

Incidencija i ishod pojave akutne bolesti darivatelja protiv primatelja u Kliničkom bolničkom centru Zagreb

Šimunić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:216904>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Šimunić

Incidencija i ishod pojave
akutne bolesti darivatelja protiv primatelja
u Kliničkom bolničkom centru Zagreb

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom doc.dr.sc. Nadire Duraković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS KRATICA

aGvHD - akutna bolest presatka protiv primatelja (*engl. acute graft versus host disease*)

AP - alkalne fosfataze (*engl. Alkaline phosphatase*)

ATC - antitimocitni globulin

CD - klusteri diferencijacije (*engl. Cluster of differentiation*)

CMV – citomegalovirus

GI – gastrointestinalni, tj. probavni sustav

GvHD - bolest presatka protiv primatelja (*engl. Graft versus host disease*)

GvL - učinak presatka protiv leukemije (*engl. Graft versus leukemia*)

HLA - humani leukocitni antigeni (*engl. Human leukocyte antigens*)

HSCT - transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (*engl. Hematopoietic stem cell transplantation*)

IL - interleukin

JAK - Janus kinaza

KBC – Klinički bolnički centar

KS – koštana srž kao izvor izolacije matičnih stanica

MAC - mijeloablativno kondicioniranje (*engl. Myeloablative conditioning*)

MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl. Major histocompatibility complex*)

MiHA - slabi antigeni tkivne podudarnosti (*engl. Minor histocompatibility antigens*)

MMF - mikofenolat mofetin

MRD – srodan podudarni darivatelj (*engl. Matched related donor*)

MUD – nesrodan podudarni darivatelj (*engl. Matched unrelated donor*)

MoAb - monoklonalna antitijela (*engl. Monoclonal antibody*)

NK limfociti - prirodno ubilačke stanice (*engl. Natural killer cells*)

NMA – nemijeloablativno kondicioniranje (*engl. Non-myeloablative conditioning*)

PK – periferna krv kao izvor iz kojeg su izolirane matične stanice

RIC – kondicioniranje smanjenog intenziteta (*engl. Reduced-intensity conditioning*)

TCD - deplecija T-limfocita (*engl. T cell depletion*)

TH1 i TH2 - pomagački limfociti podskupine 1 i 2 (*engl. Helper T cells*)

TNF- α - čimbenik tumorske nekroze alfa (*engl. Tumor necrosis factor alfa*)

Sadržaj

SAŽETAK

SUMMARY

| | |
|--|----|
| I.UVOD | 1 |
| Naziv i imunološka osnova | 1 |
| Epidemiologija i faktori rizika | 3 |
| Klinička prezentacija | 4 |
| Terapija aGvHD | 5 |
| Profilaksa aGvHD | 6 |
| II.HIPOTEZA..... | 7 |
| III.CILJEVI | 7 |
| IV.PACIJENTI I METODE | 8 |
| V.REZULTATI..... | 9 |
| 1.dio – svi ispitanici | 9 |
| 2.dio – ispitanici koji su razvili aGvHD..... | 12 |
| VI.RASPRAVA | 16 |
| Incidencija aGvHD i faktori koji na nju utječu | 16 |
| Trenutak javljanja akutnog GvHD | 18 |
| Klinička prezentacija aGvHD | 18 |
| Odnos aGvHD i relapsa primarne bolesti..... | 19 |
| Akutni GvHD i preživljenje | 19 |
| Razvoj kroničnog GvHD..... | 20 |
| VII.ZAKLJUČCI..... | 21 |
| VIII.ZAHVALE | 22 |
| IX.LITERATURA..... | 23 |
| X.ŽIVOTOPIS | 27 |

SAŽETAK

Incidencija i ishod pojave akutne bolesti darivatelja protiv primatelja u Kliničkom bolničkom centru Zagreb

Lucija Šimunić

Akutna bolest presatka protiv primatelja predstavlja imunološku reakciju imunokompetentnih stanica presatka protiv imunološki nepodudarnih tkiva primatelja, u primatelju koji zbog imunosupresije ne može odbaciti presadak te je jedna od ranih komplikacija alogene transplantacije hematopoetskih matičnih stanica. Incidencija, vrijeme javljanja i težina simptoma varira ovisno o brojnim obilježjima primatelja i donora.

Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost incidencije aGvHD s obilježjima presatka i primatelja, te prikazati kliničke karakteristike pacijenata oboljelih od aGvHD u KBC-u Zagreb.

Uključeno je 78 pacijenata oboljelih od hematoloških bolesti, liječenih alogenom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica ili infuzijom donorskih limfocita, u sustavu Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom 2018.godine.

Akutni GvHD razvilo je 44,9% ispitanika, većina u četvrtom post-transplantacijskom tjednu, pri čemu je on bio stadija II ili višeg kod 34,6% od ukupnog broja ispitanika. Evidentirana je viša incidencija u pri presatku izoliranom iz periferne krvi ($p=0,011$) i kod nesrodnih podudarnih donora ($p=0,039$), dok razlika u incidenciji nije pronađena s obzirom na dob ni intenzitet kondicioniranja. Najveći broj pacijenata (82,9%) imao je kožni oblik bolesti, rjeđe gastrointestinalni (45,7%), a zahvaćenost jetre zabilježena je u samo 8,6% oboljelih. Blagi i srednje teški stadij, s proporcijom preživljenja 100%, zabilježen je u 22,9% i 34,3% pacijenata, dok je udio pacijenata u teškom i životno-ugrožavajućem stadiju, s lošijim preživljenjem, bio ukupno 42,9%. Kumulativna proporcija jednogodišnjeg preživljenja za pacijente oboljele od aGvHD iznosila je 77,1%, a za one bez aGvHD 62,7%, međutim prema Cox-Mantel analizi razlika distribucije nije značajna ($p=0.182$). Težina kliničke slike nije korelirala ni s dobi pacijenta, danom razvoja ni prelaskom u kronični GvHD, koji se konačno razvio u 20,0% oboljelih. Ispitanici koji su razvili relaps nisu se razlikovali od onih koji nisu u incidenciji aGvHD, no oni koji su preboljeli aGvHD odgodili su pojavu relapsa ($p=0,027$).

S obzirom na viši udio pacijenata s teškim i životno-ugrožavajućim oblicima te nešto nižu ukupnu stopu preživljenja od očekivane, posebna se pažnja treba posvetiti upravo prevenciji tih oblika, a s ciljem povećanja preživljenja.

Ključne riječi: GvHD, incidencija, rizik, relaps, preživljenje

SUMMARY

Incidence and outcomes of acute donor versus host disease at the University Hospital Center Zagreb

Lucija Šimunić

Acute graft versus host disease represents the immune response of graft immunocompetent cells against host tissue in immunosuppressed host who is unable to reject the graft and is one of the early complications of allogeneic hematopoietic cell transplantation. Incidence, time of onset and severity of symptoms vary depending on many host and donor features.

The aim of this paper was to explore connection of aGvHD incidence to graft and donor features, and to present clinical characteristics of patients with aGvHD in KBC Zagreb.

The study included 78 patients treated for haematological diseases with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation or donor lymphocyte infusion in KBC Zagreb during year 2018.

Acute GvHD developed in 44.9% of patients, in most cases during fourth post-transplantation week, and it was grade II or higher in 34.6% of the total number of participants. Higher incidence was noted in patients who received graft isolated from peripheral blood ($p=0.011$) and from the unrelated matched donor ($p=0.039$), while no difference was found depending on host age or conditioning intensity. Most common clinical manifestation was skin GvHD affecting 82.9% of patients, gastrointestinal form followed with 45.7%, while liver involvement was noted in only 8.6% of patients. Mild and moderate grade, with a survival proportion of 100%, was marked in 22.9% and 34.3% of patients, while portion of patients with severe and life-threatening grade, with lower survival proportion, was 42.9% in total. Cumulative one-year survival proportion of patients with aGvHD was 77.1%, and for those without 62.7%, but the Cox-Mantel analysis showed no significant difference ($p=0.182$). Severity of symptoms did not correlate with host age, day of onset nor development of chronic GvHD, which was observed in 20.0% of patients with acute form. Patients who developed relapse did not vary in aGvHD incidence from those who did not develop relapse, but those with aGvHD delayed developing relapse ($p=0.027$).

Considering higher number of patients with severe and life-threatening form of GvHD and modestly lower cumulative survival than expected, special attention is required for prevention of this form with the intention to increase survival.

Key words: GvHD, incidence, risk, relapse, survival

I. UVOD

Naziv i imunološka osnova

Akutna bolest presatka protiv primatelja (engl. acute graft versus host disease, aGvHD) jedna je od komplikacija i prepreka sigurnoj alogenoj transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica (engl. Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT). Alogena transplantacija označava presađivanja tkiva, u ovom slučaju hematopoetskih matičnih stanica, s jedne u drugu genetski različitu jedinku, ali unutar iste vrste. Koristi se kao terapija hematoloških malignih bolesti, ali i bolesti uzrokovanih mutacijama gena koje imaju učinak samo na stanicama podrijetlom iz hematopoetskih matičnih stanica, poput talasemija, srpaste anemije, nedostatka adenozin deaminaze (1). Matične stanice mogu biti izolirane iz koštane srži ili periferne krvi s faktorima rasta uvećanim udjelom matičnih stanica (2). Prije transplantacije prikupljenih matičnih stanica primatelj prolazi kroz proces kondicioniranja koji podrazumijeva primjenu kemoterapije, povremeno u kombinaciji sa zračenjem cijelog tijela, a s ciljem uništenja hematopoetskog i imunskog sustava domaćina (2).

