

Studeni 2025.

ISSN 1847-2273 (tiskana inačica)
ISSN 2584-7244 (mrežna inačica)

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem



Trideset izdanja Biltena Krohema

**Smjernice za hemofagocitnu limfohistiocitozu
Smjernice za akutnu promijelocitnu leukemiju
Nadopuna smjernica za sideropeničnu anemiju**

Volumen 17., Broj 2.

Kroh**em**

Impresum

Bilten Krohema
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem
Volumen 17., Broj 2., studeni 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:

Dražen 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 iznešenim mišljenjima.

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

Opis slika na naslovnici:

Naslovnice svih prethodnih izdanja Biltena Krohema.

Sadržaj

Igor Aurer:

Uvodnik	3
---------------	---

Dražen Pulanić:

Trideset izdanja Biltena Krohema 2009.-2025. godina	4
---	---

Marijo Vodanović, Ivo Radman, Inga Mandac Smoljanović, Zdravko Mitrović, Ante Dobričić, Duška Petranović, Iva Ivanko, Hrvoje Holik, Ivan Krečak, Renata Babok Flegarić, Martina Marjanović, Delfa Radić – Krišto, Toni Valković, Igor Aurer, Dražen Pulanić:

Druga nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje anemije uzrokovane manjkom željeza - 2025. godina	6
--	---

Ena Ranković, Nadira Duraković, Lana Desnica, Josip Knežević, Boris Karanović, Zrinko Šalek, Sara Dejanović, Inga Mandac Smoljanović, Marino Narančić, Vlatka Periša, Hrvoje Holik, Ivan Krečak, Branimir Barišić, Ana Zelić Kerep, Tamara Vasilj, Marijo Vodanović, Dražen Pulanić:

Smjernice za dijagnostiku i liječenje hemofagocitne limfohistiocitoze	12
---	----

Mirta Mikulić, Dragana Grohovac, Pavle Rončević, Ranka Serventi Seiwert:

Smjernice za liječenje akutne promijelocitne leukemije	18
--	----

Mirta Mikulić, Margareta Radić Antolic, Monika Kolundžić:

Sekvenciranje nove generacije u akutnoj mijeloičnoj leukemiji	21
---	----

Zrinka Sertić, Margareta Radić Antolic, Monika Kolundžić, Nadira Duraković:

Mutacije zametne loze i obiteljska sklonosti za razvoj hematoloških malignih bolesti u oboljelih od akutne mijeloične leukemije – studija Krohema i poziv na suradnju	25
---	----

Ivan Krečak, Marko Lucijanić, Rajko Kušec:

Stavovi hrvatskih hematologa o skrbi bolesnika s Ph-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama u Republici Hrvatskoj: rezultati Krohemove studije	28
---	----

Marija Drinovac, Željka Tkalcic Švabek, Biljana Jelić Puškarić, Inga Mandac Smoljanović, Mirjana Mariana Kardum Paro:

Mijeloproliferativna neoplazma s istovremenim prisustvom fuzijskog onkogen BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F – prikaz slučaja	29
---	----

Margareta Radić Antolic, Monika Kolundžić, Ivana Lapić, Toni Božac, Ivana Franić Šimić, Dubravka Sertić, Pavle Rončević, Dubravka Čaržavec, Dunja Rogić, Renata Zadro:

Jednostavno KML ili nije baš tako jednostavno?	33
--	----

Monika Kolundžić, Margareta Radić Antolic:

Metoda sekvenciranja nove generacije u svrhu mjerljive ostatne bolesti u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji - europske smjernice	35
---	----

Josip Knežević, Branimir Gizdić, Marija Ivić Čikara, Ozren Jakšić:

Mjerljiva ostatna bolest u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji	37
--	----

Josip Knežević, Marijana Nehutni, Jozefina Palić, Antonija Babić, Hrvoje Lalić, Monika Koulundžić, Margareta Antolic Radić, Iva Semren, Ivana Franić Šimić, Tamara Pikvača, Rea Taradi, Barbara Dreta, Sandra Bašić-Kinda: Prezentacija T-prolimfocitne leukemije s dvostruko pozitivnim CD4 ⁺ CD8 ⁺ fenotipom – prikaz slučaja	45
Snježana Dotlić, Katarina Ražnjević, Suzana Hančić, Branimir Gizdić, Slavko Gašparov: Važnost i standardizacija određivanja ekspresije Ki-67 i statusa <i>TP53</i> u dijagnostici i liječenju limfoma plaštene zone	49
Tihana Duić, Dora Dragčević, Inga Mandac Smoljanović: Novije spoznaje o klonalnoj hematopoezi neodređenog potencijala	53
Dražen Pulanić: Peti sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema na Brijunima	58
Ana Zelić Kerep: Dojmovi s prvog sastanka Sekcije mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora	59
Novi časopis <i>Blood Global Hematology</i>	60
Zbirka pjesama „Postajemo otoci“ profesora Valkovića	61

Uvodnik

Drage Krohemovke, Krohemovci i ostali čitatelji Biltena,

stigla je jesen i bliži se naš jesenski sastanak koji će, kao i proljetni, biti na jednom otoku, u Njivicama na Krku. Nemojte iz toga zaključiti da smo odustali od sastanaka u kontinentalnom dijelu Hrvatske! Upravni odbor je samo zaključio da bi na Plitvice, gdje smo planirali imati sastanak, bilo ipak ljepše ići u svibnju iduće, nego u studenom ove godine, a 2026. ćemo ionako imati samo proljetni sastanak jer će se najesen ponovno održati kongres Hrvatskog društva za hematologiju.

Ovaj jesenski sastanak organizira donekle izmijenjeni Upravni odbor. Imamo nove voditelje Radne skupine za MDS doc. dr. Ingu Mandac Smoljanović, Radne skupine za laboratorijsku hematologiju dipl. ing. Margaretu Radić Antolic, Radne skupine za KLL prof. dr. Ozrena Jakšića i Radne skupine za Ph-negativne mijeloproliferacije dr. sc. Marka Lucijanića. Uvjeran sam da će oni nastaviti, a nadam se i poboljšati sjajan rad svojih prethodnika! Osim uobičajenih dijelova programa, radnih sastanaka radnih skupina, plenarnog stručnog programa, satelitskih simpozija i društvenog programa, na ovom sastanku dodijelit će se i godišnja nagrada Zaklade Krohema za izvrsnost i postignuća u znanstvenom i stručnom radu u području hematologije. Uz to ćemo imati još jednu svečarsku aktivnost. Izaći će 30. izdanje Biltena Krohema za što je nesumnjivo najviše zaslužan njegov glavni urednik, prof. dr. Dražen Pulanić. Dragi Dražene (je li to pleonazam?), moram priznati da sam na početku sumnjao u svrsishodnost tog pothvata, ali me je uspjeh časopisa razuvjerio. Od srca ti čestitam!

Mislim da ćete se svi složiti sa mnom da je prošli sastanak na otoku Sv. Nikola kraj Poreča bio uspješan. Imali smo nekoliko vrlo zanimljivih, ponekad i žučljivih rasprava, svi smo ponešto novo naučili i ponovno mogli uživati u druženju i ljepotama Hrvatske.

Radna skupina za benigne hematološke bolesti je početkom rujna imala sastanak na Brijunima koji polako postaje tradicionalan, Krohem je pomogao organizirati godišnji sastanak Europske mreže za limfome plaštenih stanica u Zadru početkom listopada, a nekako u isto vrijeme je prof. dr. Zinaida Perić organizirala sastanak Radne skupine za komplikacije transplantacije EBMT-a u Dubrovniku.

Europsko hematološko društvo (EHA) je pokrenulo inicijativu izdavanja smjernica za liječenje hematoloških bolesti, u nadi da će uspjeti ono što ESMO-u nije polazilo za rukom, a to je da ih redovito i na vrijeme obnavlja. U HemaSphere su objavljene preporuke za liječenje B-velikostaničnih limfoma, a one za limfome plaštenih stanica su u tisku. Moja malenkost je jedan od koautora. Uskoro možemo očekivati i preporuke za folikularni limfom, Hodgkinov limfom, itd.

Što se našeg svakodnevnog rada tiče, čini mi se da nam ograničavajući čimbenik postaje nedostatak ljudi koji mogu, znaju i žele raditi! Većina bolnica u velikim gradovima muku muči s nedostatkom medicinskih sestara (i tehničara). Na natječaje za zapošljavanje spremačica i bolničara se nitko ne javlja. Manje ustanove pak ne mogu naći specijalizante, a i specijalisti im često odlaze. Bojim se da ćemo se uskoro naći u situaciji, koja već pogađa neke europske zemlje, da moramo smanjivati kapacitete jer nema tko raditi. Sumnjam da će uvoz medicinskih sestara iz Rumunjske, o čemu se nedavno pisalo u sredstvima javnog priopćavanja, riješiti ovaj problem. Neki misle da je rješenje u privatizaciji, a ja se nadam da ću, ako se to zaista i dogodi, tada biti u mirovini i da ćete se vi mlađi morati nositi s posljedicama takve politike. No, problema je uvijek bilo i nekako smo ih preživjeli i nadživjeli, a svako vrijeme ima svoje breme pa će tako valjda biti i ovaj put! Jer kako lijepo piše u Bibliji, sutra treba pustiti da se brine o sutra jer svaki dan ima dosta svoga zla.

U očekivanju skorog viđenja sve vas pozdravlja
vaš predsjednik
Prof. dr. Igor Aurer

Trideset izdanja časopisa „Bilten Krohema“ 2009.–2025.

Dražen Pulanić

Časopis „Bilten Krohema – glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem“ pokrenut je 2009. godine. Temeljni motiv za pokretanje nacionalnog hematološkog časopisa bio je praćenje novosti iz hematologije u svijetu i u Hrvatskoj, te praćenje aktivnosti Krohema.

Prvi broj „Biltena Krohema“ tiskan je u ožujku 2009., a glavni urednik tog časopisa od prvog broja pa sve do danas je Dražen Pulanić (KBC Zagreb). Od studenoga 2012. (volumen 4, broj 2, sveukupno osmi broj časopisa) formirano je Uredništvo „Biltena Krohema“ s tajnicom Uredništva Lanom Denšnicom (KBC Zagreb) i članovima Uredništva iz različitih hematoloških centara (Srđana Čulić (KBC Split), Ivan Host (KBC Rijeka), Inga Mandac Smoljanović (KB Merkur), Vlatka Periša (KBC Osijek) i Mario Piršić (KB Dubrava)).

Iduća promjena u sastavu Uredništva nastupila je u svibnju 2024. (volumen 16, broj 1) kada su članovi Uredništva postali Davor Galušić (KBC Split) umjesto Srđane Čulić, Zinaida Perić (KBC Rijeka) umjesto Ivana Hosta, te Ivan Krečak (OB Šibenik).

Časopis većinom izlazi dva puta godišnje i temama prati stručne sastanke Krohema.

U Biltenu Krohema se objavljuju novosti iz hematologije, dijagnostičko-terapijske smjernice za različite hematološke bolesti, konsenzus preporuke, pregledni radovi, prikazi bolesnika, podaci o epidemiologiji i drugim obilježjima pojedinih hematoloških bolesti u Hrvatskoj, prijedlozi i preliminarni rezultati istraživačkih projekata Krohema, pa sve do osvrtu na pojedine sastanke i druge aktivnosti Krohema, uz povremene priloge iz povijesti hrvatske hematologije. Svi brojevi „Biltena Krohema“ objavljeni su u tiskanom obliku a ujedno se nalaze besplatno dostupni i na *web* stranicama Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem.

Jedna od najvažnijih aktivnosti Krohema je izrada smjernica za dijagnostiku i liječenje brojnih hematoloških bolesti. Časopis omogućava njihovu pravovremenu objavu i ažuriranje, i do sada je objavljeno 30 nacionalnih smjernica i njihovih nadopuna u „Biltenu Krohema“ (uključujući i tri nove u ovom broju) (Slika 1.).

Slika 1. Objavljene nacionalne smjernice za dijagnostiku i liječenje hematoloških bolesti u „Biltenu Krohema“.

Bilten Krohema – objavljene nacionalne smjernice

30 publiciranih smjernica:

- ET, 5/2011
- PRV, 10/2011
- KML, 10/2011
- Mučnina i slabost, 5/2012
- KML nadopuna, 11/2012
- HLH u pedijatriji, 11/2012
- KLL, 11/2015
- KLL nadopuna, 10/2016
- MM, 5/2017
- ITP, 5/2018
- KLL nadopuna, 5/2019
- AA, 5/2020
- KLL nadopuna, 5/2020
- COVID-19 u hematologiji, 5/2020
- AML, 5/2021
- PRV nadopuna, 5/2021
- Sideropenična anemija nadopuna, 5/2021
- ITP nadopuna, 5/2021
- MM nadopuna, 11/2021
- KLL nadopuna, 5/2022
- 4th Hrvatski konsenzus o limfomima, 11/2022
- Stečeni TTP, 5/2023
- KLL nadopuna, 5/2024
- MM nadopuna, 11/2024
- MF, 11/2024
- AML nadopuna, 11/2024
- NGS, 5/2025
- Sideropenična anemija nadopuna, 11/2025
- HLH, 11/2025
- APL, 11/2025



Do sada je objavljeno 29 redovnih brojeva „Biltena Krohema“ te jedan suplement na engleskom jeziku – Abstract Book 3. simpozija o kroničnom

GvHD-u (rujan 2016.), sveukupno trideset izdanja „Biltena Krohema“ (Slika 2.).

Slika 2. Naslovnice svih brojeva „Biltena Krohema“ po godištim/volumenima.



Vrlo aktivno sudjelovanje velikog broja članova Krohema u stvaranju „Biltena Krohema“ i niz zanimljivih tekstova koji su u proteklih 17 godina objavljeni u tom časopisu najbolji su pokazatelji da

je časopis prihvaćen kao koristan pisani medij kojim se bilježe zbivanja, arhivira prošlost, opisuju nove inicijative i budući projekti u hrvatskoj hematologiji.

Druga nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje anemije uzrokovane manjkom željeza - 2025. godina

Marijo Vodanović^{1,2}, Ivo Radman¹, Inga Mandac Smoljanović^{3,4}, Zdravko Mitrović^{4,5}, Ante Dobričić⁶, Duška Petranović^{7,8}, Iva Ivanko^{9,10}, Hrvoje Holik¹¹, Ivan Krečak^{8,12,13}, Renata Babok Flegarić¹⁴, Martina Marjanović¹⁵, Delfa Radić – Krišto^{3,4}, Toni Valković^{16,17,18}, Igor Aurer^{1,4}, Dražen Pulanić^{1,4}

¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

² Zdravstveno veleučilište, Zagreb

³ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur

⁴ Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu

⁵ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Split

⁷ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka

⁸ Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci

⁹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice

¹⁰ Hrvatsko katoličko sveučilište Zagreb

¹¹ Odjel za hematologiju i onkologiju, Opća bolnica "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod

¹² Služba interne medicine, Opća bolnica Šibensko-kninske županije

¹³ Veleučilište u Šibeniku

¹⁴ Odjel za hematologiju, onkologiju, kliničku imunologiju, Opća bolnica Varaždin

¹⁵ Dnevna bolnica internističkih djelatnosti, Opća bolnica "Dr. Anđelko Višić" Bjelovar

¹⁶ Specijalna bolnica Medico, Rijeka

¹⁷ Odjel za internističku onkologiju s hematologijom, Služba za internu medicinu, Opća bolnica Pula

¹⁸ Fakultet zdravstvenih studija Sveučilište u Rijeci

Ovaj tekst dodatak je smjernicama Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora i Krohema za zbrinjavanje anemije uzrokovane manjkom željeza objavljenih u Liječničkom vjesniku 2019. godine (1) te Nadopuni smjernica za dijagnostiku i liječenje anemije uzrokovane manjkom željeza iz 2021. godine objavljenih na mrežnoj stranici Krohema i Biltenu Krohema (2).

O ovoj nadopuni i izmjeni smjernica raspravljalo se u svibnju 2025. godine na proljetnom sastanku Krohema u Poreču.

Cilj ove druge nadopune smjernica jest istaknuti promjene u novim spoznajama o metabolizmu i primjeni željeza, donijeti novosti o aktualnim peroralnim i parenteralnim pripravcima željeza dostupnim našim bolesnicima, proširenje indikacija primjene intravenskog željeza na onkološke bolesnike te zbrinjavanje nuspojava intravenskog željeza poput reakcija preosjetljivosti i hipofosfatemije.

Podsjetimo da je anemija najzastupljenija među svim dijagnozama prvih pregleda u hematološkim ordinacijama i dnevnim bolnicama (29 %) u Hrvatskoj, od čega je najčešća upravo anemija uslijed manjka željeza (76 % bolesnika) (3).

1. Definicija i dijagnoza anemije uzrokovane manjkom željeza

Općenito je prihvaćena definicija anemije Svjet-

ske zdravstvene organizacije koja anemiju određuje kao vrijednost hemoglobina (Hb) < 130 g/L za muškarce, < 120 g/L za žene i < 110 g/L za trudnice (4,5). Manjak željeza može biti apsolutni i funkcionalni (Tablica 1.) (6).

Tablica 1. Karakteristike apsolutnog i funkcionalnog manjka željeza.

Apsolutni manjak željeza	• Sniženo serumsko željezo (Fe) < 10 µmol/L i povišen UIBC i zasićenost transferina ($\text{Fe} \times 100/\text{TIBC}$) < 20% • ili nizak feritin < 50 µg/L
Funkcionalni manjak željeza	• Feritin < 100 (ili 100 – 300 *) µg/L i zasićenost transferina ($\text{Fe} \times 100/\text{TIBC}$) < 20% * Feritin može u funkcionalnom manjku željeza kod malignih bolesti i bolesnika na hemodijalizi biti do 500 µg/L

Niža vrijednost feritina < 50 µg/L govori u prilog apsolutnog manjka željeza i predstavlja indikaciju za primjenu željeza. Više vrijednosti feritina u pridruženim stanjima ili kroničnim bolestima uz zasićenost transferina (Fe/TIBC) < 20% govori u prilog funkcionalnog manjka željeza.

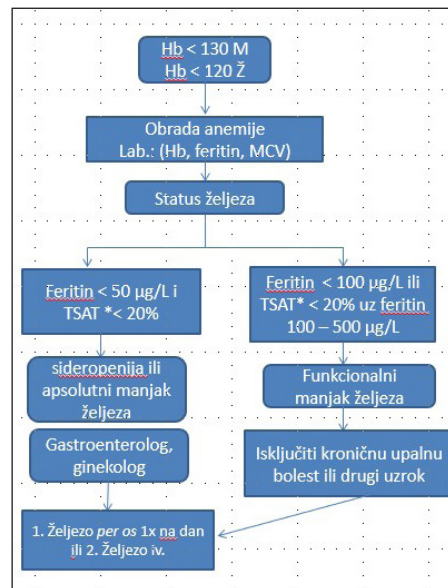
Apsolutni manjak željeza podrazumijeva sniženu razinu serumskog željeza (Fe), povišen UIBC (nezasićeni kapacitet vezanja željeza, eng. "Unsaturated Iron Binding Capacity"), sniženu zasićenost transferina (sniženi omjer Fe/TIBC , TIBC = ukupni kapacitet vezanja željeza, eng. "Total Iron Binding Capacity"), te sniženi feritin. Najosjetljiviji i najpouzdaniji test za detekciju nedostatka željeza i zaliha

željeza u tijelu jest feritin. Prema ranijim smjernicama dijagnostički pokazatelj apsolutnog manjka željeza bio je feritin $< 30 \mu\text{g/L}$, dok je prema zadnjim multicentričnim istraživanjima vrijednost feritina $< 50 \mu\text{g/L}$, pokazatelj apsolutnog manjka željeza i predstavlja indicaciju za primjenu pripravaka željeza (7,8). Studije su također pokazale da se poboljšavaju simptomi anemije poput umora ukoliko je feritin $> 50 \mu\text{g/L}$ (9,10).

Funkcionalni manjak željeza javlja se zbog neadekvatne dopreme željeza u koštanu srž usprkos dostatnim rezervama (uredan ili povišen feritin) kod bolesnika s anemijom kronične bolesti (npr. reumatoidnog artritisa, sistemskog lupusa, upalne bolesti crijeva), u srčanom popuštanju, kroničnoj bubrežnoj bolesti ali i malignim bolestima. Karakterizira je nedovoljno iskorištavanje te manjak bioraspoloživog željeza. Ova anemija najčešće je normocitna (uredan MCV ali može biti i snižen), blaga je do umjerena. Feritin je uglavnom iznad $100 \mu\text{g/L}$, često $100 - 300 \mu\text{g/L}$, kod bolesnika s malignim bolestima ili na hemodijalizi $< 500 \mu\text{g/L}$, a zasićenost transferina manja je od 20% (11,12). Tablica 1. prikazuje razlike između apsolutnog i funkcionalnog manjka željeza.

Preporuka je da liječnici različitih specijalnosti na svim razinama zdravstvene zaštite postave dijagnozu sideropenične anemije i vrstu manjka željeza temeljem kompletne krvne slike (KKS, dif, Tr, Hb, MCV, Rtc) i laboratorijskih parametara prisutnosti željeza u organizmu (Fe, UIBC, TIBC, feritin). Slika 1. prikazuje dijagnostički algoritam anemije zbog apsolutnog ili funkcionalnog manjka željeza.

Slika 1. Dijagnostički algoritam anemije zbog apsolutnog ili funkcionalnog manjka željeza.



TSAT * (eng. „transferrin saturation”, zasićenost transferina (Fe / TIBC x 100%))

2. Liječenje anemije uzrokovane manjkom željeza

Cilj liječenja anemije uzrokovane manjkom željeza jest utvrditi i liječiti uzrok koji je doveo do anemije (ginekološka, gastrointestinalna ili druga krvarenja, neadekvatan unos željeza hranom...), te nadoknaditi željezo kako bi se normalizirala krvna slika (Hb, MCV), serumsko željezo, te feritin kao pokazatelj zaliha željeza u organizmu (1). Nakon dijagnosticiranja anemije uzrokovane manjkom željeza nužno je obraditi i liječiti bolesnike kod nadležnih specijalista prema etiologiji nastanka bolesti. U nadoknadi željeza se rabe peroralni i parenteralni pripravci željeza (Tablica 2.).

Tablica 2. Pripravci peroralnog i parenteralnog željeza prema listi HZZO, pristupljeno 14.10.2025.

ATK šifra	Naziv lijeka Lista lijekova	Način primjene	Zaštićeno ime	Oblik, pakiranje
B03AC01 021	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Ferinject	otop. za inj. ili inf., boč. 1x10 ml (50 mg/ml)
B03AC01 022	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Ferinject	otop. za inj. ili inf., boč. 1x20 ml (50 mg/ml)
B03AC01 023	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Xabogard	otop. za inj. ili inf., boč. 1x2 ml (50 mg/ml)
B03AC01 024	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Xabogard	otop. za inj. ili inf., boč. 1x10 ml (50 mg/ml)
B03AC01 025	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Xabogard	otop. za inj. ili inf. boč. 1x20 ml (50 mg/ml)
B03AC01 026	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Friona	otop. za inj. ili inf., boč. 1x10 ml (50 mg/ml)
B03AC01 027	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Friona	otop. za inj. ili inf., boč. 1x20 ml (50 mg/ml)
B03AC01 028	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Correctiron	otop. za inj. ili inf., boč. 1x10 ml (50 mg/ml)
B03AC01 029	željezo karboksimaltoza OL	i.v.	Correctiron	otop. za inj. ili inf., boč. 1x20 ml (50 mg/ml)
B03AC02 051	željezo III-oksidi saharat OL	i.v.	Venofer	1x100 mg
B03AC05 051	željezo III-sorbitol glukonat OL	i.v.	Ferrlecit	1x62,5 mg
B03AC06 062	željezo(III) derizomaltoza OL	i.v.	Monofer	otop. za inj./inf., amp./boč. 5x5 ml (100 mg/ml)
B03AA07 161	željezo(II) sulfat OL	O	Tardyferon	tbl. s prod. oslob. 30x80 mg
B03AA02 141	željezo II –fumarat DL	O	Heferol	caps. 30x350 mg
B03AB05 121	željezo III-hidroksi polimaltozat DL	O	Ferrum	tbl. 30x100 mg

OL – osnovna lista, DL – dopunska listaj, i.v. – intravenski, O – oralno

Peroralni pripravci željeza. Primjena peroralnih pripravaka željeza učinkovita je u većine bolesnika sa sideropeničnom anemijom, te je i dalje najčešće prva linija terapije sideropenične anemije. Ranije preporučene doze elementarnog željeza iznosile su 100 – 200 mg/dan, s dodatkom vitamina C, međutim radi ograničene apsorpcije elementarnog željeza (10 – 15 mg/dan) danas se većinom preporuča primjena peroralnog željeza jednom dnevno (14,15). Najčešće nuspojave jesu mučnina, povraćanje, konstipacija, metalni okus u ustima, tamna stolica. Razlozi neuspjeha peroralne terapije željezom jesu nuspojave, prekratko trajanje liječenja ili nesuradljivost bolesnika, ali i protahirano krvarenje, funkcionalni manjak željeza (kada je poremećena utilizacija željeza), poremećena apsorpcija probavnog trakta (na primjer, kronični atrofični gastritis, upalne bolesti crijeva, celijakija, stanje nakon opsežnih kirurških zahvata u abdomenu) (1,16,17).

Peroralna primjena željeza povisuje hepcidin što po nekim studijama otežava apsorpciju peroralnog željeza ukoliko se primjenjuje dva puta na dan. Upitna je apsorpcija druge dnevne doze željeza a može uzrokovati gastrointestinalne nuspojave. Uzimanje peroralnog željeza svaki drugi dan pomaže u podnošljivosti terapije te je također terapijska opcija u bolesnika koji slabije podnose peroralnu terapiju (12,14,15). Uzimanje vitamina C preporuča se uz trovalentne pripravke željeza jer poboljšava pretvaranje feri 3^+ u fero 2^+ topljiviji oblik. Aktualno se na osnovnoj listi lijekova HZZO-a nalazi jedan peroralni pripravak (željezo (II) sulfat tableta s produženim učinkom a 80 mg) dok su na dopunskoj listi HZZO-a dva peroralna pripravka željeza (željezo (II) fumarat kapsula a 350 mg i željezo III-hidroksi polimaltozat tableta a 100 mg). Postoje i drugi pripravci peroralnog željeza koji se ne nalaze na listi lijekova ali su dostupni i obogaćeni su vitaminom C poput željezovog sulfata ili željezovog pirofosfata, dok postoje i pripravci koji sadrže hem i ne-hem željezo.

Parenteralni pripravci željeza. Noviji visokodozni pripravci intravenskog željeza (željezova karboksimaltoza (FCM, engl. „ferric carboxymaltose“) te željezova derizomaltoza (FDI, engl. „ferric derisomaltoside“) unaprijedili su mogućnosti liječenja anemije uslijed nedostatka željeza i već se dugi niz godina u Hrvatskoj uspješno primjenjuju u hospitaliziranih bolesnika na odjelima kao i u dnevnim bolnicama različitih specijalizacija (hematologija, opća interna, gastroenterologa, nefrologija, anesteziologija, kardiologija, ginekologija...) (18).

U nekim europskim državama se uspješno primjenjuju i na razini primarne zdravstvene zaštite (poput primjerice Slovenije ili Švicarske). Za razliku od željezovog saharata ili Fe- glukonata koji su se primjenjivali tijekom 5 – 10 a ponekad i više dana, visokodozno intravensko željezo primjenjuje se jednokratno ili u maksimalno dvije primjene. Učinkovitost se postiže zahvaljujući stabilnom ugljikohidratnom nosaču, kontroliranom otpuštanju željeza i njegovim visokim iskorištavanjem u sideropeničnoj anemiji (95 – 99%) (19-21). Navedeni noviji intravenski pripravci željeza otpuštaju značajno manje slobodnih radikala, s manjom stopom reakcija preosjetljivosti u odnosu na ranije pripravke. Najčešće infuzijske reakcije na novije intravenske pripravke željeza stupnja su 0 ili 1 (22), a najčešće nuspojave su mučnina, povraćanje, svrbež kože, bolovi u mišićima, zglobovima i leđima, te hipofosfatemija. Usprkos dobrom sigurnosnom profilu, neophodno je da tijekom primjene intravenskog pripravaka željeza bude prisutno educirano medicinsko osoblje (liječnik i medicinska sestra) s potrebnom opremom za zbrinjavanje infuzijske reakcije (15,20).

Koga liječiti intravenskim željezom?

Nema jasne definicije koja je vrijednost hemoglobina granica za primjenu intravenskog željeza (smatra se $Hb < 100$ g/L kod sideropenične anemije, apsolutnog manjka željeza) ali potrebno je u obzir uzeti i težinu simptoma i znakova bolesti, te ukoliko ne dođe do željenog terapijskog učinka na peroralno željezo. Osnovne indikacije za primjenu intravenskog željeza nisu se mijenjale u odnosu na ranije smjernice.

Osnovne indikacije – apsolutni manjak željeza

1. Neučinkovitost peroralne terapije (izostanak porasta hemoglobina > 10 g/L nakon 4 tjedna).
2. Intolerancija peroralnog željeza (nepodnošljivost ili refraktornost na liječenje (stanje nakon gastrektomije, duodenalne prenosnice, infekcija s *H. pylori*, celijakija, atrofični gastritis, upalne bolesti crijeva).
3. Potreba za brzim oporavkom (npr. teški nedostatak željeza uz anemiju u 2. i 3. trimestru trudnoće, perioperativna primjena).
4. Kronična krvarenja, nasljedni i stečeni poremećaji koagulacije.
5. Zamjena za transfuzije eritrocita kod bolesnika koji ih odbijaju iz religijskih razloga (Jehovini svjedoci).

Funkcionalni manjak željeza

1. Anemija kronične bolesti (samostalno ili uz primjenu stimulatora eritropoeze (ESA)).
2. Kronična bubrežna bolest (samostalno ili uz ESA).
3. Perzistirajuća anemija u bolesnika s malignim bolestima (samostalno ili uz ESA).
4. Perioperativna anemija.
5. Nedostatak željeza s anemijom ili bez nje u bolesnika sa srčanim zatajenjem.

3. Anemija u onkoloških bolesnika

Anemija je česti problem kod bolesnika s malignom bolesti. Prisutna je kod dijagnoze ali se i pogoršava onkološkim liječenjem (kemoterapija, zračenje), utječe na kvalitetu života, psihofizički status. Manjak željeza utječe kao pridruženi najčešći uzrok ostalim uzrocima anemije u onkoloških bolesnika i pridonosi težini anemije. Na temelju rada koji je uključio meta-analizu 23 randomizirane kliničke studije (4 studije uključivale su bolesnike preoperativno, 1 studija postoperativno), 15 studija bolesnike tijekom adjuvantnog liječenja (karcinom dojke, kolona, pluća, ginekološki tumori, mijelodne neoplazme i limfomi) te 2 studije bolesnike na radioterapiji, pokazano je da intravensko željezo može popraviti koncentraciju hemoglobina i smanjiti potrebu za transfuzijama samostalno ili u primjeni sa stimula-

torima eritropoeze u bolesnika s malignim bolestima (23). Apsolutna indikacija za primjenu pripravka intravenskog željeza u onkoloških bolesnika jest vrijednost feritina $< 50 \mu\text{g/L}$, ili zasićenost transferrina (Fe/TIBC) $< 20\%$ uz serumski feritin $100 - 500 \mu\text{g/L}$ (24, 25).

4. Zbrinjavanje nuspojava intravenskog željeza

a) Reakcije preosjetljivosti

Reakcije preosjetljivosti prisutne su na sve intravenske pripreme željeza i uvijek ih je potrebno primjenjivati uz nadzor medicinskog osoblja koji su educirani za zbrinjavanje reakcija preosjetljivosti.

Željezo poput drugih nanočestica aktivira sustav komplementa i dovodi do stvaranja anafilotoksina (C5a) koji ukoliko se ne degradiraju karbopetidazom ili u stanicama, mogu aktivirati mastocite koji otpuštaju vazoaktivne medijatore i dovode do različitih simptoma (12,26). To objašnjava Fishbane reakciju ili CARPA (eng. "complement activation-reaction pseudoallergy"), dakle komplementom posredovanu pseudoalergijsku reakciju, koja najčešće dovodi do crvenila, stezanja u prsnoj koži. bolova u zglobovima, dok ne uzrokuje teže simptome, poput bronhospazma, edema larinksa ili hipotenziju (20). Tablica 3. prikazuje težinu reakcija preosjetljivosti, simptome i njihovo zbrinjavanje (prilagođeno prema Rampton 2014.) (20).

Tablica 3. Mogućnosti liječenja/zbrinjavanja reakcija preosjetljivosti na intravenske pripreme željeza

Mogućnosti liječenja/zbrinjavanja reakcija preosjetljivosti na intravenske pripreme željeza		
	Simptomi	Liječenje
Blaga reakcija preosjetljivosti	Svrbež kože, urtikarija, osjećaj vrućine, lagani pritisak u prsnoj koži, hipertenzija, bol u leđima i zglobovima	Zaustaviti infuziju privremeno Promatrati simptome i znakove. Ukoliko nestanu, nastaviti ponovno s infuzijom
Umjerena reakcija preosjetljivosti	Kao kod blage reakcije + kašalj, bol u prsnoj koži, mučnina, kratkoća daha, tahikardija, hipertenzija	Zaustaviti infuziju, primjena iv. otopina (0.9% NaCl) i i.v. kortikosteroida
Teška reakcija preosjetljivosti	Kao kod umjerene + nagli nastanak i brzo pogoršanje simptoma + "wheezing", stridor, periorbitalni edemi, cijanoza, gubitak svijesti, kardio/respiratorni arrest	Kao kod umjerene + adrenalin i.m ili i.v + β_2 agonisti inhalacija, O_2 na masku

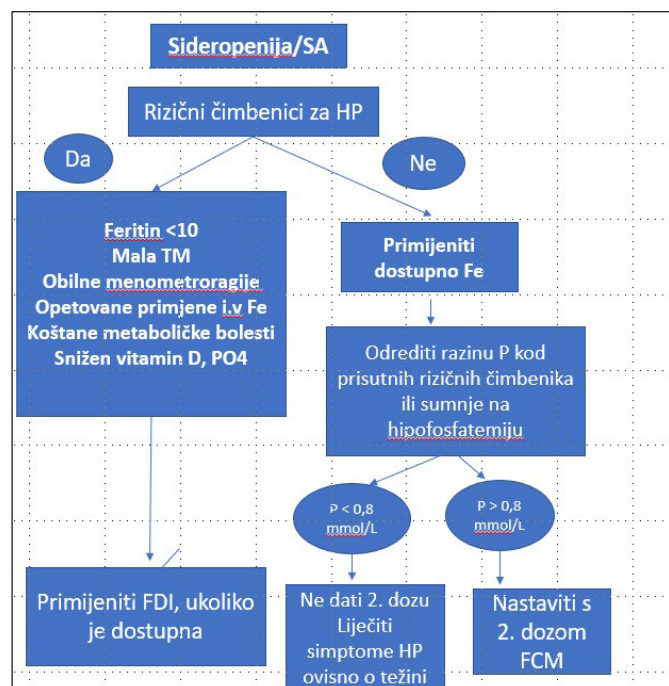
b) Hipofosfatemija

Hipofosfatemija se opisuje kao česta metabolička nuspojava kod bolesnika koji se liječe intravenskim pripravcima željeza. Najčešći su simptomi umor, bolovi u kostima, te mišićima (najčešće proksimalne skupine) ali kod opetovanih ili učestalih primjena može se pojaviti posebice kod bolesnika s rizikom od hipofosfatemije osteomalacija i respiratorna in-

suficijencija. Prema hrvatskim iskustvima simptomi su bili blaži poput umora i mišićne slabosti bez obzira na težinu hipofosfatemije (27, 28). Kod bolesnika s upalnim gastrointestinalnim bolestima (PHOSPHARE-IDA studija) prevalencija teške hipofosfatemije nakon liječenja visokim dozama željezove karboksimaltoze (FCM) iznosila je preko 30 %. Značajno viša incidencija svih stopa hipofosfate-

mije (74,4% vs 8%) u korist FCM prema željezovoj derizomaltozi (FDI) uzrokovana je jačim djelovanjem FCM na lučenje fibrocitnog faktora rasta 23 (FGF-23) iz osteoklasta i osteoblasta koji pojačava lučenje fosfata putem bubrega, smanjuje proizvodnju aktivnog vitamina D (1,25 dihidroksivitamin D) i povećava razinu PTH što može dovesti i do osteomalacije te povećati rizik od neželjenih koštanih događaja kod bolesnika s lošim metaboličkim statusom kostiju i sniženim vitaminom D (29 – 31).

