

Von Willebrandov faktor i faktor VIII u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja

Lelas, Antonela

Doctoral thesis / Disertacija

2025

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:917405>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonela Lelas

**Von Willebrandov faktor i faktor VIII u
kroničnoj bolesti presatka protiv
primatelja**

DISERTACIJA



Zagreb, 2025.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonela Lelas

**Von Willebrandov faktor i faktor VIII u
kroničnoj bolesti presatka protiv
primatelja**

DISERTACIJA

Zagreb, 2025.

Disertacija je izrađena u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. prim. dr. sc. Dražen Pulanić, dr. med., znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Beskrajno zahvaljujem najboljem mentoru u svemiru na podršci i vodstvu. Hvala cijelom cGvHD Timu, osobito Lani i Luciji, čast mi je bila surađivati s vama. Veliko hvala Ivanu na pomoći pri statističkoj analizi. Hvala cijeloj mojoj obitelji na nesebičnoj pomoći – bez vas ništa ne bi bilo moguće. Hvala mom mužu na ljubavi i razumijevanju. I za kraj, vječno zahvalna prof. Duraković koja me uvela u svijet hematologije i uz nadu da će isti moto slijediti i moja djeca kojima ovaj rad posvećujem, ostavljam poruku svima kojima ova disertacija dođe u ruke:

»Izaberi posao koji voliš i nećeš morati raditi ni dana u životu.«

Konfucije

Disertacija je izrađena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja“ (IP-2016-06-8046).

1.	Uvod i svrha rada	1
1.1.	Kronična bolest presatka protiv primatelja	3
1.1.1.	Povijesni pregled	3
1.1.2.	Epidemiologija, rizični čimbenici i prevencija	4
1.1.3.	Kliničke manifestacije, dijagnostika i stupnjevanje	5
1.1.4.	Patofiziologija	9
1.1.5.	Liječenje	12
1.2.	Endotelna ozljeda u kontekstu kronične bolesti presatka protiv primatelja	14
1.2.1.	Svojstva i funkcije endotela	14
1.2.2.	Endotelna ozljeda	16
1.2.3.	Endotelna ozljeda nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica	18
1.3.	Biomarkeri u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja	22
1.3.1.	Reaktanti akutne faze i pokazatelji endotelne ozljede	23
1.4.	Von Willebrandov faktor i faktor VIII	29
1.4.1.	Funkcija, struktura i biosinteza	29
1.4.2.	Biomarkerska upotreba	31
1.4.3.	Biomarkerski potencijal u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja.....	32
1.5.	Svrha rada	32
2.	Hipoteza	33
3.	Ciljevi istraživanja.....	34
4.	Materijali i metode	35
4.1.	Ispitanici	35
4.2.	Definicije	36

4.3.	Plan istraživanja.....	37
4.4.	Analiza	38
4.4.1.	Laboratorijska analiza.....	38
4.4.2.	Statistička analiza.....	40
4.5.	Financiranje	41
4.6.	Etička odobrenja	41
5.	Rezultati	42
5.1.	Demografske karakteristike.....	42
5.1.1.	Karakteristike kronične bolesti presatka protiv primatelja	44
5.2.	Prva studijska evaluacija.....	46
5.2.1.	Rezultati laboratorijske analize i usporedba među skupinama ..	46
5.2.2.	Korelacijska analiza ispitivanih faktora i kronične bolesti presatka protiv primatelja	48
5.2.2.1.	Multipla regresijska analiza	56
5.3.	Longitudinalno praćenje bolesnika s kroničnom bolešću presatka protiv primatelja.....	58
5.3.1.	Manifestacije kronične bolesti presatka protiv primatelja prema NIH kriterijima tijekom longitudinalnog praćenja.....	59
5.3.2.	Longitudinalno praćenje von Willebrandovoga faktora i faktora VIII u oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja	61
5.3.3.	Biomarkerski potencijal von Willebrandovoga faktora kod oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja	64
5.3.4.	Longitudinalno praćenje ostalih laboratorijskih parametara kod oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja.....	66
6.	Rasprava.....	69
7.	Zaključak.....	78

8. Sažetak	79
9. Summary	80
10. Popis literature.....	82
11. Biografija	98

PRILOZI

Popis skraćenica

aGvHD	akutna bolest presatka protiv primatelja (eng. <i>acute graft-versus-host disease</i>)
AIHA	autoimuna hemolitička anemija
alo-PKMS	alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica
ALT	alanin-aminotransferaza
ANOVA	analiza varijance
AP	alkalna fosfataza
APC	antigen prezentirajuće stanice
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AST	aspartat-aminotransferaza
ATG	antitimocitni globulin
BAFF	čimbenik aktivacije B-limfocita (eng. <i>B-cell activating factor</i>)
cGvHD	kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. <i>chronic graft-versus-host disease</i>)
CLS	sindrom kapilarnog curenja (eng. <i>capillary leak syndrome</i>)
CMV	Citomegalovirus
COVID-19	koronavirusna bolest 2019 (eng. <i>Coronavirus Disease 2019</i>)
CRP	C-reaktivni protein
CXCL	kemokinski ligand s CXC motivom (eng. <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>)
DAH	difuzno alveolarno krvarenje (eng. <i>diffuse alveolar hemorrhage</i>)
DAMP	molekularni uzorci povezani s oštećenjem (eng. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DLI	infuzija darivateljevih limfocita (eng. <i>donor lymphocyte infusion</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EBMT	Europsko društvo za transplantaciju krvi i koštane srži (eng. <i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>)
ECOG	Europska kooperativna grupa za onkologiju (eng. <i>European Cooperative Oncology Group</i>)

EDTA	etilendiamintetraoctena	kiselina	(eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	enzimsko vezani imuno-apsorbirajući esej (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)		
EPC	endotelne progenitorske stanice		
FVIII	faktor VIII		
GGT	gama-glutamil transferaza		
GP	glikoprotein		
GvHD	bolest presatka protiv primatelja (eng. <i>graft-versus-host disease</i>)		
GvT/GvL	reakcija presatka protiv tumora/leukemije (eng. <i>graft-versus-tumor/leukemia</i>)		
HDL	lipoproteini velike gustoće (eng. <i>high density lipoproteins</i>)		
HLA	sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi (eng. <i>human leukocyte antigen</i>)		
HRCT	kompjutorizirana tomografija visoke rezoluzije (eng. <i>high resolution computed tomography</i>)		
HRZZ	Hrvatska zaklada za znanost		
ICAM	međustanična adhezijska molekula 1 (eng. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)		
Ig	imunoglobulin		
IL	Interleukin		
IVIg	intravenski imunoglobulin		
ITP	imuna trombocitopenija		
JAK	Janus kinaza		
KBC	Klinički bolnički centar		
KMS	krvotvorne matične stanice		
LDH	laktat dehidrogenaza		
LDL	lipoproteini niske gustoće (eng. <i>low density lipoproteins</i>)		
LPS	lipopolisaharidi		
MAC	mijeloablativno kondicioniranje (eng. <i>myeloablative conditioning</i>)		
NCI	Nacionalni institut za rak (eng. <i>National Cancer Institute</i>)		
NF-κB	nuklearni faktor κB		

NIH	Nacionalni instituti za zdravlje (eng. <i>National Institutes of Health</i>)
PAMP	molekularni uzorki povezani s patogenima (eng. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBSC	krvotvorne matične stanice iz periferne krvi (eng. <i>peripheral blood stem cells</i>)
PTCy	poslijetransplantacijski ciklofosamid
RIC	kondicioniranje smanjenog intenziteta (eng. <i>reduced intensity conditioning</i>)
ROC	operacijska svojstva primatelja (eng. <i>receiver operating characteristic</i>)
ROCK	inhibitor Rho-kinaze
SAD	Sjedinjene Američke Države
SLE	sistemski eritemski lupus
SOS	sindrom sinusoidalne okluzije (eng. <i>sinusoidal obstruction syndrome</i>)
TA-TMA	trombotska mikroangiopatija povezana s transplantacijom (eng. <i>transplant-associated thrombotic microangiopathy</i>)
TNF- α	faktor tumorske nekroze α (eng. <i>tumor necrosis factor α</i>)
USD	američki dolar
VCAM	vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (eng. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VOD	venookluzivna bolest (eng. <i>veno-occlusive disease</i>)
VWF	von Willebrandov faktor
VWF:Ag	koncentracija antigena von Willebrandovoga faktora
VWF:RCo	ristocetinska aktivnost von Willebrandovoga faktora

Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz patofiziologije nastanka cGvHD-a.

Slika 2. Prikaz strukture i funkcije endotela.

Slika 3. Shematski prikaz fiziološke uloge VWF-a i FVIII u hemostazi.

Slika 4. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti FVIII s težinom cGvHD-a određenom NIH kriterijima u organima sa statistički značajnom korelacijom zahvaćenosti i razine istraživanih faktora.

Slika 5. Težina cGvHD-a kroz vrijeme.

Slika 6. Težina pojedinih manifestacija cGvHD-a definiranih NIH kriterijima kroz vrijeme.

Slika 7. Koncentracija i aktivnost VWF-a i FVIII kroz vrijeme u ovisnosti o aktivnosti cGvHD-a.

Slika 8. Koncentracija i aktivnost VWF-a te FVIII u ovisnosti o aktivnosti cGvHD-a i korištenju sistemske imunosupresivne terapije.

Slika 9. ROC krivulje za koncentraciju antigena i aktivnost VWF-a i FVIII u diskriminaciji: a) cGvHD bolesnika i kontrola, b) cGvHD bolesnika u početnoj fazi bolesti i kontrola c) aktivnog i neaktivnog cGvHD-a grupiranih prema procjeni kliničara.

Slika 10. Kretanje razine najznačajnijih upalnih markera kod oboljelih od cGvHD-a kroz vrijeme.

Popis tablica

Tablica 1. Pregled znakova i simptoma cGvHD-a prema aktualnim NIH smjernicama.

Tablica 2. Markeri upale i pokazatelji endotelne ozljede značajni za cGvHD.

Tablica 3. Karakteristike bolesnika s cGvHD-om i kontrolnih ispitanika bez cGvHD-a.

Tablica 4. Karakteristike cGvHD-a kod oboljelih ispitanika.

Tablica 5. Usporedba rezultata laboratorijske analize između cGvHD bolesnika i kontrola.

Tablica 6. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF-a te aktivnosti FVIII s kliničkim karakteristikama cGvHD bolesnika.

Tablica 7. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF-a te aktivnosti FVIII s manifestacijama cGvHD-a definiranim prema NIH kriterijima.

Tablica 8. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti FVIII s razinama drugih reaktanata akutne faze i imunološkim pretragama.

Tablica 9. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF-a te aktivnosti FVIII s ostalim mjerenim laboratorijskim parametrima.

Tablica 10. Multipla regresijska analiza uz korištenje koncentracije antigena VWF-a kao ovisne varijable.

Tablica 11. Multipla regresijska analiza uz korištenje ristocetinske aktivnosti VWF-a kao ovisne varijable.

Tablica 12. Multipla regresijska analiza koristeći aktivnost FVIII kao ovisne varijable.

Tablica 13. Usporedba rezultata laboratorijske analize među cGvHD bolesnicima u ovisnosti o vremenu. U zasebnu skupinu su izdvojeni ispitanici bez kliničkih znakova cGvHD-a.

1. Uvod i svrha rada

Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *chronic Graft-versus-Host Disease*, cGvHD) kasna je komplikacija alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica (alo-PKMS). Alo-PKMS je kurativna metoda liječenja brojnih malignih i nemalignih hematoloških oboljenja, a koristi se i u liječenju nekih solidnih tumora i urođenih grešaka metabolizma. Prema izvješću Europskog društva za transplantaciju krvi i koštane srži (eng. *European Society for Blood and Marrow Transplantation*, EBMT) u Europi se godišnje provede gotovo 20 000 aloPKMS, a broj provedenih procedura u stalnom je porastu (1). Ako uzmemo u obzir da je nobelovac E. Donnall Thomas tek prije nešto više od pola stoljeća provodio pionirska istraživanja u ovom području, uspjeh metode zaista je impresivan. Otkriće uloge histokompatibilnosti i sustava glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi (eng. *human leukocyte antigen*, HLA), korištenje mobiliziranih krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi (eng. *peripheral blood stem cells*, PBSC), presadba od nesrodnog i haploidentičnog donora, kondicioniranje smanjenim intenzitetom (eng. *reduced intensity conditioning*, RIC) te prevencija bolesti presatka protiv primatelja (eng. *graft-versus-host disease*, GvHD) deplecijom T stanica samo su neki od znanstvenih postignuća koji su doprinijeli široj kliničkoj upotrebi alo-PKMS-a. Uz poboljšanje transplantacijske tehnike, implementaciju je svakako pospješio i sveopći napredak medicinske skrbi čime je umanjen rizik od smrtnosti koji je, što zbog toksičnosti uzrokovane kondicioniranjem, što zbog infektivnih komplikacija i GvHD-a, bio i ostao glavni ograničavajući čimbenik u indiciranju alo-PKMS. Ipak, unatoč tome što je tijekom vremena zabilježeno smanjenje sveukupne smrtnosti, smrtnosti povezane s transplantacijom, incidencije relapsa osnovne bolesti, akutne bolesti presatka protiv primatelja (eng. *acute graft-versus-host disease*, aGvHD), a po nekim radovima čak i cGvHD-a, pokazalo se da je incidencija težih oblika cGvHD-a ostala gotovo nepromijenjena (2). Iako se razumijevanje složene patofiziologije bolesti poboljšalo a mogućnosti liječenja su se povećale, veliku zapreku u razvoju prevencije i daljnjem napretku liječenja visokomorbidnih formi cGvHD-a predstavlja nepostojanje adekvatnih biomarkera. U ovom istraživanju pažnju smo usmjerili na biomarkerski potencijal von Willebrandovoga faktora (VWF) i

faktora VIII (FVIII). Riječ je o koagulacijskim faktorima, ali i etabliranim reaktantima akutne faze čije razine odražavaju stupanj endotelnog oštećenja. U nastavku uvodnog dijela, uz povijesni prikaz i trenutna znanja o epidemiologiji i patofiziologiji cGvHD-a, detaljnije ćemo prikazati aktualnu problematiku u istraživanju i liječenju cGvHD-a, sažeti ćemo dosadašnja znanja o endotelnoj ozljedi i upalnim parametrima u kontekstu cGvHD-a te detaljnije prikazati biomarkersku ulogu VWF i FVIII u drugim bolestima i njihov biomarkerski potencijal u cGvHD-u.

1.1. Kronična bolest presatka protiv primatelja

1.1.1. Povijesni pregled

Već pri samom razvoju metode alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica kao jedna od najvažnijih komplikacija identificirana je „sekundarna bolest“ – entitet koji je uključivao i ono što danas poznajemo kao bolest presatka protiv primatelja (GvHD). Kako je još 1966. definirao Billingham, uvjeti neophodni za razvoj GvHD-a su: postojanje imunokompetentne stanice presatka, postojanje antigena primatelja koji mogu biti prepoznati od strane presatka a nisu prisutni kod darivatelja, te dovoljno vremena proteklo od potpunog udomljenja matičnih stanica u koštanoj srži primatelja (eng. *engraftment*) koje je potrebno za jačanje imunološkog odgovora (3). Tek kasnih sedamdesetih, kada je preživljenje bolesnika nakon alo-PKMS postalo dugotrajnije, uviđena je razlika u kliničkoj slici između GvHD-a koji se prezentira u ranoj poslijetransplantacijskoj fazi i onoga koji se prezentira nekoliko mjeseci kasnije. Na temelju opservacija postavljena je dogovorna vremenska granica prema kojoj se manifestacije aloimunosti koje se jave do 100-tog poslijetransplantacijskog dana definiraju kao akutni GvHD (aGvHD), a one koje se jave nakon toga kao kronični GvHD (cGvHD). Iako se zbog nedvojbenih sličnosti u početku zaista smatralo da je cGvHD tek kasna forma aGvHD-a, daljnjim istraživanjima utvrđene su fundamentalne razlike u etiologiji i patofiziologiji zbog čega se danas aGvHD i cGvHD smatraju različitim bolestima (4). Dugo se cGvHD, ovisno o zahvaćenosti, klasificirao kao ograničeni (izolirane kožne promjene ± ograničena zahvaćenost jetre) ili ekstenzivni oblik (sve ostalo). Zbog nepostojanja objektivnih kriterija, prognostička vrijednost ove podjele bila je neadekvatna za istraživanja, a veliki utjecaj ekspertize vodećih liječnika rezultirao je kasnim postavljanjem dijagnoze, nejednakom skrbi za oboljele i lošom kvalitetom života preživjelih. Uz navedeno, akumulirali su se i dokazi o nepovoljnim trendovima u incidenciji cGvHD-a, zbog čega su znanstvenici američkih Nacionalnih instituta za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*, NIH) 2005. godine organizirali konferenciju koja je rezultirala konceptualnim zaokretom i dala vjetar u leđa novim istraživanjima. Tada se postavljanje dijagnoze preusmjerilo na prepoznavanje kliničkih manifestacija bolesti, dok je vremenska komponenta u potpunosti izbačena. Zahvaljujući

predanosti stručnjaka postignut je konsenzus o kriterijima za dijagnozu i stupnjevanje težine bolesti, procjene odgovora na terapiju te su standardizirani postupci u znanstvenim istraživanjima (5–7). Na temelju tih postignuća, 2014. je organizirana druga konsenzusna konferencija NIH-a kojom su nadopunjene ranije preporuke (8,9), a navedeno je na snazi i danas.

1.1.2. Epidemiologija, rizični čimbenici i prevencija

Ovisno o rizičnim čimbenicima incidencija cGvHD-a varira između 30 i 70% od ukupnog broja uspješno alotransplantiranih bolesnika, no unatoč tome u cijelim je Sjedinjenim Američkim Državama registrirano tek oko 15.000 oboljelih (10). S obzirom da se prema definiciji Europske Unije rijetkom bolešću smatra ona bolest koja pogađa manje od 5 osoba na 10.000 ljudi iz opće populacije, cGvHD je jedna od njih. U rizičnoj populaciji međutim, zahvaljujući visokom morbiditetu i 25%-tnom mortalitetu koji dijagnoza nosi, cGvHD predstavlja najznačajniju nerelapsnu kasnu komplikaciju aloPKMS-a (11). Zaista, kao kronična multiorganska bolest karakterizirana fizičkim, funkcionalnim i psihosocijalnim poremećajima, cGvHD ozbiljno narušava kvalitetu života oboljelih (12). Nije zanemariv ni socioekonomski teret bolesti, jer uz to što oboljelima ugrožava egzistenciju onemogućujući im povratak na posao, troškovi liječenja za pojedinog bolesnika penju se do 300.000 USD godišnje (10). Čimbenici rizika za razvoj cGvHD-a upućuju na to da, s ciljem prevencije razvoja bolesti, veliku pažnju treba posvetiti odabiru darivatelja. Naime, velikom meta-analizom relevantnih studija kao glavni rizični čimbenici za razvoj cGvHD-a izdvojeni su nepodudarnost presatka u glavnom sustavu tkivne snošljivosti u ljudi (eng. *human leukocyte antigen*, HLA), korištenje PBSC kao izvora krvotvornih matičnih stanica (KMS), prethodno postavljena dijagnoza aGvHD-a, primjena infuzije darivateljevih limfocita (eng. *donor lymphocyte infusion*, DLI), starija dob primatelja i/ili darivatelja te za primatelje muškog spola i ženski spol darivatelja, uz dodatni rizik ukoliko je riječ o višerotkinjama (4). Prema svemu sudeći, osim izbjegavanja rizičnih čimbenika, preventivne strategije će se u budućnosti temeljiti i na depleciji T stanica koja se pokazala efikasnim načinom smanjenja incidencije cGvHD-a. Iako je protektivni učinak deplecije T stanica na incidenciju GvHD-a poznat od ranije, tek su se upotrebom antitimocitnog globulina (ATG) i poslijetransplantacijskog

ciklofosfamida (PTCy) na većem broju ispitanika akumulirali dokazi o nižoj incidenciji cGvHD-a (15-25% ATG; 10-30% PTCy) nego je to opisivano u povijesnim kohortama koje su koristile standardne profilaktičke agense (13–16).

1.1.3. Kliničke manifestacije, dijagnostika i stupnjevanje

Iako su upalne manifestacije karakteristične za aGvHD često prisutne i u cGvHD-u, klinički tijek cGvHD-a karakteriziran je širim opsegom djelovanja bolesti te razvojem fibroze koja dovodi do ireverzibilnih sklerotskih promjena. Kronični GvHD je ustvari imunološki posredovana bolest čiji simptomi često nalikuju kombinaciji simptoma autoimunih bolesti poput sistemske skleroze, sistemskog eritematoznog lupusa, Sjögrenog sindroma, miozitisa, imune trombocitopenije i drugih, koji mogu biti prisutni na gotovo svim organima i organskim sustavima. Najčešće su zahvaćeni koža, usta, oči, jetra, pluća, zglobovi i fascija te gastrointestinalni (GIT) i genitalni trakt. Uz pleomorfnost same bolesti, postavljanje dijagnoze otežano je i širokim spektrom diferencijalnih dijagnoza među kojima su najistaknutije infekcije, alergije na lijekove, relaps osnovne i/ili pojava sekundarne maligne bolesti te endokrinološke komplikacije.

Prema kriterijima NIH konsenzusa, za dijagnozu cGvHD-a potreban je ili jedan dijagnostički znak ili jedna distinktivna manifestacija bolesti uz potvrdu dijagnoze biopsijom, pregledom subspecijalista, radiološkom ili drugom prikladnom pretragom. Dijagnostički znakovi odnose se na karakteristične manifestacije cGvHD-a koje su samodostatne za postavljanje dijagnoze, dok se distinktivni znakovi odnose na one manifestacije koje je potrebno dodatno testirati za potvrdu dijagnoze. U Tablici 1 pregledno su prikazane dijagnostičke i distinktivne manifestacije cGvHD-a, a uz njih su prikazane i ostale nespecifične manifestacije cGvHD-a te manifestacije zajedničke za aGvHD i cGvHD. Nakon konačnog postavljanja dijagnoze, težina cGvHD-a se procjenjuje na temelju kliničke evaluacije, laboratorijskih jetrenih testova i testova plućne funkcije prema kojima se organima ili organskim sustavima pridaje ocjena na skali od 0 do 3 gdje 0 označava nepostojanje simptoma, a 3 prisustvo najtežih formi bolesti. Formular s kriterijima za ocjenu zahvaćenosti pojedinih organa prema NIH kriterijima nalazi se u Prilozima na kraju disertacije.

Konačna težina bolesti procjenjuje se na temelju broja zahvaćenih organa i ocjene njihovog funkcionalnog oštećenja, i to po sljedećim kriterijima:

- **Blagi cGvHD:** zahvaćenost 1 ili 2 organa s ocjenom koja nije viša od 1 uz ocjenu pluća 0
- **Srednje teški cGvHD:** zahvaćenost 3 ili više organa s ocjenom koja nije viša od 1 ILI bar jedan organ (osim pluća) s ocjenom 2 ILI ocjena pluća 1
- **Teški cGvHD:** bar jedan organ s ocjenom 3 ILI ocjena pluća 2 ili 3.

S obzirom da pojedine promjene mogu biti odraz proteklih oštećenja ili sekvele dugotrajnosti bolesti, procjena aktivnosti cGvHD-a ne može se procijeniti samo na temelju kliničkih manifestacija te ona predstavlja izazov za sebe. Konsenzus o procjeni aktivnosti nije postignut do danas, a u praksi se temelji na dinamici promjena u kliničkoj slici.

Tablica 1. Pregled znakova i simptoma cGvHD-a prema aktualnim NIH smjernicama (8)

Organski sustav	Dijagnostičke manifestacije	Distinktivne manifestacije	Ostale manifestacije	Zajedničke manifestacije aGvHD-a i cGvHD-a
Koža	<ul style="list-style-type: none"> Poikiloderma Promjene nalik lichen-planusu Sklerotične značajke Promjene nalik morphei Promjene nalik lichen sclerosusu 	<ul style="list-style-type: none"> Depigmentacija Papuloskvamozne lezije 	<ul style="list-style-type: none"> Poremećaj znojenja Ihtioza Keratozis pilaris Hipopigmentacija Hiperpigmentacija 	<ul style="list-style-type: none"> Eritem Makulopapularni osip Pruritus
Nokti		<ul style="list-style-type: none"> Distrofija Stvaranje longitudinalnih grebena, cijepanje ili lomljivost Oniholiza Pterigium unguis Gubitak nokta (obično simetričan, zahvaća većinu noktiju) 		
Dlake vlasišta i tijela		<ul style="list-style-type: none"> Novonastala ožiljna ili neožiljna alopecija (nakon oporavka od kemoradioterapije) Gubitak dlaka na tijelu Ljuštenje vlasišta 	<ul style="list-style-type: none"> Stanjivanje kose, tipičan je gubitak kose u pečatima, kosa je gruba i bez sjaja (ne može se objasniti endokrinim ili drugim poremećajima) Preuranjena pojava sijede kose i dlaka 	
Usta	<ul style="list-style-type: none"> Promjene nalik lichen-planusu 	<ul style="list-style-type: none"> Kserostomija Mukokele Atrofija mukozne sluznice Ulceracije Pseudomembrane 		<ul style="list-style-type: none"> Gingivitis Mukozitis Eritem Bol
Oči		<ul style="list-style-type: none"> Novonastala suhoća, bol ili osjećaj pijeska u očima Cikatricijalni konjunktivitis Keratokonjunktivitis sicca Točkasta keratopatija 	<ul style="list-style-type: none"> Fotofobija Hiperpigmentacija periorbitalnog područja Blefaritis (eritem i edem očnih kapaka) 	
Genitalni trakt	<ul style="list-style-type: none"> Promjene nalik lichen-planusu Promjene nalik lichen sclerosusu 			
<i>Žene</i>	<ul style="list-style-type: none"> Vaginalno ožiljkavanje ili sljepiljvanje klonitorisa ili stidnih usana 	<ul style="list-style-type: none"> Erozije Fisure Ulceracije 		
<i>Muškarci</i>	<ul style="list-style-type: none"> Fimoza ili ožiljkavanje/stenoza mokraćovoda ili vanjskog otvora mokraćovoda 			

Gastrointestinalni trakt	<ul style="list-style-type: none"> Ezofagealna mreža Striktura ili stenozna u gornjoj ili srednjoj trećini jednjaka 		<ul style="list-style-type: none"> Egzokrina insuficijencija gušterače 	<ul style="list-style-type: none"> Anoreksija Mučnina Povraćanje Dijareja Gubitak težine Nenapredovanje (dojenčad i djeca)
Jetra				<ul style="list-style-type: none"> Ukupni bilirubin, alkalna fosfataza > 2 x gornje granice Alkalna transferaza > 2 x gornje granice
Pluća	<ul style="list-style-type: none"> Obliterirajući bronhiolitis dijagnosticiran biopsijom pluća Sindrom obliterirajućeg bronhiolitisa (dijagnosticiran testom plućne funkcije i HRCT u inspiriju i ekspiriju) 	<ul style="list-style-type: none"> Zadržavanje zraka i bronhiektazije na CT-u pluća 	<ul style="list-style-type: none"> Kriptogena organizirana pneumonija Restriktivne bolesti pluća 	
Mišići, fascija, zglobovi	<ul style="list-style-type: none"> Fascitis Ukočenje zglobova ili kontraktura nastale zbog fascitisa ili skleroze 	<ul style="list-style-type: none"> Miozitis ili polimiozitis 	<ul style="list-style-type: none"> Edem Grčevi mišića Artralgija ili artritis 	
Hematopoetski i imunološki sustav			<ul style="list-style-type: none"> Trombocitopenija Eozinofilija Limfopenija Hipo/hiper gamaglobulinemija Autoprotutijela (AIHA, ITP) Raynaudov fenomen 	
Ostalo			<ul style="list-style-type: none"> Perikardijalna ili oleuralna efuzija Ascites Periferna neuropatija Nefrotski sindrom Miastenia gravis Abnormalnosti u srčanom provođenju ili kardiomiopatija 	

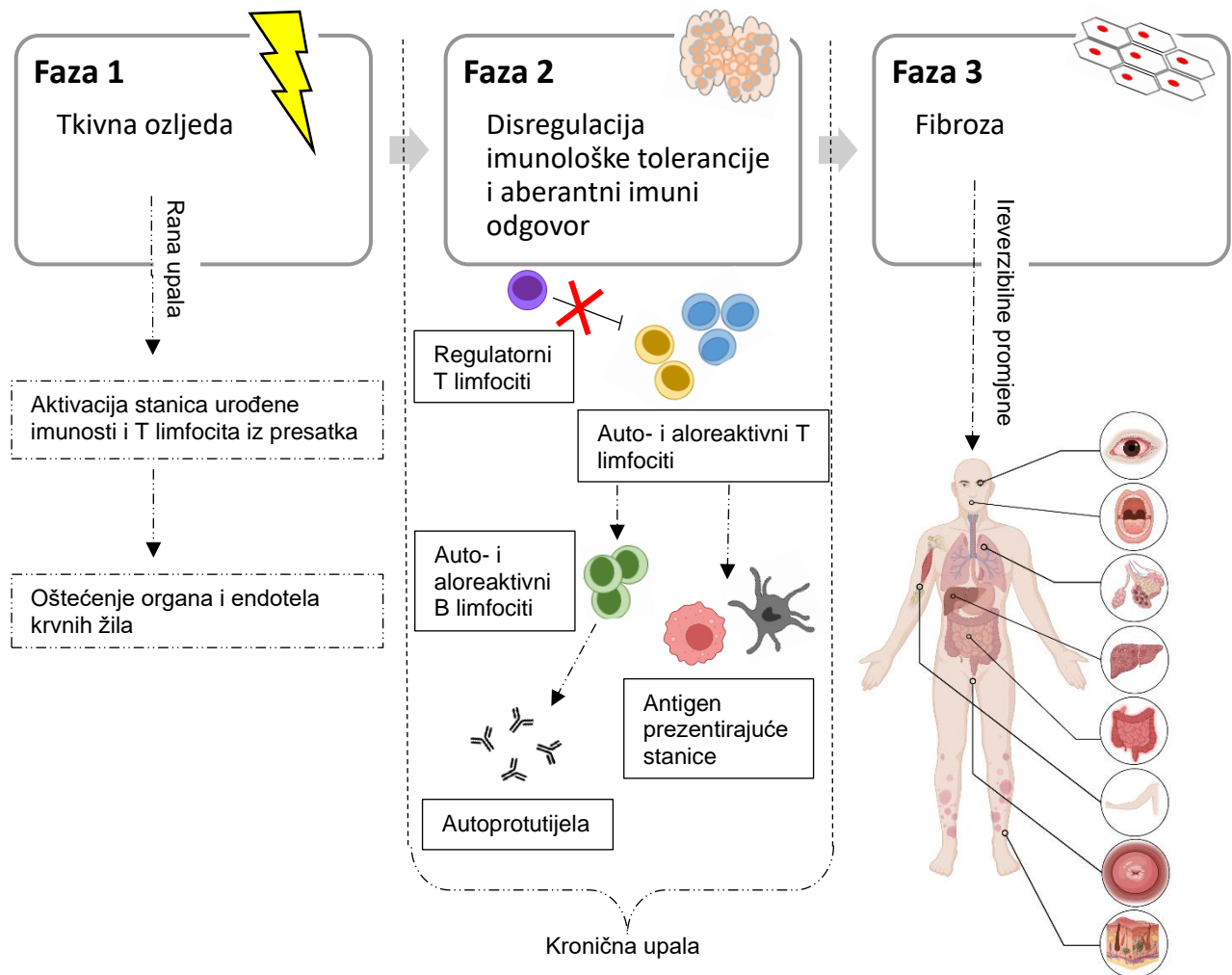
Kratice: HRCT – CT visoke rezolucije (eng. *high resolution computed tomography*); AIHA – autoimuna hemolitička anemija; ITP – imuna trombocitopenija

1.1.4. Patofiziologija

U podlozi heterogenih kliničkih manifestacija GvHD-a iznimno su kompleksni patofiziološki obrasci posredovani neprikladnim imunološkim odgovorima nastalima u procesu rasta i sazrijevanja imunih stanica presatka u „neprijateljskom“ antigenskom okruženju primatelja. Za razliku od relativno jednostavne patogeneze aGvHD-a gdje su za razvoj kliničke slike odgovorni citokini producirani T limfocitima iz presatka koji nastaju u odgovoru na antigene histokompatibilnosti primatelja, kod cGvHD-a dolazi do poremećaja kontrolnih mehanizama koji uzrokuju disregulaciju cijelog imunološkog sustava (17). Opće je prihvaćen patofiziološki model koji pojednostavljenim prikazom objašnjava genezu bolesti u 3 koraka (Slika 1). Prvi korak u nastanku bolesti je tkivna ozljeda i rani upalni odgovor uslijed kojeg dolazi do poremećaja mehanizama imunološke tolerancije što rezultira aberantnim imunim odgovorom - drugim korakom u nastanku bolesti. Neprimjeren imuni odgovor uzrokuje produljeno stanje kronične upale što potom dovodi do trećeg koraka, nastanka fibroze koja vodi k ireverzibilnim sklerotskim promjenama ciljnih organa (17,18). Važno je primjetiti kako prema predloženom modelu proinflamatorno stanje nastalo aktivnošću aGvHD-a podržava i propagira nastanak cGvHD-a, čime se objašnjava i njihova neupitna povezanost.

