

# Epstein-Barr virusom inducirani hemofagocitni sindrom

---

Tečer, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:105:025404>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Tečer**

**Epstein-Barr virusom inducirani hemofagocitni  
sindrom**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2023.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti u Kliničkoj bolnici Merkur pod vodstvom prim. dr. sc. Inge Mandac Smoljanović i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## Abecedni popis kratica i pokrata s objašnjenjima

ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima, engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

AID – citidin deaminaza potaknuta aktivacijom, engl. *activation-induced cytidine deaminase*

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije, engl. *acquired immunodeficiency syndrome*

AIM2 – protein odsutan u melanomu 2, engl. *absent in melanoma-2*

ALT – alanin-aminotransferaza

ANKL – agresivna NK-stanična leukemija

APC – stanica koja predočuje antigene, engl. *antigen presenting cell*

AST – aspartat-aminotransferaza

BARF1 - desnostrani otvoreni okvir čitanja fragmenta A restriksijske endonukleaze BamHI, engl. *BamHI-A rightward open reading frame 1*

BCR – receptor B-limfocita, engl. *B cell receptor*

BHRF1 - desnostrani otvoreni okvir čitanja fragmenta H restriksijske endonukleaze BamHI, engl. *BamHI fragment H rightward open reading frame 1*

BL – Burkittov limfom

CAEBV – kronična aktivna infekcija EBV-om, engl. *chronic active EBV infection*

CD – diferencijacijski antigen, klaster diferencijacije, označen brojem uz pokratu, engl. *cluster of differentiation*

CDS – citosolni senzori za DNA, engl. *cytosolic DNA sensors*

cGAS – sintaza cikličkog GMP-AMP, engl. *cyclic GMP-AMP synthase*

CHS – Chédiak-Higashijev sindrom

CR2 – receptor komplementa 2

CT – kompjuterizirana tomografija, engl. *computed tomography*

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

DLBCL – difuzni B-velikostanični limfom, engl. *diffuse large B-cell lymphoma*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

DRESS - reakcija na lijek s eozinofilijom i sustavnim simptomima, engl. *drug reaction with eosinophilia and systemic response*

EBER – Epstein-Barr virusom kodirana ribonukleinska kiselina, engl. *EBV-encoded RNA*

EBNA – nuklearni antigen Epstein-Barr virusa, engl. *Epstein-Barr nuclear antigen*

EBV – Epstein-Barr(in) virus

EBV<sup>+</sup>PTCL – primarni, na EBV pozitivan nodalni T/NK-stanični limfom, engl. *primary EBV<sup>+</sup> nodal T/NK-cell lymphoma*

eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije, prema engl. *estimated glomerular filtration rate*

ENKTCL – ektranodalni NK/T-stanični limfom, engl. *extranodal NK/T-cell lymphoma*

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, engl. *U.S. Food and Drug Administration*

fHLH – obiteljski (familijarni) oblik pHLH-a

GlialCAM – adhezijska molekula glija stanica, engl. *glial cell adhesion molecule*

gp – glikoprotein

GS-2 – tip 2 Griscellijeva sindroma

HHV4 – humani (gama)herpesvirus 4

HHV8 – humani (gama)herpesvirus 8

HIV – virus humane imunodeficijencije, engl. *human immunodeficiency virus*

HL – Hodgkinov limfom

HLA – humani leukocitni antigen, engl. *human leukocyte antigen*

HLH – hemofagocitna limfohistiocitoza

HPS-2 – tip 2 Hermansky-Pudlakova sindroma

HS – hemofagocitni sindrom

HVLPD - limfoproliferativna bolest nalik na vakciniformnu hidrou, engl. *hydroa vacciniiforme-like lymphoproliferative disorder*

IFN - interferon

IH – Poboljšani HLH indeks, prema engl. *Improved HLH indeks*

IL – interleukin, označen brojem uz kraticu

IM – infektivna mononukleoza

IRF – faktor interferonskog odgovora, engl. *interferon response factor*

ITK – interleukinom 2 potaknuta kinaza T-limfocita, engl. *interleukin-2-inducible T-cell kinase*

IVIG – intravenski imunoglobulini

JAK – Janus kinaza, engl. *Janus Associated Kinase*

EBV-HLH – EBV-om induciran HLH, nepovezan s novotvorinom i nasljednim sindromima

JIL – jedinica intenzivnog liječenja

LCL – limfoblastoidne stanične linije,  
engl. *lymphoblastoid cell lines*

LDH – laktat-dehidrogenaza

LMP – latentni/kasni membranski protein,  
engl. *latent membrane protein*

MAGT1 – transportni protein za magnezij  
1, engl. *magnesium transporter protein 1*

MAS – sindrom aktivacije makrofaga,  
engl. *macrophage activation syndrome*

MHC-I, MHC-II – glavni kompleks  
histokompatibilnosti klase I i II, engl.  
*major histocompatibility complex*

MKB-10, MKB-11 – Međunarodna  
klasifikacija bolesti Svjetske zdravstvene  
organizacije, 10. i 11. revizija

MOF – višeorgansko zatajenje, engl.  
*multiple organ failure*

MR – magnetska rezonancija

MS – multipla skleroza

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije,  
engl. *next generation sequencing*

NHL – non-Hodkinov limfom

NK stanice – prirodno ubilačke stanice,  
engl. *natural killer cells*,

NKTL – NK/T stanični limfom, engl.  
*NK/T cell lymphoma*

NLR – receptori slični NOD-u, engl. *NOD-  
like receptors*

NOD – protein koji sadržava domenu za  
oligomerizaciju nukleotida, engl.  
*nucleotide oligomerization domain-  
containing protein*

NPC – nazofaringealni karcinom, engl.  
*nasopharyngeal carcinoma*

ORF – otvoreni okvir čitanja, engl. *open  
reading frame*

PAMP – molekularni obrasci patogenih  
organizama, engl. *pathogen-associated  
molecular patterns*

PCR – lančana reakcija polimerazom, engl.  
*polymerase chain reaction*

PET – pozitronska emisijska tomografija

PHLH – primarna hemofagocitna  
limfohistiocitoza

PRES – sindrom posteriorne reverzibilne  
encefalopatije, engl. *posterior reversible  
encephalopathy syndrome*

PRR – receptori za prepoznavanje  
obrazaca, engl. *pattern recognition  
receptors*

PTLD – posttransplantacijska  
limfoproliferativna bolest, engl. *post-  
transplant lymphoproliferative disease*

RIG – gen induciran retinoičnom  
kiselinom, engl. *retinoic acid-inducible  
gene*

RLR – receptori slični RIG-u, engl. *RIG-like receptors*

RNA – ribonukleinska kiselina, engl. *ribonucleic acid*

SAP – protein povezan sa SLAM-om, engl. *SLAM-associated protein*

sEBV<sup>+</sup> T-NHL - sustavni na EBV pozitivan T-stanični limfom dječje dobi, engl. *systemic EBV<sup>+</sup> T-cell lymphoma of childhood*

SIRS – sindrom sustavnog upalnog odgovora, engl. *systemic inflammatory response syndrome*

SLAM – signalna limfocitna aktivacijska molekula, engl. *signaling lymphocyte activation molecule*

SLE – sistemski eritemski lupus

SMBA - teška alergija na ubod komarca, engl. *severe mosquito bite allergy*

STAT – signalni pretvarač i aktivator transkripcije, engl. *signal transducer and transcription activator*

STING – stimulator interferonskih gena, engl. *stimulator of interferon genes*

SŽS – središnji živčani sustav

TLR – receptori slični Tollu, engl. *Toll-like receptors*

TNF – tumorski faktor nekroze, engl. *tumor necrosis factor*

TNFR – receptor tumorskog faktora nekroze, engl. *tumor necrosis factor receptor*

TRAF – faktor povezan s receptorom tumorskog faktora nekroze, engl. *TNF receptor-associated factor*

VCA – virusni kapsidni antigeni, engl. *viral capsid antigens*

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta, engl. *vascular endothelial growth factor*

WGS – cijelogenomsko sekvenciranje, engl. *whole genome sequencing*

XLP – X-vezani limfoproliferativni sindrom, engl. *X-linked lymphoproliferative syndrome*

X-MEN – X-vezana imunodeficijencija s poremećajem magnezija, EBV infekcijom i novotvorinama, engl. *X-linked immunodeficiency with magnesium defect, EBV infection and neoplasia*

## SADRŽAJ

SAŽETAK .....	
SUMMARY .....	
<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Epstein-Barr virus.....</b>	<b>2</b>
2.1. Klasifikacija i otkriće virusa .....	2
2.2. Struktura, fiziologija i replikacija .....	3
2.3. Patogeneza .....	5
2.4. Imunost .....	8
2.5. Bolesti i sindromi koje uzrokuje EBV.....	12
2.5.1. Općenito o bolestima povezanim s EBV-om .....	12
2.5.2. Infektivna mononukleozna .....	13
2.6. Epidemiologija i prijenos .....	14
2.7. Laboratorijska dijagnostika .....	14
2.8. Liječenje i prevencija .....	16
<b>3. Hemofagocitni sindrom.....</b>	<b>18</b>
3.1. Uvod i podjela .....	18
3.2. Epidemiologija .....	19
3.3. Etiopatogeneza .....	20
3.4. Klinička slika .....	23
3.5. Dijagnostika .....	25
3.6. Liječenje .....	31
<b>4. Epstein-Barr virusom induciran hemofagocitni sindrom.....</b>	<b>36</b>
4.1. Uvod i podjela .....	36
4.2. Epidemiologija .....	37
4.3. Etiopatogeneza i klinička slika .....	39
4.3.1. Obiteljski HLH i EBV .....	39
4.3.2. Drugi nasljedni sindromi povezani s EBV-om induciranim HLH-om .....	39
4.3.3. EBV-om induciran HLH bez novotvorina (EBV-HLH).....	41
4.3.4. Na EBV pozitivan HLH povezan s novotvorinama.....	41
4.3.4.1. HLH povezan s NK/T-staničnim limfomima pozitivnim na EBV .....	41
4.3.4.2. HLH povezan s CAEBV-om.....	43
4.4. Dijagnostika .....	45
4.5. Liječenje, prevencija i prognoza.....	47
<b>5. Zaključak .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Zahvale.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Životopis.....</b>	<b>66</b>



## SAŽETAK

### Epstein-Barr virusom induciran hemofagocitni sindrom

Ivan Tečer

Hemofagocitni sindrom (HS) ili hemofagocitna limfohistiocitoza (HLH) hiperinflamatorni je sindrom uzrokovan nekontroliranim otpuštanjem citokina i aktivacijom T-limfocita, makrofaga i histiocita. HLH obuhvaća dva osnovna oblika: primarni i sekundarni. Primarni oblik uzrokovan je poremećenom funkcijom citotoksičnih T-limfocita i prirodnoubilačkih (NK, prema engl. *natural killer*) stanica što je rezultat mutacije gena važnih za citotoksičnost ovih stanica. Sekundarni oblik potaknut je različitim stanjima poput infekcija, malignih novotvorina, autoimunih i autoinflamatornih bolesti. Tipični su simptomi i nalazi HLH-a vrućica, splenomegalija, citopenija, hemofagocitoza u koštanjoj srži, koagulopatija i povišena razina feritina. Dijagnosticira se na temelju molekularnog nalaza koji je u skladu s dijagnozom HLH-a ili na temelju kliničko-laboratorijskih kriterija HLH-2004. Najčešći uzrok sekundarnog oblika u djece su infekcije, a u odraslih maligna bolest. Od infektivnih je uzročnika s HLH-om najčešće povezan Epstein-Barr virus (EBV). EBV je ubikvitaran virus kojim se tijekom života zarazi više od 90 % ukupne populacije. Uobičajeno uzrokuje kliničku sliku infektivne mononukleoze, ali je, zbog svoje sposobnosti uspostavljanja trajne infekcije, povezan s razvojem brojnih bolesti uključujući različite limfoproliferativne bolesti. EBV može biti okidač simptoma u osoba s primarnim HLH-om, može biti temeljni uzrok sekundarnog oblika ili uzrok NK/T-staničnih limfoproliferativnih bolesti koje su podloga za razvoj sekundarnog HLH-a. EBV-om induciran HLH dijagnosticira se ispunjavanjem dijagnostičkih kriterija za HLH uz dokazanu aktivnu infekciju EBV-om. Liječenje EBV-om induciranog HLH-a obuhvaća imunosupresivnu terapiju i kemoterapijske protokole. U slučaju primarnog HLH-a i drugih oblika koji ne odgovaraju na terapiju lijekovima jedina je učinkovita terapija alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica. Poznavanje glavnih kliničkih i laboratorijskih značajki, pravovremeno dijagnosticiranje i liječenje temeljeno na kvalitetnim dijagnostičkim i terapijskim protokolima ključ su sprečavanja teških, često fatalnih posljedica EBV-om induciranog HLH-a. Istraživanja različitih lijekova, poput monoklonskih protutijela i ciljane terapije, kao i razvoj učinkovitog cjepiva protiv EBV-a, donose nove mogućnosti za uspješnije liječenje ovog rijetkog sindroma.

**Ključne riječi:** Epstein-Barr virus, hemofagocitni sindrom, limfoproliferativni poremećaji

## **SUMMARY**

### **Epstein-Barr virus induced hemophagocytic syndrome**

**Ivan Tečer**

Hemophagocytic syndrome (HS) or hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a hyperinflammatory syndrome caused by uncontrolled cytokine release and activation of T cells, macrophages, and histiocytes. HLH comprises two major forms: primary and secondary. The primary form is caused by impaired function of cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells, as a result of mutations in genes that are important for the cytotoxicity of these cells. The secondary form is triggered by various conditions such as infections, malignancies, and autoimmune and autoinflammatory diseases. Typical findings of HLH include fever, splenomegaly, cytopenia, hemophagocytosis in the bone marrow, coagulopathy, and elevated ferritin levels. It is diagnosed based on a molecular finding consistent with HLH or on the clinical and laboratory criteria of HLH-2004. The leading cause of secondary HLH in children is infections, while in adults it is usually associated with malignancies. Among infectious agents associated with HLH, Epstein-Barr virus (EBV) is the most common trigger. EBV is a ubiquitous virus that infects over 90 % of the total population during their lifetime. Typically, the infection presents itself as infectious mononucleosis, but due to its ability to establish persistent infection, EBV is associated with the development of various diseases, including different lymphoproliferative disorders. EBV can act as a trigger for symptoms in individuals with primary HLH, it can be the sole cause of the secondary form; or can cause NK/T-cell lymphoproliferative diseases that serve as an underlying condition associated with the development of secondary HLH. EBV-induced HLH is diagnosed by the combination of HLH-2004 criteria and documented active EBV infection. The treatment of EBV-induced HLH involves immunosuppressive therapy and chemotherapy. In the case of primary HLH or other forms that do not respond to previous pharmacotherapy, the only effective therapy is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Understanding the main clinical and laboratory features, timely diagnosis, and treatment based on high-quality diagnostic and therapeutic protocols are crucial in preventing the severe, often fatal consequences of EBV-induced HLH. Studies to evaluate different drugs, including monoclonal antibodies and targeted therapies, as well as the development of an effective vaccine against EBV, bring new options for the successful treatment of this rare syndrome.

**Keywords:** Epstein-Barr virus, hemophagocytic syndrome, lymphoproliferative disorders

# 1. Uvod

Hemofagocitni sindrom (HS) ili hemofagocitna limfohistiocitoza (HLH) rijetko je, životno ugrožavajuće stanje uzrokovano pretjeranom aktivacijom imunskih stanica i otpuštanjem posrednika upale (1). U podlozi je ovog sindroma nekontrolirana aktivacija T-limfocita i makrofaga te poremećena funkcija prirodno ubilačkih stanica, tj. NK (eng. *natural killer*) stanica (2). Stanje je potaknuto i održavano stalnim otpuštanjem citokina koji potiču makrofage u koštanoj srži na hemofagocitozu (3). Pojam *fagocitoza* općenito podrazumijeva „endocitozu velikih čestica kao što su bakterije, stanice ili dijelovi raspadnuta tkiva“ (4). *Hemofagocitoza* je uži pojam koji označava fagocitozu stanica hematopoetskog sustava (eritrocita, leukocita, trombocita i njihovih prekursora) makrofagima ili histiocitima (tkivnim makrofagima) u koštanoj srži, jetri, slezeni, limfnim čvorovima ili drugim organima (5). *Limfohistiocitoza* naziv je za pojačano nakupljanje aktivnih limfocita i histiocita u tkivima. *Hemofagocitna limfohistiocitoza* pojam je koji označava nakupljanje i aktivaciju limfocita i histiocita koji vrše hemofagocitozu u različitim organima, prije svega onima koji pripadaju krvotvornom i središnjem živčanom sustavu (SŽS). U 10. reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti Svjetske zdravstvene organizacije (MKB-10) navedene su dvije dijagnoze koje se odnose na ovaj sindrom: D76.1 hemofagocitna limfohistiocitoza i D76.2 hemofagocitni sindrom povezan s infekcijom (6). U 11. reviziji (MKB-11) navedene su tri dijagnoze: 4A01.23 primarna hemofagocitna limfohistiocitoza, 3B62.5 hemofagocitni sindrom povezan s infekcijom i 3B62.Y sekundarna hemofagocitna limfohistiocitoza (7). Budući da u literaturi prevladava naziv *hemofagocitna limfohistiocitoza*, u nastavku rada bit će upotrebljavan taj naziv, odnosno odgovarajuća pokrata. Glavni su klinički znakovi i simptomi koji se javljaju u sklopu ovog sindroma vrućica, hepatosplenomegalija, limfadenopatija, koagulopatija, pancitopenija i simptomi koji su odraz zahvaćenosti SŽS-a, poput encefalopatije, konvulzija i žarišnih neuroloških ispada (8). Simptomi i znakovi variraju, ali uobičajeno se sindrom dijagnosticira na temelju prisutnosti barem pet od osam kliničkih i laboratorijskih kriterija navedenih u smjernicama imena *HLH-2004: Dijagnostičke i terapijske smjernice za hemofagocitnu limfohistiocitozu*, objavljenima kao dopuna dotadašnjim smjernicama HLH-94 (9). Osnovna je podjela HLH-a na primarni i sekundarni oblik. Primarni HLH (pHLH) genetski je uvjetovan, dok je sekundarni HLH (sHLH) stečeno stanje povezano s različitim infekcijama, malignim oboljenjima i autoimunim bolestima (1). Iako se primarni oblik naziva

i nasljednim, takav oblik HLH-a može biti potaknutim vanjskim čimbenikom, npr. infekcijom. Najčešća je infekcija u tijeku koje se može razviti HLH infekcija Epstein-Barr virusom (EBV) (3). EBV je ubikvitaran herpesvirus kojim je tijekom života inficirano oko 90 % svih ljudi (10). Iako je zaraza većinom asimptomatska, EBV je etiopatogenetski povezan s nizom bolesti i sindroma: od asimptomatske infekcije i infektivne mononukleoze (IM), preko karcinoma, drugih neoplazmi i limfoproliferativnih bolesti, do autoimunih bolesti, uključujući multiplu sklerozu (MS) (11). U sklopu pHLH-a, NK/T-staničnih limfoproliferativnih bolesti, ali i neovisno o njima, može se razviti EBV-om induciran HLH (12). Premda je rijedak, ovaj sindrom važno je na vrijeme prepoznati i razjasniti podlogu njegova nastanka radi pravovremene primjene odgovarajuće terapije. Stoga, cilj je ovoga rada prikazati etiopatogenezu, kliničku sliku, dijagnostičke postupke i terapiju ovoga rijetkog, ali, u slučaju neprepoznavanja, često fatalnog sindroma. U prvom je dijelu rada opisana infekcija EBV-om, s naglaskom na patogenezi i imunom odgovoru. Drugi dio rada odnosi se na HLH općenito, uz naglasak na prikazu kliničke slike, laboratorijskih nalaza, dijagnostičkih smjernica i protokola liječenja. Treći dio rada proizlazi iz informacija iznesenih u prvim dvama dijelovima, uz dodatan opis etiopatogenetskih, kliničkih, dijagnostičkih i terapijskih posebnosti usko vezanih uz EBV-om induciran HLH.

## 2. Epstein-Barr virus

### 2.1. Klasifikacija i otkriće virusa

Epstein-Barr virus (EBV), poznat i kao Epstein-Barrin virus ili humani gamaherpesvirus 4 (HHV4), ubikvitaran je humani virus iz porodice *Herpesviridae* koji, poput drugih humanih herpesvirusa, uzrokuje doživotne (perzistentne) infekcije s raznolikim kliničkim slikama. Pripada rodu *Lymphocryptovirus* iz potporodice limfotropnih virusa *Gammaherpesvirinae*, kojoj također pripada i humani gamaherpesvirus 8 (HHV8). Poput drugih virusa iz ovoga roda, EBV također inficira B-limfocite te može uzrokovati besmrtnost ovih stanica u *in vitro* uvjetima. Pretpostavka o postojanju dotad neotkrivenog virusa postojala je još od 1958. kada je Dennis Burkitt opisao limfom koji se javljao kao najčešći tumor dječje dobi u istočnom dijelu Afrike. Burkitt je pretpostavio da je, zbog geografske raspodjele slučajeva ove vrste tumora (danas poznat kao Burkittov limfom (BL)), mogući uzrok tumora infektivne prirode i povezan s malarijom. Prvi je put virus opisan 1964. godine kada su Anthony Epstein, Bert Achong i Yvonne Barr elektronskim mikroskopom vidjeli čestice nalik herpesvirusima u

kulturi stanica dobivenoj iz tkivnih uzoraka Burkittova limfoma (13). Budući da je virus dobio ime po britanskom patologu Anthonyju Epsteinu i irskoj virologinji Yvonne Barr, uputno bi bilo koristiti se nazivom *Epstein-Barrin virus* umjesto nazivom *Epstein-Barrov virus*. Poznata su dva tipa EBV-a, tip A i tip B (EBV-1 i EBV-2), koji se razlikuju genetski i po sposobnosti transformacije limfocita (11,14). Zbog široke rasprostranjenosti, visoke prevalencije, raznolikosti kliničkih slika i povezanosti s novotvorinama, ovaj je virus predmet brojnih istraživanja s ciljem pronalaska učinkovite prevencije zaraze i sprečavanja razvoja bolesti te uspostavljanja učinkovitih protokola liječenja.

## 2.2 Struktura, fiziologija i replikacija

EBV je ovijen virus, promjera 120 – 180 nm, građen od dvolančane deoksiribonukleinske kiseline (DNA) smještene unutar nukleokapside sastavljene od 162 kapsomere. Nukleokapsidu ovija membrana koja potječe od membrane stanice domaćina i na njoj se nalaze virusni glikoproteini (gp). Između nukleokapside i virusne ovojnice nalazi se tegument koji sadržava virusne enzime i druge proteine (13,14). Genom EBV-a čini linearna dvolančana DNA duljine 172 kbp (kilobaznih parova) koja može kodirati oko 85 proteina, od kojih neki još uvijek nisu utvrđeni i opisani (13). Poput većine herpesvirusa, životni ciklus EBV-a također se sastoji od dviju faza: latentne i litičke. Tijekom latentne faze virusna je DNA smještena u staničnoj jezgri u obliku episoma te se, ovisno o procesu diobe stanice i replikacije DNA domaćina, događa i pasivna replikacija virusnog genoma koji se prenosi u stanice kćeri čime ostaje trajno prisutan u domaćinu (11). Otvoreni okviri čitanja (ORF, prema engl. *open reading frame*) genoma EBV-a imenovani su prema fragmentu dobivenom djelovanjem restriksijske endonukleaze BamHI unutar kojeg se nalaze (15). Fragmenti su označeni slovima na način da slovo A označava najveći od fragmenata, a fragmenti označeni daljnjim slovima abecede poredani su po veličini (13). Dio proteina također ima dodatne nazive uvriježene u literaturi, odabrane po njihovu smještaju ili ulozi koju vrše. Osim u proteine dio gena prepisuje se u nekodirajuće molekule ribonukleinske kiseline (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*). Takvim nekodirajućim molekulama RNA pripadaju EBV-om kodirana RNA 1 i 2 (EBER1 i EBER2, prema engl. *EBV-encoded RNA*) te brojne mikroRNA molekule. Na krajevima virusne DNA nalazi se niz terminalnih ponavljanja veličine 0.5 kb (kilobaza) (15). Tijekom latentne infekcije B-limfocita genom EBV-a prelazi u kružni oblik spajanjem u području terminalnih ponavljanja, čiji broj može biti korišten kao surogatni biljeg stanične klonalnosti. Dakle, na temelju jednakog broja terminalnih ponavljanja može se zaključiti potječu li stanice nekog uzorka od zajedničke prethodne stanice inficirane EBV-om

(11). Geni i proteini EBV-a uobičajeno se dijele na tri skupine ovisno o fazi u kojoj se prepisuju (transkribiraju) i prevode (translatiraju): neposredno rane, rane i kasne gene i proteine (14). Važnu ulogu u građi i umnažanju virusa imaju sljedeći proteini: nuklearni antigeni (EBNA, prema engl. *Epstein-Barr nuclear antigens*, kojima pripadaju EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C i EBNA-LP); kasni ili latentni membranski proteini (LMP, prema engl. *latent membrane proteins*, kojima pripadaju LMP1, LMP2A i LMP2B); desnostrani ORF 1 fragmenta H restrikcijske endonukleaze BamHI (BHRF1, prema engl. *BamHI fragment H rightward open reading frame 1*) i desnostrani ORF 1 fragmenta A endonukleaze BamHI (BARF1, prema engl. *BamHI-A fragment rightward open reading frame*); glikoproteini membrane (označeni brojevima uz kraticu gp) i virusni kapsidni antigeni (VCA, prema engl. *viral capsid antigen*) (13,15).

Primarno mjesto replikacije virusa nepoznato je, no vjerojatno se replikacija (litička faza) EBV-a zbiva u diferencirajućim epitelnim stanicama orofarinksa, žlijezda slinovnica i desni. Virusne čestice zatim inficiraju B-limfocite smještene u usnoj šupljini, osobito u dijelovima bogatim limfnim tkivom (tzv. Waldeyerov limfatični prsten). Zaraženi B-limfociti služe kao rezervoar virusa u latentnoj fazi i kao put širenja virusa u druge dijelove limfnog sustava i u epitelne stanice (13). Virus se proteinom ovojnice gp350 veže za ciljne receptore komplementa 2 (CR2/CD21) na B-limfocitima. Daljnjom interakcijom glikoproteina gp42 s molekulama glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II (MHC-II, prema engl. *major histocompatibility complex class II*), koje služe kao koreceptori, dolazi do povezivanja gp42 i heterodimera glikoproteina gH/gL. Ovaj kompleks glikoproteina aktivira gB, fuzijski protein ključan za spajanje virusne ovojnice sa staničnom membranom. Kompleks glikoproteina gH/gL i gB također je potreban za fuziju virusne ovojnice s membranom epitelnih stanica, ali inicijalno vezanje virusa na epitelne stanice zbiva se interakcijom virusnog proteina BMRF2 s integrinima i efrinskim receptorom A2 epitelnih stanica (16). Budući da epitelne stanice nemaju izražene MHC-II, gp42 nije potreban za ulazak u njih, već je dovoljan samo heterodimer gH/gL (11). Prilikom replikacije u epitelnim stanicama dolazi do vezanja gp42 za gH/gL kompleks, dok se pri replikaciji u B-limfocitima gp42 izdvaja vezanjem na MHC-II. Zbog toga virusi nastali replikacijom u epitelnim stanicama imaju veću mogućnost zaražavanja B-limfocita jer imaju izražen gp42 (nije se vezao za MHC-II), a virusi oslobođeni iz B-limfocita s većom vjerojatnošću zaražavaju epitelne stanice jer nemaju izražen gp42 (17).

