

# Autoimunosne hemolitičke anemije

---

Salai, Grgur

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:062248>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Grgur Salai**

# **Autoimunosne hemolitičke anemije**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. prim. dr. sc. Dražena Pulanića, dr. med., znanstvenog savjetnika, i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## Popis kratica

**ADCC** - stanična citotoksičnost posredovana antitijelima (eng. *antibody-dependent cell cytotoxicity*)

**AIHA** – autoimunosna hemolitička anemija

**ANOVA** – analiza varijanci (eng. *analysis of variance*)

**BO** – bez odgovora na terapiju

**CA** – hladni aglutinini (eng. *cold agglutinins*)

**CAD** – bolest hladnih aglutinina (*cold agglutinin disease*)

**cAIHA** – hladna autoimunosna hemolitička anemija (eng. *cold autoimmune hemolytic anemia*)

**CAS** – sindrom hladnih aglutinina (eng. *cold agglutinin syndrome*)

**CI** – interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*)

**DAT** – direktni antiglobulinski test

**DAT-** – negativan direktni antiglobulinski test

**DAT+** – pozitivan direktni antiglobulinski test

**DIIHA** – lijekom uzrokovana autoimunosna hemolitička anemija (eng. *drug-induced immune hemolytic anemia*)

**HA** – hemolitička anemija

**Hb** – hemoglobin

**HR** – omjer rizika / hazarda (eng. *hazard ratio*)

**IAT** – indirektni antiglobulinski test

**Ig** – imunoglobulin

**IgA** – imunoglobulin klase A

**IgG** – imunoglobulin klase G

**IgM** – imunoglobulin klase M

**ITP** – imunosna trombocitopenija

**IVIg** – intravenski imunoglobulini

**KE** – koncentrat eritrocita

**KLL** – kronična limfocitna leukemija

**KR** – kompletna remisija

**mAIHA** – miješana autoimunosna hemolitička anemija (eng. *mixed autoimmune hemolytic anemia*)

**MCH** – prosječna količina hemoglobina (eng. *mean corpuscular hemoglobin*)

**MCHC** – prosječna koncentracija hemoglobina (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration*)

**MCV** – prosječan volumen eritrocita (eng. *mean corpuscular volume*)

**NPA** – neimunosna proteinska adsorpcija (eng. *non-immune protein adsorption*)

**PCH** – paroksizmalna hladna hemoglobinurija (eng. *paroxysmal cold hemoglobinuria*)

**PR** – parcijalna remisija

**Q1** – donja kvartila (25. percentila)

**Q3** – gornja kvartila (75. percentila)

**Re** – relaps bolesti

**RR** – relativni rizik (eng. *relative risk*)

**SD** – standardna devijacija

**VTE** – venska tromboembolija

**TMS** – transplantacija matičnih stanica

**wAIHA** – topla autoimunosna hemolitička anemija (eng. *warm autoimmune hemolytic anemia*)

## Sadržaj

Sažetak.....	i
Summary .....	ii
1. Uvod .....	1
2. Hipoteza.....	13
3. Ciljevi rada .....	14
4. Ispitanici i metode .....	15
5. Rezultati.....	22
5.1. Osnovne značajke bolesnika uključenih u istraživanje .....	23
5.2. Osnovne značajke liječenja AIHA-e .....	27
5.3. Godišni broj novih slučajeva .....	27
5.4. Smrtnost bolesnika tijekom razdoblja praćenja .....	28
5.5. Odgovor bolesnika na terapiju .....	32
5.6. Relaps bolesti.....	42
5.7. Pojava venskih tromboembolija .....	44
6. Rasprava .....	45
7. Zaključak.....	52
8. Zahvale .....	53
9. Literatura.....	54
10. Životopis .....	58

