). Avapritinib je pokazao visoku stopu kliničkih, morfoloških i molekularnih odgovora i općenito su ga bolesnici s AdvSM-om dobro podnosili (9). Niti u prvobitnoj publikaciji, niti u kasnijim ažuriranim podacima iz kliničke studije Pathfinder nakon tri godine praćenja medijan preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja nije dostignut (9,10). Zaključno, rezultati studije Pathfinder pokazali su da je avapritinib u početnoj dozi od 200 mg dnevno dobro podnošljiv, da znatno poboljšava teške simptome bolesti i kvalitetu života, smanjuje tumorsko opterećenje malignim mastocitima, dovodi do visoke stope ukupnog odgovora, dobrih molekularnih odgovora, uz produljenje preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja u odnosu na povijesne kohorte (11,12).

Drugi ciljani lijek koji se u svijetu koristi za liječenje SM-a je neselektivni inhibitor tirozin kinaze midostaurin. U globalnom registracijskom ispitivanju koje je analiziralo 89 pacijenata s AdvSM –om (16 s ASM-om, 57 SMAMN-om i 16 s MCL-om) liječenih midostaurinom u dozi od 100 mg dva puta dnevno, ukupna stopa odgovora iznosila je 60%, s tim da je 45% ispitanika imalo veliki odgovor, a 15% parcijalni odgovor. Stopa ukupnog odgovora bila je 75% u bolesnika s ASM-om, 58% u bolesnika sa SMAMN-om i 50% u bolesnika s MCL-om. Nakon medijana praćenja od 26 mjeseci (raspon 12-54 mjeseca), medijan trajanja odgovora nije postignut u bolesnika s ASM-om ili MCL-om, u a bolesnika sa SMAMN-om bio je 12,7 mjeseci. Pacijenti su odgovarali neovisno o statusu mutacije KIT D816V. Postignuta je normalizacija hipoalbuminemije (58% ispitanika), neovisnost o transfuziji krvi (40% ispitanika) ili neovisnost o transfuziji trombocita (100% ispitanika), poboljšanje testova jetrene funkcije (44%–58% ispitanika) i/ili povratak gubitka tjelesne težine (25% ispitanika). Medijan ukupnog preživljenja za ASM, SMAMN i MCL nije dosegnut, tj. iznosio je 20,7 mjeseci i 9,4 mjeseci (13). Od neželjenih učinaka često su bile izražene gastrointestinalne nuspojave. Što se tiče sigurnosti, zaključeno je da je potrebno pratiti krvnu sliku, testove jetrene funkcije, EKG (QTc interval koji može biti produljen) i razine amilaze/lipaze tijekom liječenja (13).

Temeljem gore navedenoga, avapritinib ima odobrenje EMA-e za liječenje AdvSM-a i ISM-a s umjerenim i teškim simptomima koji nisu dobro kontrolirani simptomatskom terapijom u dozi od 200 mg/dan, peroralno. Midostaurin ima odobrenje EMA-e za liječenje AdvSM-a u dozi od 2x100 mg peroralno.

Postoji više sustava/kriterija za procjenu odgovora na liječenje kod SM-a, od onih najstarijih Valentovih kriterija koji se još uvijek koriste u kliničkoj praksi, preko Mayo kriterija pa do kriterija “International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment and European Competence Network on Mastocytosis” (IWG-MRT-ECNM) (14).

Prognoza

Što se tiče ukupnog preživljenja ono značajno varira između određenih tipova SM-a. Ukupno uzevši pacijenti sa SM-om žive kraće od opće populacije što pokazuju rezultati Lim-a i suradnika (15). Međutim, isti autor pokazao je veliku razliku u preživljavanju između pojedinih tipova SM-a. Tako npr. bolesnici s ISM-om žive praktički jednako

dugo kao i opća populacija, dok bolesnici s AdvSM-om žive značajno kraće (15). U ovoj analizi koja je obuhvatila 342 bolesnika sa SM-om dijagnosticiranih u Mayo Clinic, SAD, u periodu od 31 godine (1976.-2007.), medijan preživljenja oboljelih od SM iznosio je 63 mjeseca, no među njima su bolesnici s AdvSM-om imali značajno lošije preživljenje – u bolesnika s ASM-om zabilježen je medijan preživljenja od 3,5 godine, u bolesnika sa SMAHN-om 2 godine, a u bolesnika s MCL-om medijan ukupnog preživljenja iznosio je samo 2 mjeseca (15). Uzrok smrti među bolesnicima s uznapredovalim oblikom bolesti je najčešće progresija bolesti i leukemijska transformacija.

Literatura

1. Theoharis TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N Engl J Med*. 2015;373:163–172.
2. Garcia-Montero AC et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108:2366–2372.
3. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2023 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2023 Jul;98(7):1097-1116.
4. Swerdlow SH et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.
5. Valent P, Akin C, Metcalfe D. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and new emerging treatment concepts. *Blood* 2017;129:1420-1427.
6. Jørgensen MP et al. Prevalence and incidence of mastocytosis in adults: a Danish nationwide register study. *Eur J Epidemiol*. 2025 Jan 3. doi: 10.1007/s10654-024-01195-5.
7. Krečak I, i sur. Sistemska mastocitoza u Republici Hrvatskoj. *Liječnički vjesnik*. 2022;144: 306-313
8. DeAngelo DJ, Radia DH, George TI, Robinson WA, Quiery AT, Drummond MW, et al. Safety and efficacy of avapritinib in advanced systemic mastocytosis: the phase 1 EXPLORER trial. *Nat Med*. 2021 Dec;27(12):2183-2191.
9. Gotlib J, Reiter A, Radia DH, Deininger MW, George TI, Panse J, et al. Efficacy and safety of avapritinib in advanced systemic mastocytosis: interim analysis of the phase 2 PATHFINDER trial. *Nat Med*. 2021 Dec;27(12):2192-2199.
10. Reiter A et al. Oral presentation: Avapritinib in Patients With Advanced Systemic Mastocytosis (AdvSM): Efficacy and Safety Analysis From the Phase 2 PATHFINDER Study With 3-year Follow-up. European Hematology Association (EHA) Conference, Madrid, Spain. June 13–16, 2024.
11. Reiter A et al. Efficacy and safety of avapritinib in previously treated patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood Adv*. 2022 Nov 8;6(21):5750-5762.
12. Gotlib J et al. Efficacy and safety of avapritinib in advanced systemic mastocytosis: interim analysis of the phase 2 PADFINDER trial. *Nat Med*. 2021;27:2192-2199.
13. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K, Hermine O, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016 Jun 30;374(26):2530-41.
14. Shomali W, Gotlib J. Response Criteria in Advanced Systemic Mastocytosis: Evolution in the Era of KIT Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 15;22(6):2983.
15. Lim KH et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009 Jun 4;113(23):5727-36.

Luspatercept u liječenju anemije u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom niskog rizika

Inga Mandac Smoljanović

Zavod za hematologiju KB Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Mijelodisplastični sindrom (MDS) je heterogena skupina mijeloidnih neoplazmi karakterizirana neučinkovitom hematopoezom koja dovodi do citopenije periferne krvi i povećanog rizika za progresiju u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML). MDS je jedan od najčešćih uzroka anemije u starijih osoba, a većina bolesnika postaje ovisna o transfuziji eritrocita tijekom bolesti.

Anemija i transfuzijska ovisnost pogoršavaju komorbiditete i koreliraju s kraćim preživljavanjem i smanjenom kvalitetom života. S obzirom da liječenje MDS-a ovisi o dinamičnom kliničkom tijeku same bolesti, dugoročni ishodi su često teško predvidljivi.

Prognostički parametri i stratifikacija bolesnika prema prognostičkim indeksima korisni su za izbor optimalnog pristupa liječenju, međutim i među njima postoje razlike pa smo i međunarodne prognostičke sustave bodovanja unaprijedili i individualizirali.

Današnji pristup liječenju MDS-a niskog rizika nema samo za cilj poboljšanje citopenija, nego i produljenje preživljenja, pazeći na očuvanje kvalitete života.

Najveći dio bolesnika s MDS-om niskog rizika prezentira se anemijom koja je do unazad nekoliko godina najčešće bila liječena transfuzijama eritrocita. Razina hemoglobina nije dovoljna kao jedina determinanta potrebe za transfuzijom; umjesto toga, personalizirani pristup koji uz razinu hemoglobina uključuje kliničke simptome, čimbenike kardiovaskularnog rizika i komorbiditete, važniji su parametri u odluci o početku liječenja simptomatske anemije.

Ukoliko pacijent s MDS-om niskog rizika ima dominantno simptomatsku anemiju, bez delecije 5q, uz razinu eritropoetina manju od 500, može mu se ponuditi jedna od tri mogućnosti liječenja:

1. eritropoetin (EPO)
2. luspatercept
3. transfuzija eritrocita.

Danas u 2025. većina hematologa će zauzeti stav da je transfuzijsko liječenje takvog pacijenta poraz. Prema našim smjernicama za liječenje MDS iz 2022. luspatercept je indiciran u liječenju MDS-a bolesnika vrlo niskog, niskog i intermedijarnog ri-

zika po R-IPSS, s prstenastim sideroblastima, a koji nisu kandidati ili su izgubili odgovor na EPO.

U dosadašnjim studijama, luspatercept je pokazao učinak kod 38% do 63% bolesnika s MDS-om koji su zadržali neovisnost o transfuzijama eritrocita kroz najmanje 8 tjedana. Najbolji odgovor dokazan je u grupi MDS bolesnika sa prstenastim sideroblastima ili SF3B1 mutacijom. Djelotvornost i sigurnost luspatercepta procijenjene su u multicentričnom, randomiziranom, dvostruko slijepom, placebo kontroliranom ispitivanju faze 3, MEDALIST studiji, u odraslih bolesnika s anemijom koja zahtijeva transfuziju eritrocita (≥ 2 jedinice/8 tjedana) zbog MDS-a vrlo niskog, niskog ili srednjeg rizika prema revidiranom međunarodnom prognostičkom sustavu bodovanja (R-IPSS) i koji imaju prstenaste sideroblaste ($\geq 15\%$). Uključeni su bolesnici koji su prethodno liječeni lijekom koji stimulira eritropoezu s neadekvatnim odgovorom ili koji nisu ispunjavali uvjete za liječenje lijekom koji stimulira eritropoezu ili su netolerantni na liječenje lijekom koji stimulira eritropoezu. Bolesnici s MDS-om s delecijom 5q (del5q) bili su isključeni iz ispitivanja. Bolesnici su liječeni u obje skupine tijekom 24 tjedna, a zatim su nastavili liječenje ako su pokazali kliničku korist i odsutnost progresije bolesti. Ukupno je 229 bolesnika bilo randomizirano za primanje luspatercepta 1,0 mg/kg (n=153) ili placebo (n=76) podkožno svaka 3 tjedna. Osnovne karakteristike bolesnika bile su uravnotežene unutar obje grupe. Prosječna dob bolesnika je bila 71 godina (raspon: 26 do 95 godina), a 63% bolesnika su bili muškarci. Prema R-IPSS-u, 10%, 72% i 17% bolesnika svrstan je u vrlo niski, niski i srednji rizik. Nakon 24 mjeseca analiziran je odgovor na liječenje kod 128 bolesnika (83,7%) liječenih luspaterceptom i 68 (89,5 %) bolesnika liječenih placeboom. Potom je 78 (51 %) i 12 (15,8 %) bolesnika koji su primali luspatercept odnosno placebo dovršilo 48 tjedana liječenja. Rezultati su pokazali da nije bila potrebna transfuzija eritrocita unutar 8 tjedana ili dulje u 38% bolesnika u luspatercept grupi, odnosno u 13% bolesnika u placebo grupi (p<0.001). Svim je bolesnicima bila dopuštena najbolja potporna skrb, što je uključivalo transfuzi-

ju eritrocita, kelatore željeza, antimikrobnu terapiju, nutritivnu potporu. Učinak liječenja u korist luspatercepta u odnosu na placebo zabilježen je u većini podskupina koje su analizirane, a uzimale su u obzir neovisnost o transfuziji ≥ 12 tjedana (od 1. tjedna do 24. tjedna), uključujući bolesnike s visokom početnom razinom endogenog eritropoetina (200 - 500 U/l) (23,3 % naspram 0 %, eksploratorna analiza). Medijan trajanja najduljeg razdoblja bez transfuzije eritrocita u bolesnika s odgovorom liječenih luspaterceptom iznosio je 30,6 tjedana. Najčešće nuspojave su bile umor (stupanj 3: 5%), proljevi (stupanj 3: 0%), astenija (stupanj 3: 4%) te mučnina (stupanj 3: 1%). Istraživači su zaključili da se lijek dobro podnosi i da se nuspojave smanjuju tijekom liječenja.