Slika 2. Algoritam za zbrinjavanje hipofosfatemije (HP) kod primjene intravenskih pripravaka željeza



SA – sideropenična anemija; HP – hipofosfatemija, TM – tjelesna masa, FDI – željezova derizomaltoza; FCM – željezova karboksimaltoza

Kod odabira i.v. pripravka željeza potrebno je procijeniti rizik hipofosfatemije, a pod većim rizikom su bolesnici koji imaju snižene fosfate prije primjene i.v. željeza, npr. bolesnici s upalnim bolestima crijeva (28) ili manjak vitamina D, malu tjelesnu masu, obilne menometroragije ili metaboličku koštanu bolest te ukoliko se radi o učestalim/opetovanim infuzijama željeza. U tim situacijama je FDI intravensko željezo izbora. Ukoliko bolesnici razviju simptomatsku hipofosfatemiju potrebno je liječenje. Fosfate se preporuča kontrolirati prije 2. primjene FCM, najčešće 8. dan nakon primjene prve doze, ili kod svih bolesnika prije primjene intravenskog željeza ukoliko imaju čimbenike rizika za razvoj hipofosfatemije (32). U liječenju hipofosfatemije koriste se magistralni pripravci ili fosfatni prašci (natrijev mono- i dihidrogenfosfat) u dozi od 2 – 3x 500

mg elementarnog fosfata/dan tijekom 10 – 15 dana uz kontrolu razine fosfata.

Na privatni recept se piše nadoknada peroralnih fosfata kao magistralnog pripravka:

Ime i prezime bolesnika, datum rođenja

Dg; Hipofosfatemija E83.3, Sideropenična anemija D50.0

Rp. Fosfatni prašak

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 0,503 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 2,297 g

sadržaj elementarnog fosfata 500 mg u 2,8 g praška

S: 2 – 3 x 500 mg/dan kroz 10 – 15 dana (ovisno o težini hipofosfatemije)

Magistralni pripravci se koriste u liječenju blage simptomatske (0,64 – 0,8 mmol/L) i srednje hipofosfatemije (0,32 – 0,64 mmol/L neovisno o simptomima). U liječenju teške hipofosfatemije (< 0,32 mmol/L) koriste se intravenski 1M kalijev fosfat (monohidrat i dihidrat) u dnevnoj dozi 20 – 30 ml u 500 ml 0,9%NaCl i praćenje serumske razine fosfata (6).

Zaključak

U zaključku, ova Druga nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje sideropenične anemije donosi sljedeće novosti:

- serumski feritin <50 µg/L definira sideropeniju odnosno indicaciju za nadoknadu željeza;
- peroralno željezo se većinom daje jednom dnevno obzirom na ograničenost apsorpcije regulirane hepcidinom, ili svakih 48 sati u slučaju loše podnošljivosti peroralne terapije;
- vrijednosti feritina su više kod bolesnika s malignom bolesti te je korist od primjene intravenskog željeza kod bolesnika s malignom bolesti ukoliko je feritin < 50 µg/L ili 50 – 500 µg/L uz TSAT <20 %;
- prije odabira pripravka i.v. željeza važno je procijeniti rizik od hipofosfatemije;
- važno je prepoznati težinu reakcije preosjetljivosti i adekvatno je zbrinuti.

Literatura:

- Radman I, Vodanović M, Mandac-Rogulj I, Roganović J, Petranović D, Valković T, i sur. Smjernice Hrvatskog društva za hematologiju HLZ-a i KROHEM-a za zbrinjavanje anemije uzrokovane manjkom željeza. *Liječ Vjesn* 2019;141:1-13.
- Vodanović M, Pulanić D, Radman I, Mandac Smoljanović I, Radić – Krišto D, Petranović D, i sur. Nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje anemije uzrokovane manjkom željeza. *Bilten Krohema*, 2021;13(1):46 – 50.
- Vodanović M, Pulanić D, Krečak I, Gverić Krečak V, Holik H, Flegarić-Babok R, i sur. Rezultati presječne studije Krohem-a o prvim pregledima anemija u hematološkim ambulantama. *Liječ Vjesn* 2020, 142; suppl 3:15-16.
- World Health Organisation. Worldwide Prevalence of Anaemia. 1993-2005. WHO, 2008.
- Girelli D, Ugolini S, Busti F, Marchi G, Castagna A. Modern iron replacement therapy: clinical and pathophysiological insights. *Int J Hematol* 2018, 107:16-30.
- Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB, on behalf of the British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2011; 60:1309 – 1316..
- Cancado RD, Leite LAC, Muñoz M. Defining Global Thresholds for Serum Ferritin: A in Establishing the Iron Deficiency Diagnosis in This Era of Striving for Health Equity. *Diagnostics (Basel)* 2025, 26;15(3):289.
- Galetti V, Stoffel NU, Sieber C, Zeder C, Moretti D, Zimmermann MB. Threshold ferritin and hepcidin concentrations indicating early iron deficiency in young women based on upregulation of iron absorption. *E Clinical Medicine* 2021, 39, 101052.
- Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016; 127:2809-13.
- Dignass AU, Gasche C, Bettenworth D, Birgegård G, Danese S, Gisbert JP, i sur. European Consensus on the Diagnosis and Management of Iron Deficiency and Anaemia in Inflammatory Bowel Diseases. *J Crohn's Colitis* 2015;9(3):221 - 222.
- Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I, i sur. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol* 2013; 161:639–48.
- Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood* 2014; 123: 26 – 33.
- van Santen S, De Mast Q, Oosting JD, van Ede A, Swinkels DW, van der Ven AJ. Hematologic parameters predicting a response to oral iron therapy in chronic inflammation. *Haematologica* 2014; 99(9):171 – 173..
- Stoffel NU, Cercamondi CI, Brittenham G, Zeder C, Geurts-Moespot AJ, Swinkels DW, i sur. Iron absorption from oral iron supplements given on consecutive versus alternate days and as single morning doses versus twice-daily split dosing in iron-depleted women: two open-label, randomised controlled trials. *Lancet Haematol*. 2017, 4(11):524 – 533.
- DeLoughery TG, Jackson CS, Ko CW, Rockey DC. AGA Clinical Practice Update on Management of Iron Deficiency Anemia: Expert Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2024;22(8):1575 – 1583.
- Macdougall IC, Bock AH, Carrera F, Eckardt KU, Gaillard C, Van Wyck D, i sur. FIND-CKD: a randomized trial of intravenous ferric carboxymaltose versus oral iron in patients with chronic kidney disease and iron deficiency anemia. *Nephrol Dial Transplant* 2014, 29(11):2075–84.
- Bager P, Dahlerup JF. The health care cost of intravenous iron treatment in IBD patients depends on the economic evaluation perspective. *J Crohn Colitis* 2010; 4: 427 – 30.
- Auerbach M, Ballard H. Clinical use of intravenous iron: administration, efficacy and safety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010:338 – 347.
- Pulanić D, Barbačić B, Brinar M, Delić – Brkljačić D, Gabrić ID, Kuna K, i sur. Stručno mišljenje o parenteralnoj primjeni željeza u nehematološkoj kliničkoj praksi. *Liječ Vjesn* 2024;146:22 – 34.
- Rampton D, Folkersen J, Fishbane S, i Hedenus M, Howaldt S, Locatelli F, i sur. Hypersensitivity reactions to intravenous iron: guidance for risk minimization and management. *Haematologica* 2014; 99:1671 – 1676.
- Auerbach M, Gafter-Gvili A, Macdougall IC. Intravenous iron: a framework for changing the management of iron deficiency. *Lancet Haematol* 2020; 7: e342 – 350.
- Iolascon A, Andolfo I, Russo R, Sanchez M, Busti F, Swinkels D, i sur. Recommendations for diagnosis, treatment, and prevention of iron deficiency and iron deficiency anemia. *HemaSphere*. 2024;8:e108.
- Lim J, Auerbach M, MacLean B, Al-Sharea A, Richards T. Intravenous Iron Therapy to Treat Anemia in Oncology: A Mapping Review of Randomized Controlled Trials. *Curr Oncol*. 2023 Aug 24;30(9):7836 – 7851.
- Aapro M, Beguin Y, Bokemeyer C, Dicato M, Gascón P, Glaspy J, i sur. ESMO Guidelines Committee. Management of anaemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4): 96 – 110.
- Jeffrey A, Rodgers GM. How I treat cancer-associated anemia. *Blood*, 2020;136(7):801 – 813.
- Szebeni J, Fishbane S, Hedenus M, Howaldt S, Locatelli F, Patni S, i sur. Hypersensitivity to intravenous iron: classification, terminology, mechanisms and management. *British Journal of Pharmacology*, 2015;172:5025–5036.
- Brkić N, Vučinić Ljubičić I, Holik H, Coša B. Prolazna hipofosfatemija kao mogući neželjeni ishod liječenja sideropenične anemije željezovom karboksimaltozom - unicentrično ispitivanje. *Acta clinica Croatica* 2024, 63: 475-481.
- Kelečić D, Jelaković M, Barišić A, Brinar M, Karas I, Vranešić Bender D, i sur. Hipofosfatemija kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva nakon parenteralne nadoknade željeza: prikaz serije slučajeva. *Liječ Vjesn* 2022;144:374 – 380.
- Anand G, Schmid C. Severe hypophosphatemia after intravenous iron administration. *BMJ Case Rep*. 2017;13;2017:bcr216219160.
- Schaefer B, Tobiasch M, Wagner S, Glodny B, Tilg H, Wolf M, i sur. Hypophosphatemia after intravenous iron therapy: Comprehensive review of clinical findings and recommendations for management. *Bone*, 2022;154:116202.
- Wolf M, Rubin J, Achebe M, Econs MJ, Peacock M, Imel EA, i sur. Effects of iron isomaltoside vs ferric carboxymaltose on hypophosphatemia in iron-deficiency anemia: two randomized clinical trials. *JAMA*. 2020;323(5):432 – 443.
- Martens KL, Wolf M. Incidence, mechanism, and consequences of IV iron – induced hypophosphatemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2023 (1): 636 – 639.

Smjernice za dijagnostiku i liječenje hemofagocitne limfohistiocitoze

Ena Ranković¹, Nadira Duraković^{1,2}, Lana Desnica¹, Josip Knežević³, Boris Karanović⁴, Zrinko Šalek⁵, Sara Dejanović⁵, Inga Mandac Smoljanović⁶, Marino Narančić¹, Vlatka Periša^{7,8}, Hrvoje Holik⁹, Ivan Krečak^{10,11,12}, Branimir Barišić¹³, Ana Zelić Kerep¹, Tamara Vasilj¹⁴, Marijo Vodanović^{1,15}, Dražen Pulanić^{1,2}

¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu

³ Odjel za laboratorijsku imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

⁴ Zavod za kliničku imunologiju i reumatologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

⁵ Zavod za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvovornih matičnih stanica, Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur

⁷ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

⁸ Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

⁹ Odjel za hematologiju i onkologiju, Opća bolnica "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod

¹⁰ Služba interne medicine, Opća bolnica Šibensko-kninske županije

¹¹ Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci

¹² Sveučilište u Šibeniku

¹³ Odjel za hematologiju i koagulaciju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Sveti Duh

¹⁴ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava

¹⁵ Zdravstveno veleučilište Zagreb

Uvod

Hemofagocitna limfohistiocitoza (HLH) je rijedak, ali izrazito ozbiljan sindrom sistemske imunološke disregulacije koji karakterizira nekontrolirana aktivacija makrofaga i limfocita, što dovodi do citokinske oluje i multiorganskog zatajenja. HLH se dijeli na primarni oblik, koji je genetski uzrokovan, te sekundarni oblik, koji nastaje kao odgovor na infekcije, malignitete, autoimunosne bolesti i druge okidače (1,2). S obzirom na izrazito lošu prognozu bez pravovremene dijagnoze i terapije, rana identifikacija bolesti i usmjeren terapijski pristup od presudne su važnosti za smanjenje morbiditeta i mortaliteta.

Na 5. sastanku Radne skupine za benigne hematološke bolesti Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem na Brijunima u rujnu 2025. raspravljalo se o smjernicama za dijagnostiku i liječenje bolesnika s HLH-om koje su prikazane u ovom radu, prema dosadašnjim saznanjima o pato-

fizologiji ovog poremećaja, te dostupnim dijagnostičkim i terapijskim mogućnostima.

Dijagnostički protokol

Dijagnostički pristup HLH-u započinje kliničkom sumnjom temeljenom na prisutnosti karakterističnih simptoma poput protražiranog febriliteta, citopenija u dvije ili više krvnih loza te hepatosplenomegalije.

Početne laboratorijske pretrage uključuju procjenu funkcije jetre i bubrega, upalnih markera, fibrinogena, feritina i triglicerida. Ukoliko su pretrage dostupne, potrebno je provesti i određivanje specifičnih imunoloških parametara poput solubilnog CD25, koji je marker aktivacije T-limfocita, te aktivnosti NK stanica koja odražava funkcionalni imunološki status pacijenta. Klinička obrada obvezno uključuje analizu koštane srži u svrhu identifikacije hemofagocitoze ili maligne hematološke bolesti u podlozi (Tablica 1.).

Tablica 1. Dijagnostički algoritam – preporuka Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema.

1. Klinička sumnja	Febrilitet, citopenije, povišen feritin
2. Početne pretrage	fibrinogen, trigliceridi, LDH, hepatogram, bilirubin, bubrežna funkcija, imunoglobulini kvantitativno, SE Solubilni CD25 (sIL-2R)* Aktivnost NK stanica * Analiza koštane srži (citološka punkcija ili biopsija kosti) UZV abdomena (osvrst na organomegaliju)
3. Dijagnostički kriteriji	HLH-2004: zadovoljava 5/8 kriterija HLH-2024: zadovoljava 5/7 kriterija HScore ≥ 169
4. Dodatne pretrage	Mikrobiološka analiza -mikrobiološke kulture, virusologija (COVID-19...), PCR CMV i EBV DNA.... Imunološke pretrage (ANA, ENA, ANCA, C3, C4, ukupni komplement) Screening na malignu bolest (MSCT V/T/A/Z, ev. PET-CT) Genetsko testiranje i screening na primarne imunodeficiencije (kod djece, te ako postoji sumnja na primarni HLH u odrasloj dobi) MR mozga (u slučaju neuroloških simptoma, ev. CT mozga) Lumbalna punkcija (svima): citologija, biokemija, mikrobiologija
5. Protočna citometrija*	Podtipovi limfocita (CD3+ CD8+ CD38++HLA DR+) NK-stanična funkcija/degranulacija (površinska ekspresija CD107a)*-obavezno u reaktivaciji HLH u malog djeteta (analiza u inozemnom laboratoriju) Perforin * Površinska ekspresija SAP i XIAP (kod muških)*
6. Klasifikacija HLH	Primarni ili sekundarni

*kada/ako bude moguće određivati kod nas

SAP-SLAM associated protein

XIAP-X-linked inhibitor of apoptosis

Preporučuje se za dijagnozu hemofagocitne limfohistiocitoze koristiti jedan od triju validiranih dijagnostičkih alata – HLH-2004, HLH-2024 ili HScore

re – ovisno o dostupnosti pretraga i laboratorijskih mogućnosti (Slika 1.).

Slika 1. HLH-2004 i HScore kriteriji za dijagnozu HLH-a.

A. Obiteljska bolest/poznati genski defekt ILI
B. Klinički i laboratorijski kriteriji
1. Vrućica
2. Splenomegalija
3. Citopenija ≥ 2 stanične linije Hemoglobin < 90 g/L (ispod 4 tjedna < 120 g/L) Neutrofili $< 1 \times 10^9/L$
4. Hipertrigliceridemija i/ili hipofibrinogenemija Trigliceridi ≥ 3 mmol/L Fibrinogen $< 1,5$ g/L
5. Feritin ≥ 500 $\mu\text{g/L}$
6. sCD25 ≥ 2400 U/ml
7. Smanjena ili odsutna aktivnost NK stanica
8. Hemofagocitoza u koštanoj srži, CNS-u ili limfnim čvorovima
*Za dijagnozu je potrebno 5 od 8 kliničkih i laboratorijskih kriterija.

Parametar	Vrijednost i bodovi
Imunosupresija	Ne – 0 / Da – 18
Tjelesna temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$< 38,4 - 0$ / $38,4-39,4 - 33$ / $> 39,4 - 49$
Organomegalija (uvećana jetra/slezena)	Nema – 0 / Jetra ili slezena – 23 / Oba – 38
Citopenije (broj zahvaćenih linija)	1 linija – 0 / 2 linije – 24 / 3 linije – 34
Feritin (ng/mL)	$< 2000 - 0$ / $2000-6000 - 35$ / $> 6000 - 50$
Trigliceridi (mmol/L)	$< 1,5 - 0$ / $1,5-4,0 - 44$ / $> 4,0 - 64$
Fibrinogen (g/L)	$> 2,5 - 0$ / $\leq 2,5 - 30$
AST (U/L)	$< 30 - 0$ / $\geq 30 - 19$
Hemofagocitoza u koštanoj srži	Ne – 0 / Da – 35

Usporedni prikaz dijagnostičkih sustava za hemofagocitnu limfohistiocitozu (HLH). HLH-2004 kriteriji³ zahtijevaju ispunjenje ≥ 5 od 8 parametara, dok HScore boduje kliničke i laboratorijske pokazatelje; vrijednost HScorea ≥ 169 ukazuje na visoku vjerojatnost HLH-a.

HLH-2004 i HLH-2024 kriteriji temelje se na istim kliničkim i laboratorijskim parametrima, ali HLH-2024 ne uključuje procjenu NK stanične aktivnosti ni genetsku analizu. HScore je zaseban kvantitativni alat koji na temelju devet kliničkih i laboratorijskih varijabli brzo procjenjuje vjerojatnost HLH-a, s visokom prediktivnom vrijednošću (1,2,4,5).

Nakon postavljanja kliničke sumnje na HLH započinje se dijagnostička evaluacija stanja za potvrdu dijagnoze HLH-a. Ukoliko nije već poznata maligna bolest ili infekcija, potrebno je učiniti široku obradu kako bi se podležeće stanje identificiralo, jer je dio adekvatnog liječenja i terapija stanja koje je dovelo do ovog imunosnog zbivanja. Ova dodatna dijagnostika obuhvaća širok spektar pretraga s ciljem preciznog definiranja etiologije HLH-a, što je od presudnog značaja za odabir odgovarajućeg liječenja (Tablica 1.). Prije svega, nužno je provesti

detaljnu hematološku analizu kako bi se isključile hematološke malignosti, koje su čest okidač sekundarnog HLH-a. To uključuje analizu koštane srži, limfnih čvorova ili drugih zahvaćenih tkiva, s posebnim naglaskom na identifikaciju limfoma, leukemija i drugih malignih procesa. Istovremeno, važno je isključiti infektivne uzročnike jer brojne virusne, bakterijske, gljivične i parazitske infekcije mogu potaknuti ili oponašati kliničku sliku HLH-a. Specifični mikrobiološki testovi, uključujući PCR za Epstein-Barrov virus (EBV), citomegalovirus (CMV) te testiranje na druge patogene, trebaju biti rutinski uključeni u dijagnostički proces. Preporučuje se i serološki probir za autoimunosne sistemske bolesti koje mogu biti povezane sa sekundarnim HLH-om (Tablica 1.). Molekularnu genetsku analizu treba učiniti kod djece i odraslih kod kojih se sumnja na primarni HLH (1,2,6). Uzorak se šalje u Centar za translacijska istraživanja KBC Zagreb.

Tablica 2. Terapijski protokol u prvoj liniji liječenja - preporuka Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema.

Terapijski protokol

1.linija terapije-Indukcija (1.-8.tjedan)

deksametazon	10 mg/m ² po ili iv /2 tjedna, 5 mg/m ² /2 tjedna, 2.5 mg/m ² /2 tjedna, 1.25 mg/m ² / tjedna dana, taper do kraja 8. tjedna p.o. ili i.v alternativno metilprednizolon 1 g iv/3-5 pa dexta 10 mg/m ² , alternativno taper MP #
IVIg	maksimalno 2 g/kg iv ##
intratekalna terapija (ako je zahvaćen CNS)	kortikosteroid it (deksametazon 4 mg it ili hidrokortizon prema dobi <1 g 9 mg, 1-2 g 10 mg, 2-3 g 12 mg, >3 g 15 mg) metotreksat it (doza MTXa prema dobi: 1 godina 6 mg; 1-2 godine 8 mg; 2-3 godine 10 mg; 3 godine ili više 12 mg) 1xtjedno do likvorske remisije

Izbor između sljedećih dodatnih terapija (ovisno o podlozi i težini bolesti)

Ciklosporin	2-6 mg/kg u dvije dnevne doze po (koncentracija 150-250 µg/L) *
Ruksolitinib	2x10 mg do 2x20 mg dnevno po (može i na nazogastričnu sondu) **
Etopozid	150 mg/m ² iv dva puta tjedno prva 2 tjedna, potom jedanput tjedno do max 8 tjedana (prema HLH -94 protokolu) moгуće smanjenje doze kod starijih >70 g (1x tjedno 50-100 mg/m ²) i kod TT<10 kg 5 mg/kg iv
Anakinra	početna doza (IV / SC) 2-4 mg/kg/dan podijeljeno u 2-3 doze dnevno *** titracija prema kliničkom odgovoru (do 8 mg/kg/dan)
Tocilizumab	8 mg/kg iv (max 800 mg) ****

Razmotriti kod:

- # težih kliničkih slučajeva: MOF, MAS
- ## infekcija ili autoimunih bolesti, zahvaćenosti srca ili CNSa
- * autoimunih bolesti
- ** ne-malignih uzroka HLH-a
- *** MAS
- **** nakon CART stanične terapije

UVIJEK LJEČITI I BOLEST ILI STANJE U PODLOZI (npr. INFEKCIJU, LIMFOM...)

TRAJANJE TERAPIJE INDIVIDUALNO, PREMA ODGOVORU I OVISNO O OKIDAČU U PODLOZI

Kod EBV-HLH razmotriti primjenu rituksimaba 375mg/m² 1x tjedno, 4 doze

Preporučuje se izvođenje lumbalne punkcije svim pacijentima, neovisno o prisutnosti neuroloških simptoma, dok se magnetska rezonanca mozga

provodi u slučaju kliničkih znakova ili simptoma zahvaćenosti središnjeg živčanog sustava. Ukoliko pretraga postane dostupna u rutinskoj dijagnostici,

preporučuje se, učiniti protočnu citometriju radi funkcionalne evaluacije limfocita, čime se dodatno precizira dijagnoza (Tablica 1.).

Prema tim parametrima, HLH se može klasificirati kao primarni, uzrokovan genetskim mutacijama, ili sekundarni, povezan s vanjskim faktorima.

Prva linija liječenja

Ciljevi liječenja HLH-a su brzo suzbijanje prekomjerne imunološke aktivacije i citokinske oluje te kontrola i eradikacija temeljnog okidača. Okosnicu početnog liječenja HLH-a čine sistemski kortikosteroidi. Njihovu primjenu ne treba odgađati osim ako postoje jasne kontraindikacije. U slučaju sumnje na istodobnu infekciju — uključujući mogućnost da je precipitirajući uzročnik HLH-a — odmah započeti odgovarajuću empirijsku ili ciljanu antimikrobnu terapiju (1,2,6,7).

Za sekundarne oblike HLH-a u odraslih ne postoje univerzalno prihvaćene, randomiziranim ispitivanjima utemeljene smjernice. Posljednjih se desetljeća rutinski primjenjuju pedijatrijski protokoli HLH-94/HLH-2004 (deksametazon + etopozid ± ciklosporin A, intratekalna terapija). Navedeni protokoli nisu prospektivno validirani za odraslu populaciju. S obzirom na toksičnost standardne terapije, slabiju podnošljivost u starijih bolesnika s komorbiditetima i rizik pretjerano agresivnog liječenja u sekundarnom HLH-u, novije ciljane terapije sve se češće razmatraju kao dodatak ili pak alternativa konvencionalnim protokolima (1).

U inicijalnoj fazi liječenja HLH-a naše smjernice preporučuju primjenu deksametazona u dozi od 10 mg/m² jednom dnevno, peroralno ili intravenski (Tablica 2.). Kao alternativa u teškim prezentacijama mogu se primijeniti intravenske „pulsne“ doze metilprednizolona (npr. 1 g/dan kroz 3–5 dana) radi brzog prekida hiperinflamacije, nakon čega slijedi postupno smanjenje doze prilagođeno kliničkom i laboratorijskom odgovoru (1,7).

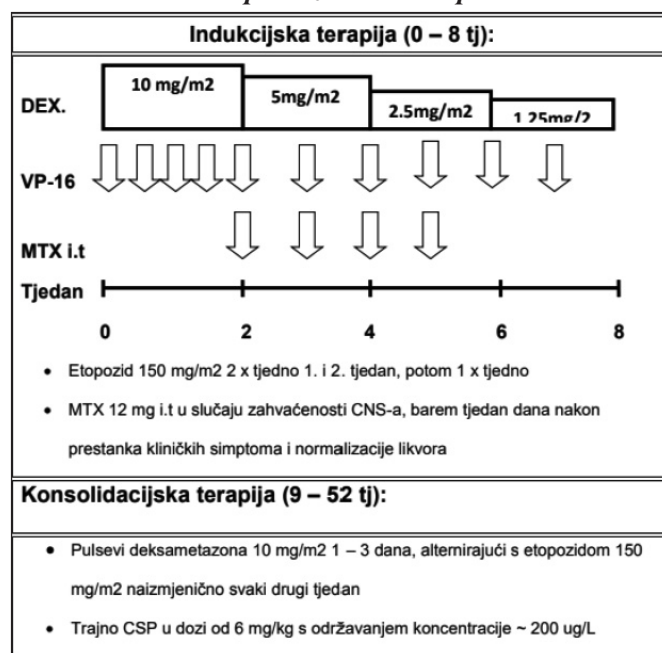
Intravenski imunoglobulini (IVIG) se u HLH-u mogu razmotriti kao adjuvantna terapija osobito kod zahvaćanja srca (npr. kardiomiopatija) ili središnjeg živčanog sustava, kao i u infekcijom-povezanom HLH-u te u sklopu MAS-a (eng. Macrophage Activation Syndrome), odnosno sindroma aktivacije makrofaga u podlozi autoimunskih ili autoinflamatornih bolesti. Primjenjuju se u maksimalnoj ukupnoj dozi do 2 g/kg (1,7).

U bolesnika s dokazanom zahvaćenošću središnjeg živčanog sustava preporučuje se intratekalna

terapija metotreksatom u kombinaciji s kortikosteroidom, s dobnim prilagodbama doze i tjednom primjenom do tjedan dana nakon kliničko/likvorske remisije.

U kliničkoj praksi kod kritično bolesnih odraslih s malignitetom-povezanim HLH-om ili fulminantnim tijekom s višestrukim zatajenjem organa primjenjuje se etopozid prema HLH-94 protokolu (Slika 2.), 150 mg/m² iv dvaput tjedno prva 2 tjedna, potom 150 mg/m² iv jednom tjedno do ukupno 8 tjedana. Brzo djeluje na eliminaciju aktiviranih limfocita i makrofaga, ali nosi rizik od teške mijelosupresije, hepatotoksičnosti i sepse, osobito u imunokompromitiranih bolesnika (1,2,7,8).

Slika 2. Shematski prikaz HLH – 94 protokola³



Ruksolitinib (obično 2×10–20 mg per os, ili prilagođeno težini) koristi se u nemaligim HLH oblicima, osobito kada je prisutna citokinska oluja ili refraktorni tijek bolesti. Inhibicija JAK/STAT signalnog puta u većini slučajeva ne kontrolira podležće stanje, malignu ili infektivnu bolest, samo modulira upalni odgovor te često mora biti kombiniran sa standardnom terapijom. Prednost je brzo djelovanje i dobra podnošljivost, ali treba pratiti hematološke parametre zbog rizika od citopenija (6,9,10).

Ciklosporin (2–6 mg/kg/dan u dvije doze per os, ciljna koncentracija 150–250 µg/L) koristi se za imunosupresiju kod autoimunskih HLH-a ili u održavanju remisije. Nuspojave uključuju nefrotoksičnost, hipertenziju i neurotoksičnost, stoga je potreban redovit terapijski monitoring (1,7).

Tocilizumab, monoklonsko protutijelo koje inhibira receptor za interleukin-6 (IL-6), koristi se kod

HLH-a povezanog s CAR-T terapijom ili kod sindroma citokinske oluje s visoko povišenim IL-6 u dozi od 8 mg/kg iv, maksimalno 800 mg. Može brzo sniziti upalu, no postoji rizik od reaktivacije infekcija i maskiranja sepse zbog supresije CRP-a (11,12).

Anakinra, rekombinantni humanizirani antagonist receptora za interleukin-1 (IL-1), obično se daje u početnoj dozi od 2-4 mg/kg IV, zaokruženo na najbližih 100 mg u 2-3 podijeljene doze. Može se titrirati do maksimalno 8 mg/kg/dan u podijeljenim dozama (ako je TT >100 kg, doza ne smije prelaziti 800 mg dnevno). Preferira se u MAS-u i autoimunim HLH-ima. Glavne nuspojave su leukopenija, porast jetrenih enzima i infekcije (7,13,14).

Pristup liječenju HLH-a mora biti individualiziran i usklađen s dinamikom bolesti, dostupnosti terapijskih opcija te odgovorom na primijenjene mjere.

Terapijski pristupi kod relapsa i refraktornih oblika

Unatoč primjeni standardnih protokola prve linije liječenja značajan broj bolesnika ne postiže zadovoljavajuću remisiju ili doživljava ponovnu aktivaciju bolesti (2).

Liječenje relapsnog i refraktornog HLH-a zahtijeva brzu individualizaciju, agresivnu imunomodulaciju, te pravovremeno upućivanje u transplantacijski centar kada je indicirano. U drugoj liniji mogu se primijeniti svi lijekovi iz prve linije koji ranije nisu korišteni. U novije vrijeme, posebnu pozornost izaziva primjena nivolumaba kod EBV-pozitivnog refraktornog HLH-a. Primjenjuje se svaka tri tjedna do postizanja negativizacije virusne DNA ili do pojave nepodnošljive toksičnosti; u slučaju postignute remisije razmatra se terapija održavanja svaka tri mjeseca tijekom jedne godine, s ciljem sprječavanja relapsa (16).

L-DEP protokol (metilprednizolon 15 mg/kg/3 dana, 0,75 mg/kg/4 dana, 0,25mg/kg/3 dana + peg-asparaginaza 2000 IU/m²/5. dan + etopozid 100 mg/m²/ 1., 8., 15. dan + liposomalni doxorubicin 25 mg/m²/1.dan, ciklus traje 21 dan) se u pedijatriji koristi kao druga linija liječenja refraktornog/relapsnog HLH-a, a može se primijeniti i u odraslih, pogotovo za refraktorni EBV-HLH (17).

Uloga alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Indikaciju za alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica imaju pacijenti koji su

nositelji homozigotne kombinacije gena povezanih s HLH-om, oboljeli koji imaju rekurentnu odnosno refraktornu bolest na prvu liniju terapije, koji imaju perzistentno odsutnu funkciju NK stanica, zahvaćen CNS i oni čija je HLH posljedica druge maligne hematološke bolesti. Dodatno se mogu razmotriti slučajevi kod kojih možemo postići remisiju HLH-a i očekujemo trajno izlječenje od hematološke bolesti koja je uzrokovala HLH, te kod kojih je postignuta normalizacija NK-stanične funkcije (18).

HLA-tipizaciju bolesnika potrebno je učiniti već pri postavljanju dijagnoze, a u slučaju srodnih donora preporučuje se genetski probir zbog mogućnosti skrivenih mutacija povezanih s HLH-om. Transplantaciju treba provesti čim je to moguće, idealno u fazi remisije, budući da je tada povezana s nižom transplantacijskom smrtnošću i boljim ishodima.

Zaključak

Liječenje HLH-a, osobito relapsnih i refraktornih oblika, zahtijeva brzu procjenu, individualiziran pristup i pravodobno uvođenje ciljane terapije. U bolesnika s visokorizičnim oblicima bolesti, transplantacija krvotvornih matičnih stanica ostaje ključna kurativna opcija te je treba planirati u remisiji. Rana dijagnostika, multidisciplinarna suradnja i dostupnost naprednih terapija presudni su za smanjenje smrtnosti i dugoročno preživljenje.