## Sažetak

### Autoimunosne hemolitičke anemije

Grgur Salai

*Uvod:* Autoimunosne hemolitičke anemije (AIHA) heterogena su skupina rijetkih bolesti koje se, ovisno o uzroku, mogu podijeliti na primarne ili sekundarne. Ovisno o vrsti podležećih protutijela, mogu se podijeliti na tople (wAIHA), hladne (cAIHA), miješane (mAIHA) ili paroksizmalnu hladnu hemoglobinuriju (PCH). *Cilj:* Ispitati kliničke karakteristike odraslih novooboljelih bolesnika s AIHA-om te identificirati čimbenike koji utječu na tijek bolesti. *Ispitanici i metode:* Unicentrična retrospektivna studija provedena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb uključila je sve punoljetne novooboljele osobe s AIHA-om koje su imale pozitivan antiglobulinski test (DAT+), u razdoblju od 1. siječnja 2014. do 30. lipnja 2020. Osobe su praćene od dijagnoze do zaključno 26. travnja 2021. Analiza preživljenja, postizanje kompletne remisije (KR) te relapsa bolesti (Re) provedene su uklapanjem u Coxov model proporcionalnih hazarda (kovarijance modela: koncentracija hemoglobina (Hb) pri dijagnozi (*osim pri analizi Re*), dob pri dijagnozi, spol, komorbiditeti (Charlsonin indeks komorbiditeta), etiološka i serološka klasifikacija te terapija rituksimabom). Za pojedine kovarijance izračunat je omjer hazarda (HR). Rezultati: U navedenom razdoblju bilo je 71 novooboljelih, od kojih je praćenje u vremenu bilo moguće za njih 64; 51% novooboljelih bile su žene, a najčešći tipovi AIHA-e bili su sekundarna (83%) i wAIHA (73%). Većina bolesnika primala je kortikosteroidnu terapiju kao prvu liniju liječenja; rituksimab je primilo 22 (34%) bolesnika, u 13 (59%) bolesnika primijenjen u sklopu prve linije terapije (zajedno s kortikosteroidima). Medijan razdoblja praćenja iznosio je 2,11 (0,60 – 3,49) godina. Stopa smrtnosti iznosila je 19,1 na 100 osoba godina; a značajan utjecaj na smrtnost imali su dob (HR 1,047 (95% CI: 1,02-1,08),  $p=0,001$ ), komorbiditeti (HR 1,28 (95% CI: 1,05-1,55),  $p=0,013$ ) te mAIHA vs. wAIHA (HR 0,19 (95% CI: 0 – 0,68),  $p=0,011$ ). Stopa incidencije KR iznosila je 9,2 na 10 osoba-godina, a značajan utjecaj na KR imali su ženski spol (HR 2,27 (95% CI: 1,01-4,92),  $p=0,037$ ) i sekundarna AIHA (HR 0,34 (95% CI: 0-0,95),  $p=0,039$ ). Stopa incidencije relapsa nakon postignute KR iznosila je 1,4 na 10 osoba-godina, a značajan utjecaj na relaps imali su mAIHA vs. wAIHA (HR 181,7 (95% CI:  $3-11 \times 10^3$ ),  $p=0,038$ ) te dob (HR 0,34 (95% CI: 0-0,96),  $p=0,04$ ). *Zaključak:* Provedeno istraživanje prikazalo je kliničke karakteristike bolesnika AIHA-om te je kvantificiralo stopu smrtnosti i stope incidencije kompletne remisije i relapsa bolesti, a ujedno je identificiralo čimbenike koje utječu na pojedini promatrani ishod.