Ovisno o tipu stanice u kojoj se nalaze virusne čestice moguća su četiri različita tipa latentne faze, u literaturi označena brojevima 0, I, II i III (18). Ti se tipovi razlikuju po vrsti i broju

gena koji se prepisuju u proteine i po nekodirajućim RNA molekulama. Različite kliničke slike u bolestima i sindromima uzrokovanim EBV-om razlikuju se po tipovima latencije. U tipu 0 prepisuju se EBER-i i transkripti kodirani fragmentom A endonukleaze BamHI (BARTs, prema engl. *BamHI A-encoded transcripts*), u tipu I uz prethodno navedene izražen je i EBNA1, u tipu II prepisuju se još geni za LMP1 i LMP2, a tipu III pridodani su još LMP2A, LMP2B, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP i BHRF1 (11).

Potaknut vanjskim čimbenicima, EBV započinje replikaciju, odnosno dolazi do prelaska iz latentne u litičku fazu. U litičkoj fazi, nakon vezanja i fuzije virusa sa stanicom, dolazi do ulaska virusa i spajanja nukleokapside s ovojnicom stanične jezgre čime virusni genom dopijeva u jezgru gdje se zbiva umnažanje virusa (14). Dolazi do zaustavljanja stanice u S-fazi staničnog ciklusa tijekom koje je omogućeno umnažanje virusa pomoću staničnih proteina i enzima. Najprije dolazi do sinteze proteina ključnih za prelazak u litičku fazu ciklusa, tzv. neposredno ranih proteina Zta (poznat i kao ZEBRA ili BZLF1) i Rta (poznat kao BRLF1). Oni potiču uzajamnu ekspresiju i ekspresiju ranih litičkih proteina (BMRF1, BHRF1...), važnih za enzimsku aktivnost potrebnu u procesu transkripcije gena i umnažanja DNA. Ove dvije skupine proteina u konačnici dovode do prepisivanja gena potrebnih za sintezu kasnih, strukturnih proteina EBV-a. U litičkoj se fazi genom virusa umnaža i do više od sto puta. Umnožena DNA pakira se u novonastale nukleokapside koje pupaju kroz unutarnju jezgrinu ovojnicu dobivajući privremenu membranu koju gube pupanjem kroz vanjsku jezgrinu ovojnicu. Dospjevši u citoplazmu, virusi dobivaju tegument građen od virusnih proteina sintetiziranih u citoplazmi. Zreli virioni nastaju u Golgijevu aparatu gdje se virusi ovijaju sekretornim vezikulama kojima se prenose do stanične membrane. Konačno, spajanjem sa staničnom membranom dolazi do otpuštanja viriona procesom egzocitoze u izvanstanični prostor (11,14,19,20). To obično dovodi do smrti stanice, a novonastali virusi mogu zaraziti nezaražene stanice domaćina ili biti preneseni na novog domaćina (11).

## **2.3 Patogeneza**

Budući da se EBV najčešće prenosi slinom, primarno umnažanje virusa odvija se u epitelnim stanicama orofarinksa i okolnih struktura. Tu se odvija litička replikacija, a virus zatim dopijeva u B-limfocite ždrijelnog limfatičnog prstena. Dolazi do transformacije linearne DNA EBV-a u kružni oblik i uspostavljanja latentne infekcije. Virus nakon toga perzistira u

dugoživućim memorijskim B-limfocitima. Dva su modela prema kojima virus dospjeva u memorijske B-limfocite: model germinativnih središta i model izravne infekcije (21).

Prema modelu germinativnih središta najprije se odvija latentna faza tipa III u kojoj su izraženi svi latentni geni (18). U tom tipu latencije proteini EBNA2 i EBNA-LP utječu na ekspresiju brojnih staničnih gena i time omogućuju transformaciju B-limfocita. EBNA3 također doprinosi transformaciji i ujedno blokira apoptozu inficiranih stanica (11). Tip III latencije karakterističan je za posttransplantacijsku limfoproliferativnu bolest (PTLD, prema engl. *post-transplant lymphoproliferative disease*), difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, prema engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), ali i za B-limfocite zaražene *in vitro* gdje stanice poprimaju oblik limfoblastoidnih staničnih linija (LCL, prema engl. *lymphoblastoid cell lines*) (11,18). Nakon toga stanice dospjevaju u germinativna središta, limfoidne strukture u kojima se B-limfociti izloženi antigenima umnažaju te se događaju procesi prekapčanja razreda imunoglobulina i somatskih hipermutacija u genima za imunoglobuline (21). U germinativnim središtima uobičajeno dolazi do stvaranja genske raznolikosti aktiviranih B-limfocita uz preživljavanje najposobnijih stanica čime nastaju plazma-stanice i memorijski B-limfociti (22). EBV u B-limfocitima germinativnog središta prelazi u latentnu fazu tipa II (13). Citoplazmatski odsječak proteina LMP1, izraženog u tom tipu latencije, djeluje kao signal sličan nizvodnom signalu membranskog proteina CD40, konstitutivno izraženog na membrani antigenom aktiviranih B-limfocita (21). Antigenom aktivirani pomagački T-limfociti izražavaju CD40L, ligand čijim se vezanjem za CD40 potiče povezivanje citosolnih proteina TRAF (prema engl. *tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor*) u B-limfocitima, što u konačnici dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora koji potiču proliferaciju B-limfocita uz pojačano stvaranje i izlučivanje imunoglobulina (22). Dakle, LMP1 djeluje kao konstitutivno aktivan receptor tumorskog faktora nekroze (TNFR, prema engl. *tumor necrosis factor receptor*) koji aktivira TRAF-ove, čime potiče proliferaciju i imortalizaciju (besmrtnost) B-limfocita bez potrebe za sudjelovanjem antigenom aktiviranih pomagačkih T-limfocita. LMP1 se također nalazi i u egzosomima, malim vezikulama koje otpuštaju stanice, te na taj način može dospjeti do susjednih ili udaljenih EBV-om nezaraženih stanica i tako djelovati na njihovu proliferaciju (11). LMP2A, također izražen na membrani zaraženih limfocita, aktivira signal sličan signalu konstitutivno izraženog receptora B-limfocita (engl. *B cell receptor*, BCR) (21). Djelovanjem ovih dvaju membranskih proteina dolazi do aktivacije kanonskog i nekakonskog puta NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor  $\kappa$ B, engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*) i drugih upalnih puteva koji utječu na transkripciju proteina (11). Osim navedenog



djelovanja u limfocitima, LMP2 izražen u epitelnim stanicama može inhibirati njihovu diferencijaciju i proces nazvan anoikis (podtip apoptoze koji se događa prilikom odvajanja stanice od izvanstaničnog matriksa) te potaknuti migraciju stanica što se dovodi u vezu s mogućnosti metastaziranja karcinoma uzrokovanih EBV-om (23). Tip II latencije karakterističan je za HL, DLBCL, NK/T-stanične limfome (NKTL, prema engl. *NK/T cell lymphoma*), nazofaringealni karcinom (NPC, prema engl. *nasopharyngeal carcinoma*) i karcinom želuca (11). Nakon djelovanja proteina izraženih u tipu II latentne faze dolazi do izlaska inficiranih, besmrtnih, memorijskih B-limfocita iz germinativnog središta pri čemu dolazi do prelaska u tip 0 latencije u kojemu je inhibiran izražaj gena. Na taj način stanice postaju zaštićene od prepoznavanja stanicama imunskog sustava koje su specifične za EBV. Ovaj tip latencije nalazimo u zdravih, imunokompetentnih osoba kod kojih nakon primarne infekcije mali broj B-limfocita ostaje trajno inficiran (21). Radi održanja broja, odnosno homeostaze memorijskih B-limfocita, povremeno dolazi do njihova dijeljenja pri čemu stanica prelazi u tip I latencije u kojemu je izražen EBNA1 (15). Taj je protein potreban za razdvajanje episomske virusne DNA prilikom diobe stanica (21). Tip I latencije prisutan je u stanicama BL-a i nekih karcinoma želuca (11). Aktivacija EBV-om zaraženih memorijskih B-limfocita može dovesti do prelaska iz latentne u litičku fazu, odnosno do transformacije B-limfocita u plazma-stanice koje otpuštaju umnožene virione. Plazma-stanice mogu nastati i izravno iz B-limfocita germinativnog središta bez prethodnog prelaska u oblik memorijskih B-limfocita (21).

Prema modelu izravne infekcije, proces nastajanja besmrtnih memorijskih B-limfocita ne ovisi o reakciji germinativnih središta, već EBV izravno inficira memorijske B-limfocite i potiče njihovu proliferaciju (13). U prilog ovom modelu govori otkriće da stanice inficirane EBV-om izolirane iz germinativnih središta osoba s IM-om ne pokazuju znakove procesa somatske hipermutacije, odnosno nema intraklonalne raznolikosti tih stanica. Dakle, prema ovim pronalascima, zaraženi B-limfociti pronađeni u germinativnim središtima osoba s IM-om ne sudjeluju u reakciji germinativnog središta. Osim izravne infekcije memorijskih B-limfocita, ova bi se pojava mogla objasniti i izravnom infekcijom B-limfocita germinativnog središta nakon koje bi uslijedila inhibicija procesa somatske hipermutacije (21,24). Uloga LMP1 i LMP2A u signalnim putovima bitnim za sprečavanje apoptoze B-limfocita dokazana je *in vitro*, ali istraživanja *in vivo* nisu pokazala toliku važnost ovih dvaju proteina u imortalizaciji B-limfocita. Moguće da ova dva proteina samo doprinose, ali nisu ključni signal za aktivaciju puteva nužnih za imortalizaciju B-limfocita (25). Istraživanja

*in vitro* također su pokazala ulogu LMP2A u poticanju preživljavanja onih B-limfocita u germinativnim središtima koji stvaraju niskoafinitetna protutijela što bi moglo doprinijeti razumijevanju povezanosti infekcije EBV-om i razvoja autoimunih bolesti (26).

Istraživanjima su dobiveni rezultati koji govore u prilog i protiv obiju teorija, međutim, ovi modeli nisu međusobno isključivi te je moguća uloga obaju modela u patogenezi trajne infekcije i bolesti uzrokovanih EBV-om (27). Premda su stanice na EBV pozitivnih malignih tumora većinom u latentnoj fazi, litička faza također doprinosi razvoju ovih bolesti. Važnu ulogu imaju citokini i faktori rasta koje luče stanice u litičkoj fazi, primjerice proupalni interleukin (IL) 6, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) i imunosupresivni IL-10 koji potiču umnažanje i preživljavanje okolnih stanica koje su u fazi latencije. Istraživanja pokazuju ulogu abortivne litičke infekcije u poticanju mutacija koje dovode do razvoja na EBV pozitivnih tumora (11). Tijekom rane faze zaraze B-limfocita izraženi su i neki geni litičke faze, a ne samo latentni geni te je takva faza nazvana prelatentnom fazom. Neki od tih litičkih gena djeluju antiapoptotski, kao homolozi gena BCL2 važnog za regulaciju apoptoze, a neki smanjuju izražaj MHC-a čime omogućavaju preživljavanje zaraženih stanica i bijeg od imunskog sustava (28). Osim u B-limfocitima i epitelnim stanicama, prisutnost EBV-a dokazana je u T-limfocitima i NK stanicama prisutnim u tkivnim uzorcima tonzila što upućuje na mogućí mehanizam razvoja neepitelnih i NK/T-staničnih limfoma te drugih proliferativnih bolesti uzrokovanih EBV-om, uključujući i HLH (29,30). Iako EBV prvenstveno inficira i uzrokuje umnažanje B-limfocita, klonalna ekspanzija T-limfocita također je uobičajena pojava i nije nužno povezana s malignitetom. Način na koji EBV ulazi u NK stanice i T-limfocite, koji nemaju receptor CD21, nije poznat. Jedan je od mogućih mehanizama sinaptički prijenos CD21 sa zaraženog B-limfocita na NK stanicu (31). Postoje dokazi da EBV može najprije zaraziti limfoidne progenitorne stanice s izraženim CD21 koje se naknadno diferenciraju u NK stanice i T-limfocite (10,32)

## **2.4 Imunost**

Imunosni odgovor na infekciju EBV-om uključuje urođenu i adaptivnu (stečenu) komponentu imunosti (11,13). Urođeni imunski odgovor pokreće se odmah nakon ulaska EBV-a u organizam domaćina i ne zahtijeva prethodnu izloženost te je ključan za aktivaciju kasnijeg adaptivnog odgovora. Sustav urođene imunosti prepoznaje molekularne obrasce patogenih organizama (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*), uključujući nukleinske kiseline i lipide EBV-a (10). Mete urođene imunosti često su molekule bitne za

preživljavanje mikroorganizama zbog čega ih mikroorganizmi ne mogu odbaciti kako bi izbjegli prepoznavanje imunskim sustavom. PAMP-ove prepoznaju receptori za prepoznavanje obrazaca (PRR, prema engl. *pattern recognition receptors*) izraženi na membrani, u citosolu i fagocitnim vezikulama stanica imunskog sustava. U urođenoj obrani od EBV-a sudjeluju receptori slični Tollu (TLR, prema engl. *Toll-like receptors*), receptori slični NOD-u (NLR, prema engl. *NOD-like receptors*; NOD – protein koji sadržava domenu za oligomerizaciju nukleotida, prema engl. *nucleotide oligomerization domain-containing protein*), receptori slični RIG-u (RLR, prema engl. *RIG-like receptors*; RIG – gen induciran retinoičnom kiselinom, prema engl. *retinoic acid-inducible gene*) i citosolni senzori za DNA (CDS, prema engl. *cytosolic DNA sensors*), uključujući sintazu cikličkog GMP-AMP (cGAS, prema engl. *cyclic GMP-AMP synthase*), signalizacijski put STING (prema engl. *stimulator of interferon genes*) i protein odsutan u melanomu 2 (AIM2, prema engl. *absent in melanoma-2*). Vezanjem odgovarajućih PAMP-ova za te receptore i senzore pokreće se nizvodna signalna kaskada upalnih staničnih puteva koji aktiviraju transkripcijske faktore poput NF- $\kappa$ B-a, koji potiče izražaj gena za upalne citokine (TNF, IL-1) te IRF3 i IRF7 (faktor interferenskog odgovora, engl. *interferon response factor*), koji potiču sintezu interferona tipa I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) važnih u protuvirusnoj obrani. Mogu potaknuti i stvaranje inflammasoma uz aktivaciju kaspaze 1 potrebne za stvaranje aktivnih oblika proupalnih citokina IL-1 $\beta$  i IL-18 (33). EBV smanjuje aktivaciju i izražaj pojedinih PRR-ova, primjerice receptora TLR9 i njegovih nizvodnih signalnih puteva (11,34,35), signalnih puteva RLR-a (36,37) i signalnog puta STING (38) što dovodi do smanjenog interferenskog odgovora inficiranih stanica. Djelovanjem proteina EBV-a zahvaćeni su i dijelovi interferenskog signalnog puta poput interferenskog  $\alpha/\beta$  receptora (IFNAR, prema engl. *interferon-  $\alpha/\beta$  receptor*) i signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije (STAT, prema engl. *signal transducer and transcription activator*) što smanjuje odgovor inficiranih stanica na antivirusno djelovanje interferona (39).

Kao dio urođene imunosti u obrani od infekcije EBV-om sudjeluju NK stanice. Istraživanja pokazuju da rani odgovor NK stanica ima važnu ulogu u kontroli litičke replikacije virusa te u sprečavanju i ublažavanju simptomatske infekcije EBV-om (40). NK stanice imaju izvršnu ulogu u ubijanju zaraženih stanica pomoću bjelančevina nazvanih perforin i granzimi koji slijedom enzimskih reakcija uzrokuju apoptozu. Sudjeluju u stvaranju IFN- $\gamma$  koji potiče makrofage na uništavanje fagocitiranih organizama. Također, vezanjem receptora CD16 za Fc-ulomak protutijela podrazreda IgG1 i IgG3 pokreće se proces stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, prema engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*),

važnog mehanizma adaptivne imunosti (33). Narušena diferencijacija NK stanica uzrokovana mutacijama hematopoetskog transkripcijskog čimbenika GATA2 i deficijencijom DNA helikaze MCM4 povezana je s razvojem na EBV pozitivnih tumora glatkih mišića, limfoma i kronične aktivne infekcije EBV-om (CAEBV, prema engl. *chronic active EBV infection*) (40). Mutacije proteina povezanih sa signalnom limfocitnom aktivacijskom molekulom (SAP, prema engl. *SLAM-associated protein*; SLAM – engl. *signaling lymphocytic activation molecule*), prisutne u X-vezanom limfoproliferativnom sindromu (XLP, prema engl. *X-linked lymphoproliferative syndrome*), povezane su s razvojem kliničke slike fulminantne infekcije EBV-om, HLH-om i B-staničnim limfomom (41). SAP je u T-limfocitima vezan uz protein SLAM, a u NK stanicama veže se na aktivacijski receptor 2B4 (9).

Manjak tzv. invarijantnih NKT stanica (iNKT, prema engl. *invariant natural killer T cells*), koje sudjeluju u aktivaciji i pojačavanju antivirusnog odgovora, prisutan je u XLP-u i također doprinosi izraženoj podložnosti infekciji uzrokovanoj EBV-om zabilježenoj kod oboljelih osoba (42). Mutacije u transportnom proteinu za magnezij (MAGT1, prema engl. *magnesium transporter protein 1*) u sklopu X-vezane imunodeficijencije s poremećajem magnezija, infekcijom EBV-om i novotvorinama (X-MEN, prema engl. *X-linked immunodeficiency with magnesium defect, EBV infection, and neoplasia*) uzrokuju smanjenu razinu magnezija u stanici što posljedično smanjuje aktivnost aktivacijskog receptora NKG2D prisutnog na objema skupinama citotoksičnih limfocita: NK stanicama i T-limfocitima. Time dolazi do smanjenog citotoksičnog djelovanja NK stanica i nekontrolirane kronične infekcije EBV-om (43). Za normalnu funkciju NK stanica u ograničavanju infekcije EBV-om važni su aktivacijski receptori 2B4, CD27, CD16 (FcγRIIIA) i prethodno spomenut NKG2D. Osim receptora, važnu ulogu imaju izvršne molekule (perforin, granzimi). Mutacije u genima za perforin povezane su s tipom 2 obiteljskog (familijarnog) HLH-a (fHLH), a mutacije proteina potrebnih za dopremu i otpuštanje citotoksičnih granula iz NK stanica, primjerice proteina Munc18-2 i Munc13-4, bitnih za aktivaciju sintaksina 11, pronađene su u pacijenata s CAEBV-om i drugim tipovima fHLH-a (40). Dio istraživanja u kojima je mjeren broj NK stanica u perifernoj krvi pokazao je negativnu (44), a dio pozitivnu (45) korelaciju s izmjerenim vrijednostima viremije. Važnu ulogu u obrani od infekcije EBV-om vjerojatno ima podskupina ranodiferenciranih NK stanica, s izraženim NKG2A receptorom, ali bez izraženog receptora NK stanica nalik imunoglobulinu (KIR, prema engl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*) i bez antigena CD57. Razina ove podskupine NK stanica veća je u mlađe djece te opada s dobi, dok istovremeno raste pojavnost kliničke slike IM-a u

odnosu na asimptomatsku infekciju. Pretpostavlja se da s vremenom dolazi do smanjenja broja ovih NK stanica zbog dotadašnje izloženosti i suočenosti imunskog sustava s brojnim drugim infekcijama pa adolescenti češće razvijaju kliničku sliku IM-a (40). Istraživanjima na miševima pokazana je pozitivna povezanost ekspanzije populacije NK stanica i CD8<sup>+</sup> T-limfocita s replikacijskom (litičkom) aktivnošću EBV-a. Moguće je da je odvijanje litičke replikacije ujedno poticaj ekspanzije i meta djelovanja ranodiferenciranih NK stanica, a njihova nedostatna aktivnost povećava rizik razvoja kliničke slike IM-a i limfoma povezanih s EBV-om (46).

Izvršnu funkciju adaptivne imunosti obavljaju T-limfociti, kao stanična komponenta, te protutijela koja proizvode B-limfociti, kao humoralna komponenta. CD8<sup>+</sup> T-limfociti važni su tijekom primarne, ali i tijekom trajne infekcije EBV-om. Ta podskupina T-limfocita prepoznaje virusne antigene koji su predočeni na molekulama MHC-I smještenima na površini zaraženih stanica (11). Vežanjem na zaražene stanice ovi T-limfociti izbacuju granule koje sadržavaju perforin, potreban za ulazak granzima u stanicu, a granzimi aktiviraju puteve programirane stanične smrti (apoptoze) (47). Tijekom infekcije dolazi do izražene ekspanzije populacije CD8<sup>+</sup> limfocita usmjerenih na epitope litičke faze EBV-a uz udio do čak 50% u ukupnim perifernim CD8<sup>+</sup> limfocitima. Najjače je izražen odgovor na neposredno rane, zatim na rane, a najmanje na kasne antigene litičke faze što je u skladu sa sve slabije izraženim procesom predočivanja antigena tijekom napretka litičke replikacije. CD8<sup>+</sup> limfociti usmjereni prema latentnim antigenima, prije svega prema EBNA3, čine do 5% ukupne populacije tih stanica u perifernoj krvi. Suprotno tome, CD4<sup>+</sup> T-limfociti u većem su broju usmjereni prema antigenima latentne nego prema antigenima litičke faze. Umnažanje CD8<sup>+</sup> limfocita vremenski se poklapa sa simptomatskim razdobljem kliničke slike IM-a što upućuje na zaključak da su simptomi uzrokovani ekspanzijom populacije CD8<sup>+</sup> limfocita, a ne infekcijom kao takvom. Smanjenje viremije praćeno je vraćanjem razine CD8<sup>+</sup> limfocita na normalne razine (48).

Humoralna imunost uključuje djelovanje protutijela razreda IgM, IgA i IgG usmjerenih na antigene latentne i litičke faze virusa. Neutralizirajuća protutijela usmjerena su na glikoproteine gp350, gp42 i gH/gL (11,49). Najprije se bilježi porast IgM, a ubrzo i IgG protutijela protiv VCA, uz odsutnost protutijela protiv EBNA1. Zatim dolazi do stvaranja IgG protutijela usmjerenih protiv EBNA2, ali i brzog prestanka sinteze istih. Konačno, s odgodom od 3 – 6 mjeseci dolazi do sinteze protutijela usmjerenih protiv EBNA1 (48). Zbog

poliklonalne aktivacije B-limfocita moguće je zabilježiti porast reumatoidnog faktora (RF), kao i heterofilnih protutijela koja mogu aglutinirati ovčje, konjske i goveđe eritrocite (13,14).

EBV izbjegava adaptivni imunski odgovor smanjenjem predočavanja antigena na nekoliko načina: smanjenim izražajem MHC-I i MHC-II molekula, smanjenom proteasomskom razgradnjom i otežanim transportom citosolnih virusnih peptida od proteasoma do membrane koji zbog toga ne mogu biti predočeni na MHC molekulama (11,50). Zbog poremećenog staničnog imunskog odgovora može doći do reaktivacije EBV-a. Istraživanja pokazuju da su neki od potencijalnih okidača psihološki stres različitog tipa (19), boravak u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) (51), autoimune i druge kronične bolesti (19). Osobe s prirođenim ili stečenim (posttransplantacijska imunosupresivna terapija, infekcija HIV-om) imunodeficijencijama sklone su razvoju limfoproliferativnih bolesti poput oralne vlasaste leukoplakije, PTLD-a i HL-a zbog oslabljene funkcije imunosti, pogotovo njene stanične komponente (13,19).

## **2.5 Bolesti i sindromi koje uzrokuje EBV**

### **2.5.1. Općenito o bolestima povezanim s EBV-om**

U sljedećem odlomku opisana je klinička slika te tipični laboratorijski nalazi infektivne mononukleoze, najčešće bolesti uzrokovane EBV-om. S obzirom na to da dio bolesti u sklopu kojih se može razviti EBV-om inducirani HLH dijeli značajke kliničke slike s IM-om, važno je poznavati tipične značajke IM-a. Budući da je tema ovog rada EBV-om inducirani HLH, klinički entiteti koji nisu povezani s ovim sindromom nabrojani su radi boljeg razumijevanja spektra diferencijalnih dijagnoza povezanih s EBV-om. Poznavanje raznolikosti kliničke slike povezane s ovim virusom važno je radi provođenja odgovarajućih dijagnostičkih pretraga. Bolesti i sindromi usko vezani uz EBV-om inducirani HLH u ovom su poglavlju samo spomenuti, a detaljno opisani u 4. poglavlju ovoga rada.

Endemična varijanta Burkittova limfoma, podvrste B-staničnog limfoma, obično zahvaća čeljust i lice. U gotovo 100 % slučajeva pozitivan je na EBV te se pretežno javlja u supsaharskoj Africi uz moguću povezanost s malarijom (11,15). EBV je prisutan u 30-40 % slučajeva klasičnog HL-a, a osobe koje su preboljele IM imaju oko četiri puta veći rizik za razvoj na EBV pozitivnog HL-a, dok je DLBCL pozitivan na EBV u oko 9 % slučajeva (11). PTLD se razvija u imunokompromitiranih osoba, najčešće nakon transplantacije ili u sklopu

AIDS-a (11,14,15). NK/T-stanične limfoproliferativne bolesti detaljnije su opisane u 4. poglavlju. Oralna vlasasta leukoplakija očituje se bijelim naslagama na vanjskim rubovima jezika, uglavnom u osoba zaraženih HIV-om (52). NPC je karcinom koji se endemično javlja u južnoj Kini, uz povećanu incidenciju u mediteranskoj, bliskoistočnoj i inuitskoj populaciji. Epitelne stanice NPC-a pozitivne su na EBV, a povišen titar za EBV specifičnih IgA protutijela biljeg je razvoja ili ponovne pojave ovog karcinoma (11,14). Karcinom želuca ne pokazuje endemični obrazac kao NPC te je u oko 10 % slučajeva pozitivan na EBV. Karakterizira ga obilan limfoidni infiltrat i ima bolju prognozu u odnosu na karcinom želuca negativan na EBV (11,15). Novija istraživanja pokazuju povezanost EBV-a i autoimunih bolesti poput SLE-a, reumatoidnog artritisa i Sjögrenova sindroma. Čini se da anti-EBNA1 protutijela križno reagiraju s autoantigenima SLE-a, a EBNA2 se veže na regulatorne regije gena vezanih uz razvoj SLE-a (11). MS se razvija djelovanjem limfocita koji napadaju mijelinsku ovojnicu živčanih vlakana. Istraživanja pokazuju 32 puta veći rizik za razvoj MS-a u osoba inficiranih EBV-om u odnosu na kontrolu. Moguću ulogu u razvoju MS-a imaju anti-EBNA1 protutijela koja križno reagiraju s adhezijskom molekulom glija stanica (GlialCAM) (11,53). Sindrom kroničnog umora također se dovodi u etiološku vezu s EBV-om (52).