Literatura:

1. La Rosée P, Horne A, Hines M, von Bahr Greenwood T, Machowicz R, Berliner N, et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood*. 2019;133(23):2465–77. doi:10.1182/blood.2018894618
2. Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2011;118(15):4041–52. doi:10.1182/blood-2011-03-278127
3. Krečak I. Hemofagocitni sindrom. *Bilten KROHEM*. 2016;8(2):27–34.
4. La Rosée P, La Rosée F. HLH: diagnostics revisited and improved. *Blood*. 2024;144(22):2274–5. doi:10.1182/blood.2024026243
5. Khare N, Jinkala SR, Kanungo S. Performance of HScore in reactive hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2021;37(2):256–63. doi:10.1007/s12288-020-01342-
6. Wu Y, Sun X, Kang K, Wang B, Liu Q, Song X, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: current treatment advances, emerging targeted therapy and underlying mechanisms. *J Hematol Oncol*. 2024;17:106. doi:10.1186/s13045-024-01621-x
7. Lanyon P, Manson J, Tattersall R, Kay L, Hyde P. Haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): Guidance on the diagnosis, treatment, management and governance. London: Getting It Right First Time (GIRFT), NHS England; 2024 Jul. Updated 2025 Jun.
8. Bergsten E, Horne AC, Aricó M, Astigarraga I, Egeler RM, Filipovich AH, et al. Confirmed efficacy of etoposide and dexamethasone in HLH treatment: long-term results of the cooperative HLH-2004 study. *Blood*. 2017;130(25):2728–38. doi:10.1182/blood-2017-06-788349
9. Wang J, Wang Y, Wu L, Wang X, Jin Z, Gao Z, et al. Ruxolitinib for refractory/relapsed hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica*. 2020;105(5):e210–e212.
10. Zhou D, Huang X, Zhu L, Hu X, Yang X, Xie M, et al. Ruxolitinib combined with dexamethasone for adult patients with newly diagnosed HLH in China. *Blood*. 2025;148(3):318–27.
11. Dufranc E, Del Bello A, Belliere J, Kamar N, Faguer S; TAIDI study group. IL-6R blocking with tocilizumab in critically ill patients with hemophagocytic syndrome. *Crit Care*. 2020;24(1):166. doi:10.1186/s13054-020-02878-7
12. Major A, Collins J, Craney C, et al. Management of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) associated with chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy using anti-cytokine therapy: an illustrative case and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(7):1765–69. doi:10.1080/10428194.2021.1881507
13. Whiteside NJ, Loughran C, Bharadwaj N, Badger R, Nahar M, Bishton MJ. A Multi-Centre Study of Outcomes of Anakinra for Trigger Factors of Adult HLH in England. *Blood*. 2024;144(Suppl 1):5375. doi:10.1182/blood-2024-205551
14. Naymagon L. Anakinra for the treatment of adult secondary HLH: a retrospective experience. *Int J Hematol*. 2022;116(6):947–55. doi:10.1007/s12185-022-03430
15. Bichon A, Bourenne J, Allardet-Servent J, et al. High Mortality of HLH in ICU Regardless Etiology or Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:735796. doi:10.3389/fmed.2021.735796
16. Liu P, Pan X, Chen C, Guo Y, Yang C, Luo X, et al. Nivolumab treatment of relapsed/refractory EBV-associated HLH in adults. *Blood*. 2020;135(11):826–33. doi:10.1182/blood.2019003
17. Meng G, Feng S, Wang Y. DEP regimen for the treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis: a review of published experience. *Front Pharmacol*. 2025;16:1599873. doi:10.3389/fphar.2025.1599873. PMID:40567361; PMCID:PMC12187591.
18. Fu L, Wang J, Wei N, Wu L, Wang Y, Huang W, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for adult and adolescent HLH: a single center analysis. *Int J Hematol*. 2016;104(5):628–35. doi:10.1007/s12185-016-2062-7

Smjernice za liječenje akutne promijelocitne leukemije

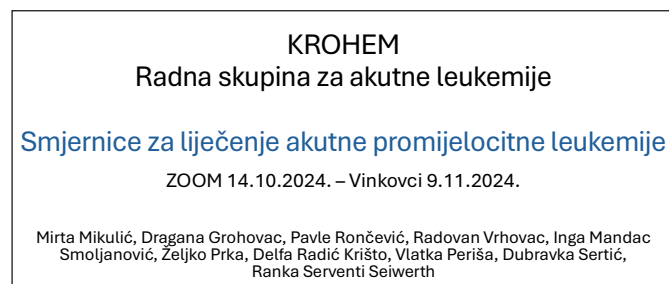
Mirta Mikulić¹, Dragana Grohovac², Pavle Rončević¹, Ranka Serventi Seiwert¹

¹ Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

² Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Rijeka

Na jesenskom sastanku Krohema 2024. godine predstavljena je prva verzija Krohemovih smjernica za liječenje akutne promijelocitne leukemije (APL). Smjernice su rezultat rada Krohemove radne skupine (RS) za akutne leukemije (Slika 1.), a temeljene su na preporukama za liječenje European Leukemia Net (ELN) (1) i National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (2) te relevantnim kliničkim studijama (3). U nastavku teksta izdvajamo najvažnije.

Slika 1. Smjernice za liječenje akutne promijelocitne leukemije dostupne su na mrežnim stranicama Krohema.



Dijagnoza

APL je podtip akutne mijeloidne leukemije (AML) koji čini 10-15% novodijagnosticiranih AML, a karakterizirana je recipročnom translokacijom t(15;17). Ista uključuje *PML* (promyelocytic leukemia) gen na kromosomu 15 i *RARA* gen (retinoic acid receptor alpha) na kromosomu 17. Kao posljedica translokacije nastaje fuzijski gen *PML::RARA*, koji kao represor transkripcije inhibira normalnu diferencijaciju mijeloidne loze, a mijeloidni prekursori koji nose ovu citogenetsku abnormalnost zaostaju u stadiju promijelocita.

U dijagnostici APL potrebno je učiniti sve uobičajene pretrage kod sumnje na akutnu leukemiju – kompletnu krvnu sliku, koagulogram, biokemiju seruma te citološku punkciju s uzimanjem uzoraka za morfologiju, protočnu citometriju, kariogram, FISH i PCR. Dijagnoza APL se temelji na prisustvu translokacije t(15;17), odnosno fuzijskog gena *PML::RARA*, ili fuzijskih varijanti.

Klinička slika

Bolesnici s APL-om prezentiraju se, kao i ostali bolesnici s AML, simptomima vezanima uz supresiju zdrave koštane srži kao što su slabost i infekcije, a u APL tipično nalazimo i poremećaj zgrušavanja posljedično diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji (DIK) s primarnom hiperfibrinolizom.

Liječenje

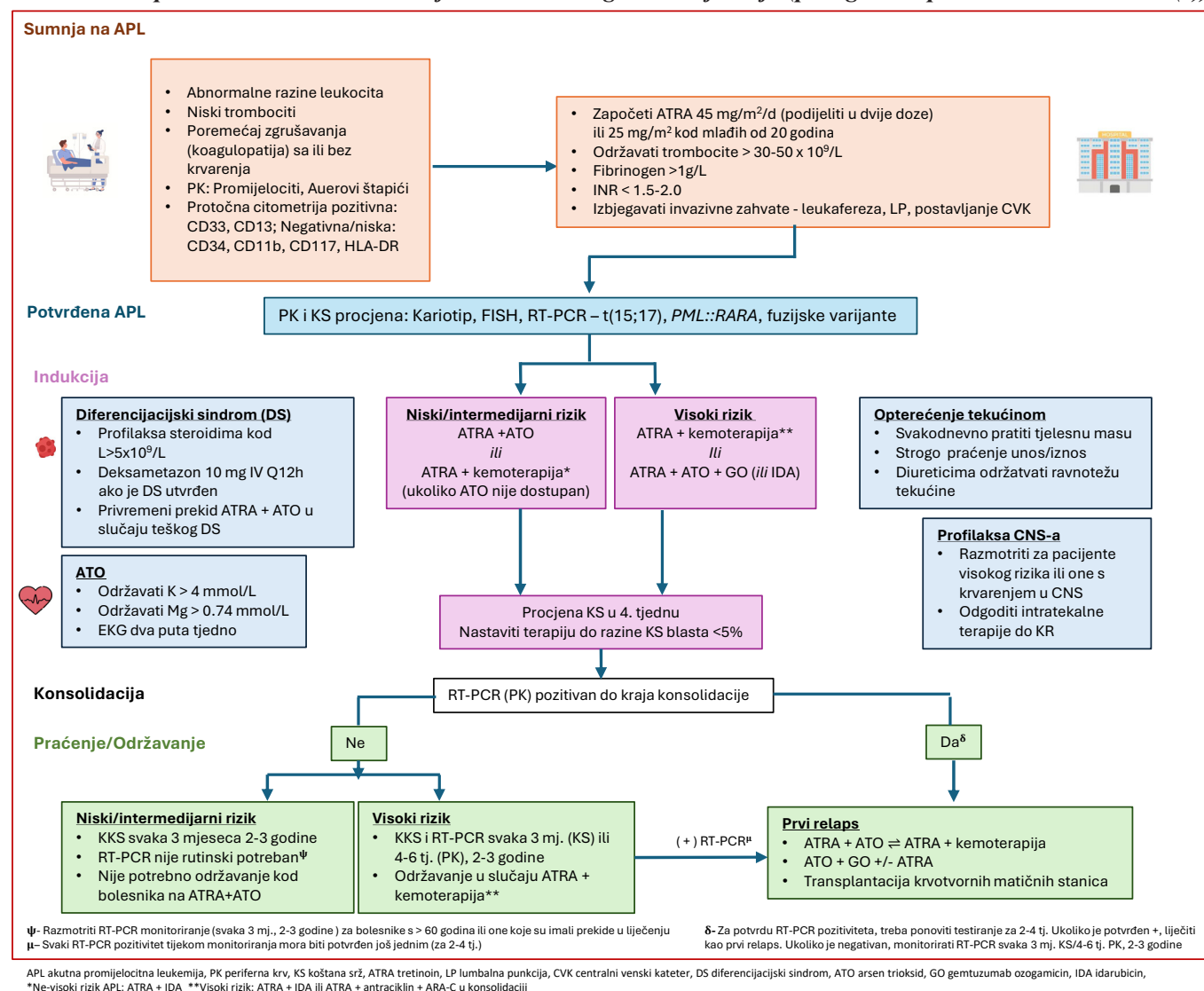
Danas se APL vrlo uspješno liječi, s dugoročnim preživljenjem od 80-95% (1). Za uspješnost liječenja zaslužne su nove sheme liječenja koje uključuju tretinoin (ATRA) te rano prepoznavanje simptoma bolesti i brzo započinjanje specifične i potporne terapije.

Kako bi se spriječile vrlo rane smrti bolesnika kod kojih postoji sumnja na APL, treba ih zbrinjavati kao hitno stanje i odmah hospitalizirati, i odmah započeti s primjenom ATRA. Uz primjenu ATRA, važno je adekvatno korigirati koagulopatiju transfuzijama, pri čemu je valja održavati PV-INR <1.5-2.0, fibrinogen >1.0 g/L, a trombocite >30x10⁹/L. Potrebno je izbjegavati invazivne postupke kao što su postavljanje centralnog venskog puta, lumbalnu punkciju i leukaferezu.

Po potvrdi dijagnoze treba započeti liječenje uvodnom terapijom, a tip uvodne terapije ovisi o stupnju rizika bolesti (Slika 2.). Nalaz mutacije *FLT3*-ITD, koja je česta u APL, ne mijenja pristup liječenju.

APL se ovisno o razini leukocita dijeli na visoki ($L > 10 \times 10^9/L$) i ne-visoki rizik ($L \leq 10 \times 10^9/L$). Ne-visoki rizik se dodatno, ovisno o razini trombocita, dijeli na niski ($Trc > 40 \times 10^9/L$) i intermedijarni ($Trc \leq 40 \times 10^9/L$).

Bolesnici ne-visokog rizika liječe se protokolima bez kemoterapije, koji se sastoje od kombinacije ATRA i arsen-trioksida (ATO). Nakon uvodnog ciklusa koji je potrebno provoditi do redukcije blasta u koštanoj srži na razinu manju od 5%, predviđene su četiri konsolidacijska ciklusa. Kod ovih bolesnika ne provodi se održavanje.

Slika 2. Postupak kod bolesnika sa sumnjom na APL i algoritam liječenja (prilagođeno prema Yilmaz M. et al. (4)).

Bolesnici visokog rizika liječe se kombinacijom ATRA i kemoterapije. Uvodni ciklus traje do redukcije blasta u koštanoj srži na razinu manju od 5%, a predviđena su tri konsolidacijska ciklusa i održavanje kroz dvije godine. Recentne studije pokazale su visoku učinkovitost kombinacije ATRA+ATO i kod ovih bolesnika (3), a u uvodnoj terapiji dodaje se ili idarubicin ili gemtuzumab-ozogamicin u svrhu redukcije broja leukocita (4).

Kako kod bolesnika koji primaju ATRA+ATO postoji rizik od razvoja diferencijacijskog sindroma (DS), potrebno je provoditi profilaksu DS kortikosteroidima kod svih bolesnika s vrijednostima leukocita $> 5 \times 10^9/L$.

Procjena odgovora na liječenje i praćenje mjerljive ostatne bolesti

Kod svih bolesnika u tijeku uvodnog liječenja prva citološka punkcija koštane srži treba biti oko 28. dana. Terapija se nastavlja s ponavljanjem punkcije svakih 7 dana do postizanja razine blasta manje od 5% u koštanoj srži. Praćenje mjerljive ostatne bolesti (MRD-measurable residual disease) metodom RT-PCR preporučeno je po završetku konsolidacijskog liječenja, a dodatno praćenje MRD kroz dvije godine obavezno je kod bolesnika visokog rizika. Ritam praćenja MRD ovisi o tome izvodi li se RT-PCR iz koštane srži – svaka tri mjeseca ili iz periferne krvi – svakih 4-6 tjedana. U slučaju nalaza pozitivnog RT-PCR, obavezno je potvrditi nalaz ponavljanjem pretrage za 2-4 tjedna.

Posebnosti u liječenju APL

Smjernice također opisuju i posebnosti liječenja starijih bolesnika i bolesnika s komorbiditetima te trudnica, kao i liječenje u slučaju relapsa ili RT-PCR pozitiviteta i relapsa u CNS.

Važno:

- *Temelj dijagnoze APL jest nalaz $t(15;17)$ ($q24.1;q21.2$), odnosno $PML::RARA$*
- *Već kod sumnje na APL odmah treba započeti primjenu ATRA 45 mg/m^2 , podijeljeno u dvije doze (bolesnici <20 godina ATRA 25 mg/m^2). Ukoliko dijagnoza ne bude potvrđena, ATRA se može prekinuti bez značajnijih nuspojava.*
- *Usporedo s primjenom ATRA, potrebno je provoditi agresivne potporne mjere i adekvatno korigirati koagulopatiju transfuzijama, pri čemu valja održavati $PV\text{-INR} <1,5$ - $2,0$, fibrinogen $>1,0 \text{ g/L}$, a trombocite $>30\text{-}50 \times 10^9/\text{L}$*
- *U slučaju $L > 5 \times 10^9/\text{L}$, primijeniti kortikosteroid u profilaksi diferencijacijskog sindroma*

Literatura:

1. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2019;133(15):1630-1643.
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Acute Myeloid Leukemia. Version 3.2024 — May 17, 2024. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1411>
3. Platzbeker U. First results of the APLLO trial: A randomized phase III study to compare ATO combined with ATRA versus standard AIDA regimen for patients with newly diagnosed, high-risk acute promyelocytic leukemia. EHA24 Abstract S102
4. Yilmaz M, Kantarjian H, Ravandi F. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer J*. 2021;11(6):123.

Sekvenciranje nove generacije u akutnoj mijeloičnoj leukemiji

Mirta Mikulić¹, Margareta Radić Antolčić², Monika Kolundžić²

¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

² Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

Uspješno liječenje akutnih leukemija zahtjeva timski rad kliničkih i laboratorijskih struka, od postavljanja dijagnoze do dugotrajnog praćenja bolesnika.

U složenu slagalicu dijagnoze akutne mijeločne leukemije (AML) od nedavno uvrštavamo i nalaz NGS-a. Kratica NGS znači *Next Generation Sequencing* – sekvenciranje nove generacije. Radi se o tehnologiji masivnog paralelnog sekvenciranja koje nam omogućuje istovremeno pretraživanje većeg broja uzoraka za velik broj mutacija. U AML, gensko profiliranje pomoću NGS-a ima ključnu ulogu u dijagnozi, stratifikaciji rizika, odabiru ciljane terapije te identifikaciji biomarkera za praćenje mjerljive ostatne bolesti (MRD). Uz navedeno, pomoću NGS-a moguće je identificirati nositelje zametnih mutacija u podlozi predispozicije za mijeloidne tumore (1,2).

Klasifikacija AML

Početak klasifikacije AML seže u sedamdesete godine prošlog stoljeća s razvojem FAB klasifikacije (French-American-British) bazirane na morfologiji, citokemiji i imunocitokemiji, te kvantifikaciji blasta u koštanoj srži (3).

Od 2001. godine, uvođenjem klasifikacije po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (World Health Organization, WHO), kao neophodni u dijagnozi AML uvršteni su nalazi protočne citometrije, citogenetike i molekularne dijagnostike. Kroz nekoliko izdanja WHO klasifikacije bilo je dodavano sve više genskih biljega, dok se razina blasta u koštanoj srži potrebnih za dijagnozu mijenjala ovisno o genskom profilu. Posljedično, važan pomak i doprinos klasifikacije prema WHO nije samo preciznija dijagnostika već i procjena prognoze bolesti (3).

Dvije najnovije klasifikacije iz 2022. godine - 5. izdanje klasifikacije WHO „World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms“ (4), i „International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias“ (5), temelje se na identifikaciji promjena najmanje 22 gena u dijagnozi AML (RARA, KMT2A, RUNX1, CBFB, NUP214, MECOM, ABL1, NPM1, CEBPA, TP53, ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2, FLT3, IDH1 i IDH2).

Sukladno tome KROHEM je u svojim Smjernicama za liječenje AML (6) usvojio preporuke European Leukemia Net (ELN) za dijagnostiku i liječenje AML (2) (Slika 1).

Slika 1. Pretrage i postupci kod dijagnoze AML.

Pretrage i postupci kod dijagnoze AML* - preporuke ELN	
Pretrage i postupci	
Pretrage za postavljanje dijagnoze Kompletna krvna slika s diferencijalnom krvnom slikom Aspirat koštane srži Biopsija koštane srži – kod dobivanja neadekvatnog uzorka aspiracijom Imunofenotipizacija protočnom citometrijom	Dodatne pretrage i postupci Fizikalni pregled Status performans (ECOG/WHO skor) Gerijatrijska procjena (optional) Biokemija, koagulacija Serologija hepatitisa A, B, C; HIV-1; CMV, EBV, HSV, VZV Test na trudnoću serum Procjena podobnosti za alogeničnu TKMS, tipizacija HLA RTG pluća, 12-kanalni EKG, UZV srca na indikaciju CT toraksa na indikaciju Lumbalna punkcija na indikaciju Informacija o krioprezervaciji sjemena i oocita--- Biobanka
Genetičke analize Citogenetika Probir na mutacije gena koje su neophodne za postavljanje dijagnoze i identifikiranje mutacija za ciljanu terapiju FLT3, IDH1, IDH2 NPM1 CEBPA, DDX41, TP53, ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2 Probir za preuredbe gena PML::RARA, CBFB::MYH11, RUNX1::RUNX1T1, KMT2A rearanžmani, BCR::ABL1, Drugi fuzijski geni	Preporučeni rok za dobivanje nalaza: 5-7 dana 3-5 dana 3-5 dana 1. Ciklus 3-5 dana
Dodatne analize gena preporučene pri dijagnozi ANKRD26, BCORL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, GATA2, JAK2, KIT, KRAS, NRAS, NF1, PHF6, PPM1D, PTPN11, RAD21, SETBP1, TET2, WT1	
Anamneza Demografija i osobna anamneza Obiteljska anamneza Anamneza krvarenja Analiza komorbiditeta	

*Prilagođeno prema preporukama ELN 2022 (Döhner et al. Blood 2022), za detalje molimo vidjeti originalnu publikaciju

U molekularnu dijagnostiku AML uz testiranje PCR-om na fuzijske prijepise *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1* i mutacijski status *FLT3* i *NPM1*, uključen je i NGS ciljani panel gena koji minimalno mora sadržavati *FLT3*,

IDH1, *IDH2*, *NPM1*, *CEBPA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2* (Slika 2). Preporučeno vrijeme za dobivanje nalaza NGS-a jest završetak uvodnog ciklusa liječenja. Kod relapsa indicirano je ponoviti molekularna testiranja kao i kod *de novo* bolesti.

Slika 2. Molekularna dijagnostika i praćenje odgovora u AML.

Molekularna dijagnostika i praćenje odgovora u AML – Zaključci sastanka Radne skupine 02/2024. (M. Radić Antolic)	
Obrada dijagnostičkog uzorka – ELN 2022	
Uzorak: KOŠTANA SRŽ (EDTA – ljubičasti čep - na ledu 2-8°C) - iznimno periferna krv – mora biti >20% blasta	
✓ izdvojiti DNA – pohraniti na 2-8°C – centri koji ne rade ili rade djelomičnu obradu pohraniti jedan alikvot za ARHIVU (volumena minimalno 20µl DNA $c_{min}=50ng/\mu l$, čistoće A260/A280=1,8 do 2,0)	
✓ izdvojiti RNA – pohraniti na -20°C (dugotrajno na -80°C)	
1. Fuzijski prijepisi - TAT ≈ 14 dana (FISH – 5-7 dana*)	
a. <i>PML::RARA</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> - kvalitativno kao potvrda translokacija (FISH)	
b. <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>DEK::NUP214</i> - kvalitativno kao potvrda translokacija (FISH)	
c. <i>BCR::ABL1</i> – obavezno odrediti tip prijepisa i navesti na nalazu: Major – e13a2, e14a2, e13a3, e14a3; minor – e1a2, e1a3	
2. Mutacijski status FLT3 – na nalazu obavezno navesti metodologiju, koji ekson/kodone pokriva analiza - TAT ≈ 3-5 dana	
a. Interna tandemska duplikacija (ITD) – u eksonima 14 i 15 (npr. Thiede C et al. Blood 2002;99:4326-35.) ➤ ako se dokazuje samo u eksonu 14 (Nakao i sur. 1996) – obavezno naznačiti da nije analiziran ekson 15	
b. Mutacije u tirozin kinaznoj domeni (TKD) – D835, I836 kodoni (npr. Murphy KM et al. J Mol Diagn. 2003;2:96-102)	
3. Mutacijski status NPM1 – na nalazu obavezno navesti tip mutacije (A – dupTCTG, B – insCATG, D – insCCTG) TAT ≈ 3-5 dana	
✓ mutaciju dokazati analizom fragmenata na kapilarnoj elektroforezi (npr. Thiede C. et al (2006) Blood, 107(10):4011-4020)	
✓ Odrediti tip mutacije Sangerovim sekvenciranjem ili NGSom	
✓ Kvantificirati mutacije A, B i D - rezultat se izražava u postotku ili u broju kopija na 10 ⁴ kopija <i>ABL1</i> .	
4. NGS – ciljani panel gena koji minimalno mora sadržavati: <i>FLT3</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</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> , a dodatna preporuka su: <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> (*Döhner H et al. Blood. 2022 Sep 22;140(12):1345-1377.) TAT ≈ kraj 1 ciklusa th	

Slika 3. Stratifikacija rizika prema ELN 2022 ovisno o genetskim biljezima.

Stratifikacija rizika prema ELN 2022 ovisno o genetskim biljezima*	
Kategorija rizika	Genetski poremećaj
Povoljni	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> , Mutirani <i>NPM1</i> , bZIP in-frame mutacija <i>CEBPA</i>
Intermedijarni	Mutirani <i>NPM1</i> , <i>Wild-type NPM1</i> with <i>FLT3-ITD</i> (bez genetskih poremećaja za visoki rizik) t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> , Citogenetski i/ili molekularni poremećaji koji nisu klasificirani kao povoljni ili nepovoljni
Nepovoljni	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> -rearranged# t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EV11)</i> t(3q26.2;q21.3)/ <i>MECOM(EV11)</i> -rearranged 25 or del(5q); 27; 217/abn(17p) Kompleksni kariotip, ** monosomalni kariotip++ Mutacije <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , and/or <i>ZRSR2</i> ++ Mutirani <i>TP53a</i>

#Istovremene mutacije *KIT* i/ili *FLT3* gena ne mijenjaju kategoriju rizika
\$AML with *NPM1* mutation and adverse-risk cytogenetic abnormalities are categorized as adverse-risk.
K s povoljnim ishodom su povezane samo in-frame mutacije affecting basic leucine zipper (bZIP) regije *CEBPA*, i mono- i bialelne
¶ Pristupio t(9;11)(p21.3;q23.3) je značajnije od ev. istovremenih genetskih poremećaja nepovoljnog rizika
Izuzet parcijalne tandem duplikacije (PTD) *KMT2A*.
**Kompleksni kariotip: ≥3 nepovezana kromosomska poremećaja bez istovremenih drugih definirajućih rponavljajućih genetskih poremećaja, izuzev hiperdiploidnog kariotipa s tri ili više trisomije ili polisomije bez strukturalnih poremećaja
++Monosomalni kariotip: prisustvo dvije ili više značajne monosomije (osim gubitka X ili Y) ili jedna autosomalna monosomija u kombinaciji s najmanje jednim strukturalnim kromosomskim poremećajem (izuzev *CBF-AML*)
++U prisustvu značajki povoljnog rizika, ne ovi se biljezi ne smatraju nepovoljnim
aTP53 mutacija s min VAF-om 10%, bez obzira je li mutacija mono- ili bialelna; TP53 mutacije su značajno povezane s AML s kompleksnim ili monosomalnim kariotipom

*Prilagođeno prema preporukama ELN 2022 (Döhner Blood 2022), za detalje molimo vidjeti originalnu publikaciju

Utjecaj NGS na liječenje AML

Najznačajniji utjecaj NGS-a jest na stratifikaciju rizika oboljelih od AML. Stratifikaciju rizika prema ELN (2) ovisno o genetskim biljezima preuzeo je i KROHEM (Slika 3) (6). Stupanj rizika (povoljni, intermedijarni i nepovoljni), u odraslih bolesnika u dobi do 65-70 godina, utječe na odabir sheme liječenja i planiranje postremisijskog liječenja. Tako se u liječenju bolesnika povoljnog rizika uz standardnu shemu „3+7“ koja uključuje daunorubicin i citarabin, može dodati i gemtuzumab ozogamicin, a u tih se bolesnika alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) planira u slučaju neadekvatnog odgovora na liječenje ili u drugoj remisiji. S druge strane, u liječenju bolesnika nepovoljnog rizika, prvenstveno onih s mutacijom *TP53*, umjesto intenzivne kemoterapije može se primijeniti kombinacija azacitidina s venetoklaksom. Svi bolesnici intermedijarnog i nepovoljnog rizika kandidati su za alogeničnu TKMS, ukoliko nemaju kontraindikacije. (6)

Dodatno, molekularne metode omogućavaju nam ciljano liječenje, *FLT3* inhibitorima i *IDH1* i *IDH2* inhibitorima (potonji još nisu dostupni u RH).

Molekularni MRD

NGS-om moguće je identificirati biomarkere pogodne za praćenje mjerljive ostatne bolesti molekularnim metodama, što je važno u procjeni odgovora na liječenje i eventualnoj modifikaciji terapije, te za rano otkrivanje relapsa.

Preventivna uloga NGS-a

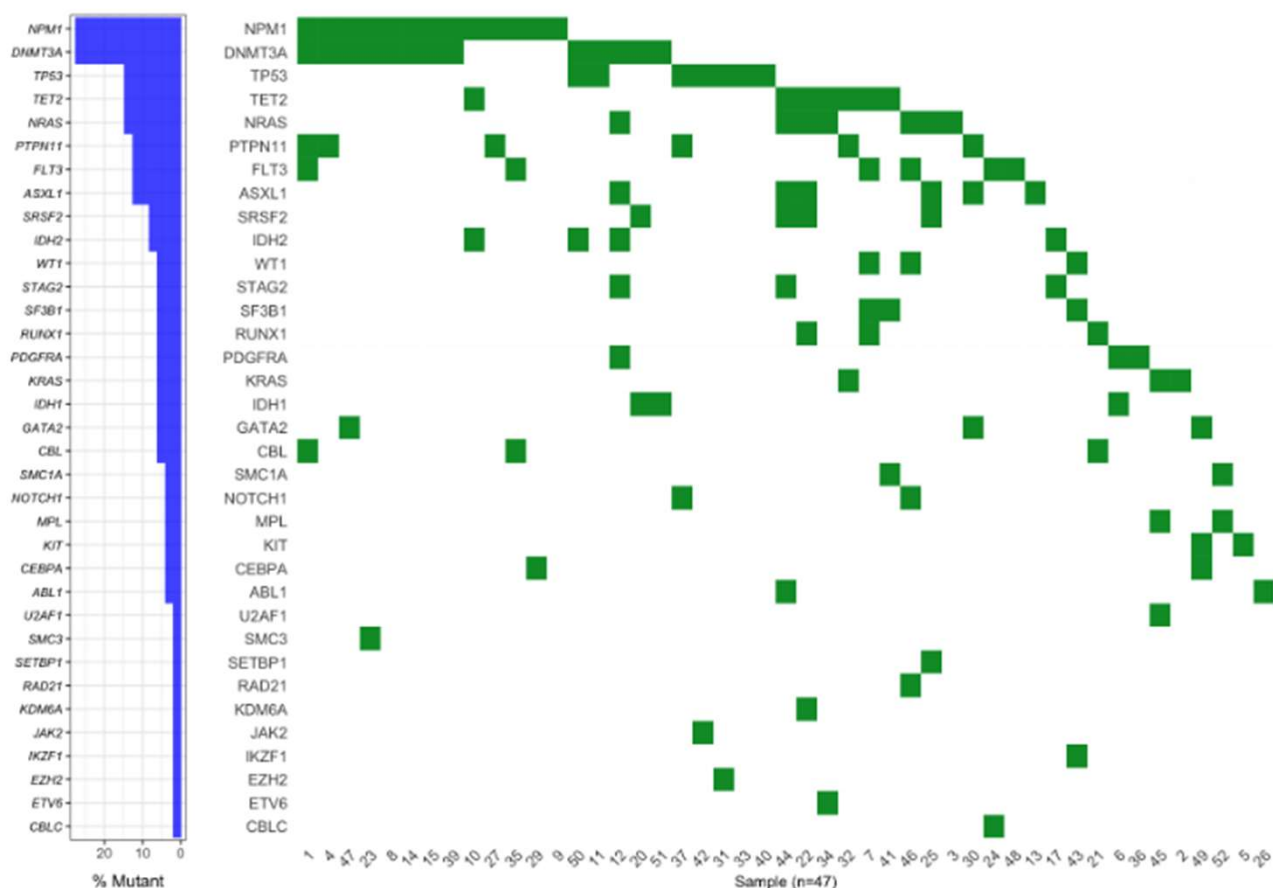
U identifikaciji bolesnika s mutacijama zametnih stanica koje nose predispoziciju za mijeloidne neoplazme, uz detaljnu obiteljsku anamnezu, neizostavan je i NGS kojim je potrebno testirati bolesnike i po potrebi članove obitelji. Osim u svrhu prepoznavanja nasljedne predispozicije za hematološki mali-

gnitet, koristi se i pri odabiru darivatelja krvotvornih matičnih stanica.

Iskustva KBC Zagreb

U KBC Zagreb, NGS se u rutinsku dijagnostiku AML uvodi početkom 2020. godine i do sada je izvedeno preko 450 analiza. Metoda koja se koristi jest ciljani genski panel (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) kojim je u početku bilo pokriveno 54 gena, ali je naknadno proširen na ukupno 62 gena. Tehnologijom obogaćivanja na kuglicama pripremaju se pojedinačne knjižnice za analizu somatskih mutacija bolesnika s dijagnozama AML, MDS, MPN, CML, CMML, JMML i ALL. Dobiiveni podaci analiziraju se pomoću online platforme Varsome Clinical. Identificiraju se varijante tipa točkastih mutacija te malih insercija i delecija gena, a interpretaciju patogenosti varijante u kontekstu hematološke malignosti omogućuju baze podataka s literaturnim dokazima poput Varsome Clinical-a, Cosmic-a, ClinVar-a, Franklin-a, i drugih. Nalaz obuhvaća tablični prikaz varijanti uz HGSV nomenklaturu, klinički značaj i frekvenciju varijante u uzorku (VAF). Osim somatskih, moguće je pronaći i potencijalne varijante zametnih stanica koje je potrebno potvrditi u nehematopoetskom tkivu.

Kako bismo procijenili utjecaj nalaza NGS-a na stratifikaciju rizika naših bolesnika, proveli smo analizu rezultata NGS-a u 47 novodijagnosticiranih bolesnika s AML-om s medijanom dobi 47 godina (18-81), liječenih u KBC Zagreb u razdoblju od 2020-2024. godine. NGS je pridonio klasifikaciji 10 bolesnika, te reklasifikaciji 4 bolesnika. Među najčešće prisutnim mutacijama bile su mutacije *NPM1* i *DNMT3A*, a zamijetili smo istovremenu prisutnost *NPM1-DNMT3A*, i međusobnu isključivost *NPM1-TP53* (Slika 4), kako je opisano i ranije u literaturi (7,8). Ovom smo analizom potvrdili vrijednost metode u svakodnevnom kliničkom radu.

Slika 4. Molekularni profil 47 bolesnika s novodijagnosticiranom AML analizirano NGS-om.

Zaključak

NGS je metoda koja značajno pridonosi kvaliteti liječenja bolesnika s AML. Iako sa sobom nosi nezanemarivo dodatno opterećenje laboratorijskog osoblja kao i financijske troškove, neophodno je da bude dostupan svim bolesnicima s dijagnozom AML podobnima za liječenje.

Literatura:

1. Guijarro F, Garrote M, Villamor N, et al. Novel Tools for Diagnosis and Monitoring of AML Curr. Oncol. 2023;30:5201–5213.
2. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood. 2022;140:1348-1377.
3. Kansal R. Toward Integrated Genomic Diagnosis in Routine Diagnostic Pathology by the World Health Organization Classification of Acute Myeloid Leukemia. J Clin Haematol. 2020;1:33-53
4. Khoury JD, Solary E, Abla O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia. 2022;36:1703–1719.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. 2022.140;1200-1228.
6. Mikulić M, Rončević P, Duraković N, et al. KROHEM Smjernice za liječenje akutne mijeloične Leukemije. 2. verzija – svibanj 2024. <https://www.krohem.hr/wp-content/uploads/2024/08/AML-Krohem-smjernice-post-0724-ZAVRSNA-pdf.pdf>
7. Wurm S, Waltersdorfer M, Loindl S, et al. Acute myeloid leukemia in the next-generation sequencing era. Real-world data from an Austrian tertiary cancer care center. Wien Klin Wochenschr. <https://doi.org/10.1007/s00508-024-02463-w>
8. Alves da Rosa SE, Barbosa de Lima L, Nunes Silveira C, et al. Real-world genomic profiling of acute myeloid leukemia and the impact of European LeukemiaNet risk stratification 2022 update. Clin Transl Oncol. 2023;25:3431-3436.

Mutacije zametne loze i obiteljska sklonosti za razvoj hematoloških malignih bolesti u oboljelih od akutne mijeloične leukemije – studija Krohema i poziv na suradnju

Zrinka Sertić¹, Margareta Radić Antolice², Monika Kolundžić², Nadira Duraković^{1,3}

¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

² Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

³ Medicinski fakultet u Zagrebu

Akutna mijeloična leukemija (AML) zloćudna je hematološka bolest u kojoj mutacije u genima progenitornih hematopoetskih stanica dovode do njihove smanjene sposobnosti samoregulacije, razvojnog aresta i ubrzane proliferacije (1). Genska heterogenost AML otkrivena sekvenciranjem iduće generacije (eng. next generation sequencing, NGS) cijelog genoma, egzoma, RNA, mikroRNA i analizom metilacije DNA opisana je u nekoliko velikih istraživanja (2–5), a konačni razvoj bolesti rezultat je stjecanja “pogonskih” (eng. driver) mutacija u više bioloških puteva.