Akutna bolest presatka protiv primatelja prvo je primijećena u životinjskim modelima i nazvana sekundarnom bolesti zbog mišljenja da nastaje sekundarno po oporavku od iradijacijskih oštećenja (3). Već šezdesetih identificirani su uvjeti koji moraju biti ispunjeni za nastanak sekundarne bolesti: primjena presatka koji sadržava imunokompetentne stanice, imunološka nepodudarnost primatelja i donora te transplantacija presatka imunosuprimiranom primatelju (3). Danas je poznato da GvHD nastaje zbog imunološke reakcije imunokompetentnih stanica presatka protiv imunološki nepodudarnih tkiva primatelja, u domaćinu koji zbog imunosupresije ne može odbaciti presadak.

Imunološka podudarnost tkiva određena je prvenstveno proteinima glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. Major histocompatibility complex, MHC), koji su u ljudi nazvani humani leukocitni antigeni (engl. Human leukocyte antigens, HLA). HLA proteini grupe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) prisutni su na gotovo svim stanicama s jezgrom i predstavljaju antigene CD8⁺ limfocitima T, dok su proteini grupe II (HLA-DR, -DQ, -DP) prisutni samo na predočnim stanicama i prezentiraju antigene CD4⁺ limfocitima T (4). HLA proteini kodirani su klasterom gena na kratkom kraku šestog kromosoma, a nasljeđivanje lokusa HLA-A, -B, -C i -DR je usko povezano te se u pravilu nasljeđuje jedan set lokusa od svakog roditelja (2). HLA geni izraženi su kodominantno (4). S obzirom da su geni HLA najpolimorfiji geni prisutni u bilo kojem genomu sisavaca (4), a veća nepodudarnost uzrokuje snažniju imunološku reakciju (2), tipizacija HLA je ključan korak u izboru donora za alogenu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica. U upotrebi su serološke i molekularne tehnike tipizacije, a cilj je pronalazak podudarnosti u HLA-A, -B i -DR donora i primatelja, što se opisuje kao 6/6 podudarnost (2). Povremeno je prihvatljiva nepodudarnost u jednom alelu (5/6), no veće se razlike

ne toleriraju (2). Iznimka su haploidentične transplantacije u kojima su donor i primatelj podudarni u samo jednom haplotipu, tj. jednom setu lokusa, te je tada potrebna dodatna obrada presatka da bi se smanjila mogućnost razvoja GvHD (2).

Unatoč HLA podudarnosti, pri alogenoj transplantaciji i dalje postoji rizik razvoja GvHD zbog postojanja slabih antigena tkivne podudarnosti (engl. Minor histocompatibility antigens, MiHA) (5). Ovi se proteini ponašaju kao antigeni bilo zbog polimorfizma u populaciji bilo zbog kodiranosti genima na Y kromosomu (5). Riječ je o peptidima nastalima iz unutarstaničnih proteina i prezentiranim putem MHC molekula donorskim limfocitima T (6). Donorski T-limfociti prepoznaju kompleks MHC i MiHA kao strani antigen i pokreću reakciju protiv njega, što se smatra ključnim korakom u patofiziologiji GvHD (6). Aktivirani donorski T-limfociti mogu direktno ili koristeći sekundarne mehanizme uzrokovati uništenje stanica i tkiva. Patološkim pregledom tkiva često se nalaze NK-limfociti vezani na odumiruće stanice, što ukazuje na njihovu ulogu izvršnih stanica u aGvHD (1). Kao medijator uglavnom se spominje čimbenik tumorske nekroze (engl. Tumor necrosis factor alfa, TNF- α), čije su povišene razine nađene u pacijenata s aGvHD. Također, korištenje protutijela protiv TNF- α kod pacijenata s GvHD rezistentnim na standardnu terapiju, rezultiralo je smanjenjem lezija karakterističnih za aGvHD (6).

Nakon alogene transplantacije imunološki sustav donora sudjeluje u eradikaciji maligne bolesti primatelja, što se naziva učinkom presatka protiv leukemije (engl. Graft versus leukemia effect, GvL), a smatra se jednim od razloga visoke uspješnosti ove terapije (2). Tako nepodudarnost koja s jedne strane uzrokuje GvHD, s druge strane ima i pozitivan učinak uklanjanja tumorskih stanica. Ovom se učinku pripisuje činjenica da alogene transplantacije imaju niži rizik relapsa prvotne bolesti nego autologne, a rizik je niži što je nepodudarnost veća (7).

Iako se bolest presatka protiv primatelja uglavnom veže uz transplantaciju koštane srži i matičnih stanica periferne krvi zbog prisutnosti limfocita T, pojava ovog sindroma moguća je, iako znatno rjeđe, i kao komplikacija transplantacije solidnih organa s velikim udjelom limfnog tkiva, poput tankog crijeva, pluća ili jetre (1), te pri transfuziji neozračene krvi (8).

Epidemiologija i faktori rizika

Klinički značajan akutni GvHD, definiran kao GvHD stadija II-IV (6), razvija se u 35-50% primatelja alogenog transplantata unatoč HLA podudaranju i profilaksi (9), dok je bez profilakse gotovo neizbježan (3). Simptomi se u većini slučajeva javljaju u razdoblju od drugog do šestog tjedna od transplantacije (6). Precizna incidencija, vrijeme javljanja i težina simptoma varira ovisno o brojnim faktorima rizika od kojih su neki potvrđeni brojnim istraživanjima, dok su za neke rezultati kontradiktorni.

S obzirom da je razvoj akutnog GvHD rezultat alogene reaktivnosti, glavni faktor rizika je HLA i MiHA nepodudarnost. Pritom veća HLA nepodudarnost odgovara jačoj reakciji (3) i nižem preživljenju (7). Pri HLA identičnoj transplantaciji primijećena je viša incidencija klinički značajnog GvHD kod nesrodnih donora u odnosu na srodne (6). Sljedeći važan faktor je intenzitet kondicioniranja. Naime, uslijed kondicioniranja dolazi do znatnog oštećenja tkiva primatelja i snažne upalne reakcije s mnoštvom citokina, koji pak mogu dovesti do pojačane ekspresije MHC molekula uslijed čega je prepoznavanje nepodudarnosti olakšano (6). Unatoč većem broju T limfocita u presatku podrijetlom iz periferne krvi u usporedbi s presatkom iz koštane srži, nije jednoznačno potvrđen povećan rizik za razvoj aGvHD, što se pripisuje protektivnom učinku mobilizacije uporabom faktora stimulacije kolonija (6). Naime, faktori stimulacije kolonija (engl. Colony-stimulating factor) mogu preko interleukina 10 (IL-10) uzrokovati polarizaciju T-limfocita u smjeru TH2, koji se povezuje s prevencijom GvHD. Suprotno, interleukin 2 (IL-2) dovodi do polarizacije u smjeru TH1, tj. aktivacije citotoksičnih T-limfocita, što korelira s većim rizikom GvHD, zbog čega se razmatra njegoa prediktivna i terapijska vrijednost (6). Transfuzija matičnih stanica iz pupčane vrpce rezultira nižom incidencijom aGvHD II-IV nego transfuzija matičnih stanica izoliranih iz drugih izvora, unatoč srodnosti i podudarnost (10), što se objašnjava naivnosti donorskih limfocita (8). Međutim, s obzirom da pupčana vrpca sadržava malen broj stanica, takva je transplantacija moguća jedino u djece ili sitnih odraslih. Alternativa je transfuzija stanica iz dviju pupčanih vrpca, no time se može povisiti rizik razvoja aGvHD u odnosu na transplantat podudarnog srodnog donora (10). Utjecaj mikrookoliša eksperimentalno je istraživan na životinjskim modelima, gdje je primijećeno da dekontaminacija crijeva i boravak u sterilnom okolišu smanjuje incidenciju i težinu GvHD (3). Kliničkim istraživanjima također je potvrđeno da antibiotska profilaksa i boravak u sobama s laminarnim protokom zraka imaju protektivan učinak ne samo na razvoj infekcija, nego i razvoj GvHD (6). Ostali istraživani faktori o kojima ovisi incidencija GvHD uključuju korištenu profilaksu, dob pacijenta i donora, seropozitivnost na CMV, primarnu bolest i dodante komorbiditete, raniju aloimunizaciju donora te spolnu nepodudarnost (3). Poseban rizik nosi kombinacija muškog pacijenta i ženskog donora, multipare, što se objašnjava alosenzitizacijom tijekom trudnoće (11).

Klinička prezentacija

Tradicionalno prema vremenu pojave i kliničkoj prezentaciji razlikujemo dva oblika GvHD: akutni i kronični. Akutni se u pravilu javlja u sto dana od transplantacije i karakteriziran je zahvaćanjem kože, jetre i gastrointestinalnog sustava, pojedinačno ili u kombinacijama. Najranija i najčešća klinička manifestacija aGvHD je makulopapulozni osip koji najčešće počinje na dlanovima i tabanima iako se može javiti bilo gdje na tijelu, a pacijenti se žale na svrbež i osjetljivost (9). Trenutak pojave osipa većinom odgovara trenutku prihvaćanja presatka (9). Moguće je spontano povlačenje, ostanak postupalnih dispigmentacija, ali i progresija u generaliziranu eritrodermiju s formacijom bula i deskvamacijom (3). Drugi najčešće zahvaćeni organ je jetra. Akutni GvHD jetre prezentira se kao žutica s konjugiranom bilirubinemijom i povišenom razinom alkalne fosfataze (engl. Alkaline phosphatase, AP), dok razine aminotransferaza mogu ostati normalne (6). Takva slika odražava oštećenje malih žučnih vodova što dovodi do kolestaze, a može se potvrditi i patohistološki (6). Gastrointestinalni sustav je najčešće najteže zahvaćen sustav u aGvHD i najteže se liječi. Najčešći simptom je proljev, iako mogu biti prisutni i mučnina, povraćanje, grčevita bol, distenzija, paralitički ileus i intestinalno krvarenje (6). Proljev se može nastaviti i unatoč prekidu oralnog unosa i otežavati održavanje ravnoteže tekućine (6).