**Ključne riječi:** autoimunosna hemolitička anemija, retrospektivna kohortna studija, rituksimab

## Summary

### Autoimmune Hemolytic Anemias

Grgur Salai

*Introduction:* Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a heterogeneous group of rare disorders which, depending upon the underlying etiology, can be classified as primary or secondary. Depending upon the underlying type of autoantibodies, AIHAs can be classified as warm (wAIHA), cold (cAIHA), mixed (mAIHA) or as paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH). *Aim:* To investigate the clinical characteristics of adult patients with AIHA and to identify factors that influence the course of disease. *Participants and methods:* Non-concurrent unicentric cohort study was performed at the University Hospital Centre Zagreb, which included all adult patients with newly diagnosed AIHA which had a positive direct antiglobulin test (DAT+), in the period from 1 January 2014 to 30 June 2020. All participants were followed until death or until censored, with the end of the follow-up period on 26 April 2021. Survival, complete remission (CR) and disease relapse (Re) were analyzed by fitting the Cox proportional hazards model (covariates: hemoglobin (Hb) concentration at diagnosis (*except for Re analysis*), age at diagnosis, sex, Charlson comorbidity index, etiological and serological classification, as well as rituximab therapy). Hazard ratio (HR) was calculated for each covariate. *Results:* During the mentioned time period, 71 DAT+ AIHA patients were newly diagnosed. Follow-up was possible for 64 of them. 51% of newly diagnosed patients were women, and the most common types were secondary (83%) and wAIHA (73%). Most patients received corticosteroids as first line therapy; 34% received rituximab therapy, in 59% of whom it was applied as first line. Median time of follow up was 2,11 (0,60 – 3,49) years. Mortality rate was 19.1 per 100 person-years; significant factors for mortality were age (HR 1,047 (95% CI: 1.0-1.1), p=0.001), comorbidities (HR 1.28 (95% CI: 1.1-1.6), p=0.013) and mAIHA vs. wAIHA (HR 0,19 (95% CI: 0 – 0.7), p=0.011). The incidence rate for CR was 9.2 per 10 person-years; significant factors for CR were female sex (HR 2.27 (95% CI: 1.01-4.9), p=0.037) and secondary AIHA (HR 0.34 (95% CI: 0-0.95), p=0.039). The relapse rate (after CR was achieved) was 1.4 per 10 person-years; significant factors for relapse were mAIHA vs. wAIHA (HR za mAIHA 181.7 (95% CI: 3-11×10<sup>3</sup>), p=0.038) and age (HR 0.34 (95% CI: 0-0.96), p=0.04). *Conclusion:* This study presented the clinical characteristics of DAT+ AIHA patients and quantified mortality rate and incidence rates for complete remission and relapse, as well as identified factors that significantly impact each of the observed outcomes.

**Keywords:** autoimmune hemolytic anemia, non-concurrent cohort study, rituximab

# 1. Uvod

## 1.1. Anemija

Anemija je stanje smanjene oksifornosti krvi, što označava smanjenu sposobnost prenošenja kisika (1). Klinički primjenjivija definicija, prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozu i klasifikaciju anemije, definira anemiju u odraslih kao stanje smanjene koncentracije hemoglobina (Hb) u krvi nižu od 130 g/L za muškarce, 120 g/L za žene koje nisu trudne te 110 g/L za trudnice (2). U muškaraca te žena koje nisu trudne, vrijednosti Hb iznad 110 g/L, a ispod donje referentne vrijednosti predstavljaju blagu anemiju; raspon Hb 80 – 110 g/L predstavlja umjerenu, a vrijednosti manje od 80 g/L odgovaraju teškoj anemiji (2).

Anemije su vrlo česte bolesti: prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije koje su provedene između 1993. i 2005. godine, četvrtina populacije svjetskog stanovništva bila je anemična (3), a najčešći oblik anemije je anemija zbog manjka željeza od koje boluje polovina anemičnih osoba (4,5).

Bolesnik s anemijom može se prezentirati anemijskim sindromom, koji uključuje osjećaj slabosti, umor, dispneju, gubitak svijesti, palpitacije, glavobolju, tinitus, anoreksiju te, ukoliko postoji predisponirajuća koronarna bolest, *anginu pectoris*. Klinički znakovi anemije uključuju bljedoću kože i sluznica, tahikardiju, sistolički šum zbog povećanog protoka, a ponekad i promjene u EKG-u (6). Navedeni simptomi i znakovi posljedica su promjena brojnih organskih sustava, a nastaju kao posljedica hipoksije tkiva ili pak uslijed kompenzacijskih napora ublažavanja hipoksije (1). Glavni kompenzacijski mehanizmi anemije uključuju smanjenje afiniteta hemoglobina za vezanje kisika (tzv. pomak disocijacijske krivulje oksihemoglobina udesno), preraspodjelu krvnog optjecaja, povećanje srčanog minutnog volumena te aktivaciju eritropoetinskog mehanizma (1).