Iz imunološke perspektive, najznačajnija karakteristika cGvHD-a je spora imuna rekonstitucija koja se očituje smanjenom razinom regulatornih T stanica (eng. *T regulatory cells*, Tregs), regulatornih B stanica (eng. *B regulatory cells*, Bregs) i drugih regulatornih stanica. Da je cGvHD zaista bolest imunološkog sustava vidimo i neposredno, na primjerima iz prakse. Tako se primjerice važnost uloge T limfocita očituje smanjenjem incidencije cGvHD-a deplecijom T limfocita iz presatka te smanjenoj incidenciji i blažoj formi bolesti kod djece kod koje još nije došlo do involucije timusa što im omogućuje bržu rekonstituciju T stanica i skraćenje proinflamatornog stanja (19). Poznato je i da se posljedično disregulaciji humoralne imunosti kod cGvHD bolesnika mjere visoke razine alo- i autoprotutijela koji se drže odgovornima za razvoj ireverzibilnih kroničnih promjena u ciljnim organima, a značajka su i svih drugih autoimunih bolesti s kojima cGvHD dijeli kliničku prezentaciju. Kada se priča o patofiziologiji cGvHD-a, treba spomenuti i njegovu zaštitnu ulogu protiv relapsa podložne maligne bolesti. Naime, iako je u visokomorbidnim formama cGvHD zaista mutilirajuća bolest, učinkom presatka protiv tumora (eng. *Graft-versus-Tumor*,

GVT) koji se se javlja združeno s GvHD-om, ujedno je i vrijedno oruđe u borbi protiv osnovne bolesti čiji je relaps i dalje jedan od glavnih uzročnika smrti kod bolesnika koji su alotransplantirani. Ipak, pozitivan učinak GVT-a nije eksplicitan jer unatoč nižoj incidenciji relapsa kod oboljelih od cGvHD-a, bolje stope preživljenja imaju samo bolesnici koji razviju blagi oblik bolesti. Razlog je taj što mortalitet uzrokovan težim oblicima bolesti anulira pozitivni efekt zaštitne uloge od relapsa u odnosu na ukupno preživljenje (20).



Slika 1. Shematski prikaz patofiziologije nastanka cGvHD-a (prilagođeno prema Cooke i sur. (2017)²³ te Zeiser i sur. (2017)²⁴, izrađeno pomoću BioRender.com).

Faza 1 prikazuje tkivnu ozljedu uzrokovanu kondicioniranjem i sekundarnim inzultima (infekcije, aGvHD, ukidanje imunosupresije, infuzija donorovih limfocita, oštećenja kože uzrokovana ultraljubičastim zračenjem, itd). Tkivna ozljeda rezultira ranim upalnim odgovorom karakteriziranim ekspresijom citokina koji uzrokuju aktivaciju antigen prezentirajućih stanica (APC), a potom i umnažanje T limfocita iz presatka. Efektorske stanice prelaze u krv gdje dolazi do aktivacije endotelnih stanica koje promiču njihovu daljnju migraciju u limfoidne, a u konačnici i u ciljne organe. S obzirom da kondicioniranje dovodi i do oštećenja timusa, dolazi do disregulacije u produkciji naivnih T limfocita i gubitka regulatornih stanica koje su zadužene za negativnu selekciju, što vodi **drugoj fazi** u genezi cGvHD-a – gubitku centralne i periferne regulacije tolerancije koja rezultira abnormalnim imunim odgovorom. Posljedično tome dolazi do nekontrolirane produkcije aloreaktivnih i autoreaktivnih T limfocita, aktivacije B limfocita i stvaranja depozita autoprotutijela te do aktivacije stanica urođene imunosti (makrofazi, dendritičke stanice i dr.). Stanice koje su izbjegle imunološku regulaciju podržavaju stanje produljene kronične upale koja dovodi do daljnjeg oštećenja tkiva, a to vodi do **faze 3** u procesu razvoja cGvHD-a, neprimjerene obnove oštećenog tkiva aktivacijom fibroblasta i nakupljanjem ekstracelularnog matriksa koje doprinosi neelastičnosti tkiva. U konačnici nastaje fibroza koja je refraktorna na liječenje zbog čega bolest često rezultira karakterističnim ireverzibilnim sklerotskim promjenama i disfunkcijom ciljnih organa.

1.1.5. Liječenje

Dok transplantacijska biologija traga za načinom uspostave imunoregulatorne homeostaze koja znači toleranciju auto- i aloantigena uz očuvanje imunog odgovora i GVT efekta, liječenje cGvHD-a se i dalje temelji na općoj immunosupresiji. Naime, kako su rana iskustva pokazala da neuvođenje sistemske terapije pri dijagnozi težih oblika cGvHD-a rezultira neizbježnom smrću (21), kortikosteroidi su vrlo rano postali zlatni standard liječenja, a u nedostatku učinkovite ciljane terapije to su i ostali već više od 40 godina. Njihova primjena u dozi od 1 mg/kg dnevno indicirana je pri postavljanju dijagnoze cGvHD-a umjerenog i teškog stupnja dok je za liječenje blagog oblika dovoljna upotreba topikalnih immunosupresiva (22). S obzirom na toksičnost i povećanu prijemčljivost za infekcije uzrokovanu kortikosteroidnim liječenjem, terapijski cilj je olakšanje simptoma uz objektivnu kontrolu manifestacija bolesti, sprječavanje trajnih oštećenja i poboljšanje ukupnog preživljenja bez debilitirajućeg djelovanja lijekova. Poznato je naime da dugotrajnom upotrebom kortikosteroida nastaju brojne ozbiljne komplikacije kao što su Cushingov sindrom, steroidni dijabetes, osteoporoza, avaskularna nekroza, miopastrofija, gojaznost, katarakta, glaukom, dislipidemija, hipertenzija, promjene raspoloženja, kronična adrenalna insuficijencija i supresija rasta kod djece. Balans između blagotvornog učinka kortikosteroida na cGvHD i njihove toksičnosti pokušava se postići pažljivim postupnim ukidanjem terapije i korištenjem minimalne efektivne doze koja kontrolira simptome, a ne onemogućuje djelovanje GVT efekta. Rana redukcija doze omogućena je korištenjem immunosupresivnih agenasa koji štede upotrebu steroida (eng. *steroid sparing agents*) kao što su kalcineurinski inhibitori (eng. *calcineurin inhibitors*, CNI) ciklosporin (CSP) i takrolimus (TAC). Ovakva kalibracija zahtjeva pomno praćenje vodećeg liječnika kroz produljeni vremenski period i iznimno je zahtjevna, kako za kliničare, tako i za pacijente. Čak ni uz sve to, uspjeh prve linije nije impresivan. Tek 20% oboljelih postigne kompletnu remisiju, dok kod njih otprilike 50% odgovor na kortikosteroide nije zadovoljavajući (23,24). Prema definiciji, steroid-refraktorni oblik cGvHD-a karakteriziran je progresijom simptoma uz korištenje visokih doza kortikosteroida (≥ 1 mg/kg) u razdoblju od minimalno tjedan dana ili nepromijenjenim stanjem uz dozu kortikosteroida koja je $\geq 0,5$ mg/kg u razdoblju od barem mjesec dana, dok je steroid-ovisni oblik karakteriziran nemogućnošću kontrole simptoma tijekom smanjivanja doze

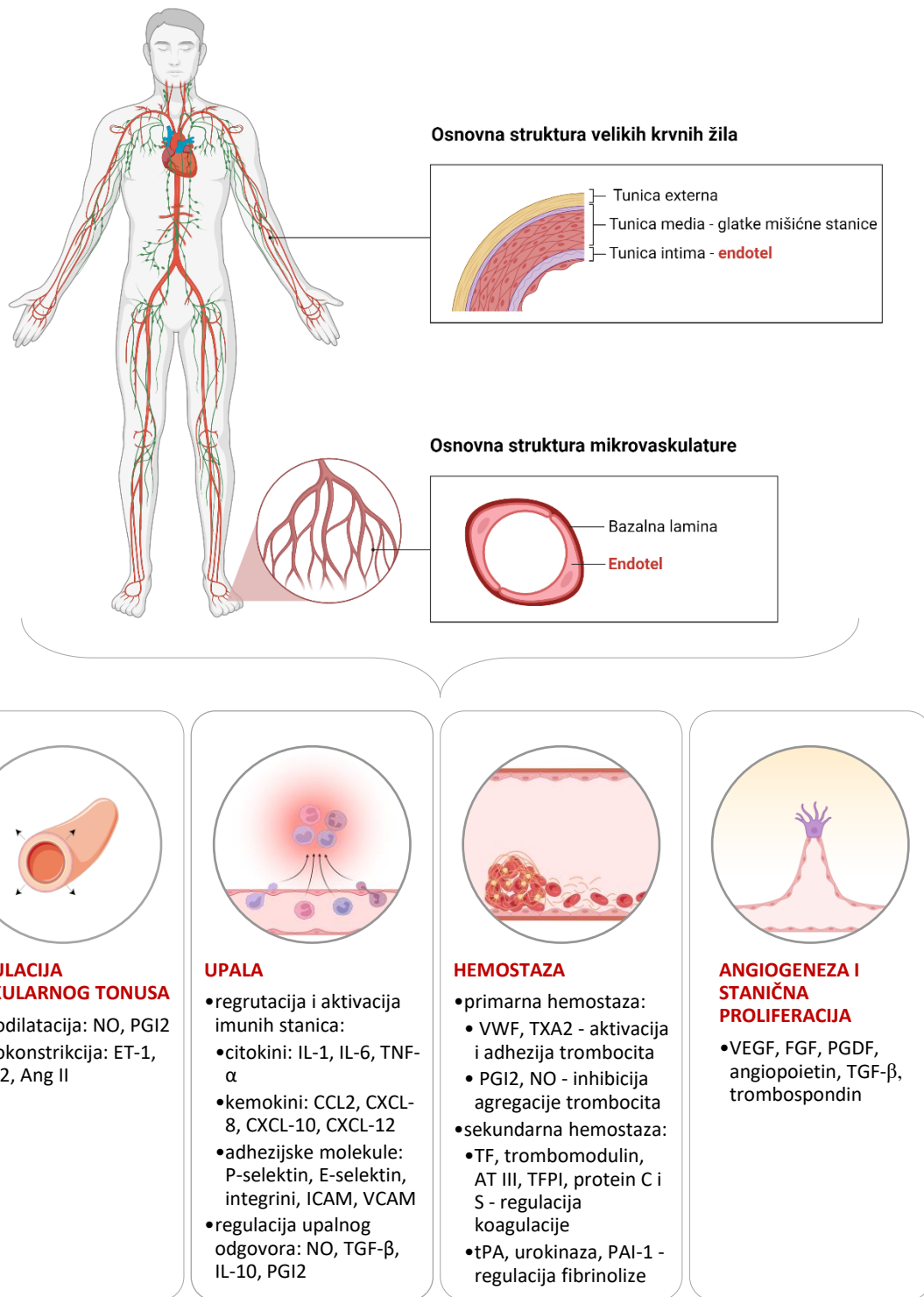
prednizona na ispod 0,25mg/kg dnevno (ili 0,5mg/kg svako drugi dan) koje je pokušano bar dva puta u razmaku od 8 tjedana (24). Za liječenje bolesnika koji ne odgovore na kortikosteroide postoje druge dostupne terapijske opcije, s tim da je tek posljednjih godina započeto s registriranjem lijekova za liječenje cGvHD-a u drugoj i kasnijim linijama. U Sjedinjenim Američkim Državama prvi odobreni lijek za liječenje kroničnog GvHD-a bio je ibrutinib, inhibitor Brutonove tirozin kinaze koji djeluje na B i T staničnu lozu limfocita što ga čini privlačnim agensom u kontroli manifestacija koje nastaju posljedično proizvodnji autoprotutijela (24). Pokrenuta su potom brojna daljnja ispitivanja zahvaljujući kojima su odobreni ruksolitinib i belumosudil, još dva inhibitora tirozin kinaze koji atenuacijom signalnih puteva kontroliraju manifestacije bolesti (25). Zahvaljujući impresivnim rezultatima REACH2 i REACH3 studije, ruksolitinib je postao prvi lijek koji je i u Europi odobren za liječenje refraktornog oblika ove bolesti. S obzirom da je u tijeku nekoliko randomiziranih kliničkih studija kojima se istražuje učinkovitost liječenja i u prvoj i u drugoj liniji liječenja bilo novim lijekovima, bilo kombinacijom onih koji su dostupni od ranije, uskoro bi mogli očekivati i neka nova odobrenja. Predviđa se da će se u budućnosti liječenje cGvHD-a temeljiti na ciljanoj terapiji uz individualni pristup dok će generalizirana imunosupresija biti stvar prošlosti.

1.2. Endotelna ozljeda u kontekstu kronične bolesti presatka protiv primatelja

Kao što smo već konstatali, endotelna ozljeda je neizostavan korak u inicijaciji cGvHD-a. U tekstu koji slijedi sažeto se prikazuje građa i fiziološka uloga endotela, najvažniji patofiziološki mehanizmi kojima endotel sudjeluje u razvoju kroničnih bolesti te dosadašnje znanje o endotelnoj ozljedi kod bolesnika kod kojih je provedena alo-PKMS.

1.2.1. Svojstva i funkcije endotela

Endotel predstavlja jednosloj endotelnih stanica pričvršćenih na bazalnu laminu koji s unutarnje strane oblaže čitavi krvožilni sustav ograđujući time krv i limfu od okolnih tkiva i organa. Upravo zahvaljujući toj strateškoj poziciji endotel djeluje i kao regulator brojnih procesa od kojih su najznačajniji kontrola vaskularnog tonusa, upale i hemostaze (26,27). Na Slici 2 detaljnije je prikazana struktura i funkcija endotela s prikazom najvažnijih medijatora koji sudjeluju u pojedinim procesima. Uspješno obavljanje ovog širokog spektra zadataka endotelu je omogućeno visokofunkcionalnom i dinamičnom prilagodljivošću zahvaljujući kojoj može u potpunosti izmijeniti svoj fenotip i prilagoditi ga zahtjevima okolnih tkiva. Tako primjerice u mikrovaskulaturi jetre, slezene ili koštane srži nalazimo sinusoidalni endotel, u glomerulima i gastrointestinalnom sustavu fenestrirani endotel, a u krvno-moždanoj barijeri visokoselektivni endotel povezan tijesnim vezama (28). Nadalje, na remećenje stanja homeostaze endotel reagira pokretanjem niza mehanizama koji uključuju promjenu tonusa vaskulature, modulaciju autokrinog, parakrinog i endokrinog lučenja te stvaranje genetskih varijacija koje rezultiraju dugoročnim restrukturiranjem krvnih žila (26). Ovaj niz akutnih i kroničnih adaptacijskih mehanizama koji omogućuje učinkoviti odgovor endotela na štetne podražaje ujedno je i dio patološkog obrasca koji sudjeluje u nastanku brojnih bolesti. Naime, zbog nespecifičnosti noxi koje stimuliraju fiziološki odgovor, endotel je u stanjima abnormalnog ili prolongiranog oštećenja podložan razvoju endotelne disfunkcije koja promjenom strukture i funkcije endotela pogoduje oštećenju okolnih tkiva i organa.



Slika 2. Prikaz strukture i funkcije endotela. U gornjem dijelu slike shematski je prikazana raspodjela krvožilnog i limfnog sustava uz prikaz uloge endotela u građi velikih krvnih žila i mikrovaskulature dok su u donjem dijelu slike prikazane najvažnije fiziološke funkcije endotela uz popis najbitnijih medijatora koji su povezani s endotelom (prilagođeno prema Xu i sur. (2021)⁽²⁷⁾, izrađeno pomoću BioRender.com).

Kratice: NO – dušikov oksid, PGI2 – prostaciklin, ET-1 – endotelin 1, TXA2 – tromboksan A2, Ang II – angiotenzin II, IL interleukin, TNF- α – faktor tumorske nekroze α (eng. *tumor necrosis factor α*), ICAM – međustanična adhezijska molekula (eng. *intercellular adhesion molecule*), VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula (eng. *vascular cell adhesion molecule*), TGF- β – transformirajući faktor rasta β (eng. *transforming growth factor beta*), VWF – von Willebrandov faktor, TF – tkivni faktor, AT III – antitrombin III, TFPI – inhibitor puta tkivnog faktora (eng. *tissue factor pathway inhibitor*), tPA – aktivator tkivnog plazminogena (eng. *tissue activator plasmnogen*), PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena 1 (eng. *plasminogen activator inhibitor-1*), VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*), FGF- faktor rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor*), PDGF – trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor*).

1.2.2. Endotelna ozljeda

Kao što je već rečeno, na svaki štetni podražaj endotel pokreće fiziološki odgovor koji obuhvaća niz mehanizama čiji je cilj održavanje homeostaze. U ranoj fazi endotelna aktivacija podrazumijeva stimulaciju endotelne stanice na brzi i reverzibilni odgovor dok u drugoj fazi potiče spore i dugoročne morfološke i funkcionalne promjene u endotelu. U slučaju da štetni podražaj nadvlada mogućnost homeostatskog odgovora dolazi do neprimjerene aktivacije endotela odnosno njegove ozljede koja se prezentira abnormalnim strukturnim promjenama i disregulacijom funkcije koja rezultira dalekosežnim promjenama u organizmu (27,29). Termin kojim se označava promjena fiziološkog protuupalnog, antitrombotskog, vazodilatacijskog i antiproliferativnog stanja endotela u promijenjeni proupalni, protrombotski, vazokonstriksijski i proliferativni fenotip je endotelna disfunkcija (27).

Uzročnici endotelne disfunkcije brojni su i raznovrsni, a neki od najznačajnijih su:

- mehanička ozljeda (29)
- upala (27,30–32)
 - bakterijski lipopolisaharidi (LPS)
 - infekcija određenim virusima kao što su npr. COVID-19 i citomegalovirus (CMV)
 - kronične autoimune bolesti
- oksidativni stres (27,33,34)
 - podražaji povezani s hiperglikemijom i poremećenim protokom krvi kao što je to u hipertenziji
- dislipidemija (27,35)
 - promijenjeni lipoproteini niske gustoće (LDL)
 - disfunkcionalni lipoproteini visoke gustoće (HDL)
- izloženost toksinima (36,37)
 - polutanti zraka, pesticidi, teški metali poput žive, itd.
 - određeni lijekovi npr. doksorubicin i inhibitori vaskularnog endotelnog faktora rasta (anti-VEGF)
- drugi rizični faktori (27,29,35,38)
 - starenje
 - pušenje

- fizička neaktivnost
- nezdrava prehrana
- pretilost
- zračenje
- fiziološki stres
- menopauza
- genetska predispozicija.

U samom početku, endotelni odgovor na molekularne uzorke povezane s patogenima (eng. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) i molekularne uzorke povezane s oštećenjem (eng. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) karakteriziran je gubitkom vaskularnog integriteta, povećanom ekspresijom kemotaktičnih i adhezijskih molekula te oslobađanjem velikih količina vWF i drugih protrombotskih medijatora (39). I dok gubitak vaskularnog integriteta uzrokuje povećanje propusnosti i curenje intravaskularnog sadržaja te vodi do pretjeranog izlaganja subendotela štetnim učincima, ekspresija kemotaktičnih i adhezijskih molekula kao što su E-selektin, međustanična adhezijska molekula 1 (eng. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) i vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (eng. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) omogućuje prijanjanje leukocita na endotel i njihovu diapedezu u tkiva (33). Nadalje, protrombotski učinci endotelne aktivacije rezultiraju aktivacijom primarne i sekundarne hemostaze, odnosno pojačanim i neadekvatno reguliranim stvaranjem krvnih ugrušaka kao što je to pimjerice u sepsi (33). Još jedna značajka disfunkcionalnog endotela koja je aktualna tema istraživanja u transplantacijskoj biologiji je sposobnost endotelnih stanica da preuzmu ulogu antigen prezentirajućih stanica (APC) i time pretvori endotel u metu imunog sustava (40). Naime, neka istraživanja pokazuju kako na staničnoj površini disfunkcionalnog endotela u određenim situacijama može doći do zamjene prezentiranog glavnog kompleksa histokompatibilnosti HLA-I koji se inače prezentira na zdravom endotelu u HLA-II klasu sustava tkivne snošljivosti koja pak svojim djelovanjem promovira upalno stanje (41). Istodobno s navedenim ranim događajima upalne imune stanice sintetiziraju i upalne medijatore odnosno proupalne citokine koji potom djeluju kao efektori dugoročnih upalnih promjena potičući ekspresiju određenih gena kroz aktivaciju pleotropnih transkripcijskih faktora od kojih je najvažniji nuklearni faktor κ B (NF- κ B). Time se kontrolira sinteza efektorskih proteina koji potiču migraciju

monocita/makrofaga i T limfocita te razvoj proinflamatornog miljea koji podržava kronično upalno stanje i time pogoduje daljnjem razvoju bolesti (30,42). Navedenim procesom potiče se i proliferacija glatkog mišića u velikim žilama koji svojim rastom prodire u endotel čime se podržava angiogeneza koja rezultira stvaranjem abnormalnih krvnih žila (33). Upalni medijatori osim autokrinog imaju i parakrino djelovanje te na taj način potiču stvaranje reaktanata akutne faze u udaljenim tkivima i organima, kao što je to primjerice sinteza C-reaktivnog proteina (CRP) u jetri (43). Na taj način upalni medijatori reguliraju upalni proces u udaljenim organima i sudjeluju u nastanku kliničkih manifestacija. Upravo iz ovih razloga endotelna ozljeda čini sastavni dio patofiziološkog obrasca brojnih panvaskularnih upalnih i kroničnih bolesti od čega su najznačajnije kardiovaskularne bolesti (27), šećerna bolest (44) i autoimune bolesti (31). Važno je za napomenuti kako kod sistemske skleroze i sistemskog eritemskog lupusa (SLE), autoimunih bolesti koje klinički najviše nalikuju cGvHD-u, endotelna disfunkcija značajno korelira s aktivnošću bolesti čime se implicira direktan učinak endotelne disfunkcije na razvoj debilitirajućih simptoma (45). S obzirom na kompleksnost i sveobuhvatnost ove teme te uzimajući u obzir temu ovog istraživanja, u sljedećem odjeljku fokusirati ćemo se samo na značajke endotelne ozljede kod bolesnika nakon alo-PKMS, osobito onih kod kojih je postavljena dijagnoza cGVHD-a.

1.2.3. Endotelna ozljeda nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica

Alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica postupak je koji u endotelnoj ozljedi sudjeluje višestrukim mehanizmima od čega se zbog svoje specifičnosti za ovu proceduru osobito ističu oni aloimuni. S obzirom na brojne štetne učinke prije, tijekom i nakon alo-PKMS, kod bolesnika kod kojih je provedena alo-PKMS teško je razlučiti direktnu razinu utjecaja pojedinog čimbenika na razvoj endotelne disfunkcije. Naime, osim alogeničnosti kao takve i već navedenih stresora kojima su i ovi bolesnici izloženi jednako kao i svi drugi, dodatni udarac na zdravlje endotela predstavlja i sama maligna bolest, translokacija endotoksina iz crijevne mikrobiote kroz oštećenu gastrointestinalnu sluznicu, citotoksično liječenje, zračenje, imunosupresivna terapija i povećana incidencija infektivnih zbiljanja s protrahiranim trajanjem upalnog stanja (46). Ipak, dosadašnja istraživanja pokazala su kako je razina endotelne aktivacije

prije same alo-PKMS dobar pokazatelj ukupnog preživljenja te prediktor ishoda procedure i razvoja endotelnih sindroma koji se javljaju kao komplikacija alo-PKMS (47). U posttransplantacijskom razdoblju se endotelna ozljeda dugo shvaćala isključivo kao pasivna posljedica kombinacije vanjskih i aloimunih utjecaja na endotel. Tako je bilo i u akutnom GvHD-u, ranoj komplikaciji alo-PKMS koju karakterizira upalni odgovor izazvan imunim stanicama darivatelja koje tkiva primatelja prepoznaju kao strana a u čijoj je patofiziologiji endotelna ozljeda komponenta neupitne važnosti (48). Veliki obrat u konceptualizaciji uloge endotela u aGvHD-u dogodio se kada su Tichelli i Gratwohl postavili koncept endotelne forme GvHD-a (49). Takva ideja nastala je na temelju istraživanja Biedermann i suradnika koji su postavili teoriju o vaskularnom endotelu kao aloimunoj meti i aktivnom sudioniku imunološkog procesa (50). Navedeno su argumentirali od ranije poznatom sposobnošću endotelne stanice malih krvnih žila da preuzme funkciju antigen prezentirajućih stanica (40), a koncept je kasnije potvrđen i *in vitro* istraživanjem Eissnera i suradnika koji su pokazali da detrimentalni podražaj u aloimunom okruženju uzrokuje pojačanu lizu endotelnih stanica (51). Da je uloga endotela u aGvHD-u zaista aktivna potvrdilo je i istraživanje kojim se pokazala značajna veza između endotelne disfunkcije i razvoja aGvHD-a refraktornog na steroide (52), a nedavno su objavljeni i rezultati eksperimentalnih istraživanja koji su pokazali kako korištenje sredstava koji imaju zaštitni učinak na endotel, kao što su sildenafil i defibrotid, smanjuje težinu bolesti (53–55). Nadalje, iako je takvo mišljenje još uvijek kontroverzno, u učinke endotelnog GvHD-a sve češće se ubrajaju i sindromi endotelne ozljede, teške rane komplikacije alo-PKMS kao što su trombotska mikroangiopatija povezana s transplantacijom (TA-TMA), sindrom sinusoidalne okluzije (SOS) ranije poznat kao venookluzivna bolest (VOD), difuzno alveolarno krvarenje (DAH) i sindrom kapilarnog curenja (CLS) (49). Navedeno je argumentirano činjenicom kako sve ove komplikacije, jednako kao i aGVHD, imaju zajedničke rizične čimbenike (dob, osnovna bolest, citotoksična terapija, korištenje imunosupresiva), svi imaju ishodište u endotelnim stanicama mikrovaskulature i rezultiraju endotelnom disfunkcijom. Prema zagovarateljima ove teorije, različite prezentacije bolesti mogle bi biti uzrokovane heterogenošću endotela i specifičnošću podražaja koji djeluje na endotel. Naime, oni smatraju da se zahvaljujući različitoj morfološkoj i funkcijskoj ulozi endotela u različitim tkivima javlja različit odgovor koji potom rezultira različitim kliničkim prezentacijama, odnosno različitim endotelnim

sindromima nakon alo-PKMS-a (46). Teško je procijeniti je li to zaista tako, ali ono s čim se svi slažu je činjenica da je funkcija endotela u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju važan etiopatološki čimbenik koji je još uvijek nedovoljno istražen. Što se cGvHD-a tiče, iako je poznato da u nastanku bolesti, među ostalim, sudjeluje i endotelna ozljeda, istraživanja funkcije endotela kod oboljelih su malobrojna i karakterizirana neuniformnošću kohorti. Pivotalna istraživanja na tu temu bila su ona od baselske grupe predvođene Biedermann koja je opisala povišenje serumskih razina VWF kao znak endotelne aktivacije kod cGvHD bolesnika. U tom istom radu opisali su i „efekt kasnog nestajanja krvnih žila“ odnosno prorjeđenje mikrožilja u dermisu cGvHD bolesnika koje je bilo praćeno infiltracijom aloreaktivnih citotoksičnih T limfocita te su zaključili kako je reducirana vaskularizacija uzrok nastanka fibroze te da je endotel pritom imuna meta (56). S obzirom da skleroza tipično nastaje relativno kasno u tijeku bolesti, u skladu s ovim istraživanjem je i ono Medingera i suradnika koji su povezali smanjenje razine markera angiogeneze s duljinom trajanja cGvHD-a (57). Daljna istraživanja baselske grupe ovaj gubitak vaskulature potvrdila su samo kod bolesnika s aktivnom sklerotskom formom cGVHD-a kože (58), dok se istraživanjem Fleminga i suradnika koji su za procjenu gustoće mikrožilja koristili drugu metodu, korelacija skleroze i prorjeđenja mikrožilja u dermisu oboljelih od kožnog cGVHD-a nije detektirala (59). Baselska grupa pokazala je nadalje i da gubitak mikrožilja može biti reverzibilan ukoliko je sklerotski cGvHD kože uspješno liječen (58). Za spomenuti je svakako i istraživanje Shimure i suradnika kojim je detektiran snižen broj endotelnih progenitorskih stanica (EPC) u sklerotskom obliku cGvHD-a (60). Riječ je naime o stanicama koje se stvaraju u koštanoj srži i inkorporirajući se u krvne žile na mjestu oštećenja imaju aktivnu ulogu u oporavku oštećenog endotela. Uz snižene EPC ova grupa je zabilježila i snižen potencijal stvaranja kolonija endotelних stanica i paradoksalno povišenje citokina angiogeneze vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, eng. *vascular endothelial growth factor*) kod bolesnika sa sklerotskim cGvHD-om i navedeno su usporedili s karakteristikama vaskulopatije kakva se javlja i kod bolesnika sa sistemskom sklerozom, bolešću koja je, podsjetimo, klinički najbližnja sklerotskom obliku cGvHD-a. Zanimljivo je i istraživanje Willemzea i suradnika koji su pokazali kako su u endotelu alotransplantiranih bolesnika prisutne stanice donorskog porijekla, da je s vremenom proteklim od alo-PKMS-a udio tih stanica sve veći te da je kod cGvHD bolesnika značajno veći nego kod alotransplantiranih bolesnika kod kojih

se cGvHD nije razvio (61). Iz ovog istraživanja evidentno je da endotelna ozljeda postoji dugo nakon alo-PKMS-a, a da endotelna forma GvHD-a zaista perzistira dugo nakon alo-PKMS-a dodatno sugerira i povišena prevalencija kasnih kardiovaskularnih komplikacija kod preživjelih što bi teoretski moglo biti posljedica djelovanja aloimunosti na endotel (49). Svakako treba naglasiti i da liječenje cGvHD-a predmnijeva supresiju endotelne aktivacije s obzirom da neki od najznačajnijih protuupalnih svojstava glukokortikoida nastaju upravo inhibicijom NF- κ B (62). Poznat je i utjecaj ostalih odobrenih imunomodulatornih lijekova u atenuaciji upalnog odgovora povezanog s endotelnom diskfunkcijom čime se može zaključiti da zapravo mnogi vidovi liječenja cGvHD-a na ovaj ili na onaj način djeluju i na endotel. Tako su primjerice ROCK inhibitori nove zvijezde liječenja kornealne endotelne bolesti (63), a istražuje se i njegovo korištenje u kardiologiji (64). Poznat je i blagotvoran učinak JAK inhibitora na endotelnu ozljedu (65), dok je utjecaj ibrutiniba nejasan s obzirom da s jedne strane ima antiproliferativno djelovanje, a s druge povećava rizik za kardiovaskularne bolesti povezane s endotelnom ozljedom (66). Zaključno, uloga endotelne ozljede nakon alo-PKMS-a je značajna, ali zbog višestrukih uloga endotela i zamršenosti međusobnih odnosa između etioloških i regulatornih faktora, uzročno-posljedična veza je nedovoljno razjašnjena. Kad se uzme u obzir da je endotelna ozljeda u podlozi gotovo svake bolesti nije ni čudo da je tome tako, a s obzirom na rastuće zanimanje za istraživanjem endotela biti će zanimljivo pratiti razvoj ovog područja u budućnosti.