### **2.5.2. Infektivna mononukleoza**

IM je tipična prezentacija infekcije EBV-om u adolescenata i mlađih odraslih osoba. Inkubacija traje oko šest tjedana (54). Glavni su simptomi i znakovi IM-a vrućica ( $> 38.5^{\circ}\text{C}$  tijekom 1 – 3 tjedna), slabost, grlobolja (sa pseudomembranoznim naslagama na krajnicima) i limfadenopatija, a mogu biti prisutni glavobolja, bolovi u mišićima, hepatosplenomegalija i gubitak apetita. Limfadenopatija je najizraženija na vratu, a manje pod pazuhom i u preponama, uglavnom je simetrična, s umjereno bolnim limfnim čvorovima (11,13,52,54). Klinička slika može se razviti naglo ili postupno, uz supfebrilne temperature tijekom prvih sedam dana. U krvnoj slici prisutan je velik broj atipičnih limfocita (odgovaraju umnoženim aktiviranim  $\text{CD8}^+$  limfocitima). Simptomi su vjerojatno posljedica povećanih razina proupalnih citokina i kemokina uzrokovanih snažnim citotoksičnim odgovorom T-limfocita na EBV-om zaražene B-limfocite (55). Mogu biti prisutni znakovi supkliničkog hepatitisa s povišenom razinom alanin-aminotransferaze (ALT) uz odsutnost žutice i bolova u trbuhu (54). Bolest obično traje nekoliko tjedana uz potpuni oporavak, osim u slučaju genetskog poremećaja koji onemogućuje odgovarajući imunski odgovor na EBV (11). Prethodno opisan proces opadanja broja NK stanica ovisan o dobi moguć je uzrok blažih simptoma ili

asimptomatske kliničke slike u djece za razliku od adolescenata i odraslih. Također je moguće da su stariji izloženi većem broju virusnih čestica pri zarazi zbog karakterističnog načina prijenosa (prijenos slinom pri ljubljenju) (11,54,55). Treći je mogući razlog povećan broj aktiviranih CD8<sup>+</sup> T-limfocita u odraslih osoba kao posljedica križne reakcije T-limfocita specifičnih za druge viruse s kojima se osoba susrela (54). Akutne komplikacije rijetke su i uključuju opstrukciju dišnih puteva, serozni meningoencefalitis, miokarditis, pneumonitis, hemolitičku anemiju i trombocitopeniju (52,54). Osobito je opasna i vrlo rijetka komplikacija ruptura slezene zbog čega se preporuča izbjegavanje sportskih i drugih fizičkih aktivnosti tijekom osam tjedana (52,56). Simptomi nalik IM-u mogu biti prisutni trajno u sklopu CAEBV-a (13). Istraživanja pokazuju da osobe koje su preboljele IM imaju povećan rizik od razvoja MS-a (53) i na EBV pozitivnog HL-a (57) .

## **2.6 Epidemiologija i prijenos**

EBV je ubikvitaran uzrok infekcija diljem svijeta. Seropozitivnost na EBV iznosi 90 – 95 % u većini zemalja (58). Primarna izloženost virusu odvija se u ranoj dobi, uglavnom prije navršene pete godine života. U razvijenijim državama primoinfekcija je češća u nešto kasnijoj dobi, ali gotovo su sve odrasle osobe seropozitivne (59). EBV se prenosi slinom putem koje dolazi na sluznicu ždrijela nezaražene osobe. Zdrave osobe prethodno zaražene EBV-om povremeno u slini izlučuju EBV. Drugi su putevi prijenosa majčino mlijeko, tjelesne tekućine i transplantirani organi pozitivni na EBV (11). Učestalost pojedinih kliničkih prezentacija ovisi o dobi, stanju imunskog sustava, geografskom području i podrijetlu. BL pozitivan na EBV znatno je češći u supsaharskoj Africi (60), a EBV-om induciran HLH, NK/T-stanični limfomi i nazofaringealni karcinom češći su u zemljama istočne i jugoistočne Azije (58,61). Neke bolesti, poput PTLĐ-a, vezane su uz stanja smanjene imunosti (59). Ovisno o strukturi antigena EBNA2, EBV se dijeli na dva tipa čija je zastupljenost neovisna o geografskom području (13).

## **2.7 Laboratorijska dijagnostika**

Uz odgovarajuću kliničku sliku bolesti povezane s EBV-om, za pravilno usmjerenje daljnjih pretraga i liječenja važni su dijagnostički postupci dokazivanja infekcije EBV-om.



Pretrage obuhvaćaju kompletnu krvnu sliku, serološke pretrage i molekularne pretrage, a korisne mogu biti dodatne nespecifične biokemijske pretrage.

Kompletna krvna slika korisna je u odbacivanju alternativnih diferencijalnih dijagnoza s kliničkom slikom koja nalikuje na IM. Leukocitoza je gotovo uvijek prisutna u IM-u, a uobičajen je tijek u kojemu najprije dolazi do limfocitoze u početnim tjednima bolesti, a zatim do postupne normalizacije broja limfocita. Isti tijek prati i pojava atipičnih limfocita (14,52). Uz odgovarajuću kliničku sliku i udio atipičnih, reaktivnih limfocita veći od 10 %, dijagnoza je IM-a vjerojatna (52,54). Taj je nalaz nespecifičan jer može biti prisutan u drugim infekcijama (CMV, zaušnjaci, rubeola) i pri primjeni nekih lijekova (14). Važno je razlikovati atipične limfocite, povezane s reaktivnim stanjima na infekcije ili lijekove, od blasta povezanih s akutnom limfoblastičnom leukemijom (52). U tome može pomoći analiza razmaza periferne krvi. Atipični su limfociti obično morfološki heterogeni, dok su blasti međusobno slični (62). Sedimentacija eritrocita ubrzana je u većini slučajeva IM-a što ju razlikuje od streptokoknog faringitisa (52). Također je moguć nalaz neutropenije i blage prolazne trombocitopenije (14). Frakcija  $\gamma$ -globulina može biti povišena u elektroforezi serumskih bjelančevina. Testovi jetrene funkcije poremećeni su u više od 80 % slučajeva uz blago povišenje aminotransferaza i alkalne fosfataze. Laktat-dehidrogenaza (LDH) povišena je u 90% slučajeva, a bilirubin znatno rjeđe (52).

Uz ove nespecifične nalaze dijagnozu treba potvrditi serološkim ili molekularnim pretragama. Serološke pretrage dijele se na one kojima se dokazuju specifična protutijela usmjerena na EBV i one kojima se dokazuju heterofilna protutijela (14,62). Potonji test temelji se na aglutinaciji ovčjih (Paul-Bunnellov test) ili konjskih (Monospot test) eritrocita heterofilnim protutijelima iz seruma zaražene osobe (62). U ranoj fazi IM-a test može biti negativan uz porast pozitivnosti tijekom prvih šest tjedana bolesti. Također, test može biti negativan u djece mlađe od četiri godine. Lažno pozitivni rezultati rijetki su, ali mogući kod osoba s malignim bolestima, drugim infekcijama i autoimunim bolestima (54). Također je moguć razvoj tzv. heterofilno negativnog IM-a (62).

Test za dokaz specifičnih protutijela na EBV koristan je za slučajeve u kojima postoji sumnja na IM, a nalaz heterofilnih protutijela je negativan, ili u slučaju produljene bolesti. Za dokazivanje se najčešće koriste imunoenzimski testovi (ELISA) (52). Najvažnija su specifična protutijela za dokaz infekcije anti-VCA IgM i IgG, anti-EBNA IgG i anti-EA IgG (14). Serološki testovi trebaju biti pažljivo interpretirani u imunokompromitiranih pacijenata, kao i nakon transplantacije solidnih organa i matičnih stanica. Tipični nalazi protutijela za ranu i

kasnu primarnu, prošlu infekciju i reaktivaciju prikazani su u *Tablici 1*.

Anti-VCA IgM protutijela pojavljuju se rano tijekom infekcije i nestaju nakon nekoliko tjedana, titar anti-VCA IgG protutijela raste 7 – 14 dana kasnije, a anti-EBNA protutijela mjerljiva su tek nakon 8 do 12 tjedana. Budući da anti-EA IgG protutijela ne stvaraju svi zaraženi EBV-om, njihova je uporaba u dijagnosticiranju primarne infekcije ograničena (14,52,54,62). Testovi avidnosti IgG protutijela mogu pomoći u razlikovanju akutne od kronične infekcije (54).

Molekularna dijagnostika podrazumijeva metodu kvantitativne lančane reakcije polimerazom (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) kojom se mjeri broj kopija DNA EBV-a u limfocitima periferne krvi, punoj krvi, plazmi ili drugom uzorku (52). Osobitu važnost ima u stanjima imunokompromitiranosti, nakon transplantacije solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica (54). Problem je ove metode razlika graničnih vrijednosti među laboratorijima što onemogućuje donošenje jasnih smjernica i usporedbu vrijednosti mjerenih u različitim laboratorijima (59).

*Tablica 1.* Nalazi specifičnih protutijela u različitim fazama infekcije EBV-om. Pozitivni nalazi označeni su znakom +, negativni znakom -, vremenski varijabilni oznakom -/+, a oznakom + (-) nalazi ovisni o individualnom odgovoru. *Izrađeno prema: Vince (2019), Balfour, i sur. (2015), Naughton, i sur. (2021) (52,54,62)*

	<b>anti-VCA IGM</b>	<b>anti-VCA IgG</b>	<b>anti- EBNA IgG</b>	<b>anti-EA IgG</b>
<b>Stanje prije infekcije, negativan na EBV</b>	-	-	-	-
<b>Rana primoinfekcija (0 – 3 tjedna)</b>	+	-/+	-	+ (-)
<b>Kasna primoinfekcija (&gt; 8 tjedana)</b>	-	+	-/+	+ (-)
<b>Prošla infekcija (&gt; 6 mjeseci)</b>	-	+	+	-
<b>Reaktivacija</b>	+	+	+	+

## 2.8 Liječenje i prevencija

Trenutno nema učinkovitih antivirusnih lijekova koji bi bili učinkoviti protiv EBV-a. Premda se pri primjeni analoga nukleozida aciklovira smanjuje količina virusa izlučenih iz orofarinksa, učinak na B-limfocite nije prisutan (14). Ganciklovir, inhibitor virusne DNA polimeraze, pokazao se učinkovitijim, ali i toksičnijim od aciklovira, a postoji i oralna varijanta istog lijeka, valganciklovir. Istraživanja pokazuju profilaktičku učinkovitost ovih

lijekova u smanjenju incidencije PTLD-a nakon transplantacije presadaka pozitivnih na EBV (13,63). Kombinacije ganciklovira i inhibitora histonske deacetilaze ili inhibitora proteasoma istražuju se u liječenju tumora pozitivnih na EBV (13,64). Omaciklovir i valomaciklovir pokazali su učinkovitost u smanjenju razine EBV-a u ustima, ali izmjereno skraćeno razdoblje oporavka od IM-a nije bilo statistički značajno (19). Maribavir, inhibitor replikacije DNA i virusne transkripcije, i cidofovir, antivirusni lijek s antiproliferativnim učinkom, također su istraživani. Svi navedeni lijekovi imaju određenu učinkovitost u sprečavanju litičke faze virusa, ali nemaju nikakav učinak na latentnu infekciju (63). Istraživani su i lijekovi drugih skupina koji se već koriste za liječenje drugih bolesti, poput H<sub>2</sub>-antagonista cimetidina, antiretrovirusnih lijekova, antiepileptika valpromida i antimalarika atrezunata (19). Primjena T-limfocita specifičnih za EBV pokazala se učinkovitom u liječenju i profilaksi PTLD-a (13). Vitamin C pokazao je učinkovitost *in vitro*, a obrnuta povezanost razine vitamina D i EBV viremije zabilježena je u relapsno-remitirajućem obliku MS-a. Retinoična kiselina ima antiproliferativan učinak na EBV-om zaražene B-limfocite u istraživanjima *in vitro*. Neki dodaci prehrani i tvari prisutne u hrani pokazali su inhibitorne učinke na reaktivaciju EBV-a u *in vitro* istraživanjima (19). U slučaju primjene antibiotika (amoksicilin, ampicilin, klindamicin) kod pacijenata sa sumnjom na streptokoknu anginu koji zapravo boluju od IM-a, može se javiti generalizirani makulopapularni, rjeđe urtikarijski ili skarlatiniformni osip (52). Bolesti povezane s EBV-om liječe se odgovarajućim terapijskim protokolima preporučenima za svaku pojedinu bolest. U potpoglavlju 4.5. detaljnije je opisano liječenje EBV-om induciranog HLH-a i NK/T-staničnih limfoproliferativnih bolesti uzrokovanih EBV-om. Trenutno ne postoji odobreno učinkovito cjepivo protiv EBV-a, a razvoj cjepiva izazovan je zbog važnosti imunskog odgovora u patogenezi bolesti povezanih s EBV-om. Živo atenuirano cjepivo moglo bi uzrokovati bolesti, osobito one povezane s imunološkim odgovorom na EBV (poput MS-a) i stoga nije dobar kandidat (11). Vektorska cjepiva s latentnim antigenima EBV-a, čestice nalik virusu te proteinska cjepiva sastavljena od pojedinačnih glikoproteina (npr. gp350) ili kompleksa glikoproteina gH/gL/gp42/gp350 (koji bi imao mogućnost ulaska u B-limfocite i epitelne stanice) potencijalni su kandidati za razvoj značajnog humoralnog odgovora i blokiranje infekcije (11,13). Pronalazak cjepiva koje bi u potpunosti zaustavilo infekciju konačno bi otkrilo stvarnu važnost EBV-a u razvoju novotvorina i kroničnih bolesti (11).

### 3. Hemofagocitni sindrom

#### 3.1. Uvod i podjela

Hemofagocitni sindrom (HS) ili hemofagocitna limfocitocitoza (HLH) životno je ugrožavajući poremećaj aktivacije imunološkog sustava u kojem dolazi do infiltracije koštane srži, limfnih čvorova, slezene, jetre, kože i SŽS-a aktiviranim makrofagima i limfocitima. Kako sam naziv govori, riječ je o sindromu, dakle skupu simptoma koji se javljaju u sklopu različitih nasljednih i stečenih bolesti, a ne o pojedinačnoj bolesti (65). Makrofagi i limfociti, potaknuti prekomjernom razinom proupalnih citokina u krvi, fagocitiraju stanice različitih krvnih loza dovodeći do vrućice, citopenije, limfadenopatije, splenomegalije, koagulopatije, jetrene disfunkcije i različitih simptoma vezanih uz zahvaćenost SŽS-a (8,61). Jedna je od glavnih značajki HLH-a niska razina NK stanica i CD8<sup>+</sup> T-limfocita (66). Sindrom su prvi opisali pedijatri A. H. Robb-Smith i R. B. Scott 1939. i nazvali ga histiocitna medularna retikuloza, a naziv hemofagocitna limfocitocitoza predložen je 1991. godine (67). Osnovna je podjela hemofagocitnog sindroma na primarni i sekundarni. Primarni HLH (pHLH) obično se javlja u djetinjstvu što je u skladu s genetskom podlogom ovog oblika HLH-a. Najčešće mutacije koje uzrokuju primarni HLH zahvaćaju gene ključne za citotoksičnu aktivnost NK stanica i T-limfocita (1). Ti geni kodiraju proteine bitne za dopremu citotoksičnih granula iz NK stanica i CD8<sup>+</sup> limfocita u ciljane stanice te se ovakav primarni HLH naziva obiteljskim (familijarnim) HLH (fHLH) i dijeli na podtipove. Osim toga, sindromi imunodeficijencije povezani s albinizmom, poput Chédiak-Higashijeva sindroma (CHS), tipa 2 Griscellijeva sindroma (GS-2) i tipa 2 Hermansky-Pudlakova sindroma (HPS-2), također mogu biti podloga za razvoj kliničke slike pHLH-a. U pHLH također se ubrajaju tip 1 i 2 XLP-a (XLP1 i XLP2) te HLH vezan uz mutaciju kinaze T-limfocita potaknute IL-2 (engl. *interleukin-2-inducible T-cell kinase*, ITK). (3,65). Sekundarni HLH (sHLH) naziva se još i stečenim HLH-om te se najčešće javlja u kasnijoj životnoj dobi, odnosno u odraslih osoba. Infekcije različitim uzročnicima (virusima, bakterijama, gljivama i parazitima) najčešći su uzrok sHLH-a. Ostali uzroci sHLH-a obuhvaćaju različite autoimune i autoinflamatorne bolesti (u sklopu kojih se ovaj sindrom katkad naziva sindromom aktivacije makrofaga, MAS, prema engl. *macrophage activation syndrome*), maligne bolesti, metaboličke poremećaje te stanja imunosupresije nakon transplantacije solidnih organa, transplantacije krvotvornih matičnih stanica i u sklopu sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) (65,66). Recentna literatura u sHLH uvrštava i sindrom otpuštanja citokina nakon primjene terapije T-limfocitima s

kimeričnim antigenskim receptorima (engl. *chimeric antigen receptor T-cell*, CAR-T) i terapije bispecifičnim protutijelima koja aktiviraju T-limfocite (engl. *bispecific T-cell engager*, BiTE) (68). Stečeni oblik HLH-a ne isključuje postojanje genetske podloge. Naime, infekcija može biti okidač pojave HLH-a u genetski predisponiranih pojedinaca (9,65). Premda postoje dijagnostičke smjernice, odnosno kriteriji za dijagnozu HLH-a (HLH-2004), dijagnosticiranje ovog sindroma često je otežano postojanjem širokog spektra kliničkih slika osnovnih bolesti u okviru kojih se javlja. Zbog preklapanja sa simptomima drugih, također životno ugrožavajućih sindroma i bolesti (poput metaboličkih i malignih bolesti ili zatajenja jetre), diferencijalnodijagnostički teško je razlučiti ispunjava li stanje propisane kriterije za HLH. U slučaju neprepoznavanja i neliječenja ovo je stanje potencijalno smrtonosno, a stopa smrtnosti ovisi o tipu HLH-a (65). Smrtnost HLH-a varira i prosječno iznosi oko 40 %, uz značajne razlike ovisne o uzroku HLH-a. Smrtnost HLH-a povezanog s reumatskim bolestima iznosi 2 – 19.5 %, a HLH povezan s nekim vrstama limfoma rezultira smrtnim ishodom u čak 72 % slučajeva (69).

### **3.2. Epidemiologija**

Pojavnost pHLH-a i sHLH-a razlikuje se ovisno o dobi pacijenata, podrijetlu, rasi i državi stanovanja (3,70). Premda je pHLH češći u dječjoj dobi, nastup bolesti u odrasloj dobi ne isključuje mogućnost pHLH-a (3). fHLH se obično javlja u mlađe dojenčadi, oko 10 % u novorođenačkoj dobi (65), a u slučaju hipomorfni mutacija s HLH-om povezanih gena moguća je pojava u starijih osoba, te se oko 20 % slučajeva fHLH-a javlja nakon navršene druge godine. Istraživanje provedeno u Švedskoj od 1971. do 1986. pokazalo je incidenciju fHLH-a od 1 na 1 000 000 djece godišnje, s podjednakom spolnom raspodjelom slučajeva (71), a presječno istraživanje iz 2010. iz Texasa pokazalo je prevalenciju od 1 na 100 000 osoba mlađih od 18 godina (70). Istraživanje iz Japana provedeno 2007. godine pokazalo je godišnju incidenciju od jednog slučaja HLH-a (neovisno o tipu) na 800 000 ljudi (72). Oko 90% slučajeva fHLH-a vezano je uz mutacije četiriju gena (geni za perforin, MUNC13-4, sintaksin-11 i MUNC18-2). pHLH se javlja kasnije u sklopu sindroma imunodeficijencije u odnosu na dob pojave fHLH-a. sHLH je vjerojatno učestaliji od pHLH-a, ali zbog preklapanja s drugim sindromima često nije dijagnosticiran (66). Istraživanja pokazuju da je incidencija sHLH-a vezanog uz maligne bolesti 0.36 slučajeva na 100000 odraslih osoba godišnje (73). HLH vezan uz maligne bolesti javlja se najčešće u sklopu hematoloških malignih bolesti te je maligna bolest češći uzrok sHLH u odraslih (48%) nego u djece (8%) (74). Od hematoloških bolesti vezanih uz sHLH najčešći su T-stanični i NK-stanični limfomi, a nešto rjeđe

B-stanični limfomi (67). Najčešće je sHLH u dječjoj dobi povezan s infekcijom, a najčešći je infektivni okidač ovog sindroma EBV. Drugi infektivni okidači mogu biti različiti virusi (CMV, HHV8, HIV, influenza, SARS-CoV-2, enterovirusi), bakterije (mikoplazme, mikobakterije), paraziti (*Plasmodium*, *Leishmania*) i gljive (*Candida*, *Cryptococcus*) (3,66). Zbog endemske geografske prisutnosti pojedinih uzročnika, epidemiološka anamneza putovanja u zemlje u kojima je prisutan pojedini uzročnik može pomoći u dijagnozi sHLH-a (67). EBV-om induciran HLH češći je u azijskoj populaciji što se povezuje s mogućom genetskom sklonosti razvoju sHLH-a (72,75). Budući da akutna prezentacija pHLH-a može biti potaknuta infekcijom, potvrda zaraze mikroorganizmom vezanim uz HLH ne znači nužno da je riječ o sHLH-u. (66). sHLH u sklopu kroničnih infekcija najčešće je vezan uz zarazu HIV-om, a može biti potaknut oportunističkim ili neoportunističkim infekcijama, vezan uz novotvorine i liječenje antiretrovirusnom terapijom, ali i izravno potaknut primarnom akutnom infekcijom virusom (67). MAS se najčešće javlja u sklopu sistemskog oblika juvenilnog idiopatskog artritisa (u oko 10% oboljelih) i Stillove bolesti odrasle dobi (65), a rijetko u sklopu SLE-a, Kawasakijske bolesti i drugih autoimunih i autoinflamatornih bolesti (66). Posttransplantacijski HLH javlja se nakon presađivanja solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica (67), a povećana je učestalost zabilježena u slučaju presađivanja matičnih stanica krvi iz pupkovine (76).

### **3.3. Etiopatogeneza**

Glavni je mehanizam razvoja pHLH-a i jedan od mogućih čimbenika koji doprinose razvoju sHLH-a izmijenjena funkcija NK stanica i citotoksičnih T-limfocita i poremećena regulacija odgovora tih skupina stanica na poticaj stanicama koje predočuju antigen (APC, prema engl. *antigen presenting cell*) (77). U imunokompetentnih pojedinaca imunski odgovor ograničavaju NK stanice i citotoksični T-limfociti koji ubijaju inficirane stanice i APC-e (65). Uklanjanje APC-a važno je u uspostavljanju negativne povratne sprege kojom se ograničava T-limfocitni odgovor (66). Kada se NK stanice i citotoksični T-limfociti aktiviraju, dolazi do izlučivanja bjelančevina koje uzrokuju staničnu smrt. Na mjestu kontakta izvršne i ciljane stanice stvara se tzv. imunološka sinapsa u koju se izlučuju molekule koje uzrokuju ubijanje stanice (47,65,77). Aktivirani limfociti prolaze proces reorganizacije citoskeleta tako da se središte organizacije mikrotubula pomiče prema mjestu imunološke sinapse. U sinapsu se procesom egzocitoze ispuštaju bjelančevine pohranjene u citoplazmatskim granulama (sekrecijskim lizosomima) koje se do membrane limfocita dopremaju mikrotubulima. Te molekule ne mogu difundirati izvan sinapse prema drugim stanicama zbog čega susjedne

stanice ostaju neoštećene (47). Glavne su dvije vrste bjelančevina pohranjenih u granulama perforin i granzimi (65). Nakon otpuštanja iz granula perforin stvara oligomere na membrani ciljne stanice i stvara pore koje omogućuju prolaz ostalom sadržaju granula u citosol (68). Budući da pore nisu nužno dostatne veličine za prolazak granzima, drugi mehanizam kojim perforin omogućuje ulazak sadržaja granula u stanicu je aktivacija procesa popravka membrane ciljne stanice. Taj proces potiče internalizaciju perforina i granzima u endosome, a perforin zatim djeluje na membranu endosoma iz kojih se u citosol oslobađaju granzimi (47). Perforin također ima ulogu u ograničavanju imunskog odgovora nakon uklanjanja antigena koji je potaknuo odgovor (65). Serinske proteaze nazvane granzimi, a osobito granzim B, potiču apoptozu ciljnih stanica aktivacijom enzimske kaskade ovisne o kaspazama. Na taj način dolazi i do uništenja imunološke sinapse što dodatno doprinosi ograničenju imunskog odgovora (47,74,77). Imunološke sinapse imaju ulogu u otpuštanju upalnih citokina i kemokina što potiče daljnji imunski odgovor (77). Nakon uklanjanja APC-a, aktivirani citotoksični T-limfociti ubijaju sami sebe procesom posredovanim perforinom čime se regulira i stišava imunski odgovor (78). U slučaju poremećenih mehanizama citotoksičnosti, odnosno produljenog vremena djelovanja imunološke sinapse, dolazi do kontinuiranog nakupljanja APC-a i posljedične stimulacije i aktivacije citotoksičnih T-limfocita (66,68). Na taj način formiran je začarani krug izlučivanja citokina i proliferacije limfocita i makrofaga, koji također izlučuju proupalne citokine (68). Posebno važnu ulogu ima IFN- $\gamma$  koji dovodi do aktivacije makrofaga (66). Aktivirani limfociti i makrofagi infiltriraju tkiva gdje fagocitiraju krvne stanice i izlučuju velike količine citokina i kemokina koji dovode do karakteristične kliničke slike HLH-a (65,66).

IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  potiču povišenje tjelesne temperature, a citopenija je uzrokovana supresivnim djelovanjem TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i teške podjedinice feritina, kao i samom hemofagocitozom. IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  također inhibiraju lipoprotein-lipazu i stimuliraju sintezu triglicerida što dovodi do hipertrigliceridemije (65). Feritin i aktivator plazminogena, otpušteni iz aktiviranih makrofaga, dovode do pojačane fibrinolize i posljedične hipofibrinogenemije (66,77). Povišena razina sCD25 (topivih receptora za IL-2, sIL2R) odraz je povećanog broja aktiviranih limfocita koji ga otpuštaju (65).

fHLH uzrokovan je mutacijama proteina važnih za normalnu funkciju citotoksičnih granula što dovodi do neučinkovitog ubijanja oštećenih stanica i APC-a (8). Tip 1 fHLH-a uzrokovan je nepoznatom mutacijom gena smještenog na dugom kraku kromosoma 9 (9q21.3-22) (77). Tip 2 uzrokovan je mutacijom gena za perforin (*PRF1*) što onemogućuje dopremu citotoksičnih granula u ciljnu stanicu i posljedično slabljenje imunskog odgovora (68,77).