Anemija je heterogena skupina poremećaja koji se didaktički, obzirom na etiopatogenezu, mogu podijeliti na četiri glavne skupine: a) anemije zbog poremećaja u stvaranju i sazrijevanju eritrocita; b) anemije uslijed poremećaja u sintezi i građi hemoglobina; c) anemije uslijed povećane razgradnje eritrocita (hemolitičke anemije); d) anemije zbog gubitka krvi (1). U kliničkom je radu vrlo važna morfološka podjela anemija obzirom na prosječni stanični volumen (MCV, eng. *mean corpuscular volume*) te obzirom na vrijednosti prosječnog staničnog hemoglobina (MCH, eng. *mean corpuscular hemoglobin*) i prosječne stanične koncentracije hemoglobina (MCHC, eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration*). Obzirom na vrijednosti MCV-a, anemije se mogu podijeliti na mikrocitne, normocitne te makrocitne; a obzirom na MCH i MCHC na hipokromne, normokromne te hiperkromne (1,5–8).

## 1.2. Hemolitičke anemije

Hemolitičke anemije (HA) nastaju zbog povećane razgradnje eritrocita, a u ovoj skupini anemija, životni vijek eritrocita je smanjen (1,9). Etiološki se mogu podijeliti u dvije velike skupine: korpuskularne (nastaju zbog metaboličkog poremećaja u eritrocitima ili poremećaja na razini stanične membrane) te ekstrakorpuskularne (poremećaj nije na razini eritrocita) (1), a prema lokalizaciji hemolize mogu se podijeliti na intravaskularne te ekstravaskularne (hemoliza primarno u slezeni) (1,9).

Klinički se HA, uz anemijski sindrom, može prezentirati i žuticom, hepatosplenomegalijom, kolelitijazom (bilirubinom-bogati pigmentirani žučni kamenci) te ulkusima donjih udova (6,10). Ovisno o tome nastaje li postupno ili iznenada, klinička prezentacija (kao i kod ostalih anemija) može biti raznolika: od latentne do vrlo teške kada može predstavljati hitno stanje (4).

MCV je u HA obično unutar referentnog raspona ili povećan. Laboratorijski znakovi hemolize uključuju povišene koncentracije nekonjugiranog (a posljedično i ukupnog) bilirubina u

plazmi, povišenu koncentraciju urobilinogena u urinu i stolici te povišenu koncentraciju laktat dehidrogenaze (LDH) u plazmi koji upućuju na povećanu razgradnju eritrocita te retikulocitozu (uz posljedično povećanje MCV-a zbog veličine retikulocita) i polikromaziju eritrocita koji upućuju na povećanu proizvodnju eritrocita kao kompenzacijski mehanizam (4,6). Laboratorijski znaci koji upućuju na intravaskularnu hemolizu uključuju snižene razine haptoglobina te povišene koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi, methemalbuminemiju, hemoglobinuriju i hemosiderinuriju. Ekstravaskularna hemoliza može se prezentirati splenomegalijom i hipersplenizmom (4,6,9).

### 1.3. Autoimunosne hemolitičke anemije

Autoimunosne hemolitičke anemije (AIHA) su heterogena skupina rijetkih poremećaja čija je zajednička značajka hemoliza eritrocita posredovana autoantitijelima usmjerenih protiv eritrocitnih antigena (4,11).