1.3. Biomarkeri u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja

Prema najširoj definiciji biomarker je varijabilna biokemijska tvar prema kojoj se može detektirati određeni fiziološki ili patološki proces. U okvirima cGvHD-a, biomarkerom se smatra ona karakteristika koja se objektivno, pouzdano i precizno može izmjeriti kao indikator fiziološkog ili patogenog procesa te kliničkog i biološkog odgovora na terapijsku intervenciju (67). Prema tome, biomarker može imati raznovrsnu ulogu - možemo ga koristiti u identifikaciji oboljelih od cGvHD-a, pri određivanju težine zahvaćenosti bolešću i/ili pojedinog organa ili organskog sustava, pri distinkciji pojedinih fenotipova bolesti, za razlučivanje aktivne forme od sekvela bolesti te za praćenje odgovora na terapiju. Prema NIH konsezzusu, predložene su definicije pojedinih vrsta biomarkera kako slijedi (67):

- **Dijagnostički** – identificira bolesnike pri nastupu klinički manifestne bolesti, pomaže u bržem postavljanju dijagnoze i ranijem uvođenju sistemske terapije
- **Prognostički** – grupira bolesnike prema stupnju rizika za pojavu, težinu, progresiju ili rezoluciju bolesti predviđajući time tijek bolesti kod pojedinog bolesnika
- **Prediktivni** – grupira bolesnike prema vjerojatnosti odgovora ili ishoda liječenja, a s obzirom da se mjeri prije početka terapije pruža informaciju o potencijalnoj koristi intervencije za pojedinog bolesnika
- **Pokazatelji odgovora na terapiju** – zamjena za procjenu odgovora kliničkom evaluacijom na temelju NIH kriterija, mjeri se nakon inicijacije terapije i daje raniji uvid u tijek liječenja nego to pokažu kliničke promjene omogućujući time pravovremenu modifikaciju terapije. Pri obradi podataka se predlaže analiza u odnosu na dugoročni ishod kao što je nerelapsni mortalitet.

Na sastanku NIH konsenzusa održanom 2020. godine pronalazak biomarkera prikladnog za kliničku upotrebu prepoznat je kao istaknuta neispunjena potreba. Naime, identifikacija biomarkera adekvatne osjetljivosti i specifičnosti neophodna je u razvoju preventivnih, preemtivnih i personaliziranih strategija liječenja gdje preventivne strategije podrazumijevaju terapeutske intervencije u vrijeme alo-PKMS-

a, preemptivne nakon alo-PKMS-a, a personalizirane nakon razvoja cGvHD-a. Adekvatnom stratifikacijom bolesnika biomarkeri bi mogli omogućiti ciljanu upotrebu ranih intervencija i time smanjiti rizik razvoja visokomorbidnih formi, zaštititi niskorizične bolesnike od infekcija i relapsa osnovne bolesti uzrokovanih nepotrebnom imunosupresijom te omogućiti personalizirano liječenje na temelju predikcije odgovora na pojedinu terapiju (68,69). U svrhu pronalaska adekvatnog biomarkera evaluirani su brojni kandidati iz gotovo svih znanstvenih područja, a unatoč tome što je tijekom vremena identificirano mnoštvo potencijalnih biomarkera cGvHD-a koji uključuju razne citokine, kemokine, genske polimorfizme, cirkulirajuće RNA ili DNA, autoprotutijela, imune stanice i stanične linije, do danas niti jedan nije postao dio rutinske kliničke primjene. Za potrebe ovog rada detaljnije ćemo prikazati samo jedan manji dio rezultata takvih istraživanja, i to onih koji u fokusu imaju pokazatelje endotelne ozljede.

1.3.1. Reaktanti akutne faze i pokazatelji endotelne ozljede

Reaktanti akutne faze (APR) definirani su kao markeri čije se plazmatske koncentracije povećavaju ili snižavaju za barem 25% u odgovoru na tkivnu ozljedu ili upalu (70). Većina reaktanata akutne faze korištenih u kliničkoj praksi stvara se u jetri, a njihova proizvodnja regulirana je upalnim medijatorima koje imune stanice stvaraju tijekom upalnog procesa (71). Pokazateljima endotelne ozljede pak, smatramo one karakteristike kojima se odražava odgovor endotela na noksu. S obzirom da taj odgovor, među ostalim, uključuje i značajnu produkciju upalnih medijatora koji svojim djelovanjem utječu na razinu upalnih markera, te da do danas nije poznat način razlikovanja endotelnog od upalnog odgovora, pokazatelji endotelne ozljede su sami po sebi ujedno i APR. Kao što smo rekli ranije, već dugo je poznato da endotelna ozljeda i upala perzistiraju dugo poslije alo-PKMS-a te da sudjeluju u nastanku cGvHD-a (17,57,71–73), a radovi koji su istraživali odnos markera upale, endotelne disfunkcije i cGvHD-a su malobrojni i karakterizirani neuniformnošću kohorti. U Tablici 2 sažeto je prikazano dosadašnje znanje o najvažnijim reaktantima akutne faze i medijatorima koji odražavaju endotelnu ozljedu, a koji su istraživani u kontekstu cGvHD-a. Navedeni markeri upale su, unatoč činjenici da su nespecifični, indirektni pokazatelj aktivnosti bolesti te samim time mogu služiti kao pomoćno sredstvo pri donošenju kliničkih odluka. Još uvijek nisu izolirani markeri upale koji pouzdano mogu služiti kao prediktori težine, prognoze, razvoja pojedinog fenotipa ili odgovora na

terapiju. Svakako treba naglasiti da upalni odgovor indirektno djeluje na gotovo svaki proces u tijelu i može imati utjecaj i na razine drugih potencijalnih biomarkera cGvHD-a, kao što je primjerice ekspresija imunih stanica.

Tablica 2. Markeri upale i pokazatelji endotelne ozljede značajni za cGvHD.

Marker		Reference
CRP	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene prijetransplantacijske i rane poslijetransplantacijske razine su prediktivni marker za razvoj bolesti • Povišene razine povezane su s aktivnošću i težinom bolesti te postojanjem sklerotskih promjena • Biomarker diskriminacije težine bolesti po grupama 	(72,74,75)
Leukociti	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine povezane su s lošijim ishodom 	(72)
Eozinofili	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine nakon alo-PKMS prediktivni marker za razvoj bolesti • Povišene razine u vrijeme postavljanja dijagnoze prediktor boljeg ukupnog preživljeg i nižeg nerelapsnog mortaliteta • Eozinofilija u tkivu povezana je s težinom cGvHD-a, eozinofilija u serumu s upalnim odgovorom/aktivnošću bolesti • Novija istraživanjima nisu potvrdila prognostičku ulogu eozinofilije 	(76–79)
Trombociti	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine povezane su s aktivnošću i težinom bolesti te postojanjem sklerotskih promjena • Povišene razine prediktivni su marker nastanka fibrotskih manifestacija • Snižene razine kod dijagnoze cGvHD-a prediktor su lošeg ishoda 	(72,80–82)
Fibrinogen	<ul style="list-style-type: none"> • Prijetransplantacijski povišene razine su prediktivni marker za razvoj bolesti 	(83)
Haptoglobin	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(84)
ADAMTS13	<ul style="list-style-type: none"> • Blago snižene razine kod oboljelih 	(67,85)

VWF	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih, povezanost s aktivnošću, težinom i zahvaćenošću jetre i usta cGvHD-om 	(56,71,86)
C3 i C4 komponente komplementa	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine povezane su s aktivnošću i težinom bolesti te postojanjem sklerotskih promjena • C3 distinktivni prediktor težine bolesti po grupama • Snižene razine C4 kod ekstenzivnog oblika bolesti 	(72,84)
Feritin	<ul style="list-style-type: none"> • Prijetransplantacijski povišene razine povezane su s nižom incidencijom bolesti • Novije studije nisu pronašle povezanost s incidencijom cGvHD-a • Povišene razine prediktor su lošeg ishoda 	(87–89)
Albumini	<ul style="list-style-type: none"> • Snižene razine povezane su s aktivnošću i težinom bolesti 	(72)
PTX3	<ul style="list-style-type: none"> • Snižene razine kod oboljelih • Povezanost razine s težinom bolesti 	(90)
TNF α	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti • Povišene razine kod oboljelih 	(67,91)
IFN γ	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja teškog obilka bolesti • U drugoj studiji zabilježena je povezanost sniženih poslijetransplantacijskih razina s razvojem bolesti 	(91)
BAFF	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti • Povišene razine kod oboljelih • Povišene i snižene razine prediktor su lošeg ishoda 	(67,90–92)
TGF β	<ul style="list-style-type: none"> • Snižene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti 	(67,91)

IL8	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine povezane su s nižom incidencijom razvoja bolesti 	(90)
IL10	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti • Povišene razine koreliraju s aktivnošću bolesti, u slini s težinom u ustima, u suzama s težinom u očima 	(67,90,91)
IL15	<ul style="list-style-type: none"> • Snižene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti 	(90,91)
IL21	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih, povezanost razine s težinom bolesti 	(90)
IL-2R α	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(93)
CXCL9	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti • Povišene razine kod oboljelih koreliraju s težinom bolesti 	(67,90)
CXCL10	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene poslijetransplantacijske razine prediktor su razvoja bolesti • Povišene razine kod oboljelih • Prediktor odgovora na terapiju 	(90)
CXCL11	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(90)
CCL15	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	
Panel: ST2, CXCL9, MMP3 i osteopontin	<ul style="list-style-type: none"> • Prediktor razvoja bolesti 	(94)
CD13	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(93)
CD163	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(93)
elafin	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod kožnog cGvHD-a • Korelira s težinom bolesti, prediktor lošeg ishoda 	(67,90)
Spondin 1	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod sklerotskog oblika kožnog cGvHD-a 	(93)

Broj cirkulirajućih endotelnih stanica	<ul style="list-style-type: none"> • Snižene razine kod sklerotskog oblika kožnog cGvHD-a 	(60)
Trombocitni mikropartikli	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod oboljelih 	(95)
VCAM	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine prediktor razvoja bolesti • Distinkcija lihenoidnih i sklerotskih lezija u kožnom cGvHD-u 	(96,97)
ICAM	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine prediktor razvoja bolesti 	(97)
E-selektin	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine prediktor razvoja bolesti • Povišene razine kod oboljelih u ranoj fazi 	(96,97)
angiopietin	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine prediktor su razvoja plućnog oblika cGvHD-a 	(98)
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine prediktor su razvoja teškog oblika cGvHD-a • Povišene razine kod sklerotskog oblika kožnog cGvHD-a 	(60,99)
FGF	<ul style="list-style-type: none"> • Povišene razine kod sklerotskog oblika kožnog cGvHD-a 	(60)

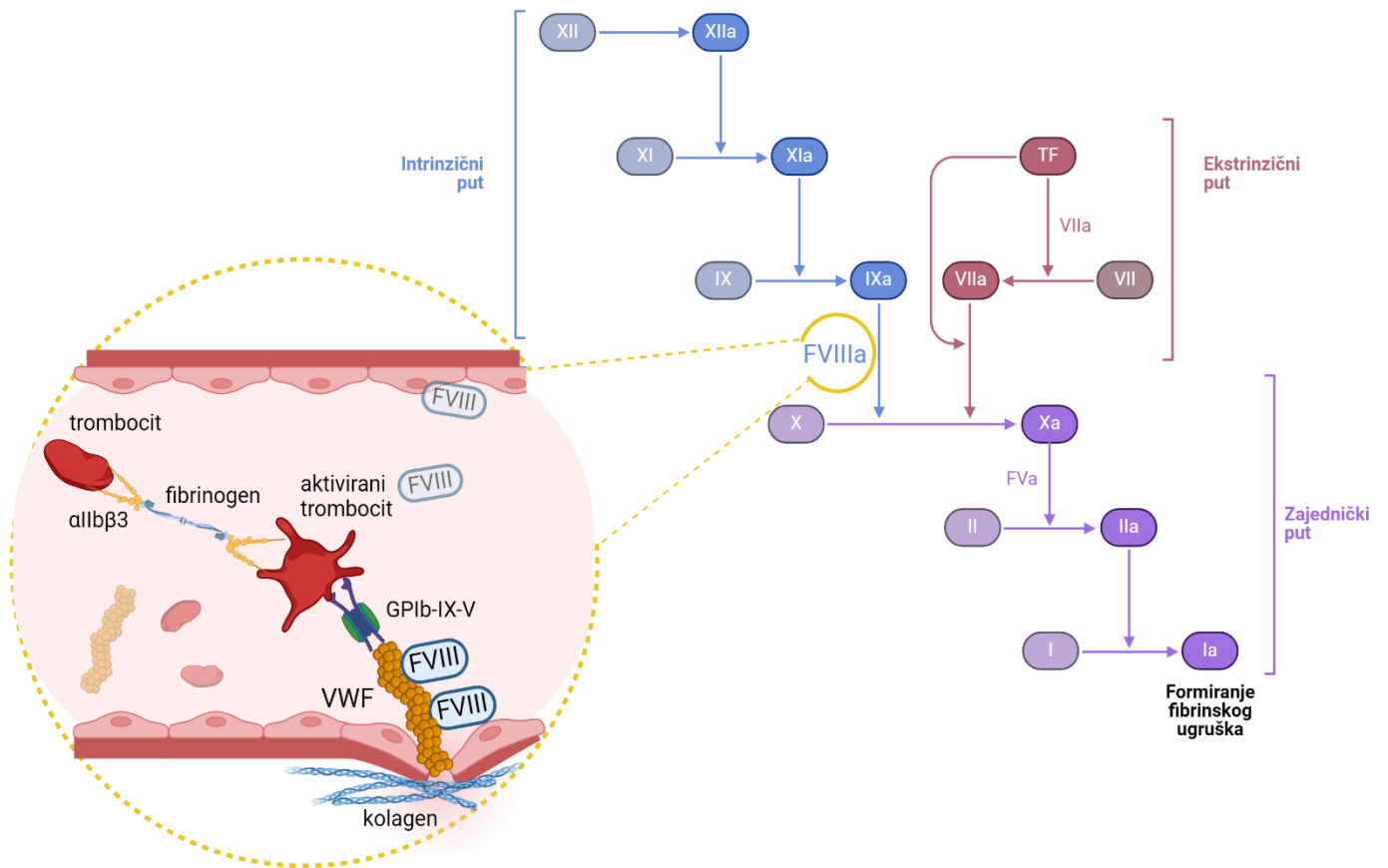
Kratice: CRP – C reaktivni protein, ADAMTS13 – eng. *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13*, VWF – von Willebrandov faktor, FVIII – faktor VIII, PTX3 – protein povezan s pentraksinom, TNF- α – faktor tumorske nekroze α (eng. *tumor necrosis factor α*), IFN γ – interferon gama, BAFF - čimbenik aktivacije B-limfocita (eng. *B-cell activating factor*), TGF- β – transformirajući faktor rasta β (eng. *transforming growth factor beta*), IL – interleukin, IL-2R α – eng. *interleukin-2 receptor subunit alpha*, CXCL – kemokinski ligand s CXC motivom (eng. *C-X-C motif chemokine ligand*), CCL - kemokinski ligand s CC motivom (eng. *C-C motif chemokine ligand*), ST2 – supresor tumorogenosti 2 (eng. *soluble suppression of tumorigenicity 2*), MMP3 – matriks metaloproteinaza 3 (eng. *matrix metalloproteinase-3*), CD – biljeg diferencijacije 163 (eng. *cluster of differentiation*), VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula (eng. *vascular cell adhesion molecule*), ICAM – međustanična adhezijska molekula (eng. *intercellular adhesion molecule*), VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*), FGF- faktor rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor*)

1.4. Von Willebrandov faktor i faktor VIII

1.4.1. Funkcija, struktura i biosinteza

Von Willebrandov faktor (VWF) i faktor VIII (FVIII) su koagulacijski faktori koji imaju važnu fiziološku ulogu u hemostazi. Koliko su neophodni u procesu zgrušavanja najbolje se vidi teškim poremećajima krvarenja nastalima posljedično njihovim manjkom, von Willebrandovom bolesti i hemofilijom A. VWF ima ključnu ulogu u primarnoj hemostazi gdje potiče aktivaciju i adheziju trombocita na mjesta vaskularne ozljede i sudjeluje u daljnoj regrutaciji trombocita. Djelujući kao nosač FVIII sudjeluje i u sekundarnoj hemostazi (100). Naime, s obzirom da FVIII ima jako kratak poluvijek života (~2h), stvaranjem kompleksa s VWF koji ima poluvijek života od 12h FVIII se stabilizira, poluvijek mu se produljuje i omogućuje mu se dolazak na mjesto vaskularne ozljede gdje potom sudjeluje u koagulacijskoj kaskadi (101). FVIII je esencijalni dio sekundarne hemostaze, i to intrizičnog puta koagulacijske kaskade gdje kao kofaktor faktora IXa sudjeluje u aktivaciji faktora X, odnosno zajedničkog puta koagulacijske kaskade (102). VWF dakle sudjeluje u inicijalnom dijelu procesa stvaranja krvnog ugruška dok FVIII sudjeluje u stabilizaciji stvorenih trombocitnih agregata, odnosno formaciji ugruška. Detaljan shematski prikaz koagulacijske uloge VWF i FVIII u hemostazi prikazan je na Slici 3.

Strukturno je VWF multimerni glikoprotein sastavljen od nekoliko funkcionalnih domena pomoću kojih komunicira s drugim krvnim sastavnicama i obavlja funkcije važne u procesu primarne hemostaze (103). VWF se primarno sintetizira u vaskularnim endotelnim stanicama i megakariocitima – prekursorima trombocita smještenima u koštanoj srži. Po sintezi monomera dolazi do stvaranja multimeričkih VWF koji se pohranjuju ili u α -granule koje se nalaze u trombocitima ili u Weibel-Paladijeva tjelešca koja se nalaze u endotelu i odakle se oslobađaju u slučaju aktivacije određenom noksom. Osim VWF-a se pritom iz ovih specijaliziranih organela oslobađaju i brojni upalni i angiogeni faktori čiji sastav pritom ovisi o mikrookolišu u kojem se organele nalaze (104). FVIII je pak glikoprotein kompleksne strukture građen od teškog i lakog lanca koji su sastavljeni od po nekoliko domena od kojih svaka ima svoju specifičnu ulogu (102). FVIII se većinom proizvodi u sinusoidalnom endotelu jetre, a manjim dijelom i u monocitno-makrofagnom dijelu hematopoetskih stanica (105).



Slika 3. Shematski prikaz fiziološke uloge vWF-a i FVIII u hemostazi (izrađeno u BioRender.com).

Na mjestima vaskularne ozljede VWF omogućuje adheziju trombocita vezanjem za subendotelni kolagen s jedne strane te receptor trombocita glikoprotein Ib (GPIb) s druge strane. Novonastali kompleks omogućuje „sidrenje“ odnosno stabilizaciju adheriranih trombocita i potiče aktivaciju i agregaciju trombocita te nastanak trombocitnog čepa. Osim na GPIb, VWF se može vezati i za druge trombocitne receptore poput integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ čime se potiče dodatna adhezija i agregacija trombocita. Nadalje se aktivacijom trombocita iz α granula oslobađa i uskladišteni VWF koji dodatno ubrzava proces nastajanja trombocitnog čepa. Paralelno ovom procesu, vaskularnom ozljedom aktivirana je i koagulacijska kaskada čijom amplifikacijom se aktiviraju i kofaktori; FVIII se pritom odvaja od VWF, a potom zajedno s aktiviranim faktorom IX vodi do aktivacije FX i konačne pretvorbe fibrinogena u fibrin, koji je krajnji produkt koagulacijske kaskade. S obzirom da se ovi događaji događaju paralelno treba naglasiti da je za koordinirani odgovor hemostaze i konačni nastanak stabilnog krvnog ugruška nužna interakcija primarne i sekundarne hemostaze te da su ta dva procesa međusobno neodjeljiva.

1.4.2. Biomarkerska upotreba

Povišene razine VWF-a i FVIII odražavaju aktivaciju endotela u odgovoru na noksu zbog čega se mogu koristiti kao markeri upale. Provedena istraživanja pokazala su osobitu povezanost povišenih razina faktora s upalnim bolestima panvaskularne prezentacije kao što su to kardiovaskularne (106), autoimune (107) i infektivne bolesti (108). Osim kao prognostički biomarker kod kardiovaskularnih oboljenja (109), VWF se pokazao i kao pouzdan prediktor rizika za kardiovaskularne incidente kod visokorizičnih skupina (110). Značajan prognostički potencijal VWF identificiran je kod teških infektivnih zbiljanja što je dosta istraživano tijekom nedavne COVID-19 pandemije (111,112). Iako je poznata i povezanost propeptida VWF-a, FVIII je ipak daleko etabliraniji biomarker rizika za razvoj tromboembolijskih incidenata (113–115). Zanimljive su nadalje i zamjećene povišene razine VWF-a kod diseminiranih malignih oboljenja koje se povezuju s potencijalom VEGF-a da inducira ekspresiju VWF-a (116).

Ipak, s obzirom da je cGvHD bolest uzrokovana disregulacijom imunološkog sustava, te da klinički nalikuje sistemskim autoimunim bolestima, za ovaj rad je najzanimljiviji istražen biomarkerski potencijal faktora u bolestima imune etiologije. Objavljeni rezultati govore u prilog tome da su razine VWF-a i FVIII pouzdani marker aktivnosti bolesti u imunološkim bolestima vezivnog tkiva (117–121) i vaskulitisu (122–126).

Postoji i dodatna povezanost razina VWF-a sa sistemskom sklerozom – bolešću koja je klinički jako slična sklerotskom obliku cGvHD-a. Naime, osim što razine pri dijagnozi sistemske skleroze mogu služiti kao prognostički biomarker, one su i dobar prediktor razvoja plućne hipertenzije, jedne od najtežih manifestacija te bolesti (127).

Svakako treba napomenuti i da osim bolesti na razinu navedenih faktora mogu utjecati i parametri vezani uz samog bolesnika. Poznato je tako primjerice da na razinu VWF-a i FVIII značajno utječu genetski čimbenici, dob, spol, tjelesna težina i krvna grupa i to na način da će starije žene veće tjelesne mase krvne grupe non-0 imati više razine faktora (126,128,129). Razine faktora povišene su i u trudnoći, a na razine faktora utječe i životni stil što uključuje pušenje, fizičku aktivnost i stres (130–132).

1.4.3. Biomarkerski potencijal u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja

Biomarkerski potencijal VWF-a i FVIII u cGvHD-u, bolešću uzrokovanom imunom disregulacijom, ističe se činjenicom da povišene razine ovih biomarkera funkcioniraju kao indikatori aktivnosti i prediktivni čimbenici razvoja bolesti u određenim organima kod autoimunih bolesti koje dijele kliničke karakteristike s cGvHD-om. Treba svakako primjetiti kako se VWF i FVIII sintetiziraju u endotelu različitih organa te da je s obzirom na heterogenost endotela teoretski moguće da bi razina pojedinog od ta dva faktora mogla značajno korelirati sa zahvaćanjem određenog organa cGvHD-om. Kako je u patogenezi cGvHD-a endotelna ozljeda poznata kao jedan od inicijalnih pokretača bolesti, za očekivati je da će razine faktora i biti više pri prezentaciji bolesti čime bi mogle imati i dijagnostičku ulogu, bilo kao prediktor težine ili rani marker bolesti. I za kraj, sama činjenica da je mjerenje aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII relativno jeftino, validirano i laboratorijski dostupno čini ove faktore još privlačnijim potencijalnim biomarkerima cGvHD-a.

1.5. Svrha rada

Svrha ovog rada je evaluacija biomarkerskog potencijala VWF-a i FVIII u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja te procjena njihove uloge u poboljšanju strategija liječenja ove glavne kasne komplikacije aloPKSMS-a.

2. Hipoteza

Hipoteza ovog rada je da su aktivnost i koncentracija von Willebrandovog faktora te aktivnost faktora VIII povišeni kod bolesnika s kroničnom bolesti presatka protiv primatelja i povezani s kliničkim manifestacijama bolesti.

3. Ciljevi istraživanja

Opći cilj ovog rada je usporediti aktivnost i koncentraciju VWF-a i aktivnost FVIII u bolesnika s cGvHD-om s aktivnosti i koncentracijom VWF-a i aktivnosti FVIII kontrolne skupine ispitanika koji nakon aloPKMS-a nisu razvili cGvHD, te ispitati povezanost aktivnosti i koncentracije VWF-a i aktivnosti FVIII u bolesnika s cGvHD-om s kliničkim manifestacijama cGvHD-a.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

1. Utvrditi povezanost aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s težinom cGvHD-a prema zahvaćenim organima.
2. Utvrditi povezanost aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s demografskim karakteristikama i obilježjima aloPKMS-a bolesnika s cGVHD-om.
3. Utvrditi povezanost aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s razinama rutinski mjerenih reaktanata akutne faze u bolesnika s cGvHD-om.

4. Materijali i metode

Ovo prospektivno longitudinalno istraživanje dio je projekta „Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja” (IP-2016-06-8046) Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) provedenog na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb u razdoblju od 3/2017. do 3/2021. Istraživanjem je obuhvaćena skupina bolesnika kod kojih se nakon alo-PKMS razvio cGvHD, a kao kontrolna skupina evaluirana je i skupina ispitanika kod kojih se nakon provedene alo-PKMS nije razvio cGvHD. Svi uključeni ispitanici evaluirani su od strane Multidisciplinarnog tima za liječenje cGvHD-a i dugotrajnih komplikacija alo-PKMS-a koji u KBC-u Zagreb djeluje od 2013. godine i koji se sastoji od specijalista različitih profila (kliničari i laboratorijski stručnjaci) s dugogodišnjim iskustvom rada s bolesnicima kojima je dijagnosticiran cGvHD.

4.1. Ispitanici

U istraživanje su uključena 83 bolesnika i 39 kontrolnih ispitanika koji su praćeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb. Ovim brojem premašena je inicijalna ciljna brojka od minimalno 61 cGvHD bolesnika i 10 kontrolnih ispitanika određena analizom statističke snage („power analizom“).