U talijanskoj studiji koja je uključivala 215 bolesnika s MDS-om vrlo niskog, niskog i intermedijarnog rizika po R-IPSS koji su postali refraktorni ili nisu bili kandidati za terapiju eritropoetinom, primijenjen je luspatercept prema protokolu u razdoblju od 1. studenog 2020. do 30. siječnja 2022. Medijan praćenja bio je 377 dana (21–534). Srednja dob pri uključivanju bila je 74 godine (31–89). Najmanje jedan komorbiditet koji je zahtijevao kontinuirano liječenje bio je prisutan u 134 (66,7%) bolesnika, a najmanje tri su bila prisutna u 43 (21,4%). Osnovno srednje opterećenje transfuzijom bilo je 7 jedinica/8 tjedana (raspon 2–22). Neovisnost o transfuziji (TI) ≥ 8 tjedana u prva 24 tjedna postignuta je u 62 (30,8%) bolesnika. Postotak bolesnika koji su zadovoljili mjeru primarnog ishoda povećao se na 39,3% kada je razdoblje promatranja uključivalo prvih 48 tjedana. Među bolesnicima koji su imali primarni odgovor ($n=79$), 23 (29,1%) imalo je višestruke TI intervale u trajanju od 8 tjedana ili duže, a 12 (15,2%) imalo je najmanje tri ili više TI intervala. Primarni odgovor postignut je u početnu razinu doze (1 mg/kg) u 33 (41,8%) ispitanika, dok su povećanja doze na 1,3 mg/kg i 1,75 mg/kg izvršena u 24,1% odnosno 34,1% bolesnika koji su primarno odgovorili. Medijan najduljeg trajanja primarnog odgovora bio je 23,9 tjedana (8–70). Eritroidni odgovor prema kriterijima IWG postignut je u 71 (35,3%) bolesnika tijekom prva 24 tjedna liječenja. Prosječno povećanje razine hemoglobina od 15 g/L ili više postignut je kod 28 (13,9%) i 44 (21,9%) bolesnika u 24, odnosno 48 tjedana liječenja.

U siječnju 2024. godine objavljena je američka studija na 253 bolesnika s MDS-om vrlo niskog, niskog i intermedijarnog rizika, a koji su najmanje 12 tjedana liječeni luspaterceptom. Oko 82,2% tih bolesnika je zahtijevalo 1 do 3 transfuzije eritrocita

unutar 8 tjedana prije početka liječenja luspaterceptom. Oko 86,6% bolesnika je liječeno sa najmanje 1 prethodnom linijom liječenja, a 12,3% je dobilo 2 do 3 linije liječenja prije luspatercepta. Najčešće se radilo o eritropoetinu. Nakon medijana od 5,7 mjeseci liječenja luspaterceptom, kod 87,4% bolesnika je postignuta neovisnost o transfuzijama, a taj status je potrajao kroz najmanje 8 tjedana.

Autori su zaključili kako je luspatercept potvrdio svoju učinkovitost i smanjio potrebu za transfuzijama čak i u skupini umjereno ovisnoj o transfuzijama eritrocita.

COMMANDS studija analizirala je bolesnike s MDS-om vrlo niskog, niskog ili srednjeg rizika, na temelju IPSS-R koji su imali manje od 5% blasta u koštanoj srži i bilo im je potrebno 2 do 6 doza filtriranih eritrocita svakih 8 tjedana prije uključivanja. Bolesnici su imali različite razine ovisnosti o transfuzijama, od manjeg do većeg transfuzijskog opterećenja. Razine EPO u serumu morale su biti manje od 500 U/L. Bolesnici s del5q su bili isključeni. Prosječna dob bolesnika bila je 74 godine, većina pacijenata imala je niskorizični MDS po IPSS-R, medijan EPO u serumu bio je 85 U/L, 79% imalo je razine EPO manje od 200 U/L, 20% imalo je razine EPO između 200 i 500 U/L, 73% pacijenata bilo je pozitivno na prstenaste sideroblaste, a 61% imalo je mutacije SF3B1. Medijan transfuzijskog opterećenja bio je 3 jedinice kroz 8 tjedana prije uključivanja, 36% pacijenata je trebalo više od 4 jedinice kroz 8 tjedana. Nakon randomiziranja 1:1, bolesnici su liječeni u prvoj skupini luspaterceptom, odnosno u drugoj skupini eritropoetinom alfa. Stopa odgovora s luspaterceptom bila je bolja od epoetina alfa, bez obzira na to jesu li bolesnici imali nisko ili visoko opterećenje transfuzijom. Bolesnici s velikim opterećenjem transfuzijom imali su izrazito nisku stopu odgovora na epoetin alfa, od samo 20%, što je bilo i niže od očekivanog. Početne razine EPO u serumu također su imale ulogu u predviđanju odgovora. I niske i visoke razine EPO dale su prednost luspaterceptu u odnosu na epoetin alfa, iako su ukupni odgovori bili bolji u bolesnika s nižim razinama EPO i manjim opterećenjem transfuzijama. Kod bolesnika s višim razinama EPO (200 do 500 U/L), stopa odgovora na epoetin alfa bila je posebno niska, samo 11%. Razine odgovora također su ispitane na temelju mutacije SF3B1 i statusa prstenastih sideroblasta. Bolesnici s SF3B1 mutacijama ili prstenastim sideroblastima dobro su reagirali na luspatercept, pokazujući značajno bolje ishode u odnosu na ESA. Za pacijente bez SF3B1 mutacija ili prstenastih si-

deroblasta, stope odgovora između luspatercepta i ESA bile su prilično slične. Kada se procjenjivalo trajanje neovisnosti o transfuziji u trajanju od najmanje 12 tjedana, luspatercept je ponovno nadmašio ESA. Medijan trajanja neovisnosti o transfuziji bio je 126 tjedana s luspaterceptom naspram 89 tjedana s ESA-om. Najčešće prijavljene nuspojave bile su umor, edemi, bol u leđima, vrtoglavica i glavobolja. Stupanj 3/4 ili ozbiljne toksičnosti bile su rijetke. Infekcije su se javljale podjednako u obje skupine, dok su proljev, mučnina i dispneja bili nešto češći kod luspatercepta. Hipertenzija, nuspojava koja se obično povezuje s lijekovima koji povećavaju eritropoezu, također je bila nešto veća s luspaterceptom. Ključni zaključci iz dugoročnih podataka o učinkovitosti luspatercepta u odnosu na ESA pokazali su kako se učinkovitost luspatercepta poboljšava s duljinom liječenja. Osim odgađanja potreba za transfuzijom, luspatercept je pokazao dosljedan porast hemoglobina, sa srednjim porastom većim od 1,5 g/dl. Početak liječenja luspaterceptom je u dozi 1 mg/kg kroz 2 doze, ali ako bolesnik zadrži ovisnost o transfuziji, doza se podiže na 1,33 mg/kg, odnosno do maksimalne 1,75 mg/kg. Dosadašnji rezultati su pokazali kako oko 70% bolesnika ima potrebu za povećanjem doze luspatercepta. Povećanje doze kod više od 60% bolesnika prati i veća neovisnost o transfuziji.

Nedavno objavljeni rezultati studije koja je uključila 331 bolesnika s MDS-om niskog rizika liječenih luspaterceptom, pokušala je dati odgovore koji su potencijalni prediktori odgovora na luspatercept. U skupini nije bilo statistički značajne razlike u stopi odgovora kod pacijenata s mutacijom SF3B1 u usporedbi s onima s divljim tipom. Nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na žarišta mutacije SF3B1 (K700E naspram ostalih) niti kada je medijan VAF procijenjen stratifikacijom <38% VAF naspram ≥38% VAF. Podjela slučajeva SF3B1-mutacije u tri različite skupine, prema IPSS-M i WHO 2022, otkrila je različitu stopu hematološkog odgovora. SF3B1 β (SF3B1 i bilo koji gen iz BCOR, BCORL1, NRAS, RUNX1, SRSF2 ili STAG2) i SF3B1 α (mutacija SF3B1 sama ili s bilo kojom drugom mutacijom različitom od prethodne skupine) pokazale su superiorne stope poboljšanja eritroidnog statusa u usporedbi sa SF3B1 5q (istodobna prisutnost mutacije i izoliranog del5q). U podskupini MDS non-RS, jedan bolesnik s dijagnozom MDS-MLD postigao je transfuzijsku neovisnost, iako to nije bilo popraćeno povećanjem razine Hb veće od 1,5 g/dL. Prilikom razmatranja mutacijskog obrasca bolesnika s LR-MDS, niski skor prema IPSS-M korelirao je s od-

govorom. U ovdje analiziranoj kohorti LR-MDS-a, ni prisutnost specifične mutacije SF3B1 ni njen VAF nisu korelirali s odgovorom. Stratifikacija bolesnika na temelju podskupina ko-mutacija, pokazala je poboljšanu dinamiku odgovora u SF3B1 α skupini, što sugerira da obrazac ko-mutacije može utjecati na odgovor na liječenje, osim što ima prognostički značaj. Pacijenti u podskupini SF3B1 del5q pokazali su slab odgovor na luspatercept kao i oni s većim mutacijskim opterećenjem što je i očekivano. Istraživači su uočili i kako je bolji odgovor postignut u skupini bolesnika s hipercelularnom koštanom srži, u odnosu na one s hipo/normocelularnom koštanom srži.

A ako bolesniku počnemo primjenjivati luspatercept i prije nego se približi kriterijima za transfuzijsko liječenje? Rezultati COMMANds studije pokazali su najbolji odgovor kod bolesnika s niskom razinom eritropoetina i niskim transfuzijskim opterećenjem. Stoga ELEMENT-MDS uključuje bolesnike s MDS-om vrlo niskog, niskog i srednjeg rizika prema R-IPSS koji nisu ovisni o transfuziji niti su liječeni ESA. Dodatni ključni kriteriji zahtijevaju bolesnike s manje od 1% blasta u perifernoj krvi i manje od 5% blasta u koštanoj srži, uz početnu razinu eritropoetina ispod 500 U/L, i razinu Hb <95 g/L. Planira se uključiti 360 bolesnika koji ispunjavaju uvjete, a koji će biti nasumično raspoređeni u omjeru 1:1 za liječenje luspaterceptom jednom svaka 3 tjedna u početnoj dozi od 1,0 mg/kg, s povećanjem doze do 1,75 mg/kg, ili epoetina alfa jednom tjedno u početnoj dozi od 450 IU/kg, s povećanjem doze do 1050 IU/kg. Primarni cilj je detektirati udio bolesnika koji postanu ovisni o transfuziji, definirano kao potreba za najmanje 3 jedinice eritrocita svakih 16 tjedana, tijekom bilo kojeg kontinuiranog 16-tjednog intervala od 1. do 96. tjedna. Ključni sekundarni cilj je kod dijela bolesnika postići porast hemoglobina od najmanje 1,5 g/dL koji se održava najmanje 16 tjedana tijekom 1. do 48. tjedna. Ostali sekundarni ciljevi uključuju vrijeme do ovisnosti o transfuziji eritrocita, preživljavanje bez transfuzije, vrijeme do postizanja modificiranog hematološkog poboljšanja - eritroidnog odgovora, neovisnost o transfuziji od najmanje 24 tjedna, vrijeme do progresije AML-a, kvaliteta života. Bolesnici moraju imati simptomatsku anemiju koju su istraživači definirali postojanjem barem jednog od četiri simptoma: umor, vrtoglavica, slabost, kratkoća daha. Kako su navedene tegobe subjektivne, postavljena je razina hemoglobina do najviše 9,5 g/L kao objektivan parametar.