Prema etiologiji mogu se podijeliti na primarne i sekundarne, tj. one koje nastaju uslijed identificiranog podležećeg uzroka (npr. limfoproliferativni poremećaj, druga autoimunosna bolest, infekcija ili lijekom-uzrokovana AIHA (DIIHA, eng. *drug-induced immune hemolytic anemia*)) (11).

Patogeneza AIHA-e nije do kraja razjašnjena, a poznato je da, kao i kod ostalih autoimunosnih poremećaja postoji interakcija genetske podloge te pojave *sloma imunotolerancije* (12). Kompleksni mehanizmi uključeni u patogenezu su molekularna mimikrija, disregulacija obrade antigena te disfunkcija limfocita. Molekularna mimikrija podrazumijeva nastanak križne reaktivnosti između antigena eritrocita te egzogenih antigena, npr. kod infekcija ili DIIHA-e (12,13). Uzročnici infekcija koje se karakteristično u literaturi povezuju s AIHA-om uključuju *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponemu pallidum*, virus humane imunodeficijencije, parvovirus B19 i hepatotropne viruse (4,11,12). Lijekovi za koje se smatra da induciraju nastanak autoimunosne hemolize to dominantno čine posredstvom jednim od tri glavna mehanizma: promjenom antigena membrane eritrocita (npr. alfa-metildopa), haptelizacijom (npr. penicilin) te neimunskom proteinskom adsorpcijom (NPA) (npr. prva generacija cefalosporina). NPA dovodi do strukturalnih promjena eritrocitne membrane što posljedično uzrokuje neimunološki-posredovano vezivanje proteina, uključujući i IgG imunoglobuline, što može dovesti do opsonizacije i uništavanja eritrocita mehanizmima stanične citotoksičnosti posredovane antitijelima (ADCC, eng. *antibody-dependent cell cytotoxicity*) (12,13).

Ključan test prilikom dijagnoze AIHA-e je direktni antiglobulinski test (DAT), poznat kao i Coombsov test. DAT se provodi dodavanjem polispecifičnih antiglobulinskih antitijela opranog

resuspendiranoj krvi ispitanika. Pojava aglutinacije eritrocita nakon centrifugiranja označava pozitivan test. Jakost reakcije može se stupnjevati između 0 (negativna) do 3+ (13). DAT test identificira prisutnost autoantitijela na membrani eritrocita (12). Pozitivan DAT (DAT+) nije dovoljan kriterij za dijagnozu AIHA-e: naime, 0.1% darivatelja krvi te 0,3 – 8% hospitalnih bolesnika je DAT+. Otprilike 95% bolesnika s AIHA-om ima DAT+, a ostalih ~5% čini zasebnu serološku skupinu DAT negativnih (DAT-) AIHA (13). DAT+ AIHA-e mogu se, prema tipologiji protutijela podijeliti na tople, hladne te miješane (11,13), a poseban, rijedak oblik AIHA-e je paroksizmalna hladna hemoglobinurija koja se dijagnosticira u prisustvu hemolize te Donath-Landsteinerovih antitijela (11).