Uključni kriteriji za cGvHD bolesnike bili su:

- potpisan informirani pristanak za sudjelovanje u studiji
- potvrđena dijagnoza cGvHD-a prema NIH kriterijima.

Uključni kriteriji za kontrolnu skupinu ispitanika bili su:

- potpisan informirani pristanak za sudjelovanje u studiji
- isključena dijagnoza cGvHD-a prema NIH kriterijima
- vremensko razdoblje od minimalno 100 dana proteklo od alo-PKMS
- ukinuta imunosupresija.

Isključni kriteriji ovog istraživanja:

- aktivni aGvHD
- aktivna infekcija definirana kao pozitivna hemokultura ili urinokultura, pneumonija ili druga infekcija koja zahtijeva uvođenje sistemske antimikrobne terapije
- trudnoća.

Bolesnici s cGvHD-om su u sklopu istraživanja klinički i laboratorijski evaluirani svakih 6-8 mjeseci, a kontrolni ispitanici su klinički i laboratorijski evaluirani samo jednom, i to prilikom uključanja u istraživanje.

4.2. Definicije

Postavljanje dijagnoze kao i ocjena težine cGvHD-a definirana je kriterijima donesenim NIH konsenzusom iz 2005. godine. Na temelju ocjena težine zahvaćenosti pojedinog organa procijenjena je ukupna težina bolesti kako je određeno NIH kriterijima. Drugi način procjene težine bolesti temeljio se na subjektivnoj procjeni vodećeg kliničara i ispitanog bolesnika (Form A i Form B) i to prema ljestvici 0-3 gdje 0 označava nepostojanje simptoma, 1 blagih, 2 umjerenih, a 3 teških simptoma te prema ljestvici 0-10 gdje 0 označava nepostojanje simptoma a 10 prisustvo najtežih mogućih simptoma.

Ovisno o načinu nastanka cGvHD-a u odnosu na aGvHD bolest je klasificirana kao [1] *de novo* ako bolesnik nije imao aGvHD, [2] *mirujuća* (eng. *quiescent*) ako je bolest dijagnosticirana nakon perioda mirovanja koji je uslijedio po razrješenju simptoma aGvHD-a ili [3] *progresivni* ukoliko su se simptomi aGvHD-a i cGVHD-a manifestirali u kontinuitetu jedan za drugim.

Aktivnost bolesti ocjenjena je na temelju kliničkog dojma uzevši u obzir znakove i simptome bolesti, trenutnu imunosupresivnu terapiju i dinamiku bolesti. Procjenom kliničara (eng. *clinician's impression of activity*) aktivnost je klasificirana na sljedeći način:

- (1) neaktivna bolest, bez sistemske ili topikalne imunosupresije
- (2) neaktivna bolest, uz sistemske ili topikalnu imunosupresiju
- (3) aktivna bolest, neovisno o stupnju trenutne imunosupresivne terapije
- (4) vrlo aktivna bolest, neovisna o stupnju trenutne imunosupresivne terapije.

Na temelju ove ljestvice, a za potrebe analize, aktivnost bolesti je podijeljena u 2 skupine - aktivnu (3 i 4) i neaktivnu (1 i 2) bolest.

Intenzitet trenutne sistemske imunosupresije vrednovan je prema ljestvici predloženoj od strane Mitchell i suradnika (133) kako slijedi:

- (0) odsustvo imunosupresivne terapije
- (1) primjena blage imunosupresivne terapije odnosno primjena kortikosteroida u dozi ekvivalentnoj dozi prednizona manjoj od 0,5 mg/kg/dan
- (2) umjerena imunosupresija odnosno primjena bilo kojeg imunosupresivnog lijeka ili procedure uz/bez dodatne primjene kortikosteroida u dozi ekvivalentnoj dozi prednizona od 0,5 ili više mg/kg/dan
- (3) visoki intenzitet imunosupresije odnosno primjena bilo koja dva imunosupresivna lijeka ili procedure uz/bez dodatne primjene kortikosteroida u dozi ekvivalentnoj dozi prednizona od 0,5 ili više mg/kg/dan.

Procjena općeg tjelesnog stanja bolesnika temeljena je na ECOG ljestvici (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*) na sljedeći način:

- (0) asimptomatski bolesnici
- (1) simptomatski ambulatorni bolesnici koji ograničenja osjećaju samo u fizički napornim aktivnostima
- (2) simptomatski, ambulatorni bolesnici koji su sposobni za brigu o sebi ali ne i za izvršavanje radnih aktivnosti te koji manje od 50% budnog provode van kreveta
- (3) simptomatski bolesnici ograničene sposobnosti za brigu o sebi i koji pritom provode više od 50% budnih sati u krevetu
- (4) bolesnici koji su potpuno onemogućeni i vezani za krevet.

Za potrebe analize pacijenti s ECOG-om 3 i 4 evaluirani su zajedno.

4.3. Plan istraživanja

Svaki ispitanik potpisao je odgovarajući informirani pristanak za sudjelovanje u studiji, nakon čega je slijedila klinička i laboratorijska evaluacija. Po uzimanju detaljne anamneze učinjen je klinički pregled i evaluacija od strane članova Multidisciplinarnog tima za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija alo-PKMS. Pritom su prikupljeni i zabilježeni sljedeći podaci:

- demografske karakteristike: dob, spol, osnovna bolest

- informacije o alo-PKMS: datum, tip darivatelja (HLA podudarni srodni ili nesrodni), spol darivatelja, izvor KMS (koštana srž ili PBSC), krvna grupa prije i poslije alo-PKMS
- poslijetransplantacijski tijek: prisustvo i simptomi aGvHD-a, korištenje DLI
- informacije o cGvHD-u: datum postavljanja dijagnoze, oblik, način nastanka, procjena aktivnosti, zahvaćenost pojedinog organa i procjena težine prema NIH kriterijima
- informacije o trenutnom stanju: protekla i trenutna sistemska imunosupresivna terapija, razina imunosupresije po literaturnoj ljestvici, prisustvo aktivne infekcije, trudnoće i drugih stanja relevantnih za istraživanje.

Ekstenzivna laboratorijska obrada je, uz mjerenje razine laboratorijski dostupnih markera upale, uključivala i određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora (VWF:Ag; %), ristocetinske aktivnosti von Willebrandova faktora (VWF:RCo; %) i aktivnosti faktora VIII (FVIII; kIU/L) iz plazme ispitanika standardnim i prethodno validiranim i verificiranim metodama. Referentne laboratorijske vrijednosti KBC-a Zagreb su sljedeće: VWF:Ag=50-150 %; VWF:RCo=50-160 %; FVIII=0,5-1,49 KiU/L. Istraživanje je nastavljeno redovitim praćenjem bolesnika s cGvHD-om koji su reevaluirani klinički i laboratorijski svakih šest do osam mjeseci kako bi se pratila dinamika razine istraživanih faktora i njihova povezanost s kliničkim i laboratorijskim parametrima, a zaključeno je sa zadnjom kontrolom učinjenom u 01/2023. S obzirom na poznati utjecaj sistemske infekcije na razinu istraživanih faktora, u slučaju aktivne infekcije (definirane kao pozitivna hemokultura ili urinokultura, pneumonija ili druga infekcija koja zahtijeva uvođenje sistemske antimikrobne terapije) evaluacija je odgođena do sljedeće planirane kontrole, a kod umrlih je zabilježen datum i uzrok smrti.

4.4. Analiza

4.4.1. Laboratorijska analiza

Uzorkovanje periferne venske krvi provođeno je između 7 i 9 sati ujutro kod ispitanika koji su bili natašte i nisu recentno provodili težu fizičku aktivnost. Biološki uzorci potom su žurno dostavljeni u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb gdje je standardiziranim postupcima provedena daljnja analiza.

Iz uzoraka plazme određene su razine istraživanih koagulacijskih faktora VWF i FVIII. Kvantitativno određivanje koncentracije antigena von Willebrandova faktora (VWF:Ag) u plazmi provedeno je lateks imunoturbidimetrijskom metodom (reagens: VWF Ag; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka). Načelo mjerenja utemeljeno je na tome da reagens sadrži polistirenske kuglice koje su obložene specifičnim antitijelima na VWF. Mjerenje se odvija na način da u uzorku koji sadrži antigene von Willebrandova faktora dolazi do aglutinacije koja se potom mjeri turbidimetrijski, i to na način da je povećanje turbidimetrije razmjerno koncentraciji VWF antigena (%) u uzorku. Kvantitativno određivanje aktivnosti von Willebrandova faktora (VWF:RCO) u plazmi također je provedeno lateks imunoturbidimetrijskom metodom (reagens: Innovance VWFAC; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka). U ovom slučaju metoda je temeljena na sposobnosti vezanja VWF na receptor glikoprotein Ib (GP Ib). Naime, reagens sadrži polistirenske kuglice koje su obložene antitijelima na GP Ib i rekombinantni GP Ib, s dvije mutacije (G233V i M239V) koje pojačavaju njegovu funkciju. Rekombinantni GP Ib iz reagensa i VWF iz ispitivane plazme vežu se na ta antitijela, što dovodi do aglutinacije koja se mjeri turbidimetrijski i to na način da je intenzitet aglutinacije razmjernan aktivnosti VWF (%). Kvantitativno određivanje funkcionalne aktivnosti faktora zgrušavanja FVIII (FVIII) u plazmi provedeno je koagulometrijskom metodom (Actin-a FS kao APTV reagens, deficitarna plazma za FVIII; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka). Za mjerenje aktivnosti FVIII korišten je modificirani test aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) na način da se u razrijeđeni uzorak plazme dodavala plazma deficitarna za FVIII odnosno plazma koja je sadržavala sve faktore zgrušavanja osim FVIII, nakon čega se u toj smjesi određivao APTV u sekundama. Na taj način vrijeme zgrušavanja citratne plazme izravno je ovisilo isključivo o aktivnosti FVIII u uzorku plazme. Iz prethodno priređene kalibracijske krivulje koja je dobivena primjenom standardne plazme izračunata je vrijednost aktivnosti FVIII (%).

Od ostalih laboratorijskih parametara treba navesti kako je sedimentacija eritrocita određivana metodom po Westergrenu, a kompletna krvna slika primjenom metode hidrodinamičkog fokusiranja i fluorescentne protočne citometrije na hematološkom analizatoru Sysmex XN-1000. Koagulacijska mjerenja izvršena su na analizatoru Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) a biokemijski parametri (bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-

aminotransferaza (ALT), gama-glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (AP), laktat dehidrogenaza (LDH), C-reaktivni protein (CRP), trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL i LDL kolesterol, albumin (serum), ukupni proteini, IgG, IgM, IgA, beta-2-mikroglobulin, feritin, reuma faktor, C3 i C4 komponente komplemента) analizirani su na uređaju Cobas c 501/6000cee, Roche, SAD. Antikardiolipinska protutijela IgG i IgM mjerena su pomoću komercijalno dostupnih ELISA (enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kitova.

4.4.2. Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc (verzija 19.1, MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019). Normalnost distribucije podataka ispitana je Smirnov-Kolmogorovljev testom. Kvantitativni podaci prikazani su kroz raspone, i to korištenjem aritmetičke sredine i standardne devijacije u slučajevima parametrijske raspodjele, odnosno medijana i apsolutnih raspona (min-max) u slučajevima neparametrijske raspodjele. Kategorijski podaci prikazani su kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima između pojedinih skupina analizirane su odgovarajućim parametrijskim (t-test za nezavisne uzorke) i neparametrijskim (Mann-Whitney U test) statističkim metodama, ovisno o utvrđenoj raspodjeli podataka. Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina analizirane su hi-kvadrat testom u slučaju parametrijske a Fisherovim egzaktnim testom u slučaju neparametrijske raspodjele podataka. Pomoću Kendalllove rang korelacije izračunati su odgovarajući koeficijenti korelacije između ispitivanih koagulacijskih faktora (FVIII i VWF) s laboratorijskim i kliničkim karakteristikama bolesti. Sve vrijednosti kojima je koeficijent korelacije na razini $\geq 0,200$ a razina značajnosti $P \leq 0,05$ uključene su u regresijske modele predikcije u multivarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi kako bi se utvrdile najprediktivnije odrednice VWF i FVIII u bolesnika s cGvHD-om. Dinamika promjene ispitivanih koagulacijskih faktora (FVIII i VWF) u odnosu na skupine prema aktivnosti bolesti analizirane su analizom varijance (ANOVA) u slučaju parametrijske, odnosno Kruskal-Wallis testom u slučaju neparametrijske raspodjele podataka. Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnima.

4.5. Financiranje

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom “Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja” (IP-2016-06-8046).

4.6. Etička odobrenja

Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i svi ispitanici potpisali su odobreni informirani pristanak.

5. Rezultati

5.1. Demografske karakteristike

U istraživanje su uključena 83 bolesnika s cGvHD-om i 39 kontrolnih ispitanika kod kojih se nakon alo-PKMS nije javio cGvHD. Medijan vremena od alo-PKMS do uključanja svih ispitanika u studiju i prve studijske evaluacije iznosio je 15 (2-313) mjeseci.

U Tablici 3 su po skupinama podijeljenima prema prisutnosti cGvHD-a detaljno prikazane demografske karakteristike ispitanika, podaci o alo-PKMS i poslijetransplantacijskom tijeku. Nije bilo statistički značajne razlike između bolesnika s cGvHD-om i kontrolnih ispitanika u većini transplantacijskih i demografskih karakteristika. Udio ispitanika u obje skupine u odnosu na spol i tip darivatelja bio je gotovo izjednačen (51,6% muškaraca i 51,6% HLA podudarnih srodnika) te nije bilo statistički značajne razlike između skupina prema spolu darivatelja kao niti prema tipu darivatelja. Medijan dobi pri transplantaciji, kao i pri uključanju u studiju također je bio ujednačen (42 vs 40; 45 vs 43 godine) te nije bilo statistički značajne razlike u vremenu od alo-PKMS do prve studijske evaluacije. Statistički značajne razlike među skupinama nije bilo ni prema dijagnozi osnovne bolesti, a vodeći razlog za alo-PKMS kod svih ispitanika bile su neoplazme mijeloidnog sustava (83%). Statistička analiza pokazala je značajnu povezanost prisustva cGvHD-a s korištenjem PBSC kao izvora KMS ($p=0,014$) i ranije preboljelim aGvHD-om ($p<0,001$), s tim da se osobito važnima pokazala povezanost s prethodnim kožnim ($p<0,001$) i gastrointestinalnim ($p=0,05$) manifestacijama aGvHD-a. Nije bilo statistički značajne razlike između skupina u primjeni infuzije darivateljevih limfocita (DLI), kao niti u raspodjeli krvnih grupa nakon transplantacije.

Tablica 3. Karakteristike bolesnika s cGvHD-a i kontrolnih ispitanika bez cGvHD-a.

Karakteristike ispitanika		cGvHD (n=83)		kontrolne (n=39)	
		Medijan (min-max)			
Dob pri alo-PKMS (godine)		42	(25-54)	40	(32-50)
Dob pri uključenju u studiju (godine)		45	(28-55)	43	(33-53)
Broj mjeseci od alo-PKMS do uključenja u studiju		12	(8-31)	17	(10-32)
		N (%)			
Spol	Ženski	39	(47,0)	20	(51,3)
	Muški	44	(53,0)	19	(48,7)
Vodeća bolest	ALL, AML, MDS, MPN	70	(84,4)	31	(79,5)
	CLL, HL, NHL, MM	7	(8,4)	6	(15,4)
	AA, PNH, imunodeficijencije	6	(7,2)	2	(5,1)
Tip darivatelja	HLA podudarni srodni	43	(51,8)	20	(51,3)
	HLA podudarni nesrodni	40	(48,2)	19	(48,7)
Izvor KMS*	Koštana srž	22	(26,5)	20	(51,3)
	PBSC	61	(73,5)	19	(48,7)
Prethodni aGvHD**	Ukupno	56	(67,5)	8	(20,5)
	Koža	51	(61,4)	7	(17,9)
	Gastrointestinalni trakt	14	(16,9)	0	(0,0)
	Jetra	13	(15,7)	2	(5,1)
Krvna grupa nakon transplantacije	0	25	(30,1)	15	(38,5)
	A	22	(25,5)	8	(20,5)
	B	6	(7,2)	3	(7,7)
	AB	10	(12,1)	1	(2,6)
	Nepoznato	20	(25,1)	12	(30,7)

*p=0,014; **p<0,001

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, IQR – interkvartilni raspon, alo-PKMS - alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica, ALL- akutna limfoblastična leukemija, AML – akutna mijeloična leukemija, MDS – mijelodisplastični sindrom, MPN – mijeloproliferativne neoplazme, CLL – kronična limfoblastična leukemija, HL – Hodgkinov limfom, NHL – non-Hodgkinov limfom, MM – multipli mijelom, AA – aplastična anemija, PNH – paroksizmalna noćna hemoglobinurija, PBSC - krvotvorne matične stanice iz periferne krvi, aGvHD – akutna bolest presatka protiv primatelja

5.1.1. Karakteristike kronične bolesti presatka protiv primatelja

U Tablici 4 prikazane su značajke 83 cGvHD bolesnika vrednovane prema NIH kriterijima prilikom prve studijske evaluacije. Medijan vremena od alo-PKMS do postavljanja dijagnoze cGvHD-a bio je 9 (2-202) mjeseci, a medijan od postavljanja dijagnoze do prve studijske evaluacije iznosio je 1 (0-195) mjesec. Kod njih 40 (48,2%) prva evaluacija bila je unutar mjesec dana od postavljanja dijagnoze. Prema kliničkim manifestacijama pri dijagnozi prevladavao je klasični oblik bolesti (86,7%), a bolest se većinom javljala nakon preboljelog aGvHD-a, tzv. mirujućim (eng. *quiescent*) tijekom (39,8%). Na prvom pregledu je prema procjeni vodećeg hematologa 49 bolesnika (59,8%) imalo aktivni oblik bolesti, a isto toliko ih je bilo na sistemskoj imunosupresivnoj terapiji. Kod većine oboljelih liječenje je provođeno umjerenom razinom imunosupresije. U vrijeme prve evaluacije kortikosteroide su primala 22 (26,5%) bolesnika, a ciklosporin njih 40 (48,2%).

Najčešće zahvaćeni organi s cGvHD-om bili su usta (59%), koža (54,2%) i oči (54,2%). Kod žena je zabilježena i visoka zahvaćenost genitalnog trakta (54,3%). Oboljeli su u prosjeku imali 3 zahvaćena organa, s tim da je najteže zahvaćenom organu najčešće pripisivana ocjena 2 što označava srednje tešku zahvaćenost organa cGvHD-om. Subjektivna procjena kliničara (Form A) i bolesnika (Form B) o težini bolesti na ljestvici 0-3 bila je usklađena s NIH kriterijima, a za većinu oboljelih procijenjena je umjerena težina bolesti (50% od strane kliničara vs 51,5 % od strane bolesnika vs 51,8% prema NIH kriterijima). I dok su bolesnici prijavili nešto više blagih oblika bolesti nego kliničari (30,9 vs 25%), kliničari su češće procjenjivali teški stupanj bolesti negoli oboljeli (25% vs 17,6%). S obzirom na rezultate procjene općeg tjelesnog stanja bolesnika prema kojoj je kod većine oboljelih (84,1%) ECOG status iznosio 0 ili 1, kod većine bolesnika na prvom pregledu nisu zabilježena značajna funkcionalna ograničenja.

Tablica 4. Karakteristike cGvHD-a kod oboljelih ispitanika.

Karakteristike cGvHD-a		Medijan (min-max)	
Broj dana od alo-PKMS do dijagnoze cGvHD-a		266	(54-6036)
Broj dana od dijagnoze cGvHD-a do prve evaluacije		42	(0-5838)
Broj zahvaćenih organa		3	(1-6)
NIH ocjena najteže zahvaćenog organa		2	(1-3)
Ukupni zbroj ocjena prema NIH kriterijima*		4	(1-12)
Subjektivna procjena težine cGvHD-a od strane kliničara (Form A, ljestvica 0-10)		5	(1-8)
Subjektivna procjena težine cGvHD-a od strane bolesnika (Form B, ljestvica 0-10)		5	(0-10)
N (%)			
Način nastanka cGvHD-a	<i>De novo</i>	28	(33,7)
	Progresivni	22	(26,5)
	Mirujući	33	(39,8)
Vrsta cGvHD-a	Klasični	72	(86,7)
	Preklapajući	11	(13,3)
Težina cGvHD-a prema NIH kriterijima	Blagi	5	(6,0)
	Umjereni	43	(51,8)
	Teški	35	(42,2)
ECOG status	0	28	(34,1)
	1	41	(50,0)
	2	13	(15,9)
	3	0	(0,0)
Zahvaćenost pojedinog organa cGVHD-om	Usta	49	(59,0)
	Koža	45	(54,2)
	Oči	45	(54,2)
	Jetra	36	(43,4)
	Pluća	30	(36,6)
	Zglobovi i fascija	17	(20,5)
	Gastrointestinalni trakt	16	(19,3)
Genitalni trakt - žene	19	(54,3)	
Broj prethodnih linija sistemskog liječenja cGvHD-a (uključujući trenutnu)	0	22	(31,9)
	1	23	(33,3)
	2	11	(15,9)
	3	6	(8,7)
	4	5	(7,2)
	5	2	(2,9)
Intenzitet trenutne imunosupresivne terapije **	Bez imunosupresije	36	(43,4)
	Blagi	7	(8,4)
	Umjereni	35	(42,2)
	Visoki	5	(6,0)
Procjena vodećeg hematologa o aktivnosti cGvHD-a	Aktivan	49	(59,8)
	Neaktivan	33	(40,2)

*najveći mogući zbroj iznosi 21 (7 organskih sustava, genitalni nije uključen u zbroj); **Blagi: kortikosteroid (prednizon <0,5 mg/kg/dan); Umjereni: kortikosteroid (prednizon ≥0,5 mg/kg/dan) i/ili pojedini imunosupresivni lijek/procedura; Visoki: dva ili više imunosupresivnih lijekova/procedura ± kortikosteroid (prednizon ≥0,5 mg/kg/dan)
alo-PKMS - alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica, cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, NIH - američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*)

5.2. Prva studijska evaluacija

5.2.1. Rezultati laboratorijske analize i usporedba među skupinama

Rezultati opširne laboratorijske analize koja je uključivala mjerenje koncentracije antigena von Willebrandova faktora (VWF:Ag), ristocetinske aktivnosti von Willebrandova faktora (VWF:RCo) i aktivnosti FVIII, rutinskih upalnih te drugih relevantnih parametara prikazani su u Tablici 5. Podaci su prikazani po skupinama i to na način da su uspoređivane razine među oboljelima od cGvHD-a i kontrolnim ispitanicima koji nakon alo-PKMS nisu razvili cGvHD. Sva tri mjerena koagulacijska parametra bila su statistički značajno viša u bolesnika s cGvHD-om u odnosu na kontrole bez cGvHD-a (VWF:Ag 268,2% vs 191,9%, $p=0,003$; VWF:RCo 261,8% vs 178,2%, $p=0,003$; FVIII 2,17 KIU/L vs 1,82 KIU/L, $p=0,006$, Tablica 5).

Od ostalih laboratorijskih analiza, istaknula se statistički značajno viša vrijednost trombocita ($211,0 \times 10^9/L$ vs $183,5 \times 10^9/L$, $p=0,027$) i eozinofila ($0,20 \times 10^9/L$ vs $0,15 \times 10^9/L$, $p=0,034$) kod cGvHD bolesnika, dok su se među biokemijskim pretragama izdvojile povišena razina feritina ($1178,6 \mu\text{g/L}$ vs $741,8 \mu\text{g/L}$, $p=0,036$), beta-2 mikroglobulina ($2,9 \text{ mg/L}$ vs $2,45 \text{ mg/L}$, $p=0,014$) i laktat dehidrogenaze (LDH; $209,0 \text{ U/L}$ vs $180,0 \text{ U/L}$, $p=0,003$) te snižene razine ukupnih proteina ($67,0 \text{ g/L}$ vs $69,5 \text{ g/L}$, $p=0,034$) i albumina ($42,0 \text{ g/L}$ vs $44,3 \text{ g/L}$, $p=0,005$) u cGvHD bolesnika. Kod oboljelih je primjećena i značajno povišena razina jetrenih enzima AP (116 U/L vs 83 U/L , $p=0,007$), AST ($35,5 \text{ U/L}$ vs 29 U/L , $p=0,026$) i GGT (72 U/L vs $32,5 \text{ U/L}$, $p<0,001$) ali ne i ALT kao niti bilirubina. Koagulacijski parametri PV, APTV, fibrinogen i D-dimeri nisu pokazali značajnu razliku među istraživanim skupinama.

Tablica 5. Usporedba rezultata laboratorijske analize između cGvHD bolesnika i kontrola.

Ispitivani parametri	Medijan (min-max)		P
	cGvHD	Kontrole	
VWF:Ag (%)	268,2 (76,60-601,0)	191,9 (51,9-600,0)	0,003
VWF:RCo (%)	261,8 (54,0-601,0)	178,2 (48,6-451,9)	0,003
FVIII (KIU/L)	2,17 (0,52-4,53)	1,82 (0,51-3,41)	0,006
Trombociti (x10 ⁹ /L)	211,0 (17,0-404,0)	183,5 (35,0-263,0)	0,027
Leukociti (x10 ⁹ /L)	6,7 (1,0-21,0)	6,2 (1,4-12,8)	0,187
Monociti (x10 ⁹ /L)	0,67 (0,02-24,0)	0,56 (0,11-1,48)	0,059
Neutrofili (x10 ⁹ /L)	3,23 (0,94-11,89)	2,69 (0,78-9,51)	0,121
Limfociti (x10 ⁹ /L)	2,02 (0,24-8,59)	2,27 (0,46-4,79)	0,778
Eozinofili (x10 ⁹ /L)	0,20 (0,00-3,75)	0,15 (0,01-0,42)	0,034
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	24,5 (2,0-120,0)	22,0 (2,0-80,0)	0,833
PV (f)	1,13 (0,31-1,32)	1,15 (0,87-1,33)	0,423
APTV (s)	25,0 (17,9-41,3)	25,15 (2,31-28,7)	0,969
Fibrinogen (g/h)	3,8 (2,1-6,1)	3,8 (2,1-6,1)	0,735
D-dimeri (mg/L FEU)	0,55 (0,08-8,56)	0,41 (0,08-8,56)	0,161
Ukupni bilirubin (μmol/L)	9,0 (3,0-221,0)	8,0 (3,0-25,0)	0,137
AP (U/L)	116,0 (28,0-505,0)	83,00 (33,0-365,0)	0,007
AST (U/L)	35,5 (15,0-944,0)	29,0 (20,0-149,0)	0,026
ALT (U/L)	36,0 (9,0-973,0)	32,0 (12,0-327,0)	0,074
GGT (U/L)	72,0 (6,0-1536,0)	32,5 (6,0-197,0)	<0,001
LDH (U/L)	209,0 (116,0-582,0)	180,0 (131,0-272,0)	0,003
Ukupni kolesterol (mol/L)	5,2 (3,2-9,9)	5,4 (3,0-8,0)	0,481
Trigliceridi (mmol/L)	1,84 (0,52-6,05)	1,6 (0,68-3,81)	0,188
HDL (mmol/L)	1,19 (0,27-3,46)	1,2 (0,71-2,65)	0,828
LDL (mmol/L)	3,0 (0,98-7,57)	3,41 (1,37-5,05)	0,520
CRP (mg/L)	3,1 (0,2-36,7)	1,55 (0,3-19,4)	0,307
Reumatoidni faktor (nmol/L)	10,2 (9,0-54,0)	10,0 (9,0-397,2)	0,905
C3 (g/L)	1,14 (0,58-1,85)	1,16 (0,48-1,71)	0,538
C4 (g/L)	0,24 (0,1-0,37)	0,22 (0,07-0,47)	0,927
Antikardiolipin IgG	7,0 (1,0-36,0)	10,5 (2,0-39,0)	<0,001
Antikardiolipin IgM	6,0 (0,9-36,0)	9,5 (1,0-60,0)	0,002
Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	2,9 (1,4-12,9)	2,45 (1,3-18,4)	0,014
Feritin (μg/L)	1178,6 (5,0-8001,0)	741,8 (21,9-4395,0)	0,036
Ukupni proteini (g/L)	67,0 (31,0-87,0)	69,5 (61,0-88,0)	0,034
IgG (g/L)	9,87 (1,53-26,54)	10,05 (4,14-36,97)	0,852
IgA (g/L)	0,69 (0,06-5,17)	0,99 (0,16-4,1)	0,038
IgM (g/L)	0,96 (0,1-3,19)	0,9 (0,25-3,5)	0,939
Albumini (g/L)	42,0 (22,0-53,1)	44,3 (24,5-51,9)	0,005

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, PV – protrombinsko vrijeme, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, AP – alkalna fosfataza, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT – gama glutamiltransferaza, LDH – laktat dehidrogenaza, HDL – lipoprotein visoke gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, CRP – C reaktivni protein, C3 – komponenta komplementa 3, C4 – komponenta komplementa 4, Ig – imunoglobulini

5.2.2. Korelacijska analiza ispitivanih faktora i kronične bolesti presatka protiv primatelja

U Tablici 6 prikazani su rezultati korelacijske analize kojom je prikazana povezanost razine istraživanih koagulacijskih faktora VWF:Ag, VWF:RCo i FVIII s kliničkim karakteristikama ispitanika oboljelih od cGvHD-a.

Tablica 6. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF-a te aktivnosti faktora VIII s kliničkim karakteristikama cGvHD bolesnika.