Tip 3 uzrokovan je mutacijom gena koji kodira protein Munc13-4, važan u pripremi kompleksa za egzocitozu (engl. *priming*) i oblikovanju citotoksičnih granula. Mutacije u genu za sintaksin-11, važnom za fuziju granula s membranom i njihovu egzocitozu, uzrokuju tip 4, a mutacije u genu za protein koji veže sintaksin (Munc18-2) dovode, posljedičnom poremećenom funkcijom kompleksa sintaksin11/Munc18-2, također do poremećenog procesa egzocitoze (65). Dakle, tipovi 3, 4 i 5 uzrokuju poremećaj dopreme perforina do ciljne stanice (78). U sklopu sindroma imunodeficijencije povezanih s albinizmom (CHS, GS-2, HPS-2) također su mutirani geni važni u formiranju i transportu vezikula, pakiranju proteina i egzocitozi (8). Budući da isti proteini sudjeluju u prometu granula s pigmentom u melanocitima i granula u trombocitima, u sklopu ovih sindroma javlja se poremećaj pigmentacije (albinizam) i sklonost krvarenju (68). CHS je uzrokovan mutacijom gena *LYST* (prema engl. *lysosomal trafficking regulator*), GS-2 mutacijom gena *RAB27A* (prema engl. *Ras-related protein Rab-27A*), a HPS-2 mutacijom gena *AP3B1* (prema engl. *adaptor-related protein complex 3 subunit beta 1*) (12).

U sklopu XLP1, bolesti uzrokovane mutacijom u genu *SH2D1A* koji kodira SAP, javljaju se HLH potaknut EBV-om, limfomi, hipogamaglobulinemija, aplastična anemija i vaskulitisi. Mogući mehanizmi pojave HLH-a u sklopu XLP1 uključuju oštećenu citotoksičnost ovisnu o aktivacijskom receptoru 2B4, nedostatak iNKT stanica i poremećen proces stanične smrti potaknute ponovnom stimulacijom T-limfocita što je važan mehanizam smanjenja populacije T-limfocita nakon završetka stimulacije antigenom (8,68). XLP2, uzrokovan mutacijom gena za X-vezani protein inhibitor apoptoze (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP*), dovodi do poremećene regulacije proteina NLRP3 u inflamasiomima i poremećene regulacije kaspaza. To dovodi do prekomjernog stvaranja proupalnih citokina IL-1 $\beta$  i IL-18 i do povećane sklonosti stanica apoptozi, odnosno posljedično do smanjene funkcije izvršnih stanica (68). HLH u sklopu sindroma XLP2 često je potaknut infekcijom EBV-om. Zbog poremećene regulacije inflamasioma u ovih pacijenata moguć je razvoj upalne bolesti crijeva, hipogamaglobulinemije, ponavljajućih infekcija i upala poput uveitisa, intersticijske bolesti pluća i periodičnih vrućica (8,68). Slična klinička slika prisutna je u slučaju mutacije gena za protein iz obitelji NLR-a, *NLRC4* (prema engl. *nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and caspase recruiting domain (CARD domain) containing 4*) što također dovodi do konstitutivne aktivnosti inflamasioma i posljedične povećane koncentracije IL-18, važnog u patogenezi bolesti (68). Osim navedenih, još neke primarne imunodeficijencije dovode do povećane sklonosti razvoju HLH-a inducirano EBV-om, a detaljnije su opisane u potpoglavlju 4.3.2. (8,65,68). HLH se može pojaviti u sklopu drugih imunodeficijencija poput



DiGeorgeova sindroma, teške kombinirane imunodeficijencije (SCID, prema engl. *severe combined immunodeficiency*), kronične granulomatozne bolesti, ataksija-teleangiektazije, Wiskott-Aldricheva sindroma, kao i u sklopu metaboličkih poremećaja poput galaktozemije, višestrukog nedostatka sulfataza, Gaucherove bolesti i drugih bolesti nakupljanja (68). Patogeneza sHLH-a manje je poznata te degranulacija i citotoksična funkcija limfocita uglavnom nije narušena (66,79). Patogeneza sHLH-a vjerojatno je multifaktorska te je moguće da kombinacija polimorfizama gena važnih za imunosni odgovor, neravnoteže između zaraženih stanica i izvršnih stanica imunosnog sustava, prolazne imunosupresije i drugih faktora dovodi do razvoja HLH-a (65). Pacijenti s MAS-om često imaju mutaciju jednog alela gena čija bialelna mutacija dovodi do pHLH-a (8). Istraživanja pokazuju da pojava HLH-a vjerojatno nije povezana s povećanom viremijom, već s pojačanim procesom predočivanja antigena u slučaju nedostatnosti perforina. To pokazuje važnost citotoksične funkcije limfocita u regulaciji predočivanja antigena i govori u prilog hipotezi da je HLH uzrokovan poremećajem regulacije upale, a ne prekomjernim proupalnim poticajem nastalim djelovanjem mikroorganizma (67). Druga istraživanja govore o razvoju HLH-a kao posljedici pojačane stimulacije TLR-a. Ponavljana stimulacija TLR-9 moguć je mehanizam razvoja HLH-a induciranog EBV-om i MAS-a u sklopu reumatskih bolesti (80). Dakle, uzrok sHLH-a, za razliku od pHLH-a, nije nužno poremećaj citotoksične funkcije limfocita, već proupalno stanje slično onome u sepsi i reumatološkim bolestima (81). Do stanja sličnog HLH-u može dovesti i izloženost nekim lijekovima u sklopu koje se javlja reakcija na lijek s eozinofilijom i sustavnim simptomima (DRESS, prema engl. *drug reaction with eosinophilia and systemic response*) (8). Premda različitog mehanizma nastanka, oba osnovna oblika HLH-a u konačnici dovode nekontrolirane proizvodnje proupalnih citokina i njima potaknute hemofagocitoze. IFN- $\gamma$  najvažniji je proupalni medijator koji dovodi do hemofagocitoze i kliničke slike pHLH-a i sHLH-a (82). Citokinska oluja uzrokuje oštećenje endotela krvnih žila, supresiju koštane srži, sklonost infekcijama i krvarenju, a kasnije i višeorgansko zatajenje (MOF, prema engl. *multiple organ failure*) (78).

### **3.4. Klinička slika**

Premda je klinička slika HLH-a u kasnijim stadijima kada se razviju svi simptomi prepoznatljiva, u ranim je fazama ovog sindroma klinička slika nespecifična (66). Glavni su znakovi HLH-a vrućica produljena trajanja ( $> 38.5$  °C), hepatosplenomegalija i citopenija, a uz njih se mogu pojaviti znakovi hepatitisa, neurološki simptomi, promjene na koži (osip, petehije, purpura, edemi), koagulopatija, limfadenopatija i poremećaji plućne funkcije

(68,77,83). Pojava ranih simptoma obično ima akutni ili subakutni tijek u vremenu od jednog do četiri tjedna (67). Zbog nespecifičnosti ranih simptoma klinička slika može sličiti kliničkoj slici sepse, infekcija, autoimunih i autoinflamatornih bolesti, malignih novotvorina ili vrućice nepoznata podrijetla (8,66). Hepatosplenomegalija je nešto češća u pHLH-u nego u sHLH-u (83), a hepatomegalija češća je u dječjoj nego u odrasloj populaciji oboljelih od HLH-a (74,84). Zahvaćenost jetre može se klinički očitovati znakovima hepatitisa i disfunkcije jetre poput hepatomegalije, ascitesa, žutice, poremećaja krvarenja i encefalopatije (67). Zatajenje jetre u sklopu HLH-a može biti glavna značajka kliničke slike i u tom slučaju HLH može nalikovati na metaboličke poremećaje (8). U 30 do 73% slučajeva HLH-a može se javiti širok spektar neuroloških simptoma i znakova: konvulzije, znakovi meningizma, poremećaji mišićnog tonusa (hipertonija i hipotonija), ataksija, žarišni ispadi, iritabilnost i različiti poremećaji svijesti uključujući komu. Opisani su i psihički simptomi poput promjena raspoloženja i psihoze (66,68,83). Simptomi zahvaćenosti SŽS-a uz prisutnost vrućice mogu usmjeriti dijagnostiku prema herpes-simpleks virusom uzrokovanom encefalitisu (8). Citopenija obično uključuje barem dvije loze krvnih stanica, a pancitopenija uz vrućicu može prvotno upućivati na kliničku sliku leukemije, odnosno na kliničku sliku SCID-a ako je prisutan osip i laboratorijski znakovi jetrenog oštećenja (8). Trombocitopenija, koja se javlja najčešće, očituje se poremećajima krvarenja uz prisutne znakove na koži (petehije); pad u crvenoj krvnoj lozi očituje se simptomima i znakovima anemije, a leukopenija (neutropenija) očituje se sklonosti oportunističkim infekcijama (1,78,83). U težim slučajevima može se javiti diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) (66,68,78). Zahvaćenost kože, prisutna u četvrtini odraslih slučajeva, može biti u obliku eritematoznog osipa, edema, petehija i purpura, a mogu se pojaviti potkožni čvorići nalik panikulitisu u sklopu T-staničnog limfoma (67). U slučajevima kada prevladavaju simptomi osipa i vrućice, klinička slika može sličiti autoinflamatornim poremećajima, juvenilnom idiopatskom artritisu ili infekciji rikecijama (8). Simptomi zahvaćenosti pluća česti su u oboljelih odraslih osoba (42 %) i uključuju kašalj, dispneju i zatajenje disanja, osobito ako je HLH potaknut infekcijom respiratornim virusom (67,84), a mogući su znakovi granulomatozne bolesti pluća.

Tijekom razvoja HLH-a dolazi do MOF-a uzrokovanog bilo okidačem i stanjem koje je dovelo do HLH-a (infekcijom, upalnom bolesti, malignom novotvorinom), bilo samim HLH-om kada zbog krvarenja i DIK-a može doći do zahvaćanja brojnih organa (8,67,78). Rjeđe su prisutni gastrointestinalni simptomi (proljevi, mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu) i simptomi zahvaćanja bubrega (bubrežno zatajenje, nefrotski sindrom) (67). Zbog razvoja DIK-a i MOF-a dolazi do visoke smrtnosti u ranim tjednima u slučaju neliječenja, a u

kasnijim fazama uzrok su smrti infekcije neutropeničnih pacijenata (67).

U slučaju pHLH-a koji se javlja u sklopu nasljednih sindroma, dio kliničke slike bit će tipičan za pojedini sindrom. Albinizam, sklonost krvarenju i piogene infekcije tipične su za CHS (68). U MAS-u su prisutni simptomi osnovne autoimune ili autoinflamatorne bolesti, u slučaju malignih novotvorina simptomi karakteristični za pojedinu bolest (npr. limfadenopatija ili potkožni čvorići u limfomu), a klinička slika može sličiti i aplastičnoj anemiji, granulomatoznoj bolesti pluća ili jetre i sterilnom encefalitisu (66,67). Zbog značajnog preklapanja kliničkih slika HLH je ponekad teško razlikovati od sepse, sindroma sustavnog upalnog odgovora (SIRS, prema engl. *systemic inflammatory response syndrome*), Kawasakijske sindroma, uznapredovalih stadija proširene maligne bolesti, relapsa autoimunih bolesti i DRESS-a (8,65,67,85). Opisani su također slučajevi izolirane pojave simptoma zahvaćanja SŽS-a i izolirani simptomi zatajenja jetre koji mogu navesti na krivu dijagnozu poput neonatalne hemokromatoze (65). Zabilježeni su i slučajevi djelomične spontane remisije (9).

### 3.5. Dijagnostika

Pravovremena dijagnoza HLH-a ključna je za početak liječenja, nužnog za sprečavanje teških i smrtnih ishoda (66). Istraživačka grupa za HLH u sklopu Međunarodne grupe za bolesti histiocita objavila je 1991. prve dijagnostičke smjernice za HLH, a 1994. donesen je prvi protokol za liječenje: HLH-94. Revidirani kriteriji objavljeni su 2004. godine (65). Za razliku od HLH-94, u smjernicama HLH-2004 dodana su tri kriterija uz prethodno postojećih pet. Dijagnoza HLH-a može se postaviti bilo pozitivnim molekularnim nalazom vezanim uz primarni oblik HLH-a, bilo ispunjavanjem pet od osam propisanih kliničko-laboratorijskih kriterija (9). Dijagnostikom temeljenom na ovih osam kriterija nije moguće razlikovati pHLH od sHLH-a (66). Također, dio pacijenata s HLH-om ne zadovoljava pet od ovih osam kriterija na početku tijeka bolesti te strogo poštivanje ovih kriterija može dovesti do neispravnog isključenja dijagnoze HLH-a (8).

Kriteriji obuhvaćeni smjernicama HLH-2004 sljedeći su: I. vrućica; II. splenomegalija; III. citopenija u najmanje dvije od tri krvne loze u perifernoj krvi (1. hemoglobin < 90 g/L, odnosno 100 g/L u novorođenčadi; 2. trombociti <  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; 3. neutrofili <  $1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ); IV. hipertrigliceridemija (trigliceridi natašte  $\geq 3$  mmol/L, odnosno  $\geq 265$  mg/dL) i/ili hipofibrinogenemija ( $\leq 1.5$  g/L); V. hemofagocitoza u koštanoj srži, slezeni ili limfnim čvorovima uz isključen malignitet; VI. niska ili odsutna aktivnost NK stanica; VII. feritin  $\geq 500$   $\mu\text{g/L}$ ; VIII. sCD25  $\geq 2400$  U/mL (9). Prva tri kriterija najčešće su zadovoljena, međutim

prisutnost ostalih kriterija varijabilna je. Većina preglednih radova vrućicu u sklopu HLH-a definira kao temperaturu višu od 38.5 °C tijekom sedam ili više dana, a splenomegaliju kao povećanje od više od 3 cm ispod rebrenog luka (74). Trombocitopenija i anemija prisutne su u oko 80 %, a leukopenija u 69 % slučajeva HLH-a odrasle dobi. Teška trombocitopenija (trombociti  $< 10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) javlja se u oko 6 %, a teška anemija (hemoglobin  $< 70 \text{ g/L}$ ) i teška neutropenija (neutrofili  $< 0.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) u oko 20 % odraslih slučajeva (67). Osim hipofibrinogenemije, u istraživanjima odraslih slučajeva HLH-a dokazane su povišene razine D-dimera u oko 50 % slučajeva i znakovi DIK-a u oko 40 % slučajeva. Hipertrigliceridemija je prisutna u 69 % odraslih slučajeva. Hipertrigliceridemija i hipofibrinogenemija mogu se javiti u sklopu diseminiranih karcinoma, sepse, SIRS-a i sindroma višestruke organske disfunkcije (67).

Prevalencija hemofagocitoze u uzorcima koštane srži iznosi od 25 do 100 %, ovisno o istraživanju (86). Hemofagocitozu je moguće ponekad dokazati u uzorcima jetre, slezene, limfnih čvorova i cerebrospinalnoj tekućini (74). Koštana srž tkivo je kojemu treba dati prednost u analizi hemofagocitoze zbog relativno sigurnog postupka uzimanja uzorka i brzog dobivanja nalaza, za razliku od drugih organa i tkiva (jetra, limfni čvorovi, slezena) gdje je rizik krvarenja i infekcije pri uzimanju uzorka veći (67,86). Traganje za hemofagocitozom u aspiratu koštane srži ima veću osjetljivost od analize bioptata koštane srži (67).

Hemofagocitoza može biti odsutna u ranim stadijima bolesti, zbog čega su potrebne analize ponovljenih aspirata koštane srži (1,8,77,86). Zbog toga je predložen novi naziv sindroma, *hiperinflamatorna limfohistiocitoza*. Hemofagocitoza može biti prisutna i u drugim stanjima poput stanja nakon transfuzije, autoimunih bolesti, infekcija, zatajenja koštane srži (67,77), u sepsi i nakon opsežnih kirurških zahvata (81). Udio stanica u kojima se odvija proces hemofagocitoze potreban da bi se dijagnosticirao HLH nije precizno određen. Premda većina istraživanja zahtijeva prisutnost hemofagocitoze u 2-3 % makrofaga, druga istraživanja predlažu prisutnost hemofagocitoze u barem dvjema stanicama na trima razmazima (86), dok neka istraživanja pokazuju da čak i u slučaju jedne hemofagocitne stanice treba razmotriti dijagnozu HLH-a (5,67). Neka istraživanja ukazuju na umjerenu do izrazitu hemofagocitozu uz nalaz pancitopenije u HLH-u, u odnosu na blagu hemofagocitozu u slučajevima koji ne odgovaraju HLH-u (5). Moguće je da postoji razlika u hemofagocitozi prisutnoj u koštanoj srži oboljelih od pHLH-a i oboljelih od sHLH-a, kao i razlika ovisna o dobi pacijenta, uz povećanu razinu hemofagocitoze u starijih pacijenata u odnosu na mlađe pacijente oboljele od fHLH-a (86). Iz svega prethodno navedenog proizlazi da hemofagocitoza nije dovoljno specifičan i osjetljiv pokazatelj HLH-a (86,87) te ne smije biti smatrana nužnim i

patognomoničnim nalazom HLH-a jer takav pristup može dovesti do odgođene dijagnoze i lošijeg ishoda zbog zakašnjelog liječenja (67,78,84). Bez obzira na to, analiza uzoraka koštane srži važna je u potvrdi ili isključenju maligne bolesti koštane srži koja može biti uzrok hemofagocitoze ili podloga za razvoj HLH-a (67,86).

Niska ili odsutna citotoksičnost NK stanica jedna je od glavnih značajki pHLH-a, ali se može javiti i u sklopu sHLH-a, MAS-a i u bliskih srodnika oboljelih od fHLH-a (65). Testovi degranulacije NK stanica i citotoksičnih T-limfocita temelje se na membranskom izražaju lizosomskog proteinskog markera CD107a. Taj se protein nalazi u citotoksičnim granulama te je nakon degranulacije prisutan na staničnoj membrani NK stanica i citotoksičnih T-limfocita (84,88). Protočnom citometrijom moguće je kvantificirati izražaj CD107a na površini citotoksičnih stanica (65,84). Drugi su testovi kojima se ispituje aktivnost NK stanica test mjerenja proteolitičke aktivnosti granzima B i test otpuštanja kroma 51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) (67).

Istraživanje iz 2012. pokazuje da je izmjerena degranulacija NK stanica u stanju mirovanja manja od 5% pokazatelj poremećaja degranulacije s osjetljivošću od 96 % i specifičnošću od 88 % (67,79). Visok udio poremećaja degranulacije dokazan je istim istraživanjem u pacijenata s tipom 3, 4 i 5 fHLH-a (97 %), nešto niži u pacijenata sa sindromima s pridruženim albinizmom (88 %), a znatno niži u pacijenata s tipom 2 fHLH-a (43 %), XLP-om (12 %) i sHLH-om (22 %) (79). Testovi ispitivanja citotoksičnosti imaju ograničenja koja treba uzeti u obzir pri tumačenju nalaza (66). Iako vrlo niska ili odsutna aktivnost NK stanica može upućivati na genetske oblike HLH-a, različite akutne bolesti i lijekovi mogu uzrokovati privremeno smanjenje ukupnog broja NK stanica što može utjecati na rezultat testova degranulacije (68). U HLH-u odrasle dobi nalaz degranulacijske aktivnosti NK stanica često je normalan zbog čega je od male važnosti u dijagnostici (81,89). U odraslih oboljelih od HLH-a fenotipski profil NK stanica sa smanjenim stvaranjem IFN- $\gamma$  sličan je drugim hiperinflamatornim stanjima poput sepse ili reumatskih bolesti (89). Stoga, normalan nalaz citotoksične aktivnosti NK stanica ne smije biti razlog isključivanja HLH-a kao moguće dijagnoze (84).

Razina feritina lako je mjerljiv i važan pokazatelj HLH-a i aktivnosti makrofaga (65), ali i nespecifičan reaktant akutne faze (81). Prema prema smjernicama HLH-2004 razina feritina od 500  $\mu\text{g/L}$  može upućivati na dijagnozu HLH-a, znatno veća razina od 10000  $\mu\text{g/L}$  pokazatelj je HLH-a s osjetljivošću od 90 % i specifičnošću od 96 % u pedijatrijskoj populaciji (90). Prema istraživanju iz 2017. razina feritina veća od 10000  $\mu\text{g/L}$  visoko je specifična za HLH u pedijatrijskoj populaciji (48.9 %), međutim najčešći je uzrok tako visokih razina feritina u odrasloj dobi maligna hematološka bolest (25.7 %), a HLH je uzrok u

manje od 20 % slučajeva (81,91). Razina feritina također je povećana u stanjima poput srpaste anemije, anemije kronične bolesti, drugih upalnih stanja, zatajenja bubrega i višestrukih transfuzija eritrocita (68,74,81). Premda niske razine feritina gotovo da mogu biti isključni kriterij za dijagnozu HLH-a (visoka negativna prediktivna vrijednost), visok feritin, osobito u odraslih pacijenata, nije dovoljan kriterij za dijagnozu HLH-a te mora biti razmotren u sklopu cjelovite kliničke slike i laboratorijskih nalaza (niska pozitivna prediktivna vrijednost) (84). Povećana razina sCD25, odnosno  $\alpha$ -lanca topivog receptora za IL-2 (sIL2R) pokazatelj je povećanog broja aktiviranih T-limfocita (8,65). Kao ni feritin, sCD25 također nije specifičan biljeg za HLH, već može biti povećan u malignim bolestima, osobito u limfomima (8,68), sepsi, SIRS-u i sindromu višestruke organske disfunkcije (67). Osjetljivost je sCD25 od 88 % do 100 %, ovisno o istraživanju i određenoj graničnoj vrijednosti (68). U smjernicama HLH-2004 navedena je osjetljivost od 93 % i specifičnost od 100 % za pedijatrijsku populaciju (9), a novija istraživanja pokazuju visoku osjetljivost (100 %) i nešto nižu specifičnost (72.5 %) u odrasloj populaciji s HLH-om, uz graničnu vrijednost 2515 U/mL (92). Više vrijednosti zabilježene su kod pacijenata s HLH-om povezanim s malignom bolesti nego kod pacijenata s HLH-om povezanim s infekcijom ili s MAS-om (92). Zbog izrazito povišene razine sCD25 i manje povišene razine feritina u HLH-u povezanom s limfomom u odnosu na HLH koji nije povezan s malignom bolešću, istraživanjima je pokazana važnost visokog omjera sIL2R/feritin kao pokazatelja s limfomom povezanog HLH-a (84,93). Kao i svi ostali pokazatelji HLH-a uvršteni u HLH-2004, sCD25 također nije specifičan, već može biti povišen u stanjima poput sepse, malignih hematoloških bolesti, reumatskih bolesti, upalnih bolesti crijeva i sarkoidoze, a moguće je da dosadašnja istraživanja upućuju na veću specifičnost ovog biljega od stvarne (81,84). Zbog navedenih manjkavosti ovih pokazatelja, istraživani su i drugi biljezi koji bi zamijenili sCD25, poput povišenog HLA-DR ili povišenog urinarnog  $\beta$ 2-mikroglobulina (68,78).

Ostali biljezi istraživani kao kandidati za dijagnozu HLH-a sljedeći su: sCD163, pokazatelj aktivacije makrofaga u sistemskom obliku juvenilnog idiopatskog artritisa; CXCL9, pokazatelj aktivnosti signalnog puta IFN- $\gamma$ ; IL-18, pokazatelj aktivnosti inflammasoma (8,68). Povećan omjer IL-18/CXCL9 i povišena apsolutna vrijednost IL-18 karakteristični su za MAS i mogu biti razlikovni kriteriji u odnosu na ostale oblike HLH-a (68). Primjenjujući kriterije HLH-2004 u slučaju MAS-a dijagnoza može biti odgođena zbog povišenih razina fibrinogena, trombocita i leukocita koje su tipične za reumatske bolesti (78). Kod pacijenata s poznatom ili pretpostavljenom dijagnozom sistemskog juvenilnog idiopatskog artritisa sa sumnjom na MAS, korisni mogu biti kriteriji koje su donijele međunarodne reumatološke

organizacije. Te smjernice uključuju feritin  $\geq 684 \mu\text{g/L}$  uz zadovoljena još dva od četiri navedena kriterija: I. trombociti  $\leq 181 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; II. AST  $> 48 \text{ U/L}$ ; III. trigliceridi  $> 156 \text{ mg/dL}$ ; IV. fibrinogen  $\leq 360 \text{ mg/dL}$  (68).

Istraživanja razina različitih citokina pokazuju da je kombinacija izrazito povišene razine IFN- $\gamma$  i IL-10 uz umjereno povišen IL-6 visoko specifična za HLH u odnosu na druga upalna stanja poput sepse. Značajnije povišen IL-6 karakterističan je za stanje sepse, ali ne i za HLH (94). Osim pokazatelja navedenih u HLH-2004, moguće su promjene drugih laboratorijskih nalaza. Oko 60 % pacijenata s HLH-om ima poremećaje koagulacije, a gotovo 80 % povišene razine jetrenih enzima (serumskih transaminaza) (67,74). Aspartat-aminotransferaza (AST) obično je značajnije povišena nego ALT te je pokazatelj sustavnog oštećenja tkiva, a ne samo jetrene ozljede (78). Ponekad su prisutne hipoproteinemija i hiperbilirubinemija (direktna) (74,77,78), a histološki nalaz bioptata jetre može sličiti kroničnom hepatitisu (83). Povišena razina LDH-a i hiponatremija prisutne su u 78 % pacijenata (67).

U dijagnostici HLH-a, osobito pri sumnji na primarni oblik, treba detaljno ispitati obiteljsku anamnezu, a u slučaju sumnje na HLH potaknut infekcijom važna je epidemiološka anamneza. Klinička slika, opisana u prethodnom potpoglavlju, također je vrlo važna u postavljanju sumnje i dijagnosticiranju HLH-a. Uz simptome i znakove zahvaćanja SŽS-a, CT i magnetska rezonancija (MR) mozga mogu otkriti nespecifične abnormalnosti u signalu bijele tvari i gubitak volumena moždanog tkiva, hidrocefalus, edeme, trombozu venskih sinusa, kalcifikacije i druge patološke promjene (83), a u dijelu pacijenata prisutne su mononuklearna pleocitoza i povišena razina proteina u cerebrospinalnom likvoru (74). Osim slikovnih pretraga SŽS-a, korisne mogu biti slikovne pretrage drugih organskih sustava. Dvije trećine pacijenata ima promjene na rendgenskoj slici i CT nalazu prsnog koša. Neke od češće zabilježenih promjena su atelektaze, intersticijski opaciteti, pleuralni izljev, pneumotoraks, konsolidacija plućnog parenhima i medijastinalna limfadenopatija. Na ultrazvuku i CT-u abdomena mogu se vidjeti hepatosplenomegalija, limfadenopatija i ascites (83). Pozitronska emisijska tomografija pretraga je koju treba učiniti kod djece sa sumnjom na okultni limfom (68).