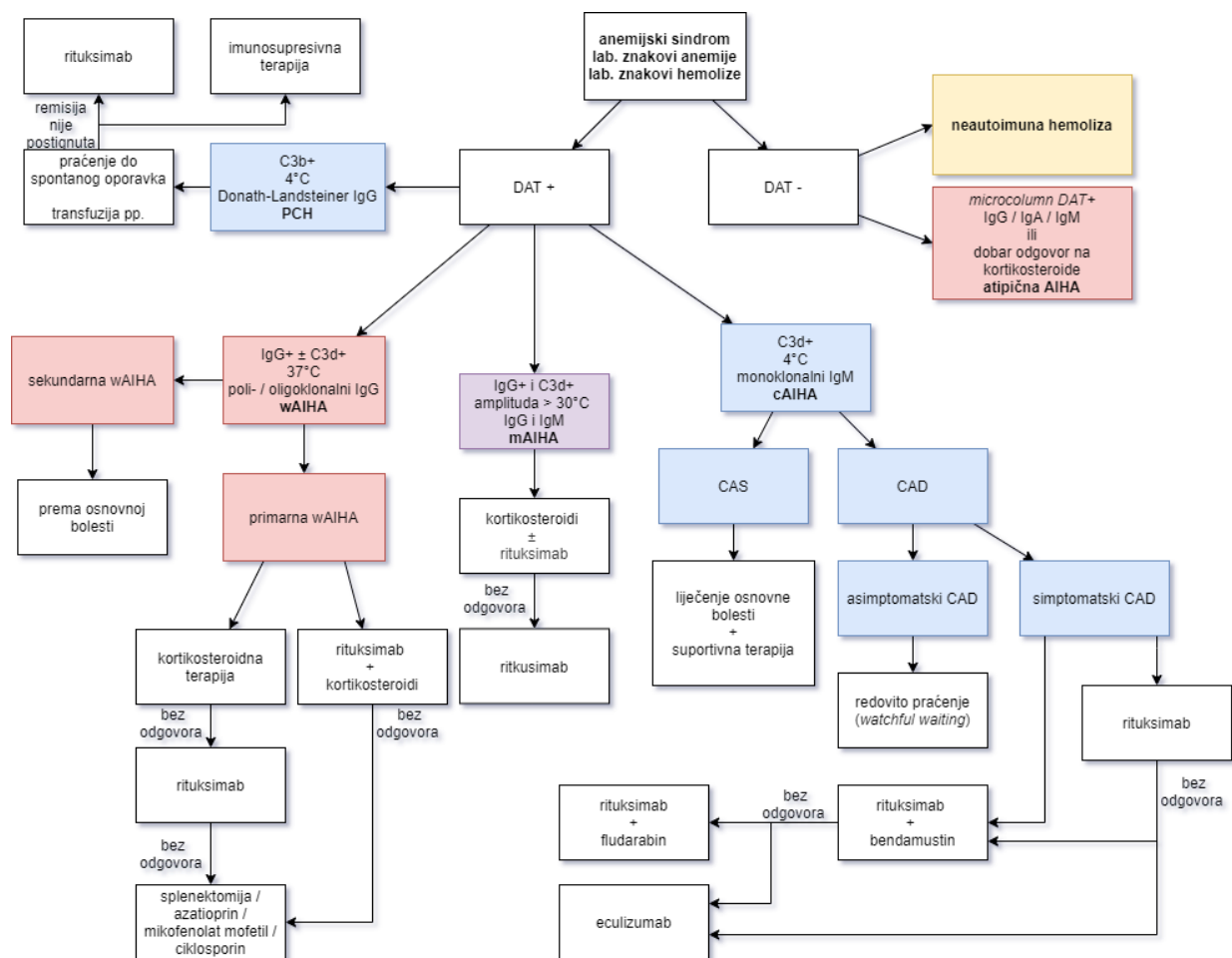
Indirektni antiglobulinski test (IAT), poznat i kao indirektni Coombsov test je laboratorijski postupak koji otkriva postojanje antitijela usmjerenih protiv antigena na membrani eritrocita. Provodi se inkubiranjem seruma ispitanika na testnom panelu standardiziranih eritrocita kako bi se antitijela usmjerena protiv eritrocita, ukoliko postoje, mogla vezati. Nakon ispiranja nevezanih antitijela, uzorku se dodaju polispecifična antiglobulinska antitijela koja u slučaju pozitivnog testa uzrokuju aglutinaciju eritrocita (11).

Načela terapije ukratko su prema serološkim podtipovima opisana u daljnjem tekstu, a baziraju se na Preporukama za dijagnostiku i terapiju utvrđenim na Prvom međunarodnom konsenzusu za AIHA-u, a najvažniji terapijski modaliteti sažeto su shematski prikazani na Slici 1. (11).