Kliničke karakteristike cGvHD bolesnika		VWF:Ag (%)	VWF:RCo (%)	FVIII (kIU/L)
Dob pri alo-PKMS	tb*	0,262	0,272	0,210
	P	0,001	<0,001	0,005
Dob pri uključenju u studiju	tb	0,244	0,252	0,228
	P	0,001	0,001	0,003
Vrijeme od alo-PKMS do prve evaluacije	tb	-0,189	-0,219	0,007
	P	0,011	0,003	0,925
Vrijeme od alo-PKMS do dijagnoze cGvHD-a	tb	-0,098	-0,122	0,025
	P	0,192	0,102	0,738
Vrijeme od dijagnoze cGvHD-a do prve evaluacije	tb	-0,197	-0,221	-0,016
	P	0,010	0,004	0,840
Spol	tb	0,080	0,028	0,014
	P	0,379	0,756	0,877
PBSC kao izvor KMS	tb	0,272	0,267	0,213
	P	0,003	0,003	0,019
Korištenje DLI	tb	0,091	0,089	0,192
	P	0,317	0,327	0,035
Prethodni aGvHD	tb	-0,057	-0,074	-0,024
	P	0,527	0,414	0,789
Način nastanka cGvHD-a	tb	-0,199	-0,159	-0,150
	P	0,021	0,065	0,081
Vrsta cGvHD-a	tb	0,129	0,119	0,079
	P	0,155	0,188	0,383
Broj prethodnih linija sistemskog liječenja (uključujući trenutnu)	tb	-0,050	-0,107	-0,004
	P	0,582	0,238	0,966
Trenutno prisutna imunosupresivna terapija	tb	0,221	0,202	0,282
	P	0,015	0,026	0,002
Intenzitet trenutne imunosupresivne terapije	tb	0,121	0,120	0,198
	P	0,160	0,165	0,022
Korištenje kortikosteroida u trenutnoj imunosupresivnoj terapiji	tb	0,174	0,117	0,310
	P	0,055	0,197	0,001
Korištenje ciklosporina u trenutnoj imunosupresivnoj terapiji	tb	0,141	0,114	0,140
	P	0,121	0,209	0,123

Aktivnost cGvHD prema procjeni vodećeg hematologa	tb P	-0,266 0,004	-0,200 0,029	-0,117 0,200
ECOG status	tb P	0,348 <0,001	0,314 <0,001	0,218 0,013
Broj zahvaćenih organa	tb P	0,261 0,001	0,283 0,001	0,125 0,125
Subjektivna procjena težine cGvHD-a od strane kliničara	tb P	0,027 0,754	0,045 0,612	0,104 0,235
Subjektivna procjena težine cGvHD-a od strane bolesnika	tb P	0,117 0,178	0,126 0,147	0,077 0,375

* Kendallov koeficijent korelacije tau-b (τ_b)

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF - von Willebrandov faktor, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, alo-PKMS - alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica, PBSC - krvotvorne matične stanice iz periferne krvi, KMS – krvotvorne matične stanice, DLI – infuzija darivateljelih limfocita

Od demografskih karakteristika statistički značajnu povezanost s višim razinama istraživanih koagulacijskih faktora pokazali su starija dob pri alo-PKMS i pri uključenju u studiju te korištenje mobiliziranih perifernih krvotvornih matičnih stanica (PBSC). Kraće vrijeme od dijagnoze cGvHD-a do prve evaluacije u studiji bilo je povezano s višim razinama VWF:Ag i VWF:RCo, a korištenje DLI bilo je povezano s povišenjem razine FVIII. Spol, vrijeme od alo-PKMS do uključenja u istraživanje, i prethodno dijagnosticirani aGvHD (neovisno o manifestaciji) nisu pokazali povezanost s razinama ispitivanih koagulacijskih faktora. Korištenje imunosupresije i lošiji ECOG status bili su povezani sa statistički višim vrijednostima VWF:Ag ($\tau_b=0,348$, $p<0,001$) i VWF:RCo ($\tau_b=0,314$, $p<0,001$). Povezanost s nižim razinama VWF:Ag imao je „*quiescent*“ način nastanka cGvHD-a, s višim razinama VWF:Ag i VWF:RCo veći broj zahvaćenih organa i cGvHD procijenjen kao aktivan od strane vodećeg hematologa, a s višim razinama FVIII korištenje sistemskih kortikosteroida ($\tau_b=0,310$, $p=0,001$) i jači intenzitet imunosupresije mjeren literaturnom ljestvicom. Povezanost s razinama faktora nije utvrđena za klasičnu prezentaciju cGvHD-a, broj prethodnih linija sistemskog liječenja, aktualno korištenje ciklosporina kao niti subjektivnu procjenu težine bolesti bilo od strane kliničara (Form A) ili od strane bolesnika (Form B). Nadalje, u Tablici 7 zasebno su izdvojene korelacije pojedinih faktora s kliničkim manifestacijama cGvHD-a vrednovanima u skladu s NIH kriterijima.

Tablica 7. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti faktora VIII s manifestacijama cGvHD-a definiranimi prema NIH kriterijima.

Manifestacije cGvHD-a		VWF:Ag (%)	VWF:RCo (%)	FVIII (kIU/L)
Težina cGvHD-a prema NIH kriterijima	Tb	0,055	0,101	0,146
	P	0,533	0,253	0,101
NIH ocjena najteže zahvaćenog organa	Tb	0,044	0,062	0,140
	P	0,609	0,047	0,106
Ukupni zbroj ocjena prema NIH kriterijima	Tb	0,225	0,249	0,158
	P	0,005	0,002	0,046
NIH cGvHD usta	Tb	0,228	0,259	0,074
	P	0,008	0,003	0,391
NIH cGvHD kože	Tb	0,106	0,086	0,120
	P	0,210	0,308	0,155
NIH cGvHD očiju	Tb	0,100	0,105	0,122
	P	0,241	0,220	0,189
NIH cGvHD jetre	Tb	0,311	0,264	0,195
	P	<0,001	0,002	0,023
NIH cGvHD pluća	Tb	-0,028	-0,005	0,018
	P	0,753	0,955	0,840
NIH cGvHD zglobova i fascije	Tb	-0,148	-0,118	-0,065
	P	0,096	0,182	0,462
NIH cGvHD gastrointestinalnog trakta	Tb	0,170	0,174	-0,049
	P	0,056	0,050	0,581
NIH GvHD genitalnog trakta kod žena cGvHD	Tb	-0,110	-0,052	-0,064
	P	0,404	0,693	0,627

* Kendallov koeficijent korelacije tau-b (tb)

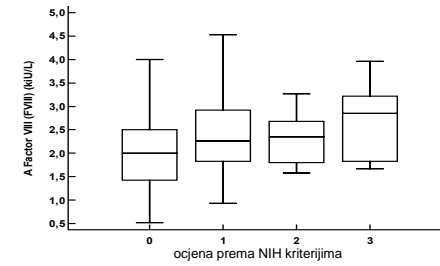
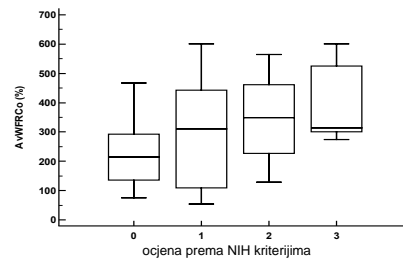
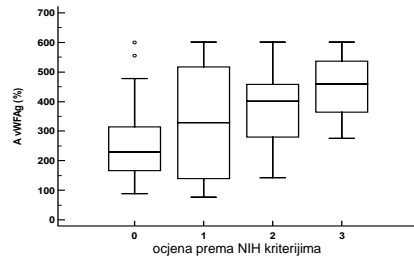
cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF - von Willebrandov faktor, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, NIH - američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng, *National Institutes of Health*)

Statistički značajna povezanost viših razina ispitivanih faktora identificirana je za cGvHD jetre (VWF:Ag; $t_b=0,311$, $p<0,001$, VWF:RCo; $t_b=0,264$, $p=0,002$, FVIII; $t_b=0,195$, $p=0,023$) te za veći zbroj ocjena zahvaćenih organa vrednovanih prema NIH kriterijima. Od ostalih manifestacija cGvHD-a, zahvaćenost usta pokazala je povezanost s višim razinama VWF:Ag ($t_b=0,228$, $p=0,008$) i VWF:RCo ($t_b=0,259$, $p=0,003$), zahvaćenost gastrointestinalnog sustava s višom razinom VWF:RCo ($t_b=0,174$, $p=0,050$), dok zahvaćenost kože, očiju, pluća, zglobova i fascije te genitalnog trakta (u žena) nije pokazala značajnu povezanost s razinama niti jednog od istraživanih faktora. Nadalje je analizirana povezanost aktivnosti i koncentracije VWF te aktivnosti FVIII s težinom cGvHD-a prema zahvaćenim organima koji su

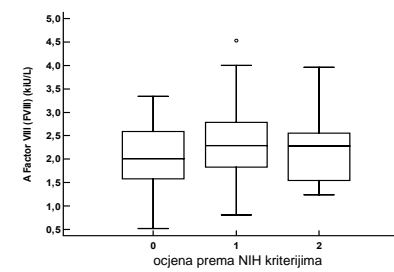
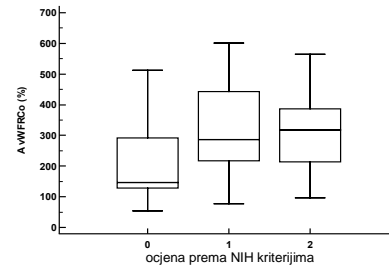
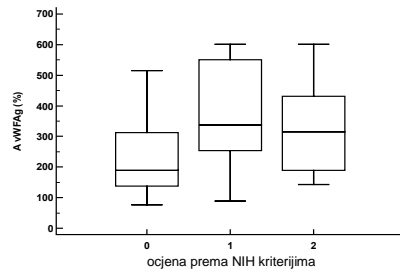
pokazali značajnu korelaciju u prethodnoj analizi, a navedeno je prikazano i slikovnim prikazom (Slika 4).

Iako je korelacijskom analizom primjećen trend porasta svih istraživanih parametra kod prisutnog cGvHD-a jetre, usporedbe razina FVIII među pojedinim skupinama podijeljenima prema stupnju težine cGvHD-a nisu pokazale statistički značajnu razliku ($p=0,153$). S druge strane razlike u razinama VWF:Ag i VWF:RCo pokazale su statistički značajnu razliku ovisnu o stupnju težine cGvHD jetre ($p=0,002$ za VWF:Ag i $p=0,013$ za VWF:RCo). Nadalje, statistički značajna razlika u razinama VWF:Ag i VWF:RCo pokazana je i za stupanj težine cGvHD-a usta ($p=0,002$ za VWF:Ag i $p=0,003$ za vWF:RCo), dok za razliku u razinama vWF:RCo ovisno o stupnju težine cGvHD-a GIT-a nije nađeno statistički značajne razlike ($p=0,124$).

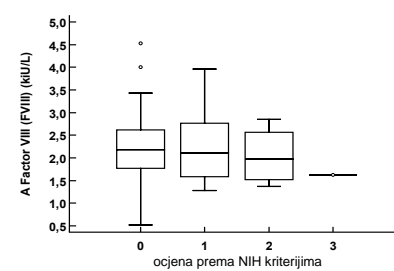
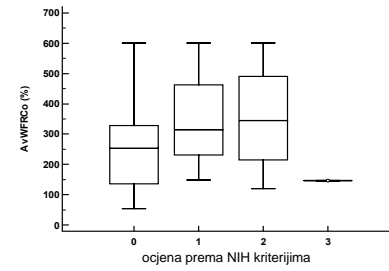
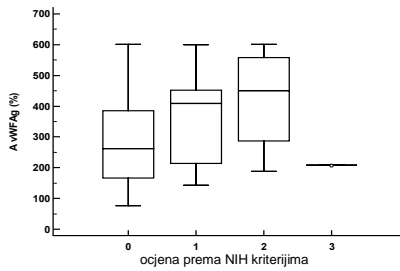
Post-hoc analizom utvrđeno je kako je kod cGvHD-a jetre statistički značajna razlika između vrijednosti VWF:Ag kod umjerene i teške zahvaćenosti jetre (cGvHD NIH 2 i 3) naspram vrijednosti kod intaktne jetre (cGvHD NIH 0), a kod cGvHD-a usta razina i VWF:Ag i VWF:RCo kod umjerene i teške zahvaćenosti usta (cGvHD NIH 2 i 3) naspram vrijednosti kod nezahvaćenih usta (cGvHD NIH 0).



a) jetra



b) usta



c) Gastrointestinalni trakt

Slika 4. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti FVIII s težinom cGvHD-a određenom NIH kriterijima u organima sa statistički značajnom korelacijom zahvaćenosti i razine istraživanih faktora

Tablica 8 prikazuje povezanost razina istraživanih koagulacijskih faktora i razina laboratorijskih reaktanata akutne faze te drugih imunoloških pretraga kod ispitanika oboljelih od cGvHD-a.

Tablica 8. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti FVIII s razinama drugih reaktanata akutne faze i imunološkim pretragama.

Laboratorijski parametri		VWF:Ag (%)	VWF:RCo (%)	FVIII (kIU/L)
VWF:Ag (%)	tb	1,000	0,717	0,482
	P	-	<0,001	<0,001
VWF:RCo (%)	tb	0,717	1,000	0,443
	P	<0,001	-	<0,001
FVIII (kIU/L)	tb*	0,482	0,443	1,000
	P	<0,001	<0,001	-
Leukociti (x10 ⁹ /L)	tb	0,218	0,128	0,224
	P	0,004	0,088	0,003
Monociti (x10 ⁹ /L)	tb	0,157	0,130	0,061
	P	0,039	0,087	0,419
Neutrofili (x10 ⁹ /L)	tb	0,104	0,050	0,192
	P	0,177	0,514	0,012
Limfociti (x10 ⁹ /L)	tb	0,160	0,129	0,069
	P	0,036	0,091	0,367
Eozinofili (x10 ⁹ /L)	tb	0,220	0,220	0,055
	P	0,010	0,010	0,521
Trombociti (x10 ⁹ /L)	tb	-0,003	-0,044	0,031
	P	0,965	0,558	0,682
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	tb	0,064	0,060	-0,001
	P	0,427	0,455	0,989
CRP (mg/L)	tb	0,104	0,192	-0,027
	P	0,174	0,012	0,720
D-dimeri (mg/L FEU)	tb	0,296	0,321	0,126
	P	<0,001	<0,001	0,096
Fibrinogen (g/h)	tb	-0,063	-0,020	-0,005
	P	0,404	0,795	0,947
Feritin (µg/L)	tb	0,318	0,315	0,171
	P	<0,001	<0,001	0,032
LDH (U/L)	tb	0,320	0,266	0,214
	P	<0,001	<0,001	0,004
Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	tb	0,373	0,352	0,139
	P	<0,001	<0,001	0,074
Ukupi proteini (g/L)	tb	-0,239	-0,260	-0,116
	P	0,002	0,001	0,126
Albumini (g/L)	tb	-0,363	-0,332	-0,108
	P	<0,001	<0,001	0,155

IgG (g/L)	tb	0,107	0,062	-0,009
	P	0,155	0,409	0,909
IgA (g/L)	tb	-0,153	-0,187	-0,124
	P	0,042	0,013	0,100
IgM (g/L)	tb	0,105	0,037	0,055
	P	0,160	0,617	0,464
Antikardiolipin IgG	tb	-0,187	-0,135	-0,205
	P	0,042	0,141	0,025
Antikardiolipin IgM	tb	-0,148	-0,077	-0,131
	P	0,109	0,404	0,156
C3 (g/L)	tb	0,030	-0,014	0,109
	P	0,721	0,871	0,196
C4 (g/L)	tb	0,003	0,022	0,067
	P	0,970	0,799	0,431
Reumatoidni faktor (nmol/L)	tb	-0,055	-0,118	0,066
	P	0,547	0,200	0,474

*Kendallov koeficijent korelacije tau-b (tb)

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF - von Willebrandov faktor, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, CRP – C reaktivni protein, LDH – laktat dehidrogenaza, Ig – imunoglobulin, C3 – komponenta komplemента 3, C4 – komponenta komplemента 4

Od rezultata se ističu povezanost povišene razine ispitivanih faktora s povišenom razinom LDH i feritina, te značajna povezanost razine viših vrijednosti VWF:Ag i VWF:RCo s višim razinama eozinofila, D-dimera, beta 2 mikroglobulina i IgA te nižih razina ukupnih proteina i albumina. Nadalje, značajnima se pokazala i povezanost više razine monocita i limfocita s višim vrijednostima VWF:Ag, viših vrijednosti leukocita s višim vrijednostima VWF:Ag i FVIII te viših vrijednosti neutrofila s višim vrijednostima FVIII. S višom razinom VWF:RCo povezana je bila i viša razina CRP-a, a s višim razinama FVIII i VWF:Ag povišena razina antikardiolipina IgG. Povezanost ostalih mjerenih parametara (trombociti, sedimentacija eritrocita, fibrinogen, IgG, IgM, antikardiolipin IgM, C3, C4 i reumatoidni faktor) nije bila statistički značajna s razinama istraživanih faktora. Osobito dobra korelacija primjećena je između povišenih razina VWF:Ag i VWF:RCo s povišenim razinama D-dimera ($\tau_b=0,296$, $p<0,001$; $\tau_b=0,315$, $p<0,001$), feritina ($\tau_b=0,318$, $p<0,001$; $\tau_b=0,315$, $p<0,001$), beta 2 mikroglobulina ($\tau_b=0,373$, $p<0,001$; $\tau_b=0,352$, $p<0,001$) i nižih vrijednosti albumina ($\tau_b=-0,363$, $p<0,001$; $\tau_b=-0,332$, $p<0,001$) te povišene razine VWF:Ag i povišenih vrijednosti LDH ($\tau_b=0,320$, $p<0,001$). Od neupalnih laboratorijskih parametara koji su relevantni za cGvHD ističu se značajna povezanost povišenih razina triglicerida, AST, ALT i GGT s višim razinama istraživanih faktora, povezanost nižih razina HDL-a s većom

aktivnošću i koncentracijom VWF-a te povezanost skraćenog APTV-a i višeg ukupnog kolesterola s većom aktivnošću FVIII. Osobito jaka korelacija pronađena je za povišene razine AST i povišene vrijednosti VWF:Ag ($\tau_b=0,348$, $p<0,001$) i VWF:RCo ($\tau_b=0,318$, $p<0,001$). Razine faktora nisu bile povezane s PV-om, LDL-om, ukupnim bilirubinom kao niti AP-om, a navedeni rezultati detaljno su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Povezanost koncentracije antigena i aktivnosti VWF te aktivnosti faktora VIII s ostalim mjenjenim laboratorijskim parametrima.

Laboratorijski parametri		VWF:Ag (%)	VWF:RCo (%)	FVIII (kIU/L)
PV	τ_b	-0,049	-0,020	0,086
	P	0,519	0,794	0,257
APTV (s)	τ_b	-0,069	-0,072	-0,265
	P	0,359	0,339	<0,001
Ukupni kolesterol (mmol/L)	τ_b	0,043	0,061	0,252
	P	0,614	0,471	0,003
Trigliceridi (mmol/L)	τ_b	0,256	0,202	0,233
	P	0,002	0,016	0,005
HDL (mmol/L)	τ_b	-0,191	-0,198	0,058
	P	0,023	0,018	0,492
LDL (mmol/L)	τ_b	-0,012	0,065	0,124
	P	0,884	0,439	0,138
Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	τ_b	0,096	0,060	0,050
	P	0,216	0,433	0,518
AP (U/L)	τ_b	0,099	0,097	0,034
	P	0,186	0,197	0,651
AST (U/L)	τ_b	0,348	0,318	0,262
	P	<0,001	<0,001	0,001
ALT (U/L)	τ_b	0,267	0,219	0,218
	P	<0,001	0,004	0,004
GGT (U/L)	τ_b	0,299	0,232	0,243
	P	<0,001	0,002	0,001

* Kendallov koeficijent korelacije tau-b (τ_b)

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF - von Willebrandov faktor, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT – gama glutamiltransferaza, LDH – laktat dehidrogenaza, HDL – lipoprotein visoke gustoće

5.2.2.1. Multipla regresijska analiza

Na temelju rezultata univarijatne korelacijske analize provedena je multipla regresijska analiza „forward“ metodom koristeći VWF:Ag, VWF:RCo i FVIII kao ovisnu varijablu. S obzirom na veliki broj potencijalnih varijabli, ovakvim stupnjevitim modelom su u konačnoj jednadžbi zadržane samo one varijable koje značajno doprinose promjeni razine pojedinog faktora u cGvHD bolesnika. U Tablici 10 prikazan je statistički značajan regresijski model ($p < 0,001$) kojim je objašnjeno 57,63% varijance VWF:Ag.

Tablica 10. Multipla regresijska analiza uz korištenje koncentracije antigena VWF-a kao ovisne varijable.

		Koeficijent	Standardna greška	R partial	P
r ² =57,63%; P<0,001	Dob u vrijeme prve evaluacije	1,963	0,825	0,296	0,021
	Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	9,224	7,800	0,152	0,242
	Broj zahvaćenih organa	22,678	10,196	0,288	0,030
	Leukociti ($\times 10^9/L$)	10,520	3,616	0,354	0,006
	LDH (U/L)	0,613	0,216	0,346	0,006
	Albumini (g/L)	-11,187	3,233	-0,410	0,001

LDH – laktat dehidrogenaza

Od prediktorskih varijabli koje kontrolirano na utjecaj svih varijabli u navedenom regresijskom modelu utječu na VWF:Ag izdvajaju se starija dob u vrijeme evaluacije ($p=0,021$), veći broj zahvaćenih organa cGvHD-om ($p=0,030$), viši leukociti ($p=0,006$), viši LDH ($p=0,006$) te niži albumini što je sve povezane s višom razinom VWF:Ag ($p=0,001$). Ako gledamo ovih 5 značajnih varijabli, albumini su se pokazali kao najjači prediktor razine VWF:Ag ($R \text{ partial}=0,410$). U Tablici 11 prikazan je statistički značajan regresijski model ($p < 0,001$) kojim je objašnjeno 54,04% varijance VWF:RCo.

Tablica 11. Multipla regresijska analiza uz korištenje ristocetinske aktivnosti VWF-a kao ovisne varijable.

		Koeficijent	Standardna greška	R partial	P
r ² =54,04%; P<0,001	Dob u vrijeme prve evaluacije	2,852	0,801	0,415	0,001
	Broj zahvaćenih organa s cGvHD-om	34,752	10,101	0,403	0,001
	LDH (U/L)	0,704	0,214	0,389	0,002
	Albumini (g/L)	-11,429	2,938	-0,446	<0,001

LDH – laktat dehidrogenaza

Pritom se kao varijable sa značajnim utjecajem na varijaciju razine VWF:RCo izdvajaju starija dob u vrijeme evaluacije (p=0,001), veći broj zahvaćenih organa (p=0,001), viši LDH (p=0,002) te niži albumini što je sve povezane s višom razinom VWF:Ag (p<0,0012) s tim da je niski albumin ponovno najjači prediktor razine VWF:Ag (R partial=0,446).

Tablica 12 prikazuje statistički značajan model (p<0,001) kojim je objašnjeno 29,57% varijance za FVIII.

Tablica 12. Multipla regresijska analiza koristeći aktivnost faktora VIII kao ovisne varijable.

		Koeficijent	Standardna greška	R partial	P
r ² =29,57%; P<0,001	Dob u vrijeme prve evaluacije	0,012	0,005	0,281	0,014
	Korištenje sistemske imunosupresije	-0,440	0,153	-0,317	0,005
	Leukociti (x10 ⁹ /L)	0,048	0,021	0,258	0,025
	APTV (s)	-0,049	0,022	-0,255	0,026

APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

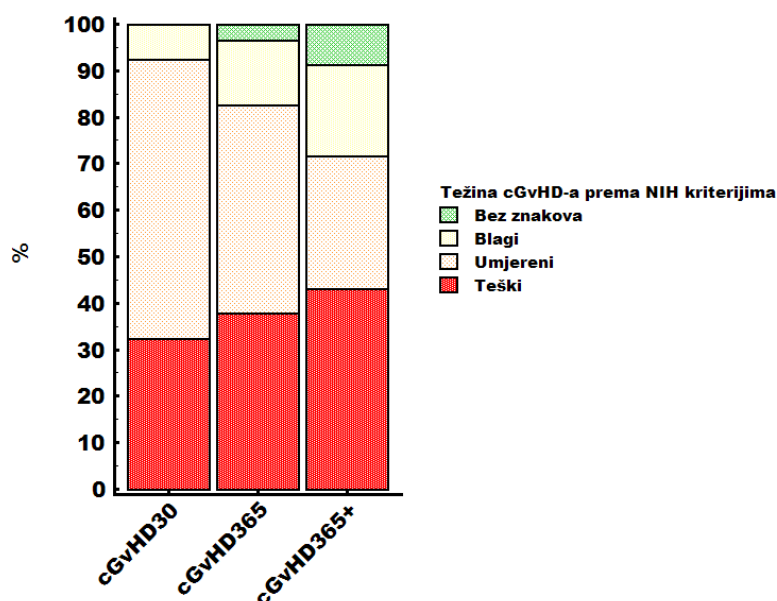
U navedenom modelu kao prediktivne varijable izdvajaju se starija dob u vrijeme evaluacije (p=0,014), korištenje sistemske imunosupresije (p=0,005), viši leukociti (p=0,025) i skraćeni APTV (p=0,026) što je sve povezano s višim razinama FVIII, a kao najutjecajnija varijabla izdvaja se korištenje sistemske terapije (R partial=0,317).

5.3. Longitudinalno praćenje bolesnika s kroničnom bolešću presatka protiv primatelja

Bolesnicima s cGvHD-om su tijekom razdoblja praćenja s medijanom od 47 mjeseci na svakom kontrolnom pregledu reevaluirane kliničke manifestacije bolesti prema NIH kriterijima i mjereni unaprijed određeni laboratorijski parametri kako je ranije navedeno. Iako je između kontrolnih pregleda bio planiran vremenski interval od 6-8 mjeseci, medijan razmaka među kontrolnim evaluacijama iznosio je 9 mjeseci. Razlog za ovo odstupanje bile su sustavne infekcije koje su zbog značajnog utjecaja na razine faktora bile isključni kriterij evaluacije te pandemija COVID-19 zbog koje su u tijeku istraživanja privremeno ukinute sve elektivne kontrole koje za bolesnike u datom trenutku nisu bile od životne važnosti. S obzirom na navedeno, ukupan broj kontrolnih posjeta nije bio ujednačen. Od 83 cGvHD bolesnika njih 54 je imalo dvije evaluacije, 39 tri evaluacije, 27 četiri evaluacije, 15 pet evaluacija, 6 bolesnika šest evaluacija, a maksimalnih 7 evaluacija imala su tri bolesnika. Evaluacije su podijeljene ovisno o vremenu od postavljanja cGvHD dijagnoze na one koje su bile unutar 30 dana (cGvHD30), od 30 dana do 365 dana (cGvHD365) i nakon 365 dana (cGvHD365+) od postavljanja dijagnoze cGvHD-a, a u dodatnu skupinu su izdvojeni oni bolesnici kod kojih je tijekom praćenja došlo do rezolucije simptoma, odnosno oni kod kojih u trenutku kontrolnih evaluacija nije bila prisutna niti jedna manifestacija cGvHD-a definirana NIH kriterijima (cGvHD0). Tijekom razdoblja praćenja smrtni ishod zabilježen je kod ukupno 10 (12%) cGvHD ispitanika s medijanom od 318 dana od inicijalne evaluacije do nastupa smrtnog ishoda, a u većini slučajeva uzrok smrti bile su infektivne komplikacije (50%) i relaps osnovne bolesti (30%).

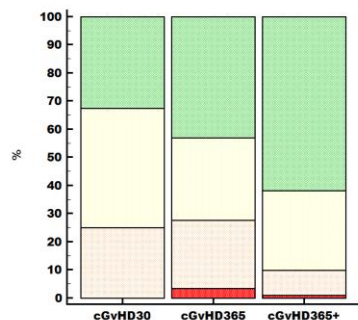
5.3.1. Manifestacije kronične bolesti presatka protiv primatelja prema NIH kriterijima tijekom longitudinalnog praćenja

Od ukupno učinjene 281 kontrolne evaluacije, 40 (14,2%) ih je bilo unutar 30 dana, 56 (19,9%) od 30 do 365 dana (odnosno do jedne godine), a 167 (59,4%) nakon 365 dana (nakon jedne godine) od postavljanja dijagnoze cGvHD-a. Prema NIH kriterijima, kod bolesnika na 17 kontrolnih evaluacija (6%) nije bilo nikakvih znakova bolesti, na njih 48 (17%) zabilježen je blagi, 102 (36,3%) umjereni, a na preostalih 114 evaluacija (40,6%) teški oblik cGvHD-a. Na Slici 5 prikazana je dinamika težine cGvHD-a kroz vrijeme. Vidljivo je pritom da se tijekom vremena prati povećani udio bolesnika s blagim i teškim cGvHD-om, dok se broj bolesnika s umjerenom težinom bolesti smanjuje. Tijekom vremena se povećava i broj bolesnika kod kojih je došlo do rezolucije bolesti, odnosno onih kod kojih više nije prisutna niti jedna manifestacija cGvHD-a. Na sličan način sa Slike 6 možemo iščitati na koji način se kroz vrijeme mijenjala težina simptoma cGvHD-a u pojedinom zahvaćenom organu.

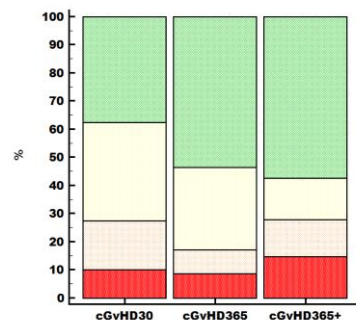


Slika 5. Težina cGvHD-a kroz vrijeme.