Dokaz infekcije koja je potaknula razvoj HLH-a važan je dio dijagnostike sHLH-a i pHLH-a potaknutog infekcijom (67). Mikrobiološka dijagnostika treba biti usmjerena prema uzročnicima poput herpesvirusa, virusa influence, mikobakterija, gljiva i parazita (*Plasmodium*, *Leishmania*) te uključuje molekularne testove (npr. PCR) i serološke testove (67). Osobitu važnost treba dati testiranju na EBV jer je najčešći infektivni okidač HLH-a, osobito u azijskoj populaciji (84). Kod mlađih odraslih i imunokompetentnih osoba treba

dijagnostiku usmjeriti prema novoj, primarnoj infekciji, a kod imunosuprimiranih pacijenata u obzir treba uzeti mogućnost reaktivacije prethodne infekcije (67). Osim testova i pretraga kojima se ispituju pojedini kriteriji HLH-2004, važne su pretrage kojima se potvrđuje ili isključuje genetska podloga HLH-a (66). Imunološkim pretragama moguće je otkriti genetsku predispoziciju za razvoj HLH-a u vremenu kraćem no što je potrebno za pristizanje rezultata genetskih testova. Danas su dostupni paneli za genetsko testiranje koji obuhvaćaju najčešće gene vezane uz razvoj HLH-a, a koriste se metode sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) i cijelogenomskog sekvenciranja (engl. *whole genome sequencing*, WGS) (8,68). Takvo testiranje može biti osobito korisno kod osoba koje su složeni heterozigoti za mutacije dvaju različitih gena vezanih za proces degranulacije u kojih je uobičajeno rano nastupanje simptoma, kao kod homozigota za mutacije istih gena (84). Genetski testovi nemaju važnost samo u djece, već i u odraslih pacijenata kod kojih postoji pozitivna obiteljska anamneza HLH-a, osobna anamneza teške rekurentne infekcije EBV-om, pacijentima bez jasnog okidača ili temeljne bolesti koja bi dovela do HLH-a (67). U slučaju pozitivne obiteljske anamneze ili pretraga koje ukazuju na određeni genetski poremećaj, može se koristiti ciljano sekvenciranje pojedinog gena (68). U takvim slučajevima kasnije pojave HLH-a moguće su mutacije jednog alela ili složena heterozigotnost za gene koji sudjeluju u putu degranulacije (84). Istraživanja su pokazala da su određeni polimorfizmi gena za perforin (A91V) češći u pacijenata odrasle dobi s HLH-om, ali nisu dovoljni da bi uzrokovali nastanak HLH-a (84).

Protočnom citometrijom moguće je, brže nego genetskim testovima, dokazati deficijencije 10 od 12 poznatih genetskih uzroka pHLH-a uključujući manjak perforina, Munc13-4, SAP-a i XIAP-a korištenjem kvantitativnih testova visoke osjetljivosti (8,68,74,78). Dijagnostički testovi usmjereni na otkrivanje sindroma XLP1 i XLP2 osobito su važni kod dječaka pozitivnih na EBV (78). Indirektno mjerenje SAP-a moguće je mjerenjem broja iNKT stanica koje su odsutne u slučaju manjka SAP-a (68). Pacijenti sa simptomima i znakovima zahvaćanja SŽS-a također su kandidati za genetske pretrage (77). Pozitivan molekularan test koji upućuje na HLH dovoljan je za dijagnozu, bez obzira na prisutnost ili odsutnost nalaza preostalih osam kriterija iz HLH-2004 (9). Budući da HLH može biti potaknut malignom bolešću, osobito kod odraslih osoba, dijagnostički postupak treba biti usmjeren otkrivanju ili isključenju maligne bolesti. Limfom je uzrok na koji treba obratiti pažnju kod starijih pacijenata, osobito starijih od 60 godina (84).

Zbog nesavršenosti kriterija HLH-2004, osobito u dijagnosticiranju HLH-a odrasle dobi, predloženi su kriteriji za procjenu vjerojatnosti dijagnoze HLH-a: *HScore za stratifikaciju*



*rizika od HLH-a* (81). Kriteriji uključuju devet varijabli: tri kliničke, pet bioloških i jednu citološku. Najmanji broj bodova koji donosi jedan kriterij je 18, a najveći 64. Uz broj bodova 90 ili manji vjerojatnost da pacijent ima HLH je manja od 1 %, a uz broj bodova 250 ili veći vjerojatnost je veća od 99 % (95). Iako su smjernice HLH-2004 primarno razvijene za dijagnozu HLH-a u pedijatrijskoj populaciji, danas su još uvijek glavne smjernice za dijagnozu HLH-a neovisno o dobi i sumnji na pHLH ili sHLH (74).

Tablica 2. HScore za stratifikaciju rizika od HLH. Prema Fardet, i i sur. (2014) (95)

Parametar	Broj bodova
<b>Prisutno stanje imunosupresije (da/ne)</b>	0 (ne), 18 (da)
<b>Tjelesna temperatura (°C)</b>	0 (< 38.4), 33 (38.4-39.4), 49 (> 39.4)
<b>Organomegalija</b>	0 (ne), 23 (hepatomegalija ili splenomegalija), 38 (hepatosplenomegalija)
<b>Broj staničnih loza zahvaćenih citopenijom</b>	0 (1 loza), 24 (2 loze), 34 (3 loze)
<b>Feritin (ng/mL)</b>	0 (< 2000), 35 (2000 – 6000), 50 (> 6000)
<b>Trigliceridi (mmol/L)</b>	0 (< 1.5), 44 (1.5 – 4), 64 (> 4)
<b>Fibrinogen (g/L)</b>	0 (> 2.5) ili 30 (≤ 2.5)
<b>AST (IU/L)</b>	0 (< 30) ili 19 (≥ 30)
<b>Hemofagocitoza u aspiratu koštane srži (da/ne)</b>	0 (ne), 35 (da)

### 3.6. Liječenje

Liječenje HLH-a ovisi o uzroku, okidaču, tipu i težini kliničke slike (77). Tri su osnovne skupine terapijskih mjera koje se primjenjuju u liječenju HLH-a: I) suportivna terapija, važna radi sprečavanja životno ugrožavajućih komplikacija; II) terapija kojom se uklanja okidač sindroma (primjerice liječenje infekcije) i III) terapija kojom se smanjuje upalni odgovor i stanična proliferacija, koja obuhvaća imunosupresivne i citotoksične lijekove (67). Početna terapija treba biti uvedena odmah nakon postavljanja dijagnoze HLH-a, bez obzira na neotkriven uzrok i moguću genetsku predispoziciju koja je dovela do razvoja sindroma, kao i na nedokazanu hemofagocitozu u koštanoj srži (68,78). Cilj je početne terapije u obama osnovnim tipovima HLH-a smanjiti aktivnost imunskog sustava uklanjanjem prekomjernih aktiviranih makrofaga i T-limfocita te ublažiti hipercitokinemiju kako bi se spriječilo daljnje oštećenje organa (1,78).

Trenutni terapijski protokoli temeljeni su na smjernicama HLH-94 i HLH-2004 i uključuju

kemoterapiju u kombinaciji s imunoterapijom. Smjernice donesene u ovim istraživanjima temeljene su na kliničkim studijama koje su uključivale samo liječenje djece s HLH-om, kod kojih prije nije primjenjivan citotoksičan lijek niti ciklosporin A, ali se, zbog nedostatka drugih smjernica, koriste i u liječenju odraslih osoba (83,96). Odluka o primjeni ovih terapijskih protokola treba biti temeljena na odluci stručnjaka iskusnog u liječenju HLH-a, neovisno o potpunom ili nepotpunom ispunjavanju propisanih dijagnostičkih kriterija (96). Molekularna dijagnoza pHLH-a bez prisutnosti simptoma HLH-a nije indikacija za početak terapije propisane ovim istraživanjima (96). U obama istraživanjima terapijski je protokol podijeljen na inicijalnu fazu i fazu održavanja.

Inicijalnu terapija prema protokolu HLH-2004 čini primjena deksametazona, ciklosporina A i etopozida tijekom prvih osam tjedana liječenja. Dio pacijenata sa simptomima zahvaćenosti SŽS-a također treba dobivati intratekalno primijenjen metotreksat i prednizolon (9). Promjena u odnosu na HLH-94 uvođenje je ciklosporina A od prvog dana liječenja te intratekalna primjena prednizolona uz prije primjenjivani metotreksat (97). Deksametazon, lijek iz skupine glukokortikoida, djeluje protuupalno ublažavajući odgovor citokinima, inhibirajući diferencijaciju dendritičkih stanica i djelujući citotoksično na limfocite (66,74). Zbog izraženije sposobnosti prelaska krvno-moždane barijere daje mu se prednost u odnosu na druge glukokortikoide poput prednizona ili prednizolona (67). Prije primjene glukokortikoida treba isključiti dijagnozu HLH-a povezanog s limfomom jer dijagnostički postupak može biti otežan nakon primjene tih lijekova (78). Ciklosporin je imunosupresivni lijek, inhibitor kalcineurina, citokroma P450 3A4 i P-glikoproteina te inhibitor sinteze IL-2, nužnog za samoaktivaciju i diferencijaciju T-limfocita. Uzrokuje reverzibilnu inhibiciju imunokompetentnih limfocita (primarno pomagačkih T-limfocita, a posredno i B-limfocita) u G0 i G1 fazi staničnog ciklusa (98). Najčešće je upotrebljavan imunosupresivni lijek za liječenje odraslih pacijenata i djece s HLH-om (67). Etopozid je inhibitor topoizomeraze II, enzima koji omogućuju stvaranje dvostrukih lomova lanaca DNA tijekom procesa replikacije i ponovno spajanje lanaca nakon toga. Etopozid sprečava drugu fazu reakcije topoizomeraze II, odnosno ponovno spajanje lanaca (99). Na taj način smanjuje broj aktiviranih T-limfocita (1). Tijekom faze indukcije, koja traje prvih dva tjedna, pacijenti dobivaju svakodnevno visoke doze deksametazona ( $10 \text{ mg/m}^2$ ), etopozid u dozi  $150 \text{ mg/m}^2$  iv. (intravenski), dvaput tjedno te, u protokolu HLH-2004, ciklosporin do dostizanja razine u krvi od  $200 \text{ } \mu\text{g/L}$ , uz dozu od  $6 \text{ mg/kg}$  dnevno (podijeljenu u dva davanja) tijekom prvog tjedna liječenja (97). Pri primjeni ciklosporina pažnju treba usmjeriti na bubrežnu i jetrenu funkciju i prilagoditi dozu s ciljem održavanja prethodno navedene preporučene razine u krvi (67). Razine

ciklosporina A iznad terapijskih povezane su s neurotoksičnošću i nalazom sindroma posteriorne reverzibilne encefalopatije (PRES, prema engl. *posterior reversible encephalopathy syndrome*) (100). Nepostojanje statistički značajne razlike u ukupnom preživljenju pacijenata liječenih protokolom HLH-2004 u odnosu na one liječene terapijskim protokolom HLH-94 uz izraženu neurotoksičnost ciklosporina dovele su do stava da rano uvođenje ciklosporina A ne treba biti dio standardne terapije HLH-a (74). Kod primjene etopozida davput tjedno tijekom prvih dvaju tjedana potrebno je redovito praćenje krvne slike jer etopozid može uzrokovati tešku neutropeniju. U slučaju da uz prisutnost infekcije broj neutrofila padne ispod  $0.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , treba razmotriti odgodu liječenja etopozidom (78). Dozu etopozida treba prilagoditi u slučaju smanjene bubrežne funkcije, ali prisutnost citopenije i disfunkcije jetre nije razlog za odgodu uvođenja terapije etopozidom jer se ova stanja obično poboljšaju primjenom terapije (1,96). Primjena etopozida može trajati kraće od osam tjedana ako je odgovor na terapiju potpun što je češće u sHLH-u, ali je, s druge strane, ponekad potrebna primjena dvaput tjedno u razdoblju duljem od dva tjedna ako se pojave znakovi reaktivacije u razdoblju primjene etopozida jednom tjedno (96).

Intratekalna primjena metotreksata i prednizolona uvodi se ako nakon prva dva tjedna primjene trostruke terapije i dalje napreduju neurološki simptomi ili nije došlo do poboljšanja nalaza cerebrospinalne tekućine (9,83). Prema smjernicama HLH-2004, proteine i broj stanica u cerebrospinalnom likvoru potrebno je analizirati svaka četiri tjedna kod pedijatrijske populacije, a u slučaju pojave dodatnih neuroloških simptoma potrebno je učiniti MR. Metotreksat se daje jednom tjedno u razdoblju od 3. do 6. tjedna liječenja, u dozi ovisnoj o dobi pacijenta (od 6 mg za dojenčad do 12 mg za starije od 3 godine), kao i prednizolon (od 4 mg za dojenčad do 10 mg za starije od 3 godine) (97). Novije smjernice preporučaju samo uporabu metotreksata, bez prednizolona jer istraživanja nisu pokazala dodatno poboljšanje pri primjeni dvojne intratekalne terapije (96).

Tijekom sljedećih šest tjedana postupno se smanjuje doza deksametazona (3. i 4. tjedan: 5 mg/m<sup>2</sup> dnevno, 5. i 6. tjedan: 2.5 mg/m<sup>2</sup> dnevno, 7. tjedan: 1.25 mg/m<sup>2</sup> uz postupno ukidanje terapije u 8. tjednu). Etopozid se tijekom preostalih šest tjedana inicijalne faze primjenjuje jednom tjedno u dozi od 150 mg/m<sup>2</sup>, a ciklosporin A održava se na preporučenoj razini od 200 µg/L (97).

Terapija održavanja namijenjena je pacijentima s nasljednim oblikom HLH-a, pacijentima s trajnim ili refraktornim oblikom nenasljednog HLH-a, kao i pacijentima kod kojih je nakon početne remisije došlo do reaktivacije bolesti. Cilj je ove terapije održati stabilno stanje pacijenta do transplantacije krvotvornih matičnih stanica (HSCT, prema engl. *haematopoietic*

*stem cell transplantation*) (9). Terapija održavanja sastoji se od pulsnog davanja deksametazona u razdoblju od 3 dana, u dozi od 10 mg/m<sup>2</sup>, svaka dva tjedna, te od davanja etopozida u dozi od 150 mg/m<sup>2</sup> iv., također svaka dva tjedna, izmjenično s tjednima u kojima se primjenjuje deksametazon (78,83,97). Ciklosporin A nastavlja se davati na način da se održi preporučena razina lijeka od 100 do 200 µg/L (78,97).

Reaktivacija bolesti česta je u fHLH-u, osobito u drugom dijelu inicijalne faze terapije, te je u tom slučaju potrebno intenzivirati terapiju. Ponovno pokrenuta inicijalna faza može se skratiti u tom slučaju i nastaviti s terapijom održavanja do HSCT-a. Treba uvesti antibiotike širokog spektra, antivirusne i antigljivične lijekove (9).

Istraživani su također alternativni protokoli liječenja imunoterapijom koja uključuje antitimocitne globuline (ATG) i metilprednizolon (66). Liječenje ovim protokolom dovelo je do podjednakog ukupnog preživljenja u liječenoj skupini pacijenata kao i terapija prema smjernicama HLH-2004 (65,66,101).

HSCT je jedina terapija izlječenja za pacijente s fHLH-om (83). Prije HSCT-a primjenjuju se dva režima pripreme – mijeloablativno kondicioniranje i kondicioniranje smanjenog intenziteta. Među pacijentima s HLH-om bilježi se visoka stopa neželjenih učinaka (hepatična venskookluzivna bolest, plućno krvarenje) i značajna smrtnost uz primjenu mijeloablativnog pristupa zbog čega se uglavnom preporuča kondicioniranje smanjenog intenziteta (8,68). Uz kondicioniranje smanjenog intenziteta češća je pojava miješanog kimerizma, ali remisiju je moguće postići uz stalno održavanje udjela od 10 do 20 % darivateljevih limfocita (65,66,102). Kako bi se omogućila pravovremena primjena HSCT-a, tipizacija humanog leukocitnog antigena (HLA tipizacija, prema engl. *human leukocyte antigen*) i potraga za odgovarajućim darivateljem treba početi čim je dijagnoza pHLH-a postavljena, a zbog varijabilnosti u dobi razvitka kliničke slike, članovi obitelji koji su potencijalni darivatelji trebaju biti testirani na gene vezane uz pHLH (66,96). Asimptomatski nositelji bijele mutacije povezanih s HLH-om, čiji je član obitelji razvio kliničku sliku HLH-a tijekom dojenačke dobi, trebaju biti žurno podvrgnuti HSCT-u, a kod bijelih nositelja bez pozitivne obiteljske anamneze HSCT treba provesti ovisno o individualnoj procjeni (96). U slučaju nepostojanja odgovarajućeg darivatelja, treba tražiti djelomično odgovarajućeg, a u obzir dolaze haploidentični članovi obitelji (9). HSCT može biti terapija za HLH odrasle dobi u slučaju lošeg odgovora na terapiju, bez obzira na nepostojanje dokazanog genetskog uzroka, ako je liječenje reaktivacija neuspješno ili nije poznat okidač sindroma koji bi se mogao kontrolirati terapijom (96). Trogodišnje ukupno preživljenje u istraživanju HLH-94 iznosilo je 55 %, a u pacijenata koji su liječeni HSCT-om 64 %. U slučaju neliječenja srednje je

preživljenje osoba s fHLH-om dva mjeseca (9). Preživljenje nakon mijeloablativnog kondicioniranja iznosi 40 – 70 %, a nakon kondicioniranja smanjenog intenziteta čak iznad 70 % (8).

Za liječenje MAS-a imunosupresija je postignuta korištenjem visokih doza glukokortikoida uz postupno smanjenje doze, ponekad uz dodatno liječenje ciklosporinom A i etopozidom (65). Budući da je u podlozi razvoja MAS-a neka od reumatskih bolesti, veliku važnost u liječenju imaju lijekovi korišteni za liječenje tih bolesti, poput antagonista receptora za IL-1, protutijela i drugih proteina usmjerenih na IL-6 (tocilizumab) ili na TNF (infliksimumab, etanercept) (65–67,77). Drugi su imunosupresivni lijekovi koji su se pokazali učinkovitima u liječenju HLH-a u sklopu autoimune bolesti metotreksat i ciklofosfamid (67).

U slučaju HLH-a povezanog s infekcijom obavezan dio liječenja treba biti primjena terapije usmjerene na liječenje infektivne bolesti, odnosno uklanjanje uzročnika. Kod pacijenata s HLH-om povezanim s HSV-om, kao i kod novorođenčadi starosti manje od tjedan dana s povišenim jetrenim enzimima nepoznate etiologije, treba odmah primijeniti visoke doze aciklovira zbog izrazito loše prognoze ovog oblika HLH-a (78). Pacijenti s tuberkulozom i HLH-om trebaju biti dodatno liječeni antituberkuloznom terapijom (1). Primjena nekih antimikrobnih lijekova, poput amfotericina B za HLH potaknut lišmenijazom, može biti dovoljna za izlječenje (1). HLH-94 nije indiciran u liječenju HLH-a povezanog s lišmenijazom i tuberkulozom (96). Osim liječenja usmjerenog na uzročnika infekcije, u slučaju HLH-a povezanog s infekcijom u obzir dolazi primjena monoterapije visokim dozama (1 g/kg) intravenskih imunoglobulina (IVIG), monoterapije glukokortikoidima, monoterapije ciklosporinom A, kao i kombinacija ovih lijekova u inicijalnoj terapiji (78). Liječenje s EBV-om povezanog HLH-a detaljnije je opisano u potpoglavlju 4.5.

Pacijenti s HLH-om u sklopu limfoma trebaju osim kemoterapije za liječenje limfoma dobivati glukokortikoide i ciklosporin A (78). Za HLH povezan s drugim malignim bolestima terapija uključuje etopozid i glukokortikoide primijenjene prije ili istovremeno s terapijom specifičnom za tumor (96). Istraživanja pokazuju djelomičnu učinkovitost primjene alemtuzumaba kod pacijenata refrakternih na prethodno liječenje uobičajenim protokolom (68). Alemtuzumab je monoklonsko protutijelo usmjereno na glikoprotein CD52 izražen na T-limfocitima, B-limfocitima, histiocitima te u manjoj mjeri na membrani NK stanica (103,104). Koristi se u liječenju B-stanične kronične limfocitne leukemije i MS-a (103,105). Alemtuzumab je korišten u nekoliko slučajeva koji nisu odgovarali na uobičajenu terapiju kao terapija održavanja do primjene alogeničnog HSCT-a (103,104). Emapalumab, potpuno humano monoklonsko protutijelo usmjereno na IFN- $\gamma$ , odobrila je za odrasle i pedijatrijske

slučajeve refrakternih, rekurentnih i progresivnih oblika HLH-a, kao i za pacijente koji ne podnose uobičajenu terapiju Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA, prema engl. *U.S. Food and Drug Administration*) (68,106). Djelotvornost emapalumaba također je pokazana u liječenju MAS-a (68). Anakinra, rekombinantni antagonist receptora za IL-1, korišten je u liječenju sHLH-a, prije svega uzrokovanog reumatskim bolestima. Pokazao se djelotvornim u liječenju pedijatrijskih pacijenata s MAS-om ili drugim sHLH-om koji nije uzrokovan malignom bolesti (68,107). Inhibitori Janus kinaze (JAK inhibitori, prema engl. *Janus associated kinase*), poput ruksolitiniba, istraživani su kao terapija u slučaju nedovoljnog odgovora na osnovni terapijski protokol, ali i kao prva linija terapije za sHLH. Iako nema dovoljno opsežnih prospektivnih istraživanja učinkovitosti ruksolitiniba, istraživanja na malom uzorku slučajeva pokazuju učinkovitost u terapiji sHLH-a (68,108,109). U tijeku su istraživanja učinkovitosti i sigurnosti tadekiniga alfa, rekombinantnog proteina koji se veže na IL-18, u liječenju pHLH-a uzrokovanog manjkom XIAP-a (XLP2) i mutacijom NLRC4, čiju pojavu može inducirati EBV (8,110). Suportivna terapija uključuje zbrinjavanje anemije i koagulopatije transfuzijama eritrocita, trombocita i svježe smrznute plazme, prevenciju jetrenog oštećenja i bubrežnog zatajenja, antikonvulzivnu terapiju, kao i profilaktičku terapiju protiv razvoja oportunističkih infekcija (1,67,78). Profilaktičku terapiju čini primjena trimetoprim-sulfametoksazola (5 mg/kg dnevno trimetoprima) radi sprečavanja infekcije *Pneumocystis jirovecii* te primjena drugih antimikotika radi prevencije aspergiloze i ostalih gljivičnih infekcija (78,96). Preporučeno je provoditi tjedne testove na moguće infekcije i značajne infektivne okidače HLH-a (EBV, CMV, adenovirusi) (96).

U slučaju razvoja izrazito teške kliničke slike može biti potrebno liječenje u JIL-u uz mehaničku ventilaciju, terapijsku izmjenu plazme i primjenu vazoaktivnih lijekova (1,68). Budući da je većina provedenih istraživanja liječenja HLH-a odrasle dobi nekontrolirana i retrospektivna, s različitim dozama primjenjivanih lijekova, odluke o liječenju odraslih i dalje su velikim dijelom temeljene na kliničkom iskustvu i pojedinačnim slučajevima (67).

## **4. Epstein-Barr virusom induciran hemofagocitni sindrom**

### **4.1. Uvod i podjela**

EBV je važan i čest okidač, ali i mogući osnovni uzrok razvoja HLH-a. Infekcija EBV-om najčešća je infekcija povezana s HLH-om (12). EBV može biti okidač HLH-a u pacijenata s

fHLH-om, ali može biti i pokretač HLH-a u osoba s nasljednim sindromima i mutacijama vezanim uz sklonost EBV-om induciranom HLH-u (12). Osim uz postojeći pHLH, akutna infekcija EBV-om može pokrenuti razvoj sHLH-a u osoba koje nemaju genetsku predispoziciju za razvoj tog sindroma. Takav HLH može biti nepovezan s novotvorinama, odnosno isključivo pokrenut infekcijom EBV-om. Dio literature takav neneoplastični HLH označava pokratom EBV-HLH. S druge strane, s EBV-om povezane limfoproliferativne bolesti T-limfocita i NK stanica i limfomi mogu biti podloga za razvoj sHLH-a (12). Izmijenjena verzija klasifikacije limfoidnih novotvorina Svjetske zdravstvene organizacije iz 2017. godine definira četiri novotvorine koje su povezane s EBV-om i u sklopu kojih se može očitovati HLH (12). HLH je česta i tipična komplikacija agresivne NK-stanična leukemije (ANKL) i sustavnog na EBV pozitivnog T-staničnog limfoma dječje dobi (sEBV<sup>+</sup> T-NHL, prema engl. *systemic EBV<sup>+</sup> T-cell lymphoma of childhood*), ali se sporadično može javiti i u sklopu druge dvije vrste limfoma, ektranodalnog NK/T-staničnog limfoma (ENKTCL, prema engl. *extranodal NK/T-cell lymphoma*) i primarnog na EBV pozitivnog nodalnog T/NK-staničnog limfoma (EBV<sup>+</sup>PTCL, prema engl. *primary EBV<sup>+</sup> nodal T/NK-cell lymphoma*) (12). Osim uz ove limfome i leukemije, EBV-om inducirani HLH može se javiti i u sklopu CAEBV-a. CAEBV je podijeljen na sustavni oblik i lokalizirani (kožni) oblik. Dva su podtipa lokaliziranog oblika: limfoproliferativna bolest nalik na vakciniformnu hidrou (HVLDP, prema engl. *hydroa vacciniiforme-like lymphoproliferative disorder*) i teška alergija na ugrize komaraca (SMBA, prema engl. *severe mosquito bite allergy*) (12,111). HLH isključivo potaknut EBV-om ponekad je teško razlikovati od HLH-a povezanog s NK/T-staničnim limfomima. Razlikovanje temeljnog stanja u sklopu kojeg se razvio HLH važno je za usmjeravanje dijagnostike i daljnjeg liječenja i praćenja pacijenta (12).

## 4.2. Epidemiologija

Infekcija EBV-om najčešća je infekcija povezana s HLH-om, osobito u Aziji i Sjedinjenim Američkim Državama (12,67). U sustavnim pregledima literature izračunat je udio EBV-om induciranog HLH-a od 40 do 50 % u ukupnom broju slučajeva virusom potaknutog HLH-a (1,67). EBV-om inducirani HLH najčešći je tip sHLH-a u djece, dok je u odraslih sHLH češće komplikacija maligne bolesti (78). Budući da je riječ o sindromu širokog etiopatogenetskog spektra s preklapanjima podtipova, točnu je prirodu bolesti ponekad teško odrediti uobičajenim dijagnostičkim metodama pa se epidemiološki podatci o HLH-u razlikuju ovisno o istraživanju, ključnim i isključnim kriterijima.