Dosadašnja pozitivna klinička iskustva s luspaterceptom u MDS niskog rizika dovela su do istraživanja u ostalim hematološkim entitetima pa se tako danas provode istraživanja u kojima se luspatercept primjenjuje u liječenju anemije u mijelofibrozi, nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica.

Neučinkovita eritropoeza je dio patofiziološke slagalice brojnih poremećaja, pa tako i nehematoloških malignih bolesti. Vrijeme će pokazati gdje će još luspatercept pronaći svoju terapijsku nišu.

Literatura

- Kaphan E, Laurin D, Lafeuillade B, Drillat P, Park S. Impact of transfusion on survival in patients with myelodysplastic syndromes: Current knowledge, new insights and transfusion clinical practice. *Blood Rev.* 2020 May;41:100649.
- Mandac Smoljanović I, Mitrović Z, Rončević P, Galušić D, Valković T, Zatezalo V i dr. Pavle Rončević, Davor Galušić, Toni Valković, Viktor Zatezalo, V. Preporuke za liječenje mijelodisplastičnog sindroma Radne skupine za mijelodisplastični sindrom. KROHEM, svibanj 2022. <https://www.krohem.hr/mijelodisplastichni-sindrom-mds/>
- Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, Garcia-Manero G, Buckstein R, Santini V, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med.* 2020 Jan 9;382(2):140-151.
- Fenaux P, Haase D, Santini V, Sanz GF, Platzbecker U, Mey U; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol.* 2021 Feb;32(2):142-156.
- Germing U, Fenaux P, Platzbecker U, Buckstein R, Santini V, Díez-Campelo M et al. Improved benefit of continuing luspatercept therapy: sub-analysis of patients with lower-risk MDS in the MEDALIST study. *Ann Hematol.* 2023 Feb;102(2):311-321. doi: 10.1007/s00277-022-05071-8.
- Oliva EN, Huey K, Deshpande S, Turner M, Chitnis M, Schiller E, et al. A Systematic Literature Review of the Relationship between Serum Ferritin and Outcomes in Myelodysplastic Syndromes. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 895. <https://doi.org/10.3390/jcm11030895>
- Platzbecker U, Götze KS, Kiewe P, Germing U, Mayer K, Radsak M, et al. Long-Term Efficacy and Safety of Luspatercept for Anemia Treatment in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes: The Phase II PACE-MDS Study. *J Clin Oncol.* 2022 Aug 23;JCO2102476.
- Zeidan AM, Platzbecker U, Garcia-Manero G, Sekeres MA, Fenaux P, DeZern AE, et al. MDS-261 Systematic Literature Review (SLR) to Identify the Burden of Illness and Treatment Effectiveness in ESA-Refractory or Relapsed, Transfusion-Dependent, Low-Risk MDS. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2022 Oct;22 Suppl 2:S308.
- Bazinet A, Bravo GM. New Approaches to Myelodysplastic Syndrome Treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 2022 May;23(5):668-687. doi: 10.1007/s11864-022-00965-1. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35320468.
- Komrokji RS, Aguirre LE, Al-Ali N, et al. Activity of luspatercept and ESAs combination for treatment of anemia in lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* Published online April 14, 2023. doi:10.1182/bloodadvances.2023009781
- Lanino L, Restuccia F, Perego A, Ubezio M, Fattizzo B, Riva M. et al. Fondazione Italiana Sindromi Mielodisplastiche (FISiM) Clinical network (<https://www.fisimematologia.it/>). Real-world efficacy and safety of luspatercept and predictive factors of response in patients with lower risk myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Am J Hematol.* 2023 Aug;98(8):E204-E208. doi: 10.1002/ajh.26960. Epub 2023 May 24. PMID: 37222267.
- Garcia-Manero G, Platzbecker U, Santini V, et al. Efficacy and safety results from the COMMANDS trial: A phase 3 study evaluating luspatercept vs epoetin alfa in erythropoiesis-stimulating agent (ESA)-naïve transfusiondependent (TD) patients (pts) with lower-risk myelodysplastic syndromes (LR-MDS). Abstract 7003. Presented at the 2023 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting; June 2, 2023; Chicago, Illinois.
- Platzbecker U, Götze KS, Kiewe P, et al. Long-term efficacy and safety of luspatercept for anemia treatment in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: The phase II PACE-MDS Study. *J Clin Oncol.* 2022;40(33):3800-3807.
- Garcia-Manero G, Platzbecker U, Santini V, et al. Efficacy and safety of luspatercept versus epoetin alfa in erythropoiesis-stimulating agent (ESA)-naïve patients with transfusion-dependent lower-risk myelodysplastic syndromes: full analysis of the COMMANDS trial. Presented at: 65th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA: December 9-12, 2023; Abstr 193. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-178596>
- Jouzier C, Cherait A, Cony-Makhoul P, Hamel JF, Veloso M, Thepot S, et al. Red blood cell transfusion burden in myelodysplastic syndromes (MDS) with ring Sideroblasts (RS): A retrospective multicenter study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). *Transfusion.* 2022 May;62(5):961-973. doi: 10.1111/trf.16884. Epub 2022 Apr 22.
- Griffiths EA. Transfusion avoidance in myelodysplastic neoplasms. *Curr Opin Hematol.* 2024 Mar 1;31(2):40-46. doi: 10.1097/MOH.0000000000000794. Epub 2023 Nov 16.
- Zeidan AM, Komrokji RS, Buckstein R, et al. The ELEMENT-MDS trial: a phase 3 randomized study evaluating luspatercept versus epoetin alfa in erythropoiesis-stimulating agent-naïve, non-transfusion-dependent, lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2023;142(suppl 1):6503. doi:10.1182/blood-2023-178635
- Mukherjee S, Brown-Bickerstaff C, Falkenstein A, Makinde AY, Bland E, Laney J, et al. Treatment patterns and outcomes with luspatercept in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: A retrospective US cohort analysis. *Hemasphere.* 2024 Jan 30;8(1):e38.
- Consagra A, Lanino L, Al Ali NH, Aguirre L, Xie Z, Chan O, Andreossi G, et al. Response to luspatercept can be predicted and improves overall survival in the real-life treatment of LR-MDS. *Hemasphere.* 2025 Feb 12;9(2):e70086. doi: 10.1002/hem3.70086.
- Andritsos LA, McBride A, Tang D, Barghout V, Zanardo E, Song R, et al. Real-world impact of luspatercept on red blood cell transfusions among patients with myelodysplastic syndromes: A United States healthcare claims database study. *Leuk Res.* 2025 Jan;148:107624. doi: 10.1016/j.leukres.2024.107624.

Anemija srpolikih stanica

David Zima, Lucija Mucavac, Sara Dejanović Bekić, Ernest Bilić

Zavod za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju

Klinika za pedijatriju KBC Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Anemija srpolikih stanica ili srpasta anemija jedna je od najčešćih nasljednih hemoglobinopatija u svijetu, ali kako se javlja u pripadnika crne rase ili u Arapskoj populaciji, u našim je krajevima bila vrlo rijetka pojava. Zbog globalnih migracija stanovništva zadnjih godina i u Hrvatskoj imamo pojavu djece i odraslih oboljelih od ove anemije.

Bolest je obilježena stvaranjem abnormalnog hemoglobina (HbS) i posljedičnim gubitkom bikonkavnog oblika eritrocita i pretvorbom eritrocita u oblik srpa ili polumjeseca.

Bolest je uzrokovana točkastom mutacijom (A→T) u šestom kodonu gena za β -globin na kromosomu 11p15.5, pri čemu dolazi do zamjene GTG u GAG i zamjene hidrofilne glutaminske kiseline (Glu) s hidrofobim valinom (Val), što dovodi do stvaranja mutiranog hemoglobinskog tetramera HbS ($\alpha_2\beta^2$) (1,2). Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno i za razvoj bolesti potrebne su mutacije oba alela gena koji kodira β -globin (3).

Bolest srpastih stanica (*engl. sickle cell disease*) širi je entitet, koji osim homozigotnih bolesnika (HbSS), uključuje i složene heterozigote s jednim alelom β -globina s mutacijom srpastih stanica (β^S) i drugim alelom β -globina s nekom drugom mutacijom - β^C (HbSC), β^D (HbSD), β -talasemija alel (HbS β^+ -talasemija ili HbS β^0 -talasemija), $\beta^{O/Arab}$ (HbSO/Arab) (3). Najzastupljeniji i najteži oblik bolesti je homozigotni (HbSS), koji čini 60-70% oboljelih (4). Heterozigotnost, koja uključuje samo jedan mutirani alel (HbAS), obično je benigne naravi, iako rijetko i u heterozigota može doći do stvaranja srpastih eritrocita, ali samo pri izlaganju vrlo niskim razinama kisika (5).

Epidemiologija

Iako ne postoje pouzdani podaci o globalnoj incidenciji i prevalenciji, procjenjuje se da trenutno u svijetu od srpaste anemije boluje više od 3 milijuna ljudi (6). Svake se godine rodi oko 300.000 novih bolesnika (3,4,7), a prema projekcijama taj bi broj do 2050. godine mogao porasti na gotovo 400.000 godišnje (8). Bolest najčešće pogađa crnu rasu, a najveća je prevalencija u subsaharskoj Africi, Indiji,

Bliskom istoku i Mediteranu pri čemu se najviše novooboljelih rađa u tri države - Nigeriji, Demokrat-skoj Republici Kongo i Indiji (8,9).

Srpasta anemija globalni je javnozdravstveni problem. Bolesnici imaju brojne morbiditete i u prosjeku žive kraće. Medijan očekivanog trajanja života u razvijenim je zemljama 43 godine (IQR 31,5–55 god.) (9). U nerazvijenim je zemljama situacija je još i teža, liječenje je rijetko dostupno, a velika većina djece u svijetu još uvijek umire prije 5. godine života (10).

Odavno je primijećeno da je prevalencija srpaste anemije najveća u područjima s velikom učestalošću malarije. Još je 1949. godine postavljena "hipoteza o malariji" koja pokušava objasniti geografsku distribuciju srpaste anemije, a koja pretpostavlja da HbS predstavlja oblik balansirano polimorfizma jer heterozigoti (HbAS) imaju selektivnu prednost - djelomičnu zaštitu od teškog oblika infekcije *Plasmodium falciparum* (10). Iako je ova teorija široko prihvaćena, danas se još uvijek istražuju točni mehanizmi zaštite i njihova biološka osnova (6,8).

Patofiziologija

U fiziološkim uvjetima molekule hemoglobina ne ulaze u međusobnu interakciju (3). U srpastoj anemiji abnormalni hemoglobinski tetrameri (HbS) u specifičnim nepovoljnim uvjetima (deoksigenacija, dehidracija, acidoza) ulaze u međusobnu interakciju i stvaraju krute polimere (2,3,11). Kada se stvori kritična masa - dovoljna količina HbS polimera unutar eritrocita, slijedi promjena eritrocita u srpasti oblik (12). Isprva eritrociti osciliraju između normalnog bikonkavnog i srpastog oblika, međutim, u slučaju daljnjih nepovoljnih uvjeta (deoksigenacija, dehidracija, acidoza i dr.) oni postaju trajno srpasti (5).

Brzina polimerizacije iznimno je osjetljiva na koncentraciju HbS i raste proporcionalno s HbS koncentracijom na 34.-tu potenciju, dok je istovremeno obrnuto proporcionalna koncentraciji HbF, koji zamjenjuje HbS i time sprječava polimerizaciju molekula hemoglobina (2). Sam proces stvaranja polimera nije ireverzibilan. Pluća su jedini organ koji može započeti proces depolimerizacije, a zbog toga

svako oštećenje plućne funkcije pogoduje nakupljanju HbS polimera i potiče srpastu deformaciju eritrocita (3).

Stvaranje srpastih eritrocita ključni je događaj koji potom pokreće daljnje patofiziološke procese. Najvažniji su procesi u bolesti vazookkluzija, hemoliza, hemolizom posredovana endotelna disfunkcija i kronična upala (2).