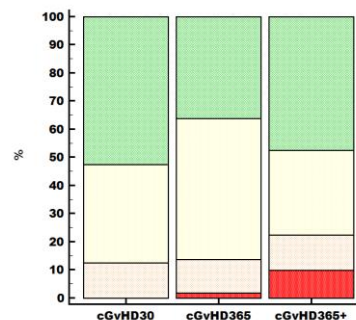
(cGvHD30 – bolest evaluirana unutar 30 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365 – bolest evaluirana od 30 do 365 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD+ - bolest evaluirana nakon 365 dana od postavljanja dijagnoze; Legenda: stupanj težine bolesti po NIH kriterijima, 0 - bez znakova bolesti, 1 - blagi, 2 - umjereni, 3 - teški)



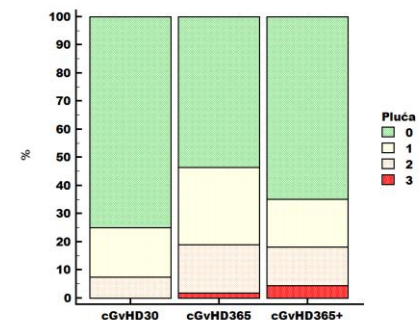
a) usta



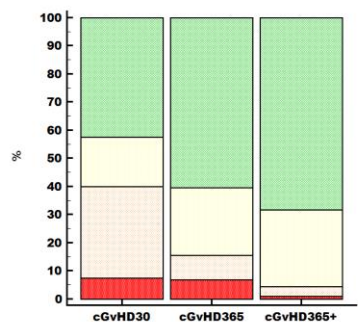
b) koža



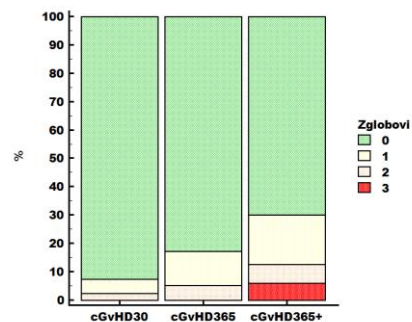
c) oči



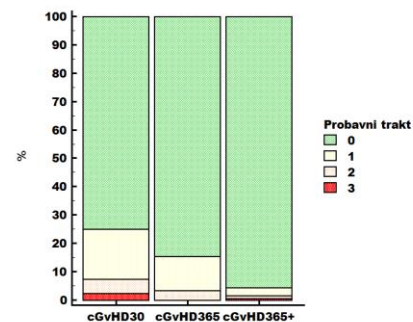
d) pluća



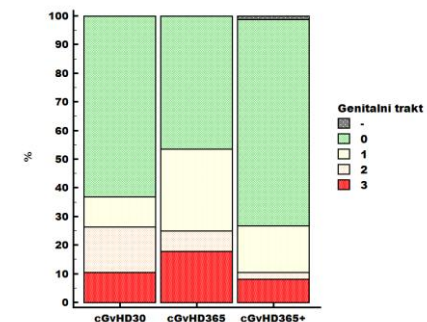
e) jetra



f) zglobovi i fascija



g) gastrointestinalni trakt



h) genitalni trakt- žene

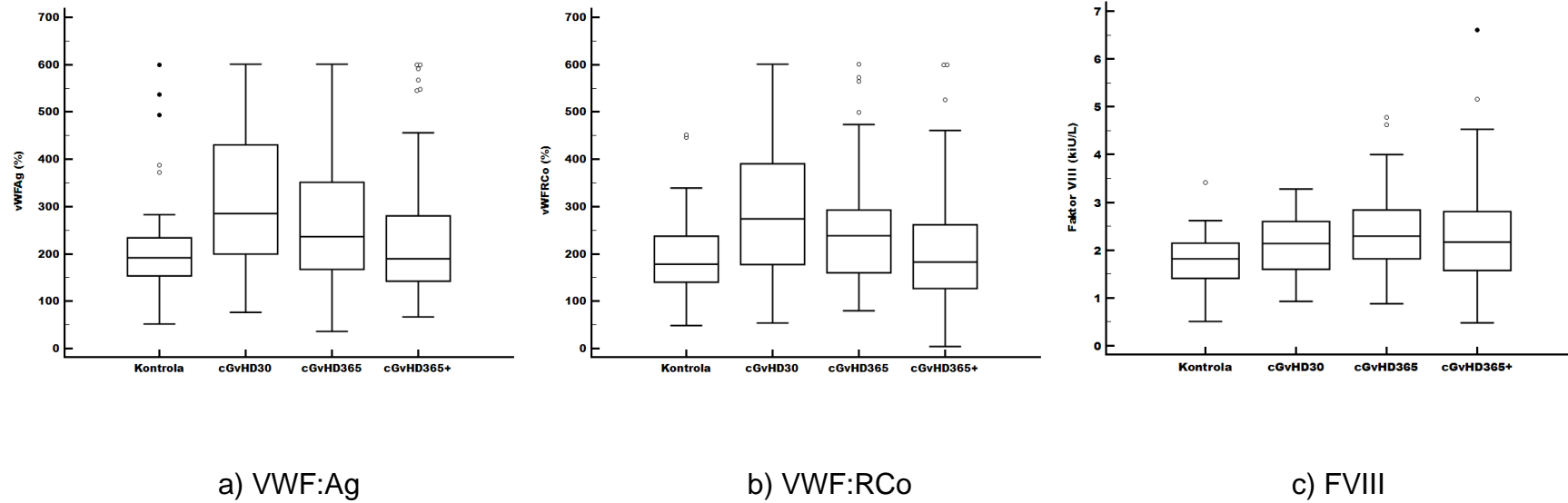
Slika 6. Težina pojedinih manifestacija cGvHD-a definiranih NIH kriterijima kroz vrijeme.

(cGvHD30 – bolest evaluirana unutar 30 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365 – bolest evaluirana od 30 do 365 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365+ - bolest evaluirana nakon 365 dana od postavljanja dijagnoze; Legenda: stupanj težine bolesti po NIH kriterijima, 0 - bez znakova bolesti, 1 - blagi, 2 - umjereni, 3 - teški, (-) - neevaluirane ispitanice)

5.3.2. Longitudinalno praćenje von Willebrandovoga faktora i faktora VIII u oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja

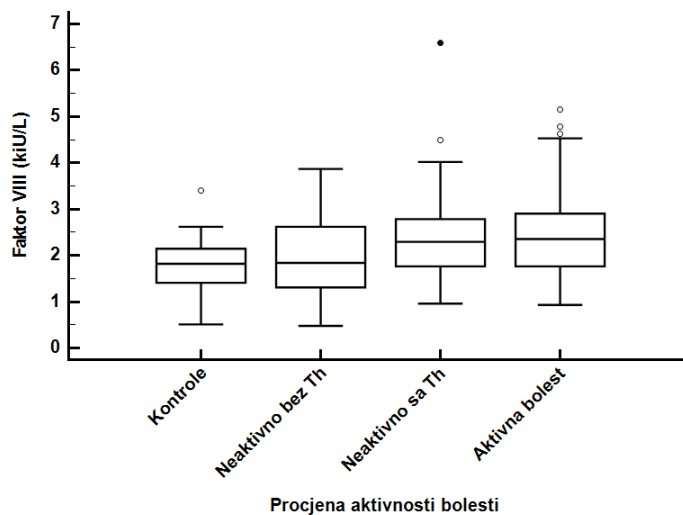
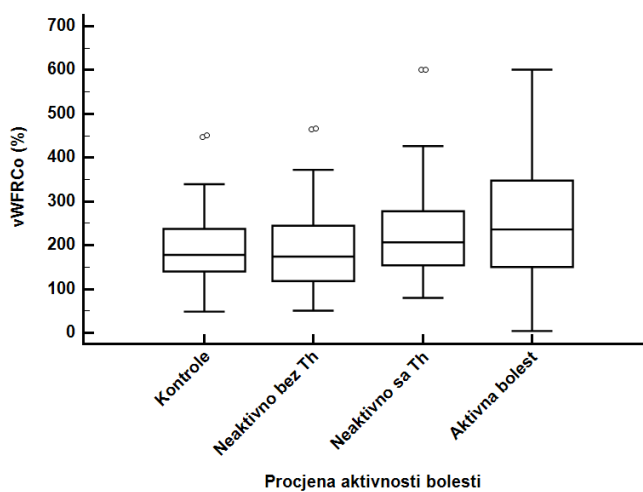
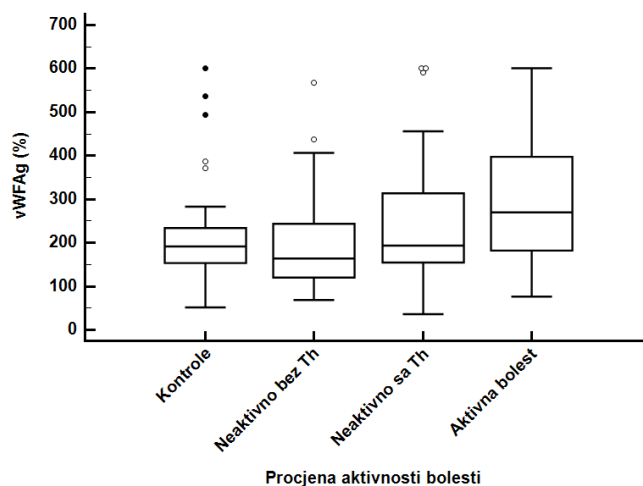
Na Slici 7 prikazana je dinamika razine VWF:Ag, VWF:RCo i FVIII tijekom vremena praćenja s različitim vremenskim odmacima od postavljanja dijagnoze kod oboljelih od cGvHD-a te su vrijednosti uspoređene s razinama kod kontrolnih ispitanika bez cGvHD-a. Kod bolesnika s cGvHD-om se ističu izrazito povišene vrijednosti faktora u prvih 30 dana od postavljanja dijagnoze te silazni trend razine VWF:Ag i VWF:RCo tijekom vremena praćenja koji nije prisutan za razinu FVIII. Nakon godinu dana od postavljanja dijagnoze cGvHD-a oba faktora pokazuju tendenciju izjednačavanja vrijednosti s razinama faktora zabilježenim kod kontrolnih post-alo-PKMS ispitanika koji nemaju cGvHD.

Kada se pak razine faktora kod cGvHD bolesnika analiziraju prema aktivnosti bolesti i korištenju sistemske imunosupresivne terapije, uočljive su povišene vrijednosti ispitivanih faktora pri aktivnoj bolesti te gotovo izjednačene razine između kontrola i bolesnika s neaktivnom bolešću (Slika 8). Daljnom analizom utvrđena je statistički značajna razlika između razine VWF:Ag (270,0% vs 191,9% vs 163,9%), VWF:RCo (236,2% vs 178,2% vs 174,1%) i FVIII (2,4 kiU/L vs 1,82 kiU/L vs 1,84 kiU/L) kod bolesnika s aktivnom bolešću u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu bolesnika s neaktivnom bolešću kod kojih se ne koristi sistemska terapija ($p < 0,001$). Nije bila statistički značajna razlika između faktora u skupini bolesnika s aktivnom bolešću i skupini bolesnika s bolešću koja je neaktivna a koji koriste sistemska imunosupresivnu terapiju, dok su statistički značajno više faktore imali bolesnici s neaktivnom bolešću koji koriste imunosupresiju u odnosu na bolesnike s neaktivnom bolešću koji ne koriste imunosupresiju (VWF:Ag vs 193,9% vs 163,9%, VWF:RCo 207,0%; vs 174,1% FVIII 2,3 kiU/L vs 1,84 kiU/L; $p < 0,001$).



Slika 7. Koncentracija i aktivnost VWF-a i FVIII kroz vrijeme u ovisnosti o aktivnosti cGvHD-a.

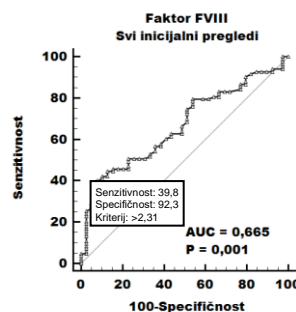
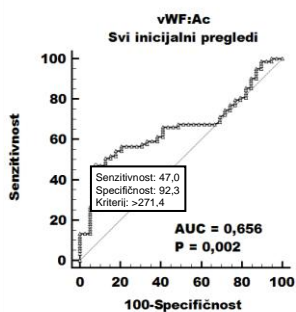
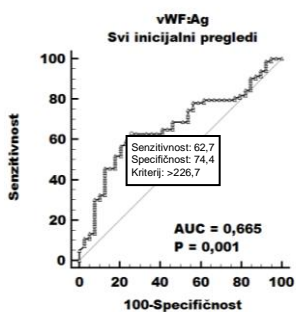
(kontrola – bolesnici nakon alo-PKMS koji nisu razvili cGvHD, cGvHD30 – bolest evaluirana unutar 30 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365 – bolest evaluirana od 30 do 365 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365+ - bolest evaluirana nakon 365 dana od postavljanja dijagnoze)



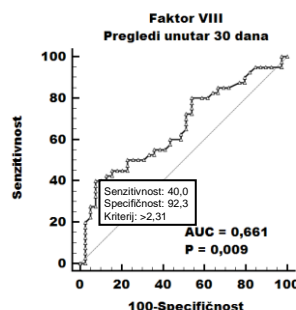
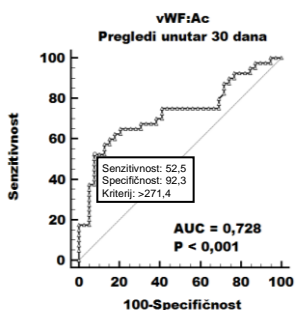
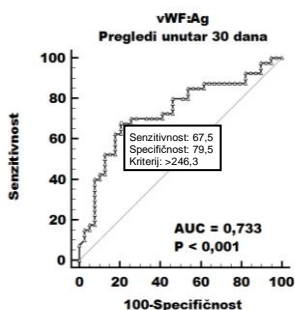
Slika 8. Koncentracija i aktivnost VWF-a te FVIII u ovisnosti o aktivnosti cGvHD-a i korištenju sistemske imunosupresivne terapije.

5.3.3. Biomarkerski potencijal von Willebrandovoga faktora kod oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja

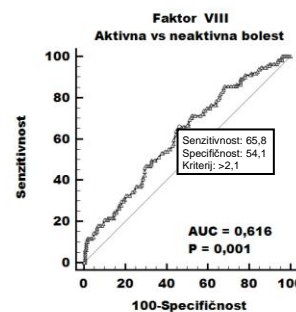
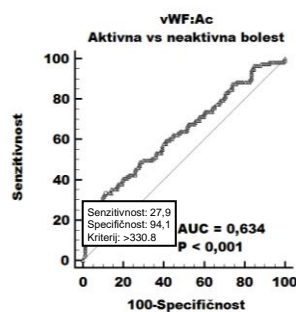
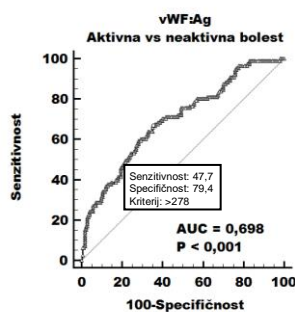
Za procjenu dijagnostičke valjanosti VWF:Ag, VWF:RCo i FVIII učinjena je analiza operacijskih svojstava primatelja (ROC analiza) kojom se prikazuje odnos specifičnosti i osjetljivosti pojedinog faktora. ROC krivulje prikazane na Slici 9 prikazuju statistički značajnu diskriminaciju između oboljelih od cGvHD-a i kontrolnih ispitanika te između onih s aktivnim i neaktivnim oblikom cGvHD-a. Ipak, kako je vidljivo na Slici 9, zadovoljavajuća osjetljivost i specifičnost postignuta je samo za diskriminaciju cGvHD bolesnika u početnoj fazi bolesti od kontrolnih ispitanika kod kojih se nakon alo-PKMS nije razvio cGvHD i to uz graničnu vrijednost za VWF:Ag iznad 246,3% (AUC=0,733) i VWF:RCo iznad 271,4% (AUC=0,728). Bolju osjetljivost pokazale su povišene razine VWF:Ag (67,5% vs 52,5%), a bolju specifičnost povišene razine VWF:RCo (92,3% vs 79,5%).



a)



b)



c)

Slika 9. ROC krivulje za koncentraciju antigena i aktivnost vWF-a i FVIII u diskriminaciji: a) cGvHD bolesnika i kontrola, b) cGvHD bolesnika u 30 dana od dijagnoze bolesti i kontrola c) aktivnog i neaktivnog cGvHD-a grupiranih prema procjeni kliničara.

5.3.4. Longitudinalno praćenje ostalih laboratorijskih parametara kod oboljelih od kronične bolesti presatka protiv primatelja

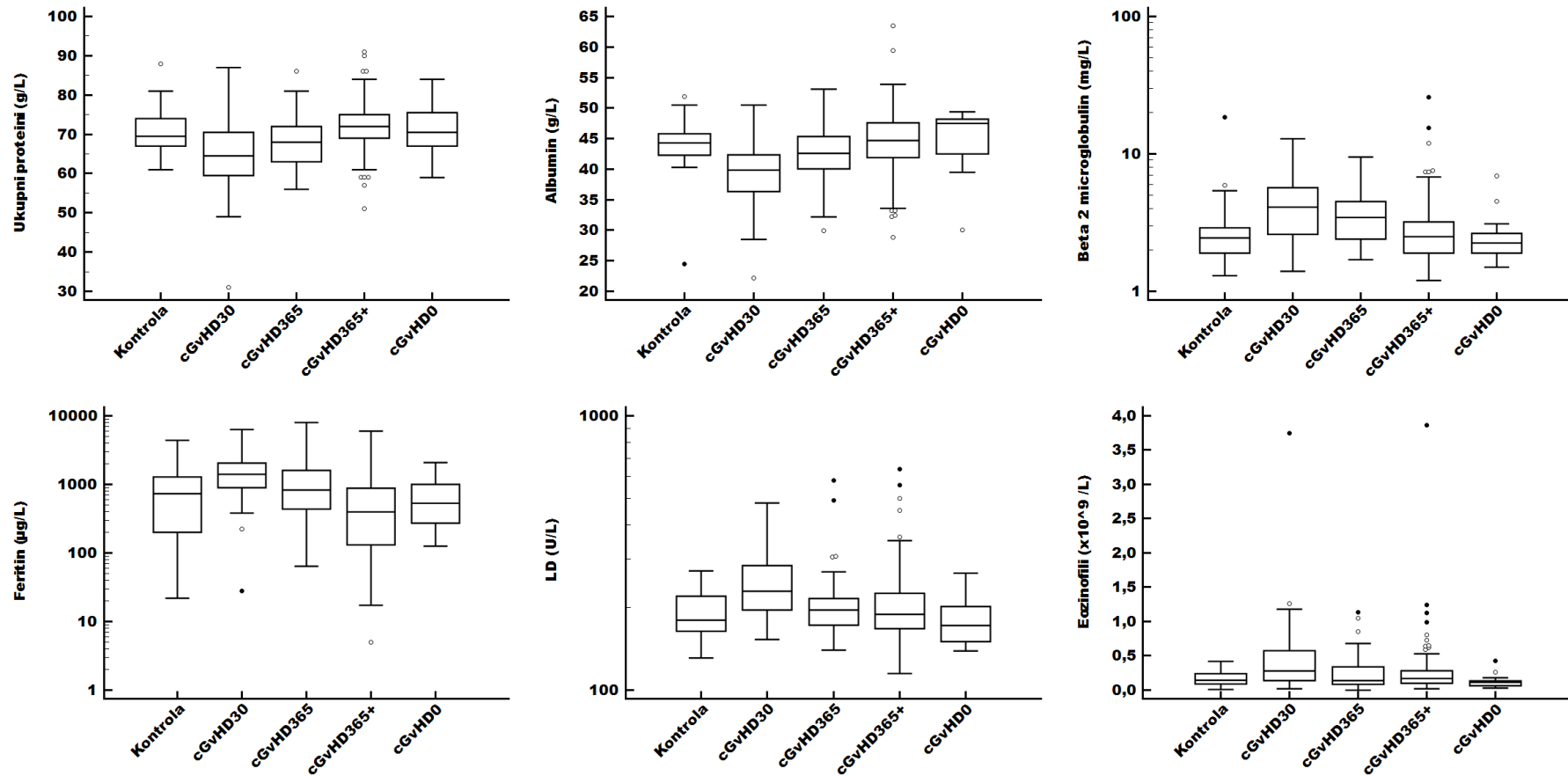
U Tablici 14 prikazani su medijani i rasponi svih laboratorijskih vrijednosti evaluiranih tijekom vremena praćenja grupiranih prema vremenu mjerenja od postavljanja dijagnoze cGvHD-a uz dodatno izdvojenu grupu bolesnika kod kojih je došlo do rezolucije bolesti. Treba napomenuti da nisu svi laboratorijski parametri mjereni kod svih bolesnika na svakom pregledu. Razlog je dijelom u tehničkim poteškoćama pri vađenju, predanalitici i analitici, a dijelom i u planu istraživanja. Naime, prema planu istraživanja je planirano imunološke parametre kod svih bolesnika vaditi samo jednokratno zbog čega su upravo pri analizi tih varijabli i najveća odstupanja.

Na Slici 10 grafički je prikazano kretanje reaktanata akutne faze i drugih laboratorijskih pokazatelja koji su tijekom praćenja pokazali sličan trend kao i VWF, odnosno onih koji su imali statistički značajno promijenjene vrijednosti u početnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$ za ukupne proteine, albumin, beta 2 mikroglobulin, feritin i LDH te $p = 0,023$ za eozinofile) i kod kojih se prati povratak razine vrijednosti na razinu kontrolne skupine po rezoluciji bolesti. Analizirajući njihove razine u odnosu na aktivnost bolesti procijenjenu od strane kliničara i korištenje imunosupresivne terapije, albumin i beta 2 mikroglobulin su pokazali statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) u razinama između aktivne bolesti i neaktivne bolesti ali samo u slučaju nekorištenja sistemske imunosupresivne terapije dok za neaktivnu bolest uz korištenje sistemske imunosupresivne terapije razlika u razinama nije bila statistički značajna.

Tablica 13. Usporedba rezultata laboratorijske analize među cGvHD ispitanicima u ovisnosti o vremenu. U zasebnu skupinu su izdvojeni bolesnici bez kliničkih znakova cGvHD-a.

Ispitivani parametri	cGvHD30 (n=40)		cGvHD365 (n=56)		cGvHD365+ (n=167)		cGvHD0 (n=17)		Referentni interval
	Medijan (min-max)								
vWF:Ag	285,35	(76,6 – 601)	241,85	(36,2 – 601)	192,45	(66,9 – 600)	104,1	(78,9 – 437,2)	50 – 150 (%)
VWF:RCo	274,25	(54 - 601)	245,45	(83,2 – 601)	183,4	(4,3 – 600)	91,8	(69,3 – 347,6)	50 – 160 (%)
FVIII	2,14	(0,93 – 3,28)	2,31	(2,03 – 4,78)	2,18	(0,48 – 6,6)	1,24	(0,88 – 3)	0,5 – 1,49 (KiU/L)
Trombociti	198	(17 – 369)	223,5	(14 – 576)	248,5	(22 – 560)	213	(87 – 275)	158-424 (x10 ⁹ /L)
Leukociti	6,4	(1 - 21)	6,7	(2,1 – 14,7)	7,8	(2,8 – 19,8)	6	(3,1 – 10,9)	3,4 – 9,7 (x10 ⁹ /L)
Monociti	0,69	(0,02 – 3,2)	0,66	(0,17 – 2)	0,81	(0,17 – 2,77)	0,5	(0,17 – 1,2)	0,12 – 0,84 (x10 ⁹ /L)
Neutrofilii	2,88	(0,94 – 11,89)	3,2	(1,01 – 9,88)	3,8	(1,38 – 12,72)	3,46	(1,16 – 7,49)	2,06 – 6,49 (x10 ⁹ /L)
Limfociti	1,83	(0,24 – 8,59)	2,24	(0,54 – 7,79)	2,52	(0,74 – 8,78)	2,13	(0,97 – 3,58)	1,19 – 3,35 (x10 ⁹ /L)
Eozinofili	0,28	(0,02 – 3,75)	0,14	(0 – 1,14)	0,17	(0,02 – 3,86)	0,16	(0,03 – 0,43)	0 – 0,43 (x10 ⁹ /L)
Sedimentacija eritrocita	25	(2 – 120)	24	(4 – 115)	20	(1 – 105)	18	(2 – 82)	2 – 23 (mm/h)
PV	1,1	(0,85 – 1,3)	1,12	(0,7 – 1,32)	1,16	(0,73 – 1,37)	1,09	(0,98 – 1,22)	>0,7 (/)
APTV	25,2	(17,9 – 32)	25	(18,5 – 41,3)	24,25	(18 – 41,5)	25,9	(21,7 – 2,1)	24-33 (s)
Fibrinogen	3,65	(1,9 – 7)	3,9	(2,2 – 7,2)	3,9	(2 – 7,6)	3,2	(2,3 – 6,8)	1,8 – 4,1 (g/h)
D-dimeri	0,66	(0,15 – 5,51)	0,69	(0,13 – 4,46)	0,5	(0,11 – 4,77)	0,3	(0,1 – 3,55)	0 – 0,5 (mg/L FEU)
Ukupni bilirubin	9,5	(3 – 47)	10	(3 – 221)	8	(2 – 33)	9	(6 – 18)	3 – 20 (μmol/L)
AP	125	(36 – 424)	121	(39 – 683)	90,5	(28 – 481)	83	(48 – 141)	60 – 142 (U/L)
AST	44,5	(15 – 944)	32,5	(12 – 252)	30	(15 – 251)	25	(17 – 69)	11 – 38 (U/L)
ALT	55,5	(15 – 973)	28	(6 – 572)	29	(6 – 269)	26,5	(12 – 135)	12 – 48 (U/L)
GGT	95,5	(15 – 1536)	76	(9 – 1117)	45	(6 – 834)	26	(12 – 71)	11 – 55 (U/L)
LDH	229,5	(153 – 481)	196	(140 – 582)	189	(115 – 639)	172	(139 – 267)	0 – 240 (U/L)
Ukupni kolesterol	4,85	(3,2 – 9,9)	5,25	(3,2 – 9,1)	5,7	(3,1 - 10)	5,6	(3,4 – 7,1)	0 – 5 (mol/L)
Trigliceridi	2,03	(0,7 – 6,05)	1,72	(0,52 – 4,97)	1,83	(0,49 – 12,45)	1,31	(0,69 – 3,34)	0 – 1,7 (mmol/L)
HDL	1,16	(0,35 – 3,46)	1,39	(0,27 – 2,98)	1,37	(0,69 – 2,76)	1,47	(0,58 – 2,76)	>1 (mmol/L)
LDL	2,83	(0,98 – 7,57)	3,01	(1,14 – 5,65)	3,5	(1,23 – 7,13)	3,53	(1,99 – 4,74)	0 – 3 (mmol/L)
CRP	3	(0,3 – 36,7)	3,2	(0,2 – 86,6)	3,5	(0,1 – 149,2)	3	(0,2 – 49,1)	0 – 5 (mg/L)
Reumatoidni faktor	10	(9 – 35)	11,7	(9 – 54)	10	(9 – 106,8)	9	(9 – 9)	0 – 14 (nmol/L)
C3	1,16	(0,58 - 1,66)	1,24	(0,95 – 1,85)	1,41	(0,95 – 1,94)	1,51	(1,01 – 2,01)	0,9 – 1,8 (g/L)
C4	0,23	(0,1 – 0,37)	0,25	(0,16 – 0,3)	0,27	(0,16 – 0,5)	0,25	(0,16 – 0,34)	0,1 – 0,4 (g/L)
Antikardiolipin IgG	6	(1-19)	7,5	(1 – 36)	4,5	(2 – 20)	3	(3 – 3)	
Antikardiolipin IgM	6	(0,9 – 36)	6,5	(1 – 30)	6	(1 – 29)	1	(1 -1)	
Beta 2 mikroglobulin	4,1	(1,4 – 12,9)	3,45	(1,7 – 9,5)	2,5	(1,2 – 25,9)	2,25	(1,5 – 6,9)	0,8 – 2,2 (mg/L)
Feritin	1407,15	(28 – 6319,5)	830,1	(64,2 – 8001)	397,4	(5 – 5996,9)	547,6	(125,9 – 2086,6)	30 – 400 (μg/L)
Ukupni proteini	64,5	(32 – 87)	68	(56 – 86)	72	(51 – 91)	70,5	(69 – 84)	66 – 81 (g/L)
IgG	9,81	(1,53 – 26,4)	9,65	(4,91 – 27,21)	11,13	(1,77 – 26,8)	11,8	(6,26 – 24,28)	7 – 16 (g/L)
IgA	0,54	(0,09 – 3,3)	0,76	(0,06 – 3,76)	1,2	(0,05 – 5,3)	1,32	(0,5 – 2,75)	0,7 – 4 (g/L)
IgM	0,995	(0,1 – 3,19)	0,995	(0,11 – 4,96)	1,085	(0,13 – 5,21)	0,48	(0,23 – 1,53)	0,4 – 2,3 (g/L)
Albumini	39,85	(22,2 – 50,5)	42,6	(29,9 – 53,1)	44,7	(28,9 – 63,5)	47,5	(30,1 – 49,4)	41 – 48,6 (g/L)

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, VWF:Ag – koncentracija antigena von Willebrandova faktora, VWF:RCo – ristocetinska aktivnost von Willebrandova faktora, FVIII – aktivnost faktora VIII, PV – protrombinsko vrijeme, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, AP – alkalna fosfatasa, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT – gama glutamiltransferaza, LDH – laktat dehidrogenaza, HDL – lipoprotein visoke gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, CRP – C reaktivni protein, C3 – komponenta komplementa 3, C4 – komponenta komplementa 4, Ig – imunoglobulini



Slika 10. Kretanje razine najznačajnijih laboratorijskih pokazatelja kod oboljelih od cGvHD-a kroz vrijeme.

(kontrola – bolesnici nakon alo-PKMS koji nisu razvili cGvHD, cGvHD30 – bolest evaluirana unutar 30 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365 – bolest evaluirana od 30 do 365 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD365+ - bolest evaluirana nakon 365 dana od postavljanja dijagnoze, cGvHD0 – rezolucija cGvHD-a, ukupni NIH 0)

6. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su hipotezu da su aktivnost i koncentracija vWF-a te aktivnost FVIII povišeni kod bolesnika s cGvHD i povezani s kliničkim manifestacijama bolesti.