Zbog kompleksnosti brige za pacijenta primatelja presatka matičnih stanica, često je teško razlikovati karakteristična klinička obilježja aGvHD od oštećenja nastalih kondicioniranjem, toksičnih učinaka ili nuspojava lijekova te infekcija (3). S obzirom da svaki od mogućih uzroka iziskuje drugačiji terapijski pristup, preporučljivo je učiniti biopsiju jednog ili više zahvaćenih organa (3). Patohistološki pregled često je nužan za potvrdu dijagnoze, međutim ni on nije uvijek patognomoničan (6).

Kronični GvHD može se manifestirati u bilo kojem trenutku nakon transplantacije, a obilježava ga klinička slika i patološki nalaz nalik na autoimune bolesti (12). Akutni GvHD je glavni faktor rizika za nastanak kroničnog (8). Smatra se da otprilike dvije trećine slučajeva kroničnog GvHD nastaje iz akutnog, dok se jedna trećina javlja *de novo* (12).

Zbog postojanja slučajeva javljanja obilježja akutnog GvHD nakon stotog dana, te slučajeva preklapanja simptoma, navedena tradicionalna podjela više nije bila dostatna te su novom podjelom unutar svake skupine definirane dvije podskupine. Akutni klasični GvHD definiran je postojanjem karakteristične kombinacije simptoma unutar sto dana od transplantacije ili infuzije donorskih leukocita (13). Pojava simptoma karakterističnih za aGvHD nakon stotog dana, a bez istodobne prisutnosti obilježja kroničnog definira se kao perzistentni, rekurentni ili late onset GvHD (13). U slučaju istovremene prisutnosti simptoma obje grupe govori se o sindromu preklapanja (engl. overlap

syndrome), a klasični kronični uključuje pojavnost simptoma karakterističnih za kronični GvHD u bilo kojem trenutku, ali bez istovremene prisutnosti simptoma akutnog (13).

Terapija aGvHD

Izbor inicijalne terapije ovisi o zahvaćenim organima, simptomima te korištenoj profilaksi i uglavnom je temeljen na imunosupresiji T-limfocita, koji se smatraju odgovornima za kliničke manifestacije aGvHD (14). Unatoč postojanju brojnih terapijskih opcija i stalnom razvitku novih, sistemski kortikosteroidi ostaju terapija izbora u liječenju akutnog GvHD (8). Uz iznimku razreda I kada topikalna primjena može biti dostatna, uglavnom se primjenjuju sistemski kortikosteroidi, na primjer metilprednizolon u visokoj dozi od 2 mg/kg na dan, kontinuirano 7 do 14 dana, nakon čega slijedi postupno smanjenje doze (3). Nije potrebno koristiti doze više od navedene, jer je potvrđeno da su pacijenti koji su primali dozu od 10 mg/kg na dan imali isti omjer odgovora na terapiju i 3-godišnju smrtnost kao i oni koji su primali 2 mg/kg na dan (9). Osim primjene kortikosteroida, nužna je optimizacija doza profilaktičkih lijekova s ciljem postizanja terapijskih razina, a kod onih pacijenata koji više ne primaju profilaksu ponovo uvođenje (14). Ostala terapija ovisi o prisutnim simptomima. Kod kožnog oblika primjenjuju se hidratantne kreme, a u prisutnosti svrbeža moguća je uporaba antihistaminika (14). U pacijenata s gastrointestinalnom manifestacijom može se adjuvantno primijeniti kortikosteroid bez mogućnosti apsorpcije, poput beklometazona, no pritom treba biti isključeno istovremeno postojanje infekcije (14). Iznimno je bitna suportivna terapija s ciljem održavanja ravnoteže elektrolita, a oktretid se može koristiti za kontrolu proljeva (14).

Kao prva linija razmatrani su brojni drugi lijekovi i njihove kombinacije sa kortikosteroidima, međutim nijedan se nije pokazao boljim. Kombinacija metilprednizolona i mikofenolat mofetina (MMF) činila se obećavajućom, međutim nije općeprihvaćena zbog povećanja broja infektivnih komplikacija (3). Otprilike 40-50% pacijenata reagira na terapiju prvog izbora (3), a šansa za odgovorom smanjuje se s povišenjem stadija aGvHD (15). Progresija aGvHD unutar 3-5 dana od početka terapije ili nepotpun odgovor u roku od 7-14 dana smatraju se rezistencijom na kortikosteroide i jedna su od indikacija za uvođenje terapije drugog izbora (3). Druga je indikacija ovisnost o steroidima, definirana kao ponovno javljanje lezija uslijed smanjenja doze kortikosteroida (3). Trenutno ne postoji konsenzus što bi se trebalo koristiti kao druga linija terapije, iako se najčešće primjenjuju monoklona protutijela (engl. Monoclonal antibody, MoAb) ili poliklona protutijela nazvana antitimocitni globulin (ATG) (3). Od monoklona protutijela u upotrebi su protutijela na receptore interleukina 2 i TNF- α te na CD52 (3). CD52 je marker limfocita (3), dok IL-2 i TNF- α imaju ulogu u upalnoj patogenezi GvHD (6). Pacijenti koji koriste etanercept (inhibitor TNF- α) u kombinaciji s metilprednizolonom imaju veću vjerojatnost postići potpuni odgovor na terapiju, a time i bolje preživljenje u usporedbi s onima koji koriste samo etanercept, uz istovremeno sličnu stopu

infekcija (14). Moguća je primjena i sirolimusa, mikofenolat mofetina, pentostatina. Dobri rezultati postizu se primjenom ekstrakorporalne fotofereze, čija je glavna prednost nad ostalim metodama manja toksičnost (3). Najnovije metode ciljaju signalne unutarstanične puteve koji se pokreću aktivacijom citokinskih receptora, poput ruxsolutiniba koji uzrokuje supresiju JAK kinaznog puta te regulatorne T limfocite koje se nastoji stimulirati putem infuzije alfa-1 antitripsina (3) ili inducirati njihov razvoj iz transplantiranih mezenhimalnih stromalnih stanica (14). Uz imunosupresive pacijentima se često u terapiju dodaju antimikrobni lijekovi, posebice u slučajevima ovisnosti o kortikosteroidima, s obzirom da su ionako pod rizikom od infekcija, a produžena imunosupresija dodatno povisuje taj rizik (6).

Profilaksa aGvHD

S obzirom na lošu prognozu aGvHD viših stadija i unatoč primjeni terapije, sve se više napora ulaže u pronalazak što bolje profilakse. Kao profilaksa nekad je široko u upotrebi bio metotreksat, da bi mu kasnije bio dodan ciklosporin (3), što je danas najčešće korištena profilaksa kod pacijenata s mijeloablativnim kondicioniranjem (16). Umjesto ciklosporina može se primijeniti takrolimus, za kojeg studije izvještavaju da smanjuje incidenciju klinički značajnog GvHD (17), ali nema razlike u preživljenju u odnosu na ciklosporin (3). Nadalje, kombinacija mikofenolat mofetina s ciklosporinom ili takrolimusom podjednako je učinkovita kao raniji režimi, a uz to povezuje se s boljim prihvaćanjem presatka zbog čega je često korištena u kondicioniranju smanjenog intenziteta (16).

Alternativni pristup predstavlja deplecija T-limfocita (engl. T cell depletion, TCD). Može se provesti ex vivo prije infuzije ili in vivo koristeći poliklonalna ili monoklonalna protutijela (3). Ovakav je pristup iznimno učinkovit u profilaksi GvHD, no pokazao se rizičnim za razvoj infektivnih komplikacija i relapsa prvotne bolesti, zbog čega je primjena ograničena na situacije u kojima rizik od smrti uslijed GvHD nadmašuje rizik relapsa, poput haploidentičnih i nepodudarnih transplantacija (3).

Od neimunosupresivnih metoda prevencije vrijedi spomenuti primjenu ursodeoksikolne kiseline, koja dokazano smanjuje incidenciju hepatalnog i gastrointestinalnog oblika GvHD (18).

II. HIPOTEZA

Incidencija akutne bolesti presatka protiv primatelja u pacijenata liječenih alogenom transplantacijom u KBC-u Zagreb, kao i trenutak javljanja, klinički oblici i preživljenje, odgovara onoj u svijetu, a ovisi o dobi pacijenta, intenzitetu kondicioniranja, izvoru iz kojeg je presadak izoliran i srodnosti donora i primatelja, te korelira sa smanjenom pojavom relapsa primarne bolesti.

III. CILJEVI

Opći cilj ovog rada je istražiti povezanost incidencije aGvHD s obilježjima presatka i primatelja, te prikazati kliničke karakteristike pacijenata oboljelih od aGvHD u KBC-u Zagreb.