Srpasti su eritrociti rigidniji, teže prolaze kroz krvne žile, okludiraju ih i uzrokuju ishemiju i ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu tkiva (7,13).

Vazookkluzija se primarno događa na razini postkapilarnih venula (3). Vazookkluziji pridonose i povećana adhezija između krvnih stanica i endotela (3,11) te povećana aktivacija trombina, smanjene razine antikoagulanasa i oštećena fibrinoliza (7).

Srpasti eritrociti imaju kraći životni vijek i skloniji su hemolizi (3,13). Procjenjuje se da je životni vijek srpastih eritrocita 10-20 dana (1). Hemoliza se većinom odvija ekstravaskularno i posredovana je stanicama retikuloendotelnog sustava koje prepoznaju oštećene srpaste eritrocite, međutim, bitan čimbenik čini i intravaskularna hemoliza koja može činiti i do 30% ukupne hemolize (11,12). Kronična hemoliza jedna je od ključnih čimbenika razvoja kronične vaskulopatije (13) jer uzrokuje promjenu metabolizma i smanjenje dušikova oksida i smanjenu sposobnost vazodilatacije, ali i hemolizom posredovanu disfunkciju endotela (3,7,12).

Nadalje, bolest je karakterizirana stanjem kronične upale koja je posljedica više čimbenika. Osim toga što su vazookkluzija, naknadna reperfuzija tkiva i kronična hemoliza (13) proinflamatorna stanja u kojima nastaje oksidativni stres i otpuštaju se proupalni citokini (11), kronična upala rezultat je i promjena na eritrocitnoj membrani, povećanoj adhezivnosti eritrocita i leukocita, aktivaciji leukocita i dr. (3,7,11).

Dodatni dokaz da je srpasta anemija stanje kronične upale predstavlja činjenica da bolesnici imaju povišene razine neutrofila, monocita i trombocita, a također je utvrđeno da povećane koncentracije agregata neutrofila i trombocita te monocita i trombocita izravno koreliraju s težinom kliničke slike bolesti (2).

Klinička slika

Srpasta anemija pokazuje visok stupanj kliničke heterogenosti. Bolesnici se međusobno razlikuju prema učestalosti, težini i spektru simptoma, kao i po kliničkom tijeku i komplikacijama bolesti. Klinička slika rezultat je međudjelovanja genetskih, bioloških i okolišnih čimbenika (6,8). Za kliničku

sliku vjerojatno su najvažniji genetski čimbenici, pri čemu najtežu kliničku sliku imaju homozigoti (HbSS), a složeni heterozigoti imaju većinom blaži oblik bolesti. I unutar svakog genotipa srpaste anemije postoji značajna fenotipska heterogenost (8). Fenotip može biti oblikovan i drugim genetskim čimbenicima poput varijacijama i mutacijama drugih gena uključenih u regulaciju upalnih procesa, oksidativnom stresu, staničnoj adheziji i drugim procesima (6).

Rekurentni bolovi - vazookkluzivne krize

Klinička slika većinom se ne razvija prije druge polovine prve godine života zbog zaštitnog učinka više razine HbF tijekom prvih 6 mjeseci života (1). Najvažnije obilježje bolesti rekurentne su epizode boli koje nastaju zbog okluzije krvnih žila i ishemije tkiva (14). U manje djece, posebice dojenčadi, vazookkluzivne krize klinički se očituju daktilitisom (tzv. sindrom šake-stopala) (1) i nastaju kao rezultat okluzije mikrocirkulacije i upale periosta metakarpalnih i metatarzalnih kostiju (12). U kliničkoj slici dominiraju razdražljivost i simptomi regresije - dijete prestaje puzati, stajati, hodati (1). U kasnijoj dobi bolovi se većinom javljaju centralnije na rukama i nogama, ali i u leđima, rebrima, sternumu i drugdje na tijelu (7,12). Učestalost boli s godinama se povećava te oko 30-40% adolescenata i odraslih imaju gotovo svakodnevne bolne epizode (9). Početak boli može biti postupan, a trajanje od nekoliko sati do nekoliko dana (4). U većini slučajeva jasan se okidač ne može sa sigurnošću odrediti (12), iako je poznat cijeli niz okidača - stres, infekcije, febrilitet, dehidracija, acidoza, nagle vremenske promjene, hladnoća, zagađenje zraka i dr. (1). Bolne su epizode praćene subfebrilitetom ili nižim febrilitetom uz blažu leukocitozu, dok visoki febrilitet ukazuje na opsežnije oštećenje tkiva ili razvoj infekcije (12). Dijagnoza se temelji na anamnezi, s obzirom na to da ne postoji jasan laboratorijski test, a fizikalnim pregledom mogu se otkriti tek diskretni znakovi poput blažeg lokaliziranog edema, eritema ili palpatorne osjetljivosti (12).

Akutne boli mogu prijeći u kronične. Kronične boli definiraju se kao oni koji se javljaju u većini dana tijekom posljednjih šest mjeseci, a udio pedijatrijskih bolesnika s kroničnim bolima može doseći i do 40% (9). Kronične boli mogu nastati zbog senzibilizacije i sniženog praga za bol uslijed ponavljalnog izlaganja boli ili pak zbog drugih komplikacija poput avaskularne nekroze (kuk, rame) ili ulkusa (9). Bolne epizode mogu rezultirati i smrtnim isho-

dom, najčešće zbog aritmije uslijed neprepoznatog oštećenja miokarda ili plućne hipertenzije (12).

Akutni sindrom prsnog koša (*acute chest syndrome*)

Akutni sindrom prsnog koša akutna je, po život opasna, ozljeda plućnog parenhima koja nastaje zbog vazookkluzije plućnih krvnih žila (15). U 10-20% slučajeva prethodi mu bolna epizoda vazookkluzije drugdje u tijelu (12). Novija istraživanja pokazuju na to da razvoj trombocitopenije u bolesnika s vazookkluzivnom krizom mogući prediktor razvoja akutnog sindroma prsnog koša (2). Patogenetski, nakon vazookkluzije plućnih krvnih žila slijedi masivnog otpuštanja citokina, privlačenja i aktivacije upalnih stanica i prenaplašenog upalnog odgovora koji uzrokuje oštećenja alveolarno-kapilarne barijere, razvoj plućnog edema i prekid izmjene plinova (2). Klinički se prezenetira febrilitetom, kašljem, dispnejom, bolima u prsištu, bronhoopstrukcijom i hipoksijom, a na rendgenogramu je vidljiv novonastali plućni infiltrat (12). Otprilike 50% bolesnika ima barem jednu epizodu akutnog sindroma prsnog koša, a najveća je incidencija između druge i četvrtne godine života (15). U pedijatrijskih je bolesnika tijekom akutnog sindroma prsnog koša većinom lakši, dok se u odrasloj dobi javlja rjeđe, ali je tijekom teži (12). U najtežim oblicima može evoluirati u akutni respiratorni distres sindroma (*ARDS*) (2). Akutni sindrom prsnog koša najčešći je uzrok smrti u osoba sa srpastom anemijom, čineći gotovo 25% svih smrtnih slučajeva, pri čemu je smrtnost u pedijatrijskih bolesnika 1.1%, a u odraslih 4.3% (15).

Otprilike 40% slučajeva akutnog sindroma prsnog koša u pedijatrijskih bolesnika ima prepoznat uzrok, pri čemu je 40% povezano s infekcijama - najčešće virusne infekcije, infekcije *S.pneumoniae* (7) ili atipičnim uzročnicima poput *M. pneumoniae* ili *C.pneumoniae* (15). Javlja se češće kod djece koja boluju od astme (7). Drugi česti uzrok akutnog sindroma prsnog koša je začepljenje plućne mikrocirkulacije masnim embolusom ili embolusom koštane srži nakon periferne vazookkluzivne krize (2).

Anemija

Homozigotni bolesnici imaju umjerenu do tešku anemiju s prosječnim razinama hemoglobina od 6-8 g/dL (1). Složeni heterozigoti većinom imaju blažu anemiju, a među njima najdublju anemiju imaju bolesnici s genotipom HbS β^0 -talasemija kod kojih je prosječna vrijednost hemoglobina 8.5 g/dL (7). Akutni pad u crvenoj lozi, tj. pad hemoglobina za

2 g/dL, najčešće je uzrokovan aplastičnom krizom, akutnim krvarenjem, sekvestracijom u slezeni ili hemolitičkom reakcijom na transfuziju (4).

Aplastična kriza gotovo je isključivo uzrokovana infekcijom parvovirusom B-19, a zbog privremene aplazije crvene loze slijedi nagli pad hemoglobina za 3-6 g/dL (5). U perifernoj krvi retikulociti su gotovo odsutni, a broj leukocita i trombocita je u većini slučajeva nepromijenjen (7). U koštanoj srži eritropoeza je zaustavljena u stadiju normoblasta (5). Infekcija obično traje do tjedan dana, a privremena aplazija može trajati do 14 dana (7) tijekom kojih je većina bolesnika ovisna o transfuzijama eritrocita (1).

Sekvestracija u slezeni životno je ugrožavajuća komplikacija koja nastaje uslijed nakupljanja veće količine krvi u slezeni (4). Zahvaljujući boljoj identifikaciji bolesnika incidencija se smanjila s 30% na 12.6% (3). Sekvestracija može biti provocirana febrilitetom, bakterijemijom ili virusnom infekcijom (npr. parvovirus B19), a najveća je incidencija između 5. i 24. mjeseca života (7). U homozigotnih bolesnika javlja se gotovo isključivo do 4. godine života (do tada je slezena još uvijek očuvana), dok se u složenih heterozigota koji nisu skloni autosplenektomiji može dogoditi i kasnije (5). Dvije trećine bolesnika ima ponovljenu epizodu sekvestracije, i to najčešće u prvih 6 mjeseci od prethodne epizode (3). Klinički se prezentira boli u lijevom hemiabdome, distenzijom abdomena, bljedoćom i protrahiranosti (4). U krvnoj slici prisutan je pad hemoglobina za više od 2 g/dL, retikulocitoza, a često i trombocitopenija i leukopenija (5). Abruptni pad hemoglobina može uzrokovati hipovolemijski šok i smrt (7).

Sekvestracija se, osim u slezeni, može zbivati i u jetri. Hepatalna sekvestracija može se javiti kod svih genotipova (5). Klinički se prezentira hepatomegalijom i bolovima u gornjem desnom kvadrantu (4). Pad hemoglobina veći je od 2 g/dL, a aktivnosti jetrenih enzima ne moraju nužno biti povišeni (5).

Infekcije

Bolesnici s anemijom srpolikih stanica imaju veći rizik od infekcija, posebice onih bakterijskih. Najvažniji je čimbenik povećane podložnosti infekcijama funkcionalni je asplenizam uzrokovan progresivnom fibrozom (7). Autosplenektomija je u većine bolesnika prisutna do 5. godine života (3). Drugi su bitni čimbenici podložnosti infekcijama smanjena obrambena učinkovitost kronično aktiviranih neutrofila, disfunkcionalnost sustava komplementa,

disfunkcionalnost protutijela IgM i IgG razreda te narušena sposobnost opsonizacije (1). Posebno su opasne infekcije inkapsuliranim organizmima (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* tip b i *N. meningitidis*) (3). Najveći je rizik od smrti zbog infekcije u prvih pet godina života (7).

Već je ranije istaknuta povezanost akutnih respiratornih infekcija i po život opasnog akutnog sindroma prsnog koša. Osim toga, u bolesnika s ovom anemijom česta je pojava i osteomijelitisa. Osteomijelitis može biti unifokalan i multifokalan, a najčešći su uzročnici *S. aureus* i *Salmonella spp.* (5). Za razliku od opće populacije kod kojih su najčešće zahvaćene metafize dugih kostiju, u bolesnika s anemijom srpolikih stanica osteomijelitis je najčešće lokaliziran u dijafizama (3).