EBV nije uobičajen okidač fHLH-a. Opisani su slučajevi CAEBV-a u osoba koje su nositelji

mutacija za fHLH (112). fHLH potaknut EBV-om najčešće se javlja u mlađe djece, premda postoje slučajevi osoba s hipomorfim mutacijama u kojih se sindrom razvio u starijoj dobi (12). XLP1 najčešći je genetski poremećaj praćen EBV-om induciranim HLH-om, dok je u sklopu sindroma XLP2 ovaj virus znatno rjeđi okidač HLH-a (113). EBV je gotovo jedini zabilježeni infektivni okidač HLH-a u XLP1, dok su u XLP2 zabilježeni i drugi mikroorganizmi (114). Povremeno se nasljedni sindromi imunodeficijencija povezanih s albinizmom (CHS, GS-2, HPS-2) također kompliciraju razvojem HLH-a induciranog EBV-om. Ostale mutacije rijetko su povezane s EBV-om induciranim HLH-om (sindrom X-MEN, deficijencija ITK, deficijencija CD27) i dosada je opisan mali broj slučajeva (112). Općenite epidemiološke značajke pHLH-a detaljnije su opisane u potpoglavlju 3.2.

Najviše slučajeva neneoplastičnog EBV-HLH-a opisano je u istočnoj Aziji, osobito u Japanu gdje čini oko 40-50 % ukupne incidencije sHLH-a. Najčešće se očituje u dječjoj dobi, ali može se javiti i u odrasloj dobi kada je prognoza lošija (72,114,115). Premda je infekcija EBV-om u prvoj godini života najčešće asimptomatska, EBV-om induciran HLH može se javiti oko prve navršene godine (3).

sEBV<sup>+</sup> T-NHL češći je u istočnoj Aziji i južnoameričkim državama, dok je u Europi rijedak. Kako mu i samo ime govori, riječ je o bolesti koja se javlja u djetinjstvu (10,114). Suprotno tomu, ANKL se najčešće javlja u dobi od 20 do 50 godina, većina je oboljelih azijskog podrijetla, ali je sve više oboljelih europskog i južnoameričkog podrijetla (116). ENKTCL također je bolest odrasle dobi, ali se obično javlja u istočnoj Aziji, Srednjoj i Južnoj Americi. Čini do 8 % svih limfoma u istočnoj Aziji i nekim zemljama Južne Amerike (114).

EBV<sup>+</sup>PTCL vrlo je rijedak oblik limfoma s tipičnom pojavnosti u starijoj odrasloj dobi, osobito u imunosuprimiranih i imunodeficijentnih osoba (10).

Sustavni NK-stanični i T-stanični oblik CAEBV-a češći je u pedijatrijskoj populaciji u istočnoj Aziji, a rjeđi u južnoameričkim državama, dok je B-stanični oblik vrlo rijedak, ali se češće javlja u Europi (zapadni oblik). Sustavni oblik CAEBV-a može se javiti i u odrasloj dobi te je u tom slučaju težeg kliničkog tijeka. U dječjoj dobi češći je u osoba muškog, a u populaciji starijih odraslih u osoba ženskog spola (117). Javlja se u imunokompetentnih domaćina. HVLPD se javlja u djece i adolescenata te je klasični oblik češći u osoba bijele rase, a sustavni u osoba azijskog i latinoameričkog podrijetla. Epizode bolesti češće su u proljeće i ljeto. (10,114) SMBA je vrlo rijetka bolest djece iz istočne Azije (uglavnom Japana) i Meksika. Opisano je svega nekoliko stotina slučajeva (10,111).

Geografska raspodjela pojavnosti EBV-om induciranog HLH-a, s najvećim udjelom slučajeva u Aziji, upućuje na mogući doprinos okolišnih (kemijski karcinogeni, pesticidi), genetskih



(pojedini HLA podtipovi) faktora i prevalencije pojedinih sojeva EBV-a u etiopatogenezi ovog sindroma (10,118).

### **4.3. Etiopatogeneza i klinička slika**

#### **4.3.1. Obiteljski HLH i EBV**

EBV može biti slučajni okidač razvoja HLH-a u osoba koje su nositelji mutacija koje uzrokuju autosomno recesivni fHLH. Riječ je o mutacijama perforina i uz transport citotoksičnih granula vezanih proteina. EBV može potaknuti razvoj HLH-a u bilo kojem od pet tipova fHLH-a, premda je to neuobičajen oblik EBV-om potaknutog HLH-a (12). Limfociti trajno zaraženi EBV-om mogu poticati upalu stimulirajući disfunkcionalne aktivirane citotoksične T-limfocite tipične za ove sindrome. Etiopatogeneza ovih sindroma opisana je u potpoglavlju 3.3., a uloga EBV-a u poticanju HLH-a uz prisutnost ovih mutacija opisana je u potpoglavlju 2.3. i 2.4. Zabilježeni su slučajevi složenih heterozigota za gene odgovorne za razvoj fHLH-a kod kojih se razvila klinička slika CAEBV-a (112,119).

#### **4.3.2. Drugi nasljedni sindromi povezani s EBV-om induciranim HLH-om**

Osim uz fHLH, EBV može potaknuti razvoj HLH-a kod pojedinaca s genetski uzrokovanom podložnošću EBV infekcijama. EBV je češći okidač HLH-a u ovim sindromima nego u fHLH-u. EBV-om potaknut HLH tipično se javlja uz XLP1 (Duncanovu bolest), nasljedni sindrom čija su genetska podloga i patogeneza opisani u potpoglavljima 4.4. i 5.3. Budući da je riječ o X-vezanom recesivnom sindromu, obično obolijevaju dječaci, a ženski nositelji ne razvijaju kliničku sliku (112). Djeca s XLP1 razvijaju teške oblike primarne infekcije EBV-om zbog nekontroliranog poliklonalnog umnažanja T-limfocita i B-limfocita. Nekontrolirani T-limfociti i poremećena funkcija citotoksičnosti pokreću citokinsku oluju i aktivaciju makrofaga dovodeći do razvoja HLH-a. HLH je najčešća teška posljedica ovog sindroma (oko 30 % slučajeva), ali mogu se razviti hipogamaglobulinemija, aplastična anemija i B-stanični limfomi (12,112–114). Osobe s ovim sindromom imaju oslabljen serološki odgovor na cjepiva, a težina kliničke slike varira unutar obitelji, bez obzira na posjedovanje iste mutacije (112). XLP2, uzrokovan mutacijom gena *BIRC4*, koji kodira protein XIAP, rjeđe je podloga za razvoj EBV-om induciraniog HLH-a. Mutacije gena za XIAP uzrok su oko 30 % slučajeva XLP-a (112). Udio pacijenata s HLH-om u sklopu XLP2

koji su pozitivni na EBV manji je nego u XLP1, a rjeđe se razvijaju i B-stanični limfomi. (12,113) Patogeneza ovog sindroma opisana je u potpoglavlju 3.3., a ključna je značajka pojačana apoptoza T-limfocita potaknuta različitim stimulansima dok je citotoksična funkcija limfocita u ovom sindromu normalna (112,114). Pacijenti s ovim sindromom češće razvijaju citopeniju, splenomegaliju i hemoragijski kolitis bez razvoja HLH-a u odnosu na pacijente s XLP1. Različita istraživanja daju oprečne rezultate o omjeru letaliteta ovih dvaju sindroma (12,112,113). Pacijenti s XLP2 često razvijaju kliničku sliku upalne bolesti crijeva zbog poremećenih signalnih puteva vezanih uz NOD1 i NOD2 (113).

Deficijencija ITK-a također je nasljedni poremećaj povezan s razvojem EBV-om inducirano HLH-a. ITK ima važnu ulogu u signalnim putevima T-staničnog receptora važan je za proliferaciju i diferencijaciju T-limfocita. Uz ovu mutaciju javljaju se hipogamaglobulinemija, citopenija i proliferativne bolesti poput B-stanične limfoproliferativne bolesti, B-staničnog limfoma i limfomatoidne granulomatoze (12,112). Homozigotna mutacija gena za CD27 rijedak je, ali u literaturi opisan genetski poremećaj povezan s EBV-om induciranim HLH-om. CD27 je TNFR koji se veže za ligand CD70 i ima ulogu aktivacijskog receptora u B-limfocitima, T-limfocitima i NK stanicama. Biljeg je memorijskih B-limfocita (112,120). Mutacije proteina MAGT1 uzrokuju poremećaj unutarstanične signalizacije jer magnezij ima ulogu sekundarnog glasnika. Sindrom vezan uz takve mutacije, nazvan je X-MEN, a patogeneza je opisana u potpoglavlju 2.4. Pacijenti s mutacijama MAGT1 imaju smanjen broj CD4<sup>+</sup> limfocita i poremećen omjer CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita. Citotoksični limfociti i NK stanice uz tu mutaciju imaju smanjenu sposobnost ubijanja stanica zaraženih EBV-om. U sklopu ovih mutacija javljaju se kliničke slike EBV-om inducirano HLH-a i limfoma pozitivnih na EBV (12,43,112). Osobe s mutacijom GATA2 također razvijaju kliničke slike CAEBV-a, trajne viremije i tumora glatkih mišića pozitivnih na EBV. Poremećaj se nasljeđuje autosomno dominantno i može biti podloga za razvoj EBV-om inducirano HLH. GATA2 protein važan je za hematopoezu te ove osobe često imaju smanjen broj B-limfocita, CD4<sup>+</sup> T-limfocita, NK stanica, dendritičkih stanica, eritrocita, neutrofila, monocita i trombocita (112,121). EBV može biti okidač za razvoj HLH-a kod pacijenata koji boluju od sindroma imunodeficijencije povezanih s albinizmom (CHS, GS-2, HPS-2). Patogeneza i klinička slika ovih sindroma opisana je u potpoglavljima 5.3. i 5.4.

### **4.3.3. EBV-om induciran HLH bez novotvorina (EBV-HLH)**

EBV može biti jedini uzrok razvoja HLH-a. Takav HLH nema genetsku podlogu niti je povezan s novotvorinama i limfoproliferativnim bolestima. Sindrom se očituje kontinuiranom visokom tjelesnom temperaturom, splenomegalijom, limfadenopatijom, žuticom, edemima i kožnim osipom. Moguće su i rijetke prezentacije u obliku perforacije crijeva, bolova u epigastriju uz štucanje, kožnih lezija, plućnih infiltrata i bolesti SŽS-a (75,114,122). U laboratorijskim nalazima krvi i cerebrospinalne tekućine ističu se nalazi detaljno opisani u potpoglavljima 3.4. i 3.5, ali su poremećaji tih parametara obično izraženiji i razvijaju se brže nego kod drugih oblika HLH-a (114). T-limfociti i NK stanice djece s EBV-HLH-om često pokazuju izraženije znakove atipije nego u NK/T-staničnim limfomima pozitivnim na EBV (12). T-limfociti češće su zahvaćeni (u oko 80% slučajeva) nego NK stanice. T-limfociti u EBV-HLH-u najčešće su CD8<sup>+</sup> fenotipa, pozitivni na EBV, uz gubitak CD5 i CD7, antigena tipičnih za T-limfocite, a broj CD4<sup>+</sup> limfocita manji je što čini razliku u odnosu na druge EBV-om inducirane limfoproliferativne poremećaje (12). Način na koji EBV ulazi u T-limfocite i NK stanice opisan je u potpoglavlju 2.3. U velikom broju slučajeva bolest se razvija iz jedne EBV-om zaražene stanice što se očituje monoklonalnošću T-staničnih receptora (oko 50%) (114). Inficirani T-limfociti nemaju izražene jako imunogenične proteine EBV-a, već izražavaju LMP1 (tip II latencije). Na taj način zaraženi T-limfociti uspijevaju izbjeći uklanjanje drugim citotoksičnim stanicama. LMP1 pokreće signalni put kojim se aktivira NF-κB čime se povećava sinteza proupalnih citokina i potiče klonalna ekspanzija (78). Pretpostavlja se da je proliferacija T-limfocita i NK stanica u neneoplastičnom EBV-HLH-u prolazno potaknuta primarnom infekcijom EBV-om i posljedičnom hipercitokinemijom, za razliku od CAEBV-a gdje dolazi do samoodržive proliferacije NK stanica i T-limfocita uz izbjegavanje apoptoze tih stanica tijekom duljeg vremena (123).

### **4.3.4. Na EBV pozitivan HLH povezan s novotvorinama**

#### **4.3.4.1. HLH povezan s NK/T-staničnim limfomima pozitivnim na EBV**

HLH je inicijalna prezentacija gotovo svih pacijenata sa sEBV<sup>+</sup> T-NHL-om i vrlo česta prezentacija ANKL-a. Etiologija EBV<sup>+</sup> T-NHL-a nepoznata je, ali je zbog izrazite predispozicije ovisne o rasi pretpostavljeno da genetski poremećaj odgovora na EBV ima ulogu u razvoju tog limfoma (114). LMP1 u stanicama zaraženim EBV-om potiče povećan izražaj citidin deaminaze potaknute aktivacijom (AID, prema engl. *activation-induced*

*cytidine deaminase*) i time dovodi do genomske nestabilnosti i posljedičnih mutacija u onkogenima i genima supresorima tumora (10,124). Delecije genoma EBV-a često su prisutne u analiziranim zaraženim stanicama NK/T-staničnih limfoma i CAEBV-a (za razliku od IM-a) te je moguće da doprinose razvoju limfoma (10,11). Tijekom razvoja bolesti dolazi do monoklonalne ekspanzije EBV-om zaraženih T-limfocita (114). Simptomi bolesti javljaju se nekoliko dana ili tjedana nakon simptoma IM-a u sklopu primoinfekcije EBV-om. Izrazita hiperplazija histiocita i hemofagocitoza u koštanoj srži, jetri i slezeni dovode do pancitopenije, koagulopatije, hepatosplenomegalije i poremećaja jetrene funkcije (114). Infiltracija jetrenih sinusoida i portalnih prostora malim limfocitima dovodi do kolestaze, steatoze i fokalne nekroze jetre, u slezeni je vidljiva deplecija bijele pulpe uz izražene limfoidne infiltrate, a arhitektura limfnih čvorova uglavnom je održana u ranim fazama bolesti (114). Morfološka atipija stanica većinom je blagog stupnja, ali u nekim slučajevima opisana je izražena atipija, dok su citogenetičke abnormalnosti tipičan nalaz (12). Kao i EBV-HLH, ovaj je limfom obilježen aberantnim CD8<sup>+</sup> limfocitima (12). Fulminantnim tijekom bolesti dolazi do brzog napredovanja do MOF-a, sepse i, u većini slučajeva, letalnog ishoda (114)

ANKL je vrlo rijetka bolest uzrokovana sustavnom proliferacijom NK stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi (12). Infekcija EBV-om prisutna je u oko 90 % slučajeva (116). Dio slučajeva nastaje iz CAEBV-a ili ENKTL-a. Tipični su simptomi i znakovi ANKL-a vrućica, malaksalost, hepatosplenomegalija, zatajenje jetre, pancitopenija i povišen LDH (10,114). Leukemične NK stanice čine od 5 do 80 % leukocita periferne krvi, a mogu pokazivati širok spektar atipija. Zbog opisanih slučajeva u kojima nije bilo faze leukemije, već se bolest prezentirala samo hepatosplenomegalijom i limfadenopatijom, bolest je prije nazivana agresivnom NK-staničnom leukemijom/limfomom (114). NK stanice infiltriraju koštanu srž, slezenu, jetru i kožu u različitom opsegu, a u slučaju razvoja HLH-a infiltracija koštane srži je izrazitija (114,125). Tumorske stanice obično izražavaju antigene CD56 i CD16. Kod značajnog dijela pacijenata dokazane su mutacije komponenti JAK/STAT signalizacijskog puta i povišene razine IL-10 što je možda dio etiopatogeneze ove bolesti (116). Koagulopatija je česta pojava. Iako su opisane subakutne kliničke slike, tijek je uglavnom fulminantan te u kratkom vremenu dolazi do razvoja MOF-a (10,116,125).

ENKTCL agresivni je limfom pozitivan na EBV. Glavne su značajke izražena nekroza, invazija i destrukcija krvnih žila te citotoksičan fenotip. Obično se razvija u gornjim dišnim putevima (nosna šupljina, paranazalni sinusi, nazofarinks i orofarinks, usna šupljina, nepce), ali može se pojaviti u drugim regijama (gastrointestinalni trakt, testisi, pluća, koža, SŽS)

(12,125). Simptomi nazalnog tipa uključuju gnojnu sekreciju iz nosa, nosnu opstrukciju i epistaksu (114,125). Bolest se može komplicirati razvojem HLH-a i širenjem izvan dišnog puta. Postoji i ektranazalni tip tumora (20-30 %) s prvom prezentacijom izvan dišnih puteva koji ima lošiju prognozu (114). Tumor je sastavljen od CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK stanica, a rjeđe od citotoksičnih T-limfocita (12,118). Stanice tumora pokazuju znakove atipije, kromosomske aberacije i mutacije komponenti JAK/STAT signalizacijskog puta. EBV pokazuje obrazac tipa II latentne faze (114).

EBV<sup>+</sup>PTCL rijedak je i agresivan oblik perifernog T-staničnog limfoma koji uglavnom zahvaća limfne čvorove bez zahvaćanja drugih, ektranodalnih regija (114,125). Glavni je znak generalizirana limfadenopatija, a mogu se javiti sustavni simptomi. Nekroza i destrukcija krvnih žila rjeđa je nego u ENKTCL-u. Stanice tumora pokazuju fenotip citotoksičnih CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-limfocita, rjeđe NK stanica, a EBV je prisutan u tipu II latentne faze. Rijetko se prezentira kao HLH (12,114).

#### **4.3.4.2. HLH povezan s CAEBV-om**

CAEBV uključuje nekoliko prethodno navedenih NK/T-staničnih limfoproliferativnih poremećaja. B-stanični CAEBV rijedak je i klasificiran kao s imunodeficijencijom povezan limfoproliferativni poremećaj, a zbog geografske raspodjele neki ga nazivaju i zapadnim podtipom CAEBV-a. Dakle, izraz CAEBV primarno se koristi za bolesti uzrokovane poremećajem NK stanica i T-limfocita (12). Patogeneza bolesti nije poznata, ali moguće je da ulogu imaju mutacije gena odgovornih za proliferaciju stanica, staničnu smrt i imunosti odgovor na EBV, a etiopatogenezi možda doprinose i delecije genoma EBV-a (11,125). Novija istraživanja pokazuju da takve delecije omogućuju uspostavljanje prelatentne abortivne litičke faze (opisano u potpoglavlju 2.3.), u kojoj je izražen značajan broj gena litičke faze, ali bez umnažanja virusnih čestica. Moguće je da ekspresija dijela litičkih gena pogoduje onkogenezi i razvoju limfoproliferativnih bolesti (11,32). Mogući način na koji EBV ulazi u NK stanice i T-limfocite opisan je u potpoglavlju 2.3. Ove se bolesti obično ne javljaju u pacijenata s mutacijama tipičnih gena povezanih s imunodeficijencijama te se imunodeficijencije smatraju isključnim faktorom za dijagnozu. CAEBV je definiran kao rekurentna pojava tipičnih simptoma i znakova IM-a (vrućica, limfadenopatija, hepatosplenomegalija ili povišena razina transaminaza) u razdoblju od 3 mjeseca uz prisutan nalaz povišene razine DNA EBV-a u krvi (EBV DNAemija), histološki nalaz bolesti u zahvaćenim organima i pozitivan nalaz EBV RNA u zahvaćenim tkivima (114,126,127). Tip

II latentne faze tipičan je za CAEBV, a EBV je uglavnom monoklonalnog podrijetla (3,114). Bez obzira na monoklonalnost, uglavnom nema histoloških dokaza maligne proliferacije, već histološka slika nalikuje na reaktivna upalna stanja. Dakle, CAEBV ima dvojne karakteristike imunodeficijencije i maligne neoplazme (3). Rjeđi su simptomi i znakovi sustavnog CAEBV-a osip i druge promjene na koži, jake reakcije na ubode komaraca, proljev i uveitis (114). Tijek bolesti može biti kroničan i polagan, ali može biti i akutan i težak, što je češće kod odraslih osoba (64,127). Oko 30 % osoba s CAEBV-om razvije HLH koji može biti prva prezentacija CAEBV-a ili se može pojaviti naknadno u tijeku bolesti (12). Osim HLH-a, moguće su druge komplikacije bolesti: DIK, jetreno zatajenje, aneurizme koronarnih arterija, zahvaćenost SŽS-a, intersticijska pneumonija i miokarditis (114). Klinička slika ovisi o razini viremije i imunskom stanju domaćina. Teža klinička slika i jači humoralni odgovor povezani su s T-staničnim oblikom CAEBV-a. NK-stanični oblik češće uključuje kožne simptome, a s vremenom može napredovati u ANKL ili ENKTCL (114). Za razliku od sEBV<sup>+</sup> T-NHL-a i EBV-HLH-a u kojima su umnoženi CD8<sup>+</sup> T-limfociti, u T-staničnom CAEBV-u umnoženi su CD4<sup>+</sup> T-limfociti, premda postoje slučajevi s umnoženim CD8<sup>+</sup> T-limfocitima. NK-stanični CAEBV obilježavaju umnožene NK stanice zbog čega ga je teško razlikovati od ANKL-a i EBV-HLH-a s umnažanjem NK stanica (12). Razine proupalnih citokina (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) povišene su (128). Postoje preklapanja između sustavnog i kožnog oblika bolesti.

HVLPD je jedna od kožnih prezentacija CAEBV-a. Nepoznate je etiologije. Za bolest su karakteristične spužvaste vezikulopapularne lezije unutar epidermisa, slične onima u klasičnoj vakciniformnoj hidroi, nakon čijeg povlačenja zaostaju ožiljci (124). U klasičnom se obliku kožne lezije nalaze na regijama izloženima suncu, a u teškom obliku nalaze se i na neizloženim dijelovima kože uz češći razvitak sustavnih simptoma (12). Epizode bolesti češće su u proljeće i ljeto. Umnoženi su CD8<sup>+</sup> limfociti i CD56<sup>+</sup> NK stanice. U zaraženim stanicama odvija se tip II latentne faze, a zaraženi T-limfociti uglavnom su monoklonalnog podrijetla. Kao i CAEBV, bolest može biti blaga, uz izolirano i povremeno zahvaćanje kože, ali i teška, agresivna, sustavna, uz razvoj HLH-a (64,114).

U sklopu SMBA-a javlja se izražena reakcija na ubode komaraca (12). Unatoč nazivu, bolest nije alergijska. Ubodi komaraca mogu potaknuti proliferaciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za antigene komaraca koji zatim potiču izražaj LMP1 u NK stanicama (114). LMP1 je protein EBV-a povezan s onkogenezom i imortalizacijom stanica kako je opisano u potpoglavlju 2.3. Na mjestu uboda komarca javljaju se crvenilo, bule, ulkusi, nekroza epidermisa, a kasnije ožiljci (114,125). Bolest se može prezentirati sustavnim simptomima (vrućica,

limfadenopatija, jetrena disfunkcija i hepatosplenomegalija) i razvojem HLH-a. Nakon smirivanja reakcije na ubod komarca oboljeli su asimptomatski do sljedećeg uboda komarca (114). Tipično su umnožene CD56<sup>+</sup> NK-stanice te reaktivni CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfociti, a EBV također pokazuje tip II latencije. Iz lokaliziranih oblika može se razviti sustavni CAEBV i NK/T-stanični limfomi (12).

#### 4.4. Dijagnostika

Dijagnoza EBV-om induciranog HLH-a temelji se na kriterijima za dijagnozu HLH-a (HLH-2004) i pozitivnom nalazu infekcije EBV-om. Infekciju EBV-om dijagnosticira se na temelju kvantitativnim PCR-om dokazanog povećanog broja kopija DNA u plazmi ili mononuklearnim stanicama periferne krvi, na temelju prisutnosti specifičnih protutijela na EBV ili dokazom EBER-a u tkivima *in situ* hibridizacijom (3,114). Smjernice HLH-2004 detaljno su opisane u potpoglavlju 3.5., a dijagnostičke metode kojima se potvrđuje zaraza EBV-om opisane su u potpoglavlju 2.7. Dio studija predlaže kvantitativni PCR za EBV DNA kao dio početnih pretraga koje se provode u svih pacijenata s HLH-om. Granična vrijednost kojom bi se definirala prisutnost ekstremno velikog broja kopija DNA EBV-a u krvi nije utvrđena. HLH u pacijenata koji imaju trajno umjerene do visoke vrijednosti EBV DNA mjerene PCR metodom trebao bi se smatrati HLH-om povezanim s EBV-om (12). U dijagnostici CAEBV-a i neneoplastičnog EBV-HLH-a prednost treba dati PCR analizi EBV-a u mononuklearnim stanicama periferne krvi, uz graničnu vrijednost od 10<sup>2.5</sup> kopija/μg (124,129). Nakon potvrde da se radi o HLH-u povezanom s EBV-om, daljnju dijagnostiku treba usmjeriti u otkrivanje podtipa tog sindroma. Radi utvrđivanja je li u podlozi razvoja HLH-a genetska mutacija, treba provesti genetske pretrage i protočnu citometriju kojima se utvrđuje ili postavlja sumnja na neki od podtipova pHLH-a (12). Utvrđi li se kod muških osoba (osobito dječaka) EBV-om induciran HLH i dokaže da su B-limfociti inficirani EBV-om, važno je provesti testove za XLP1 i XLP2 (78). Dijagnostičke metode vezane uz otkrivanje pojedinih podtipova pHLH-a opisane su u potpoglavlju 3.5. U slučaju da tim pretragama nije utvrđena nasljedna podloga razvoja HLH-a, radi utvrđivanja odgovarajućeg protokola liječenja pretrage treba usmjeriti na razlučivanje između vrlo sličnih podtipova EBV-om induciranog sHLH-a (114). Također treba provesti dodatne pretrage poput lumbalne punkcije, radi utvrđivanja zahvaćenosti SŽS-a, procjenu bubrežne i jetrene funkcije, kao i mikrobiološke pretrage za otkrivanje drugih uzročnika (12). Analizu HLA-a također je bitno provesti dovoljno rano za slučaj da se kod pacijenta utvrdi potreba za liječenjem metodom alogeničnog HSCT-a (12).