Specifični ciljevi su:

I. U promatranju svih pacijenata

- Utvrditi korelaciju faktora rizika (viša dob pacijenta, presadak izoliran iz periferne krvi, nesrodan ili nepodudaran donor, mijeloablativno kondicioniranje) i incidencije aGvHD
- Utvrditi zaštitan učinak aGvHD na razvoj relapsa
- Utvrditi stopu preživljenja primatelja alogenog grafta matičnih stanica

II. U promatranju samo pacijenata koji su razvili aGvHD

- Utvrditi prosječan trenutak pojave aGvHD te korelaciju trenutka pojave s izvorom iz kojeg je izoliran presadak i intenzitetom kondicioniranja
- Prikazati zastupljenost pojedinih oblika i stadija
- Utvrditi korelaciju težine kliničke slike s dobi pacijenta, trenutkom javljanja i ishodom (preživljenjem i prelaskom u kronični GvHD)

IV. PACIJENTI I METODE

U istraživanje je uključeno 78 pacijenata oboljelih od hematoloških bolesti, liječenih alogenom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica ili infuzijom donorskih limfocita, na Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom 2018.godine.

Podaci o pacijentima prikazani su tablično te su opisane njihove demografske (dob i spol) i kliničke (srodnost donora, izvor matičnih stanica, intenzitet kondicioniranja, trajanje hospitalizacije) karakteristike. Izračunata je ukupna incidencija akutnog GvHD, te incidencija klinički značajnog GvHD. Zatim su analizirane razlike u potencijalnim faktorima rizika (srodnost donora i primatelja, izvor izoliranja presatka, intenzitet kondicioniranja te dob pacijenta) među pacijentima koji su razvili aGvHD i onima koji nisu, te razlike u preživljenju i sklonosti razvoju relapsa. Među pacijentima koji su razvili aGvHD analizirano je kada se sindrom prosječno javlja, zastupljenost pojedinih oblika i stadija te preživljenje.

Zahvaćenost pojedinih organa iskazana je kroz stadije po Glucksbergu kako slijedi. Lezija svakog od 3 karakteristična organa svrstava se u jedan od pet moguća stadija, pri čemu stadij nula označava da nema zahvaćanja spomenutog organa. Progresija kožnog GvHD klinički se svrstava u četiri stadija ovisno o proširenosti kožne lezije u odnosu na površinu tijela. Prvi, drugi i treći stadij označavaju zahvaćanje do 25, do 50 i iznad 50% površine tijela redom, dok je četvrti obilježen generaliziranom eritrodermijom s formacijom bula i deskvamacijom. (19) Oštećenje jetre izraženo je kao količina ukupnog bilirubina u serumu izražena u mg/dL. Do 2 mg/dL označava nezahvaćenost, odnosno stadij nula. Prvi, drugi, treći i četvrti stadij definirani su vrijednostima do 3, do 6, do 15 i iznad 15 mg/dL redom. (19) Volumen proljevaste stolice mjera je zahvaćenosti gastrointestinalnog sustava, a normalu predstavlja količina do 500 ml dnevno. Do 1000, 1500 i iznad 1500 ml dnevno svrstava se u prvi, drugi i treći stadij redom, a četvrti uključuje prisutnost krvi u stolici, jaku abdominalnu bol ili ileus. (19) Ukupan stadij određuje se kombinacijama pojedinačnih stadija te dobar je prediktor preživljenja. (3) Stadij I (blagi oblik) označava izolirano blago ili umjereno zahvaćanje kože, stadij II (umjereno teški oblik) široko zahvaćenu kožu ili blago zahvaćen gastrointestinalni sustav ili jetru. Umjereno ili teško zahvaćena jetra ili gastrointestinalni sustav definira stadij III (teški oblik), a zahvaćenost bilo kojeg organa u pojedinačnom stadiju IV svrstava se u ukupan stadij IV (životno-ugrožavajući oblik) (19).

V. REZULTATI

Rezultati su prikazani u dva dijela. U prvom dijelu analizirane su karakteristike svih ispitanika te razlike među ispitanicima koji su razvili aGvHD u odnosu na one koji aGvHD nisu razvili. Drugi dio odnosi se na pacijente koji su razvili aGvHD.

1.dio – svi ispitanici

Analizirano je 78 primatelja alogenog presatka hematopoetskih matičnih stanica, od čega 42 (53,8%) muškaraca i 36 (46,2%) žena. Prosječna dob ispitanika, izražena kao medijan (raspon), iznosila je 39 (1- 68) godina. Podaci o podrijetlu presatka s obzirom na izvor iz kojeg je presadak izoliran te s obzirom na srodnost primatelja i donora prikazani su u Tablici 1. U Tablici 2 prikazan je intenzitet kondicioniranja primatelja. Prosječno trajanje hospitalizacije, mjereno od dana transplantacije, a prikazano kao medijan (25.a – 75.a percentila) bilo je 30 (24 – 44) dana. Akutnu bolest presatka protiv primatelja (aGvHD) razvilo je 35 (44,9%) ispitanika, pri čemu je ona bila ukupnog stadija II ili višeg kod 27 (34,6%) ispitanika. Do relapsa primarne bolesti je došlo u 12 (15,4%) ispitanika. Desetero (12,8%) primatelja umrlo je do stotog dana od transplantacije, od čega je samo jedan (10,0%) u tom trenutku imao potvrđen relaps primarne bolesti, odnosno smrtnost bez relapsa primarne bolesti iznosila je 11,5%.

Tablica 1 Podrijetlo presatka s obzirom na izvor iz kojeg je izoliran te srodnost primatelja i donora. Podaci su prikazani kao broj (udio od ukupnog broja ispitanika)

| | | |
|----------|---|------------|
| Izvor | Periferna krv (PK) | 48 (61,5%) |
| | Koštana srž (KS) | 30 (38,5%) |
| Srodnost | Srodan – engl.matched related donor (MRD) | 16 (20,5%) |
| | Nesrodan – engl.matched unrelated donor (MUD) | 46 (59,0%) |
| | Haploidentičan | 16 (20,5%) |

Tablica 2 Intenzitet kondicioniranja primatelja. Podaci su prikazani kao broj (udio od ukupnog broja ispitanika)

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| Intenzitet kondicioniranja | Mijeloablativno – engl.myeloablative conditioning (MAC) | 34 (43,6%) |
| | Ne-mijeloablativno – engl.non-myeloablative c. (NMA) | 10 (12,8%) |
| | Smanjenog intenziteta – engl.reduced-intensity c. (RIC) | 34 (43,6%) |

Razlike među ispitanicima koji su razvili aGvHD i onima koji nisu analizirane su koristeći Pearsonov hi-kvadrat test za kategoričke varijable (spol, izvor, srodnost, intenzitet kondicioniranja, relaps), a Mann-Whitney za numeričke (dob, trajanje hospitalizacije, dan razvoja relapsa), pri čemu se p vrijednost $<0,05$ smatrala statistički značajnom.

Ispitanici koji su razvili aGvHD nisu se razlikovali od onih koji bolest nisu razvili ni u dobi ($p=0,469$) ni po spolu ($p=0,150$). Nije postojala statistički značajna razlika ni u trajanju hospitalizacije nakon transplantacije među grupama ($p=0,864$). Intenzitet kondicioniranja također nije značajno utjecao na incidenciju aGvHD ($p=0,532$). Međutim, razlika među grupama primijećena je s obzirom na izvor iz kojeg je presadak izoliran ($p=0,011$). Incidencija aGvHD u ispitanika koji su primili presadak izoliran iz koštane srži iznosila je 26,7%, u usporedbi sa 56,3% koliko je iznosila u onih koji su primili presadak izoliran iz periferne krvi.

Nadalje, razlika u incidenciji aGvHD nađena je i ovisno o srodnosti donora i primatelja ($p=0,043$). U Tablici 3 prikazane su incidencije aGvHD unutar pojedinih grupa i vrijednosti prilagođenih standardiziranih reziduala (engl. adjusted standardised residual). Prilagođeni standardizirani reziduali korišteni su kao post-hoc test za određivanje skupine koja pridonosi značajnosti hi-kvadrat testa, što je definirano kao vrijednost $>1,96$. Samo je za nesrodne donore vrijednost reziduala bila značajna (2,48) i pozitivna. Za nju je izračunata p vrijednost, koja je uz prilagodbu Bonferronijevom korekcijom iznosila 0,039.

Tablica 3 Incidencija aGvHD ovisno o srodnosti donora i primatelja.