Moždani udar

Do 20 godine života 11% bolesnika s anemijom srpolikih stanica preboli moždani udar, a gotovo 40% ima subkliničke ishemijske promjene moždanog parenhima (9). Manifestni moždani udar obično zahvaća veće krvne žile, a nastaje zbog *in situ* okluzije oštećene žile ili embolizacije distalnog tromba (7). Klinički se prezentira parezom/plegijom, afazijom, dizatrijom, konvulzijama i drugim neurološkim ispadima (9). Subklinička moždana ishemija rezultat je progresivnog sužavanja malih krvnih žila uslijed oštećenja endotela, promjena u intimi i proliferacije fibroblasta i glatkih mišićnih stanica (7). Subkliničke ishemije uzrokuju kognitivni deficit i poremećaje ponašanja (9).

Hemoragični moždani udar većinom se javlja u odrasloj dobi, a najčešće kao posljedica rupture aneurizme nastale na podlozi kronične vaskulopatije (12).

Kako bi se identificirali bolesnici s rizikom od moždanog udara, preporučuje se jednom godišnje učiniti probir transkranijalnom Doppler sonografijom u svih bolesnika od navršene druge godine života. U slučaju patološkog nalaza, pretragu treba ponoviti unutar mjesec dana (3).

Zahvaljujući uvođenju probira transkranijalnom Doppler sonografijom i preventivne transfuzije osoba s većim rizikom od moždanog udara, incidenција je u posljednjim godinama značajno smanjena (5,12). Oko 70% neliječenih bolesnika ponovno doživi moždani udar unutar 3 godine, a ishod je nakon ponovljenog moždanog udara znatno lošiji (7).

U bolesnika sa srpastom anemijom mogu se javiti i druge neurološke komplikacije poput tranzitornih ishemijskih ataka, glavobolja, konvulzija, tromboza

venskih sinusa, posteriorne reverzibilne encefalopatije (PRES) (3).

Druge akutne komplikacije bolesti

Akutna intrahepatalna kolestaza hitna je komplikacija bolesti koja nastaje zbog opstrukcije hepatálnih sinusoida i posljedične ishemije i infarkcije hepatocita (2). Klinički se očituje boli u gornjem desnom kvadrantu, pogoršanjem žutice, hepatomegalijom, tamnim urinom i svijetlom stolicom, a laboratorijski hiperbilirubinemijom, povišenja aktivnosti alkalne fosfataze te povremeno koagulopacijom (5). Kao i kod drugih hemolitičkih anemija, u bolesnika sa srpastom anemijom česta je pojava kolelitijaze i kalkuloznogolecistisa zbog povećanog stvaranja i precipitacije bilirubina (1). Kolelitijaza se može pojaviti već u ranom djetinjstvu, od druge godine života, a više od 30% bolesnika ima kolelitijazu do 18. godine života (7).

Avaskularna nekroza čest je uzrok boli (akutne i kronične) i invalidnosti bolesnika. Najčešće je zahvaćena glava femura te kao posljedica može doći do skraćanja noge i šepanja (3). U polovine bolesnika je asimptomatska (7). Nastaje zbog začepljenja kapilara srpastim eritrocitima i to većinom u distalnom dijelu kosti gdje je kolateralna cirkulacija najslabije razvijena (5). Najvažniji faktori rizika su česte bolne vazookluzivne krize, povišen hematokrit (3) i složena heterozigotnost - HbS α -talasemija i HbS β^0 -talasemija (5).

Prijapizam se javlja u oko 35% bolesnika, najčešće u homozigota (5). Srednja dob prve epizode priapizma je između 12. i 15. godine života, a 75% ima prvu epizodu prije 20. godine (7). Prevalencija je vjerojatno i veća zbog nedovoljnog prijavljivanja. Većinom se javlja u ranim jutarnjim satima (7), a nastaje zbog produljene venske staze u kavernoznim tijelima penisa (2,3). Do 50% bolesnika koji su tijekom djetinjstva imali epizode priapizma u odrasloj dobi ima erektilnu disfunkciju (7).

Najvažnije akutne oftalmološke komplikacije su hifema, makularna ishemija, zbog okluzije trombom *a. centralis retinae*, i sindrom orbitalne kompresije (5). U odrasloj dobi, osobito u bolesnika s HbSC genotipom, česta je pojava proliferativne retinopatije koja, iako može spontano regredirati, može također rezultirati gubitkom vida (12).

Kronične komplikacije bolesti

Plućna hipertenzija

Plućna hipertenzija javlja se u 6 do 11% bolesnika (5). U odraslih je prevalencija i veća, do 30% (4).

Uzrokovana je progresivnom proliferacijom glatkih mišićnih stanica i intime te tromboze in situ, što rezultira suženjem ili obliteracijom plućnih arteriola i povećanjem plućnog vaskularnog otpora (2). Ključni su čimbenici u razvoju kronična intravaskularna hemoliza i smanjena dostupnost dušikovog oksida (9), uz mogući doprinos i ponavljanih epizoda akutnog sindroma prsnog koša i funkcionalne asplenije (12). S vremenom zbog povećanja opterećenja dolazi do insuficijencije desnog srca. Klinički se to očituje progresivnom dispnejom, a povećan je rizik od akutnog cor pulmonale ili iznenadne srčanom smrti (2). Bolesnici s plućnom hipertenzijom imaju i češće astmu, učestale bolne krize i veći rizik od smrti (4).

Osim toga, 16% djece i 8% odraslih razvija opstruktivnu, a 7% djece i 28% odraslih restriktivnu plućnu bolest, dok su poremećaji disanja tijekom spavanja, uključujući opstruktivnu apneju i noćnu hipoksiju, prisutni su kod polovine bolesnika (9).

Bubrežne komplikacije

Procjenjuje se da 20-40% bolesnika sa srpastom anemijom razvije kroničnu bubrežnu bolest (9). Hipoksija, acidoza i hiperosmolarnost bubrežnog parenhima predstavljaju idealnu okolinu za polimerizaciju HbS i srpastu pretvorbu eritrocita (5). Ponavljani ciklusi akutnih bubrežnih ozljeda rezultiraju kroničnom bubrežnom bolesti (16). Najčešće je prvi znak bubrežnog oštećenja mikroalbuminurija (30-300 mg u 24h urinu) (5). Prema jednoj je studiji mikroalbuminurija prisutna u gotovo polovine pedijatrijskih bolesnika (9), a prevalencija se s godinama povećava (16). Mikroalbuminurija je posljedica glomerulopatije i hiperfiltracije, a patofiziološki mehanizmi nastanka glomerulopatije su vaskularna kongestija, hemodinamske promjene glomerula, intravaskularna hemoliza i endotelna disfunkcija (9). Ipak, zbog glomerularne hiperfiltracije, povećane sekrecije kreatinina i niskog serumskog kreatinina, bubrežno oštećenje često ostaje neprepoznato u pedijatrijskoj populaciji (12).

Manifestacija bubrežnog oštećenja u pedijatrijskih bolesnika je i hipostenurija koja nastaje vjerojatno zbog medularne hipoperfuzije i ishemije (9). Hipostenurija uzrokuje enurezu, poliuriju, nokturiju i sklonosti dehidraciji (7). Enureza može perzistirati i do kasne adolescentne dobi (3).

Renalna papilarna nekroza, osobito česta u bolesnika s HbSC genotipom, klinički se očituje hematurijom, a nastaje zbog opstrukcije krvnih žila koje opskrbljuju vasa recta (5).

Kožni ulkusi javljaju se u oko 5-10% bolesnika (12). Rijetki su kod djece, a samo se iznimno pojavljuju prije 10. godine života (7). Najčešći su u homozigota, a manja je šansa njihovih nastanaka u bolesnika s višim hemoglobinom i visokim razinama HbF (5). Patogeneza je kompleksna i uključuje mehaničku opstrukciju visokim hematokritom, vensku insuficijenciju i bakterijske infekcije (4). Trauma i teška anemija povećavaju rizik od nastanka ulkusa (5). Obično se javljaju u područjima s manje potkožnog masnog tkiva, s tankom kožom i smanjenim protokom krvi, pri čemu je najčešće mjesto nastanka su maleoli, a rjeđe se javljaju i pretibijalno, na gornjem dijelu stopala i na Ahilovoj tetivi (4). Kronični ulkusi, osobito ako su dovoljno duboki da izlože kost, mogu uzrokovati osteomijelitis (5).

Zaostajanje u rastu djece sa srpastom anemijom multifaktorijalne je etiologije. Najvažniji su čimbenici kronična anemija, česte infekcije i rekurentne bolne epizode (14). Iako tijekom djetinjstva zaostaju i u visini i u težini u odnosu na svoje vršnjake, većina bolesnika ipak do kraja adolescencije dosegne rast u visinu, ali ne i težinu. Zaostajanje u težini vjerojatno je posljedica većih kalorijskih potreba anemičnih bolesnika zbog veće aktivnosti koštane srži i kardiovaskularne kompenzacije (7).

Dijagnostika

Dijagnostička metoda koja se smatra zlatnim standardom za postavljanje dijagnoze jest elektroforeza hemoglobina. Ova metoda koristi svojstvo da je HbS više pozitivno nabijen od HbA pa se sporije kreće na ploči gela od HbA (7). Osim što omogućuje identificiranje različitih vrsta hemoglobina na temelju njihovih električnih naboja, elektroforeza i kvantificira udjele HbS i drugih vrsta hemoglobina (HbA, HbF...) u ukupnom hemoglobinu (14). Udio je HbS u ukupnom hemoglobinu u homozigota viši, i iznosi oko i više od 90% (3), dok je udio u složenih heterozigota niži, oko 35-40% (7). Gensko testiranje služi za potvrdu dijagnoze i identificiranje specifične mutacije.

Dijagnoza se može postaviti i prenatalno, analizom mutacija DNA kordocentezom iz korionskih resica (10.-14. tjedan gestacije) ili fetalnih fibroblasta dobivenih amniocentezom (15.-20. tjedan gestacije) (7). Neinvazivne prenatalne dijagnostičke metode još su u fazi razvoja.

Programi probira

Danas su programi probira već uspostavljeni u nekim razvijenijim zemljama poput SAD-a i di-

jelova Bliskog istoka (8). U SAD-u je univerzalni program probira uveden 2007. godine (5), a srpasta anemija najčešća je bolest koja se otkriva obveznim državnim novorođenačkim programom probira s incidencijom 1:2.647 (3). Programi probira tek se počinju razvijati i u nekim slabije razvijenim zemljama s visokom prevalencijom bolesti poput Indije i nekih afričkih zemalja (8). Najčešće korištene metode za dijagnozu u novorođenčadi su izoelektrično fokusiranje i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography* - HPLC) iz sasušanih uzoraka nekoliko kapi krvi nanesenih na filter papir (Guthrijev test) (7).

Liječenje

Liječenje srpaste anemije uključuje liječenje i ublažavanje simptoma vazookluzivnih kriza i drugih akutnih komplikacija, poboljšanje kvalitete života bolesnika, prevenciju komplikacija i očuvanje funkcije organa. U liječenju akutnih vazookluzivnih kriza primjenjuju se različiti analgetici, od nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) za umjerene bolove do opioda za jače bolove (9).

Sastavni dio liječenja srpaste anemije su i transfuzije. Transfuzije eritrocita obično se primjenjuju u liječenju akutnih komplikacija bolesti u svrhu sprječavanja njihova napredovanja (aplastične krize, sekvestracija, moždani udar, akutni torakalni sindrom) (3). Kronična transfuzijska terapija koristi se u svrhu prevencije moždanog udara u bolesnika s abnormalnim nalazima transkranijalnog Doplera ili magnetne rezonance kao i za sekundarnu prevenciju moždanog udara ili epizoda akutnog torakalnog sindroma (3). Cilj je povećati oksiformnost krvi i smanjiti udio HbS, pri čemu se nastoji održati HbS ispod 30% (5). Najčešće su komplikacije kroničnih transfuzija aloimunizacija, najčešće na Kelly (26 %) te Rh antigene – E (24%) i C (16%), prekomjerno nakupljanje željeza (7).