Patohistološka analiza aspirata i bioptata koštane srži, protočna citometrija i citogenetičke pretrage trebaju biti dio dijagnostičkog protokola. ENKTCL se obično dijagnosticira analizom zahvaćenog ekстранodalnog tkiva, EBV<sup>+</sup>PTCL analizom bioptata limfnog čvora, a dokazom EBV-a u bioptatu kožnih lezija, infiltrata iz jetre, tkiva SŽS-a i pluća može se potvrditi CAEBV (12,127). Pretrage dokazivanja EBER-a *in situ* hibridizacijom i imunohistokemijski testovi kojima se određuje fenotip T-limfocita u infiltratima (CD4<sup>+</sup> ili CD8<sup>+</sup>, patološki gubitak T-limfocitnih biljega poput CD5 ili CD7) također mogu pomoći u razlikovanju podtipova EBV-om induciranog sHLH-a (3,12). Iako dokaz aberantnih T-limfocita nije dovoljan za potvrdu postojanja novotvorine, takav nalaz može olakšati usmjeravanje dijagnoze prema neneoplastičnom EBV-HLH-u ili HLH-u u sklopu novotvorina povezanih s EBV-om. Populacija aberantnih T-limfocita u CAEBV-u obično je CD4<sup>+</sup> fenotipa, za razliku od sEBV<sup>+</sup> T-NHL i neneoplastičnog EBV-HLH za koje je tipičan CD8<sup>+</sup> fenotip. Ipak, postoje iznimke poput CD8<sup>+</sup> CAEBV-a pa se ponekad svim navedenim pretragama ne uspijeva razjasniti radi li se o CAEBV-u, EBV-HLH-u ili sEBV<sup>+</sup> T-NHL-u (114,130). Iako citogenetičke abnormalnosti i nalaz stanične atipije mogu upućivati na dijagnozu sEBV<sup>+</sup> T-NHL-a, u većini slučajeva teško je razlikovati ovaj tip limfoma od drugih novotvorina povezanih s EBV-om i neneoplastičnog EBV-HLH-a. Citogenetičke abnormalnosti specifičan su, ali neosjetljiv kriterij za sEBV<sup>+</sup> T-NHL (12,114). Istraživanja pokazuju izraženiju hiperbilirubinemiju, hiperferitinemiju, mlađu dob i više vrijednosti EBV DNA u krvi kao osjetljive, ali nespecifične nalaze u sEBV<sup>+</sup> T-NHL-u (12). Sličan dijagnostički problem vezan je i uz NK-stanični CAEBV koji je teško razlikovati od ANKL-a i neneoplastičnog EBV-HLH-a s NK-staničnom proliferacijom (12). Također postoje i preklapanja sustavnog i kožnog oblika CAEBV-a, a postoji i mogućnost progresije lokaliziranog oblika u sustavni (125). SMBA obično prate infiltrati NK stanica, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita u koži, a u perifernoj su krvi na EBV pozitivne NK stanice, za razliku od HVLDP-a u kojemu stanice uglavnom potječu od T-limfocita (12). Metode analiziranja klonalnosti T-staničnih receptora korisne su utvrđivanju monoklonalnog podrijetla EBV-om zaraženih stanica, ali monoklonalnost/poliklonalnost također nije kriterij specifičan za određeni podtip EBV-om induciranog HLH-a (3,114,130). Dijagnoza neneoplastičnog HLH-a trebala bi biti isključna, nakon provedenih pretraga kojima se isključuje postojanje novotvorina ili pHLH-a. Razvijen je model probira pedijatrijskih pacijenata pozitivnih na EBV kojim je moguće posumnjati na EBV-HLH na temelju parametara koji se mjere rutinski kod većine pacijenata. Model uključuje pet parametara s određenim graničnim vrijednostima: broj trombocita (< 90 × 10<sup>3</sup>/μL), broj neutrofila (< 1.0 × 10<sup>3</sup>/μL), razina albumina (< 38.5 g/L), hemoglobina (90 g/L) i LDH-a (> 637 IU/L). Svaki



parametar donosi bodove, a maksimalan je broj bodova 80. Uz graničnu vrijednost od 29 bodova osjetljivost tog modela bila je 89.2 %, specifičnost 89.5 %, pozitivna prediktivna vrijednost 26.8 %, a negativna prediktivna vrijednost 99.5 % (131).

Uloga PET-CT-a s fluorodeoksiglukozom u utvrđivanju postojanja limfoma u sklopu kojeg se razvio EBV-om induciran HLH nije jasno utvrđena zbog nedostatka istraživanja koja bi potvrdila vrijednost te dijagnostičke metode u ovoj primjeni (12). Na temelju seroloških pretraga može se naslutiti o kojem se obliku EBV-om induciranog HLH-a radi. Za CAEBV tipičan je nalaz visokog titra anti-VCA IgG i anti-EA IgG protutijela, uz čest nalaz anti-VCA IgA i anti-EA IgA, a za sEBV<sup>+</sup> T-NHL nalaz anti-VCA IgG protutijela uz čestu odsutnost IgM razreda protutijela usmjerenog na isti antigen (114).

U slučaju nemogućnosti određivanja točnog podtipa EBV-om induciranog HLH-a preostaje pretpostavka dijagnoze na temelju terapijskog odgovora. Pacijenti koji se ne oporavljaju ili ne odgovaraju na terapiju vjerojatnije su razvili HLH u sklopu CAEBV-a ili sEBV<sup>+</sup> T-NHL-a, a oni s dobrim odgovorom na terapiju vjerojatno boluju od neneoplastičnog EBV-HLH-a (12). Ponovna pojava sustavnih simptoma u slučajevima u kojima je došlo do poboljšanja nakon primjene terapije govori u prilog CAEBV-u, a ne sEBV<sup>+</sup> T-NHL-u. Važno je utvrditi kod kojih je pacijenata u podlozi razvoja HLH-a prisutna novotvorina i CAEBV jer takvi pacijenti zahtijevaju prilagodbu intenziteta terapije i imaju lošiju prognozu.

## **4.5. Liječenje, prevencija i prognoza**

Budući da je riječ o rijetkom sindromu koji obuhvaća heterogenu skupinu podtipova, ne postoji jedinstven protokol liječenja. Pristup liječenju ovisi o postojanju i vrsti temeljne bolesti u sklopu koje se razvio EBV-om induciran HLH. Dio smjernica temelji se na univerzalnim smjernicama HLH-94 i HLH-2004, koje su detaljno opisane u potpoglavlju 3.6. Tim dijagnostičko-terapijskim smjernicama nisu definirani različiti podtipovi EBV-om induciranog HLH-a te je stoga potrebna njihova prilagodba u primjeni u ovih pacijenata. Zbog rijetke pojave ovoga sindroma, istraživanja sigurnosti i učinkovitosti primjene pojedinih terapija za liječenje EBV-om induciranog HLH-a uglavnom su temeljena na malom broju ispitanika, ali su, u nedostatku definiranih protokola liječenja, vrijedna informacija, osobito u slučaju izostanka odgovora na prvu liniju terapije. Suportivna terapija i terapija komplikacija opisana u potpoglavlju 3.6. primjenjuje se i u EBV-om induciranom HLH-u.

EBV-om induciran HLH koji se javlja u sklopu fHLH-a i drugih nasljednih sindroma liječi se po principu liječenja tih nasljednih poremećaja. Terapija za pHLH detaljno je opisana u potpoglavlju 3.6., a uključuje terapiju prema smjernicama HLH-94 i HLH-2004. Terapija

uključuje imunosupresivnu i kemoterapiju uz HSCT kao ciljnu terapiju izlječenja. HSCT kao terapija sindroma XLP2 povezan je s lošom prognozom, ali je primjena kondicioniranja smanjenog intenziteta dovela do poboljšanja ishoda (113). U potpoglavlju 3.6. opisane su i nove terapije koje su potencijalni kandidati za liječenje pHLH-a, a neke od njih još su u fazi istraživanja, poput inhibitora IL-18 u liječenju pHLH u sklopu XLP2. Također, primjena rituksimaba (anti-CD20 protutijela) može biti korisna u liječenju XLP-a jer se primjenom tog monoklonskog protutijela smanjuje broj B-limfocita umnoženih u ovim sindromima, a posljedično i viremija jer su B-limfociti rezervoar EBV-a (3).

Liječenje EBV-om induciranog sHLH-a složenije je zbog raznolike etiološke podloge. Kada je isključeno postojanje nasljednih sindroma sa sklonošću razvoja HLH-a, kao i postojanje limfomproliferativnih bolesti pozitivnih na EBV, ili je priroda bolesti nepoznata, može se započeti terapiju za neneoplastični EBV-HLH. Prvu liniju terapije čini monoterapija kortikosteroidima ili IVIG-om, ili kombinacija kortikosteroida i ciklosporina A (3,78). Neka istraživanja pokazuju da oko 60 % pedijatrijskih slučajeva EBV-HLH-a ne zahtijeva terapiju citotoksičnim lijekovima (132). U slučaju slabog odgovora na terapiju (izostanak pada tjelesne temperature unutar 48 sati), može se primijeniti HLH-94/HLH-2004 protokol, premda nema studija koje bi pokazale učinkovitost ove terapije u EBV-HLH-u (3,78). Etopozid je predložen kao dio početne terapije za EBV-HLH zbog mogućeg učinka na blokiranje EBV-a. Primjena etopozida kao dijela početne terapije (unutar četiri tjedna od dijagnoze) povezana je sa statistički značajno duljim preživljenjem u odraslih pacijenata te je zbog toga preporučen kao dio inicijalnog protokola liječenja odraslih, ali ne i djece s EBV-HLH-om. Mogući mehanizam ovakvog učinka je smanjenje broja umnoženih T-limfocita aktiviranih EBV-om uz posljedično smanjenje količine cirkulirajućih proupalnih citokina (132). Primjena kemoterapijskih režima za liječenje CAEBV-a također može biti korisna u liječenju refrakternog neneoplastičnog EBV-HLH-a (123). Opisan je slučaj uspješnog liječenja EBV-HLH-a kombinacijom ganciklovira i rano uvedenih visokih doza metilprednizolona, uz postupno smanjenje doze tijekom pet mjeseci. Uz ganciklovir može se primijeniti i CMV hiperimunoglobulin koji je pokazao učinkovitost u snižavanju broja kopija EBV-a (133). Istraživanje iz Kine pokazuje značajno bolji odgovor (potpuni i djelomični) odraslih pacijenata na liječenje kemoterapijskim režimom DEP (liposomalni doksorubicin, etopozid, visoke doze metilprednizolona) i L-DEP (DEP u kombinaciji s pegaspargazom) u odnosu na liječenje uobičajenim HLH-94/HLH-2004 protokolom. Odgovor na liječenje zabilježen je pri primjeni ovih režima u inicijalnoj terapiji i u terapiji spasa, uz značajno bolji odgovor na

L-DEP u odnosu na DEP režim (134).

U nedostatku učinkovite terapije, u slučaju refrakternog neneoplastičnog EBV-HLH-a potrebno je primijeniti HSCT, ali i razmotriti mogućnost alternativne dijagnoze EBV-om inducirane limfoproliferativne bolesti (3).

Nekoliko dodatnih terapija istraživano je za liječenje EBV-HLH-a. Broj kopija EBV DNA veći od 10000 po  $\mu\text{g}$  DNA periferne krvi zahtijeva agresivnije liječenje, ponekad uz primjenu rituksimaba (133). Rituksimab u kombinaciji s terapijom iz HLH-94/HLH-2004 protokola dovodi do kliničkog poboljšanja uz smanjenje viremije sukladno prethodno objašnjenom mehanizmu. Ipak, T-limfociti i NK stanice također su stanice koje mogu biti zaražene EBV-om te rituksimab kao monoterapija nema željeni učinak. Budući da je jedna od mogućih nuspojava rituksimaba hipogamaglobulinemija, treba biti oprezan s primjenom ovog lijeka (3,61,74). Primjena rituksimaba pokazala se učinkovitijom u pacijenata u Europi nego u Kini, vjerojatno zbog manjeg broja B-limfocita zaraženih EBV-om u slučajevima iz Kine (134). Nivolumab, inhibitor vezivanja proteina programirane stanične smrti 1 (PD-1, prema engl. *programmed cell death protein 1*) s ligandom programirane smrti 1 (PD-L1, prema engl. *programmed death-ligand 1*) pokazao je učinkovitost u istraživanju provedenom na malom uzorku pacijenata s refrakternim i relapsirajućim oblikom EBV-HLH-a. Premda kontraindicativna, uporaba ovog monoklonskog protutijela koje uzrokuje disinhibiciju imunskog odgovora pokazala se učinkovitom ne samo u kontroli bolesti, već i u postizanju nemjerljivih razina EBV DNA u krvi. Budući da LMP1 potiče ekspresiju PD-L1 aktivacijom puta JAK/STAT i NF- $\kappa$ B, moguće je da je učinak nivolumaba rezultat ponovne uspostave normalne citotoksične aktivnosti nakon inhibiranja vezivanja PD-L1 s PD-1 čime se postiže učinkovita eradikacija EBV-a (135,136). Sličan učinak uz nemjerljive razine EBV DNA opisan je pri primjeni sintilimaba, monoklonskog protutijela usmjerenog na PD-1, u slučaju EBV-HLH-a refrakternog na prethodno višestruko liječenje kemoterapijom i HSCT-om (137). Učinkovita primjena emapalumaba u slučajevima refrakternog EBV-HLH-a opisana je u nekoliko slučajeva (3). Istraživanja rituksolitiniba kao prve linije terapije pokazale su objektivnu stopu odgovora od 87.5 % u djece oboljele od EBV-HLH-a (138). Istodobna izrazita hiperbilirubinemija ( $> 1.8 \text{ mg/dL}$ ) i hiperferitinemija ( $> 20300 \text{ ng/mL}$ ) pri dijagnozi povezana je s lošijim ishodima (115). Zahvaćenost SZS-a, starija dob i lošije opće tjelesno stanje prema Karnofsky ljestvici također su negativni prognostički faktori u liječenju HLH-a (133,139). Istraživanja su pokazala veće vrijednosti prokalcitonina,  $\beta$ 2-mikroglobulina, CRP-a, sCD25, kreatinina, ureje, LDH-a i niže vrijednosti natrija i albumina kod preminulih o odnosu na preživjele (129,140). Značajno bolja prognoza

zabilježena je u pacijenata kod kojih je postignut potpuni ili djelomični odgovor na početnu terapiju (134). Veća smrtnost tijekom inicijalne faze liječenja (prvih osam tjedana) povezana je s dobi starijom od 18 godina, višim vrijednostima prokalcitonina ( $> 2 \mu\text{g/L}$ ), sCD25, ureje u krvi i većim brojem kopija EBV-DNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Na temelju tih vrijednosti sastavljen je sustav stratifikacije s graničnom vrijednosti koja određuje vjerojatnost smrti tijekom perioda inicijalne terapije. Kod pacijenata s višim rizikom od smrti tijekom inicijalne faze bolji su ishodi zabilježeni ako je kao dio inicijalne terapije primijenjen etopozid (129). Druga istraživačka grupa razvila je drugi sustav predviđanja prognoze preživljenja, Poboljšani HLH indeks (IH, prema engl. *Improved HLH index*), koji se temelji na vrijednostima sCD25, prokalcitonina i procijenjene brzine glomerularne filtracije (eGFR, prema engl. *estimated glomerular filtration rate*). Prema toj klasifikaciji pacijenti su podijeljeni u tri skupine: IH- (sCD25  $\leq 18000 \text{ pg/mL}$ , prokalcitonin  $\leq 1.8 \text{ mg/mL}$ , eGFR  $\geq 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ), IH1+ (samo sCD25  $\geq 18000 \text{ pg/mL}$  ili samo eGFR  $\leq 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ) i IH2+ (ostali pacijenti). Uz ispunjavanje kriterija HLH-2004 ili HScore  $\geq 169$  zabilježene su značajne razlike u preživljenju između ovih triju skupina. Značajna razlika u preživljenju zabilježena je u skupinama IH1+ i IH2+ između pacijenata koji su liječeni i koji nisu liječeni HSCT-om, a u skupini IH- nije bilo razlike ovisne o provođenju HSCT-a (140). Početni pad broja kopija EBV DNA u plazmi (u 2. tjednu) upućuje na manju vjerojatnost ponovne pojave simptoma. Ipak, porast EBV DNA može biti posljedica umnažanja EBV-om zaraženih B-limfocita, a ne posljedica ponovnog razvoja bolesti. Dob manja od 2 godine pri dijagnozi rizični je faktor za rekurentni EBV-om induciran HLH (141). Ukupno preživljenje pacijenata liječenih alogeničnim HSCT-om znatno je dulje (52.8 %) od preživljenja pacijenata koji nisu liječeni tom metodom (0.66%), a dulje preživljenje zabilježeno je u onih pacijenata kod kojih je remisija postignuta i prije primjene HSCT-a (134). Istraživanja pokazuju različite vrijednosti ukupnog trogodišnjeg preživljenja (91.2 %, (115), 66.7 % (61)). Niže vrijednosti preživljenja zabilježene su u odraslih pacijenata uz jednogodišnje preživljenje od 22 % (129) i 29.3 % (140).

Liječenje NK/T-staničnih novotvorina povezanih s EBV-om važno je započeti što ranije kako bi se spriječio razvoj komplikacija, uključujući HLH. Budući da je liječenje osnovne bolesti ključno za prevenciju HLH-a, u nastavku su opisane terapijske mogućnosti za liječenje NK/T-staničnih novotvorina povezanih s EBV-om.

Grupa stručnjaka iz Osake (Japan) donijela je smjernice za liječenje CAEBV-a temeljene na dugogodišnjem iskustvu liječenja pacijenata koji boluju od CAEBV-a, od kojih su neki razvili

HLH. Predložili su terapijski protokol u tri koraka: 1) imunokemoterapija radi smirivanja upale; 2) citoreduktivna višestruka kemoterapija; 3) rekonstruktivna terapija alogeničnim HSCT-om (127). Primjena antivirusne terapije (aciklovira), koju ne uključuje ovaj protokol, možda bi imala učinka u ranoj fazi primarne infekcije, ali nema učinka u CAEBV-u (64). Prvi korak uključuje prednizolon, ciklosporin A i etopozid. Etopozid nije obavezan, ali primjenjuje se u slučaju razvoja HLH-a. Prvi korak primjenjuje se odmah po potvrdi dijagnoze CAEBV-a (127). Drugi korak, uz nastavak liječenja nižim dozama prednizolona i ciklosporina A, čine dvije linije liječenja: prvu čini petodnevni modificirani CHOP režim (vinkristin, ciklofosamid, pirarubicin, prednizolon), a drugu devetodnevni ESCAP režim (etopozid, citarabin, L-asparaginaza, metilprednizolon, prednizolon). Cilj je druge linije smanjiti rizik od progresije bolesti prije alogeničnog HSCT-a, smanjiti mogućnost odbacivanja presatka i spriječiti relaps nakon transplantacije (12). Druga linija primjenjuje se u slučaju neuspjeha prve linije, a u slučaju daljnjeg izostanka odgovora na terapiju prelazi se na treći korak. Učinkovitost kemoterapije mjeri se smanjenjem broja kopija EBV DNA (64,127). Istraživani su i drugi kemoterapijski režimi poput režima SMILE (deksametazon, metotreksat, ifosfamid, L-asparaginaza i etopozid) (64). Nasuprot ovim preporukama, postoje pretpostavke da su antraciklinski kemoterapeutici, uključeni u neke prethodno navedene protokole, neučinkoviti u liječenju CAEBV-a zbog mehanizma izbacivanja tih molekula iz NK-stanica i T-limfocita pomoću P-glikoproteina izraženog na njima (118). Tijekom primjene kemoterapije treba pratiti simptome pogoršanja (vrućica, jetrena disfunkcija, hipercitokinemija) na početku primjene kemoterapije i u periodu oporavka od mijelosupresije. Nemjerljiva razina EBV DNAemije nakon drugog koraka znak je potpune molekularne remisije te je u tom slučaju potrebno praćenje bez nužnog prelaska na treći korak (127). Iskustva iz SAD-a pokazuju mjerljivo, ali kratkotrajno poboljšanje nakon primjene rituksimaba i autolognih, za EBV specifičnih, citotoksičnih T-limfocita (128).

Trećem koraku prethodi terapija niskim dozama etopozida i citarabina, a zatim kondicioniranje smanjenog intenziteta (fludarabin, melfalan, antitimocitni globulin, metilprednizolon, etopozid). Reaktivacija bolesti može se pojaviti na početku kondicioniranja i pri primjeni antitimocitnog globulina (127). Kondicioniranje smanjenog intenziteta povezano je s boljim trogodišnjim ukupnim preživljenjem nego mijeloablativno kondicioniranje, bez razlika ovisnih o tipu transplantacije (matične stanice krvi iz pupkovine, periferne krvi ili koštane srži) (127,142). Alternativni terapijski protokoli za CAEBV bez HLH-a uključuju primjenu kombinacije antivirusnog lijeka ganciklovira i inhibitora proteasoma bortezomiba uz prisutnost kojeg bi ganciklovir uzrokovao smrt zaraženih stanica

(64). U slučaju da pacijenti s CAEBV-om razviju sliku HLH-a, treba započeti liječenje prema protokolu HLH-1994 i nastaviti s terapijom održavanja do provođenja alogeničnog HSCT-a (64). Premda se CAEBV ponekad doima kao samoograničavajuća i prolazna bolest, odgoda radikalne terapije povećava rizik teških komplikacija poput HLH-a i MOF-a zbog kojih je ponekad kontraindicirano provoditi predviđeni protokol liječenja (64,127,128). Rano uvođenje i dovršetak terapije bez perioda opreznog promatranja (engl. *watchful waiting*) pokazalo se ključnim u liječenju CAEBV-a uz ukupno trogodišnje preživljenje od  $75.8 \pm 4.8$  %, odnosno  $87.3 \pm 4.2$  % za pacijente koji su liječeni trećim korakom protokola, tj. HSCT-om (64,127). Petnaestogodišnje preživljenje nakon HSCT-a iznosi 60 %, a bez HSCT-a 25 % (118). Unatoč prethodno opisanom protokolu liječenja, novije retrospektivne analize pokazuju bolje preživljenje pacijenata koji su liječeni samo HSCT-om u odnosu na one koji su liječeni kombinacijom kemoterapije i HSCT-a. U razmatranju tog podatka treba uzeti u obzir moguću pristranost u izboru režima liječenja ovisno o težini kliničke slike pacijenata (117). Prognoza bolesti bolja je za pedijatrijsku populaciju nego za odrasle (124,125). Ipak, dio autora ne slaže se s pristupom ranog liječenja i zastupa pristup opreznog promatranja do pogoršanja simptoma (64). Liječenje HVLPD-a i SMBA-a ovisi o prezentaciji. U slučaju sustavne progresije bolesti, jedina je metoda izlječenja, kao i kod sustavnog CAEBV-a, primjena HSCT-a. Pacijenti s proširenom bolesti imaju lošiju prognozu (118).

U liječenju sEBV<sup>+</sup> T-NHL-a korišteni su kemoterapijski protokoli temeljeni na etopozidu i režim CHOP, ali bez većeg uspjeha. Uspješnijim se pokazalo liječenje režimom SMILE i HSCT-om (118). Za terapiju ANKL-a ne postoji jedinstveni režim liječenja, međutim kemoterapijski režimi koji uključuju L-asparaginazu (npr. SMILE, AspaMetDex i VIDL) pokazali su se učinkovitima. Ipak, takve su terapije samo kratkotrajno rješenje (116). Srednje preživljenje osoba s ANKL-om iznosi manje od dva mjeseca (118). Iskustvo temeljeno na malom broju pacijenata govori u prilog primjene HSCT-a u liječenju ANKL-a. Ipak, bez obzira na porast dvogodišnjeg preživljenja od 0 % do 38 % nakon primjene HSCT-a, većina pacijenata liječenih tom metodom nije preživjela u duljem praćenju ishoda (116,118). Inhibitori vezivanja PD-1 s PD-L1, kao što su pembrolizumab i nivolumab, pokazuju obećavajuće rezultate u liječenju ove leukemije (116). U liječenju ENKTCL-a koristi se kombinirana kemoradioterapija. Opisani su različiti protokoli liječenja, uključujući primjenu kemoterapije i radioterapije u slijedu (sekvencijski), istovremenu primjenu kemoterapije i radioterapije, kao i tzv. *sendvič-kemoradioterapiju* (10,118). Potpuni odgovor na kemoradioterapiju, ovisno o režimu liječenja, iznosi od 45 % do 100 %, uz stopu objektivnog

odgovora od 78 % do 100 % (10). Niži postotci zabilježeni su u liječenju viših stadija limfoma. U višim stadijima bolesti učinkovitim se pokazao kemoterapijski protokol SMILE (10,118). Uloga HSCT-a u liječenju ENKTCL-a nije jasna zbog oskudnih informacija temeljenih na malom broju pacijenata liječenih ovom metodom (10). Uloga monoklonskih protutijela usmjerenih na PD-L1 također se istražuje kao terapijsko rješenje (10,118). Opisan je uspješan slučaj korištenja nivolumaba u liječenju EBV-HLH-a koji se razvio nakon prethodne remisije ENKTCL-a. Nakon primjene nivolumaba zabilježen je pad razine IFN- $\gamma$  i IL-2 u perifernoj krvi uz nemjerljivo niske razine EBV DNA. Poslije dva ciklusa terapije nivolumabom primijenjen je HSCT čime se postigla ponovna dugotrajna remisija (136).

## **5. Zaključak**

Heterogenost kliničke slike, širok spektar uzroka i relativno rijetka pojavnost čine EBV-om induciran HLH dijagnostičkim i terapijskim izazovom. Zbog svega navedenog, poznavanje patofiziologije stanja koja prethode razvoju HLH-a, dijagnostičkih kriterija, epidemioloških obilježja oboljelih i terapijskih protokola bitno je za sprečavanje teških, a u slučaju neliječenja fatalnih ishoda. Istraživanja novih učinkovitih terapija, osobito onih koje uključuju primjenu monoklonskih protutijela i ciljane terapije, uz sve manju pojavnost neželjenih učinaka pri HSCT-u, daju obećavajuće rezultate u liječenju ovog sindroma.

## **6. Zahvale**

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Ingi Mandac Smoljanović na savjetima i pomoći u izradi diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima na stalnoj i bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom čitavog mog školovanja, a osobito im hvala na motivaciji i savjetima koje su mi davali u stresnim trenucima studiranja, uvijek misleći na moje dobro. Zahvaljujem i braći, Josipu i Matiji, što su uvijek bili spremni pomoći i što sam u njima uvijek imao primjer koji mogu slijediti. Hvala kolegama i prijateljima na zajedničkim trenucima koji su studiranje učinili lakšim i radosnijim. Hvala zboru i glazbi koji su mi uvijek pružali odmor i utočište od fakultetskih briga.