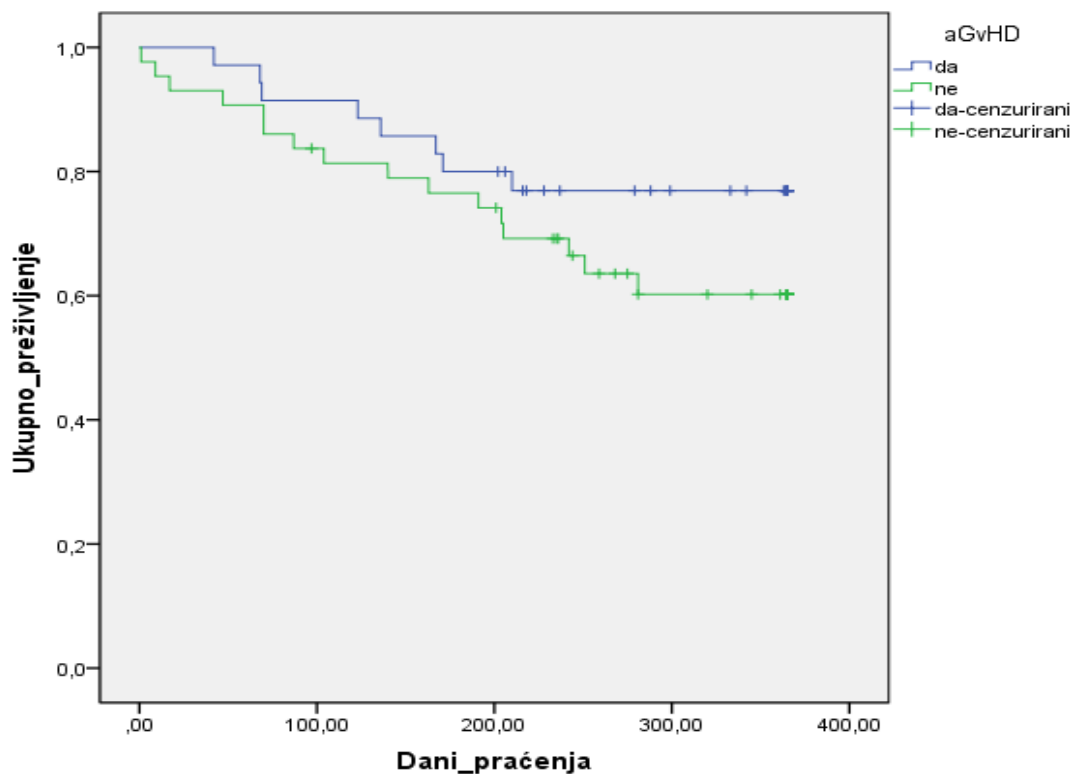
| | Haploidentičan | MRD | MUD | Ukupno |
|-----------------------|----------------|-------|------|--------|
| Incidencija aGvHD (%) | 25,0 | 31,3 | 56,5 | 44,9 |
| Adjusted residual | -1,79 | -1,23 | 2,48 | x |

Među ispitanicima koji su razvili relaps prvotne bolesti i onima koji relaps nisu razvili, nema statistički značajne razlike u incidenciji aGvHD ($p=0,382$). Međutim, među onima koji su razvili relaps postoji razlika kada su razvili relaps ovisno o tome jesu li ili nisu imali aGvHD ($p=0,027$), pri čemu oni koji su preboljeli aGvHD razvijaju relaps u prosjeku kasnije.

Učinjena je Kaplan-Meier analiza preživljenja godine dana od transplantacije, čiji su rezultati prikazani grafički na Slici 1. U Tablici 4 prikazani su podaci o broju smrti u jednogodišnjem posttransplantacijskom razdoblju za sve ispitanike, te za grupu koja je razvila aGvHD i onu koja nije. Udio cenzuriranih događaja odgovara kumulativnoj proporciji preživljenja pojedine grupe. Srednja duljina preživljenja ispitanika koji su razvili aGvHD iznosila je 309 dana, a za one koji ga nisu razvili 274. Mantel-Cox test korišten je za analizu razlika distribucije preživljenja, no rezultati se nisu pokazali statistički značajnima ($p=0,182$).

Tablica 4 Preživljenje

| aGvHD | Ukupan broj | Broj događaja (smrti) | Cenzurirani N (%) |
|--------|-------------|-----------------------|-------------------|
| Da | 35 | 8 | 27 (77,1%) |
| Ne | 43 | 16 | 27 (62,8%) |
| Ukupno | 78 | 24 | 54 (69,2%) |



Slika 1 Kaplan-Meier analiza preživljenja. Cenzurirani podaci osim ispitanika koji su preživjeli 365 posttransplantacijskih dana uključuju i ispitanike izgubljene iz praćenja te one za koje u trenutku analize nije prošlo 365 dana od transplantacije.

2.dio – ispitanici koji su razvili aGvHD

Ukupno 35 ispitanika razvilo je akutnu bolest presatka protiv primatelja te su oni korišteni kao uzorak drugog dijela istraživanja. Oboljeli su u prosjeku imali 35 (1 - 65) godina i nakon transplantacije bili su hospitalizirani 29 (24 – 50) dana. Osmero (22,9%) ih je primilo presadak izoliran iz koštane srži, a ostalih 27 (77,1%) iz periferne krvi. Nadalje, 5 (14,3%) presadaka bilo je prikupljeno od podudarnih srodnih donora, 4 (11,4%) od srodnih haploidentičnih, a preostalih 26 (74,3%) bili su nesrodni HLA podudarni darivatelji. Četvero pacijenata, od kojih su svi preboljeli ukupan stadij II aGvHD, naknadno je razvilo relaps primarne bolesti. Do stotog dana od transplantacije broj umrlih iznosio je 3 (8,6%), a do kraja šestomjesečnog razdoblja 7 (20,0%). Od ukupno evidentiranih 8 umrlih, 6 (75%) imalo je pritom aGvHD stadija IV, a ostalih 2 (25%) stadija III, ali sa zahvaćenim gastrointestinalnim sustavom.

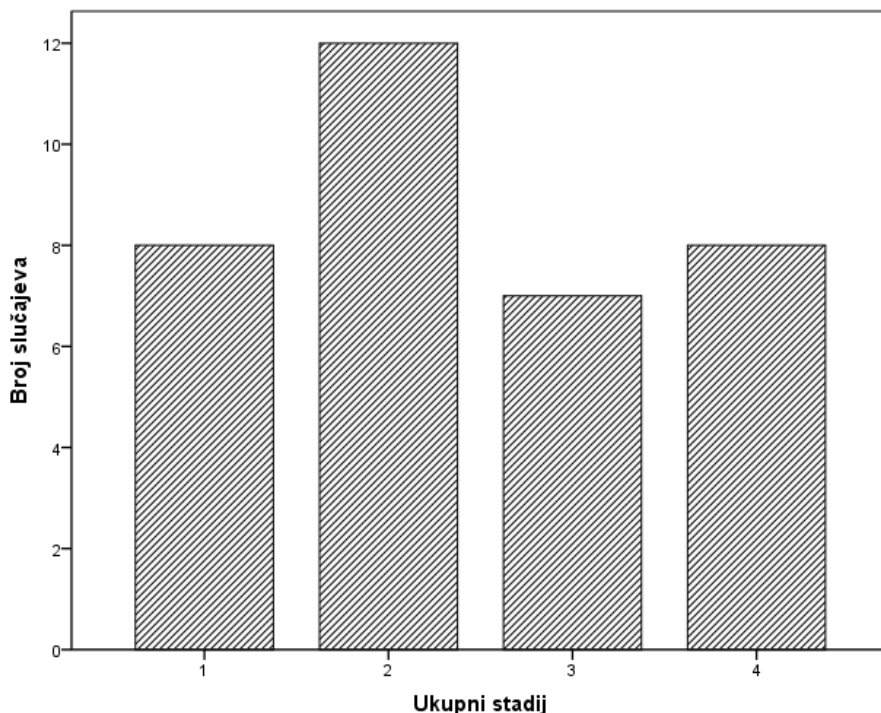
Akutna bolest presatka protiv primatelja kod većine se oboljelih javila četvrti tjedan od transplantacije. U 77,1% pacijenata dijagnosticirana je prije stotog dana, u prosjeku je 43. (21. -88.) dan. U to vrijeme, nešto više od pola (57,1%) oboljelih bilo je otpušteno iz bolnice te su prvi simptomi evidentirani na redovnoj kontroli. Razlika u trenutku javljanja aGvHD, ovisno o izvoru iz kojeg su matične stanice izolirane, analizirana je koristeći Mann-Whitney test, no nije pronađena značajnost ($p=0,723$). Za testiranje razlike u trenutku javljanja aGvHD ovisno o intenzitetu kondicioniranja korišten je Kruskal-Wallis test, no razlika također nije nađena ($p=0,926$).

Najveći broj pacijenata (82,9%) imao je kožni oblik bolesti. Gastrointestinalne simptome imalo je 45,7% oboljelih, dok je zahvaćenost jetre zabilježena u samo 8,6% pacijenata. U Tablici 5 prikazana je zastupljenost pojedinog stadija po Glucksbergu za svaki od karakteristično zahvaćenih organskih sustava. Izolirano zahvaćanje kože, bez prisutnosti simptoma drugih sustava zabilježeno je u 51,4% oboljelih.

Tablica 5 Zastupljenost pojedinog stadija bolesti za svaki od organa. Stadij 0 označava da nema zahvaćenosti tog organa. Podaci su prikazani kao broj (udio) pacijenata u svakom stadiju.

| Stadij | Kožni oblik | Jetreni oblik | Gastrointestinalni oblik |
|--------|-------------|---------------|--------------------------|
| 0 | 6 (17,1%) | 32 (91,4%) | 19 (54,3%) |
| 1 | 2 (5,7%) | - | 3 (8,6%) |
| 2 | 11 (31,4%) | 3 (8,6%) | 4 (11,4%) |
| 3 | 15 (42,9%) | - | 2 (5,7%) |
| 4 | 1 (2,9%) | - | 7 (20,0%) |

Ukupan stadij po Glucksbergu definiran je kombinacijama zahvaćenosti pojedinačnih organa. Otprilike trećina (34,3%) oboljelih pacijenata pripadala je stadiju II. U prvi i četvrti stadij svrstano je po osmero (22,9%) oboljelih, dok je najmanji broj (20,0%) pacijenata bio u trećem stadiju. Broj pacijenata u svakom od stadija prikazan je na Slici 2. Uključivanjem u analizu samo pacijenata sa GvHD II – IV (n=27) dobivamo sljedeće udjele: 44,5% u drugom, 25,9% u trećem te 29,6% u četvrtom stadiju.



Slika 2 Broj pacijenata u svakom od 4 ukupna stadija aGvHD

Spearmanov test korelacije rangova korišten je za procjenu povezanosti težine kliničke slike, iskazane kao ukupan stadij po Glucksbergu, te dana razvoja aGvHD i dobi pacijenta. Nije pronađena korelacija, a rezultati su prikazani u Tablici 6.