Sva bi djeca do pete godine života trebala uzimati profilaktičku terapiju penicilinom (125 mg dva puta dnevno do 3. godine života, a potom 250 mg dva puta dnevno) (3). U bolesnika alergičnih na penicilin preporučuje se primjena eritromicin etilsukcinata u dozi 10 mg/kg dva puta dnevno (7). Nakon pete godine života ne postoje jasne smjernice. Najveći je rizik od invazivnih bakterijskih infekcija u djece mlađe od pet godina, nakon čega se taj rizik smanjuje, zbog čega mnogi kliničari prekidaju profilaktičku antibiotsku terapiju. Ipak, s obzirom na to da je učestalost infekcija i dalje viša nego u osoba s funkcionalnom slezenom, neki stručnjaci zagovara-

ju nastavak penicilinske profilakse i nakon pete godine, pa čak i tijekom cijelog života (3).

Lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti

Hidroksiureja

Unatoč tome što je prošlo četiri desetljeća od početka primjene, i gotovo tri desetljeća od objave ključnog kliničkog istraživanja o učinkovitosti hidroksiureje u liječenju srpaste anemije, hidroksiureja i dalje ostaje terapija prvog izbora za djecu i odrasle (9,17).

Hidroksiureja je antimetabolitni lijek koji je specifičan za S-fazu staničnog ciklusa i koji reverzibilno inhibira ribonukleotidnu reduktazu. Različitim mehanizmima djelovanja, hidroksiureja u eritroidnim prekursorima inducira povećanje ekspresije γ -globinskog gena, a time i stvaranje proteinskog produkta, γ -globina, koji se potom spaja s α -globinom i tvori HbF ($\alpha_2\gamma_2$) (17). HbF ometa polimerizaciju HbS jer ni HbF ni hibridni tetramer ($\alpha_2\gamma\beta S$) ne sudjeluju u formiranju polimera (12).

Cilj je liječenja postići udio HbF koji je dovoljno visok da spriječi polimerizaciju HbS. Smatra se da je udio HbF od 20% dovoljan da se spriječi većina simptoma bolesti (12). Osim toga, eritrociti s HbF su veći (veći MCV), prilagodljiviji su i lakše prolaze kroz male kapilare (18). Hidroksiureja djeluje i protuupalno te poboljšava periferni protok krvi i smanjuje broj vazookluzivnih događaja, a to ostvaruje smanjenjem broja leukocita u krvi, povećanjem razine dušikovog oksida i smanjenjem izražaja adhezivnih molekula na površini neutrofila, eritrocita i endotela (1,9,17). Hidroksiureja smanjuje učestalost vazookluzivnih kriza, akutnog sindroma prsnog koša, moždanog udara, broja dana hospitalizacije i potrebu za transfuzijama (2,12,14). Uobičajena početna doza iznosi 15–20 mg/kg/dan uz postupno povećanje doze svakih 8 tjedana za 5 mg/kg/dan sve dok se ne postigne maksimalna doza od 35 mg/kg/dan ili se ne pojave znakovi toksičnosti (3). Odgovor na terapiju očituje se kliničkim poboljšanjem i laboratorijskim odgovorom - porast HbF-a (obično 10–20%) i porast hemoglobina za 1–2 g/dL (7). Trenutne su preporuke su da svi bolesnici sa srpastom anemijom trebaju započeti liječenje hidroksiurejom u dobi od 9 mjeseci (3).

Najčešće su nuspojave o dozi ovisne neutropenija, retikulocitopenija, trombocitopenija, hiperpigmentacija noktiju/kose, anoreksija i mučnina (18). Toksičnost se očituje smanjenjem broja neutrofila $<1000/\text{mm}^3$, trombocita $<80.000/\text{mm}^3$, retikulocita $<80.000/\text{mm}^3$ ili padom hemoglobina za 2 g/dL (7).

Potrebne su redovite mjesečne kontrole krvne slike, kreatinina i aktivnosti jetrenih enzima (18). Osim većeg rizika od infekcija, postoji i rizik od aplastične krize uslijed dugotrajne mijelosupresije (19).

Već dulje vremena postoje bojazni o učincima dugotrajne primjene hidroksiureje, ponajprije o njenom utjecaju na neplodnost u muškaraca i povećanom riziku od leukemije. Novije studije ipak ne pokazuju da postoji veća učestalost malignih oboljenja, a nema ni uvjerljivih podataka o negativnom učinku na spermatogenezu u bolesnika koji su dugoročno uzimali hidroksiureju (17).

L-glutamin aminokiselina je koja se koristi u liječenju u odraslih i djece starije od 5 godina (1). Može se primjenjivati kao monoterapija ili kao dodatak hidroksiureji (20). Upotreba L-glutamina smanjuje učestalost bolnih epizoda i broj hospitalizacija (4). Točan mehanizam djelovanja zasad je nepoznat. Utvrđeno je da bolesnici sa srpastom anemijom imaju sniženu razinu ukupnog glutamata i glutamina kao i povezanost sniženog glutamata i razvoja plućne hipertenzije (12). Pretpostavlja se da L-glutamin smanjuje adheziju eritrocita na endotel (7), regenerira NO i smanjuje hemolizu eritrocita neutralizirajući radikale kisika (5). Glutamin se primjenjuje dva puta dnevno 0.3 g/kg/po dozi (20). Lijek se dobro podnosi, a najčešće su nuspojave mučnina, umor, opstipacija, bolovi u trbuhu, leđima i glavobolja (5).

Krizanlizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže za P-selektin i blokira njegovu interakciju s ligandom (9,21). Blokirajući djelovanje P-selektina smanjuje se mogućnost interakcije stanica endotela, srpastih eritrocita, trombocita i leukocita, a time i smanjuje rizik od vazookluzivne krize (5). Lijek se primjenjuje jednom mjesečno venski, u dozi 2.5-5 mg/kg i u bolesnika starijih od 16 godina (22). Nedostatak krizanlizumaba je što ne smanjuje hemolizu i nema porasta razine hemoglobina (19). Rezultati dosadašnjih istraživanja ipak su dobri, značajno je manja incidencija vazookluzivnih kriza, a teže nuspojave, osim trombocitopenije, nisu zabilježene (21).

Voxelotor je prvi odobreni alosterični modifikator HbS koji povećavajući afinitet HbS za kisikom, inhibira polimerizaciju HbS (9). Inicijalni su rezultati bili obećavajući, bolesnici su odmah po uvođenju lijeka imali značajan porast hemoglobina i smanjenje hemolize (19). Međutim, nije bilo značajnijeg smanjenja incidencije vazookluzivnih kriza ili drugih akutnih komplikacija bolesti (7). Europska agencija za lijekove (EMA) odlučila je krajem 2024. godine

obustaviti njegovo korištenje zbog najnovijih kliničkih istraživanja koja su pokazala veću smrtnost i veći broj vazookluzivnih događaja u bolesnika koji su uzimali voxelotor u usporedbi s placebom (23).

IMR-687 (tovinontrin) novi je visoko selektivan inhibitor fosfodiesteraze 9 (PDE9) koji aktivacijom NO - c-GMP puta potiče stvaranje HbF, smanjuje hemolizu i stvaranje srpastih eritrocita (24). Trenutno je još u istraživanjima, a prve studije pokazuju značajno smanjenje incidencije vazookluzivnih događaja, smanjenje broja hospitalizacija i produljenje vremena do prvog značajnijeg događaja (25).

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (HSCT) terapija je koja može trajno izliječiti bolest. Iako standardno liječenje, hidroksiurejom i drugim lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti, ima manje nuspojave, ono ne omogućuje trajno izličenje, a bolesnici su opterećeni brojnim morbiditetima i imaju kraće očekivano trajanje života. S druge strane, nakon transplantacije, bolesnici su trajno izliječeni i više nemaju epizode akutnih vazookluzivnih kriza, akutne sindrome prsnog koša, moždane udare i druge komplikacije bolesti. Osim toga, u većine bolesnika slijedi i poboljšanje kroničnih komplikacija bolesti, primjerice cerebralne vaskulopatije (26). Ipak, transplantacija nosi i veće rizike - mogućnost smrtnog ishoda, razvoja teškog GVHD-a, infekcije, transplantacijom uzrokovano oštećenje organa i dr. (27).

Prva zabilježena HSCT u bolesnika sa srpastom anemijom izvedena je 1984. godine kada je 8-godišnjoj djevojčici afroameričkog podrijetla sa srpastom anemijom učinjena alogena HSCT HLA-podudarnog brata zbog akutne mijeloične leukemije (28). Iako je djevojčica razvila teški akutni i kronični GVHD, prema zadnjim je poznatim podacima deset godina nakon transplantacije klinički ishod bio povoljan (28).

Obzirom na sve rizike, prvenstveno imunološke komplikacije, primjena HSCT većinom je ograničena na mlađe bolesnike s još očuvanom funkcijom organa, ali velikim rizikom od akutnih, po život opasnih komplikacija bolesti (26,29). Najbolji rezultati postižu se transplantacijom od srodnog HLA-podudarnog donora (3). Najteže su komplikacije smrt, odbacivanje presatka i GVHD. Prema podacima Europskog udruženja za transplantaciju koštane srži (EBMT) na 1000 učinjenih HSCT od srodnog HLA-podudarnog donora između 1986. i 2013. ukupno je petogodišnje preživljenje bilo 92.9% (26). Rizik od

odbacivanja presatka znatno je manji prilikom primjene mijeloablativnog kondicioniranja (7–11%) u usporedbi s nemijeloablativnim kondicioniranjem, kod kojeg taj rizik može doseći i do 50% (5). Akutni GVHD II-IV. stupnja razvije se u oko 16% bolesnika (30). Provedeno je više istraživanja u kojima je bilo korišteno kondicioniranje smanjenog intenziteta, u svrhu očuvanja fertiliteta i smanjenja toksičnosti, a rezultati su zadovoljavajući (31).

Najbolji ishodi HSCT postižu se kada se ona učini prije desete godine života, optimalno u predškolskoj dobi (29,30). Svaka dodatna godina života u trenutku transplantacije povećava rizik od terapijskog neuspjeha (odbacivanje presatka ili smrt) za 10%, rizik od razvoja akutnog GVHD-a raste za 4%, a bolesnici stariji od 16 godina u trenutku transplantacije imaju i veći rizik od razvoja kroničnog GVHD-a (30). Preporuke stoga sugeriraju da bi alogenu HSCT trebalo razmotriti što je ranije moguće u svih simptomatskih mlađih bolesnika s HLA-podudarnim srodnim donorem (26,30). Najčešće se tijekom transplantacije koristi mijeloablativno kondicioniranje s fludarabinom, treosulfanom i thiotepom (32).

Samo oko 15% bolesnika ima HLA-podudarnog srodnog donora (7). Vjerojatnost pronalaska potencijalnog nesrodnog podudarnog donora ovisi ponajprije o etničkoj i rasnoj pripadnosti pri čemu je najveća vjerojatnost pronalaska podudarnog donora bijelcima europskog podrijetla, a najniža crncima južnoameričkog ili srednjoameričkog podrijetla (26). S druge strane, gotovo svaki bolesnik ima HLA-haploidentičnog srodnika (31). Rani pokušaji transplantacije HLA-haploidentičnih donora nisu bili zadovoljavajući i stopa odbacivanja presatka bila je visoka (32). U posljednjih su godina razvijeni poboljšani protokoli kondicioniranja. Odlična je stopa preživljenja i s niskom stopom odbacivanja presatka postignuta s nemijeloablativnim kondicioniranjem s anti-timocitnim globulinom, fludarabinom, thiotepom, ciklofosfamidom, niskom dozom zračenja cijelog tijela i post-transplantacijskim ciklofosfamidom (32,33). Daljnje unapređenje haploidentične HSCT ključno je kako bi se omogućilo sigurno i učinkovito izlječenje većem broju bolesnika koji nemaju podudarnog donora.

Genska terapija

U posljednjih je nekoliko godina razvijeno nekoliko inovativnih genskih terapija za liječenje srpaste anemije. Neke od njih već su dobile odobrenje od regulatornih agencija poput FDA i EMA-e, a neke su još uvijek u različitim fazama prekliničkih i

kliničkih ispitivanja. Osnovni princip genske terapije zasniva se na prikupljanju autolognih CD34+ hematopoetskih matičnih stanica, njihovu ex vivo genetsku modifikaciju (dodavanje ili uređenje gena), kondicioniranju i reinfuziji modificiranih matičnih stanica natrag u bolesnika (7).