Naime, usporedbom aktivnosti i koncentracije VWF-a te FVIII kod bolesnika s cGvHD-om i kontrolne skupine ispitanika koji nakon alo-PKMS nisu razvili cGvHD utvrđeno je da su aktivnost i koncentracija VWF-a i FVIII povišene kod bolesnika s cGvHD-om. Ispitivanjem povezanosti aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s kliničkim manifestacijama cGvHD-a utvrđena je značajna korelacija sva tri parametra s prisutnošću cGvHD-a jetre. Nadalje, aktivnost i koncentracija VWF-a bile su povezane s prisutnošću cGvHD-a u ustima, dok je aktivnost VWF-a bila povezana sa zahvaćenošću gastrointestinalnog sustava. Na taj način potvrđen je i drugi dio hipoteze, koji sugerira povezanost aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s kliničkim manifestacijama bolesti kod cGvHD bolesnika. Iako daljnjom analizom nije nađena statistički značajna povezanost stupnja ukupne težine cGvHD-a s razinama ispitivanih faktora, utvrđena je značajna povezanost stupnja težine cGvHD-a jetre i usta s razinom aktivnosti i koncentracije VWF-a, dok za FVIII takva veza nije evidentirana. Time je ispunjen i prvi specifični cilj rada, utvrđivanje povezanosti aktivnosti i koncentracije VWF-a te aktivnosti FVIII s težinom cGvHD-a prema zahvaćenim organima. Provedenom univarijatnom analizom ispunjeni su i preostali ciljevi ovog rada koji su predmnijevali utvrđivanje povezanosti razine faktora s demografskim karakteristikama, obilježjima alo-PKMS-a i razinama rutinski mjerenih reaktanata akutne faze u bolesnika s cGvHD-om. Prema očekivanju, s obzirom na poznatu vezu starije dobi i viših razina VWF (128), dob se u našem istraživanju pokazala kao značajan parametar povezan s višim razinama faktora, bez obzira promatra li se dob u vrijeme alo-PKMS ili u vrijeme prve studijske evaluacije. Za višu razinu VWF-a značajno se pokazalo i vrijeme proteklo od alo-PKMS i/ili postavljanja dijagnoze cGvHD-a do prve evaluacije, što pak nije imalo utjecaj na razinu FVIII. Nadalje, značajnu povezanost s višim razinama faktora imalo je i korištenje PBSC-a kao izvora KMS-a, što je očekivano s obzirom na to

da je korištenje PBSC-a poznati čimbenik rizika za razvoj GvHD-a zbog višeg udjela T stanica, drugih imunih stanica i citokina koji doprinose upalnom odgovoru i razvoju aGvHD-a, koji potom oštećenjem endotela propagira razvoj cGvHD-a (134). Korištenje sistemske imunosupresije u vrijeme pregleda također je značajno koreliralo s višim razinama faktora, a kako je umjereni ili teški stupanj bolesti prema NIH kriterijima indikacija za uvođenje sistemske terapije, ovakav rezultat govori u prilog povezanosti težine bolesti i razina ispitivanih faktora. Treba svakako napomenuti i da su prema našem istraživanju kortikosteroidi značajno korelirali s višom razinom FVIII, dok korištenje CSP-a nije pokazalo značajnu korelaciju s razinama faktora što se može potkrijepiti i dosadašnjim istraživanjima. Naime, meta-analizom ranijih istraživanja pokazan je protuupalni, ali i hiperkoagulabilni učinak kortikosteroida koji se očituje sniženim razinama VWF-a i povišenim razinama FVIII (135). Što se CSP-a tiče, čini se da imunomodulatorno djelovanje ovog agensa u niskim dozama kojim se, prema zadnjim izvještajima, učinkovito smanjuje incidencija teških oblika aGvHD-a uz manji toksični učinak i očuvan GVL efekt (136), vrijedi i u kontekstu cGvHD-a. Naime, od ranije poznati potencijal kalcineurinskih inhibitora u inicijaciji endotelne ozljede te neučinkovitosti u stabilizaciji aktiviranog endotela koja je poznati patofiziološki čimbenik nastanka cGvHD-a (137,138), doveo je do toga da se CSP u okvirima cGvHD-a koristi isključivo kao kao agens koji štedi steroide i tako omogućuje manji broj nuspojava zbog prolongirane terapije kortikosteroidima. Dapače, na temelju ovog teorijskog znanja je i u liječenju TA-TMA, terapijski zahtjevnog posttransplantacijskog endotelne sindroma, upravo ukidanje CSP i njegova zamjena taktolimusom jedna od predloženih metoda liječenja koja zbog multifaktorijalne etiologije bolesti nije polučila značajnim uspjehom (139). Korelacijskom analizom je pokazano i da su s razinama faktora značajno korelirali funkcionalno stanje bolesnika odnosno njihov ECOG status i ukupni zbroj ocjena zahvaćenosti organa po NIH kriterijima dok su aktivnost cGvHD-a procjenjena od strane vodećeg hematologa i broj organa zahvaćenih cGvHD-om značajno korelirali s razinama VWF, ali ne i FVIII. Rezultati su nadalje pokazali kako razine mjerenih faktora koreliraju s aktivnošću bolesti te da su najizraženije povišene pri postavljanju dijagnoze, kada je bolest očekivano najaktivnija i kada je zahvaćen

najveći broj organa. Navedeni rezultati ukazuju na značajnu povezanost ispitivanih faktora s aktivnošću cGvHD-a i upućuju na to kako bi FVIII i VWF zaista mogli služiti kao markeri aktivnosti bolesti te kao takvi biti validni kao dijagnostički biomarkeri ili biomarkeri odgovora na terapiju. S obzirom da ovo istraživanje nije predvidjelo analizu faktora prije i nakon početka određene terapije, biomarkerski potencijal u tom smislu nije mogao biti procjenjen. Učinjena je pak dodatna statistička obrada kako bi se procijenila njihova dijagnostička vrijednost te je utvrđeno kako su razine VWF:Ag iznad 246,3% i VWF:RCo iznad 271,4% u inicijalnoj fazi bolesti dijagnostički pokazatelj pojave cGvHD-a visoke specifičnosti (92,3%) i dobre osjetljivosti (67,5%). S obzirom na utjecaj širokog spektra patoloških ali i fizioloških varijacija na razinu VWF (140), koje su se doduše pokušale svesti na minimum isključivanjem bolesnika sa sistemskim infekcijama i ozljedama te pravilnom raspodjelom po spolu, dobu i krvnoj grupi, ovakav rezultat je impresivan. Što se upalnih markera tiče, značajnu korelaciju s bar jednim od ispitivanih faktora pokazali su D-dimeri, feritin, LDH, beta 2 mikroglobulin i albumini, redom etablirani reaktanti akutne faze osjetljivi na razinu upalnih citokina povezanih s aktivnošću cGvHD-a (141–144). Za ovaj rad zanimljivo je pritom istraživanje Staley i suradnika koji su identificirali niske razine albumina i visoke razine LDH kao prediktor lošeg ishoda akutne trombotične trombocitopenične purpure (TTP-a), najpoznatijeg endotelnog sindroma kojeg karakteriziraju visoke razine VWF-a uzrokovane nedjelotvornošću enzima ADAMTS13 koji u fiziološkim uvjetima omogućuje razgradnju ultra-velikih multimeri VWF u manje dijelove (145).

Svi statistički značajni parametri sa zadovoljavajućim koeficijentom korelacije i s biološkom povezanošću uključeni su u multiplu regresijsku analizu koja je identificirala dob u vrijeme evaluacije, broj zahvaćenih organa, višu razinu leukocita i LDH te nižu razinu albumina kao determinante značajne za razinu VWF:Ag, dob u vrijeme evaluacije, broj organa zahvaćenih cGvHD-om, višu razinu LDH te nižu razinu albumina kao prediktor razine VWF:RCo te dob u vrijeme evaluacije, korištenje sistemske imunosupresije, viši broj leukocita i skraćeni APTV kao varijable prediktivne za razinu FVIII. Ovakvi rezultati multiple regresijske analize u skladu su s ranijim tekstom i dokazuju kako viša razina

upale povezana s jačom aktivnošću bolesti značajno utječe na razinu VWF-a i FVIII.

Rezultati longitudinalne analize pokazali su pak da su razine VWF i FVIII kod bolesnika s cGvHD-om povišene dugo nakon postavljanja dijagnoze i da su značajno više kod oboljelih od cGvHD-a u usporedbi na kontrolnu skupinu. Pokazano je također i kako razine faktora padaju na razine slične kao kod kontrolne skupine u slučaju da dođe do potpune rezolucije bolesti. Kada se gleda kretanje težine pojedinih manifestacija cGvHD-a tijekom vremena praćenja, što je, prema našem saznanju prvi put da se radi analiza tog tipa, u ovoj studiji zamjećena je povećana prevalencija težih stupnjeva zahvaćanja jetre, kože i gastrointestinalnog trakta, dakle onih manifestacija koje su zajedničke s aGvHD-om, u ranoj, inflamatornoj fazi bolesti kada je očekivano najviša razina endotelne disfunkcije. Iako s vremenom dolazi do rezolucije jetrenih i gastrointestinalnih manifestacija kod kojih kasnije prevladava blagi stupanj bolesti, kožne manifestacije teškog stupnja ne regrediraju već naprotiv, nakon godinu dana dolazi do dodatnog porasta njihovog udjela. Razlog ove bifazične raspodjele prevalencije težih oblika je vjerojatno razvoj inflamatornog oblika u ranoj, a sklerotskog u kasnoj fazi bolesti. Ako gledamo iz perspektive endotela kao potencijalnog aktivnog činitelja bolesti, navedeno se možda može povezati s različitim funkcionalnim i morfološkim karakteristikama vaskulature u različitim slojevima kože (146). Teoretski je moguće da je nastanak kožnih promjena potenciran različitim imunim mehanizmima za koje su zaslužna različita svojstva endotela u pojedinim slojevima kože. I drugi organi kod kojih se javljaju karakteristične ireverzibilne sklerotske promjene također dijele taj obrazac čije je obilježje porast umjerenih i teških oblika bolesti tijekom vremena praćenja. Riječ je o manifestacijama koje zahvaćaju oči, pluća, zglobove i fasciju, organa u kojima se, uz kožu, razvijaju najteže posljedice bolesti. Zanimljivo je kako promjene u ustima imaju zaseban ritam razvoja i za njih je karakteristična pojava najtežih simptoma nakon prvih 30 dana te rezolucije nakon godinu dana od postavljanja dijagnoze. S obzirom da unatoč visokoj prevalenciji zahvaćenosti u ranoj fazi vrlo rijetko dolazi do razvoja teškog oblika bolesti, kod ove manifestacije moguć je utjecaj specijaliziranog mukoznog imunog sustava usta koji atenuira

upalu u ranoj fazi bolesti, iako kod ove bolesti nisu provedena istraživanja koja bi potvrdila te tvrdnje (147). Poznato je naime, kako rane intervencije koje rezultiraju smanjenjem upalne aktivnosti, primjerice snižena incidencija aGvHD-a povezana s T-deplecijom, rezultiraju smanjenom incidencijom cGvHD-a pa je moguće da je takav mehanizam posredovan mukozom usta primjenjiv i na lokalnoj razini. Za spomenuti je još i genitalni trakt u žena kod kojeg je vidljiv jasan trend smanjenja težine simptoma nakon godinu dana od dijagnoze cGvHD-a uz napomenu kako su u analizu prema NIH kriterijima iz 2004. godine uključeni samo cGvHD ispitanici ženskog spola i da se prema kriterijima procjena težine vrednuje prema simptomima koji spolno neaktivne žene nisu mogle procijeniti. Sve navedeno je u skladu s teorijom prema kojoj postoji više fenotipova bolesti, odnosno s tvrdnjom da u razvoju pojedinih manifestacija sudjeluju različiti imuni mehanizmi (17). Jesu li za to barem djelomično odgovorni efekti endotelne disfunkcije koji se različito eksprimiraju u različitim krvožilnim sustavima teško je za reći.

Prije nego što kontekstualiziramo prikazane rezultate, važno je istaknuti ključne aspekte koji potvrđuju kvalitetu dizajna i metodologije istraživanja te omogućuju pouzdanu interpretaciju nalaza, čime se osigurava visok nivo znanstvene validnosti i relevantnosti studije. Demografske karakteristike ispitivane kohorte bile su u skladu s literaturnim podacima, a usporedba između oboljelih od cGVHD i kontrolnih ispitanika nije pokazala razliku u raspodjeli niti jednog od relevantnih demografskih pokazatelja, dok je i ovim istraživanjem potvrđena povezanost korištenja PBSC i prethodnog aGvHD-a s razvojem cGvHD-a kao što je opisivano ranije. Za naglasiti je i da je kod gotovo polovice ispitanika oboljelih od cGvHD-a prva studijska evaluacija provedena unutar prvih 30 dana od postavljanja dijagnoze cGvHD-a. Što se karakteristika samog cGvHD-a tiče, iako je kod većine bolesnika na prvom pregledu zabilježen klasični oblik bolesti, kod njih 13% bolest se prezentirala preklapajućim („overlap“) sindromom. Kod ispitanika s cGvHD-om je bolest na prvom pregledu u većini slučajeva procjenjena kao umjerena ili teška (94%) iako je tek kod njih 59,8% od strane kliničara procijenjena kao aktivna. Razlog za to je različito vrijeme uključivanja u studiju u odnosu na postavljanje dijagnoze, s tim da su bolesnici koji su uključeni u studiju kasnije u tijeku bolesti imali razvijene ireverzibilne sekvele bolesti zbog čega im

je težina, unatoč neaktivnosti, mahom bila okarakterizirana kao teška. Pri uključenju u studiju cGvHD bolesnici su većinom bili dobrog općeg tjelesnog stanja (84,1% ECOG 0-1), a najčešće zahvaćeni organi bili su usta, koža i oči. Literaturna ljestvica korištena za procjenu razine imunosupresije pokazala je da je pri prvom pregledu kod većine bolesnika bila prisutna umjerena razina imunosupresije što moramo uzeti s oprezom jer se prema kriterijima u umjerenu imunosupresiju ubraja i samo korištenje agenasa koji štede kortikosteroide kao što su ciklosporin i takrolimus, što je u kliničkoj praksi jako česta pojava i ne može se poistovjećivati s potrebom za uvođenjem dodatne imunosupresije radi kontrole aktivnosti cGvHD-a.

S obzirom na fiziološku povezanost trombocita i VWF, svakako treba spomenuti značajnu razliku u razini trombocita između oboljele i kontrolne skupine bolesnika. Reaktivnu trombocitozu koja je zabilježena kod naših bolesnika u skladu je s rezultatom NIH grupe koja je primjećenu trombocitozu kod cGvHD bolesnika povezala s nastankom fibrotskih promjena i zadebljanjem vaskularne stijenke (72). Trombociti su, naime, već ranije identificirani kao medijator koji posreduje između upalnog odgovora i nastanka endotelne disfunkcije i pokazuje različite karakteristike u različitim vaskularnim sustavima (148). Za spomenuti je pritom i rezultate studija koje su pokazale kako VWF porijekla trombocitnih α -granula ima tek manju ulogu u trombogenezi i aterosklerozi, dok je tromboinflamacija povezana s VWF-om koji je porijeklom iz Weibel-Paladijevih tjelešaca u endotelu (39). Značajna razlika među skupinama pokazana je za još jedan prognostički upalni parametar čija je povezanost s cGvHD-om poznata od ranije – eozinofilijom. Uz to, značajna se pokazala i veza cGvHD-a s povišenim LDH, β -2-mikroglobulinom, feritinom i sniženim albuminom. Zanimljivo je kako se pri longitudinalnoj analizi pokazalo da navedeni upalni markeri prate sličan trend kao i VWF, te da su im razine značajno povišene u početnoj fazi dok se po rezoluciji bolesti prati povratak razine vrijednosti na razinu sličnu kao kod kontrolne skupine. Takav rezultat indirektni je dokaz vrijednosti razine VWF-a kao upalnog parametra. S obzirom da FVIII nije jednako etabliran marker endotelne disfunkcije kao što je to VWF, ali i da se prema ovim rezultatima VWF pokazao kao značajniji biomarker, svakako se treba osvrnuti i na ideju oko njegove

analize. Naime, s obzirom na postojanje i drugih mehanizama regulacije razine FVIII, te na činjenicu da se on sintetizira u sinusoidalnom endotelu jetre, hipotezirali smo da bi možda različite manifestacije bolesti, osobito jetre, mogle pridonijeti značajnijem porastu FVIII koji bi eventualno imao biomarkerski značaj. Rezultati su pak pokazali kako je porast FVIII bio u skladu s očekivanjima, odnosno proporcionalano niži od razina VWF te nije nađena veza aktivnosti FVIII s aktivnošću cGvHD-a koja odstupa od povišenja uvjetovanog porastom VWF. Naime, rezultati ranijih studija pokazali su kako se za svakih 1% promjene u plazmatskim razinama VWF razina FVIII mijenja za otprilike 0,54% (149). S obzirom da je FVIII nekovalentnim vezama vezan za cirkulirajući VWF u plazmi koji ga štiti od proteolize, povišene razine VWF i vezanje FVIII za isti značajno utječu i na razine FVIII čime se objašnjava i utjecaj istih čimbenika varijacije VWF na FVIII (140). Kako bi zaista razumijeli važnost potencijalne dijagnostičke primjene VWF-a, valja naglasiti kako je velika zapreka u istraživanju patofiziologije cGvHD-a i u pronalasku djelotvornijih načina liječenja nedostatak biomarkera zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti koji bi bio prikladan za kliničku upotrebu. S obzirom da je broj alo-PKMS u stalnom porastu te da je preživljenje nakon alo-PKMS sve dulje, za očekivati je i da će broj oboljelih od cGvHD-a u budućnosti biti sve viši zbog čega je i neispunjena potreba za pronalaskom adekvatnog biomarkera cGvHD-a sve naglašenija.

Konačno, kada rezultate našeg istraživanja stavimo u kontekst trenutnog znanja o cGvHD-u kao kasnoj komplikaciji alo-PKMS koja do danas ostaje enigma transplantacijske biologije, najzanimljivija je svakako pokazana povezanost razine faktora s aktivnošću bolesti koja perzistira dugo nakon alo-PKMS. S obzirom da su FVIII i VWF poznati markeri endotelne ozljede ranije evaluirani kao biomarkeri u autoimunim bolestima koje klinički nalikuju cGvHD-u te da je endotelna ozljeda jedan od etiopatogenetskih čimbenika nastanka cGvHD-a, njihova evaluacija dala je i novi uvid u samu patogenezu bolesti. Tome u prilog ide i istraživanje na svinjskom modelu prema kojem je opisano kako je raspored endotelnih Weibel-Paladijevih tjelešaca različit u različitim vaskularnim sustavima i to na način da je u arterijama pluća eksprimiran u znatno jačoj razini negoli je to u kardiovaskularnom sustavu (150). Ukoliko se navedeno može preslikati na

ljudski organizama, što ne znamo zbog etičkih i tehničkih ograničenja u istraživanju endotela, ova različita ekspresija mogla bi objasniti i zašto su kardiovaskularne manifestacije eksprimirane puno kasnije nakon alo-PKMS te zašto su pluća jedna od najteže pogođenih organa kod oboljelih od cGvHD-a. Postavlja se time i pitanje raspodjele Weibel-Paladijevih tjelešaca u ostalim organskim sustavima, osobito onima zahvaćenima sklerotskim oblikom cGvHD-a. Nadalje, nedavno istraživanje Umina i suradnika koji su identificirali povezanost endotelne ekspresije DBY/HLA-II kompleksa s razvojem cGvHD ide u prilog tome da bi endotel zaista mogao biti i meta aloimunosti u cGvHD-u (151). Kako su komentirali Holtzman i Pavletic, stvaranje aloprotutijela na određene alele HLA-II klase slabih tkivnih antigena (eng. *minor histocompatibility antigens*, mHLA) koji su eksprimirani na endotelu, a koji se ranije nisu smatrali relevantnima u kliničkoj praksi, mogli bi biti ključni za razumijevanje patofiziologije cGvHD-a i pronalaska načina očuvanja GVL efekta (152). Ovakav pomak u shvaćanju patofiziologije bolesti mogao bi dovesti i do razvoja novih terapijskih strategija. Naime, cGvHD je kao kompleksna manifestacija aloimunosti fenomen čiju aktivnost ne možemo do kraja kontrolirati dostupnim terapijskim sredstvima. Pokazano je da je kod 50% oboljelih za potpuno ukidanje terapije potrebno 7 godina, kod 10% više od toga, a kod čak njih 40% prolongirana imunosupresija rezultira smrću ili relapsom (153). Smatra se kako je razlog ovakve neefikasnosti nedovoljno poznavanje mehanizma nastanka i djelovanja same bolesti te da potraga za novim metodama liječenja cGvHD-a treba započeti boljim razumijevanjem njegove patogeneze. Kada se sve navedeno uzme u obzir, endotel predstavlja obećavajući cilj terapijskog djelovanja u cGvHD-u. Trenutno najveći potencijal imaju sredstva koja štite endotel kao što su defibrotid, sildenafil, pa čak i statini, smanjujući pritom razinu upalnog odgovora posljedično čemu se smanjuje razina endotelne disfunkcije koja je, prema svemu sudeći, okidač abnormalnog imunog odgovora u cGvHD-u. Najvrjedniji efekt ovakvog liječenja zasigurno je očuvanje GVL efekta odnosno smanjena incidencija relapsa bolesti i mortaliteta koji nastaju posljedično ekscesivnoj imunosupresiji inkorporiranoj u trenutne strategije liječenja.

Za kraj, svakako treba napomenuti i nedostatke ovog istraživanja, a to je u prvom redu nespecifičnost promatranih koagulacijskih faktora i mogući utjecaj brojnih vanjskih čimbenika na njihovu razinu. Treba napomenuti i da, iako nije postojala razlika u raspodjeli ABO krvne grupe između ispitivanih grupa u ovom istraživanju, buduća istraživanja trebaju detaljnije istražiti utjecaj varijacije krvne grupe na razinu ovih faktora s obzirom na utjecaj krvne grupe 0 na sniženje razine VWF od čak 25-30% (140). Također, s obzirom da su u istraživanju evaluirane serumske razine VWF i FVIII, treba napomenuti i kako one ne odražavaju nužno razinu endotelne aktivacije u pojedinom tkivu. Nadalje, važno ograničenje ove kao i drugih kliničkih opservacija je nemogućnost detekcije kauzalnosti, tek korelacije između istraživanih varijabli.

7. Zaključak

Aktivnost i koncentracija von Willebrandovog faktora i faktora VIII više su kod bolesnika s cGvHD-om u odnosu na kontrolne ispitanike nakon alo-TKS koji nisu razvili cGvHD i povezane su s kliničkim manifestacijama bolesti. Naše istraživanje pokazalo je kako su razine VWF i FVIII najznačajnije povišene u ranoj fazi cGvHD-a te da bi se mogli koristiti kao pomoćno dijagnostičko sredstvo koje korelira s aktivnošću bolesti. Ovaj rad ukazuje na potrebu za daljnim istraživanjem biomarkerskog potencijala VWF kao dijagnostičkog sredstva u ranoj fazi bolesti prije pojave kliničkih manifestacija te u procjeni odgovora na terapiju. Korištenjem VWF i FVIII kao biomarkera koji bi omogućio raniju dijagnozu cGvHD mogla bi se omogućiti ranija terapijska intervencija i smanjenje nastanka ireverzibilnih i teških sekvela bolesti. Nadalje, s obzirom na povezanost razine VWF sa zahvaćanjem jetre cGvHD-om te uzimajući u obzir kliničke poteškoće u evaluaciji ovog organa, moguće je korištenje razine VWF i kao pokazatelja jetrenih manifestacija cGvHD-a što također zatjeva daljnju evaluaciju. Treba napomenuti i kako ovo istraživanje predstavlja jedan od prvih radova kojim se prospektivno longitudinalno evaluiraju VWF i FVIII u kontekstu cGvHD-a kao mogućih pokazatelja endotelne aktivacije. Regulacija aktivnosti endotela predstavlja potencijalni način atenuacije aktivnosti bolesti kojom bi se mogao izbjeći razvoj teških formi cGvHD-a uz očuvanje GVL efekta zbog čega svakako zaslužuje aktivniju pozornost znanstvene zajednice.

8. Sažetak

Kronična bolest presatka protiv primatelja (cGvHD) kasna je komplikacija alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica (alo-PKMS) koju karakterizira imuna disregulacija. U svakodnevnoj kliničkoj praksi istaknuta je potreba za neinvazivnim i lako dostupnim biomarkerom koji bi pouzdano pokazivao aktivnost bolesti i pomogao u modulaciji terapijske strategije. Von Willebrandov faktor (VWF) i faktor VIII (FVIII) su koagulacijski faktori koji djeluju kao upalni markeri koji mogu odražavati i endotelnu aktivaciju, inače poznati etiopatogenetski čimbenik nastanka cGvHD-a. Njihov biomarkerski potencijal u procjeni aktivnosti bolesti opisan je ranije u autoimunim bolestima koje klinički nalikuju cGvHD-u. Rezultati naše studije pokazali su kako su razine VWF i FVIII značajno više kod bolesnika oboljelih od cGvHD-a u odnosu na kontrole koji nisu razvili cGvHD (VWF:Ag 268,2% vs 191,9%, $p=0,003$; VWF:RCo 261,8% vs 178,2%, $p=0,003$; FVIII 2,17 vs 1,82, $p=0,006$). Daljnom analizom pokazano je kako su razine VWF:Ag iznad 246,3% i VWF:RCo iznad 271,4% u inicijalnoj fazi bolesti dijagnostički pokazatelj pojave cGvHD-a visoke specifičnosti (92,3%) i dobre osjetljivosti (67,5%). Pokazano je i da su razine faktora povezane s postojanjem manifestacija cGvHD u jetri, ustima i gastrointestinalnom traktu. Ovim longitudinalnim istraživanjem po prvi put je pokazano kako su razine VWF i FVIII povišene dugo nakon postavljanja dijagnoze cGvHD-a i da su povezane s aktivnošću bolesti. Navedeni rezultati ukazuju na moguću dugotrajnu ulogu endotela u aloimunom odgovoru povezanim s cGvHD-om čime se dodatno ističe potreba za bazičnim istraživanjima koji bi dodatno objasnili biologiju bolesti. Potrebno je provesti dodatna istraživanja biomarkerskog potencijala VWF kao dijagnostičkog sredstva u predmanifestnoj fazi bolesti te u procjeni odgovora na terapiju čime bi se mogla omogućiti ranija terapijska intervencija i smanjenje nastanka ireverzibilnih i teških sekvela bolesti.

Ključne riječi: Von Willebrandov faktor, faktor VIII, kronična bolest presatka protiv darivatelja, biomarker, endotelna aktivacija, endotelna disfunkcija

9. Summary

Von Willebrand factor and Factor VIII in chronic Graft-versus-Host Disease

Antonela Lelas, 2025.

Chronic Graft-versus-Host Disease (cGvHD) is a late complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) characterized by immune dysregulation. In clinical practice, there is a critical need for a non-invasive and easily accessible biomarker that can reliably indicate disease activity and assist in tailoring therapeutic strategies. Von Willebrand factor (VWF) and factor VIII (FVIII) are coagulation factors that function as inflammatory markers and can reflect endothelial activation, a known etiopathogenetic factor in the development of cGvHD. Their biomarker potential in assessing disease activity has been previously described in autoimmune diseases that clinically resemble cGvHD. Our study results showed that VWF and FVIII levels were significantly higher in patients with cGvHD compared to controls who did not develop cGvHD (VWF 268.2% vs 191.9%, $p=0.003$; VWF 261.8% vs 178.2%, $p=0.003$; FVIII 2.17 vs 1.82, $p=0.006$). Further analysis revealed that VWF levels above 246.3% and VWF levels above 271.4% in the initial phase of the disease are diagnostic indicators of cGvHD with high specificity (92.3%) and good sensitivity (67.5%). It was also shown that these factor levels are associated with the presence of cGvHD manifestations in the liver, mouth, and gastrointestinal tract. This longitudinal study demonstrated for the first time that VWF and FVIII levels remain elevated long after the diagnosis of cGvHD and correlate with ongoing disease activity. These findings suggest a possible long-term role of the endothelium in the alloimmune response related to cGvHD, highlighting the need for basic research to further explain the biology of the disease. Additional studies are needed to investigate the biomarker potential of VWF as a diagnostic tool in the pre-manifestation phase of the disease and in assessing response to therapy, which could enable earlier therapeutic intervention and reduce the occurrence of irreversible and severe disease sequelae.

Key words: Von Willebrand factor, factor VIII, chronic Graft-versus-Host Disease, biomarker, endothelial activation, endothelial dysfunction

10. Popis literature

1. Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, i sur. The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(10):1575–85.
2. Penack O, Peczynski C, Mohty M, Yakoub-Agha I, Styczynski J, Montoto S, i sur. How much has allogeneic stem cell transplant–related mortality improved since the 1980s? A retrospective analysis from the EBMT. *Blood Adv.* 2020;4(24):6283–90.
3. Gratwohl A. Historical Aspects of Chronic Graft versus Host Disease. U: Vogelsang GB, Pavletic ZS, ur. *Chronic Graft Versus Host Disease: Interdisciplinary Management.* Cambridge University Press. 2009;str. 3–7.
4. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, i sur. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 2011;117(11):3214.
5. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945–56.
6. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, Cowen EW, i sur. Measuring Therapeutic Response in Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(3):252–66.
7. Martin PJ, Weisdorf D, Przepiorka D, Hirschfeld S, Farrell A, Rizzo JD, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(5):491–505.
8. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for

- Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(3):389-401.e1.
9. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, Koreth J, Inamoto Y, Jagasia M, i sur. Measuring Therapeutic Response in Chronic Graft-versus-Host Disease. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):984–99.
 10. Pavletic SZ, Martin PJ, Schultz KR, Lee SJ. The Future of Chronic Graft-Versus-Host Disease: Introduction to the 2020 National Institutes of Health Consensus Development Project Reports. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(6):448–51.
 11. Wolff D, Lawitschka A. Chronic Graft-Versus-Host Disease. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7. izdanje. Cham (CH): Springer. 2019;331–45.
 12. Lee SJ, Onstad L, Chow EJ, Shaw BE, Jim HSL, Syrjala KL, i sur. Patient-reported outcomes and health status associated with chronic graft- versus-host disease. *Haematologica*. 2018;103(9):1535–41.
 13. Finke J, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger H, Stelljes M, Volin L, i sur. Long-term outcomes after standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-human-T-lymphocyte immunoglobulin in haemopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: final results of a randomised controlled trial. *Lancet Haematol*. 2017;4(6):e293–301.
 14. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemary M, i sur. Addition of anti-thymocyte globulin to standard graft-versus-host disease prophylaxis versus standard treatment alone in patients with haematological malignancies undergoing transplantation from unrelated donors: final analysis of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2020;7(2):e100–11.
 15. Mussetti A, Greco R, Peccatori J, Corradini P. Post-transplant cyclophosphamide, a promising anti-graft versus host disease prophylaxis: where do we stand? *Expert Rev Hematol*. 2017;10(5):479–92.