Suprotno dosadašnjoj paradigmi da je fenotip akutne leukemije rezultat nakupljanja somatskih mutacija, napredak metoda genske analize otkrio je da bi u oko 10% slučajeva mutacije zametne loze (eng. germline) mogle biti prvi korak u leukemogenezi (6). Otkriće novih zametnih varijanti gena povezanih s predispozicijom za mijeloidne neoplazme odrazilo se i na njihovu veću zastupljenost u novim izdanjima klasifikacije mijeloidnih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organisation, WHO) i ICC (eng. International Consensus Classification) (7,8). Najčešće su patogene i vjerojatno patogene zametne varijante u *DDX41* genu, zatim *TP53*, *GATA2*, *SBDS*, *RUNX1* i *CHEK2* (9), a iako se primarno povezuju s nastankom maligne bolesti u mlađih bolesnika, mogu biti otkrivene pri dijagnozi u bilo kojoj dobi s genima poput *DDX41* i *CHEK2* koji su povezani s progresijom u mijelodisplastični sindrom (MDS) ili AML petom desetljeću života i kasnije (10).

Pravovremeno prepoznavanje zametne varijante u bolesnika može odrediti rizik bolesti, usmjeriti terapijsku odluku i utjecati na ishod liječenja. Primjerice, bolesnici s AML i zametnom varijantom *CEBPA* gena imaju bolje ishode od onih sa sporadičnim somatskim *CEBPA* mutacijama, ali su skloni kasnijim ponavljajućim *de novo* epizodama akutne leukemije (11). Bolesnici sa zametnom varijantom gena *DDX41* liječeni intenzivnom kemoterapijom imaju nižu stopu relapsa u odnosu na one s div-

ljim tipom *DDX41* i bolešću visokog rizika prema European LeukemiaNet (ELN) stratifikaciji (15% vs. 44% u prvoj godini), ali višu stopu kasnih relapsa (82% vs. 75% u prve tri godine) (12), dok su zamijećeni bolji i rani i kasni ishodi liječenja hipometilirajućim lijekovima u bolesnika s MDS/AML i zametnom varijantom *DDX41* u odnosu na divlji tip (13). Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (KMS) metoda je izbora za liječenje visokorizičnih bolesnika, a postojanje zametne varijante može utjecati na izbor darivatelja jer je najpoželjniji darivatelj KMS još uvijek srodni HLA-podudarni član obitelji, potencijalni nositelj iste mutacije. Razvoj donorom posredovane maligne bolesti (eng. donor derived malignancy, DDM) poput MDS ili AML zabilježeno je u do 2-5% poslijetransplantacijskih relapsa kao posljedica prijenosa stečenih mutacija u obliku klonске hematopoeze, ali i mutacija zametne loze darivatelja (14,15). Mutacije zametne loze darivatelja povezane su i s neuspješnim usađivanjem presatka i izostankom imune rekonstitucije, te komplikacijama prilikom prikupljanja KMS poput otežane mobilizacije ili razvoja akutne leukemije u darivatelja (16–20). U do sada zabilježenim slučajevima posttransplantacijskih komplikacija tek je naknadnom analizom potvrđena zametna mutacija u poznatim genima povezanim s predispozicijom za mijeloidne neoplazme poput *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA* i *DDX41*.

Utjecaj mutacija zametne loze na rizik razvoja hematoloških malignih bolesti uključujući AML još je uvijek nedovoljno razjašnjena i nosi puno otvorenih pitanja. Klasifikacija zametnih varijanti povezanih s mijeloidnim neoplazmama podložna je brzim promjenama sukladno mnoštvu novih otkrića i trenutno ne postoje jasne smjernice koga testirati, kada i kojim opsegom genskog panela, kao niti za nadzor, zbrinjavanje i gensko savjetovanje zdravih nositelja patogenih i vjerojatno patogenih varijanti zbog varijabilne latencije i penetrantnosti gena koji nose različit rizik sekundarnih genskih događaja i progresije u malignu bolest. Koliko nam je poznato, trenutno

nema istraživanja koje se bave njihovom učestalošću u članova obitelji oboljelih od AML. Za razliku od solidnih tumora, dokazivanje mutacije zametne loze u malignim hematološkim bolestima nema samo ulogu praćenja i rane dijagnostike za srodnike već i potencijalne terapijske implikacije za oboljele ukoliko se razmatra srodni darivatelj za alogeničnu transplantaciju KMS. Prema NCCN smjernicama (eng. National Comprehensive Cancer Network) u drugim malignim bolestima učestalost veća ili jednaka 5% opravdava redovni probir na zametne varijante (21). Iako aktualne ELN smjernice prepoznaju važnost utvrđivanja zametnih varijanti pri dijagnozi (22), trenutno se ne provodi sustavni probir na mutacije zametne loze u bolesnika s AML i članova njihovih obitelji i nema dostupnih literaturnih podataka koji bi govorili u prilog odnosno protiv takvog probira u redovnoj kliničkoj praksi.

Od studenog 2024. godine na Zavodi za hematologiju i Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u sklopu projekta Radne skupine za laboratorijsko-dijagnostičku hematologiju Krohema provodi se prospektivno istraživanje čiji je glavni cilj utvrditi učestalost mutacija stanica zametne loze u bolesnika s novodijagnosticiranom AML koji su podobni za liječenje intenzivnom kemoterapijom i/ili alogeničnom transplantacijom KMS, te učestalost bolesnika kod kojih je ista mutacija prisutna i u prvim srodnika. Kriteriji uključenja su odrasla dob (navršenih 18 godina ili više), dijagnoza AML prema dijagnostičkim kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (8) i potpisan informirani pristanak. Kriteriji isključenja su dob od 65 godina ili više, nepodobnost za liječenje intenzivnom kemoterapijom i/ili alogeničnom transplantacijom KMS procijenjena prema AML-CM procjeni rizika prema Sorroru (23) i/ili procjeni vodećeg liječnika. O ispitanicima su prikupljeni relevantni demografski i klinički podaci pri dijagnozi, a u svrhu provođenja dodatnih eksplorativnih analiza uključeni bolesnici biti će praćeni do progresije bolesti, smrti ili kraja istraživačkog razdoblja, te će tijekom praćenja biti zabilježen odgovor na terapiju definiran prema ELN smjernicama (22) i preživljenje. Svakom bolesniku se prilikom postavljanja dijagnoze uzima uzorak koštane srži za molekularno profiliranje pomoću ciljanog NGS panela koji uključuje gene za koje je poznato da su povezani s razvojem mijeloidnih neoplazmi. U slučaju sumnje

na zametnu varijantu provest će se uparena analiza Sangerovim sekvenciranjem ne-hematološkog tkiva, odnosno uzorka bukalne sluznice. Istom metodom ćemo iz uzorka periferne krvi istražiti prisutnost prethodno dokazane zametne varijante i kod prvih srodnika bolesnika (roditelja, djece, braće i sestara).

Uz očekivani skori početak suradnje s Kliničkim bolničkim centrom Split i Kliničkom bolnicom Dubrava, u svrhu prikupljanja što vjerodostojnijeg uzorka populacije bolesnika s AML u Republici Hrvatskoj, ovim putem pozivamo i ostale hrvatske centre na suradnju uključivanjem svojih bolesnika s novodijagnosticiranom AML. Ukoliko ovo istraživanje dovede do otkrića novih zametnih varijanti ili mutacijskih uzoraka nadopunilo bi spoznaje o heterogenosti genske podloge AML, a probir na mutacije zametnih stanica unutar obitelji pomogao bi razjasniti predispoziciju za razvoj malignih hematoloških bolesti i utjecati na odabir optimalnog darivatelja za transplantaciju KMS.

Literatura:

1. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer Journal*. 2016;6(7): e441–e441. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>.
2. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22): 2059–2074. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
3. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(23): 2209–2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
4. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2018;562(7728): 526–531. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0623-z>.
5. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5): 686–698. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-693879>.
6. Yang F, Long N, Aneupuritanang T, Bottomly D, Savage JC, Lee T, et al. Identification and prioritization of myeloid malignancy germline variants in a large cohort of adult patients with AML. *Blood*. 2022;139(8): 1208–1221. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011354>.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):

- 1200–1228. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>.
8. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7): 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
9. Makishima H, Saiki R, Nannya Y, Korotev S, Gurnari C, Takeda J, et al. Germ line DDX41 mutations define a unique subtype of myeloid neoplasms. *Blood*. 2023;141(5): 534–549. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018221>.
10. Gurnari C, Robin M, Godley LA, Drozd-Sokołowska J, Włodarski MW, Raj K, et al. Germline predisposition traits in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: a survey-based study and position paper on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *The Lancet Haematology*. 2023;10(12): e994–e1005. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(23\)00265-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00265-X).
11. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bödör C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood*. 2015;126(10): 1214–1223. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-647172>.
12. Duployez N, Largeaud L, Duchmann M, Kim R, Rieunier J, Lambert J, et al. Prognostic impact of DDX41 germline mutations in intensively treated acute myeloid leukemia patients: an ALFA-FILO study. *Blood*. 2022;140(7): 756–768. <https://doi.org/10.1182/blood.2021015328>.
13. Sébert M, Freiman L, Chaffaut C, Guerci A, Peterlin P, Thépot S, et al. Clinical impact of genetic alterations including germline DDX41 mutations in MDS/low-blast count AML patients treated with azacitidine-based regimens. *Leukemia*. 2024;38(4): 918–922. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02180-3>.
14. Gibson CJ, Kim HT, Zhao L, Murdock HM, Hambley B, Ogata A, et al. Donor Clonal Hematopoiesis and Recipient Outcomes After Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(2): 189–201. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02286>.
15. Loschi M, Villy MC, Galimard JE, Auboiron MM, Gachard N, Perani A, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in germline DDX41 mutated patients with myeloid malignancies. *Blood Advances*. 2025; <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2025017084>.
16. Xiao H, Shi J, Luo Y, Tan Y, He J, Xie W, et al. First report of multiple CEBPA mutations contributing to donor origin of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(19): 5257–5260. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326322>.
17. Sakata N, Okano M, Masako R, Tanaka A, Yamashita Y, Karasuno T, et al. Donor-derived myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation in a family with germline GATA2 mutation. *International Journal of Hematology*. 2021;113(2): 290–296. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02980-0>.
18. Kobayashi S, Kobayashi A, Osawa Y, Nagao S, Takano K, Okada Y, et al. Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31(4): 1020–1022. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.44>.
19. Berger G, van den Berg E, Sikkema-Raddatz B, Abbott KM, Sinke RJ, Bungener LB, et al. Re-emergence of acute myeloid leukemia in donor cells following allogeneic transplantation in a family with a germline DDX41 mutation. *Leukemia*. 2017;31(2): 520–522. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.310>.
20. Williams LS, Williams KM, Gillis N, Bolton K, Damm F, Deutch NT, et al. Donor-Derived Malignancy and Transplantation Morbidity: Risks of Patient and Donor Genetics in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2024;30(3): 255–267. <https://doi.org/10.1016/J.JTCT.2023.10.018>.
21. Daly MB, Pilarski R, Yurgelun MB, Berry MP, Buys SS, Dickson P, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2020;18(4): 380–391. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0017>.
22. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12): 1345–1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.
23. Sorror ML, Storer BE, Fathi AT, Gerds AT, Medeiros BC, Shami P, et al. Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia–Composite Model to Estimate Risks of Mortality. *JAMA Oncology*. 2017;3(12): 1675. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2714>.

Stavovi hrvatskih hematologa o skrbi bolesnika s Ph-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama u Republici Hrvatskoj: rezultati Krohemove studije

Ivan Krečak¹⁻³, Marko Lucijanić⁴⁻⁶, Rajko Kušec⁴⁻⁶

¹ Služba interne medicine, Opća bolnica Šibensko-kninske županije

² Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci

³ Veleučilište u Šibeniku

⁴ Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Dubrava

⁵ Medicinski fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu

⁶ Zavod za znanstveno-istraživačku djelatnost, Klinička bolnica Dubrava

Na jesenskom sastanku Kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem u Vinkovcima u studenom 2024. Radna skupina za Ph-negativne mijeloproliferativne neoplazme (MPN) Krohema prikazala je rezultate online upitnika o stavovima i preferencijama hrvatskih hematologa o zdravstvenoj skrbi odraslih bolesnika s MPN u Republici Hrvatskoj (RH). U online anketi je sudjelovao 31 hrvatski hematolog, uglavnom iz kliničkih ustanova (71,9%) i većinom (53,3%) s dugogodišnjim (>10 godina) iskustvom u liječenju MPN. Ukratko, rezultati prikazane ankete pokazali su kako se hrvatski hematolozi jako dobro pridržavaju trenutno važećih međunarodnih smjernica (*European Leukemia Network-ELN*) za dijagnozu, stratifikaciju rizika i liječenje bolesnika s MPN. Točnije, većina ispitanika koristi ELN-ov skor (koji u obzir uzima dvije varijable: starija životna dob i preboljela tromboza) i revidirani IPSET (engl. *International Prognostic Score for Thrombosis in ET*; u obzir uzima tri varijable - dob > 60 godina, preboljela tromboza i prisutnost JAK2V617F mutacije) za stratifikaciju rizika bolesnika s policitemijom verom (PV) i esencijalnom trombocitemijom (ET), dok su IPSS (engl. *International Prognostic Scoring System*, 22,6%) i dinamički IPSS (DIPSS, 64,5%) najčešće korišteni skorovi za procjenu rizika bolesnika s mijelofibrozom (MF). Hidroksiureja je i dalje najčešće korišten citoreduktivni agens za prvu liniju liječenja visokorizičnih bolesnika s PV (87,1%) i ET (80%), nakon čega slijede različiti oblici interferona. Kod bolesnika rezistentnih/intolerantnih na hidroksiureju, hrvatski hematolozi najčešće koriste ruxolitinib kod bolesnika s PV (32,3%), te interferone (48,4%) i anagrelid (25,8%) u bolesnika s ET. Eritropoetin je najčešće korišten (51,6%) za liječenje anemije, a ruxolitinib (93,5%) za liječenje splenomegalije u bolesnika s MF. Recentnim dolaskom ropeginterferona na hrvatsko tržište te ruxoli-

tiniba na listu Posebno skupih lijekova za liječenje PV, moguće je da će se ovi podaci i ponešto mijenjati. Zanimljivo, hrvatski hematolozi smatraju nove antikoagulanse (npr. rivaroksaban, apiksaban, dabigatran i edoksaban) sigurnim u liječenju bolesnika s MPN i koristi ih preko 90% ispitanika, dok su primjena acetilsalicine kiseline u više dnevnih doza kao i primjena MPN-SAF (engl. *Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form*) upitnika za procjenu simptoma bolesti bili vrlo slabo zastupljeni. Konačno, čak dvije trećine hematologa ima mogućnost uključiti bolesnike s MPN u kliničke studije u svom centru. Sve navedeno sugerira kako je zdravstvena skrb bolesnika s MPN u RH zaista na visokoj razini.

Rezultati provedenog istraživanja objavljeni su u časopisu *Journal of Clinical Medicine* na koji upućujemo sve zainteresirane čitatelje ukoliko o istima žele saznati više detalja (1). Naredni koraci Radne skupine KROHEM-a za Ph-negativne MPN su istražiti epidemiologiju MPN u RH, te izrada smjernica za ET, PV i klonalnu hematopoezu neodređenog značaja (engl. *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential, CHIP*).

Literatura:

1. Krečak I, Lucijanić M, Kušec R. Survey of Clinical Practice in Chronic Myeloproliferative Neoplasms in Croatia: A Study by the MPN Working Group Party of the Croatian Cooperative Group for Hematologic Diseases (KROHEM). *J Clin Med*. 2025;14(5):1524.

Mijeloproliferativna neoplazma s istovremenim prisustvom fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F – prikaz slučaja

Marija Drinovac¹, Željka Tkalić Švabek¹, Biljana Jelić Puškarić², Inga Mandac Smoljanović³,
Mirjana Mariana Kardum Paro¹

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

² Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

³ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Uvod

Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) razlikuje Philadelphia (Ph) pozitivne i Ph negativne mijeloproliferativne neoplazme (MPN). Prisustvo Ph kromosoma nastalog translokacijom dijelova dugih krakova kromosoma 9 i 22 na molekularnoj razini znači prisustvo fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 koji ukazuje na dijagnozu kronične mijeloične leukemije (KML) kao jedine Ph pozitivne MPN, dok njegovo odsustvo ukazuje na drugu skupinu, Ph negativne MPN i dijagnozu policitemije vere (PV), esencijalne trombocitemije (ET), primarne mijelofibroze (PMF), a rijetko na kroničnu neutrofilnu leukemiju (KNL), kroničnu eozinofilnu leukemiju (KEL) i nespecificirane MPN (1).

Somatske mutacije u genima uključenim u signalizaciju tirozin kinaze (JAK2, MPL i CALR) predstavljaju ključne molekularne događaje u patogenezi Ph negativnih MPN (2). Mutacija JAK2 V617F karakteristična za PV, no prisutna i u drugim MPN (ET i PMF) uzrokuje konstitutivne aktivacije JAK-STAT signalnog puta i u konačnici nekontroliranu proliferaciju krvnih stanica. Za razliku od fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 u KML, koji aktivira više signalnih puteva, uključujući posredno i JAK-STAT signalni put, mutacija JAK2 V617F uzrokuje izravnu i trajnu aktivaciju JAK-STAT signalizacije, neovisno o vezanju citokina na njihove specifične receptore za hematopoetske čimbenike rasta. Ova razlika u mehanizmu aktivacije JAK-STAT signalnog puta odražava se i na biološke karakteristike te terapijski odgovor u Ph pozitivnim i Ph negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN) (1, 2).

Istovremeno postojanje fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F u bolesnika s dijagnozom KML je izuzetno rijetka koja može značajno promijeniti kliničku sliku, tijek bolesti i odgovor na terapiju (3).

Ovdje izvještavamo o slučaju bolesnice kojoj je postavljena dijagnoza KML i potvrđeno istovremeno postojanje fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F s naglaskom na njihov među-

odnos, klinički značaj, utjecaj na terapijske odluke i ishod liječenja.

Prikaz slučaja

Bolesnica, 72 godine, je u veljači 2016. godine upućena u Kliničku bolnicu Merkur radi učestalih, sporadičnih hematoma (promjera do 3 cm) na trupu i ekstremitetima. Na osnovu kliničkih karakteristika i rezultata laboratorijskih pretraga (hematoloških i biokemijskih), u veljači 2016. godine postavljena je sumnja na hematološku bolest (KML), a bolesnica je podvrgnuta daljnjoj laboratorijskoj i citološkoj obradi.

Laboratorijska obrada pri sumnji na hematološku bolest

Početna laboratorijska obrada obuhvatila je hematološke i biokemijske pretrage u venskoj krvi i serumu te citološku analizu punktata i biopsiju koštane srži. U nalazu krvne slike (hematološki brojčar Sysmex XN-2000, Siemens, Njemačka) utvrđena je leukocitoza ($28,02 \times 10^9/L$) i trombocitoza ($555 \times 10^9/L$) te povišena aktivnost laktat dehidrogenaze (LD) (biokemijski analizator DxC 700 AU, Beckman Coulter, Njemačka) (Tablica 1.).

Tablica 1. Rezultati hematoloških i biokemijskih pretraga početne laboratorijske obrade.

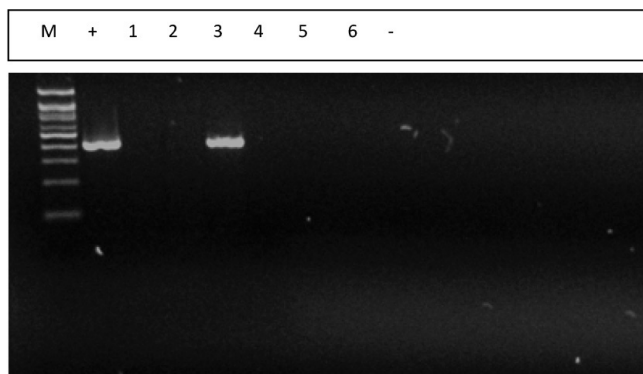
HEMATOLOGIJA			
Pretraga	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
Leukociti	28.02	$10^9/L$	3.4 - 9.7
Eritrociti	4.45	$10^{12}/L$	4.34 - 5.72
Hemoglobin	129	g/L	138 - 175
Hematokrit	0.375	L/L	0.415 - 0.530
Trombociti	555	$10^9/L$	158 - 424
BIOKEMIJA			
Pretraga	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
Kalij	4.3	mmol/l	3.9 - 5.1
Natrij	140	mmol/l	137 - 146

Glukoza	6.8	mmol/l	4.4 - 6.4
Ureja	6.2	mmol/l	2.8 - 8.3
Kreatinin	55	μmol/l	49 - 90
Laktat dehidrogenaza (LD)	325	U/L	< 241
Aspartat aminotransferaza (AST)	30	U/L	11-34
Alanin - aminotransferaza (ALT)	50	U/L	8-14
Gama - glutamiltransferaza (GGT)	79	U/L	9-35
Alkalna fosfataza (ALP)	48	U/L	63-135

Citološka analiza punktata i biopsija koštane srži pokazala je da se radi o hipercelularnom uzorku s omjerom hematopoetskih loza pomaknutim u korist granulocitne loze, bujne granulopoeze uz zastupljene sve razvojne stadije te mjestimice brojnije eozinofile, dok nezrele stanice nisu umnožene. Eritropoeza je umjereno zastupljena i normoblastična. Zapažen je povećan broj megakariocita, neki sitni i mononuklearni, uz poneki mikromegakariocit, mjestimično prisutni i „sea-blue” histioci. Citološki nalaz je odgovarao slici MPN.

Molekularnom analizom (izolacija ukupne RNA, reverzna transkripcija u komplementarnu DNA (cDNA), umnažanjem metodom reverzne transkripcije lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR), elektroforeza na 2% agarozu je u punktu koštane srži dokazala prisustvo fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 (podtip e14a2) (Slika 1.), ali ne i mutacije JAK2 V617F (Slika 2.). U bolesnice je u veljači 2016. po završenoj hematološkoj obradi postavljena dijagnoza KML.

Slika 1. Molekularna analiza fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 pri sumnji na hematološku bolest (KML) (2 % agarozni gel).

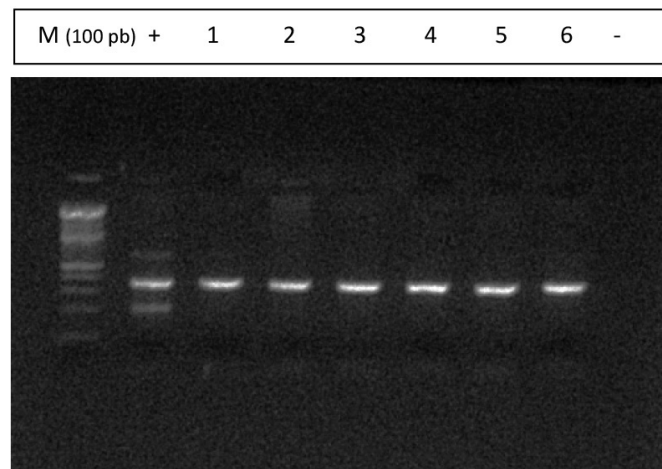


Legenda:

M = molekularni biljeg (veličine fragmenata 100 pb)
 (+) = pozitivna kontrola dokazano pozitivna na fuzijski onkogen BCR::ABL1
 (3) = dokazan fuzijski onkogen BCR::ABL1 (podtip e14a2) u punktu koštane srži
 (2,4,5,6) = uzorci negativni na fuzijski onkogen BCR::ABL1

(-) = uzorak negativan na fuzijski onkogen BCR::ABL1 (ultračista voda, negativna kontrola)

Slika 2. Molekularna analiza mutacije JAK2 V617F pri sumnji na hematološku bolest (KML) (2 % agarozni gel).

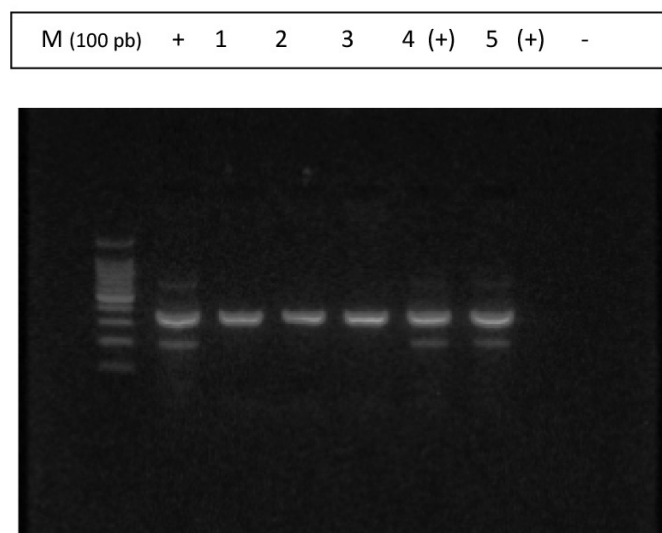


Legenda:

M = molekularni biljeg (veličine fragmenata 100 pb)
 (+) = pozitivna kontrola, uzorak dokazano pozitivan na mutaciju JAK2 V617F
 (1-6) = uzorci negativni na mutaciju JAK2 V617F u punktu koštane srži (KS) i venskoj krvi (vK)
 (-) = uzorak negativan na mutaciju JAK2V617F (ultračista voda, negativna kontrola)

S obzirom na kontinuirani porast broja trombocita od veljače 2016., dvije godine nakon postavljanja dijagnoze KML, ponovljena molekularna analiza je potvrdila prisustvo mutacije JAK2 V617F u uzorku venske krvi (Slika 3.).

Slika 3. Molekularna analiza mutacije JAK2 V617F u bolesnice s dijagnozom KML (2 % agarozni gel).



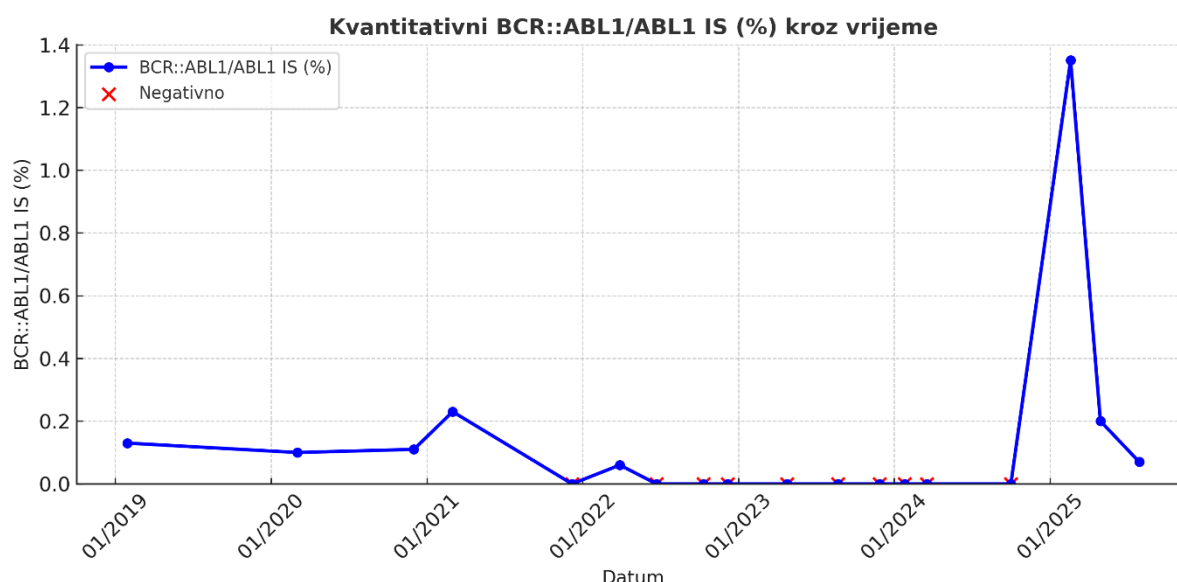
Legenda:

M = molekularni biljeg (veličine fragmenata 100 pb)
 (+) = pozitivna kontrola, uzorak dokazano pozitivan na mutaciju JAK2 V617F
 (4,5) = uzorak pozitivan na mutaciju JAK2 V617F u venskoj krvi (vK)
 (-) = uzorak negativan na mutaciju JAK2V617F (ultračista voda)

Terapija i ishod liječenja

Nakon postavljanja dijagnoze KML, bolesnica je liječena inhibitorima tirozin kinaze. Inhibitorom tirozin kinaze druge generacije je postignut duboki molekularni odgovor (MR4.5) koji je tijekom redovnih godišnjih kontrola u bolesnice praćen molekularnom metodom (RQ-PCR) pokazujući stabilnu molekularnu remisiju 3 godine (01/2022.- 01/2025.)

Slika 4. Molekularni odgovor na liječenje inhibitorom tirozin kinaze druge generacije u bolesnice s dijagnozom KML (nakon potvrde istovremenog postojanja fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F).



Na početku liječenja inhibitorom tirozin kinaze druge generacije, broj kopija fuzijskog prijepisa BCR::ABL1 standardiziranog prema međunarodnoj skali (BCR::ABL1/ABL1 IS (%)) je nizak, a nakon gotovo 3,5 godine liječenja (06/2022.g.) postignuta je potpuna remisija osnovne bolesti (BCR::ABL1/ABL1 IS (%) je negativan; na Slici 4. označeno crvenim) u trajanju od gotovo 2,5 godine (do 10/2024.g.). Tijekom 2025.g. u molekularnom odgovoru na liječenje povremeno se pojavljuje naznaka minimalne ostatne bolesti, što ukazuje na potrebu učestalijeg praćenja molekularnog odgovora i/ili prilagodbu terapije. Nakon potvrde istovremenog postojanja fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F pristup liječenju je dodatno individualiziran radi bolje kontrole obje komponente MPN.

Rasprava

Istovremeno postojanje fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F u MPN je rijedak nalaz, s učestalošću manjom od 1 %. Iako su povezane s različitim entitetima, istovremeno prisustvo ukazuje na odvojene, ali paralelne i klonalne populacije unutar hematopoetskog sustava. Najvje-

(Slika 4).

Na slici 4 prikazana je dinamika broja kopija fuzijskog prijepisa BCR::ABL1 standardiziranog prema međunarodnoj skali (BCR::ABL1/ABL1 IS (%)) tijekom liječenja inhibitorom tirozin kinaze druge generacije uz razdoblja potpune remisije osnovne bolesti (Slika 4).

rojatnije nisu slučajne, nego odražavaju dinamičnu klonsku evoluciju MPN (4 - 6). U većini dosad prikazanih slučajeva postojanje fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 opisuje se kao primarni događaj, a mutacija JAK2 V617F sekundarni kao i u ovom prikazu slučaja. Redoslijed bi mogao ukazivati na klonsku evoluciju MPN i genetsku nestabilnost uzrokovanu dugotrajnom proliferacijom BCR::ABL1 pozitivnih stanica. Noviji radovi ukazuju da se u pojedinim slučajevima fuzijski onkogen BCR::ABL1 može razviti unutar već postojećeg klona s mutacijom JAK2 V617F, što ukazuje i potvrđuje postojanje složene biološke heterogenosti i patogeneze rijetkih kombinacija (7 - 9). Primjenom različitih inhibitora tirozin kinaze u većine se bolesnika (7 od 9; 78 %) postiže molekularna remisija, no prisustvo mutacije JAK2 V617F u bolesnika s dijagnozom KML može promijeniti kliničku sliku bolesti, osobito u slučajevima trombocitoze kao što je i u prikazanom slučaju. Stoga je od osobite važnosti u bolesnika s dijagnozom KML i atipičnim laboratorijskim nalazima (perzistirajućom i napredujućom trombocitozom) pravodobno prepoznati moguću pojavu dodatne klonalne populacije, odnosno mijeloproliferativne kompo-

nente ponavljanjem molekularne analize na prisustvo mutacije JAK2 V617F (9).

Zaključak

Ovo je jedan od rijetkih slučajeva koji daje uvid u liječenje bolesnika s istovremenom prisutnošću fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 i mutacije JAK2 V617F u bolesnice s dijagnozom KML. Prisutnost fuzijskog onkogenog BCR::ABL1 predstavlja primarni događaj, dok je mutacija JAK2 V617F otkrivena tijekom praćenja osnovne bolesti molekularnom analizom mutacije JAK2 V617F radi perzistirajuće, napredujuće trombocitoze. U ovom prikazu slučaja, unatoč razvoju mutacije JAK2 V617F tijekom praćenja molekularnog odgovora na liječenje inhibitorom tirozin kinaze druge generacije, postignuta je potpuna remisija osnovne bolesti pravodobnom prilagodbom terapije i učestalijim redovitim praćenjem. Ovakvi slučajevi naglašavaju upravo njihovu važnost u situacijama kada se tijekom liječenja pojave novi genetski događaji koji mogu promijeniti biološko ponašanje bolesti i utjecati na ishod liječenja.

Literatura:

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703–1719.
2. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779–1790.
3. Soderquist C, Ewalt M, Czuchlewski D, et al. Myeloproliferative neoplasms with concurrent BCR–ABL1 translocation and JAK2 V617F mutation: a multi-institutional study from the Bone Marrow Pathology Group. *Mod Pathol*. 2018;31(5):690–704.
4. Hirschbuehl K, Schmitt-Graeff A, Erben P, et al. Concurrent occurrence of JAK2-V617F positive polycythemia vera and BCR–ABL positive chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2006;30(5):695–698.
5. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Coexistence of JAK2 V617F and BCR–ABL1 translocations in hematological malignancies: a single institution experience. *Leukemia*. 2016;30(5):1125–1128.
6. Pagnano KB, Finazzi G, Almeida AM, et al. Clinical, morphological and genetic characteristics of patients with concurrent presence of JAK2 V617F and BCR::ABL1. *Leuk Res*. 2025;141:107345.
7. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Concurrent JAK2 V617F mutation and BCR–ABL1 translocation: report on a new case and review of the literature. *Leukemia*. 2007;21(8):1824–1826.
8. Zhou A, Knoche EM, Engle EK, Abukhdeir AM, Gocke CD, Batista DA, et al. Coexistence of BCR–ABL1 and JAK2 V617F in myeloproliferative neoplasms: clinical and molecular characterization of a series of cases. *Haematologica*. 2017;102(12):e478–e481.
9. Banerjee S, Yadav A, Kumar R, Gupta R, Jha R, Sharma P, et al. Coexistent BCR::ABL1 and JAK2 V617F: a case report and a brief review of literature. *J Med Sci*. 2025;11(1):1–4.

Jednostavno KML ili nije baš tako jednostavno?

Margareta Radić Antolic¹, Monika Kolundžić¹, Ivana Lapić^{1,2}, Toni Božac¹, Ivana Franić Šimić¹, Dubravka Sertić³, Pavle Rončević³, Dubravka Čaržavec⁴, Dunja Rogić^{1,2}, Renata Zadro⁵

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

²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

³Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

⁴Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

⁵Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Specijalna bolnica Sveta Katarina, Zagreb, Hrvatska

Liječenje bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom (KML) tirozin kinaznim inhibitorima (TKI) značajno je poboljšalo kvalitetu njihova života, ali i produžilo životni vijek.