Casgevy (exagamglogene autotemcel, CTX001)

Casgevy genska je terapija odobrena od EMA-e i FDA za liječenje bolesnika starijih od 12 godina s teškom srpastom anemijom kod kojih je indicirana transplantacija hematopoetskih matičnih stanica, ali nemaju odgovarajućeg donora (34). Pomoću CRISPR-Cas9 tehnologije ciljano se uređuje regija gena *BCL11A* na autolognim CD34+ hematopoetskim matičnim stanicama, a potom se provede mijeloablativno kondicioniranje busulfanom prije reinfuzije modificiranih stanica (35). Ranijim je istraživanjima uočeno da smanjenje ekspresije gena *BCL11A* dovodi do porasta razine HbF (36). Prema istraživanju provedenom na 44 bolesnika dobi 12-35 godina, tijekom promatrane godine dana praćenja, 97% bolesnika nije imalo niti jednu vazookluzivnu krizu, a nijedan bolesnik nije bio hospitaliziran (35). Nisu zabilježena maligna oboljenja, a najčešće su nuspojave bile povezane s kondicioniranjem - leukopenija, febrilna neutropenija, trombocitopenija. Ostale prijavljene nuspojave bile su oštećenje jetre, mučnina, povraćanje, glavobolja, stomatitis (34). U travnju 2024. započelo je istraživanje o učinkovitosti i sigurnosti exagamglogen autotemcela u bolesnika s teškim oblikom anemije genotipa HbSC (36). Preliminarni se rezultati još očekuju.

Lyfegnia (lovotibeglogene autotemcel, BB305)

Lovotibeglogene autotemcel je genska terapija koja je 2024. godine odobrena od FDA-e za liječenje srpaste anemije. Lovotibeglogene autotemcel koristi globinski lentivirusni vektor za prijenos izmijenjenog β -globinskog gena (na 87. mjestu treonin je susplituiran glutaminom), čime nastaje HbAT87Q koji sprječava polimerizaciju i stvaranje srpastog eritrocita (36). Prije početka primjene terapije lovotibeglogene autotemcel provodi se mijeloablativno kondicioniranje (7). Prema istraživanju provedenom na bolesnicima u dobi od 12 do 50 godina, u razdoblju od 6. do 18. mjeseca nakon početka terapije, 88% bolesnika nije imalo vazookluzivnih događaja (37). Najčešće su nuspojave bile posljedica kondicioniranja - leukopenija, febrilna neutropenija, anemija, trombocitopenija te stomatitis (37). Tijekom faze 1 istraživanja u dvoje je bolesnika zabilježena AML

nakon genske terapije. Iako je u oba slučaja zaključeno da AML nije bio uzrokovan lijekom, i dalje se preporučuje doživotno praćenje bolesnika zbog mogućeg razvoja maligniteta (37,38).

Liječenje anemije srpolikih stanica postupno postaje sve uspješnije, pa je za očekivati u sljedećem destjeću i značajno bolje preživljenje sa visokom kvalitetom života oboljelih.

Literatura

1. Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K, Anie KA, et al. Sick Cell Disease-Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. *Int J Neonatal Screen*. 2019;5(2):20.
2. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sick Cell Disease. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:263-92.
3. Smith-Whitley Kim, Kwiatowski JL. Chapter 489 - Hemoglobinopathies. U: Kliegman RM, Geme JWS, Blum NJ, ur. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 21th ed. Elsevier; 2020: 2540-58.
4. Onimoe G, Rotz S. Sick cell disease: A primary care update. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(1):19-27.
5. Mangla A, Ehsan M, Agarwal N, Maruvada S. Sick Cell Anemia. [Internet]. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. [pristupljeno 10.3.2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164/>
6. Williams TN, Thein SL. Sick Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19:113-47.
7. Khandros E, Kwiatowski JL. Chapter 9 - Hemoglobinopathies. U: Fish JD, Lipton JM, Lankowsky P, ur. *Lankowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 7th ed. New York: Academic Press. 2021. 207-232.
8. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561-73.
9. Brandow AM, Liem RI. Advances in the diagnosis and treatment of sick cell disease. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):20.
10. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sick cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*. 2010;1:104.
11. Sesti-Costa R, Costa FF, Conran N. Role of Macrophages in Sick Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6333.
12. Steinberg MH. Sick cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*. 2008;8:1295-1324.
13. Connes P, Renoux C, Joly P, Nader E. Vascular pathophysiology of sick cell disease. *Presse Med*. 2023;52(4):104202.
14. Elendu C, Amaechi DC, Alakwe-Ojimba CE, Elendu TC, Elendu RC, Ayabazu CP, et al. Understanding Sick cell disease: Causes, symptoms, and treatment options. *Medicine (Baltimore)*. 2023 Sep 22;102(38):e35237.
15. Friend A, Settlemeyer TP, Girzadas D. Acute Chest Syndrome. [Internet]. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. [pristupljeno 10.3.2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441872/>
16. Williams TN, Thein SL. Sick Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018 Aug 31;19:113-147.
17. Yasara N, Premawardhana A, Mettananda S. A comprehensive review of hydroxyurea for β -haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic. *Orphanet J Rare Dis*. 2021; 16(1):114.
18. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sick cell anemia. *Expert Opin Drug Saf*. 2015;14(11):1749-58.
19. Tayyaba Rehan S, Hussain HU, Malik F, Usama RM, Tahir MJ, Asghar MS. Voxelotor versus other therapeutic options for sick cell disease: Are we still lagging behind in treating the disease?. *Health Sci Rep*. 2022;5(4):e713.
20. Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, et al. A Phase 3 Trial of l-Glutamine in Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(3):226-35.
21. Kaur K, Kennedy K, Liles D. Crizanlizumab in Sick Cell Disease. *Pain Manag*. 2023; 13(10):603-12.
22. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(5):429-39.
23. Mahase E. Sick cell drug is withdrawn over safety concerns just months after rollout. *BMJ*. 2024; 387:q2147
24. McArthur JG, Svenstrup N, Chen C, Fricot A, Carvalho C, Nguyen J, et al. A novel, highly potent and selective phosphodiesterase-9 inhibitor for the treatment of sick cell disease. *Haematologica*. 2020; 105(3):623-31.
25. Andemariam B, Mant T, Eleftheriou P, Lugthart S, Bronte-Hall L, Barroso F, et al. Treatment with IMR-687, a Highly Selective PDE9 Inhibitor, Increases HbF and Reduces VOCs in Adults with Sick Cell Disease in a Long-Term, Phase 2a, Open-Label Extension Study. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 2046.
26. Rostami T, Rad S, Rostami MR, Mirhosseini SA, Alemi H, Khavandgar N, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Sick Cell Disease: A Multidimensional Review. *Cell Transplant*. 2024 Jan-Dec;33:9636897241246351.
27. Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, Pinto Simões B, et al. Sick cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2017;129(11):1548-56.
28. Jones RJ, Kassim AA, Brodsky RA, DeBaun MR. Is allogeneic transplantation for sick cell disease still relevant in the era of gene therapy? *Blood Adv*. 2025 Feb 25;9(4):877-83.
29. Ashorobi D, Naha K, Bhatt R. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Sick Cell Disease. [Internet]. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. [pristupljeno 10.3.2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538515/>
30. Cappelli B, Volt F, Tozatto-Maio K, Scigliuolo GM, Ferster A, Dupont S, et al. Risk factors and outcomes according to age at transplantation with an HLA-identical sibling for sick cell disease. *Haematologica*. 2019;104(12):e543-e546.

31. Robinson TM, Fuchs EJ. Allogeneic stem cell transplantation for sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(6):524-29.
32. Cappelli B, Gluckman E, Corbacioglu S, Fuente J, Abboud MR. Hemoglobinopathies (Sickle Cell Disease and Thalassemia) 2024 Apr 11. U: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, et al., ur. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 8th edition. Cham (CH): Springer; 2024. Chapter 80.
33. Kassim AA, Walters MC, Eapen M, Smith M, Logan BR, Solh M, et al. Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. *NEJM Evid*. 2025;4(3):EVIDoa2400192.
34. European Medicines Agency. First gene editing therapy to treat beta thalassemia and severe sickle cell disease | European Medicines Agency [Internet]. 2023. ^[1]_[SEP]
Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-gene-editing-therapy-treat-beta-thalassemia-and-severe-sickle-cell-disease>
35. Frangoul H, Locatelli F, Sharma A, Bhatia M, Mapara M, Molinari L, et al. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2024;390(18):1649-62.
36. Barak M, Hu C, Matthews A, Fortenberry YM. Current and Future Therapeutics for Treating Patients with Sickle Cell Disease. *Cells*. 2024;13(10):848.
37. Food and Drug Administration. FDA Approves First Gene Therapies to Treat Patients with Sickle Cell Disease [Internet]. 2023. ^[1]_[SEP]
Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>
38. Leonard A, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2023;2023(1):542-547.



Dodjela godišnje nagrade Zaklade Krohema u 2024. godini

Prof. dr. sc. Damir Nemet

Upravitelj Zaklade Krohema

Godišnja nagrada Zaklade Krohema uspostavljena je prije osam godina s prvom dodjelom Nagrade 2018. godine. Do ove godine trinaest naših istaknutih kolegica i kolega primilo je Nagradu za svoj predan i samoprijegoran rad i postignute rezultate u stručnom i znanstvenom radu, unaprjeđenje hrvatske hematologije te afirmaciju hrvatske hema-

tologije u svijetu. Radi se o pojedincima koji su se istaknuli svojim postignućima, svojom disciplinom, dosljednošću u stremljenju ka zadanom cilju, svojim intelektualnim sposobnostima, inovativnošću i sposobnošću da svoju inovativnost realiziraju u stvarne rezultate. Dodjelom Nagrade zbog toga vrijedi izdvojiti takve pojedince.



Slika 1. Dobitnici Nagrade Zaklade Krohema od 2018. do 2023.

Na jesenskom sastanku Krohema u Vinkovcima 8. studenog 2024. dodijeljena je ponovno Godišnja nagrada Zaklade Krohema za najbolja postignuća u području hematologije.

Nagrada je ove godine dodijeljena u obliku plakete i diplome te novčanog iznosa od 8.000,00 EUR.

Zaklada je 26. kolovoza 2024. raspisala natječaj za dodjelu GODIŠNJE NAGRADE ZAKLADE za izvrsnost i postignuća u znanstvenom i stručnom radu u području hematologije u 2023. godini

Upravno vijeće Zaklade je imenovalo Povjerenstvo za izradu prijedloga za dodjelu Godišnje na-

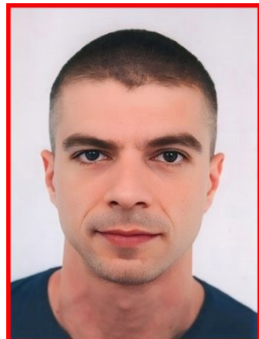
grade u sastavu: prof. dr. sc. Branimir Jakšić, prof. emeritus Boris Labar, prof. dr. sc. Damir Nemet, prof. dr. sc. Slobodanka Ostojić Kolonić i prof. dr. sc. Toni Valković.

Povjerenstvo je razmatralo dva prijedloga za Nagradu:



Ana Boban iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu za izniman stručni i znanstveni rad u području hemostaze i tromboze te za važan utjecaj u međunarodnim udrugama i afirmaciju hrvatske hematologije

Predlagač je Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb, pročelnik Zavoda prof. dr. sc. Igor Aurer.



Branimir Gizdić iz Kliničke bolnice Dubrava za značajan znanstveni i stručni rad u području dijagnostike hematoloških bolesti, posebno kronične limfocitne leukemije.

Predlagači su prof. dr. sc. Ozren Jakšić i prof. dr. sc. Vlatko Pejša iz Zavoda za hematologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Ana Boban - opis i obrazloženje prijedloga

Prof. dr. Ana Boban voditeljica je Centra za hemofiliju u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb. Osim značajnog znanstvenog i stručnog rada u Hrvatskoj iznimna je njena aktivnost u međunarodnim udruženjima i projektima. Članica je Upravnog odbora European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) koje je najveće europ-

sko društvo hematologa za nasljedne i stečene poremećaje koagulacije. Trenutno je dopredsjednica, a od slijedeće godine predsjednica EAHAD-a.