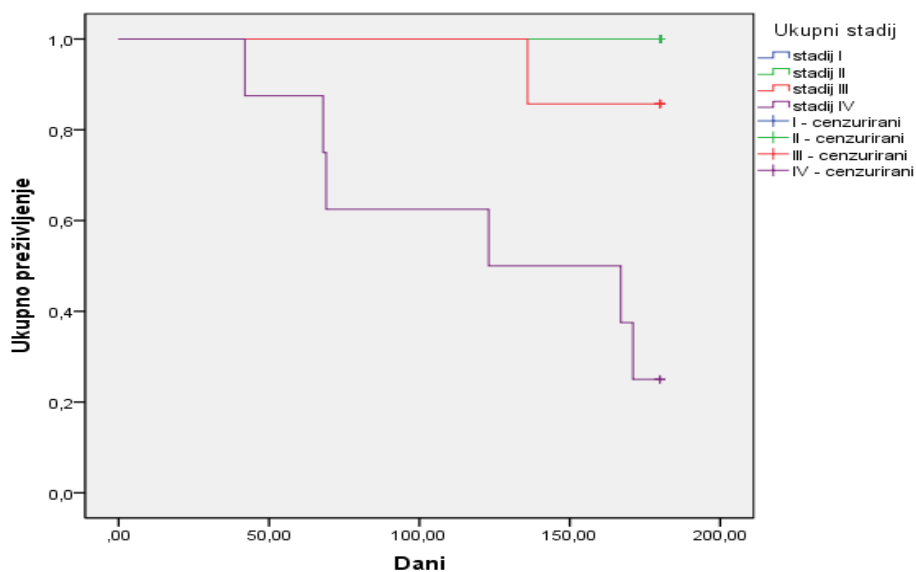
Tablica 6 Ovisnost težine kliničke slike (ukupni stadij) o danu razvoja aGvHD i dobi pacijenta

| Ukupni stadij | Dan razvoja aGvHD | Dob pacijenta |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|
| Spearmanov koeficijent korelacije | -0,197 | -0,131 |
| p_vrijednost | 0,256 | 0,454 |

Od 35 pacijenata koji su razvili aGvHD, u razdoblju od 6 posttransplantacijskih mjeseci umrlo ih je 7 (20,0%) . U Tablici 7 prikazana je kumulativna proporcija preživljenja 6 mjeseci po razredima, izražena kao udio cenzuriranih ispitanika, a na Slici 3 Kaplan-Maier krivulja preživljenja također ovisno o ukupnom stadiju. Od 18 pacijenata s izolirano zahvaćenom kožom, umro je jedan (5,6%), koji je pritom bio svrstan u ukupan stadij IV, te je ujedno jedini umrli koji nije imao zahvaćen GI sustav.

Tablica 7 Preživljenje pacijenata s aGvHD ovisno o ukupnom stadiju po Glucksbergu

| Ukupni stadij/ razred | Ukupan broj | Broj umrlih | Broj (udio) cenzuriranih |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------------------|
| I | 8 | 0 | 8 (100%) |
| II | 12 | 0 | 12 (100%) |
| III | 7 | 1 | 6 (85,7%) |
| IV | 8 | 6 | 2 (25,0%) |



Slika 3 Kaplan-Meier krivulja preživljenja aGvHD ovisno o ukupnom stadiju

Sedmero (20,0%) ispitanika razvilo je kronični GvHD nakon akutnog, a jedan od njih imao je istovremeno i simptome akutnog te mu je dijagnosticiran sindrom preklapanja. Mann-Whitney test korišten je za testiranje povezanosti težine kliničke slike akutnog GvHD i razvoja kroničnog, pri čemu je iz analize isključeno troje pacijenata umrlih prije stotog dana. Nije detektirana statistički značajna

povezanost ($p=0,617$). Od ukupnog broja ispitanika, izuzev 10 umrlih prije stotog dana, kronični oblik bolesti razvilo ih je 13 (19,1%), od čega šestoro (46,2%) de novo, a ostali prelaskom iz akutnog.

VI. RASPRAVA

Incidencija aGvHD i faktori koji na nju utječu

Akutnu bolest presatka protiv primatelja (aGvHD) razvilo je 44,9% pacijenata liječenih alogenom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica u KBC-u Zagreb, pri čemu je ona bila ukupnog stadija II ili višeg kod 34,6% od ukupnog broja primatelja. Sličan smo rezultat i očekivali s obzirom da se prema podacima EMBT-a akutni GvHD umjerenog do teškog stadija razvija u otprilike 40% svih primatelja alogenog presatka (3).

Incidencija aGvHD bila je značajno viša u pacijenata koji su primili presadak od nesrodnog donora i onih koji su primili presadak izoliran iz periferne krvi, no nije evidentirana razlika ovisno o korištenom režimu kondicioniranja i dobi pacijenta koju smo također očekivali.

Višu incidenciju aGvHD kod korištenja presatka nesrodnih donora u odnosu na srodne smo i očekivali budući da se upravo to u većini dostupne literature spominje kao jedan od glavnih faktora rizika. Izostanak povišenja incidencije u primatelja haploidentičnih presađaka objašnjavamo posttransplantacijskom primjenom ciklofosfamida u tih pacijenata. Prema radu Basheya i suradnika iz 2013. godine (20) incidencija aGvHD nakon haploidentične transplantacije pri kojoj je korišten presadak sa smanjenim brojem limfocita T i ciklofosfamid, nije se značajno razlikovala od incidencije nakon transplantacije od podudarnog srodnog ili nesrodnog donora. Jedno još novije istraživanje izvještava o izostanku razlike incidencije aGvHD u primatelja podudarnog presatka srodnog donora i haploidentičnog presatka uz primjenu ciklofosfamida (21). U istom istraživanju prezentiraju podatak o višoj incidenciji aGvHD u primatelja podudarnog presatka nesrodnog primatelja, u slučajevima kad presadak nije imao smanjen broj limfocita T (21), što je također primijećeno i u naših ispitanika.

Dok je učinak korištenja matičnih stanica podrijetla pupčane vrpce na smanjenje rizika razvoja aGvHD jednoznačno potvrđen brojnim istraživanjima (22), povećan rizik korištenja periferne krvi kao izvora matičnih stanica u odnosu na koštanu srž nije u potpunosti potvrđen. Dok dio istraživanja ide u prilog hipoteze da graft izoliran iz periferne krvi povećava rizik razvoja aGvHD zbog povećanog udjela imunokompetentnih limfocita T, dio je opovrgava objašnjavajući izostanak povećanja rizika protektivnim učinkom interleukina 10. Jedna meta analiza iz 2012. godine sugerira postojanje značajnog smanjenja rizika aGvHD stadija II-IV ($p=0,002$) kod korištenja presatka iz koštane srži, te još značajnije razlike u incidenciji teškog i životno-ugrožavajućeg ($p=0,001$) oblika bolesti (23). Recentno kohortno istraživanje japanskih znanstvenika izvještava o lošijem ishodu transplantacije matičnih stanica izoliranih iz periferne krvi u odnosu na one iz koštane srži u slučaju kombinacije ženski donor–muški primatelj, dok razlike u ishodu nema u grupi muški donor–ženski primatelj ni u grupi u kojoj su donor i primatelj podudarni po spolu (24). Suprotno, prema istraživanju Flowers i

suradnika (25) upotreba mobiliziranih stanica iz periferne krvi povećava rizik kroničnog GvHD, ali ne i akutnog.

Iako smo očekivali višu incidenciju aGvHD kod pacijenata koji su prošli kod proces mijeloablativnog kondicioniranja u odnosu na ostale oblike smanjenog intenziteta, izostanak razlike može se objasniti kombinacijom režima kondicioniranja i izvora grafta te korištene profilakse. Naime, s obzirom da su danas poznati brojni faktori rizika aGvHD, upotrijebljen režim kondicioniranja nastoji se kombinirati s izvorom grafta i korištenom profilaksom na takav način da se poboljša prihvaćanje grafta uz istovremeno minimaliziranje rizika aGvHD (16). Jagasia i suradnici (26) 2012-e dokazuju smanjenje incidencije GvHD stadija II ili višeg pri korištenju kombinacije grafta podrijetla koštane srži uz mijeloablativno kondicioniranje bez zračenja (OR=0,56 u srodnih i OR=0,55 u nesrodnih) i grafta izoliranog iz periferne krvi uz kondicioniranje smanjenog intenziteta (OR=0,70 u srodnih i OR=0,75 u nesrodnih) u odnosu na kombinaciju mijeloablativnog sa zračenjem i graftom iz periferne krvi koja je korištena kao referentna kategorija.

U istom istraživanju ne pronalaze učinak dobi na incidenciju aGvHD, međutim evidentiraju povećanje mortaliteta povezanog s tretmanom kao i ukupnog mortaliteta koje prati stariju dob ispitanika (26). S druge strane Lee i suradnici (27) navode mlađu dob primatelja kao faktor rizika za razvoj aGvHD, ali potvrđuju vezu starije dobi i nižeg preživljenja. Oba ova istraživanja su kao i naše u suprotnosti s ranijim shvaćanjem starije dobi kao faktora rizika. S druge strane Hahn (28) potvrđuje stariju dob kao faktor rizika za razvoj aGvHD II-IV, ali samo kod primatelja transplantata koštane srži ($p=0,0005$), no ne i periferne krvi. Gale (11) dokazuje blago povišen rizik kod pacijenata starije dobi, no učinak izostaje kad se iz analize izuzmu muški primatelji transplantata izoliranog iz žene koja je ranije rodila ili primila transfuziju.