Preporuke Europske leukemijske mreže (engl. *European LeukemiaNet*, ELN) iz 2025. godine za KML upozoravaju na važnost dokazivanja dodatnih kromosomskih promjena (engl. *Additional Chromosomal Abnormalities*, ACA) pri postavljanju dijagnoze KML-a u kroničnoj fazi bolesti, a sve se više govori i o dodatnim genskim promjenama u obliku točkastih mutacija, delecija i duplikacija te preuredbi na razina drugih gena izuzev *BCR::ABL1*. Upravo te dodatne promjene, bilo da se nalaze u KML staniци ili u nekoj drugoj stanici hematopoeze, mogu otežati liječenje TKI-om pojavom neželjenih događaja (neutropenije, anemije, trombocitopenije, itd.) za koje nije jasan ni mehanizam ni točan uzrok djelovanja. Ako je poznato da su najčešće ACA u kroničnoj fazi KML-a trisomija 8 (+8), dupli Philadelphia kromosom (+Ph), izokromosom 17q (i(17q)) i trisomija 19 (+19), a najčešće genske promjene mutacije u genima *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *BCORL1*, *KMT2D*, *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2* i *TP53*, može se zaključiti da se radi o promjenama karakterističnima za mijelodisplaziju (MDS), akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) ili mijeloproliferativnu neoplazmu (MPN), a prisutne su u 25 % KML bolesnika pri dijagnozi bolesti. Iako samo njih trećina razvija neki oblik rezistencije ili progresije bolesti, ostaje oko 8 % KML bolesnika kojima je potrebna dodatna dijagnostička obrada i značajno veći angažman liječnika pri ostvarivanju terapijskih ciljeva u liječenju KML-a.

KML bolesnici koji očekivano postignu terapijski odgovor i uspješno se liječe godinama, imaju prosječno vrijeme preživljenja slično općoj populaciji. Ipak, starenjem povećavaju vjerojatnost razvoja druge neoplazme (neovisno o KML-u), što može biti slično učestalosti u općoj populaciji, ali i češće. Tome pogoduje nestabilnost genoma KML stanica, modulatorski efekti TKI-a te dodatne genske i

kromosomske promjene nastale naknadno tokom liječenja.

Primjer iz rutinskog rada je 56-godišnji bolesnik s dijagnozom KML-a od 2/2023. godine. Dijagnostičkom obradom dokazana je t(9;22)(q34;q11) i fuzijski priјepis *BCR::ABL1* (e14a2) te započeta terapija imatinib mesilatom. S obzirom da bolesnik tijekom dvije godine nije postigao molekularni odgovor niti na jedan od primijenjenih TKI-a (*BCR::ABL1/ABL1* >20%IS u cijelom razdoblju praćenja), u nekoliko navrata analiziran je mutacijski status tirozin kinazne domene *ABL1* gena, a mutacije ni u jednom uzorkovanju nisu bile dokazane. Citogenetičkom analizom u praćenju, također nije dokazana ni jedna dodatna kromosomska promjena, a kako je bolesnik razvijao i citopeniju, učinjeno je sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) uzorka koštane srži zbog sumnje na promjene u drugim genima, kako predlažu smjernice KroHema za KML iz 2025. godine. Ciljanim NGS mijeloidnim panelom utvrđena je mutacija u *ASXL1* genu (NM_015338.6 c.1934dup p.(Gly646TrpfsTer12)) s frekvencijom mutiranog alela (engl. *Variant Allele Frequency*, VAF) od 20%. Smatra se da mutacije u *ASXL1* genu koje dovode do poremećaja njegove funkcije rezultiraju poremećajima u ekspresiji gena i remodeliranju kromatina, destabiliziraju već oštećene mehanizme u stanicama i dovode do klonalne evolucije. Bolesnici koji pri dijagnozi imaju *ASXL1* mutacije su mlađe životne dobi, teže postižu ili uopće ne postižu odgovor na liječenje TKI, razvijaju komplikacije u obliku citopenija te brže razvijaju blastičnu fazu bolesti.

Slijedi opis tri različita slučaja bolesnika s KML-om, kojima je dokazana translokacija t(9;22)(q34;q11) te fuzijski priјepis e14a2/e13a2 *BCR::ABL1*, bez dodatnih kromosomskih promjena pri dijagnozi, a u praćenju im je dokazana sekundarna mijeloproliferacija. Postavljanje dijagnoze sekundarne MPN uz postojeći KML može biti izazovno zbog sličnih laboratorijskih nalaza i kliničkih simptoma, kao i

liječenje koje može biti kompleksno zahvaljujući ekspresiji oba fenotipa bolesti.

Prvi slučaj je 61-godišnja bolesnica koja je započela liječenje imatinib mesilatom te postigla maksimalni molekularni odgovor (engl. *Major Molecular Response*, MMR), ($BCR::ABL1/ABL1 \leq 0,1\%$ IS), koji je održan kroz 5 godina. Na rutinskoj kontrolnoj obradi požalila se na opću slabost i umor. S obzirom da nije bilo promjena u rezultatu kvantitativnog $BCR::ABL1$, osim što je ekspresija kontrolnog gena bila 5x veća od uobičajene, učinjena je kompletna reevaluacija bolesti. U mijelogramu je bilo prisutno 45% mijeloblasta, a citogenetičkom analizom dokazana je trisomija 8 bez prisustva $t(9;22)(q34;q11)$. Molekularnom analizom dokazana je interna tandemna duplikacija (ITD) u genu *FLT3*, a naknadnim NGS-om i mutacije u genima *NPM1* (NM_002520 c.863_864insCTCG Trp288Cysfs*12), VAF =31% i *DNMT3A* (NM_175629 c.2645G>A Arg882His), VAF=36% te je potvrđena dijagnoza AML. Iz navedenog se može zaključiti da je došlo do razvoja nove mijeloidne neoplazme neovisno o već postojećem KML-u što je prema literaturi u 7 % slučajeva.

Drugi slučaj je 65-godišnja bolesnica koja je tijekom dvanaestogodišnjeg liječenja promijenila nekoliko različitih TKI-a (imatinib, dasatinib i bosutinib) zbog komplikacija (pleuralni izljevi) uzrokovanih nuspojavama. Uvođenjem reducirane doze nilotiniba održavan je stalan molekularni odgovor MR4 ($BCR::ABL1/ABL1 \leq 0,01\%$ IS) tijekom 3 godine. Rutinskom hematološkom kontrolom uočena je citopenija te je zatražena reevaluacija s biopsijom kosti. Patohistološki nalaz upućivao je na prisutnost mijelodisplazije s fibrozom gradusa 1. Citogenetičkom analizom utvrđena je trisomija 8 bez prisustva $t(9;22)(q34;q11)$. Godinu dana kasnije, bolesnica je prekinula terapiju nilotinibom zbog suspektog cerebrovaskularnog događaja. U navedenom razdoblju došlo je do progresije citopenije, a javili su se i sve jači klinički simptomi (bol u kostima, slabost, umor). Laboratorijskom obradom potvrđena je dijagnoza MDS-a uz već poznatu trisomiju 8, te je dodatno dokazana i točkasta mutacija *JAK2 V617F*.

Treći slučaj je 61-godišnja bolesnica na terapiji imatinib mesilatom kroz 4 godine te postignutim molekularnim odgovorom do razine MR5 ($BCR::ABL1/ABL1 \leq 0,001\%$ IS). Pojava anemije zahtijevala je proširenu laboratorijsku obradu kojom je potvrđena mijelofibroza gradusa 1 te aneuploidija kromosoma 8 i 9 (46xx,-8,+9). Narednih 5 godina, na reduciranoj dozi imatiniba (100mg/dan) i održa-

nim molekularnim odgovorom MR5, dolazi do pogoršanja periferne citopenije. Utvrđena je progresija fibroze na gradus 3 te utvrđen kompleksni kariotip (47xx, +9/ 46xx, del(12)(q22q24)), a molekularnom analizom dokazana je mutacija *JAK2 V617F*.

Postavljanje dijagnoze Ph negativne *JAK2 V617F* pozitivne MPN i KML u istog bolesnika opisano je u desetak slučajeva u literaturi, pri čemu je udio neoplastičnog klona bio veći u korist Ph negativne MPN. U našim slučajevima *JAK2 V617F* pozitivna MDS/MPN razvila se desetak godina od postavljanja dijagnoze KML-a.

Zadnjih dvadesetak godina, zbog izuzetno uspješnog terapijskog pristupa, standardiziranog laboratorijskog praćenja i jasnih smjernica u liječenju, KML je postala predvidiva bolest i u većini slučajeva rutinski pomalo nezanimljiva. Ipak, postoje izuzeci koji zahtijevaju dodatni angažman u kliničkom i dijagnostičkom pristupu. Osim toga, danas se puno govori o održavanju optimalne kvalitete života ovih bolesnika, a ne samo postizanju ciljnih odgovora na terapiju.

Literatura:

1. Apperley JF, Milojkovic D, Cross NCP, Hjorth-Hansen H, Hochhaus A, Kantarjian H, et al. 2025 European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2025;39:1797-813.
2. Cross NCP, Ernst T, Branford S, Cayuela JM, Deininger M, Fabarius A, et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2023;37:2150-67.
3. Loghavi S, Kanagal-Shamanna R, Khoury JD, Medeiros LJ, Naresh KN, Nejati R, et al.; WHO 5th Edition Classification Project. Fifth Edition of the World Health Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissue: Myeloid Neoplasms. *Mod Pathol*. 2024;37:100397.
4. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Gianelli U, Gangat N, Vannucchi AM, et al. The international consensus classification of myeloid neoplasms and acute Leukemias: myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*. 2023;98:166-79.
5. Smjernice Krohema za kroničnu mijeloidnu Philadelphia pozitivnu leukemiju 2025. Dostupno na: <https://www.krohema.hr/wp-content/uploads/2025/05/Smjernice-KML-2025-v.2.0.pdf> (pristupljeno 14.10.2025.)
6. Yoshimaru R, Minami Y. Genetic Landscape of Chronic Myeloid Leukemia and a Novel Targeted Drug for Overcoming Resistance. *Int J Mol Sci*. 2023;24:13806.
7. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2024;99:2191-212.

Metoda sekvenciranja nove generacije u svrhu mjerljive ostatne bolesti u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji - europske smjernice

Monika Kolundžić¹, Margareta Radić Antolic¹

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

Godine 2024. Europska leukemijska mreža (engl. *European LeukemiaNet, ELN*) donosi zadnje smjernice za dijagnostiku, prognostičke čimbenike i stratifikaciju rizika akutne limfoblastične leukemije (ALL) u odraslih. Za preciznu definiciju bolesti, odabir terapije te postavljanje dobrih temelja za praćenje minimalne ostatne bolesti (engl. *measurable residual disease, MRD*) potreban je cjelovit dijagnostički pristup.

Dijagnostika ALL-a, u prvom redu, sastoji se od morfološke karakterizacije stanica, odnosno blasta. Citološki nalaz definirat će akutnu leukemiju te razlikovati ALL od limfoblastičnog limfoma i ALL od akutne mijeloične leukemije. Nakon toga slijedi imunofenotipska analiza biljega stanične diferencijacije metodom protočne citometrije koja uključuje korištenje minimalno 8 različitih boja za obilježavanje staničnih antigena. Konačno, citogenetika i metode molekularne dijagnostike zaključit će genetičku karakterizaciju bolesti u vidu poremećaja na razini kromosoma i gena.

U okviru inicijalne dijagnostike važno je odrediti mogući biljeg praćenja bolesti budući da se tijekom liječenja bolesnika oslanja upravo na vrijednost mjerljive ostatne bolesti. S obzirom na veliku prognostičku vrijednost MRD odgovora kao pokazatelja uspješnosti terapije, ali i neovisnog čimbenika rizika bolesti, nove smjernice upravo preporučuju princip liječenja bolesnika temeljen na MRD odgovoru, a imperativ je standardizirana metodologija u njegovom određivanju.

Mjerljiva ostatna bolest jest kvantifikacija ostalih neoplastičnih stanica, odnosno blasta, ispod razine osjetljivosti citomorfologije. Nove smjernice predstavljaju dva modela ocjene MRD odgovora. Prvi model ima jasnije postavljene granice ocjene odgovora pri čemu kompletni MRD odgovor definira kao nemjerljivi MRD s minimalnom osjetljivosti metode od 0.01%, dok je MRD - neuspjeh bilo koji MRD pozitivitet iznad spomenute granice osjetljivosti u određenoj relevantnoj točki mjerenja. Problem interpretacije veže se za MRD odgovore tzv. sive zone, a to su negativni MRD s nedovoljnom osjetljivosti metode, MRD - pozitivitet ispod granice osjetljivosti od 0.01%, koji je mjerljiv ili nemjerljiv te nemjerljivi MRD - pozitivitet.

Neovisno o tome koji se interpretacijski model ko-

risti svaki nalaz MRD-a mora sadržavati vrstu uzorka koja je korištena (periferna krv ili koštana srž), razinu osjetljivosti metode i status MRD-a.

Do danas, razvijene su brojne različite tehnologije praćenja MRD-a, a u rutinskom radu najzastupljenije su metoda protočne citometrije i kvantitativni PCR u praćenju fuzijskih gena. Idealna metoda za određivanje MRD-a treba biti standardizirana, dovoljno osjetljiva i reproducibilna.

Protočna citometrija ima brojne prednosti; primjenjiva je u najvećem broju slučajeva ALL-a, rezultati su brzo dostupni, a sama osjetljivost metode je 0.1-0.01% (ovisi o broju analiziranih stanica i fluorescentnih boja koje se koriste u obilježavanju). Međutim, uzorci moraju biti analizirani u kratkom roku zbog ograničene vitalnosti stanica. Nerijetko je analiza otežana zbog hipocelularnosti koštane srži uzrokovane terapijom. Analiza može biti otežana i zbog promjene aberantnog fenotipa bolesti, zbog same evolucije blasta, ali i utjecaja terapije. Također, postavlja se i pitanje subjektivnosti budući da analiza ovisi o znanju i iskustvu analitičara. Fuzijski gen, poput *BCR::ABL1*, je vrlo stabilan biljeg praćenja u svim stadijima ALL-a. Osjetljivost kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR*) u praćenju fuzijskih gena je 0.01-0.001%, a sama metoda je jednostavna, jeftina i brza. Međutim, ova metoda primjenjiva je u otprilike 40% slučajeva kolika je i prosječna zastupljenost fuzijskih gena u ALL-u.

Klonalna preuredba gena za B-stanični imunoglobulin (Ig) i/ili klonalna preuredba gena za T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor, TCR*) vrlo je specifični biljeg praćenja bolesti na molekularnoj razini. Predstavlja svojevrsni *fingerprint* ALL-a bolesnika; specifični slijed gena nastaje u ranom stadiju razvoja B i T-staničnih progenitora somatskom rekombinacijom V, (D), J gena. Zlatni standard u kvantitativnom određivanju klonalnosti Ig/TCR jest alel-specifični kvantitativni PCR. Osjetljivost metode je 0.01-0.001% i to je prva u potpunosti standardizirana metoda praćenja MRD-a u ALL-u. Ipak, sama metoda vrlo je kompleksna. Nakon početne identifikacije klonalne preuredbе potrebno je dizajnirati specifične početnice za svakog bolesnika i svaku prisutnu

klonalnu preuredbu; slijedi RQ-PCR koji je potrebno dodatno optimizirati i prilagoditi prisutnoj klonalnoj preuredbi. Unatoč visokoj razini standardiziranosti i vrlo velikoj osjetljivosti metoda zbog svoje kompleksnosti i dugotrajnosti nije raširena u rutinskoj praksi.

Od 2012. godine radna grupa EuroClonality-NGS koja okuplja referentne laboratorije unutar EuroClonality organizacije kontinuirano radi na razvoju, standardizaciji i validaciji metode sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) za identifikaciju i kvantifikaciju klonalne preuredbi Ig/TCR gena. Prednosti NGS-a nad drugim molekularnim metodama već su poznate; NGS je visokoprotočna metoda koja istovremeno može sekvencirati više regija gena od interesa stoga je u kontekstu određivanja klonalnosti omogućila pokrivanje gotovo svih mogućih klonalnih preuredbi, budući da koristi univerzalne početnice za genske lokuse koji sudjeluju u rekombinaciji. Također, NGS omogućuje istovremenu analizu više različitih uzoraka bolesnika. Razvijena NGS metoda u određivanju klonalnosti koristi amplikon tehnologiju sekvenciranja te sadrži visoki stupanj kontrole kvalitete, unutarnju kontrolu za izvedbu sekvenciranja te kontrolu koja je ujedno i kalibrator prema kojem se identificirani klonalni rearanžmani kvantificiraju. Brojni radovi pokazuju odličnu korelaciju NGS metode sa zlatnim standardom, RQ-PCR-om, uz veću osjetljivost i specifičnost NGS metode. Osim toga, NGS metodom smanjen je cjelokupni procesni rad. Rezultati EuroClonality validacijske studije koja uspoređuje NGS sa metodom sekvenciranja po Sangeru dokazuju superiornost NGS metode u detekciji višeklonalnih preuredbi po bolesniku i otkrivanju leukemijskog klona uz prisutnu zdravu poliklonalnu pozadinu.

Osobito važna primjena NGS metode jest u području niskog MRD-a (<0.001%), u kojem metode poput RQ-PCR-a mogu dati lažno pozitivne rezultate. Iako je precizna kvantifikacija i dalje izazov, usporedne studije dokazale su veću pouzdanost razlikovanja stvarno negativnih od lažno pozitivnih rezultata. Osim toga, zaključeno je da molekularno nedefinirani MRD rezultati, tzv. siva zona (MRD negativni s nedovoljnom osjetljivošću metode ili pozitivni MRD ispod granice od 0.01%, mjerljivi i nemjerljivi) nisu granični rezultati upitne relevantnosti već da imaju svoju prognostičku vrijednost što je dokazano stopama incidencije relapsa i ukupnog preživljenja takvih bolesnika.

U usporedbama metode protočne citometrije i NGS-a dokazana je veća osjetljivost NGS metode, tj. veća stopa lažno negativnih rezultata MRD-a primjenom metode protočne citometrije. Potvrđena je i

veća prognostička vrijednost rezultata veće osjetljivosti dobivenih metodom NGS-a.

Zaključno, preporuka ELN-a i dokazano najbolja praksa u praćenju MRD-a bolesnika s ALL-om jest kombinacija minimalno dvije metode. NGS u MRD-u ima definitivni i veliki potencijal zbog svoje visoke protočnosti, veće osjetljivosti, specifičnosti i primjenjivosti te dodatne vrijednosti koju nam kao metoda nudi, a to je detekcija više različitih istovremeno prisutnih klonalnih preuredbi u bolesnika s ALL-om. Ipak, da bi se primjena ove metode raširila u rutinskoj praksi potrebno je još validacijskih studija za konačnu standardizaciju metode, ali i veći financijski kapacitet u odnosu na potrebe konvencionalnih molekularnih metoda.

Literatura:

1. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, i sur. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 2024 May 9;143(19):1891-1902.
2. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, i sur. Management of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 2024 May 9;143(19):1903-1930.
3. Contreras Yametti GP, Ostrow TH, Jasinski S, i sur. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Practice and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 13;13(8):1847.
4. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, i sur. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257-317.
5. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, i sur. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2159-71.
6. van der Velden VHJ, Dombrink I, Alten J, i sur. EuroMRD Consortium. Analysis of measurable residual disease by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. *Leukemia*. 2024 Jun;38(6):1315-1322.
7. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, i sur.; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):604-11.
8. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, i sur.; EuroClonality-NGS working group. 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*. 2019 Sep;33(9):2241-2253.
9. Kotrová M, Koopmann J, Trautmann H, i sur. Prognostic value of low-level MRD in adult acute lymphoblastic leukemia detected by low- and high-throughput methods. *Blood Adv*. 2022 May 24;6(10):3006-3010.
10. Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, i sur. High-sensitivity next-generation sequencing MRD assessment in ALL identifies patients at very low risk of relapse. *Blood Adv*. 2022 Jul 12;6(13):4006-4014.

Mjerljiva ostatna bolest u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Josip Knežević¹, Branimir Gizdić², Marija Ivić Čikara³, Ozren Jakšić^{3,4}

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

² Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinička bolnica Dubrava

³ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava

⁴ Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu

Mjerenje minimalne, odnosno mjerljive ostatne bolesti (prema engl. „measurable residual disease“ - MRD) u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji (B-KLL) danas ima središnje mjesto u procjeni dubine terapijskog odgovora i u prognozi ukupnog preživljenja. U tom je kontekstu potreba za standardiziranim, reproducibilnim i validiranim metodama detekcije MRD-a postala nužna, kako bi rezultati bili usporedivi među centrima i korisni za donošenje kliničkih odluka.

Uloga imunofenotipizacije u detekciji mjerljive ostatne bolesti u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Imunofenotipizacija protočnom citometrijom temelji se na prepoznavanju klonalnih B-stanica koje zadržavaju karakterističan fenotip CD19⁺CD5⁺ uz aberantnu ekspresiju dodatnih biljega poput CD20, CD23, CD43, CD79b, CD81, CD22, CD200 ili ROR1. ERIC (eng. *European Research Initiative on CLL*) preporuke naglašavaju potrebu za panelom koji obuhvaća najmanje šest imunofenotipskih biljega, a koji omogućuje jasnu razliku između leukemijskih i normalnih B-stanica te detekciju MRD-a do razine od 10⁻⁴. ERIC pritom propisuje obvezne i preporučene biljege praćenja te kombinaciju fluorokroma u 5 epruveta po 4 flurokroma. (Tablica 1.). Takav pristup osmišljen je tako da ga mogu primjenjivati laboratoriji s lošijim tehničkim mogućnostima, uz očuvanje dijagnostičke osjetljivosti i usporedivosti rezultata (1, 2).

S druge strane, EuroFlow NGF (eng. *Next Generation Flow*) protokol za MRD u CLL koristi dvije epruvete po 8 boja (ukupno 12 markera: CD19, CD5, CD20, CD23, CD22, CD43, CD81, CD79b, CD10, CD200, ROR1, CD3/CD45) za precizno razlikovanje B-KLL stanica od normalnih B-stanica, uključujući i pacijente liječne rituximabom ili drugim terapijama koje mijenjaju fenotip. Osjetljivost metode doseže do 10⁻⁵ pri ≥ 5 –10 milijuna akviziranih događaja, uz standardizirane gating strategije i algoritme analize, što omogućuje visoku reproduktivnost i međulaboratorijsku usporedivost. Protokol se može

primjenjivati u perifernoj krvi za rutinsko praćenje MRD-a, dok se koštana srž koristi samo za potvrdu MRD-negativnosti ili u istraživačkim studijama (3).

Osjetljivost metode ovisi o broju analiziranih događaja i o kvaliteti dobivenog signala. Za detekciju MRD-a do razine 10⁻⁴ potrebno je analizirati najmanje jedan do dva milijuna leukocitnih događaja, dok je za granicu od 10⁻⁵ poželjno prikupiti pet do deset milijuna događaja. Rezultate je potrebno uvijek izražavati kvantitativno (npr. 0,001% leukocita) uz obavezno navođenje granice osjetljivosti. Termin „MRD-negativan“ treba izbjegavati te se preporuča termin „MRD – nedetektabilna“ i ona se smije se koristiti samo ako je uzorak analiziran do deklarirane granice osjetljivosti i ako u toj razini nije detektirana klonalna populacija (4, 5).

Velik izazov u praksi predstavlja terapijom inducirana modulacija izražaja površinskih antigena. Ciljane terapije, primjerice monoklonska protutijela protiv CD20 ili CD19, ali i novi oralni inhibitori signalnih puteva, mogu promijeniti fenotip leukemijskih stanica i time otežati njihovu identifikaciju. Zbog toga se preporučuje korištenje dopunskih biljega (CD43, CD79b, ROR1) te redovito ažuriranje panela u skladu s terapijskim protokolima. Novije publikacije EuroFlow konzorcija upravo iz tog razloga proširuju standardni panel i validiraju njegove izvedenice prilagođene bolesnicima liječenima ciljanom terapijom.

Uspješno provođenje MRD analize zahtijeva strogu kontrolu kvalitete. Svaki laboratorij mora definirati i dokumentirati vlastiti limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ), provoditi internu validaciju i sudjelovati u vanjskim programima osiguranja kvalitete. ERIC i EuroFlow aktivno potiču laboratorije na međusobnu razmjenu podataka i na sudjelovanje u interlaboratorijskim usporedbama, što dugoročno vodi prema boljoj usporedivosti i pouzdanosti rezultata.

Prilikom izvještavanja rezultata nužno je navesti osnovne tehničke podatke: korišteni panel i fluorokrome, broj analiziranih događaja, granicu osjetljivosti, tip uzorka i eventualne terapijske okolnosti

koje mogu utjecati na fenotip. Dodatno, preporučuje se opisati interpretacijske granice i navesti koristi li laboratorij EuroFlow ili ERIC metodologiju. Na taj se način osigurava transparentnost i olakšava razumijevanje rezultata u kliničkom kontekstu.

U usporedbi s molekularnim metodama poput PCR-a i NGS-a, protočna citometrija nudi bržu i jeftiniju obradu uz dodatnu fenotipsku informaciju o ostalim staničnim populacijama u analiziranom uzorku. NGF pristupi danas postižu osjetljivost sličnu molekularnim metodama (do 10^{-5}), no prednost NGS-a ostaje u detekciji minimalnih rezidualnih klonova u slučajevima kada terapija uzrokuje gubitak ciljnih antigena. Stoga se u mnogim kliničkim studijama preporučuje kombinirano korištenje oba pristupa, osobito kod evaluacije dubokih remisija ili u istraživanjima novih lijekova.

Najčešće pogreške u provođenju MRD analize uključuju nedovoljnu akviziciju događaja, neadekvatnu kompenzaciju fluorokroma, neprepoznavanje terapijski induciranih promjena izražaja biljega i izostanak navođenja granice osjetljivosti u nalazu. Izbjegavanje tih pogrešaka i pridržavanje standardiziranih protokola ključno je za održavanje visoke pouzdanosti rezultata.

Zaključno, mjerenje MRD-a protočnom citometrijom u B-KLL-u postalo je nezaobilazan dio suvremene dijagnostičke i istraživačke prakse. Napori ERIC-a i EuroFlow-a rezultirali su visokom razinom standardizacije i mogućnošću postizanja vrlo visoke osjetljivosti metode, dok iwCLL konsenzusi definiraju njezin klinički značaj. Laboratoriji koji uvode ili nadograđuju MRD testiranje trebaju usvojiti standardizirane protokole, jasno izvještavati granice osjetljivosti te kontinuirano sudjelovati u programima harmonizacije i provjere kvalitete. U eri ciljane terapije i sve dubljih remisija, upravo MRD ostaje najsnažniji objektivni pokazatelj postignutog terapijskog učinka i temelj za buduće personalizirano vođenje bolesnika s B-KLL-om.

Tablica 1. Preporučene kombinacije protutijela i fluorokroma u procjeni ostatne bolesti u kroničnoj limfocitnoj leukemiji prema ERIC smjernicama.

FITC	PE	PerCPy5.5	APC	Aim
kappa	lambda	CD19	CD5	Clonal assessment
CD45	CD14	CD19	CD3	Limit of detection
CD20	CD38	CD19	CD5	CLL quantification
CD81	CD22	CD19	CD5	CLL quantification
CD79b	CD43	CD19	CD5	CLL quantification

Tablica 2. Preporučene kombinacije protutijela i fluorokroma u procjeni ostatne bolesti u kroničnoj limfocitnoj leukemiji prema Euroflow smjernicama (6).

	FITC	PE	PERCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-C750	BV421	BV510
1	CD79b	CD5	CD3	CD19	ROR1	CD38	CD27	IgD+IgM
2	CD22				CD180			

Uloga sekvenciranja nove generacije (NGS) u detekciji mjerljive ostatne bolesti u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Napretkom u razumijevanju biologije bolesti i razvojem visoko učinkovitih ciljanih terapija fokus kod liječenja B-KLL-a se mijenja. Od postizanja površinske remisije na ostvarivanje dubokog, molekularnog odgovora, koji se uz metodu protočne citometrije može kvantificirati mjerenjem minimalne rezidualne bolesti pomoću NGS-a. Sekvenciranje nove generacije pojavilo se kao najosjetljivija metoda za kvantificiranja MRD-a, što omogućava bolju stratifikaciju rizika, terapijske odluka i definiranje krajnjih ciljeva liječenja B-KLL-a (7).

Molekularne tehnike koje se upotrebljavaju za detekciju MRD-a su alel specifični oligonukleotidni PCR (ASO-PCR) i sekvenciranje nove generacije (NGS) (8).

ASO-PCR je metoda koja se temelji na detekciji B-KLL klona koji je bio prisutan kao dominantan klon prilikom postavljanja dijagnoze.

Ova metoda prvo identificira jedinstvenu, pacijent-specifičnu sekvencu DNA preuređenog gena za teški lanac imunoglobulina (IGH) u B-KLL klonu u dijagnostičkom uzorku, a nakon toga se dizajniraju specifične početnice (eng. *primers*) koje ciljaju upravo tu sekvencu, te omogućavaju njezinu amplifikaciju i kvantifikaciju u uzorcima uzetim tijekom praćenja.

ASO-PCR je vrlo osjetljiva metoda koja rutinski postiže granice detekcije između 10^{-4} i 10^{-5} .

Glavni nedostatak ove metode je da se za svakog pacijenta moraju dizajnirati i validirati specifične PCR početnice što ovu metodu čini dugotrajnom i vrlo skupom. Također nije primjenjiva kod svih bolesnika jer se ponekad ne uspije identificirati prikladan molekularni biljeg za praćenje, te zahtijeva dijagnostički uzorak s visokim udjelom tumorskih stanica i DNA visoke kvalitete.

Sekvenciranje nove generacije (NGS) predstavlja tehnološki iskorak u molekularnoj detekciji minimalne rezidualne bolesti i omogućava vrlo visoku osjetljivost.

I NGS je metoda koja se temelji na identifikaciji preuređenog gena za teški lanac imunoglobulina (IGH) u B-KLL klonu, te se V(D)J rekombinacija koristi kao jedinstveni tumorski biljeg (9).

Tijekom sazrijevanja, svaki B-limfocit nasumično spaja genske segmente – varijabilni (V), raznoliki (D) i spojni (J) unutar lokusa gena za teški lanac imunoglobulina (IGH) kako bi stvorio jedinstveni gen za B-stanični receptor (BCR). Ova jedinstvena V(D)J sekvencija, posebice hipervarijabilna regija CDR3 na spoju segmenata djeluje kao trajni i jedinstveni genetski barkod za taj B-limfocit i sve njegove potomke.

S obzirom da je B-KLL monoklonska ekspanzija jedne maligne B-stanice, sve leukemijske stanice kod bolesnika dijele identičnu sekvencu IGH V(D)J preuređenja. Taj klonotip se razlikuje od milijuna različitih IGH sekvenci prisutnih u bolesnikovim normalnim, poliklonskim B-limfocitima, što ga čini izuzetno specifičnim tumorskim biljegom za praćenje MRD-a (10).

Proces NGS MRD analize sastoji se od tri ključna koraka, od identifikacije biljega do njegove kvantifikacije.

Korak 1: Početna procjena klonalnosti

Za razliku od NGF-a koji može identificirati LAIP (od eng. Leukaemia-associated immunophenotypes) u bilo kojem uzorku, NGS-MRD je metoda praćenja koja je beskorisna bez početnog testa na dijagnostičkom uzorku. Potreban je početni uzorak s visokim udjelom bolesti, a najčešće se koristi uzorak kod dijagnoze ili relapsa. Iz tog se uzorka izolira DNA, te se provodi multipleks PCR s konsenzusnim početnicama koje ciljaju IGH, te u određenim slučajevima i gene za lokuse lakih lanaca (IGK/IGL), kako bi se amplificirali svi V(D)J rearanžmani. Bioinformatički će se identificirati dominantni, maligni klonotip (ili više njih) koji će se pratiti u kasnijim uzorcima. Ovaj korak nosi i logističke implikacije jer dijagnostički uzorak mora biti pravilno prikupljen, pohranjen (DNA je stabilna, za razliku od svježih stanica za NGF) i dostupan za sekvenciranje prije nego što se može započeti praćenje MRD-a (11, 12).

Korak 2: Priprema biblioteke i NGS

Iz uzoraka za praćenje MRD-a (periferna krv ili koštana srž) izolira se DNA i provodi se isti proces multipleks PCR-a i sekvenciranja. Kritičan faktor za postizanje visoke osjetljivosti je količina ulazne DNA. Postizanje osjetljivosti od 10^{-6} zahtijeva sekvenciranje količine DNA koja je ekvivalent mi-

lijuna ili više stanica što može biti ograničavajući faktor.

Korak 3: Bioinformatička analiza

Ovaj korak je vrlo važan dio NGS MRD analize. Vrlo je važna kontrola kvalitete jer sirovi podaci sekvenciranja moraju proći analizu provjere kvalitete, uključujući procjenu stopa pogrešaka i uklanjanje očitavanja niske kvalitete. Zatim identifikacija i grupiranje klonotipova gdje se sekvence obrađuju specijaliziranim informatičkim programom (npr. ARResT/Interrogate, LymphoTrack MRD ili slično) kako bi se identificirala upotreba V, D i J gena te sekvencija spojne regije. I konačno korekcija pogrešaka jer je veliki izazov razlikovanje stvarnih klonova niske frekvencije od pogrešaka unesenih tijekom PCR-a i sekvenciranja. Stopa pogrešaka može biti u istom rasponu kao i ciljana osjetljivost (10^{-6}) što stvara kritičan problem omjera signala i šuma. Neke metode koriste jedinstvene molekularne identifikatore (UMI) što su kratke, nasumične sekvence koje se dodaju svakoj molekuli DNA prije PCR-a što omogućava precizniju korekciju amplifikacije i pogrešaka sekvenciranja.

Na samom kraju radi se kvantifikacija gdje se broj očitavanja koji odgovara malignom klonu dijeli se s ukupnim brojem ekvivalenata stanica s jezgrom koje su sekvencirane (kalibriracija pomoću kontrolnih gena) kako bi se dobila kvantitativna MRD frekvencija (npr. broj stanica na milijun).

Složenost NGS MRD analize zahtijeva standardizaciju kako bi se osigurala pouzdanost i usporedivost rezultata (13). EuroClonality-NGS radna skupina je jedna od važnih organizacija za razvoj, standardizaciju i validaciju NGS testova za IG/TR gene u svrhu analize klonalnosti i MRD-a. Što uključuje validaciju setova početnica, uspostavljanje kontrola kvalitete i razvoj bioinformatičkih protokola poput DEPART algoritma za strukturiranu evaluaciju rezultata klonalnosti. Također postoje i komercijalni testovi kao što su clonoSEQ (Adaptive Biotechnologies) i LymphoTrack (Invivoscribe) koji nude standardizirane komplete i softverske alate (14, 15).

NGS je najosjetljivija od svih dostupnih metoda, sposobna detektirati jednu B-KLL stanicu na 1,000,000 leukocita (10^{-6}) pa čak i dublje što predstavlja povećanje osjetljivosti za 10 do 100 puta u usporedbi sa standardnim metodama (NGF i ASO-PCR).