U EAHAD-u je voditeljica Radne skupine za akreditaciju centara za hemofiliju. U tom je svojstvu pokrenula projekt uvođenja novog oblika akreditacije centara za hemofiliju te je kao prvi autor publicirala smjernice za organizaciju centara za hemofiliju:

Boban A, Baghaei F, Karin F, Klamroth R, Miesbach W, Stephensen D, Kavanagh M, Noone D, Crato M, Peyvandi F; EAHAD Accreditation and Audit of Haemophilia Centres Working Group: Accreditation model of European Haemophilia Centres in the era of novel treatments and gene therapy. Haemophilia. 2023 Nov;29(6):1442-1449. doi: 10.1111/hae.14887. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37819168

Ovaj projekt je također predstavila izlaganjem na EAHAD godišnjim kongresima 2022. i 2024. godine. Prof. Ana Boban je također vrlo aktivna u Radnoj skupini za gensku terapiju EAHAD-a, koautor je znanstvenih radova iz ovog područja kao i sudionica debate na kongresu EHA u Madridu 2024. „Hemophilia: Gene therapy access for patients?“

Miesbach W, Baghaei F, Boban A, Chowdary P, Coppens M, Hart DP, Jimenez-Yuste V, Klamroth R, Makris M, Noone D, Peyvandi F. Gene therapy of hemophilia: Hub centres should be haemophilia centres: A joint publication of EAHAD and EHC. Haemophilia. 2022 May;28(3):e86-e88. doi: 10.1111/hae.14546. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35263819

Miesbach W, Boban A, Chowdary P, Coppens M, Crato M, Jimenez-Yuste V, Klamroth R, Makris M, Mulders G, Peyvandi F. Administration of gene therapy for haemophilia - The hub and spoke model and its regional differences and challenges. Haemophilia. 2024 May;30(3):855-857. doi: 10.1111/hae.14985. Epub 2024 Mar 18. PMID: 38500258

Miesbach W, Boban A, Chowdary P, Coppens M, Crato M, Jimenez-Yuste V, Klamroth R, Makris M, Mulders G, Peyvandi F. EAHAD haemophilia gene therapy clinical outcome database (EAHAD-GTD). Haemophilia. 2024 May;30(3):852-854. doi: 10.1111/hae.14981. Epub 2024 Mar 10. PMID: 38462796

Također je značajna njena aktivnost u International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), najvećoj svjetskoj udruzi za poremećaje hemostaze i tromboze, izabrana je u ISTH Council, članica je Upravnog odbora ISTH-a. Sudjelovala je u izradi smjernica za liječenje nasljedne hemofilije, projektu ISTH-a, koautor je publikacije smjernica u Journal of Thrombosis and Haemostasis:

Rezende SM, Neumann I, Angchaisuksiri P, Awo-du O, **Boban A**, Cuker A, Curtin JA, Fijnvandraat K, Gouw SC, Gualtierotti R, Makris M, Nahuelhual P, O'Connell N, Saxena R, Shima M, Wu R, Rosendaal FR. *International Society on Thrombosis and Haemostasis clinical practice guideline for treatment of congenital hemophilia A and B based on the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation methodology. J Thromb Haemost. 2024 Sep;22(9):2629-2652. doi: 10.1016/j.jtha.2024.05.026. Epub 2024 Jun 20. PMID: 39043543*

Članica je medicinske savjetodavne grupe European Haemophilia Consortium (EHC), krovnog udruženja osoba s hemofilijom Europe te članica znanstvenog odbora godišnjeg kongresa EHC-a u Zagrebu 2023. Pod pokroviteljstvom ISTH-a organizirala međunarodni sastanak „ISTH workshop on hemostatic disorders“ u Zagrebu u rujnu 2024. Ovakav sastanak je prvi puta održan u ovom dijelu Europe sa 200 sudionika iz 42 zemalja sa 6 kontinenata.

Branimir Gizdić - opis i obrazloženje prijedloga

Dr. sc. Branimir Gizdić je molekularni biolog. U zadnjih 15-ak godina aktivno sudjeluje i doprinosi u istraživanju biologije i dijagnostici KLL-a. Diplomirao je s temom Ikaros proteina u KLL-u, doktorirao s temom NOTCh-1 mutacija u KLL-u te se usavršavao u jednom od vodećih laboratorija na Sveučilištu u Torinu koji se bavi biologijom B-KLL-a. Sudjelovao je u projektima MZOS-a i HRZZ-a s temom biologije KLL-a.

Uveo je u rutinsku praksu određivanje prisutnosti mutacija TP53 gena u kroničnoj limfocitnoj leukemiji (KLL) i drugim limfoproliferacijama. Također je uveo u praksu određivanje mutacija na genima za više terapijskih meta za nove ciljne lijekove poput mutacija gena za Btk, Bcl-2 i PLCG2. Nadalje je uveo metodu koja se temelji na sekvenciranju po Sangeru, potom i na temelju sekvenciranja nove generacije (NGS) za što je dobio certifikat Education and research in CLL (ERIC). Paralelno je u rutinsku primjenu uveo određivanje minimalne ostatne bolesti također prema ERIC standardu te pokrenuo određivanje mutacija IGHV metodom NGS-a. Ova postignuća su značajno unaprijedila i upotpunila dijagnostiku B-KLL jer su postale dostupne sve molekularne pretrage važne za odluke u liječenju i praćenje bolesti. Također su ove pretrage dostupne i bolesnicima s drugim bolestima kod kojih je ta pretraga bitna (npr. TP53 kod limfoma plaštene zone). Do sada je određen TP53 mutacijski

status (uz ostale gene) za preko 200 bolesnika iz cijele RH čime je vidljiva velika i rastuća potreba za preciznim definiranjem bolesti i personaliziranim pristupom bolesniku. Ova postignuća osnova su za uvođenje osjetljivih molekularnih metoda za određivanje minimalne ostatne bolesti komplementarno s već uvedenom metodom protočne citometrije što je bitno za donošenje terapijskih odluka u korak sa suvremenim trendovima u liječenju B-KLL-u i drugih limfoproliferacija.

Zaključak povjerenstva: znanstveni i stručni doprinos kandidata, utjecaj na znanost i struku i održivost

Prvi prijedlog u velikoj mjeri i u potpunosti zadovoljava sve kriterije za dodjelu Nagrade.

Prof. dr. Ana Boban 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. Također je ostvarila izniman položaj i utjecaj u međunarodnim asocijacijama iz područja hemofilije i hemostaze i tromboze, kao potpredsjednica i buduća predsjednica EAHAD-a te u Upravnom odboru ISTH, a također je izabrana u medicinsku savjetodavnu grupu EHC-a. Svojim znanstvenim i stručnim radom te organizacijskim postignućima značajno je utjecala na unaprjeđenje skrbi o bolesnicima s poremećajima koagulacije u Hrvatskoj po najboljim svjetskim kriterijima liječenja. Ovo postignuće je važno i kao priznanje kvalitete rada Centra za hemofiliju, te dokaza da je u ovom segmentu kvaliteta hrvatske hematologije na razini najrazvijenijih europskih zemalja. Osim toga, postignuća prof. Ane Boban u međunarodnim stručnim udrugama omogućuju našim specijalizantima i specijalistima kontakt s drugim renomiranim stručnjacima i njihovim centrima, proširujući svoje znanje i mogućnost nastavka ostvarenje suradnje. Organizacijom međunarodnih skupova u Hrvatskoj s vrhunskim predavačima omogućena je vrhunska edukacija velikom broju polaznika iz Hrvatske.

U drugom prijedlogu se radi o sofisticiranoj metodi molekularne dijagnostike u relativno uskoj skupini bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (KLL).

Dr. sc. Branimir Gizdić svoj višegodišnji rad u znanstvenim projektima i usavršavanje u području biologije KLL u zemlji i inozemstvu pretočio je u uvođenje dijagnostičkih metoda za bolesnike s

KLL-om koje do tada nisu bile dostupne u RH pa su po prvi puta na raspolaganju sve relevantne dijagnostičke pretrage za ovu bolest. Time je omogućeno detaljno poznavanje karakteristika bolesti i mehanizama rezistencije, a time i informirano korištenje ciljanih lijekova, postizanje najboljih terapijskih odgovora i najveća korist za bolesnika. Metode uvedene za KLL primjenjuju se i za druge limfoproliferativne bolesti te se time značajno proširuje krug bolesnika koji imaju korist. Radom dr. Branimira Gizdića, uvođenjem i primjenom metoda molekularne dijagnostike omogućen je značajan napredak u personaliziranom pristupu bolesnicima s CLL, stratifikaciju rizika, predviđanje progresije bolesti i konačno odabir odgovarajuće terapije. Time se otva-

ra mogućnost napretka u primjeni metoda molekularne dijagnostike i drugih hematoloških bolesti, a u širem smislu podiže se kvaliteta hrvatske hematologije općenito.

Povjerenstvo je stoga zaključilo da su oba prijedloga, svaki na svoj specifičan način, vrlo vrijedan doprinos hrvatskoj hematologiji te je odlučeno da se dodijele dvije Godišnje nagrade Zaklade u ukupnom iznosu od 8.000,00 EUR rangirane kao prva i druga nagrada:

Prva nagrada u iznosu od 5.000,00 EUR prof. dr. sc. Ani Boban

Druga nagrada u iznosu od 3.000,00 EUR dr. sc. Branimiru Gizdiću



Upravitelj Zaklade prof. dr. sc. Damir Nemet s dobitnicom prve Nagrade prof. dr. sc. Anom Boban

Upravitelj Zaklade prof. dr.sc. Damir Nemet s dobitnikom druge Nagrade dr. sc. Branimirom Gizdićem

Čestitamo dobitnicima nagrade na postignućima u napretku dijagnostike i liječenja bolesnika s hematološkim bolestima i želimo im i dalje puno uspjeha.

Sekcija mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora – vizija i planovi za budućnost

Ana Zelić Kerep

Sekcija-mladih@hrdh.hr

Sekcija mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) osnovana je u lipnju 2024. godine s ciljem okupljanja specijalizanata hematologije i mladih specijalista hematologije u ranim fazama karijere. Svrha Sekcije je osiguravanje kontinuirane i kvalitetne edukacije iskrojene prema potrebama specijalizanata od prvog susreta s hematologijom do prvih koraka u ulozi specijalista hematologa. U svijetu hematologije se prati eksponencijalan rast znanja i informacija, stoga je potrebna platforma koja će omogućiti mladim hematolozima da daju svoj doprinos prijenosu znanja na način prilagođen novim generacijama. Okosnica edukativnih aktivnosti Sekcije su specijalizanti, te je do sada održano nekoliko uspješnih aktivnosti uz aktivno sudjelovanje specijalizanata i mladih specijalista, uz mentorstvo iskusnih kolega.

Jedan od glavnih ciljeva Sekcije je i facilitiranje aktivnosti Young EHA odbora, te općenito poticanje na korištenje EHA edukativnih alata, međunarodno povezivanje i poticanje na polaganje EHA ispita.

Ove godine se po prvi puta održava Sastanak mladih hematologa, od 20.-21.9.2025. u Rastokama, gdje će se obraditi teme iz benigne i maligne hematologije. Edukativni blokovi će se sastojati od prikaza slučajeva iz prakse od strane specijalizanata svih faza specijalizacije, a voditelji pojedinih blokova su perspektivni mladi specijalisti, koji će dati i teorijski uvod. Službeni poziv i program će uskoro biti dostupni.

Također, Sekcija ima i odvojenu web stranicu, koja ima i mogućnost objave sadržaja zatvorenog tipa nedostupnog javnosti, dakle uz podatke za prijavu korisničkim imenom i šifrom (<https://sekcija-mladih.hrdh.hr/>). Službena adresa elektroničke pošte je sekcija-mladih@hrdh, gdje ste svi pozvani slati ideje za buduće projekte, seminare i slično.

Aktivne potrebe Sekcije za koje se traže volonteri su priprema postupnika za hitna stanja, dijagnostiku, smjernice i slično, koji bi bili dostupni na stranicama Sekcije, te promoviranje Sekcije na društvenim mrežama.