## 7. Literatura

1. Koumadoraki E, Madouros N, Sharif S, Saleem A, Jarvis S, Khan S. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and Infection: A Literature Review. *Cureus*. 14(2):e22411.
2. Wilson C, Lee WI, Cook MC, Smyth L, Talaulikar D. Correlation of haemophagocytosis with clinical criteria of haemophagocytic lymphohistiocytosis and recommendations for bone marrow reporting. *Pathology (Phila)*. 2022 Jun;54(4):434–41.
3. Imashuku S, Morimoto A, Ishii E. Virus-triggered secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr*. 2021;110(10):2729–36.
4. Struna | Hrvatsko strukovno nazivlje [Internet]. Zagreb: Hrvatski institut za jezik i jezikoslovlje. Fagocitoza; [pristupljeno 21. 4. 2023.]. Dostupno na: <http://struna.ihjj.hr/naziv/fagocitoza/26409/>
5. Chandra H, Chandra S, Kaushik R, Bhat N, Shrivastava V. Hemophagocytosis on Bone Marrow Aspirate Cytology: Single Center Experience in North Himalayan Region of India. *Ann Med Health Sci Res*. 2014;4(5):692–6.
6. World Health Organisation. ICD-10 [Internet]. [pristupljeno 13. 6. 2023.]. Dostupno na: <https://icd.who.int/browse10/2019/en>
7. World Health Organisation. ICD-11 [Internet]. [pristupljeno 13. 6. 2023.]. Dostupno na: <https://icd.who.int/en>
8. Risma KA, Marsh RA. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Clinical Presentations and Diagnosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Mar;7(3):824–32.
9. Henter JI, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, i sur. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124–31.
10. Kimura H, de Leval L, Cai Q, Kim WS. EBV-associated NK and T-cell lymphoid neoplasms. *Curr Opin Oncol*. 2022 Sep;34(5):422–31.
11. Damania B, Kenney SC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*. 2022 Sep 29;185(20):3652–70.
12. El-Mallawany NK, Curry CV, Allen CE. Haemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein–Barr virus: a complex relationship with diverse origins, expression and outcomes. *Br J Haematol*. 2022;196(1):31–44.
13. Young LS. Epstein–Barr Virus (Herpesviridae). U: Bamford DH, Zuckerman M, editors. *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2021 [pristupljeno 26. 4. 2023.]. Str. 267–77. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338212788>
14. Beader N. Herpesvirusi: Epstein-Barr virus. U: Kalenić S, ur. *Medicinska mikrobiologija*. 2. izmijenjeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 410–24.

15. Humans IWG on the E of CR to. EPSTEIN-BARR VIRUS. U: Biological Agents [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 2012 [pristupljeno 13. 5. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304353/>
16. Cui X, Snapper CM. Epstein Barr Virus: Development of Vaccines and Immune Cell Therapy for EBV-Associated Diseases. *Front Immunol.* 2021 Oct 8;12:734471.
17. Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat Med.* 2002 Jun;8(6):594–9.
18. Jiang L, Xie C, Lung HL, Lo KW, Law GL, Mak NK, i sur. EBNA1-targeted inhibitors: Novel approaches for the treatment of Epstein-Barr virus-associated cancers. *Theranostics.* 2018 Oct 22;8(19):5307–19.
19. Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol.* 2019 Oct;72(10):651–8.
20. Nanbo A. Epstein-Barr Virus Exploits the Secretory Pathway to Release Virions. *Microorganisms.* 2020 May 13;8(5):729.
21. Vockerodt M, Yap LF, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, i sur. The Epstein–Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J Pathol.* 2015;235(2):312–22.
22. Aktivacija stanica B i stvaranje protutijela. U: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, ur. *Stanična i molekularna imunologija.* 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 239–63.
23. Fotheringham JA, Raab-Traub N. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2 Induces Autophagy To Promote Abnormal Acinus Formation. *J Virol.* 2015 Jun 3;89(13):6940–4.
24. Kurth J, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R. Epstein–Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 15;100(8):4730–5.
25. Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. The pathogenesis of Epstein–Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol.* 2013 Jun 1;3(3):227–32.
26. Minamitani T, Yasui T, Ma Y, Zhou H, Okuzaki D, Tsai CY, i sur. Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein–Barr virus LMP2A. *Proc Natl Acad Sci.* 2015 Sep 15;112(37):11612–7.
27. Vistarop AG, Cohen M, De Matteo E, Preciado MV, Chabay PA. Analysis of Epstein-Barr virus infection models in a series of pediatric carriers from a developing country. *Sci Rep.* 2016 Mar 18;6:23303.
28. Murata T, Sugimoto A, Inagaki T, Yanagi Y, Watanabe T, Sato Y, i sur. Molecular Basis of Epstein–Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses.* 2021 Dec;13(12):2344.
29. Coleman CB, Daud II, Ogolla SO, Ritchie JA, Smith NA, Sumba PO, i sur. Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells in Healthy Kenyan Children. *J Infect Dis.* 2017 Sep 15;216(6):670–7.

30. Hudnall SD, Ge Y, Wei L, Yang NP, Wang HQ, Chen T. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2005 Apr;18(4):519–27.
31. Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P, Fournié JJ. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2003 Jun 15;170(12):5993–8.
32. Murata T, Okuno Y, Sato Y, Watanabe T, Kimura H. Oncogenesis of CAEBV revealed: Intragenic deletions in the viral genome and leaky expression of lytic genes. *Rev Med Virol.* 2020 Mar;30(2):e2095.
33. Urođena imunost. U: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, ur. Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 51–84.
34. Gent M van, Braem SGE, Jong A de, Delagic N, Peeters JGC, Boer IGJ, i sur. Epstein-Barr Virus Large Tegument Protein BPLF1 Contributes to Innate Immune Evasion through Interference with Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS Pathog.* 2014 velj;10(2):e1003960.
35. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IGJ, Buisson M, i sur. EBV Lytic-Phase Protein BGLF5 Contributes to TLR9 Downregulation during Productive Infection. *J Immunol.* 2011 Feb 1;186(3):1694–702.
36. Vilmen G, Glon D, Siracusano G, Lussignol M, Shao Z, Hernandez E, i sur. BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction. *Autophagy.* 2021 Jun 3;17(6):1296–315.
37. Gupta S, Ylä-Anttila P, Sandalova T, Sun R, Achour A, Masucci MG. 14-3-3 scaffold proteins mediate the inactivation of trim25 and inhibition of the type I interferon response by herpesvirus deconjugases. *PLOS Pathog.* 2019 stu;15(11):e1008146.
38. Xing J, Zhang A, Zhang H, Wang J, Li XC, Zeng MS, i sur. TRIM29 promotes DNA virus infections by inhibiting innate immune response. *Nat Commun.* 2017 Oct 16;8(1):945.
39. Lange PT, White MC, Damania B. Activation and Evasion of Innate Immunity by Gammaherpesviruses. *J Mol Biol.* 2022 Mar 30;434(6):167214.
40. Chijioke O, Landtwing V, Münz C. NK Cell Influence on the Outcome of Primary Epstein–Barr Virus Infection. *Front Immunol [Internet].* 2016 [pristupljeno 12. 5. 2023.];7. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00323>
41. Marsh RA, Bleesing JJ, Chandrakasan S, Jordan MB, Davies SM, Filipovich AH. Reduced-Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation Is an Effective Treatment for Patients with SLAM-Associated Protein Deficiency/X-linked Lymphoproliferative Disease Type 1. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Oct 1;20(10):1641–5.
42. Chung BK, Tsai K, Allan LL, Zheng DJ, Nie JC, Biggs CM, i sur. Innate immune control of EBV-infected B cells by invariant natural killer T cells. *Blood.* 2013 Oct 10;122(15):2600–8.

43. Chaigne-Delalande B, Li FY, O'Connor GM, Lukacs MJ, Jiang P, Zheng L, i sur. Mg<sup>2+</sup> Regulates Cytotoxic Functions of NK and CD8 T Cells in Chronic EBV Infection Through NKG2D. *Science*. 2013 Jul 12;341(6142):186–91.
44. Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, Harrison N, i sur. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol*. 2005;129(2):266–74.
45. Balfour HH Jr, Odumade OA, Schmeling DO, Mullan BD, Ed JA, Knight JA, i sur. Behavioral, Virologic, and Immunologic Factors Associated With Acquisition and Severity of Primary Epstein–Barr Virus Infection in University Students. *J Infect Dis*. 2013 Jan 1;207(1):80–8.
46. Chijioke O, Müller A, Feederle R, Barros MHM, Krieg C, Emmel V, i sur. Human Natural Killer Cells Prevent Infectious Mononucleosis Features by Targeting Lytic Epstein-Barr Virus Infection. *Cell Rep*. 2013 Dec 26;5(6):1489–98.
47. Diferencijacija i uloge izvršnih CD8<sup>+</sup> stanica T. U: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, ur. *Stanična i molekularna imunologija*. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 231–8.
48. Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. The Immunology of Epstein-Barr Virus–Induced Disease. *Annu Rev Immunol*. 2015;33(1):787–821.
49. Bu W, Joyce MG, Nguyen H, Banh DV, Aguilar F, Tariq Z, i sur. Immunization with Components of the Viral Fusion Apparatus Elicits Antibodies That Neutralize Epstein-Barr Virus in B Cells and Epithelial Cells. *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1305-1316.e6.
50. Albanese M, Tagawa T, Bouvet M, Maliqi L, Lutter D, Hoser J, i sur. Epstein–Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Oct 18;113(42):E6467–75.
51. Coşkun O, Yazici E, Şahiner F, Karakaş A, Kiliç S, Tekin M, i sur. Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus reactivation in the intensive care unit. *Med Klin - Intensivmed Notfallmedizin*. 2017 Apr 1;112(3):239–45.
52. Vince A. Virus Epstein-Barr. In: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, editors. *Klinička infektologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 470–8.
53. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, i sur. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022 Jan 21;375(6578):296–301.
54. Balfour HH, Dunmire SK, Hogquist KA. Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunol*. 2015 Feb 27;4(2):e33.
55. Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Münz C, Hislop AD. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol*. 2014 Apr;35(4):159–69.
56. Bartlett A, Williams R, Hilton M. Splenic rupture in infectious mononucleosis: A systematic review of published case reports. *Injury*. 2016 Mar;47(3):531–8.

57. Hjalgrim H, Ekström Smedby K, Rostgaard K, Molin D, Hamilton-Dutoit S, Chang ET, i sur. Infectious Mononucleosis, Childhood Social Environment, and Risk of Hodgkin Lymphoma. *Cancer Res.* 2007 Mar 1;67(5):2382–8.
58. Kanda T, Yajima M, Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.* 2019;110(4):1132–9.
59. Nowalk A, Green M. Epstein-Barr Virus. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun 24;4(3):4.3.47.
60. Graham BS, Lynch DT. Burkitt Lymphoma. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [pristupljeno 10. 6. 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538148/>
61. Shamriz O, Kumar D, Shim J, Briones M, Quarmyne MO, Chonat S, i sur. T Cell-Epstein-Barr Virus–Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH) Occurs in Non-Asians and Is Associated with a T Cell Activation State that Is Comparable to Primary HLH. *J Clin Immunol.* 2021 Oct 1;41(7):1582–96.
62. Naughton P, Healy M, Enright F, Lucey B. Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br J Biomed Sci.* 2021 Jul 3;78(3):107–16.
63. Pagano JS, Whitehurst CB, Andrei G. Antiviral Drugs for EBV. *Cancers.* 2018 Jun;10(6):197.
64. How I treat T-cell chronic active Epstein-Barr virus disease - PMC [Internet]. [pristupljeno 13. 6. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024635/>
65. Janka GE. Familial and Acquired Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med.* 2012;63(1):233–46.
66. Bode SF, Lehmborg K, Maul-Pavicic A, Vraetz T, Janka G, Stadt U zur, i sur. Recent advances in the diagnosis and treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Arthritis Res Ther.* 2012 Jun 8;14(3):213.
67. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, Khamashta MA, Bosch X. Adult haemophagocytic syndrome. *The Lancet.* 2014 Apr 26;383(9927):1503–16.
68. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 2020 Apr 16;135(16):1332–43.
69. La Marle S, Richard-Colmant G, Fauvernier M, Ghesquières H, Hot A, Sève P, i sur. Mortality and Associated Causes in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Multiple-Cause-of-Death Analysis in France. *J Clin Med.* 2023 Feb 20;12(4):1696.
70. Niece JA, Rogers ZR, Ahmad N, Langevin AM, McClain KL. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in Texas: Observations on ethnicity and race. *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Mar 1;54(3):424–8.
71. Henter JI, Elinder G, Söder O, Öst Å. Incidence in Sweden and Clinical Features of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr.* 1991;80(4):428–35.

72. Ishii E, Ohga S, Imashuku S, Yasukawa M, Tsuda H, Miura I, i sur. Nationwide Survey of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*. 2007 Jul 1;86(1):58–65.
73. Machaczka M, Vaknäs J, Klimkowska M, Hägglund H. Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: a retrospective population-based analysis from a single center. *Leuk Lymphoma*. 2011 Apr;52(4):613–9.
74. Bhatt NS, Oshrine B, An Talano J. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Leuk Lymphoma*. 2019 Jan;60(1):19–28.
75. Imashuku S. Clinical features and treatment strategies of Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Dec 1;44(3):259–72.
76. Takagi S, Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Tsuji M, i sur. High incidence of haemophagocytic syndrome following umbilical cord blood transplantation for adults. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(4):543–53.
77. *Pediatric Annals* [Internet]. [pristupljeno 5. 6. 2023.]. An Overview of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Dostupno na: <https://journals.healio.com/doi/10.3928/19382359-20170717-01>
78. Morimoto A, Nakazawa Y, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Pediatr Int*. 2016;58(9):817–25.
79. Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, Vraetz T, i sur. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2754–63.
80. Behrens EM, Canna SW, Slade K, Rao S, Kreiger PA, Paessler M, i sur. Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome–like disease in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jun 1;121(6):2264–77.
81. Naymagon L. Can we truly diagnose adult secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)? A critical review of current paradigms. *Pathol - Res Pract*. 2021 Feb 1;218:153321.
82. Canna SW, Behrens EM. Not all Hemophagocytes are Created Equally: Appreciating the Heterogeneity of the Hemophagocytic Syndromes. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 Jan;24(1):113–8.
83. Mehta RS, Smith RE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): a review of literature. *Med Oncol*. 2013 Oct 9;30(4):740.
84. Nikiforow S, Berliner N. The unique aspects of presentation and diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Hematology*. 2015 Dec 5;2015(1):183–9.
85. Yang JJ, Lei DK, Ravi V, Maloney NJ, Crew A, Worswick S. Overlap between hemophagocytic lymphohistiocytosis and drug reaction and eosinophilia with systemic symptoms: a review. *Int J Dermatol*. 2021;60(8):925–32.

86. Gupta A, Weitzman S, Abdelhaleem M. The role of hemophagocytosis in bone marrow aspirates in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(2):192–4.
87. Goel S, Polski JM, Imran H. Sensitivity and Specificity of Bone Marrow Hemophagocytosis in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Ann Clin Lab Sci*. 2012 Dec 21;42(1):21–5.
88. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, i sur. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003 Oct 1;281(1–2):65–78.
89. Carvelli J, Piperoglou C, Farnarier C, Vely F, Mazodier K, Audonnet S, i sur. Functional and genetic testing in adults with HLH reveals an inflammatory profile rather than a cytotoxicity defect. *Blood*. 2020 Jul 30;136(5):542–52.
90. Allen CE, Yu X, Kozinetz CA, McClain KL. Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(6):1227–35.
91. Otrrock ZK, Hock KG, Riley SB, de Witte T, Eby CS, Scott MG. Elevated serum ferritin is not specific for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Ann Hematol*. 2017 Oct;96(10):1667–72.
92. Hayden A, Lin M, Park S, Pudek M, Schneider M, Jordan MB, i sur. Soluble interleukin-2 receptor is a sensitive diagnostic test in adult HLH. *Blood Adv*. 2017 Dec 12;1(26):2529.
93. Tsuji T, Hirano T, Yamasaki H, Tsuji M, Tsuda H. A high sIL-2R/ferritin ratio is a useful marker for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol*. 2014;93(5):821–6.
94. Xu XJ, Tang YM, Song H, Yang SL, Xu WQ, Zhao N, i sur. Diagnostic Accuracy of a Specific Cytokine Pattern in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children. *J Pediatr*. 2012 Jun 1;160(6):984-990.e1.
95. Development and Validation of the HScore, a Score for the Diagnosis of Reactive Hemophagocytic Syndrome. [pristupljeno 7. 6. 2023.]; Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.38690>
96. Ehl S, Astigarraga I, von Bahr Greenwood T, Hines M, Horne A, Ishii E, i sur. Recommendations for the Use of Etoposide-Based Therapy and Bone Marrow Transplantation for the Treatment of HLH: Consensus Statements by the HLH Steering Committee of the Histiocyte Society. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(5):1508–17.
97. Henter JI. HLH-2004 Treatment Protocol [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2018 Jul [pristupljeno 8. 6. 2023.]. Report No.: NCT00426101. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00426101>
98. Tapia C, Nessel TA, Zito PM. Cyclosporine. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [pristupljeno 9. 6. 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482450/>

99. Reyhanoglu G, Tadi P. Etoposide. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [pristupljeno 9. 6. 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557864/>
100. Thompson PA, Allen CE, Horton T, Jones JY, Vinks AA, McClain KL. Severe neurologic side effects in patients being treated for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 May;52(5):621–5.
101. Mahlaoui N, Ouachée-Chardin M, de Saint Basile G, Neven B, Picard C, Blanche S, i sur. Immunotherapy of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with antithymocyte globulins: a single-center retrospective report of 38 patients. *Pediatrics*. 2007 Sep;120(3):e622-628.
102. Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, Li D, Jodele S, Joshi S, i sur. Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):5824–31.
103. Strout MP, Seropian S, Berliner N. Alemtuzumab as a bridge to allogeneic SCT in atypical hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jul;7(7):415–20.
104. Marsh RA, Allen CE, McClain KL, Weinstein JL, Washko JK, Skiles J, i sur. Salvage Therapy of Refractory Hemophagocytic Lymphohistiocytosis with Alemtuzumab. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Jan;60(1):101–9.
105. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 20;16(7):16414–39.
106. Al-Salama ZT. Emapalumab: First Global Approval. *Drugs*. 2019 Jan 1;79(1):99–103.
107. Eloiseily EM, Weiser P, Crayne CB, Haines H, Mannion ML, Stoll ML, i sur. Benefit of Anakinra in Treating Pediatric Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2020 Feb;72(2):326–34.
108. Keenan C, Nichols KE, Albeituni S. Use of the JAK Inhibitor Ruxolitinib in the Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Front Immunol*. 2021 Feb 16;12:614704.
109. Ahmed A, Merrill SA, Alsawah F, Bockenstedt P, Campagnaro E, Devata S, i sur. Ruxolitinib in adult patients with secondary haemophagocytic lymphohistiocytosis: an open-label, single-centre, pilot trial. *Lancet Haematol*. 2019 Dec;6(12):e630–7.
110. AB2 Bio Ltd. Multicenter, Double-blind, Placebo-controlled, Randomized Withdrawal Trial With Tadekinig Alfa (r-hIL-18BP) in Patients With IL-18 Driven Monogenic Autoinflammatory Conditions: NLRC4 Mutation and XIAP Deficiency [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2023 Mar [pristupljeno 8. 6. 2023.]. Report No.: NCT03113760. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03113760>
111. Yamada M, Ishikawa Y, Imadome KI. Hypersensitivity to mosquito bites: A versatile Epstein–Barr virus disease with allergy, inflammation, and malignancy. *Allergol Int*. 2021 Oct 1;70(4):430–8.



112. Cohen JI. Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):241–65.
113. Xu T, Zhao Q, Li W, Chen X, Xue X, Chen Z, i sur. X-linked lymphoproliferative syndrome in mainland China: review of clinical, genetic, and immunological characteristic. *Eur J Pediatr*. 2020;179(2):327–38.
114. Kim WY, Montes-Mojarro IA, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Epstein-Barr Virus-Associated T and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Front Pediatr* [Internet]. 2019 [pristupljeno 18. 1. 2023.];7. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00071>
115. Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, i sur. Prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: Report of the Japan Histiocytosis Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(7):1257–62.
116. Ishida F. Aggressive NK-Cell Leukemia. *Front Pediatr* [Internet]. 2018 [pristupljeno 10. 6. 2023.];6. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2018.00292>
117. Yonese I, Sakashita C, Imadome KI, Kobayashi T, Yamamoto M, Sawada A, i sur. Nationwide survey of systemic chronic active EBV infection in Japan in accordance with the new WHO classification. *Blood Adv*. 2020 Jun 29;4(13):2918–26.
118. Shafiee A, Shamsi S, Kohandel Gargari O, Beiky M, Allahkarami MM, Miyanaji AB, i sur. EBV associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases: A comprehensive overview of clinical manifestations and novel therapeutic insights. *Rev Med Virol*. 2022;32(4):e2328.
119. Rohr J, Beutel K, Maul-Pavacic A, Vraetz T, Thiel J, Warnatz K, i sur. Atypical familial hemophagocytic lymphohistiocytosis due to mutations in UNC13D and STXBP2 overlaps with primary immunodeficiency diseases. *Haematologica*. 2010 Dec;95(12):2080–7.
120. Ghosh S, Köstel Bal S, Edwards ESJ, Pillay B, Jiménez Heredia R, Erol Cipe F, i sur. Extended clinical and immunological phenotype and transplant outcome in CD27 and CD70 deficiency. *Blood*. 2020 Dec 3;136(23):2638–55.
121. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*. 2015;169(2):173–87.
122. Abou-El-Hassan H, Kantono M, Bhagat A, Hu J, Karp D, Jerome R, i sur. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Caused by a Severe Epstein-Barr Virus Infection in a Young Patient Presenting With Hiccups. *Cureus*. 2023 Mar;15(3):e36199.
123. Sawada A, Inoue M. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Treatment of Epstein-Barr Virus-Associated T- or NK-Cell Lymphoproliferative Diseases and Associated Disorders. *Front Pediatr*. 2018 Nov 6;6:334.
124. Arai A. Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection: The Elucidation of the Pathophysiology and the Development of Therapeutic Methods. *Microorganisms*. 2021 Jan;9(1):180.

125. Cohen JI, Iwatsuki K, Ko YH, Kimura H, Manoli I, Ohshima K, i sur. Epstein-Barr virus NK and T cell lymphoproliferative disease: report of a 2018 international meeting. *Leuk Lymphoma*. 2020 Mar 20;61(4):808–19.
126. Dávila Saldaña BJ, John T, Bonifant C, Buchbinder D, Chandra S, Chandrakasan S, i sur. High risk of relapsed disease in patients with NK/T-cell chronic active Epstein-Barr virus disease outside of Asia. *Blood Adv*. 2022 Jan 17;6(2):452–9.
127. Sawada A, Inoue M, Kawa K. How we treat chronic active Epstein–Barr virus infection. *Int J Hematol*. 2017 Apr 1;105(4):406–18.
128. Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK, Pittaluga S, Heslop HE, Rooney CM, i sur. Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: a 28-year experience in the United States. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):5835–49.
129. Cui T, Wang J, Wang Z. The Outcome of Induction Therapy for EBV-Related Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Model for Risk Stratification. *Front Immunol* [Internet]. 2022 [pristupljeno 26. 6. 2023.];13. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9289144/>
130. The ambiguous boundary between EBV-related hemophagocytic lymphohistiocytosis and systemic EBV-driven T cell lymphoproliferative disorder - PMC [Internet]. [pristupljeno 12. 6. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203186/>
131. Li X, Yan H, Xiao Z, Luo T, Xie L, Yang Y, i sur. Development of a screening score for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis among pediatric patients with acute infection of Epstein-Barr virus. *Front Immunol*. 2022 Sep 12;13:981251.
132. Song Y, Wang Y, Wang Z. Requirement for etoposide in the initial treatment of Epstein-Barr virus-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2019 Sep;186(5):717–23.
133. Budhathoki P, Qureshi ZA, Shah A, Khanal S, Ghazanfar H, Hanif A. A Case of Severe Epstein-Barr Virus-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Successfully Treated With High Dose Steroids and Ganciclovir. *Cureus*. 2022 Jun;14(6):e25952.
134. Lai W, Wang Y, Wang J, Wu L, Jin Z, Wang Z. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults and adolescents—a life-threatening disease: analysis of 133 cases from a single center. *Hematology*. 2018 Nov 26;23(10):810–6.
135. Liu P, Pan X, Chen C, Niu T, Shuai X, Wang J, i sur. Nivolumab treatment of relapsed/refractory Epstein-Barr virus–associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood*. 2020 Mar 12;135(11):826–33.
136. Dong LH, Liu J, Zu P, Gao X, Du JW, Wang YS, i sur. PD-1 blockade with nivolumab-controlled Epstein-Barr virus infection and associated haemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Nov;25(11):1438–40.
137. Pi Y, Wang J, Wang Z. Successful Treatment of Relapsed Epstein–Barr Virus-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis After Allo-HSCT with PD-1 Blockade: A Case Report. *Infect Drug Resist*. 2022 Jul 13;15:3751–6.

138. Zhang Q, Zhao YZ, Ma HH, Wang D, Cui L, Li WJ, i sur. A study of ruxolitinib response-based stratified treatment for pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2022 Jun 16;139(24):3493–504.
139. Shao X, Xu Y, Xu X, Xu Y, Chen H, Hong M, i sur. Epstein-Barr Virus-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Adults: A Retrospective Analysis of 23 Patients in China. *Isr Med Assoc J IMAJ*. 2018 Feb;20(2):80–5.
140. Yao S, He L, Zhang R, Liu M, Hua Z, Zou H, i sur. Improved hemophagocytic lymphohistiocytosis index predicts prognosis of adult Epstein-Barr virus-associated HLH patients. *Ann Med*. 55(1):89–100.
141. Yanagaisawa R, Matsuda K, Ohga S, Kanegane H, Morimoto A, Okamoto Y, i sur. Factors predicting the recurrence of Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children after treatment using the HLH-2004 protocol. *Int J Hematol*. 2019 May 1;109(5):612–7.
142. Kawa K, Sawada A, Sato M, Okamura T, Sakata N, Kondo O, i sur. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic SCT with reduced-intensity conditioning for the treatment of chronic active EBV infection. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jan;46(1):77–83.

## 8. Životopis

Rođen sam 8. svibnja 1998. u Slavonskom Brodu. Nakon završene Osnovne škole „Blaž Tadijanović“ upisao sam prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije „Matija Mesić“ te sva četiri razreda završio s odličnim uspjehom. Usporedno sam pohađao osnovnu i srednju Glazbenu školu Slavonski Brod, smjer glazbenik klavirist, također s odličnim uspjehom. Svake godine, od 7. razreda osnovne škole do 4. razreda gimnazije, sudjelovao sam na državnim Natjecanjima iz biologije i hrvatskog jezika, a najbolje rezultate ostvario sam u drugom razredu (1. mjesto na državnom Natjecanju iz biologije) i četvrtom razredu gimnazije (1. mjesto na državnom Natjecanju iz biologije i 1. mjesto na državnom Natjecanju iz hrvatskoga jezika). Na temelju tih rezultata dodijeljen mi je Oskar znanja u dva navrata, 2015. i 2017. godine. Državnu maturu položio sam s odličnim uspjehom kao jedan od dvadeset najuspješnijih maturanata na obaveznim ispitima Državne mature zbog čega mi je dodijeljeno priznanje Ministarstva znanosti i obrazovanja. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam u akademskoj godini 2017./2018. kao prvoplasirani na listi upisanih. Nagrađen sam Dekanovom nagradom za uspješnost u ak. god. 2017./2018. Tijekom studija bio sam demonstrator na kolegiju Klinička propedeutika (ak. god. 2022./2023.) i kolegiju Pedijatrija (ak. god. 2022./2023.). Aktivno se služim engleskim i poznajem osnove njemačkog jezika. Dugogodišnji sam aktivni član Akademskog zbora Ivan Goran Kovačić.