Studije koje su se bavile uspoređivanjem metoda detekcije pokazuju izvrsnu podudarnost između NGS-a i NGF-a na pragu od 10^{-4} . Također vidjelo se

da većina bolesnika koji se smatraju uMRB prema NGF-u (uMRD4) zapravo imaju detektabilnu bolest primjenom NGS-a. Pokazalo se da su gotovo tri četvrtine bolesnika liječenih FCR-om s uMRD4 statusom i dalje su bili MRB-pozitivni prema NGS-u.

Izbor metode za procjenu MRD-a uključuje, naravno, kompromis između dostupnosti, preciznosti i cijene metode. NGF je široko dostupna, brza i ne zahtijeva početni uzorak, što ovu metodu čini praktičnom za široku kliničku upotrebu. NGS nudi neusporedivu osjetljivost i specifičnost ali dolazi s višim troškovima, duljim vremenom obrade i većom tehničkom složenosti. NGF je dostupan u većini hematoloških laboratorija, daje rezultate relativno brzo i može se izvesti na bilo kojem uzorku tijekom

praćenja. S druge strane, NGS zahtijeva specijaliziranu opremu, složenu bioinformatičku ekspertizu, početni dijagnostički uzorak za identifikaciju klona i ima dulje vrijeme do izdavanja nalaza (tipično do 30 dana). To dovodi do pitanja da li je visoko osjetljiva informacija dobivena NGS-om vrijedna povećanog logističkog i financijskog tereta. Konsenzus je danas da je za rutinsko praćenje s osjetljivošću 10^{-4} koju postiže NGF, ova metoda i praktičan izbor. Međutim, za klinička ispitivanja koja imaju za cilj dokazati eradikaciju bolesti, za odluke o terapiji vođene MRD-om (poput prekida liječenja) ili za bolesnike kod kojih se traži najdublji mogući odgovor, preciznost NGS-a postaje neophodna pa tako ove dvije metode imaju komplementarnu ulogu.

Tablica 3. Usporedba metoda za određivanje MRD-a.

Metodologija	Princip	Standardna osjetljivost	Maksimalna osjetljivost	Standardizacija	Prednosti	Nedostaci	Uzorak
Višeparameterska protočna citometrija	Detekcija aberantnog imunofenotipa pomoću fluorescentnih protutijela	10^{-4}	10^{-5} (NGF)	ERIC	Brza, široko dostupna, ne zahtijeva početni uzorak, relativno jeftina	Niža osjetljivost od NGS-a, subjektivnost analize, zahtijeva stručnost, mogući lažno negativni rezultati zbog promjene fenotipa	Svježa periferna krv ili koštana srž
ASO-qPCR	Kvantifikacija pacijent-specifičnog IGH preuređenja pomoću prilagođenih početnica	10^{-4} do 10^{-5}	10^{-5}	EuroMRD	Visoka osjetljivost i specifičnost	Dugotrajna, nije primjenjiva na sve bolesnike, te zahtijeva početni uzorak	DNA
Sekvenciranje nove generacije (NGS)	Kvantifikacija IGH preuređenja pomoću konsenzusnih početnica i visokoprotocnog sekvenciranja	$\geq 10^{-4}$	$\geq 10^{-6}$	EuroClonality-NGS	Najviša osjetljivost i specifičnost, univerzalna primjenjivost (s konsenzusnim početnicama)	Skuplja, dulje vrijeme obrade, zahtijeva početni uzorak, složena bioinformatika, potrebna visoka stručnost	DNA

Mjerljiva ostatna bolest u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji i liječenje

Cilj liječenja B-kronične limfocitne leukemije (B-KLL) jest postizanje kompletne remisije prema kriterijima međunarodne radne skupine za kroničnu limfocitnu leukemiju (engl. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia - iwCLL) (16). Međutim, postizanje kompletne remisije ne znači istodobno i totalnu eradikaciju klona bolesti. Sve boljim ishodima kemoterapijskog liječenja kao i pojavom ciljanih lijekova javila se i potreba za određivanjem dubljeg odgovora na terapiju te se u definiranje ishoda liječenja B-KLL-a uvodi pojam minimalne ostatne bolesti (engl. „MRD- Minimal

Residual Disease“). MRD se definira kao broj leukemijskih stanica u perifernoj krvi ili koštanoj srži nakon provedenog liječenja (16). Sama ideja MRD-a se u liječenju B-KLL-a javila već 1990-tih godina; u samim počecima uporabe metoda PCR-a i protočne citometrije u kliničkoj praksi.

Minimalna ostatna bolest je jedan od najvažnijih biomarkera B-KLL-a. Ima dijagnostičko (potvrda dijagnoze ili subtipa bolesti), prognostičko (procjena progresije ili relapsa bolesti bez liječenja) i prediktivno značenje (procjena odgovora na specifičnu terapiju), a može služiti i kao marker odgovora na pojedinu terapiju (najspecifičniji biomarker procjene dubine odgovora) ili kao monitoring tijekom i nakon

liječenja (17). U liječenju B-KLL-a MRD može imati pasivnu i aktivnu ulogu. Kao pasivni biomarker u kliničkim studijama može se određivati periodički zbog sustavnog praćenja odgovora tijekom trajanja terapije ili može poslužiti kao MRD na kraju liječenja (engl. „End Of Treatment MRD“; EOT-MRD). Važnost MRD-a ispitivana je u svim oblicima liječenja: u prvoj liniji, relapsno refraktornim oblicima bolesti, u kontekstu konsolidacijske terapije, u kontinuiranom liječenju kao i vremenski ograničenom liječenju. Na temelju rezultata kliničkih studija koje su dokazale kako je postizanje MRD-a pozitivan prediktor ukupnog preživljenja i preživljena bez progresije bolesti Europska agencija za lijekove je 2016. god., a Američka agencija za hranu i lijekove 2020. god. definirala korištenje MRD-a kao intermedijarnog cilja u kliničkim istraživanjima na temelju kojeg se može ubrzati odobrenje lijeka za kliničku uporabu (17,18,19). Kao aktivni marker liječenja MRD može služiti kao putokaz poboljšanja liječenja kod MRD pozitivnih bolesnika (primjerice intenzifikacija doze lijeka ili prolongacija liječenja), dok kod MRD negativnih bolesnika može služiti kao marker za deeskalaciju doze lijeka ili raniji prestanak liječenja. Međunarodna radna skupina za B-KLL je 2018. god. u izdanim smjernicama jasno definirala MRD u B-KLL-u kao jednu pozitivnu stanicu na 10 000 limfocita u perifernoj krvi ili koštanoj srži - MRD4 (16). Dolaskom novih lijekova postižu se sve dublji odgovori stoga se javlja potreba za standardizacijom metoda i objavom rezultata MRD-a te je 2021. god. izdan konsenzus od strane 174 eksperta o ključnim pitanjima, problemima i s jasnim preporukama za određivanjem MRD-a. Prema konsenzusu danas se umjesto naziva minimalan preporučuje naziv mjerljive ostatne bolesti (engl. Measurable Residual Disease), obzirom da se pojam minimalan odnosi na subjektivnu procjenu, a umjesto MRD negativnosti preporučuje se koristiti naziv nedetektabilni MRD (u-MRD) jer se stanice dokazuju do granice određene konsenzusom, što ne znači kako se ne bi mogle dokazati na niže postavljenom pragu (20).

MRD primarno određuje dubinu odgovora na liječenje i time pokazuje i superiornost liječenja pojedinih terapijskih opcija zbog čega se danas koristi gotovo u svim kliničkim studijama kao primarni ili sekundarni ishod (21). Prvi lijek s kojim je pokušano eradicirati MRD bio je alemtuzumab u kliničkoj studiji NCRN CLL207 i prvi put je dokazano da je postizanje nedetektabilnog MRD-a povezano s boljim OS-om i PFS-om (22). Prva terapija uz koju je kod značajnog dijela bolesnika postignut u-MRD

jest kemoterapija po FCR (fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab) što je dokazano u dvije studijama (23,24).

Ostale studije koje su kasnije uspjele dokazati kako postizanje u-MRD u prvoj liniji liječenja poboljšava preživljenje bez progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljenje (OS) bolesnika jesu studije s u kojima su bolesnici liječeni GClb (obinutuzumab, klorambucil), BR (bendamustin, rituksimab) te GB protokolu (obinutuzumab, bendamustin) (25,26,27).

Prve studije koje su učinkovitost venetoklaksa kod relapsno/refraktornih bolesnika procjenjivale MRD-om jesu MURANO, te CLARITY studij te su na neki način pokazale kako inkorporirati MRD u procjenu odgovora (28,29,30). MURANO je klinička studija faze tri koja je uspoređivala učinkovitost rituksimab-bendamustin (BR grupa) terapije s rituksimab venetoklaks (VR) terapijom. Nedetektabilni MRD je bio sekundarni cilj. U VR grupi 5-godišnji OS je iznosio 95% za bolesnike s u-MRD-om, dok je za bolesnike s detektabilnim MRD-om iznosio 72,9% (28). U CLARITY studiju uključeni su bolesnici s relapsno /refraktornom B-KLL-om liječeni kombinacijom ibrutiniba i venetoklaksa (I+R). Primarni cilj bio je odrediti udio bolesnika kod kojih je nakon 12 mjeseci kontinuirane terapije I+R postignuta kompletna remisija. MRD je određivan nakon osam, 14 i nakon 26 mjeseci, a trajanje terapije je određeno na temelju nalaza MRD-a na način da kod bolesnika kod kojih je u-MRD postignut nakon osam mjeseci je terapija nastavljena do 14 mjeseci, kod onih kod kojih je u-MRD postignut nakon 14 mjeseci terapija je nastavljena do 26. mjeseca, a kod onih kod kojih je u-MRD postignut tek u nakon 26 mjeseci ibrutinib je nastavljen kontinuirano do progresije ili toksičnosti (29). Nakon 12 mjeseci kontinuirane terapije u-MRD je postignut kod 36% bolesnika u perifernoj krvi i koštanoj srži. Studija je dokazala sinergistički učinak venetoklaksa i ibrutiniba, a obje studije su dokazale kako je postizanje u-MRD u pozitivnoj korelaciji s PFS-om i OS-om.

Kliničke studije E1912 i ELEVATE koje su ispitivale učinkovitost kontinuirane primjene inhibitora Brutonove kinaze (BTKi) kao monoterapije ili u kombinaciji s drugim lijekovima pokazale su kako nema značajne razlike u PFS-u između bolesnika s nedetektabilnim i detektabilnim MRD-om. Stoga se serijsko određivanje MRD-a tijekom terapije BTKi ne preporuča, a u kliničkim studijama u kojima se BTKi primjenjuju kontinuirano preporuča se da u-MRD definira kao sekundarni cilj (31,32,33).

U CAPTIVATE studiju uključeni su bolesnici s

neliječenom B-KLL koji su prvo liječeni s tri ciklusa ibrutiniba, a nakon toga još 12 ciklusa ibrutiniba i venetoklaksa nakon čega je određen MRD. Bolesnici s u-MRD-om su liječeni placebom ili ibrutinibom, a bolesnici s detektabilnim MRD-om ibrutinibom ili kombinacijom venetoklaksa i ibrutiniba. Jednogodišnje preživljenje bez bolesti se nije značajnije razlikovalo u skupini s u-MRD-om između bolesnika koji su nakon 12 mjeseci nastavili primati ibrutinib ili placebo što govori o potencijalnoj prednosti vremenski ograničene terapije kod bolesnika koji su postigli u-MRD (34).

FLAIR studija je individualizirala liječenje bolesnika s B-KLL-om na temelju nalaza MRD-a i pritom uspjela dokazati superiornost u odnosu na standardnu kemoterapiju po FCR protokolu. U studiji su uspoređivani rezultati liječenja bolesnika liječenih prema FCR protokolu te kombinacijom ibrutiniba i venetoklaksa (I+V). U potonjoj grupi trajanje liječenja je određeno

kao dvostruko vrijeme od postizanja u-MRD. Trogodišnji PFS je iznosio 92,7% (CI 95%) u I+V, a 76,8% u grupi bolesnika liječenih FCR-om (35). Ukupno trogodišnje preživljenje je iznosilo 98% u I+V grupi, te 93% u FCR grupi. Radi se o prvoj kliničkoj studiji koja je jasno definirala trajanje liječenja nakon postizanja u-MRD-a. Pokazano je kako se korištenjem MRD-a kao biomarkera ishoda liječenja mogu poboljšati rezultati ishoda liječenja, ali i individualizirati pristup liječenju, smanjiti mogućnost potencijalnih nuspojava te značajno smanjiti troškove u odnosu na kontinuiranu terapiju. Na temelju rezultata ove studije MRD-om vođena terapija prvi put je uključena i u kliničke ESMO smjernice (36).

B-kronična limfocitna leukemija je bolest koja zahvaća više odjeljaka (limfni čvorovi, slezena, koštana srž i periferna krv) što predstavlja potencijalni izazov u određivanju MRD-a jer čak i nakon postizanja nedetektabilnog MRD-a u koštanoj srži ili perifernoj krvi značajan udio B-KLL stanica se može zadržavati u drugim odjeljcima i služiti kao rezervoar za relaps bolesti (17). Pojedini lijekovi (primjerice antiCD20 protutijela) bolje djeluju u perifernoj krvi nego u koštanoj srži. Zanimljiva je primjerice analiza dvije kliničke studije CLL8 (FC vs FCR) i CLL10 (FCR vs BR) gdje je dokazano da je čak 39% bolesnika s parcijalnom remisijom prema iwCLL kriterijima imalo u-MRD u perifernoj krvi. Analiza je također pokazala kako nema značajnije razlike u PSF-u kod bolesnika s detektabilnim MRD i kompletnom remisijom u odnosu na bolesnike s postignutim u-MRD- i parcijalnom remisijom (37).

Slične rezultate je pokazala i analiza MURANO studije gdje je 86 od 197 pacijenata postiglo parcijalnu remisiju s uMRD-om. Analizom podskupina pokazano je kako nema razlike u ishodima liječenja kod bolesnika s uMRD-om s parcijalnom remisijom ili kompletnom remisijom (38). Slično tomu u TRANSCEND CLL 004 studiji u kojoj u se uključeni bolesnici s relapsno refraktnom B-KLL (R/R KLL) liječeni lisocabtagen-maraleucel-om čak 19 od 34 bolesnika sa stabilnom bolešću imalo je negativan MRD u perifernoj krvi (39).

U tijeku su također nove studije kako u prvoj liniji liječenja tako i u relapsno refraktornim oblicima u kojima su bolesnici liječeni trojnom terapijom (antiCD20 protutijelo, BTKi, venetoklaks). Rezultati ovih studija pokazuju veći postotak pacijenata s postignutim MRD-om te pozitivnu korelaciju u-MRD-a s PFS-om i OS-om (40,41,42).

Unatoč širokoj primjeni u kliničkim studijama, te jasnim odrednicama i sve većim naporima za preciznim definiranjem i standardizaciji metoda uloga MRD-a u kliničkoj praksi za sada ostaje nejasna i većina smjernica ne preporuča rutinsko određivanje tijekom liječenja. Rezultati svih studija pak jasno dokazuju kako se radi o jednom od najvažnijih prediktivnih i prognostičkih markera, međutim za širu primjenu kliničkoj praksi potrebne su nove randomizirane studije koje bi usporedile standardne opcije liječenja te dale nova saznanja o još uvijek neriješenim pitanjima o uporabi MRD-a (pravovremeno testiranje, koliko često pratiti MRD, što s MRD relapsom bez kliničkih znakova relapsa, itd.). Osim procjene dubine odgovora MRD je i odličan marker individualizacije trajanja terapije. Korištenjem MRD-a potencijalno se smanjuje kumulativna toksičnost lijeka, ali i smanjuju troškovi u zdravstvu (osobito u eri novih lijekova) te potencijalno povećava suradljivost dijela bolesnika (veća motivacija za liječenje kod vremenski ograničene terapije).

Literatura

1. Rawstron AC, et al. Improved flow cytometric analysis of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of the European Research Initiative on CLL (ERIC). *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(6):361-368.
2. Böttcher S, et al. Minimal residual disease quantification in chronic lymphocytic leukemia: a European Research Initiative on CLL (ERIC) update. *Leukemia.* 2021;35(11):2999-3012.
3. van Dongen JJM, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-1975.
4. Flores-Montero J, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in B-cell disorders: an EuroFlow study. *Leukemia.* 2017;31(10):2094-2103.
5. Rawstron AC, et al. ERIC and EuroFlow standardization of MRD detection in CLL by flow cytometry. *Haematologica.* 2019;104(9):1831-1839.
6. Engelman, Robby et al. "Novel Flow Cytometric Antibody Panel and Dedicated Analysis Algorithm for Automated Fully Standardized Minimal Residual Disease Detection in Chronic Lymphocytic Leukemia." *American journal of hematology* vol. 100,4 (2025): 724-728. doi:10.1002/ajh.27604
7. Song, Meiling et al. "Minimal Residual Disease Detection: Implications for Clinical Diagnosis and Cancer Patient Treatment." *MedComm* vol. 6,6 e70193. 15 May. 2025, doi:10.1002/mco2.70193
8. Sánchez, Ricardo et al. "Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies." *International journal of molecular sciences* vol. 20,11 2832. 10 Jun. 2019, doi:10.3390/ijms20112832
9. Hultcrantz, Malin et al. "Capture Rate of V(D)J Sequencing for Minimal Residual Disease Detection in Multiple Myeloma." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 28,10 (2022): 2160-2166. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2995
10. Groenen, Patricia J T A et al. "Read the clonotype: Next-generation sequencing-based lymphocyte clonality analysis and perspectives for application in pathology." *Frontiers in oncology* vol. 13 1107171. 8 Feb. 2023, doi:10.3389/fonc.2023.1107171
11. Wierda, William G et al. "Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations." *Leukemia* vol. 35,11 (2021): 3059-3072. doi:10.1038/s41375-021-01241-1
12. Logan, Aaron C et al. "High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 108,52 (2011): 21194-9. doi:10.1073/pnas.1118357109
13. Bacher, Ulrike et al. "Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use." *Blood cancer journal* vol. 8,11 113. 12 Nov. 2018, doi:10.1038/s41408-018-0148-6
14. Genuardi, Elisa et al. "Application of the Euro Clonality next-generation sequencing-based marker screening approach to detect immunoglobulin heavy chain rearrangements in mantle cell lymphoma patients: first data from the Fondazione Italiana Linfomi MCL0208 trial." *British journal of haematology* vol. 194,2 (2021): 378-381. doi:10.1111/bjh.17519
15. Brand, Michiel, et al. "EuroClonality-NGS Recommendations for Evaluation of B-Cell Clonality Analysis by Next-Generation Sequencing: A Structured Approach with the DEPART Algorithm." *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 25, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.06.011>.
16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131(25):2745-2760.
17. Research CfDEa. Hematologic malignancies: regulatory considerations for use of minimal residual disease in development of drug and biological products for treatment. 2020.
18. Fürstenau M, De Silva N, Eichhorst B, Hallek M. Minimal Residual Disease Assessment in CLL: Ready for Use in Clinical Routine?. *Hemasphere.* 2019;3(5):e287.
19. European Medicines Agency. Appendix 4 to the guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man – condition specific guidance. Ref number: EMA/CHMP/703715/2012 Rev. 2. Published Feb 15, 2016.
20. Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia.* 2021;35(11):3059-3072.
21. Böttcher S, Hallek M, Ritgen M, Kneba M. The role of minimal residual disease measurements in the therapy for CLL: is it ready for prime time?. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(2):267-288.
22. Hazem AS, Moreton P, Kennedy B, et al. Eradication of Minimal Residual Disease with Alemtuzumab in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated with Prolonged Survival and Is an Appropriate Therapeutic Endpoint for Relapsed CLL. *Blood.* 2007;110(11):3114
23. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):980-988.
24. Eichhorst B, Fink AM, Busch et al. Frontline Chemoimmunotherapy with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Shows Superior Efficacy in Comparison Bendamustine (B) and Rituximab (BR) in Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Final Analysis of an International, Randomized Study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 Study) *Blood* (2014) 124 (21): 19.
25. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370(12):1101-1110.
26. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):928-942.
27. Sharman JP, Burke JM, Yimer HA, et al. Phase 2, multicenter GIBB study of obinutuzumab plus bendamustine in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2021;62(4):791-800.
28. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax-rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* (2018) 378(12):1107–20.

29. Hillmen P, Rawstron AC, Brock K, Munoz-Vicente S, Yates FJ, Bishop R, et al. Ibrutinib plus venetoclax in Relapsed/Refractory chronic lymphocytic leukemia: The clarity study. *J Clin Oncol* (2019) 37(30):2722–9.
30. Fisher A, Goradia H, Martinez-Calle N, Patten P, Munir T. The evolving use of measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia clinical trials. *Front Oncol*. 2023;13:1130617. Published 2023 Feb 22.
31. Shanafelt TD, Wang XV, Hanson CA, et al. Long-term outcomes for ibrutinib-rituximab and chemoimmunotherapy in CLL: updated results of the E1912 trial. *Blood*. 2022;140(2):112-120.
32. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, et al. Efficacy and safety in a 4-year follow-up of the ELEVATE-TN study comparing acalabrutinib with or without obinutuzumab versus obinutuzumab plus chlorambucil in treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2022;36(4):1171-1175.
33. Wang XV, Hanson CA, Tschumper RC, et al. Measurable residual disease does not preclude prolonged progression-free survival in CLL treated with ibrutinib. *Blood*. 2021;138(26):2810-2827.
34. Wierda WG, Allan JN, Siddiqi T, et al. Ibrutinib Plus Venetoclax for First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Primary Analysis Results From the Minimal Residual Disease Cohort of the Randomized Phase II CAPTIVATE Study. *J Clin Oncol*.
35. Munir T, Cairns DA, Bloor A, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy Guided by Measurable Residual Disease. *N Engl J Med*. 2024;390(4):326-337.
36. Eichhorst B, Ghia P, Niemann CU, et al. ESMO Clinical Practice Guideline interim update on new targeted therapies in the first line and at relapse of chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol*. 2024;35(9):762-768
37. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3758-3765.
38. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *J Clin Oncol*. 2019;37(4):269-277.
39. Papp E, Ansari S, Wall J, Thompson E, Chen Y, Siddiqi, et al. Undetectable MRD Status in Patients with R/R CLL/SLL with Stable Disease after Lisocabtagene Maraleucel Treatment: Exploratory Analysis of the TRANSCEND CLL 004 Study. *Blood*. 2023;1 (142). 3263.
40. Eichhorst B, Niemann CU, Kater AP, et al. First-Line Venetoclax Combinations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2023;388(19):1739-1754.
41. Brown JR, Seymour JF, Jurczak W, et al. Fixed-Duration Acalabrutinib Combinations in Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2025;392(8):748-762.
42. Huber H, Tausch E, Schneider C, et al. Final analysis of the CLL2-GIVe trial: obinutuzumab, ibrutinib, and venetoclax for untreated CLL with del(17p)/TP53mut. *Blood*. 2023;142(11):961-972.

Prezentacija T-prolimfocitne leukemije s dvostruko pozitivnim CD4⁺CD8⁺ fenotipom - prikaz slučaja

Josip Knežević¹, Marijana Nehutni¹, Jozefina Palić¹, Antonija Babić¹, Hrvoje Lalić¹, Monika Kolundžić¹, Margareta Radić Antolčić¹, Iva Semren¹, Ivana Franić Šimić¹, Tamara Pikvača³, Rea Taradić³, Barbara Dreta², Sandra Bašić-Kinda²

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

² Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

³ Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb

Uvod

T-prolimfocitna leukemija (T-PLL) prvi je put kao zasebna hematološka bolest opisana 1973. godine u radu Catovskog i suradnika, koji su prepoznali skupinu bolesnika s agresivnom leukemijom zrelih T-limfocita, obilježenom izraženom limfocitozom, hepatosplenomegalijom, čestim zahvaćanjem kože te karakterističnim morfološkim izgledom prolimfocita u perifernoj krvi. Unatoč svome nazivu, pojam „prolimfocitna“ donekle je zavaravajući jer maligne T-stanice potječu iz posttimusnog stadija razvoja (1). T-PLL se smatra rijetkom bolešću s godišnjom incidencijom od približno dva slučaja na milijun stanovnika u europskim zemljama, što čini oko dva posto svih kroničnih limfocitnih leukemija (2).

Leukemijske stanice u T-PLL-u pokazuju imunofenotip karakterističan za zrele (posttimusne) T-limfocite, bez izražaja TdT i CD1a. U većine bolesnika prisutan je CD3, premda površinska ekspresija može biti smanjena ili u potpunosti odsutna. Najčešći imunofenotipski obrazac jest CD4⁺/CD8⁻ (58–65%), dok je koekspresija CD4 i CD8 rjeđa (21–32%). Aberantni gubitak pan-T-staničnih biljega (CD2, CD5, CD7) pojavljuje se rijetko (3). Antigen CD52 gotovo je univerzalno izražen u neliječenih bolesnika, što predstavlja važnu terapijsku metu (4).

U ovom prikazu slučaja opisan je 43-godišnji muškarac s dijagnozom T-PLL, postavljenom na temelju morfoloških značajki koštane srži i imunofenotipske analize, uz dodatnu potvrdu citogenetskim ispitivanjem te molekularnom analizom preuredbe T-staničnog receptora.

Prikaz slučaja

Muškarac, star 43 godine, inicijalno pregledan zbog osjećaja pritiska u prsima. Učinjenom laboratorijskom obradom verificirana limfocitoza, normocitna anemija i trombocitopenija.

Prethodno dijagnosticiran ulcerozni kolitis, prije 20 godina, ranije liječen mesalazinom. U obiteljskoj

anamnezi nije bilo hematoloških bolesti. Kliničkim pregledom bez hepatosplenomegalije, negira B simptome.

Analiza periferne krvi pokazala je izraženu limfocitozu ($142,9 \times 10^9/L$) i trombocitopeniju ($25 \times 10^9/L$), uz uredne vrijednosti eritrocita i koagulacijski status, a od ostalih nalaza imao je povišene vrijednosti ALT (82 U/L), AST (59 U/L), LDH (534 U/L), β -2 mikroglobulina (4,3 mg/L) i feritina (412,6 $\mu g/L$). Elektroforeza proteina bila je uredna, a obrada za autoimune bolesti pristigla je negativna. Zbog leukocitoze i trombocitopenije učinjena je i citološka punkcija koštane srži.

Imunofenotipizacijom limfocita periferne krvi, provedenom pomoću panela za ne-Hodgkinove limfome, utvrđena je dominantna populacija limfocita koja je činila 94% živih leukocita. Stanice su pokazale imunofenotip zrelih T-limfocita (CD45⁺, CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺ i CD7⁺). Unutar te populacije, 86% stanica bilo je dvostruko pozitivno (CD4⁺/CD8⁺), dok je 8% bilo jednostruko pozitivno (CD8⁺). Nadalje, 86% aberantnih T-limfocita iskazivalo je aberantnu ekspresiju CD117⁺. Negativni biljezi uključivali su CD34⁻, TdT⁻, CD1a⁻ i CD56⁻.

Razmaz koštane srži pokazao je zrele limfatičke stanice morfološki slične onima u perifernoj krvi. Biopsija koštane srži bila je 80–90% celularna. Sve tri hematopoetske loze bile su prisutne, ali izrazito potisnute zbog velikih intersticijskih nakupina atipičnih T-limfocita. Imunohistokemijska analiza potvrdila je pozitivnost za CD3⁺, CD2⁺, CD5⁺, CD7⁺, CD4⁺, CD8⁺ i TCL1⁺, dok su ostali testirani biljezi pokazali negativitet CD56⁻, CD57⁻, CD30⁻, TdT⁻, CD10⁻, CD23⁻, PDI⁻ i ICOS⁻. Bojenje Ki-67 pokazalo je proliferacijski indeks od približno 40%.

Metodom interfaznog FISH-a (fluorescentna in situ hibridizacija) utvrđena je preuredba TCRAD gena što može ukazivati na rekurentne promjene vezane uz T-PLL, kao što su inv(14)(q11q32) ili t(14;14)(q11q32). Također dokazane su 3 kopije MYC gena

što može ukazivati na izokromosom 8 (iso(8)(q10)), a to rezultira povećanom ekspresijom MYC gena. Nije pronađena delecija ATM-gena.

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) izolirana je iz leukocita perferne krvi uz komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Njemačka. Primjenom metode višestruke lančane reakcije polimeraze (engl. *multiplex polymerase chain reaction*) uz smjesu odgovarajućih početnica te nastavnu analizu fragmenata metodom kapilarne elektroforeze otkrivena je klonalna preuredba gama T-staničnog receptora.

Učinjenim PET-CT-om verificirana splenomegalija (17 cm), bez limfadenopatije i bez hepatosmegalije.

Na temelju navedenog postavljena je dijagnoza T-PLL, a pacijentu je započeto liječenje alemtuzumabom (postepeno povećanje doze do 30 mg), uz potporu transfuzijama trombocita i eritrocita.

Dva mjeseca kasnije, prilikom kontrolnog dolaska na sljedeću dozu alemtuzumaba, pacijent je razvio poremećaje vida uz jake glavobolje stoga je upućen u hitnu službu. Daljnja obrada potvrdila je progresiju bolesti s još izraženijom leukocitozom ($588,6 \times 10^9/L$), trombocitopenijom ($12 \times 10^9/L$) uz sada prisutnu i tešku anemiju (Hb 70 g/L), produljeno protrombinsko vrijeme i porast vrijednosti jetrenih enzima (ALT 104 U/L, GGT 233 U/L, ALP 181 U/L), a MS-CT je pokazao izrazitu hepatosplenomegaliju bez limfadenopatije.

Zbog progresije bolesti, uz postojeću terapiju alemtuzumabom dodan je kladribin. Tijekom primjene kladribina broj limfocita se smanjio, ali trombocitopenija je perzistirala, zahtijevajući svakodnevne transfuzije trombocita. Zabilježeni su laboratorijski znakovi blagog sindroma lize tumora, no bez kliničkih komplikacija (5). Desetog dana hospitalizacije pacijent je otpušten u dobrom općem stanju.

Nekoliko dana kasnije, točnije sedam dana nakon otpusta, ponovno je hospitaliziran zbog otežanog disanja i pogoršanja općeg stanja te mu je učinjen kontrolni MSCT koji je pokazao obostrane pleuralne izljeve i izražen ascites. Laboratorijski nalazi su pokazali blagu anemiju, leukocitozu ($26 \times 10^9/L$), trombocitopeniju ($11 \times 10^9/L$) uz izrazito visoke vrijednosti LDH (1917 U/L). Zbog razvoja tenzijskog ascitesa učinjena je i evakuacija ascitesa te su uzorci odaslani na analizu, a citološkom analizom i imunofenotipizacijom potvrđena je prisutnost bolesti što je upućivalo na progresiju te je započeta terapija venetoklaksom uz postepeno dizanje doze (6).

Nekoliko dana nakon otpusta, u dnevnoj ambulanti nakon primjene alemtuzumaba, pacijent je razvio vrućicu, zimicu i treskavicu te je zbog infektivne komplikacije hospitaliziran. Uz primjenu antibiotika i nastavak terapije (alemtuzumab, venetoklaks) kliničko stanje se popravilo, a nalazi su ukazivali na stabilizaciju bolesti.

S obzirom na izražen CD117 na leukemijskim stanicama, postavljena je sumnja na prisutnost *KIT* mutacije. Iz uzorka periferne krvi u opisanoj progresiji bolesti učinjena je analiza sekvenciranja sljedeće generacije (NGS - engl. next generation sequencing) sa ciljanim panelom gena za leukemijske bolesti mijeloidne loze stanica (54 dijagnostički i prognostički relevantnih gena obuhvaćeno je panelom). Korišten je komercijalni kit Agilent myeloid custom panel, Agilent Technologies, SAD, a pripremljena knjižnica sekvencirana je na uređaju MiSeq, Illumina, SAD. Osjetljivost primijenjene NGS metode doseže do 5% (najmanji relativni udio detekcije varijanti), a analiza je obuhvatila točkaste mutacije te male insercije, odnosno delecije genskog materijala. Sekundarna i tercijarna analiza podataka učinjena je na platformi Varsome Clinical, Saphetor SA, Švicarska. Prema smjernicama i tada dostupnim literaturnim dokazima, izvještene su sve patogene klinički značajne varijante u kontekstu prisutne hematološke bolesti (7,8).

Opisanim NGS sekvenciranjem pronađena je točkasta mutacija u *KIT* genu, NM_000222.3 c.1621A>C p.(Met541Leu), navedena varijanta u literaturi opisana je uz povoljan odgovor na terapiju imatinibom. Također, detektirana je i *JAK3*, NM_000215.4 c.1718C>T p.(Ala573Val) varijanta. *JAK3 A573V* mutacija aktivira JAK-STAT signalni put i ima leukemogeni učinak što ju svrstava u klinički značajnu patogenu varijantu 1. razine (9,10).

Sukladno rezultatima molekularnog testiranja pacijentu je uvedena terapija imatinibom. Ubrzo nakon dolazi do povlačenja svih ascitesa i izljeva te do stabilizacije ukupnog broja leukocita. Pacijent je u dobrom općem stanju otpušten uz nastavak terapije. Ubrzo nakon toga pacijent se javlja u hitnu službu s kliničkim znakovima akutne ishemije miokarda. Slikovnim tehnikama utvrđeno je prisustvo tumorske tvorbe u lijevoj klijetki srca što je nažalost dovelo do smrtnog ishoda.

Rasprava

T-prolimfocitna leukemija (T-PLL) rijetka je i agresivna leukemija zrelih T-limfocita, karakterizi-

rana brzim tijekom bolesti i visokom stopom relapsa unatoč inicijalnom odgovoru na terapiju. Klinički i imunofenotipski heterogena, bolest se obično očituje leukocitozom, hepatosplenomegalijom i limfadenopatijom, dok kožni infiltrati i rijetki atipični fenotipovi dodatno kompliciraju dijagnostički i terapijski pristup (11).

U opisanom slučaju pacijent je imao rijedak imunofenotipski profil: maligne T-stanice bile su dvostruko pozitivne (CD4⁺/CD8⁺) i izrazito izražavale CD117⁺, što je zabilježeno samo u manjini T-PLL slučajeva (3,16,17). Ova atipična ekspresija CD117⁺ ukazivala je na potencijalnu ciljanu terapijsku metu i postavila dodatne izazove u planiranju liječenja.