Iz svega navedenog slijedi da su među obilježjima pacijenata i donora prisutni brojni interferencijski efekti, koji moraju biti osviješteni pri proglašavanju nekog obilježja faktorom rizika za pojedinu skupinu. Jedno od ovog ograničenja istraživanja je što u analizu faktora rizika nije uključeno promatranje dobi i spola donora, korištenog režima profilakse, kao ni utjecaja primarne dijagnoze, a svo troje spominju se kao potencijalni faktori rizika te su kao takvi mogući čimbenici zabune u ovoj analizi. Osim toga, faktori rizika koji su analizirani, uspoređeni su samo s obzirom povećavaju li incidenciju aGvHD ili ne, no nije promatran njihov utjecaj na težinu kliničke slike, odnosno ukupni stadij aGvHD.

Trenutak javljanja akutnog GvHD

Akutna bolest presatka protiv primatelja je u 77,1% naših ispitanika dijagnosticirana prije stotog dana, odnosno najčešće u četvrtom tjednu od transplantacije, što odgovara definiciji klasičnog akutnog GvHD (13) te navodima iz literature prema kojima se bolest najčešće javlja upravo između drugog i šestog tjedna od transplantacije (6). S obzirom da pojava simptoma aGvHD često korelira s trenutkom prihvaćanja grafta, koji pak ovisi o izvoru iz kojeg su matične stanice izolirane te intenzitetu kondicioniranja (9), očekivali smo raniju pojavu aGvHD kod pacijenata koji su primili presadak izoliran iz periferne krvi (29) i mijeloablativno kondicioniranje (9), no razlika u trenutku javljanja aGvHD nije nađena. Izostanak razlike može se ponovo objasniti učinkom fiksnih kombinacija kojim objašnjavamo i izostanak učinka kondicioniranja na povećanje incidencije. Nadalje, upotreba mikofenolat mofetina kao profilakse aGvHD koja je preporučena u slučajevima slabijeg intenziteta kondicioniranja jer potiče bolje prihvaćanje grafta (16) mogla bi dodatno smanjiti razliku u trenutku prihvaćanja grafta, a time i javljanja aGvHD.

Klinička prezentacija aGvHD

Od kliničkih oblika naši su pacijenti najčešće imali kožni oblik (82,9%), zatim gastrointestinalni (45,7%), a najrjeđe jetreni (8,6%). Od pacijenata koji su imali gastrointestinalne simptome, skoro pola (43,7%) pripadalo je stadiju IV, a od 8 umrlih pacijenata čak sedmero ih je imalo GI simptome. To odgovara navodima literature da je upravo GI oblik najčešće najteži. Osim toga, stadij IV gastrointestinalnog sustava veže se uz lošiji ishod od stadija IV kože ili jetre, što dodatno pridonosi njihovom visokom udjelu u smrtnosti (22).

Drugom ukupnom stadiju pripadao je najveći broj oboljelih: 34,3% od ukupnog broja, odnosno 44,5% od onih s GvHD II-IV. Prema istraživanju grupe američkih znanstvenika iz 2017. koja je promatrala kliničke karakteristike oboljelih podijeljenih u 3 kohorte ovisno o tome kada je učinjena transplantacija, očekivali smo najviši udio klinički značajnog GvHD (GvHD II-IV) upravo u stadiju II (30), kao što je i potvrđeno rezultatima. Međutim, u usporedbi sa zadnjom kohortom spomenutog istraživanja (transplantirani 2006.-2012.), u naših primjećujemo nižu incidenciju stadija II nego očekivano (63%), na račun više incidencije stadija III i IV, odnosno sličan udio stadija II kao što je u kohorti iz 1999-2001 (44%) (30). Valja napomenuti da je u ovom istraživanju u svakoj kohorti povećavan udio pacijenata koji koriste profilaksu GvHD temeljenu na takrolimusu (80% u zadnjoj), čime istraživači i objašnjavaju sukcesivno značajno smanjenje udjela stadija III i IV (30). Suprotno, većina naših pacijenata koristi profilaksu temeljenu na ciklosporinu (nije prikazano u rezultatima), što može biti jedno od objašnjenja razlike. Osim toga, u navedenom istraživanju ne nalazimo podatak o

ukupnoj incidenciji aGvHD ni udjelu pacijenata u stadiju I, te stoga ne možemo govoriti o boljoj ili lošijoj ukupnoj prevenciji aGvHD.

Težina kliničke slike aGvHD nije korelirala ni s danom razvoja aGvHD ni dobi pacijenta. S obzirom na dokazan veći mortalitet povezan s terapijom u starijih pacijenata (26,27), pretpostavili smo da bi uzrok tome mogao biti što oboljevaju od težih oblika aGvHD, no tu pretpostavku nismo potvrdili. Također, s obzirom na bolju prognozu late-onset aGvHD u odnosu na klasični akutni GvHD (27), htjeli smo provjeriti postoji li veza trenutka nastanka bolesti i težine kliničke slike koja bi zatim uvjetovala niži, odnosno viši mortalitet, no ni ta veza nije pronađena u naših ispitanika.

Odnos aGvHD i relapsa primarne bolesti

Pacijenti koji su preboljeli aGvHD, razvijali su relaps podjednako često kao i oni koji nisu, ali razvijali su ga kasnije. S obzirom da je patofiziološki mehanizam koji uzrokuje učinak presatka protiv primatelja sličan onom koji uzrokuje učinak presatka protiv leukemije, odnosno smanjuje rizik relapsa, očekivali smo nižu pojavnost relapsa u pacijenata kod kojih je zabilježen aGvHD. Prema jednom istraživanju povišenje stadija aGvHD smanjivalo je rizik relapsa s HR (engl. hazard ratio) od čak 0,48 za ukupni stadij III, odnosno 0,14 za ukupni stadij IV (31). Međutim, oni su pritom promatrali period od stotog dana do tri godine nakon transplantacije, dok je vrijeme praćenja našeg uzorka relativno kratko, te stoga možemo pretpostaviti da se u trenutku analize relaps u dijela pacijenata nije stigao razviti i naslutiti da bi razlika možda bila pronađena da smo uzorak analizirali s većim vremenskim odmakom.

Akutni GvHD i preživljenje

Iako su pacijenti koji su razvili aGvHD imali u prosjeku nešto višu kumulativnu proporciju preživljenja od onih koji nisu, statistički razlika distribucije preživljenja nije bila značajna (ukupno preživljenje 69,2%). S jedne strane aGvHD značajan je uzrok smrti u akutnom posttransplantacijskom periodu, a rizik raste s rastom stadija aGvHD (31) te bi zbog toga mogli očekivati nižu proporciju preživljenja u toj grupi. No s druge strane, za grupu koja nije razvila relaps promatrali smo ukupnu smrtnost, a ne smrtnost bez relapsa, zbog čega možemo pretpostaviti da je upravo relaps, kojem su skloniji pacijenti ove grupe (31), jedan od bitnih uzroka smanjena preživljenja. Nadalje, u ovoj su grupi i oni pacijenti koji su umrli od drugih komplikacije prije nego se aGvHD imao vremena razviti te oni kod kojih graft nije prihvaćen te se aGvHD nije ni mogao razviti, a kod kojih napredovanje primarne bolesti uzrokuje smrt. Shakouhi i suradnici (32) također ne nalaze značajnu razliku u

preživljenju među pacijentima koji razvili aGvHD i onima koji nisu, a izvještavaju o ukupnom jednogodišnjem preživljenju od 82,2%, što je nešto više od ukupnog preživljenja naših ispitanika.

U periodu od 6 post-transplantacijskih mjeseci umrlo je 20% oboljelih od akutne bolesti presatka protiv primatelja. Kumulativna proporcija preživljenja za blagi i umjereno težak oblik bila je 100%, za težak 85,7%, a za životno-ugrožavajući 25%, odnosno 53,3% gledajući stadij III i IV zajedno. Smrtnost izoliranog kožnog oblika aGvHD iznosila je 5,6%. Niži ukupni stadij aGvHD te izolirani kožni GvHD u pravilu se povezuje uz visoko preživljenje (27,33), što je evidentirano i u naših pacijenata. Ukupno šestomjesečno preživljenje uspoređujemo s već ranije spomenutim nedavnim istraživanjem američkih znanstvenika, kod kojih je preživljenje stadija II u zadnjoj kohorti 83%, a u ostalima još niže (30), dok je u naših pacijenata preživljenje istog stadija 100%, odnosno jednako stadiju I. Nadalje, ukupno šestomjesečno preživljenje pacijenata s GvHD III-IV u spomenutoj kohorti iznosi 52% (30), što je vrlo slično našim rezultatima.

Razvoj kroničnog GvHD

Zabilježena incidencija kroničnog GvHD iznosi 19,1%, a u 53,8% slučajeva kronični se oblik razvio iz akutnog. Nije nađena korelacija težine kliničke slike akutnog GvHD izražene kao ukupan stadij i razvoja kroničnog. Takav je rezultat u suprotnosti je s našim očekivanjima budući da Flowers i suradnici (25) izvještavaju o signifikantnoj vezi akutnog GvHD stadija III i IV, no ne i I i II, s razvojem kroničnog GvHD.