16. el Fakih R, Hashmi SK, Ciurea SO, Luznik L, Gale RP, Aljurf M. Post-transplant cyclophosphamide use in matched HLA donors: a review of literature and future application. *Bone Marrow Transplant.* 2019;55(1):40–7.
17. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, i sur. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(2):211–34.
18. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2565–79.
19. Qayed M, Wang T, Hemmer MT, Spellman S, Arora M, Couriel D, i sur. Influence of Age on Acute and Chronic GVHD in Children Undergoing HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplantation for Acute Leukemia: Implications for Prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(3):521–8.
20. Bhatt VR, Wang T, Chen K, Kitko CL, MacMillan ML, Pidala JA, i sur. Chronic Graft-Versus-Host Disease, Non-Relapse Mortality and Disease Relapse in Older versus Younger Adults Undergoing Matched Allogeneic Peripheral Blood Hematopoietic Cell Transplantation: A CIBMTR Analysis. *Transplant Cell Ther.* 2022;28(1):34.
21. Sullivan K, Shulman H, Storb R, Weiden P, Witherspoon R, McDonald G, i sur. Chronic Graft-Versus-Host Disease in 52 Patients: Adverse Natural Course and Successful Treatment With Combination Immunosuppression. *Blood.* 1981;57(2):267–76.
22. Flowers MED, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2015;125(4):606–15.
23. Martin PJ, Storer BE, Inamoto Y, Flowers MED, Carpenter PA, Pidala J, i sur. An endpoint associated with clinical benefit after initial treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2017;130(3):360–7.
24. Wolff D, Fatobene G, Rocha V, Kröger N, Flowers ME. Steroid-refractory chronic graft-versus-host disease: treatment options and patient management. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(9):2079–87.

25. Zeiser R, Lee SJ. Three US Food and Drug Administration–approved therapies for chronic GVHD. *Blood*. 2022;139(11):1642–5.
26. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
27. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, i sur. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol Rev*. 2021;73(3):924–67.
28. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res*. 2007;100(2):158–73.
29. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:71–95.
30. Zhang M, Lin JM, Li XS, Li J. Quercetin ameliorates LPS-induced inflammation in human peripheral blood mononuclear cells by inhibition of the TLR2-NF- κ B pathway. *Genet Mol Res*. 2016; 15(2)
31. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):11324–49.
32. Prasad M, Leon M, Lerman LO, Lerman A. Viral Endothelial Dysfunction: A Unifying Mechanism for COVID-19. *Mayo Clin Proc*. 2021; 96(12):3099–108.
33. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(5):398–406.
34. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van De Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000; 130(5):963–74.
35. Sun L, Liu YL, Ye F, Xie JW, Zeng JW, Qin L, i sur. Free fatty acid-induced H₂O₂ activates TRPM2 to aggravate endothelial insulin resistance via Ca²⁺-dependent PERK/ATF4/TRB3 cascade in obese mice. *Free Radic Biol Med*. 2019;143:288–99.
36. Vassallo D V, Simões MR, Furieri LB, Fioresi M, Fiorim J, Almeida EAS, i sur. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):939–46.
37. Luu AZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Teoh H, Hess DA, Verma S. Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2018;3(6):861–70.

38. Harris RA, Padilla J, Hanlon KP, Rink LD, Wallace JP. The Flow-mediated Dilation Response to Acute Exercise in Overweight Active and Inactive Men. *Obesity*. 2008;16(3):578–84.
39. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis C, i sur. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*. 2021;9(7):781.
40. Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, Engels FH, Popma SH, Krasinskas AM, i sur. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: An alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med*. 2002;8(3):233–9.
41. Carman C V., Martinelli R. T Lymphocyte–Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Front Immunol*. 2015;6:603.
42. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621–34.
43. Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(18):2278–89.
44. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4(2):84–8.
45. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, i sur. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation*. 2004;110(4):399–404.
46. Hildebrandt GC, Chao N. Endothelial cell function and endothelial-related disorders following haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2020;190(4):508–19.
47. Ueda N, Chihara D, Kohno A, Tatekawa S, Ozeki K, Watamoto K, i sur. Predictive value of circulating angiopoietin-2 for endothelial damage-related complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(9):1335–40.
48. Hildebrandt GC, Chao N. Endothelial cell function and endothelial-related disorders following haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2020;190(4):508-519.

49. Tichelli A, Gratwohl A. Vascular endothelium as 'novel' target of graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(2):139–48.
50. Biedermann BC, Pober JS. Human vascular endothelial cells favor clonal expansion of unusual alloreactive CTL. *J Immunol*. 1999;162(12):7022-30.
51. Eissner G, Hartmann I, Kesikli A, Holler E, Haffner S, Sax T, i sur. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells enhance the allogeneic activity of endothelial-specific CD8+/CD28-CTL. *Int Immunol*. 2011;23(8):485–92.
52. Luft T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, i sur. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood*. 2011;118(6):1685–92.
53. Martinez-Sanchez J, Hamelmann H, Palomo M, Mir E, Moreno-Castaño AB, Torramade S, i sur. Acute Graft-vs.-Host Disease-Associated Endothelial Activation in vitro Is Prevented by Defibrotide. *Front Immunol*. 2019; 10:2339.
54. Cordes S, Mokhtari Z, Bartosova M, Mertlitz S, Riesner K, Shi Y i sur. Endothelial damage and dysfunction in acute graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2021;106(8):2147-2160.
55. García-Bernal D, Palomo M, Martínez CM, Millán-Rivero JE, García-Guillén AI, Blanquer M, i sur. Defibrotide inhibits donor leucocyte-endothelial interactions and protects against acute graft-versus-host disease. *J Cell Mol Med*. 2020;24(14):8031–44.
56. Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, Tsakiris DA, Jeanneret C, Pober JS, i sur. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *The Lancet*. 2002;359(9323):2078–83.
57. Medinger M, Tichelli A, Bucher C, Halter J, Dirnhofer S, Rovo A, i sur. GVHD after allogeneic haematopoietic SCT for AML: angiogenesis, vascular endothelial growth factor and VEGF receptor expression in the BM. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(5):715–21.
58. Haeusermann P, Kump E, Rovo A, Tichelli A, Itin P, Gratwohl A, i sur. Partial Reconstitution of Cutaneous Microvessels in Long-Term Survivors after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Dermatology*. 2009;219(1):32–41.
59. Fleming JN, Shulman HM, Nash RA, Johnson PY, Wight TN, Gown A, i sur. Cutaneous chronic graft-versus-host disease does not have the abnormal

- endothelial phenotype or vascular rarefaction characteristic of systemic sclerosis. *PLoS One*. 2009; 4(7).
60. Shimura K, Ashihara E, Shimazaki C, Matsunaga S, Taniguchi K, Uchiyama H, i sur. Circulating Endothelial Progenitor Cells Decreased in Patients with Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(4):426–37.
 61. Willemze AJ, Bakker AC, Von Dem Borne PA, Bajema IM, Vossen JM. The effect of graft-versus-host disease on skin endothelial and epithelial cell chimerism in stem-cell transplant recipients. *Transplantation*. 2009;87(7):1096–101.
 62. Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science*. 1995;270(5234):232–3.
 63. Syed ZA, Rapuano CJ. Rho kinase (ROCK) inhibitors in the management of corneal endothelial disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2021; 32(3):268–74.
 64. Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28(6):296–302.
 65. Beckman JD, DaSilva A, Aronovich E, Nguyen A, Nguyen J, Hargis G, i sur. JAK-STAT inhibition reduces endothelial prothrombotic activation and leukocyte–endothelial proadhesive interactions. *J Thromb Haemost*. 2023;21(5):1366–80.
 66. Lee DH, Hawk F, Seok K, Gliksman M, Emole J, Rhea IB, i sur. Association between ibrutinib treatment and hypertension. *Heart*. 2022;108(6):445–50.
 67. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(5):780–92.
 68. Pidala J, Kitko C, Lee SJ, Carpenter P, Cuvelier GDE, Holtan S, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IIb. The 2020 Preemptive Therapy Working Group Report. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(8):632–41.
 69. Kitko CL, Pidala J, Schoemans HM, Lawitschka A, Flowers ME, Cowen EW, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IIa. The 2020 Clinical

Implementation and Early Diagnosis Working Group Report. *Transplant Cell Ther.* 2021;27(7):545–57.

70. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.
71. Lelas A, Greinix HT, Wolff D, Eissner G, Pavletic SZ, Pulanic D. Von Willebrand Factor, Factor VIII, and Other Acute Phase Reactants as Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2021;12:1476.
72. Grkovic L, Baird K, Steinberg SM, Williams KM, Pulanic D, Cowen EW, i sur. Clinical laboratory markers of inflammation as determinants of chronic graft-versus-host disease activity and NIH global severity. *Leukemia.* 2012;26(4):633–43.
73. Penack O, Luft T. Editorial: Endothelial Dysfunction During Inflammation and Alloimmunity *Front Immunol.* 2018;9:2886.
74. Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, i sur. Differing impacts of pretransplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013;97(1):109–16.
75. Fuji S, Kim SW, Fukuda T, Mori SI, Yamasaki S, Morita-Hoshi Y, i sur. Preengraftment Serum C-Reactive Protein (CRP) Value May Predict Acute Graft-versus-Host Disease and Nonrelapse Mortality after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(5):510-7.
76. Ahmad I, Labbé AC, Chagnon M, Busque L, Cohen S, Kiss T, i sur. Incidence and Prognostic Value of Eosinophilia in Chronic Graft-versus-Host Disease after Nonmyeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1673–8.
77. Kim DH, Popradi G, Xu W, Gupta V, Kuruvilla J, Wright J, i sur. Peripheral Blood Eosinophilia Has a Favorable Prognostic Impact on Transplant Outcomes after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(4):471–82.
78. Mortensen KB, Gerds TA, Bjerrum OW, Lindmark A, Sengeløv H, Andersen CL. The prevalence and prognostic value of concomitant eosinophilia in chronic graft-

- versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2014;38(3):334–9.
79. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, i sur. Toward Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(2):126–37.
 80. Martires KJ, Baird K, Steinberg SM, Grkovic L, Joe GO, Williams KM, i sur. Sclerotic-type chronic GVHD of the skin: Clinical risk factors, laboratory markers, and burden of disease. *Blood.* 2011;118(15):4250–7.
 81. Bat T, Steinberg SM, Childs R, Calvo KR, Barrett AJ, Battiwalla M, i sur. Active thrombopoiesis is associated with worse severity and activity of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(12):1569–73.
 82. Pulanic D, Lozier JN, Pavletic SZ. Thrombocytopenia and hemostatic disorders in chronic graft versus host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(7):393–403.
 83. Moroga Y, Takata H, Yoshida N, Nagamatsu K, Nashimoto Y, Saburi M, i sur. [Hypofibrinogenemia associated with steroid therapy for the patients who developed GVHD after allogeneic stem cell transplantation]. *Rinsho Ketsueki.* 2015;56(7):883–8.
 84. McGuirk J, Hao G, Hou W, Abhyankar S, Williams C, Yan W, i sur. Serum proteomic profiling and haptoglobin polymorphisms in patients with GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 2009;2(1):17.
 85. Bozdog SC, Gunaltay S, Dalva K, Ozcan M. Follow-up of ADAMTS13 enzyme and its relationship with clinical events after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009;20(3):165-9.
 86. Biedermann BC, Tsakiris DA, Gregor M, Pober JS, Gratwohl A. Combining altered levels of effector transcripts in circulating T cells with a marker of endothelial injury is specific for active graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(11):1077–84.
 87. Wahlin A, Lorenz F, Fredriksson M, Remberger M, Wahlin BE, Hägglund H. Hyperferritinemia is associated with low incidence of graft versus host disease,

- high relapse rate, and impaired survival in patients with blood disorders receiving allogeneic hematopoietic stem cell grafts. *Med Oncol.* 2011;28(2):552-8.
88. Penack O, Peczynski C, van der Werf S, Finke J, Ganser A, Schoemans H, i sur. Association of Serum Ferritin Levels Before Start of Conditioning With Mortality After alloSCT – A Prospective, Non-interventional Study of the EBMT Transplant Complications Working Party. *Front Immunol.* 2020;11:519089.
 89. Fingrut W, Law A, Lam W, Michelis F V., Thyagu S, Viswabandya A, i sur. High Post-Transplant Ferritin Level Associates with Adverse Survival and Higher Mortality Rate following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant, whereas Pre-Transplant Ferritin Level Does Not. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):3454–3454.
 90. Milosevic E, Babic A, Iovino L, Markovic M, Grce M, Greinix H. Use of the NIH consensus criteria in cellular and soluble biomarker research in chronic graft-versus-host disease: A systematic review. *Front Immunol.* 2022;13:1033263.
 91. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ. Biologic markers of chronic graft vs. host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(3):324.
 92. Saliba RM, Sarantopoulos S, Kitko CL, Pawarode A, Goldstein SC, Magenau J, i sur. B-cell activating factor (BAFF) plasma level at the time of chronic GvHD diagnosis is a potential predictor of non-relapse mortality. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(7):1010–5.
 93. Ren HG, Adom D, Paczesny S. The search for drug-targetable diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in chronic graft-versus-host disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018;14(5):389–404.
 94. Yu J, Storer BE, Kushekhar K, Zaid MA, Zhang Q, Gafken PR, i sur. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol.* 2016; 34(22):2583–90.
 95. Pihusch R, Wegner H, Salat C, Pihusch M, Holler E, Kolb HJ, i sur. Flow cytometric findings in platelets of patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30(6):381–7.
 96. Aractingi S, Gluckman E, Goué C Le, Dubertret L, Carosella ED. Lymphocytes, cytokines and adhesion molecules in chronic graft versus host disease. *Clin Mol Pathol.* 1996;49(4):M225-31.

97. Matsuda Y, Hara J, Osugi Y, Tokimasa S, Fujisaki H, Takai K, i sur. Serum levels of soluble adhesion molecules in stem cell transplantation-related complications. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(9):977–82.
98. Schmidt K, Schwarzbich MA, Lehnert N, Rachakonda SP, Falk C, Ho AD, i sur. Prediction of Chronic Lung Graft-Versus-Host Disease By Angiopoietin-2. *Blood.* 2014;124(21):1175–1175.
99. Schwarzbich MA, Nicola L, Schmidt K, Falk C, Ho AD, Dreger P, i sur. High VEGF Serum Levels on Days +50 and +100 after Allogeneic Stem Cell Transplantation Predict Severe Chronic GvHD. *Blood.* 2014;124(21):1163–1163.
100. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1335-42.
101. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood.* 2016;128(16):2007–16.
102. Fay PJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol.* 2006;83(2):103–8.
103. Hassan MI, Saxena A, Ahmad F. Structure and function of von Willebrand factor: The protein that is deficient and/or abnormal in inherited von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(1):11-22.
104. Schillemans M, Karampini E, Kat M, Bierings R. Exocytosis of Weibel–Palade bodies: how to unpack a vascular emergency kit. *J Thromb Haemost.* 2019;17(1):6-18.
105. Arruda VR. The search for the origin of factor VIII synthesis and its impact on therapeutic strategies for hemophilia A. *Haematologica.* 2015;100(7):849–50.
106. Rumley A, Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell JWG, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Br J Haematol.* 1999;105(1):110–6.
107. Blann AD. von Willebrand factor antigen as an acute phase reactant and marker of endothelial cell injury in connective tissue diseases: A comparison with CRP, rheumatoid factor, and erythrocyte sedimentation rate. *Z Rheumatol.* 1991;50(5):320–32.
108. Steinert M, Ramming I, Bergmann S. Impact of Von Willebrand Factor on Bacterial Pathogenesis. *Front Med.* 2020;7:565911.

109. Sonneveld MAH, Franco OH, Ikram MA, Hofman A, Kavousi M, De Maat MPM, i sur. Von Willebrand Factor, ADAMTS13, and the Risk of Mortality: The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(12):2446–51.
110. Frankel DS, Meigs JB, Massaro JM, Wilson PWF, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, i ostali. Von Willebrand factor, type 2 diabetes mellitus, and risk of cardiovascular disease: The Framingham Offspring Study. *Circulation.* 2008;118(24):2533–9.
111. Ladikou EE, Sivaloganathan H, Milne KM, Arter WE, Ramasamy R, Saad R, i sur. Von Willebrand factor (vWF): marker of endothelial damage and thrombotic risk in COVID-19? *Clin Med.* 2020;20(5):e178–82.
112. Kayal S, Jaïs JP, Aguiñi N, Chaudière J, Labrousse J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3 PART I):776–84.
113. Nossent AY, Van Marion V, Van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM, Van Mourik JA, i sur. von Willebrand factor and its propeptide: The influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2556-62.
114. Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, O'Donnell JS. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2012;157(6):653-63
115. Cosmi B, Legnani C, Cini M, Favaretto E, Palareti G. D-dimer and factor VIII are independent risk factors for recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122(5):610–7.
116. Yang X, Sun HJ, Li ZR, Zhang H, Yang WJ, Ni B, i sur. Gastric cancer-associated enhancement of von Willebrand factor is regulated by vascular endothelial growth factor and related to disease severity. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–11.
117. Scheja A, Åkesson A, Geborek P, Wildt M, Wollheim CB, Wollheim FA, i sur. Von Willebrand factor propeptide as a marker of disease activity in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Res.* 2001;3(3):178–82.
118. Herrick AL, Illingworth K, Blann A, Hay CRM, Hollis S, Jayson MIV. Von Willebrand factor, thrombomodulin, thromboxane, β -thromboglobulin and markers of fibrinolysis in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1996.;55(2):1227.

119. Nossent JC, Raymond WD, Eilertsen GØ. Increased von Willebrand factor levels in patients with systemic lupus erythematosus reflect inflammation rather than increased propensity for platelet activation. *Lupus Sci Med.* 2016;3(1).
120. Gürol G, Ciftci IH, Harman H, Karakece E, Kamanli A, Tekeoglu I. Roles of claudin-5 and von Willebrand factor in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(2):1979–84.
121. James JP, Stevens TRJ, Hall ND, Maddison PJ, Goulding NJ, Silman A, i sur. Factor VIII related antigen in connective tissue disease patients and relatives. *Br J Rheumatol.* 1990;29(1):6-9.
122. D'Cruz D, Direskeneli H, Khamashta M, Hughes GRV. Lymphocyte activation markers and von Willebrand factor antigen in Wegener's granulomatosis: Potential markers for disease activity. *J Rheumatol.* 1999;26(1):103-9.
123. Alkaabi JK, Gravell D, Al-Haddabi H, Pathare A. Haemostatic Parameters in Patients with Behçet's Disease. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014;14(2):e190-6.
124. Lau CS, McLaren M, Belch JJF. Factor VIII von Willebrand factor antigen levels correlate with symptom severity in patients with Raynaud's phenomenon. *Br J Rheumatol.* 1991;30(6):433-6.
125. Rose PE, Kavi J, Chant I, Taylor CM, Struthers GS, Robertson M. Factor VIII von Willebrand protein in haemolytic uraemic syndrome and systemic vasculitides. *Lancet.* 1990 Mar 3;335(8688):500-2.
126. Go E, Aeschlimann FA, Lu H, Larry JR, Hebert D, Yeung RSM, i sur. Von Willebrand factor antigen as a marker of disease activity in childhood-onset antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2023:kead600.
127. Barnes T, Gliddon A, Doré CJ, Maddison P, Moots RJ. Baseline vWF factor predicts the development of elevated pulmonary artery pressure in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Sep;51(9):1606-9.
128. Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G, i sur. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost.* 1993;70(3):380–5.

129. Franchini M, Capra F, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: From biology to clinical implications. *Thromb J*. 2007;5(1):1–5.
130. Cohen RJ, Epstein SE, Cohen LS, Dennis LH. Alterations of fibrinolysis and blood coagulation induced by exercise, and the role of beta-adrenergic-receptor stimulation. *Lancet*. 1968;2(7581):1264–6.
131. Von Känel R. ACUTE MENTAL STRESS AND HEMOSTASIS: WHEN PHYSIOLOGY BECOMES VASCULAR HARM. *Thromb Res*. 2015;135(Suppl 1):S52-S55.
132. Prisco D, Fedi S, Brunelli T, Chiarugi L, Lombardi A, Gianni R, i sur. The influence of smoking on von Willebrand factor is already manifest in healthy adolescent females: The Floren-teen (Florence Teenager) Study. *Int J Clin Lab Res*. 1999;29(4):150–4.
133. Mitchell SA, Leidy NK, Mooney KH, Dudley WN, Beck SL, Lastayo PC, i sur. Determinants of functional performance in long-term survivors of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with chronic graft-versus-host disease (cGVHD). *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr;45(4):762-9.
134. Mohty M, Kuentz M, Michallet M, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, i sur. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood*. 2002;100(9):3128–34.
135. van Zaane B, Nur E, Squizzato A, Gerdes VE, Büller HR, Dekkers OM, i sur. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anti-coagulant and fibrinolytic factors. *J Thromb Haemost*. 2010;8(11):2483-93.
136. Flores C, Fouquet G, Moura IC, Maciel TT, Hermine O. Lessons to learn from low-dose cyclosporin-A: A new approach for unexpected clinical applications. *Front Immunol*. 2019;10(MAR):440642.
137. Holler E, Kolb H, Hiller E, Mraz W, Lehmacher W, Gleixner B, i sur. Microangiopathy in Patients on Cyclosporine Prophylaxis Who Developed Acute Graft-Versus-Host Disease After HLA-Identical Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1989;73(7):2018–24.
138. Rodrigues-Diez R, González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Rodrigues-Diez RR, Egido J, Ortiz A, i sur. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce

- vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Sci Rep*. 2016;6:27915.
139. Li A, Wu Q, Davis C, Kirtane KS, Pham PD, Sorrow ML, i sur. Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy Is a Multifactorial Disease Unresponsive to Immunosuppressant Withdrawal. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(3):570–6.
 140. Swystun LL, Lillicrap D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease. *J Thromb Haemost*. 2018;16(12):2375-2390.
 141. Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, Acute Phase Reactants. *StatPearls*. 2023.
 142. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti S V. Serum Ferritin: Past, Present and Future. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(8):760.
 143. Gupta GS. The Lactate and the Lactate Dehydrogenase in Inflammatory Diseases and Major Risk Factors in COVID-19 Patients. *Inflammation*. 2022 Dec;45(6):2091-2123.
 144. Yilmaz B, Köklü S, Yüksel O, Arslan S. Serum beta 2-microglobulin as a biomarker in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 21;20(31):10916-20.
 145. Staley EM, Cao W, Pham HP, Kim CH, Kocher NK, Zheng L, i sur. Clinical factors and biomarkers predict outcome in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2019;104(1):166.
 146. Cracowski JL, Roustit M. Human Skin Microcirculation. *Compr Physiol*. 2020;10(3):1105–54.
 147. Pelaez-Prestel HF, Sanchez-Trincado JL, Lafuente EM, Reche PA. Immune Tolerance in the Oral Mucosa. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
 148. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4(1):23–35.
 149. Song J, Chen F, Campos M, Bolgiano D, Houck K, Chambless LE, i sur. Quantitative Influence of ABO Blood Groups on Factor VIII and Its Ratio to von Willebrand Factor, Novel Observations from an ARIC Study of 11,673 Subjects. *PLoS One*. 2015;10(8).

150. Gebrane-Younès J, Drouet L, Caen JP, Orcel L. Heterogeneous distribution of Weibel-Palade bodies and von Willebrand factor along the porcine vascular tree. *Am J Pathol.* 1991;139(6):1471.
151. Umino K, Morita K, Ikeda T, Kawaguchi S ichiro, Nagayama T, Ito S, i sur. Antibody-mediated pathogenesis of chronic GVHD through DBY/HLA class II complexes and induction of a GVL effect. *Blood.* 2023;142(11):1008–21.
152. Holtzman NG, Pavletic SZ. W“H-Y” antigen/HLA complexes in chronic GVHD. *Blood.* 2023;142(11):946–8.
153. Martin PJ, Lee SJ, Przepiorka D, Horowitz MM, Koreth J, Vogelsang GB, i sur. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. The 2014 Clinical Trial Design Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(8):1343-59.

11. Biografija

Antonela Lelas (rođ. Samardžić) zvanje doktorice medicine stekla je diplomiravši na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine. Tijekom studija dobila je Dekanovu nagradu za najbolji znanstveni rad na temelju istraživanja kasnih komplikacija alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Nakon odrađenog staža zaposlila se kao znanstveni asistent na projektu „*Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja*“ koji je 2017.–2021. godine proveden na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste te godine upisala je poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom rada na projektu aktivno je sudjelovala i u međunarodnom projektu „EuroGraft“ Kooperacije za znanost i tehnologiju (COST) u sklopu kojeg je provela kratke znanstvene boravke na Sveučilišnoj klinici Regensburg u Njemačkoj i Dječjoj bolnici Sveta Ana u Beču, Austrija. Od 2020. zaposlena je kao specijalizant hematologije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb te je član Multidisciplinarnog tima za kronični GVHD KBC-a Zagreb. Autorica je 5 znanstvenih radova, više od 15 kongresnih priopćenja prikazanih na domaćim i međunarodnim kongresima, a s usmenim prezentacijama aktivno je sudjelovala i u nekoliko međunarodnih kongresa u čijem fokusu je bio kronični GvHD. Područje znanstvenog interesa su joj stanična terapija i njene komplikacije, od čega se osobito ističe kronični GvHD.

PRILOZI

Prilog 1. Formular za ocjenjivanje zahvaćenosti pojedinih organa u svrhu procjene težine cGvHD-a (8)

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: <input type="text"/> KPS ECOG LPS	<input type="checkbox"/> Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN† <input type="text"/> SCORE % BSA <u>GVHD features to be scored by BSA:</u>	<input type="checkbox"/> No BSA involved	<input type="checkbox"/> 1-18% BSA	<input type="checkbox"/> 19-50% BSA	<input type="checkbox"/> >50% BSA
Check all that apply: <input type="checkbox"/> Maculopapular rash/erythema <input type="checkbox"/> Lichen planus-like features <input type="checkbox"/> Sclerotic features <input type="checkbox"/> Papulosquamous lesions or ichthyosis <input type="checkbox"/> Keratosis pilaris-like GVHD				
SKIN FEATURES SCORE:	<input type="checkbox"/> No sclerotic features	<input type="checkbox"/> Superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)		Check all that apply: <input type="checkbox"/> Deep sclerotic features <input type="checkbox"/> "Hidebound" (unable to pinch) <input type="checkbox"/> Impaired mobility <input type="checkbox"/> Ulceration
<u>Other skin GVHD features (NOT scored by BSA)</u>				
Check all that apply: <input type="checkbox"/> Hyperpigmentation <input type="checkbox"/> Hypopigmentation <input type="checkbox"/> Poikiloderma <input type="checkbox"/> Severe or generalized pruritus <input type="checkbox"/> Hair involvement <input type="checkbox"/> Nail involvement <input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				
MOUTH <u>Lichen planus-like features present:</u>	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	<input type="checkbox"/> Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
EYES	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	<input type="checkbox"/> Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT new vision impairment due to KCS	<input type="checkbox"/> Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision due to KCS
<i>Keratoconjunctivitis sicca (KCS) confirmed by ophthalmologist:</i>				
<input type="checkbox"/> Yes				
<input type="checkbox"/> No				
<input type="checkbox"/> Not examined				

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

GI Tract	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Symptoms without significant weight loss* ($<5\%$)	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with mild to moderate weight loss* (5-15%) OR moderate diarrhea without significant interference with daily living	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with significant weight loss* $>15\%$, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation OR severe diarrhea with significant interference with daily living
Check all that apply:				
<input type="checkbox"/> Esophageal web/proximal stricture or ring				
<input type="checkbox"/> Dysphagia				
<input type="checkbox"/> Anorexia				
<input type="checkbox"/> Nausea				
<input type="checkbox"/> Vomiting				
<input type="checkbox"/> Diarrhea				
<input type="checkbox"/> Weight loss $\geq 5\%$ *				
<input type="checkbox"/> Failure to thrive				
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				

LIVER	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin and ALT or AP < 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin with ALT ≥ 3 to 5 x ULN or AP ≥ 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin but ≤ 3 mg/dL or ALT > 5 ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin > 3 mg/dL
--------------	---	---	---	---

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

LUNGS**

Symptom score:	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	<input type="checkbox"/> Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O_2)
-----------------------	--------------------------------------	---	---	--

Lung score:	<input type="checkbox"/> FEV1 $\geq 80\%$	<input type="checkbox"/> FEV1 60-79%	<input type="checkbox"/> FEV1 40-59%	<input type="checkbox"/> FEV1 $\leq 39\%$
% FEV1 <input type="text"/>				

Pulmonary function tests

Not performed

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
JOINTS AND FASCIA	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	<input type="checkbox"/> Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	<input type="checkbox"/> Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)
<u>P-ROM score</u> (see below)				
Shoulder (1-7):	___			
Elbow (1-7):	___			
Wrist/finger (1-7):	___			
Ankle (1-4):	___			
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				

GENITAL TRACT (See Supplemental figure [†])	<input type="checkbox"/> No signs	<input type="checkbox"/> Mild signs [†] and females with or without discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Moderate signs [†] and may have symptoms with discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Severe signs [†] with or without symptoms
<input type="checkbox"/> Not examined				
Currently sexually active				
<input type="checkbox"/> Yes				
<input type="checkbox"/> No				

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

Other indicators, clinical features or complications related to chronic GVHD (check all that apply and assign a score to severity (0-3) based on functional impact where applicable none – 0, mild -1, moderate -2, severe – 3)

- | | | |
|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> Ascites (serositis)___ | <input type="checkbox"/> Myasthenia Gravis___ | |
| <input type="checkbox"/> Pericardial Effusion___ | <input type="checkbox"/> Peripheral Neuropathy___ | <input type="checkbox"/> Eosinophilia > 500/ μ l___ |
| <input type="checkbox"/> Pleural Effusion(s)___ | <input type="checkbox"/> Polymyositis___ | <input type="checkbox"/> Platelets <100,000/ μ l___ |
| <input type="checkbox"/> Nephrotic syndrome___ | <input type="checkbox"/> Weight loss>5%* without GI symptoms___ | <input type="checkbox"/> Others (specify): |

Overall GVHD Severity
(Opinion of the evaluator) No GVHD Mild Moderate Severe

Photographic Range of Motion (P-ROM)