Alemtuzumab, humanizirano monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD52, etablirao se kao terapija prve linije za T-PLL. Studija Deardena i suradnika iz 2011. godine pokazala je da intravenaska primjena alemtuzumaba u 32 bolesnika rezultira ukupnom stopom odgovora od 91%, pri čemu 81% bolesnika postiže potpuni odgovor (12). Retrospektivno istraživanje Damlaja i suradnika na 41 bolesniku pokazalo je superiornu učinkovitost alemtuzumaba u odnosu na druge terapije, s medijanom ukupnog preživljenja (mOS) od 40,5 mjeseci u usporedbi s 10,3 mjeseca kod alternativnih režima; međutim, ukupno preživljenje ostalo je ograničeno, što naglašava potrebu za pravodobnom transplantacijom tijekom kratkotrajne remisije (13). Ovi podaci potvrđuju da, iako alemtuzumab dovodi do visokih stopa inicijalnog odgovora, relaps je česta pojava u agresivnim oblicima T-PLL. Stoga dolazi do potrebe za uvođenjem drugih terapija koje se mogu davati i u kombinaciji s alemtuzumabom. Kladribin, purinski nukleozidni analog, koristi se u refraktornim i relapsnim slučajevima, često u kombinaciji s alemtuzumabom, pri čemu su zabilježeni privremeni odgovori. Nedavna retrospektivna analiza pet bolesnika s relapsnom/refraktornom T-PLL, koji su primali kladribin u kombinaciji s BCL-2 inhibitorom venetoklaksom, pokazala je ukupnu stopu odgovora od 100%, uključujući 40% potpunih remisija (14). Venetoklaks je selektivni inhibitor BCL-2, proteina koji sprječava apoptozu u malignim stanicama, i pokazao je aktivnost u različitim hematološkim malignitetima. Ex vivo funkcionalno testiranje primarnih T-PLL stanica identificiralo je venetoklaks kao najsnažniji agens specifičan za T-PLL. U dvoje pacijenata s kasnim, refraktornim T-PLL, primjena venetoklaksa dovela je do brzih kliničkih odgovora, uključujući smanjenje splenomegalije, limfadenopa-

tije i limfocitoze, uz djelomičnu remisiju kao najbolji klinički odgovor. Međutim, inducirana ekspresija BCL-2 mogla je pridonijeti razvoju rezistencije, što naglašava potrebu za primjenom kombinacijskih tretmana (14). Nadalje, u prvoj međunarodnoj studiji kombinacija ibrutiniba i venetoklaksa kod 14 bolesnika s relapsnom/refraktornom T-PLL dala je ukupnu stopu odgovora od 7,1% (jedna djelomična remisija), dok je 21,4% bolesnika postiglo stabilizaciju bolesti. Medijan trajanja odgovora bio je 23,1 tjedan, a medijan ukupnog preživljenja 31,8 tjedana. Zaključno kombinacija ibrutiniba i venetoklaksa nije pokazala klinički značaj (15).

Ciljana terapija na temelju molekularnog profila, poput *KIT* mutacija u podskupini T-PLL bolesnika s CD117⁺ imunofenotipom, pruža dodatnu mogućnost. Inhibitori tirozin-kinaze poput imatiniba mogu inducirati stabilizaciju bolesti i regresiju leukocitoze, pleuralnih izljeva i ascitesa, potvrđujući potencijal precizno usmjerene terapije u odabranim slučajevima. Gorczyca i suradnici pokazali su na analizi 28 slučajeva T-PLL-a da je u 4 slučaja (14%) prisutna ko-ekspresija CD117, pri čemu su svi ti tumori CD8-pozitivni, što osim dijagnostičke vrijednosti sugerira mogućnost primjene kombinirane terapije alemtuzumabom i imatinibom te otvara prostor za individualizirani pristup liječenju u ovoj rijetkoj podskupini bolesti (16). Bellone i suradnici opisali su rijedak slučaj pedijatrijske T-PLL s ekspresijom CD117 i izoliranom delecijom 12(p13). Standardna terapija za T akutnu limfoblastičnu leukemiju bila je neučinkovita, dok je kombinacija fludarabina, citarabina, ciklofosfamida i alemtuzumaba dovela do remisije, naglašavajući važnost molekularnog i imunofenotipskog profila te ranog uvođenja selektivnije terapije kod rijetkih i agresivnih oblika T-PLL (16).

Ovaj slučaj ilustrira izazove u liječenju agresivne T-PLL, posebno kod bolesnika s rijetkim imunofenotipom CD4⁺/CD8⁺ i CD117⁺. Integracija imunofenotipizacije, molekularnog testiranja i multidisciplinarnog odlučivanja omogućuje primjenu ciljane terapije i može značajno poboljšati klinički ishod.

Literatura:

1. Catovsky D, Galetto J, Okos A, Galton D.A, Wiltshaw E, Stathopoulos G. Prolymphocytic Leukaemia of B and T Cell Type. *Lancet* 1973, 2, 232–234.
2. Herling M, Khoury J.D, Washington L.T, Duvic M, Keating M.J, Jones D. A Systematic Approach to Diagnosis of Mature T-Cell Leukemias Reveals Heterogeneity among WHO Categories. *Blood* 2004, 104, 328–335.
3. Matutes E, et al. Clinical and Laboratory Features of 78 Cases of T-Prolymphocytic Leukemia. *Blood* 1991, 78, 3269–3274.
4. Ginaldi L, et al. Levels of Expression of CD52 in Normal and Leukemic B and T Cells: Correlation with in Vivo Therapeutic Responses to Campath-1H. *Leuk. Res.* 1998, 22, 185–191.
5. Zainul S et al. Epigenetic therapy overcomes treatment resistance in T-cell prolymphocytic leukemia. *Sci Transl. Med.* 2015 Jan 24; 7(293)
6. Hampel PJ et al. Venetoclax treatment of patients with relapsed T-cell prolymphocyte leukemia. *Blood Cancer J.* 2021 March 2;11(3):47
7. van Dongen JJ, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2257-317.
8. Langerak AW, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012 Oct;26(10):2159-71.
9. Horak P, et al. 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 May;24(5):986-998.
10. Li MM, et al. 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 Jan;19(1):4-23.
11. Ramos AC, [Kidist T](#), [Amandeep A](#), [Katherine G.J](#), [Sachin G](#). T-cell prolymphocytic leukemia: an overview of current and future approaches. *Cureus.* 2021;13(2): e13516.
12. Dearden C, et al. Alemtuzumab therapy in T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(22):5799-5806.
13. [Damlaj M](#), et al. *Impact of alemtuzumab therapy and route of administration in T-prolymphocytic leukemia: a single-center experience.* *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015; 15:699–704.
14. Arani N, et al. Venetoclax combined with cladribine in patients with relapsed/refractory (R/R) T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL). *J Clin Oncol* 2022;40
15. Boidol B, et al. First-in-human response of BCL-2 inhibitor venetoclax in T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2017; 130:2499–2503.
16. Herling M, et al.. Limited efficacy for ibrutinib and venetoclax in T-prolymphocytic leukemia: results from a phase 2 international study. *Blood Adv.* 2024;8(4):842–845.
17. Gorczyca W, et al. A Subset of T-cell prolymphocytic leukemia expresses CD117 (c-KIT). *Blood.* 2004;104(11):4540-4546.
18. Bellone M, et al. *Pediatric T-cell prolymphocytic leukemia with an isolated 12(p13) deletion and aberrant CD117 expression.* *Exp Hematol Oncol.* 2012;1:7.

Važnost i standardizacija određivanja ekspresije Ki-67 i statusa TP53 u dijagnostici i liječenju limfoma plaštene zone

Snježana Dotlić^{1,2}, Katarina Ražnjević¹, Suzana Hančić³, Branimir Gizdić⁴, Slavko Gašparov^{2,3} u ime Hematopatološke sekcije HLZ-a*.

¹Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³Klinički zavod za patologiju i citologiju KB Merkur

⁴Klinički zavod za patologiju KB Dubrava

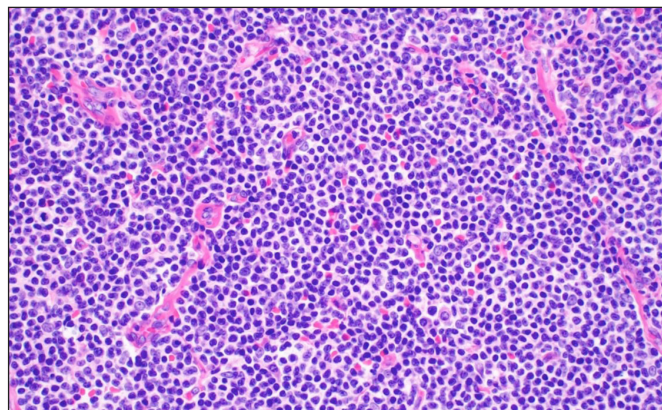
*Članovi Hematopatološke sekcije HLZ-a koji su sudjelovali u radionici: Anita Škrtić, Katarina Horvat Pavlov, Eva Lovrić, Darija Mužinić, Ivana Ilić, Tamara Pikivača, Jasmina Rajc, Nenad Kunac, Ivana Karaman, Marina Čaleta Rade, Čedna Tomasović Lončarić, Luka Manojlović, Ita Hadžisejdić, Koviljka Matušan Ilijaš, Andreja Tarle, Ozrenka Poljak, Martina Abramović, Paula Šteković, Magdalena Šamija, Zorana Lipšanski, Matea Kos, Marina Bakula, Anita Kokot, Ozren Štanfel.

Limfom plaštene zone (engl. *mantle cell lymphoma*, MCL) je rijedak ne-Hodgkinov limfom zrelih B-limfocita karakteriziran translokacijom t(11;14) koja rezultira prekomjernom ekspresijom biljega cyclin D1. Bolest je klinički i biološki heterogena uz čestu infiltraciju koštane srži i ekstrapnodalnih organa, a bolesnici se obično, usprkos terapiji, suočavaju s relapsima i progresijom tumora koja odražava kompleksnu gensku evoluciju neoplastičnog kлона. Razlikujemo dva osnovna biološka i klinička podtipa bolesti- konvencionalni MCL i leukemijski (ne-nodalni) MCL koji obično pokazuje indolentniji klinički tijek (1,2). Među bolesnicima s konvencionalnim oblikom MCL osobito agresivan tijek bolesti tipično pokazuju oni s karakterističnom morfologijom tumorskih stanica koje se opisuju kao blastoidne ili pleomorfne.

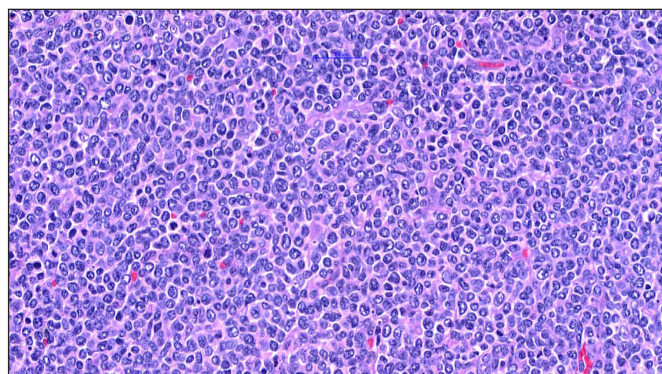
Jedan od najvažnijih prognostičkih parametara je MIPI (*MCL International Prognostic Index*) koji se temelji na dobi bolesnika, općem zdravstvenom stanju, vrijednosti LDH i broju limfocita u perifernoj krvi (3). Ostali ključni prognostički parametri uključuju morfologiju tumorskih stanica (blastoidni/ pleomorfni MCL), proliferacijski indeks mjeren imunohistokemijskim bojenjem na Ki-67 (4) i mutacijski status TP53 ili ekspresiju p53 (5,6).

Slika 1: A. Konvencionalni MCL (HE bojenje, povećanje x200), B. Pleomorfni MCL (HE bojenje, povećanje x200).

A



B

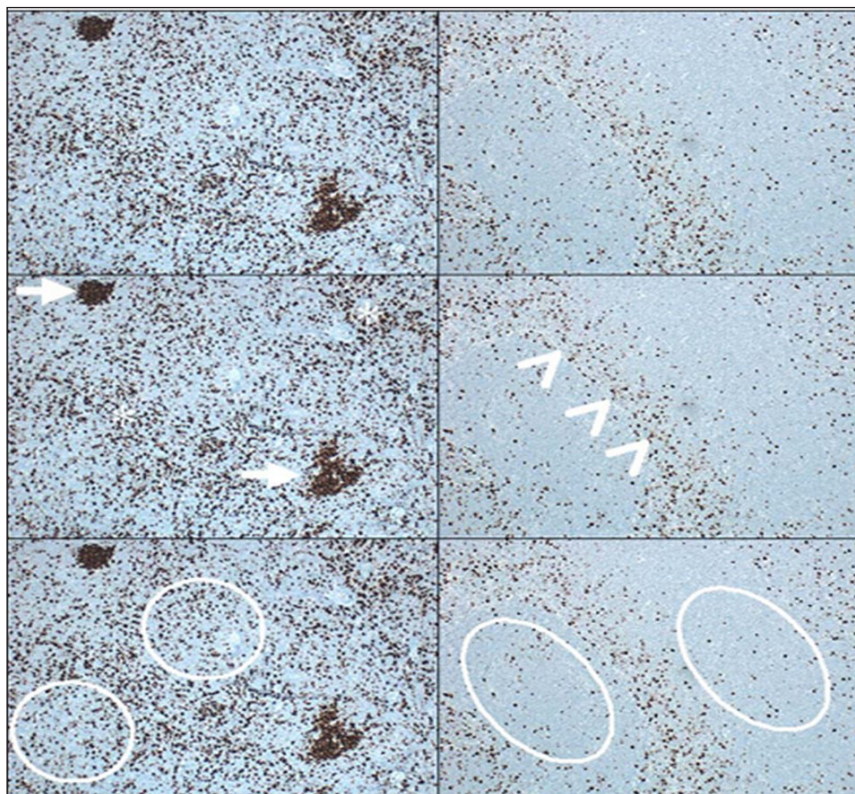


Visoki proliferacijski indeks određen imunohistokemijskim bojenjem na Ki-67 povezan je s lošijim ishodom bolesnika s MCL, što je potvrđeno u randomiziranim kliničkim studijama na pacijentima liječenima imunokemoterapijom (3,7). Blastoidni i pleomorfni MCL najčešće su osim specifičnom morfologijom karakterizirani visokim proliferacijskim indeksom, ali prognostička važnost proliferacijskog indeksa dokazana je i kod pacijenata s MCL klasične morfologije (7). Međutim najvažnije ograničenje

procjene proliferacijskog indeksa leži u značajnoj varijabilnosti evaluacije imunohistokemijskog bojenja koja ovisi o tehničkim detaljima laboratorijskog protokola, odnosno kvaliteti preparata te o interpretaciji hematopatologa. *European Mantle Cell Lymphoma Network* objavio je 2009. godine preporuke i detaljne smjernice za određivanje proliferacijske aktivnosti u MCL koje naglašavaju važnost preciznog odabira regije limfnog čvora u kojemu se broje stanice s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na Ki-67 te

broj stanica, odnosno vidnih polja velikog povećanja mikroskopa koji su potrebni za pouzdanu procjenu (7) (slika 2). Granična vrijednost ekspresije Ki-67 koja se smatra značajnom u MCL iznosi 30%. Međutim, nedavno se počelo raspravljati o mogućoj promjeni optimalne granične vrijednosti Ki-67 od 50% koja bi za današnje bolesnike s MCL liječene modernim imunokemoterapijskim protokolima i terapijom održavanja preciznije detektirala skupinu bolesnika s lošijom prognozom i agresivnijim tijekom bolesti (8).

Slika 2: Iz Klapper W i sur, J Hematop 2009; imunohistokemijsko bojenje na Ki-67; slika prikazuje odabir adekvatnih regija limfnog čvora s MCL u kojima se očitava postotak pozitivnih stanica (zaokružene zone u zadnjem redu), uz izbjegavanje ostataka germinativnih centara limfatičnih folikula, područja bogatih reaktivnim T-limfocitima i tzv. "hot-spot" žarišta u tumoru.



Osim ekspresije Ki-67, važnu prognostičku informaciju za bolesnike s MCL nosi imunohistokemijska ekspresija biljega p53 te mutacija gena *TP53*.

Gen *TP53* smješten je na kromosomu 17 i u zdravim stanicama (divlji tip *TP53*) ima ulogu važnog tumor-supresorskog gena. Mutirani gen potiče rast tumora i djeluje na odnos stanice s mikrookolišem, a ovisno o vrsti genske aberacije može dovesti do inhibicije fiziološke funkcije gena (tzv. "loss of function" mutacije) ili aktivno sudjelovati kao promotor tumorskog rasta (tzv. "gain of function" mutacije). Najveći broj bolesnika s MCL ima deleciju kromosoma 17p na jednom alelu i mutaciju *TP53* na drugom alelu, ali postoje i druge kombinacije (poput funkcionalnog drugog alela ili mutacije *TP53* na oba

alela, bez prisutne delecije) (9,10). Ova kompleksna biološka podloga nudi objašnjenje zašto starije dijagnostičke metode (imunohistokemijska analiza, FISH) nisu uvijek precizne i pokazuju ograničenu osjetljivost u kontekstu limfoma plaštene zone. Mutacije *TP53* u MCL imunohistokemijski se očituju kao nuklearna ekspresija u visokom intenzitetu u više od 50% tumorskih stanica ili kao potpuno negativna reakcija u tumoru. U MCL s divljim tipom *TP53* obično se nalazi fokalna ekspresija p53 različitog intenziteta nuklearnog bojenja u rasponu između 5-50% stanica (11).

Nova limfomska klasifikacija Internacionalnog konsenzusa hematopatologa (*The International Consensus Classification of Lymphoid Neoplasms*,

ICC) iz 2022. godine preporuča analizu mutacije *TP53* u rutinskoj dijagnostičkoj obradi za sve uzorke pacijenata s MCL (12).

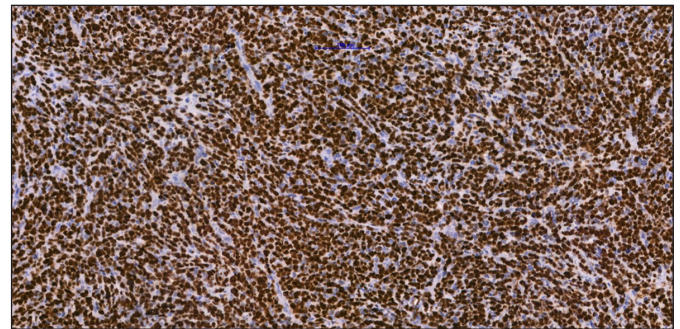
U siječnju 2025. godine u Zagrebu je organizirana radionica Hematopatološke sekcije HLZ-a u kojoj su sudjelovali hematopatolozi, molekularni biolog te magistri i inženjeri medicinske laboratorijske dijagnostike iz šest velikih bolničkih centara u Republici Hrvatskoj (KBC Zagreb, KB Merkur, KB Dubrava, KBC Osijek, KBC Split i KBC Rijeka). U svakom centru učinjena je imunohistokemijska analiza ekspresije Ki-67 i p53 na tkivima istih pet limfnih čvorova s MCL, a rezultati su uspoređeni na radionici, uz raspravu o razlikama u protokolima, kvaliteti preparata i interpretaciji patologa te na kraju korelirani s nalazima molekularne analize mutacijskog statusa *TP53* metodom NGS (učinjene u KB Dubrava).

U prvom dijelu radionice šest histopatoloških laboratorija navedenih centara usporedili su tehničke parametre imunohistokemijskog bojenja Ki-67. Analiza je obuhvatila razotkrivanje epitopa antigena, primarno antitijelo, uvjete inkubacije, vizualizacijske sustave i korištenu opremu. Utvrđeno je da tri laboratorija koriste MIB-1 klon antitijela, a tri 30-9 klon, koji su prihvaćeni standardi za Ki-67 detekciju i ovise o orijentaciji laboratorija prema validiranim komercijalnim platformama. Svi laboratoriji koristili su metodu HIER (engl. *Heat-Induced Epitope Retrieval*) za razotkrivanje epitopa antigena s različitim puferima, a vrijeme inkubacije primarnog antitijela varira od 16 do 40 minuta. Razlike u puferima i inkubaciji antitijela odražavaju kompatibilnost s pojedinim uređajima, ali ne predstavljaju značajne metodološke razlike. Četiri centra koriste *Ventana BenchMark* sustav i *ultraView* multimer vizualizacijski kit, a dva *Dako/Agilent* i *EnVision* polimer. Iako se koriste različite tehnologije, obje metode daju usporedive rezultate visoke kvalitete. Analiza je pokazala visok stupanj standardizacije imunohistokemijskog bojenja Ki-67 među hrvatskim histopatološkim laboratorijima. Zaključeno je da uočene razlike u trajanju inkubacije antitijela, izboru pufera ili uređaja proizlaze iz tehničkih specifikacija pojedinih sustava i ne utječu značajno na dijagnostičku interpretaciju.

Drugi dio radionice bio je posvećen analizi imunohistokemijske ekspresije p53, a svi centri koristili su primarno antitijelo p53 istoga klona (DO-7). Vrijeme inkubacije primarnog antitijela bilo je relativno ujednačeno u većini centara (30 minuta), a najkraće vrijeme inkubacije primarnog antitijela (16 minuta) korišteno je u protokolu KBC-a Zagreb. Za

demaskiranje antigena svi centri koristili su pufer visokog pH, ali vrijeme trajanja procesa osjetno se razlikovalo. KBC Zagreb koristio je detekcijski kit *OptiView DAB* tehnologije detekcije multimera posredovane haptanima koji omogućuje stvaranje jačeg signala. Ostali centri koristili su detekcijski kit *UltraView DAB* tehnologije detekcije multimera, odnosno *EnVision FLEX* detekcijski kit tehnologije polimera. Svi centri koristili su kromogen DAB (diaminobenzidin).

Slika 3: Imunohistokemijska ekspresija p53 u blastoidnom MCL; nuklearno pozitivna reakcija u više od 90% tumorskih stanica.



Ovakva usporedna evaluacija doprinosi međulaboratorijskoj usklađenosti, kontroli kvalitete i može poslužiti kao temelj za izradu nacionalnih smjernica za standardizaciju imunohistokemijskih protokola.

U tablici su prikazani rezultati interpretacije proliferacijskog indeksa imunohistokemijskim bojenjem na Ki-67 i ekspresije p53 koje su analizirali hematopatolozi iz svih centara. Razlike u očitanim vrijednostima proliferacijskog indeksa nastale su uglavnom kao rezultat odabira različitih regija limfnih čvorova u kojima su brojane stanice s ekspresijom Ki67.

Utvdili smo značajnu varijaciju u interpretaciji ekspresije p53 za tri od pet analiziranih limfoma, objašnjenu razlikama u imunohistokemijskim protokolima koji su utjecali na kvalitetu preparata ili u interpretaciji intenziteta pozitivne reakcije u odabranim regijama tumora. Prema očekivanju, u limfomima s pleomorfnom i blastoidnom morfologijom dokazana je visoka ekspresija p53, kao i mutacije *TP53*.

Na kraju radionice usvojene su preporuke da se pri očitavanju proliferacijskog indeksa u MCL trebaju koristiti objavljene smjernice European MCL Networka (7). Postotak tumorskih stanica s ekspresijom Ki-67 treba biti precizan i određen u nalazu kao točan broj, a ne raspon vrijednosti. Kod imunohistokemijske ekspresije p53 potrebno je optimizirati imunohistokemijske protokole i brojati tumorske stanice s jakim intenzitetom pozitivne nuklearne reakcije.

Imunohistokemijska analiza ekspresije p53 daje nam potencijalno vrijednu informaciju o biologiji limfoma u kratkom vremenskom roku, ali zlatni standard je sekvenciranje gena *TP53* koje se može učiniti na različitim uzorcima (svježe tkivo, periferna krv, koštana srž ili tumorsko tkivo iz parafinske kocke) pod uvjetom da analizirani uzorak sadrži više od 30% očuvanih tumorskih stanica.

Zaključno, imunohistokemijska ekspresija Ki-

67 i mutacijski status *TP53* od iznimne su važnosti za sve bolesnike s MCL- i one s konvencionalnim oblikom limfoma, kao i za bolesnike s ne-nodalnim (leukemijskim) MCL. Preporuča se ponavljanje biopsije zahvaćenog organa u slučaju relapsa MCL uz obavezno određivanje navedenih prognostičkih čimbenika koji utječu na odabir optimalnih terapijskih opcija u različitim fazama bolesti.

Tablica 1. Rezultati interpretacije proliferacijskog indeksa, ekspresije p53 i mutacijskog statusa TP53 u pet limfnih čvorova s MCL

	xx/22 (blastoidni MCL)		xx/23 (pleomorfni MCL)		xx/24 (klasični MCL)		xx/24 (klasični MCL)		xx/24 (klasični MCL)	
NGS TP53	Mutiran (c.473G>A p.Arg158His c.347C>T p.Ser116Phe c.31G>A p.Glu11Lys)		Mutiran (c.488A>G p.Tyr163Cys)		Nemutiran		Nemutiran		Nemutiran	
PATOLOG	Ki67	p53	Ki67	p53	Ki67	p53	Ki67	p53	Ki67	p53
1	89	84	47	72	11	21	18	32	14	28
2	92	85	55	87	15	15	22	35	20	25
3	70	68	37	70	11	15	10	30	15	15
4	90	80	40	90	15	10	20	35	25	30
5	90	80	48	90-95	25	15	25	35	20	30
6	87	70	38	90	12	10	18	4	14	3
7	98	90	30	100	10	5	20	0	20	1
8	90	70	26	90-100	17	15-20	19	14	25	24
9	95	75	68	85	28	6	53	6	46	8
10	80	35	34	90	25	19	23	12	23	13
11	80	5	25	90	15	5	20	5	25	1
12	85	85	30	90	15	5	20	10	20	10
13	95	5-10	45-50	95	30-40	3-5	40-50	2-5	20-40	2
14	90	10	50	90	30	3	40	2-3	30-40	1
15	95	95	60	100	30	30	60	50	25	70
16	>90	10	65	>90	35-45	5	40	5-10	40	5

Literatura:

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et.al. The 2016 revision of the World Health Organization Classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127:2375-90.
2. Royo C, Navarro A, Clot G, et.al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012;26:1895-8.
3. Hoster E, Rosenwald A, Berger F, et al. Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle cell lymphoma: results from randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol* 2016;34:1386-94.
4. Dreyling M, Ferrero S, Vogt N, et al. New paradigms in mantle cell lymphoma: is it time to risk-stratify treatment based on the proliferative signature? *Clin Cancer Res* 2014;20:5194-206.
5. Aukema SM, Hoster E, Rosenwald A, et al. Expression of TP53 is associated with the outcome of MCL independent of MIPI and Ki-67 in trials of the European MCL Network. *Blood* 2018;131:417-20.
6. Eskelund CW, Dahl C, Hansen JW, et al. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy. *Blood* 2017;130:1903-10.
7. Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma- consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009;2:103-11.
8. Epperla N, Switchenko JM, Geyer SM, et al. Ki-67 expression of 50% is the optimal cut off to predict survival outcomes in mantle cell lymphoma (MCL): A pooled analysis from CALBG 50403 (Alliance) and MCL Real-world study cohort. *Blood* 2023;142(1):380.
9. Pavlakis E, Stiewe T. p53's extended reach: The mutant p53 secretome. *Biomolecules* 2020;10(2):307.
10. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica* 2018;103(12):1956-68.
11. Li, X., Luo, D., Zhang, L. et al. Accurate interpretation of p53 immunohistochemical patterns is a surrogate biomarker for TP53 alterations in large B-cell lymphoma. *BMC Cancer* 2023;23:1008.
12. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022;140(11):1229–1253.

Novije spoznaje o klonalnoj hematopoezi neodređenog potencijala

Tihana Duić¹, Dora Dragčević¹, Inga Mandac Smoljanović^{1,2}

¹Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur

²Medicinski Fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Uvod

Tijekom svog razvoja, stanice ljudskog tijela kontinuirano doživljavaju oštećenja svog genoma, bilo zbog intrinzičnih uzroka ili zbog izloženosti mutagenima. Iako se velika većina oštećenja DNK popravljaju, a genom se replicira s izuzetno visokom točnošću, stanice postupno stječu somatske mutacije tijekom života. Sve stanice unutar pojedinca nose somatsku mutaciju, ali svaka određena mutacija prisutna je samo u podskupu stanica ili čak u pojedinačnim stanicama. Stoga se somatske mutacije često opisuju kao mozaik, a u svakodnevnoj praksi se koristi pojam somatski mozaicizam.

Za razliku od naslijeđenih varijanti, somatske mutacije postoje samo u malim i varijabilnim udjelima stanica, u rasponu od embrionalnih mutacija prisutnih u većini stanica do mutacija prisutnih u samo jednoj stanici.

Sa starenjem proces hematopoeze postaje podložan somatskim genetskim alteracijama/mutacijama koje predstavljaju temelj za potencijalnu klonalnu ekspanziju hematopoetskih matičnih i progenitornih stanica (1).

S dobi povezana klonalna ekspanzija odnosno klonalna hematopoeza (CH) posljednjih godina stječe sve više i više pažnje zbog svoje uloge u hematološkim poremećajima, kardiovaskularnim bolestima i upalnim stanjima (1).

Poznato je kako su u više od 85% slučajeva mijelodisplastičnog sindroma (MDS) prisutne somatske mutacije (2).

Slične somatske mutacije pojavljuju se sa starenjem i kod zdravih pojedinaca, a iako su povezane s većim rizikom od progresije u mijeloidnu nepolazmu, većina ljudi nikad ne razvije klonalni mijeloidni poremećaj (3).

CHIP i CCUS – definicija i dijagnoza

CHIP (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*) – klonalna hematopoeza neodređenog potencijala pojam je koji je incijalno opisan 2014. u 2 velike studije objavljene u *New England Journal of Medicine* (3,4). U jednoj studiji koja je uključivala 17,000 pojedinca, analizirane su somatske mutacije u 160 gena za koje je poznato da su prisutne u he-

matološkim poremećajima (3). Studija je pokazala da se analizirane mutacije s većem učestalošću pojavljuju sa starenjem i povezane su s povećanim rizikom od pojave hematoloških klonalnih poremećaja, koronarne bolesti i ishemijskog moždanog udara (3). Druga studija, u kojoj su analizirani geni 12,000 ispitanika također je potvrdila kako broj somatskih mutacija raste s dobi i njihovu povezanost s povećanim rizikom za razvoj hematoloških poremećaja (4).

CHIP je definiran prisutnošću somatske „pogonske“ (*driver*) mutacije s „promjenjivom frekvencijom alela“ (VAF – *variable allel frequency*) većom od 2% uz odsutnost jasnih/vidljivih hematoloških abnormalnosti (Slika 1.) (1).

Slika 1. Klonalna hematopoeza neodređenog potencijala (CHIP).

Klonalna hematopoeza neodređenog potencijala (CHIP)
Značajke: • Nema morfoloških dokaza o hematološkom neoplastičnom procesu • Ne ispunjava dijagnostičke kriterije za PNH, MGUS ili MBL* • Prisustvo somatske mutacije povezane s hematološkom neoplazijom pri promjenjivoj frekvenciji alela od najmanje 2 % (npr. DNMT3A, TET2, JAK2, SF3B1, ASXL1, TP53, CBL, GNB1, BCOR, U2AF1, CREBBP, CUX1, SRSF2, MLL2, SETD2, SETDB1, GNAS, PPM1D, BCORL1) • Vjerojatnost progresije u očitu neoplaziju iznosi približno 0,5–1 % godišnje, slično kao kod MGUS-a

*PNH – paroksizmalna noćna hemoglobinurija; MGUS – monoklonalna gamopatija neutvrđenog značaja; MBL – monoklonalna B limfocitoza

Preuzeto iz: Luger SM, Ciccarelli BT. A CHIP off the old (MDS) block. *Haematologica* [Internet]. 2025 Sep 1 [cited 2025 Oct 10];110(9):1898–9.

S druge strane, CCUS (*clonal hematopoiesis of undetermined significance*) – klonalna citopenija neodređenog značaja definirana je prisutnošću klonalne hematopoeze s citopenijom (hemoglobin <13 g/dL za muškarce i < 12 g/dL za žene, broj neutrofila <1.8 × 10⁹/L, ili trombocita <150 × 10⁹/L) (1). Iako su CHIP i CCUS dva zasebna entiteta koja su 2022. godine uvrštena u WHO i ICC klasifikaciju, zapravo predstavljaju spektar mijeloidnih bolesti (2,5,6).

Somatske mutacije koje pronalazimo u stanjima klonalne hematopoeze uključuju SNV (*single nucleotide variants*), insercije/delecije, CNV (*copy number variants*) kao i promjene kromosoma (1).

Najčešće mutacije gena, koje se mogu pronaći u 80% slučajeva klonalne hematopoeze uključuju DNMT3A, TET2 i ASXL1, no poznato je da se u pojedinim slučajevima javljaju i mutacije u pogonskim genima kao što su JAK2, IDH 1/2, SF3B1, SRSF1 i sl. (1) Prema podacima iz studija, prevalencija klonalne hematopoeze je oko 10% u pojedinaca starijih od 65 godina, a stopa progresije CHIP-a u mijeloidnu neoplazmu je oko 0.5- 1% godišnje, što je usporedivo s stopom progresije monoklonalne gamopatije neodređenog značenja u multipli mijelom (1,2).

CCUS je povezan sa značajno većom kumulativnom stopom progresije, koja prema podacima iznosi 82% u 5 godišnjem razdoblju, odnosno 92% u 10 godišnjem razdoblju iako postoje podatci i o nižim stopama progresije (1).

Važno je naglasiti da na temelju genomskih analiza postoji značajno podudaranje između CCUS – a i niskorizičnog MDS-a zbog čega bi se CCUS mogao klasificirati i kao rana faza mijeloidne bolesti (1)

Stoga je od velike važnosti razlikovati CHIP od stanja kao što je CCUS i u obzir uzeti rizik od progresije koji oni nose (1).

Prognostičko značenje CHIP i CCUS

Kako je ranije navedeno, CHIP je premaligno stanje hematopoetske matične stanice čija učestalost se povećava sa starenjem te je povezan s povećanim rizikom mijeloidnih neoplazmi, ali i višim kardiovaskularnim rizikom.

Somatske mutacije u genima povezanim s razvojem mijeloidnih neoplazmi su u ovom slučaju prisutne u hematopoetskoj matičnoj stanici te se detektiraju kao frakcija varijantnog alela (VAF, eng. „variant allele fraction“) na razini 2% ili više (7).

Iako su studije pokazale veću učestalost progresije prema mijeloidnim neoplazmama, koja je prosječno oko 1% godišnje, u određenim skupinama pacijenata ona je veća i od 90% (7,8). Prema retrospektivnoj studiji koja je uključila 151 bolesnika sa dokazanim CCUS, pokazana je značajna razlika ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata koji su bili izloženi citotoksičnoj terapiji (npr. kemoterapija, radioterapije) prije postavljanja dijagnoze u usporedbi s onima koji nisu bili izloženi takvim agensima (OS 3.6 godina u usporedbi s nedosegnutim OS) (9). Za precizniju karakterizaciju CHIP i CCUS razvijen je i prognostički skor (CHRS) koji temeljem dobi, prisutnosti i karakteristikama citopenije, detektiranim klonalnih mutacija i eventualnoj prisutnosti visokorizičnih mutacija na NGS-u i VAF-a razlikuje promjene niskog (≤ 9.5 bodova), intermedijarnog (10 – 12 bo-

dova) i visokog (≥ 12.5 bodova) rizika koje imaju rizik progresije prema MDS-u i AML-u u rasponu od manje od 1% za niskorizične bolesnike, 8% za bolesnike intermedijarnog rizika te do više od 50% za visokorizične bolesnike u (3,10)periodu od 10 godina (3,11). Klonalne mutacije visokog rizika (npr. SRSF2, SF3B1, ZRSR2, IDH1/2, FLT3, RUNX1, JAK2, TP53), raspodjela volumena eritrocita (RDW ≥ 15) te makrocitoza (prosječni volumen eritrocita (MCV) ≥ 100 fL) donose 2.5 boda, dok dvije ili više mutacije te VAF veći od 20% donose 2 boda.