Također, incidencija kroničnog GvHD zabilježena u naših ispitanika puno je manja od incidencije od 43% o kojoj u svom radu izvještava MacMillan. (33) Iako moramo imati u vidu da naša brojka nije konačna jer je vrijeme praćenja pojedinih pacijenata u trenutku analize podataka bilo kraće od godine dana, koliko je trajalo praćenje ispitanika u spomenutom istraživanju, manja incidencija djelomično može biti objašnjena i boljom prevencijom ili drugačijim karakteristikama pacijenata i donora. Nadalje, udio slučajeva kroničnog koji su se razvili iz akutnog GvHD od 53,3%, manji je od dvije trećine slučajeva očekivane prema dostupnoj literaturi (12) iz čega slijedi da bi potencijalno bolja prevencija akutnog, a time i njegova smanjena incidencija mogla biti djelomično odgovorna za smanjenje i incidencije kroničnog.

VII. ZAKLJUČCI

Incidencija akutne bolesti presatka protiv primatelja u pacijenata liječenih alogenom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica na Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom 2018. godine iznosi 44,9%, odnosno 34,6% gledajući samo stadije II-IV, te je nešto niža od EMBT prosjeka.

Primatelji presatka izoliranog iz periferne krvi, kao i presatka podrijetlom od podudarnog nesrodnog donora imaju višu incidenciju aGvHD, dok incidenciju ne mijenjaju dob pacijenta ni intenzitet kondicioniranja.

Akutni GvHD najčešće se javlja tijekom četvrtog posttransplantacijskog tjedna, a trenutak pojave nije ovisan o podrijetlu presatka ni intenzitetu kondicioniranja.

Najzastupljeniji ukupan klinički stadij je drugi, uz još uvijek visok udio pacijenata u trećem i četvrtom stadiju, što daje nepovoljniju raspodjelu po stadijima u usporedbi s nekim svjetskim centrima, no uz jednako dobro ili čak bolje preživljenje pojedinih stadija rezultira tek blago nižim ukupnim preživljenjem. Posebna se pažnja stoga treba posvetiti prevenciji težih oblika akutnog GvHD, s ciljem još boljeg preživljenja.

Manji broj akutnih oblika prelazi u kronični, dovodeći do niže incidencije kroničnog GvHD od očekivane.

Pacijenti koji su preboljeli aGvHD razvijaju relaps u prosjeku kasnije od onih koji nisu, no potrebno je dulje longitudinalno praćenje da bi se utvrdilo postojanje razlike u incidenciji relapsa među grupama.

VIII. ZAHVALE

Na ukazanom povjerenju i usmjeravanju tijekom pisanja rada zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nadiri Duraković. Vaša ljubaznost i stručnost velika su mi inspiracija.

Također, hvala svim ostalim nastavnicima i kolegama studentima koji su mi kroz cijeli studij prenosili svoje znanje i iskustva, a posebice prof.dr.sc. Marini Šagud koja mi je otvorila vrata u svijet znanstvenog rada.

Svim prijateljima zahvaljujem na prekrasnim studentskim uspomenama.

Khaderu hvala na širenju vidika i obogaćivanju svakodnevice.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, mami Željki i tati Vladi, čija mi je podrška i nesebično odricanje omogućila sve dosadašnje i buduće uspjehe. Nadam se da ste ponosni. Posebno hvala baki Štefici, koja se svakom uspjehu raduje više od mene same i čija je upornost moja velika motivacija te sestri Patriciji koja je uvijek bila moj najsigurniji oslonac.

IX. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Transplantacijska imunologija. U: Stanična i molekularna imunologija. 2018. str. 359–82.
2. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Stem cell transplantation. U: Essential Haematology. 2006. str. 249–63.
3. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute Graft-Versus-Host Disease. U: The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. 2019. str. 323–30.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti i predočivanje antigena limfocitima T. U: Stanična i molekularna imunologija. 2018. str. 107–36.
5. Griffioen M, Van Bergen CAM, Falkenburg JHF. Autosomal minor histocompatibility antigens: How genetic variants create diversity in immune targets. *Front Immunol.* 2016.;7(MAR):1–9.
6. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp Hematol.* 2001.;29(3):259–77.
7. Anasetti C, G.Beatty P, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, i ostali. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol.* 1990.;29(2):79–91.
8. Salomao M, Dorritie K, Mapara MY, Sepulveda A. Histopathology of graft-vs-host disease of gastrointestinal tract and liver: An update. *Am J Clin Pathol.* 2016.;145(5):591–603.
9. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2007.;2(35):1–9.
10. Lazaryan A, Weisdorf DJ, DeFor T, Brunstein CG, MacMillan ML, Bejanyan N, i ostali. Risk factors for acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with umbilical cord blood and matched related donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016.;22(1):134–40.
11. Gale R, Bortin M, van Bekkum D, Biggs J, Dicke K, Gluckman E, i ostali. Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 1987.;67(4):397–406.
12. Gamal AH. Bone Marrow Transplantations. U: CLINICAL HEMATOLOGY. 2013. str. 216–21.

13. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, i ostali. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005.;11(12):945–56.
14. Chao NJ, Negrin RS, Rosman AG. Treatment of acute graft-versus-host disease [Internet]. UpToDate. 2020 [citirano 05. svibanj 2020.]. Dostupno na: www.uptodate.com
15. Liu W, Sun Y, Zhang X, Xu L, Wang Y, Yan C, i ostali. Risk factors analysis for steroid-resistant acute graft versus host disease after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2020.;41(2):106–11.
16. Chao NJ, Negrin RS, Rosman AG. Prevention of acute graft-versus-host disease [Internet]. UpToDate. 2020 [citirano 05. svibanj 2020.]. Dostupno na: www.uptodate.com
17. Ratanatharathorn V, Nash R, Przepiorka D, Devine S, Klein J, Weisdorf D, i ostali. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 1998.;92(7):2303–14.
18. Ruutu T, Eriksson B, Remes K, Juvonen E, Volin L, Remberger M, i ostali. Ursodeoxycholic acid for the prevention of hepatic complications in allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002.;100(6):1977–83.
19. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner C, Neiman P, Clift R, i ostali. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974.;18(4):295–304.
20. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, i ostali. T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol.* 2013.;31(10):1310–6.
21. Dreger P, Sureda A, Ahn KW, Eapen M, Litovich C, Finel H, i ostali. PTCy-based haploidentical vs matched related or unrelated donor reduced-intensity conditioning transplant for DLBCL. *Blood Adv.* 2019.;3(3):360–9.
22. Chao NJ, Negrin RS, Rosman AG. Clinical manifestations, diagnosis, and grading of acute graft-versus-host disease [Internet]. UpToDate. 2020 [citirano 05. svibanj 2020.]. Dostupno na: www.uptodate.com

23. Chang Y-J, Weng C-L, Sun L-X, Yun-Tao Z. Allogeneic bone marrow transplantation compared to peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of hematologic malignancies: a meta-analysis based on time-to-event data from randomized controlled trials. *Ann Hematol.* 2012.;91:pages427–437.
24. Nakasone H, Kawamura K, Yakushijin K, Shinohara A, Tanaka M, Ohashi K, i ostali. BM is preferred over PBSCs in transplantation from an HLA-matched related female donor to a male recipient. *Blood Adv.* 2019.;3(11):1750–60.
25. Flowers, M. E., Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, i ostali. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 2011.;117(11):3214–3219.
26. Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, i ostali. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2012.;119(1):296–307.
27. Lee S-E, Cho B-S, Kim J-H, Yoon J-H, Shin S-H, Yahng S-A, i ostali. Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transpl.* 2013.;48:587–592.
28. Hahn T, McCarthy PL, Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, i ostali. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol.* 2008.;26(35):5728–34.
29. Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Skoetz N, Scheid C, i ostali. Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014.;(4).
30. Khoury HJ, Wang T, Hemmer MT, Couriel D, Alousi A, Cutler C, i ostali. Improved survival after acute graft-versus-host disease diagnosis in the modern era. *Haematologica.* 2017.;102(5):958–66.
31. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen AA, Bandini G, Devergie A, i ostali. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2002.;100(12).

32. Shokouhi S, Bray S, Bakhtiyari S, Sayehmiri K, Alimoghadam K. Effects of aGVHD and cGVHD on Survival Rate in Patients with Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. 2015.;9(3):112–21.
33. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. Biol Blood Marrow Transplant. 2002.;8(7):387–94.

X. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1995. u Čakovcu, na čijem sam širem području završila osnovnu školu (OŠ Ivanovec) i opću gimnaziju (Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec).

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam akademske godine 2014./2015. Tijekom studija bila sam demonstrator na katedrama za anatomiju, histologiju i embriologiju, fiziku, medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju te pedijatriju. U projektu Mentalno zdravlje mladih – Pogled u sebe sudjelovala sam kao vršnjački edukator. Članica sam studentske udruge CroMSIC, a volontiranje u projektima udruge omogućilo mi je odlazak na studentsku razmjenu u Nicosiju, Cipar (Near East University), gdje sam provela mjesec dana na stručnoj praksi na odjelu pedijatrije.

Na četvrtoj godini studija počela sam se baviti znanstvenim radom na području psihijatrije. Koautorica sam rada objavljenog u Psychiatria Danubina te tri znanstvena sažetka od kojih sam jedan prezentirala na međunarodnom neuropsihijatrijskom kongresu u Puli.

Za rad „Anhedonija u depresivnoj epizodi: obilježja anhedonije u osoba s depresijom te usporedba anhedonije s nikotinskom ovisnošću u depresiji, shizofreniji i kontrolnoj skupini“ primila sam Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad u akademskoj godini 2018./2019.

Za istu akademsku godinu nagrađena sam Dekanovom nagradom za postignut uspjeh na petoj godini studija.

Posjedujem ACLS certifikat NHCPS organizacije u sklopu „Save a Life“ inicijative.

Aktivno se služim engleskim jezikom uz poznavanje osnova njemačkog.