Pitanje koje i danas izaziva rasprave je može li CHIP klon u rasponu od 2% do 10% VAF realno imati utjecaja na neobjašnjivu citopeniju.

Druge varijable uključene u prognostički skor poput prisutnosti citopenije (CCUS) i dobi preko 65 godine donose 2 boda, a ostale varijable (odsutnost visokorizičnih mutacija i DNMT3A mutacije, prisutnost jedne mutacije, VAF $< 20\%$, RDW $< 15\%$, MCV < 100 fL, dijagnoza CHIP-a i dob < 65 godina) donose po jedan bod(11).

Mutacija DNMT3A koja se u ispitivanjima pokazala kao niskorizična je i u ovom slučaju povoljan prognostički čimbenik te donosi 0.5 boda (8,11).

Još jedan prognostički skor koji je razvijen za procjenu progresije prema mijeloidnoj neoplazmi je MN prediktivni skor u kojem se zasebno prikazuje i izračunava preživljenje bez progresije te rizik progresije u AML, MDS ili MPN u razdoblju od 2, 5 i 10 godina. U MN prediktivni skor osim mutacija, dobi, VAF-a i obaveznih parametara krvne slike (hemoglobin, MCV, trombociti) se mogu unijeti i drugi potencijalno klinički značajni parametri koji se uzimaju u obzir pri izračunu rizika progresije (npr. neutrofili, lipidogram, retikulociti, indeks tjelesne mase) (12,13). Neke mutacije (npr. DNMT3A, JAK2, TET2) koje su u ispitivanjima pokazale povećani rizik za kardiovaskularne i tromboembolijske događaje koji mogu utjecati na ukupno preživljenje i kvalitetu života zahtijevaju strogu kontrolu rizičnih čimbenika i prema tome ciljane terapijske intervencije (14–16).

Prisutnost CHIP-a povezana je s povećanim rizikom od ateroskleroze, trombogeneze, kardiovaskularnih bolesti, akutnog oštećenja bubrega i razvoja hematoloških malignih bolesti (1, 4, 11, 12). U nedavno objavljenoj studiji koja je uključila 101 pacijenata sa STEMI, analizom je dokazana klinička važnost mutacija *ASXL1* i *CREBBP* koje su jedine bile povezane s lošijim ishodima (26).

Pacijenti s hematološkim malignim bolestima koji su CHIP+ imaju povećan rizik od nuspojava i

smrtnosti bez recidiva nakon autologne transplantacije matičnih stanica (ASCT) ili terapije kimeričnim antigenskim receptorom T stanica (13–15).

CHIP je češći kod pacijenata koji su liječeni ASCT zbog zbog prethodne izloženosti agensima poput kemoterapije i radioterapije. Prisutnost CHIP može utjecati na mobilizaciju matičnih stanica, odgođeni oporavak hematopoeze nakon ASCT, smanjenim ukupnim preživljavanjem i povećanom smrtnošću bez recidiva. Kako podaci ne ukazuju na povezanost CHIP i ukupnog preživljenja, potrebna su veća istraživanja kako bi se razjasnila zapažanja vezana uz CHIP i ASCT. Prisutnost klonalne hematopoeze ne bi trebala uvelike utjecati na kliničko donošenje odluka u vezi s autolognom SCT, iako bi bilo nužno pratiti poznatu prisutnost CHIP nakon ASCT zbog dugoročnih posljedica.

Prevalencija CHIP kod alogenične transplantacije matičnih stanica (aloSCT) općenito je niža u usporedbi s autolognom SCT, prvenstveno zbog mlađe dobi alogenih donora. Kako su se povremeno u istraživanjima pojavljivali izvještaji o pojavi akutnih leukemija porijekla darivateljevih matičnih stanica kod primatelja, već neko vrijeme se razmatra bolji skrining starijih darivatelja na prisutnost CHIP (25).

Iako se CHIP najčešće povezuje s mijeloidnim poremećajima, sve je više istraživanja o povezanosti CHIP s razvojem ili ishodima liječenja u limfoproliferativnim bolestima.

Analizirajući 437.219 ispitanika iz britanske biobanke (UK Biobank), identificirano je 13.068 osoba s CHIP-om i 424.151 bez CHIP-a. Osobe s CHIP-om bile su starije, s medijanom dobi od 62 godine, u usporedbi s onima bez CHIP-a, koji su imali medijan dobi od 57 godina.

Nadalje, CHIP je češće nađen kod muškaraca u odnosu na žene, s prekomjernom težinom i anamnezom nikotinizma. Medijan praćenja bio je 12,6 godina za osobe bez CHIP-a i 12,8 godina za one s CHIP-om. Među osobama s CHIP-om zabilježeno je 150 incidencijskih slučajeva bilo kojeg NHL-a (stopa incidencije 93,22 na 100 000 osoba-godina), dok je među osobama bez CHIP-a (tj. referentna skupina) identificirano 2653 slučaja (48,35 na 100 000 osoba/godina).

Osobe s CHIP-om imale su veći rizik od bilo kojeg NHL-a u odnosu na one u skupini bez CHIP-a (omjer rizika 1,52, 95% interval pouzdanosti). Nađen je povećani rizik u vezi s CHIP-om za većinu proučavanih podtipova NHL-a, posebno za KLL/SLL (HR: 1,64, 95% CI: 1,21–2,21), folikularni

NHL (HR: 1,63, 95% CI: 1,06–2,51) i ne-Hodgkinove limfome zrelih T/NK stanica (HR: 2,79, 95% CI: 1,57–4,96).

CHIP s mutacijom TET2 značajno je povećao rizik od NHL-a, kao i CHIP s mutacijama u DNMT3A iako u tom slučaju nije pronađena statistička značajnost. Analiza frakcija varijantnih alela (VAF) mutiranih gena otkrila je povišene rizike za NHL u oba slučaja CHIP-a s VAF-om od $\geq 0,1$ (HR: 1,55, 95% CI: 1,27–1,88) i onima s VAF-om $< 0,1$ (HR: 1,38, 95% CI: 1,02–1,88) (27).

Sve je više istraživanja o utjecaju CHIP-a na ishode liječenja i nuspojave kod pacijenata sa solidnim tumorima.

Većina studija je analizirala CHIP nakon liječenja maligne bolesti, a dosad objavljeni rezultati ukazuju na prevalenciju od 5 do 65% koja raste s dobi i prethodnim linijama liječenja.

Postoje neki dokazi da su određeni karcinomi vjerojatnije povezani s CHIP-om od drugih, pri čemu karcinomom pluća nemalih stanica, karcinom dojke, gušterače i prostate imaju najveću prevalenciju CHIP-a, dok pacijenti s karcinomom bubrežnih stanica i rakom jajnika imaju najnižu prevalenciju (22,23).

Najčešće CHIP mutacije kod zdravih osoba ili pacijenata sa solidnim karcinomima javljaju se u genima povezanim s epigenetičkom regulacijom, uključujući DNMT3A, TET2 i ASXL1. Dodatne mutacije pronađene su u genima povezanim s faktorima spajanja RNA (SF3B1, SRSF2 i U2AF1), odgovorom na oštećenje DNA (PPM1D i TP53) i signalnim putovima (npr. JAK2 V617F). Iako su obično asimptomatske, mutacije u kritičnim putovima - poput samoobnavljanja, diferencijacije, popravka DNA i upalne signalizacije - navodno utječu i na hematopoezu i na biologiju solidnih tumora, potencijalno potičući progresiju tumora.

Stresori iz okoliša djeluju sinergistički s mutacijama CHIP, poboljšavajući klonsku sposobnost i daljnje širenje. Opsežne studije pokazale su da bivši pušači i osobe s bolestima povezanim s pušenjem, pokazuju veću učestalost CHIP. Među citostatcima, inhibitori topoizomerase II i spojevi platine predstavljaju najveći rizik, a ovi su lijekovi također snažno povezani s mijeloidnim neoplazmama povezanim s terapijom.

Prema dosadašnjim spoznajama, citotoksične terapije prvenstveno selektiraju već postojeće somatske mutacije u genima oštećenja DNA kao što su TP53, PPM1D, ATM i CHEK2, koje pružaju prednost klonske selekcije i razvoja pod stresorima (24).

Mutacije CHIP-a mogu dovesti do povećane ekspresije upalnih gena u stanicama urođenog imunološkog sustava koje stvaraju proupalna stanja (16).

Kliničke i terapijske intervencije

Ciljane terapijske intervencije kod pacijenata sa dokazanim CHIP ili CCUS nisu definirane, već se obzirom na rizik, prisutne mutacije i prisutnost citopenija preporučuju različiti intervali praćenja i eventualne dodatne dijagnostičke obrade (17).

Za bolesnike sa CHIP-om niskog rizika prema CHRS uz odsutnost visokorizičnih mutacija preporučena je godišnja evaluacija kliničkog stanja i kompletne krvne slike, a u slučaju prisutnosti visokorizičnih mutacija ili prema CHRS-u intermedijarnog ili visokorizičnog CHIP-a kontrole se preporučuju svakih 6 mjeseci (18).

U slučaju dijagnosticiranog CCUS-a preporučaju se redovne kontrole krvne slike svakih 3 –6 mjeseci, ovisno o riziku i prisutnosti visokorizičnih mutacija, a u slučaju zabilježene progresije citopenije preporuča se ponavljanje NGS-a, uz dodatnu analizu koštane srži te u slučaju sumnje na progresiju u MDS, AML ili drugu mijeloidnu neoplazmu nastavak ciljane obrade (18). Ciljana terapija koja bi se oslonila na principe terapije MDS-a ili AML-a se ne preporučuje, u slučaju simptomatskih citopenija bez dokaza progresije bolesti preporučena je suportivna terapija (17,18). Obzirom na povećani kardiovaskularni i tromboembolijski rizik, posebice u bolesnika sa CHIP-om (npr. JAK2 ili TET2 mutaciju) preporuča se agresivna kontrola standardnih čimbenika rizika (14,16). Danas je aktivno i više kliničkih ispitivanja koja istražuju ciljanu terapiju za pacijente s dijagnozom CHIP/CCUS, fokusirana većinom na visokorizične bolesnike.

Kliničko ispitivanje faze II uključuje bolesnike s dijagnozom visokorizičnog CCUS kojima se u liječenje uključuje kanakinumab (humano monoklonsko protutijelo na interleukin-1) te se kao primarni ishod prati hematološki odgovor citopenija, a sekundarno i utjecaj na progresiju prema mijeloidnim neoplazmama (19).

Druga studija ispituje učinkovitost enasideniba (IDH2 inhibitora) kod pacijenata sa dijagnozom CCUS i IDH2 mutacijom uz primarno praćenje hematološkog odgovora (20). Jedno od aktivnih istraživanja uključuje i lijek koji je sada već etabliran u liječenju MDS - a niskog rizika, luspatercept, te ispituje njegov potencijal u pacijenata s dijagnozom CCUS (21).

Zaključak

CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential) i CCUS (Clonal Cytopenia of Undetermined/Significant Significance) predstavljaju rane klonalne poremećaje hematopoeze koji mogu prethoditi razvoju mijeloidnih neoplazija poput MDS-a ili AML-a.

Poznavajući ograničenja dostupnih kliničkih podataka, nalazimo da su citopenije jednako česte kod osoba s malim (2%-10%) CHIP klonovima kao i kod osoba s velikim (>10%) CHIP klonovima; međutim osobe s citopenijom koje imaju veliki CHIP klon imaju znatno povećan rizik od progresije u malignitet. Stoga su i važni podaci iz kliničke prakse ili identifikacija pojedinaca koji imaju viši rizik progresije u mijeloidni /limfoproliferativni poremećaj ili druge kronične nemaligne bolesti ovisno o CHIP/CCUS.

Njihovo pravovremeno prepoznavanje od strane multidisciplinarnih suradnika omogućuje ranu identifikaciju osoba s povećanim rizikom za malignu transformaciju, praćenje klonalne dinamike i hematoloških parametara, te pravovremenu intervenciju.

Literatura:

1. Mohammad A, Mascarenhas J, Marcellino BK, Nathan DI. Target practice: Opportunities for therapeutic intervention in CHIP and CCUS. *Blood Rev* [Internet]. 2025 Jul 25 [cited 2025 Oct 10];101323. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268960X25000682>
2. Luger SM, Ciccarelli BT. A CHIP off the old (MDS) block. *Haematologica* [Internet]. 2025 Sep 1 [cited 2025 Oct 10];110(9):1898–9. Available from: <https://haematologica.org/article/view/12232>
3. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Dec 25 [cited 2025 Oct 10];371(26):2488–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25426837/>
4. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Dec 25 [cited 2025 Oct 10];371(26):2477–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25426838/>
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2025 Oct 15];140(11):1200. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9479031/>
6. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Oct 15];36(7):1703–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35732831/>

7. Weeks LD, Niroula A, Neuberg D, Wong W, Lindsley RC, Luskin MR, et al. Prediktivnii of risk for myeloid malignancy in clonal hematopoiesis. *NEJM evidence* [Internet]. 2023 Apr 25 [cited 2025 Oct 15];2(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37483562/>
8. Weeks LD, Ebert BL. Causes and consequences of clonal hematopoiesis. *Blood* [Internet]. 2023 Dec 28 [cited 2025 Oct 15];142(26):2235–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37931207/>
9. Li M, Baranwal A, Gurney M, Shah SN, Al-Kali A, Alkhateeb H, et al. The impact of cytotoxic therapy on the risk of progression and death in clonal cytopenia(s) of undetermined significance. *Blood Adv* [Internet]. 2024 Jun 25 [cited 2025 Oct 15];8(12):3130–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38564774/>
10. Weeks LD, Niroula A, Neuberg D, Wong W, Lindsley RC, Luskin MR, et al. Prediktivnii of risk for myeloid malignancy in clonal hematopoiesis. *NEJM evidence* [Internet]. 2023 Apr 25 [cited 2025 Oct 15];2(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37483562/>
11. Weeks LD. Clonal Hematopoiesis Risk Skor (CHRS) Calculator. Dana-Farber Center for Prevention of Progression . 2023.
12. MN Prediktivni [Internet]. [cited 2025 Oct 15]. Available from: https://bioinf.stemcells.cam.ac.uk/shiny/vassiliou/MN_prediktivni/
13. Hasserjian RP. Calibrating Personalized Risk in Patients With Clonal Hematopoiesis. *The Hematologist* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 Oct 15];21(1). Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/hem.V21.1.202411>
14. Cobo I, Tanaka T, Glass CK, Yeang C. Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 Oct 15];29(1):1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34654019/>
15. Saadatagah S, Kim RB, Sukumar S, Uddin MM, Folsom AR, Cushman M, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and incidence of venous thromboembolism in older adults. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2025 Jul 1 [cited 2025 Oct 15];23(7):2235–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40252845/>
16. Zon R, Sekar A, Clapham K, Oren O, Niroula A. JAK2 -mutant clonal hematopoiesis is associated with venous thromboembolism. . *Blood*. 2024 Nov 14;144(20):2149–54.
17. Malcovati L, Cazzola M. How I manage patients with unexplained cytopenia. *Blood* [Internet]. 2025 Apr 10 [cited 2025 Oct 15];145(15):1610–20. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood.2024025771>
18. Risk Stratifying CHIP and CCUS in Hematology Clinics | Dana-Farber Cancer Institute [Internet]. [cited 2025 Oct 15]. Available from: <https://www.dana-farber.org/for-physicians/clinical-resources/hematologic-malignancies/advances-newsletter/2024-issue-18/risk-stratifying-chip-and-ccus-in-hematology-clinics>
19. Borate UM, Dvorak-Kornaus KM, Zhao Q, Eisfeld AK, Mundy-Bosse BL. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Multi-Center Study of Inflammation Modification of Canakinumab to Prevent Leukemic Progression of Clonal Cytopenias of Unknown Significance (CCUS): Impact Study. *Blood* [Internet]. 2023 Nov 2 [cited 2025 Oct 15];142(Supplement 1):1327–1327. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2023-189949>
20. Study Details | NCT05102370 | A Study of Enasidenib in People With Clonal Cytopenia of Undetermined Significance | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2025 Oct 15]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05102370?cond=CCUS%20Clonal%20Cytopenia%20of%20Undetermined%20Significance&rank=3>
21. Study Details | NCT06788691 | Luspatercept for Clonal Cytopenias of Uncertain Significance | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2025 Oct 15]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT06788691>
22. Marshall CH, Gondek LP, Luo J, Antonarakis ES. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential in Patients with Solid Tumor Malignancies. *Cancer Res*. 2022 Nov 15;82(22):4107–4113.
23. Krishnan T, Solar Vasconcelos JP, Titmuss E, Vanner RJ, Schaeffer DF, Karsan A, Lim H, Ho C, Gill S, Yip S, Chia SK, Kennecke HF, Jonker DJ, Chen EX, Renouf DJ, O'Callaghan CJ, Loree JM. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and its Association with Treatment Outcomes and Adverse Events in Patients with Solid Tumors. *Cancer Res Commun*. 2025 Jan 1;5(1):66–73.
24. Nguyen YTM, Fujisawa M, Ishikawa S, Sakata-Yanagimoto M. Clonal Hematopoiesis and Solid Cancers. *Cancer Sci*. 2025 Aug;116(8):2055–2063.
25. Singh A, Balasubramanian S. The crossroads of cancer therapies and clonal hematopoiesis. *Semin Hematol*. 2024 Feb;61(1):16–21. doi: 10.1053/j.seminhematol.2024.01.006.
26. Fan WL, Yeh JK, Hsieh LC, Tsai ML, Ho MY, Huang YC, Hsieh IC, Wen MS, Wang CY. Prognostic significance of clonal hematopoiesis in STEMI: a 10-year follow-up reveals high-risk gene mutations. *Hum Genomics*. 2025 May 12;19(1):51.
27. Liu M, Zhou L, Liu Q, Wang X, Wei H, Liu Q. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) and risk of non-Hodgkin lymphoma: A community-based cohort study. *Hemasphere*. 2025 Jul 27;9(7):e70187. doi: 10.1002/hem3.70187.

Peti sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema na Brijunima

Dražen Pulanić

Voditelj Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema

Slika 1. Peti sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema.



U rujnu 2025. godine na Brijunima je održan 5. sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema (Slika 1.) podijeljen tematski u dvije cjeline: u petak 5. rujna se prvo raspravila baza benignih hematoloških bolesti, a zatim je taj dan bio posvećen različitim anemijama i drugim ne-malignim i rijetkim bolestima (aplastična anemija, paroksizmalna noćna hemoglobinurija, hemoglobinopatije, autoimunosne hemolitičke anemije, mijelofistične anemije, hemofagocitni sindrom, eozinofilije, Vexas

sindrom, Gaucherova bolest, hemokromatoza). Idući dan, u subotu 6. rujna, teme su bile dominantno trombocitopenije poput imunosne trombocitopenije (ITP) i trombotične trombocitopenične purpure, ali i zanimljivosti iz područja laboratorijske medicine (poput obrade produženog PV-a u bolesnika bez jetrene bolesti), interventne radiologije (endovaskularne intervencije u dubokoj venskoj trombozi), pancitopenije u lišmaniozi, sekundarnih eritrocitoza i značenja visokog vitamina B12 u djece i odraslih. Na sastanku je sudjelovalo više od 70 sudionika, hematologa i drugi stručnjaka iz velikog broja hrvatskih centara, a sudjelovali su i specijalisti drugih grana medicine s kojima usko surađuju hematolozi (transfuziologija, gastroenterologija-hepatologija, medicinska biokemija, interventna radiologija). Na sastanku je aktivno sudjelovao i jedan od najuglednijih stručnjaka u svijetu iz područja ITP-a prof. dr. Francesco Zaja iz Italije, s izvrsnim predavanjem o novim terapijama za liječenje ITP-a. Nakon svakog predavanja slijedile su zanimljive rasprave. Sastanak je održan u ugodnom i vedrom raspoloženju, potaknuvši nove znanstvene i stručne inicijative. Svakako je potrebno istaknuti brojne sponzore koji su poduprli održavanje ovog sastanka, a sljedeći 6. sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema planira se u rujnu 2026. ponovno na Brijunima.

Slika 2. Sudionici Petog sastanka Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema na Brijunima.



Dojmovi s prvog sastanka Sekcije mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora

Ana Zelić Kerep

*Odjel za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava KBC Zagreb
predsjednica Sekcije mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju HLZ-a,
ambasador Young EHA Committee za Hrvatsku*

Sekcija mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) osnovana je u lipnju 2024. godine uz pismo podrške Europskog hematološkog društva (European Hematology Association, EHA), s ciljem da okuplja specijalizante hematologije i mlade specijaliste, te služi kao platforma za kontinuiranu edukaciju usmjerenu na hematologe u ranim fazama karijere. Od ostalih dugoročnih ciljeva Sekcije mladih hematologa jest i aktivno identificiranje edukacijskih/karijernih potreba specijalizanata/mladih hematologa na području Republike Hrvatske, te poticanje povezivanja i razmjene kliničkih iskustava specijalizanata hematologije/mladih hematologa na početku samostalnog kliničkog djelovanja.

S tim na umu, dana 20. i 21.9.2025. u Rastokama je održan prvi sastanak Sekcije mladih hematologa Hrvatskog društva za hematologiju HLZ-a, a sastojao se od nekoliko edukativnih cjelina gdje su se obradile glavne skupine bolesti i stanja koje su esencijalne za svakodnevni klinički rad. Okupilo se tridesetak specijalizanata i mladih hematologa, a edukativne sesije bile su vođene od strane mlađih specijalista, koji su moderirali specijalizante u prikazima slučajeva vezanih za određenu temu.

Skup je otvoren obraćanjem profesora Tonija Valkovića, a edukacija je započela pregledom imunosno posredovanih trombocitopenija, kojeg je dao dr. Marino Narančić, specijalist hematolog Odjela za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava u KBC Zagreb, koji je ujedno i tajnik Sekcije. Potom je dr. David Čičić iz KB Dubrava uveo auditorij u svijet akutnih leukemija, uz zanimljive i izazovne prikaze slučajeva iz svakodnevne kliničke prakse. Izazova prikaza limfoidnih neoplazmi su se prihvatili dr. Tomislav Brblić iz KBC Sestre Milosrdnice i dr. Ivana Vučinić Ljubičić iz OB "Dr. Josip Benčević" Slavonski Brod. Drugi dan skupa je obilježen cjelinama o multiplom mijelomu

pod vodstvom dr. Karle Mišure Jakobac iz KB Merkur, te o kroničnoj mijeloičnoj leukemiji, čime je skup zaključila dr. Ena Sorić iz KB Dubrava.

Skup je u prvi plan doveo specijalizante hematologije iz cijele Hrvatske u svim fazama specijalističkog usavršavanja, te je pokazao da je edukacija skrojena od mladih za mlade potrebna i prije svega učinkovita.

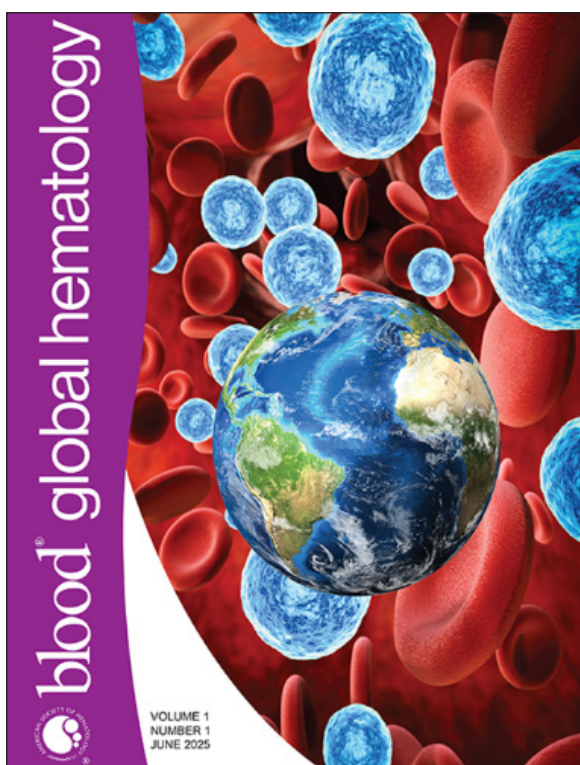
Ovim putem želim zahvaliti Hrvatskom društvu za hematologiju HLZ-a na podršci, pogotovo profesoru Toniju Valkoviću, te profesorici Nadiri Duraković, i svima koji su na bilo koji način ovaj skup podržali.

Na kraju je ostala pozitivna atmosfera i želja da se ovakvi skupovi nastave, za što svakako ne manjka podrške i entuzijazma, te ujedno najavljujem i drugi sastanak Sekcije koji se planira za treći vikend u rujnu 2026. godine, 19. i 20.9.

Novi časopis *Blood Global Hematology*

Blood Global Hematology novi je časopis s otvorenim pristupom (eng. open-access) iz portfelja časopisa *Blood* (najznačajnijeg hematološkog časopisa na svijetu), koji je fokusiran na studije iz regija koje su manje zastupljene u medicinskoj literaturi. Cilj tog novog časopisa je objavljivati visokokvalitetna hematološka istraživanja, kao i lokalne prilagodbe kliničkih smjernica, epidemiologiju i analize javnog zdravlja te radove koji se bave hematološkim problemima globalnog utjecaja.

Glavni urednik tog novog časopisa je dr. Jorge Cortes iz Georgia Cancer Center iz SAD-a, a prof. Dražen Pulanić postao je član uredništva kao prvi član međunarodnog uredništva iz Europe. Pozivaju se zainteresirani kolege da razmotre slanje svojih radova u *Blood Global Hematology* (<https://ashpublications.org/bloodglobal/pages/About>).



Zbirka pjesama „Postajemo otoci“ profesora Valkovića



Naš član prof. dr. sc. Toni Valković tijekom ove godine promovirao je u rodnoj Rijeci svoju prvu objavljenu zbirku pjesama „Postajemo otoci“ koja je 2023. godine tiskana u nakladi biblioteke „Knjigolijek“, nakladnika „Medicinska naklada“ Zagreb, a glavna urednica bila je prof. Anđa Raič. Zbirka sadrži 76 pjesama od kojih je svaka originalno ilustrirana. Zbirka „Postajemo otoci“ plod je višegodišnjeg pisanja pjesama, a pojedine pjesme su do sada objavljene jedino u lokalnom krčkom časopisu „Krčki val“. Njegova pjesma „Preobražaj“ (koja nije uvrštena u ovu zbirku) nagrađena je 2024. godine za najbolju pjesmu pisanu na standardnom hrvatskom jeziku od strane Nezavisnog internetskog portala „Otok Krk.org“ te multimedijalne udruge „Krčka beseda“.

U sljedećem tekstu izdvojeni su neki osvrti na zbirku „Postajemo otoci“.

Prof. Anđa Raič, urednica biblioteke „Knjigolijek“: Liječnici pjesnici, Biblioteka „Knjigolijek“, Liječničke novine, broj 241, srpanj 2025, stranica 66-67.

„...Ako postoji knjiga koja apsolutno odgovara našoj ediciji Knjigolijek, onda je to upravo ova knjiga. Zašto? Knjiga kipti od životne radosti. Mnoge su pjesme ditirambi nazorovskog tipa, s pastoralnim ugođajem i pozivom na uživanje... Valkovićeve su pjesme ode kvarnerskom podneblju i središnjem Otoku. U tu hvalu uključeni su mnogi mediteranski motivi: sunce, more, valovi, grote, školjke, masline, borovi, smokve, brodice, moreplovci... Budući da ozračje opuštanja, nirvane, ali i nadolazeće energije djeluje iscjeljujuće, možemo govoriti o učinku

ekoterapije... Zavičajni krajolik uglavnom je antropomorfiziran, stopljen s lirskim subjektom, ženom i Bogom, u službi dosljednoga panteizma. Drugi u odnosu stapanja najčešće je žena, pa slijede upečatljivi motivi ljubavi, želje i žudnje... Inače, neke Valkovićeve pjesme podsjećaju na haiku-poeziju. To su blic-sličice zaustavljenog trenutka...“

Prof. dr. sc. Ivan Damjanovi, dr. med: Liječnici pjesnici, Biblioteka „Knjigolijek“, Liječničke novine, broj 241, srpanj 2025, stranica 68.

„... Toni Valković jedan je od tih rijetkih liječnika-pjesnika koji je svoje pjesme sabrao i izdao kao zanimljivo i dopadljivo oslikanu zbirku pjesama... S morem autora povezuje i ljubav prema ženi, koja se spominje u nekoliko dojmljivih stihova. A spominje se i Bog, bez kojega svega toga ne bi bilo... Edgar Degas je rekao da umjetnost nije ono što ljudi vide u slici na prvi pogled, već ono što ih umjetnik nagovori da bi trebali vidjeti. To se načelo može primijeniti i na Toniju Valkovića, vizualnog umjetnika, koji svojim stihovima donosi slike i metafore, a mi ih onda doživljavamo kao njegovu, a kojiput i vlastitu poetsku stvarnost...“

Prof. dr. sc. Nikola Petković, hrvatski književnik, sveučilišni profesor, književni kritičar i publicist: predgovor zbirke pjesama „Postajemo otoci“

„... Pjesnički prvijenac riječko-krčkog pjesnika Tonija Valkovića zreo je tekstualni dokument čvrsto strukturirane trijade: lirsko-neopastoralne pjesme u i o zavičaju, duhovna i spiritualna (u velikoj mjeri pan-

teistička) promišljanja o prvim i posljednjim stvarima te propitivanje pojma i koncepta ljubavi... Nakon njezova izlaska iz tiska čitatelj s pravom očekuje nastavak poetskog prebiranja ovog ćutilnog autora čiji će prepoznatljiv glas jamačno obogatiti nacionalnu pjesničku pozornicu, bez obzira koliko ova bila sustavno urušavana od sadašnjosti koja je rezistentna upravo na segmente koje u ovom prikazu ističem: na drugog i empatiju, na nasušnu potrebu za duhovnošću te ohola kada se obraća ljubavi za koju pretpostavlja da je se može komodificirati... Stoga, nadam se, zapravo objektivno istinito vjerujem da će poezija Tonija Valkovića, osim estetskog učinka kojega će polučiti, trenutku u kojem živimo poslužiti i kao korektiv...”

Na kraju, evo i nekoliko Tonijevih pjesama...

GRANICA ZAVIČAJA

Gdje granica je zavičaja?

Ako okom određujemo:

U biblijski zelenom masliniku
Što živi u daljini;
Zapuštenom vinogradu
Tvoga oca;
Ili crti gdje nebo se
Istočilo u more.

Ako srcem prosuđujemo:

U kući gdje stara me mati
S tanjurom brodeta
Već satima čeka.

RASTOČEN U MORE

U snu se rastočih u more:
Tijelo u kaplje,
Misli u pjenu,
Žudnja u vale,
A sjećanja u ribe i koralje.
Pa rastočen u more
Konačno, sa sobom se sastah.

ŽENA U GROTI

Na primorskoj groti
Ležim gol i sam,
I s tobom u mislima
Ljubav opet ponavljam.

A grota Ti si
I ja sam na Tebi.

Na sol vonjaš ko' uvijek ljeti,
I ćutim žudnju Tvoje topline

Koju od sunca uzela si za me.

A kapi mora ko' kapi znoja
Padaju s mene
na Tvoje kameno tijelo
ko' noću kad u tebi ronim.

I svud oko mene vonj lavande i kuša
Baš ko' pod našim lancunima bijelim.

I sad kad Te nema ja ipak ležim
na tvom živom kamenom tijelu.

ČITATELJU

Tebi, to su možda riječi što nižu se i prolaze
(dani u godini, raspoloženja djevojke)....
Slike - ponekad nejasne i nestalne
(morska pjena il' pustinjski pjesak)...
Misli- počesto zbrkane i prijeporne
(osjećaji ljubavnika, proljetna kiša)....
Ali znaj,
Ja se u svakoj pjesmi rodim,
Ili umrem za te.

NEPOZNATOJ ŽENI

Svakoga jutra
Srećem ti oči
I tugu u njima.

A ispod tuge
Proplamsaji tijela,
Što željeti zna itekako.

Svako jutro
Ukrašeno tugom
Tvojega oka,
Za mene je jutro
Ustalo iz ljepote.

JATO RIJEČI

Na vjetrometinama i
Vododjelnicama života
Pokušavam uhvatiti
Jato razigranih riječi,
Što pjevaju i lete
U daljine, visine,
I sjećanja moga uma.

I uvijek mi neka,
Neuhvatljiva i prava
Nedostaje do bola.

NJIŠEMO SE

Njišemo se kao klatna:
Od časa kad volimo
Kroz duge zamahe samoće
Do trena kada smo voljeni.

Kao trava u savanama
Zatalasana proganjanim antilopama
Njišemo se u našim voljenjima.

DODIRI LJUBAVI

U stvarnosti u kojoj postoji
Vrijeme za rađanje,
I tijelo za voljenje
I riječi za žaljenje,
I zemlja za pokapanje,
Često ne ćutimo
Nevidljive dodire ljubavi.

GEOMETRIJA JUTRA

Usporedne i daleke dodirnice
Mora, kopna i neba
Prošarane putanjama broda
I već nevidljivog zrakoplova
Stvorile su geometriju jutra
U kojem život sporo i tiho
Ali nezaustavljivo raste
Iz nekoliko nijansi modrine,
Sunca i skrivenih strasti.

BIJEG

Tvoja mladost
Vrištala je u meni
Poput jata gladnih galebova.

Kao kiša želio sam pljuštati
Uzdizati se kao more
I kao vjetar žudio šibati.

Na kraju sam tek kao zora pobjegao.

NA KRAJU MENE

Na rubu ostarjelog tijela
I koncu svake misli
na samom kraju mene
Stoji more.

Jer jedino more
Na mom Otoku
Za mene
Uvijek je ondje.

MOJI SINOVI

Valovi moji:
Dugo i nježno
Zapluskujte žalove
Snažno al' mudro
Razbijajte rtove
Bez straha
Zaljuljajte brodove
Radosno i strasno
pohodite uvale

Sinovi, moji valovi.

TRENUTAK

Savršenstvo kasnog ljeta
Prepoznato u trenutku-
Kada Ti na pramcu
A Ja na krmi
Poglede smo ispleli,
I njima ljubav
Mornarskim čvorom vezali.
Blistavi trenutak kasnog ljeta
Već izgubljen
U labirintu vremena.

PANDEMIJSKA PJESMA

Koliko su divni naši životi?

I gledanje južine na moru
kada se sve inačice modrine
izmiješaju u jednom jedinom valu...
I kad mi ruku, blijedu, al' toplu,
kriomice položiš na bedara...
I kad u nekom velikom i dalekom gradu
stojim s tobom u gomili neznanih i
nasmijanih ljudi
shvaćajući da te volim...

PREOBRAŽAJ

Iz mojih starih i kvrgavih ruku
počele su rasti maslinove grane.
I usta koja skoro da su nijema
najednom zašumila su morem.
Dah koji jedva još da struji
iz utrobe posta tramontana
A noge klecave i slabe
duboko ulaze u zemlju
i korjen su mlade loze sada.

Umrijeti neću nikad
jer svoje potrošeno tijelo
pretvaram u otok.

[illegible]