Bolesnici s AIHA-om pod povećanim su rizikom od nastanka venskih tromboembolija (VTE) - potrebu za tromboprolifaksom treba razmotriti uzimajući u obzir karakteristike i komorbiditete pojedinog bolesnika (11). Osim VTE, infekcije i AIHA-e također su međusobno povezane: infekcije mogu biti okidači hemolitičkih kriza, a imunosupresivna terapija povećava mogućnost infekcije (11). Osim navedenih stanja, bolesnici s AIHA-om su pod povećanim rizikom

i od nastanka gastrointestinalnog krvarenja, osteoporoze uzrokovane kortikosteroidnom terapijom te pomanjkanja tvari nužnih za produkciju eritrocita (željezo, vitamin B12 i folna kiselina) (11).

Akutna AIHA, u sklopu hemolitičke krize, može biti hitno stanje (4). Transfuzija koncentrata eritrocita (KE) je, ukoliko se isključi prisutnost aloantitijela, sigurna u bolesnika s AIHA-om uz adekvatnu premedikaciju kortikosteroidima (najčešće metilprednizolon) i optimalan odabir pripravka eritrocita; racional primjene takvih KE je da se transfundirani eritrociti neće uništavati ni više ni manje nego endogeni eritrociti, no povećani će „priljev“ eritrocita omogućiti bolesniku preživljenje (4,11).



**Slika 1.** Shematski prikaz najvažnijih modaliteta terapije u liječenju autoimunskih hemolitičkih anemija (AIHA) prema serološkom podtipu. Serološki tipovi su podebljani, a iznad njih su, odozgor redom, navedeni: antigeni protiv kojih su pripadajuća autoantitijela usmjerena, optimum temperature in vitro za vezanje antigen-antitijelo te podvrsta autoantitijela. *DAT* – direktni antiglobulinski test; *cAIHA* – hladna AIHA; *mAIHA* – miješana AIHA; *wAIHA* – topla AIHA; *PCH* – paroksizmalna hladna hemoglobinurija; *CAD* – bolest hladnih aglutinina, *CAS* – sindrom hladnih aglutinina.

## Topla AIHA

Topla AIHA (wAIHA, eng. *warm autoimmune hemolytic anemia*) je prema literaturi najčešći serološki tip; najčešće se odnosi na AIHA-u uzrokovanu IgG autoprotutijelima uz optimalnu reakciju aglutinacije pri temperaturi od 37°C, a autoprotutijela su većinom usmjerena na *Rh* ili glikoforinski antigenski sustav (12,13). Monomerni IgG slabo fiksiraju komplement pa je klasična aktivacija komplementa rijetkost (13), a eritrociti se uništavaju ADCC mehanizmima te fagocitiraju monocitno-makrofagnim sustavom posredstvom prepoznavanja *Fc* receptorima, to se ponajprije događa ekstravaskularno – najviše u slezeni, ali i u jetri i koštanoj srži (11–13).

Prva linija terapije za bolesnike koji imaju simptomatsku primarnu wAIHA-u najčešće je kortikosteroidna terapija (npr. prednizolon 1 mg/kg/dan kroz 2-3 tjedna ili ekvivalent metilprednizolona, nakon čega uslijedi postupna redukcija doze) (11). Rituksimab (*anti-CD20* monoklono protitijelo) u kombinaciji s kortikosteroidima također je opcija za prvu liniju terapije: wAIHA nije registrirana indikacija za primjenu rituksimaba, no tzv. *off-label* primjena rituksimaba u kombinaciji s prednizolonom kroz četiri tjedna je u usporedbi s isključivo prednizolonom pokazala veću stopu oporavka godinu dana nakon terapije u dvije dvostruko slijepe randomizirane studije (11,14,15). No, ove studije nisu imale dovoljnu snagu niti dovoljno dug period praćenja bolesnika kako bi ispitale pridonosi li kombinacija rituksimaba i kortikosteroida dugotrajnoj remisiji i smanjenoj potrebi drugih terapijskih opcija (11). Druga linija terapije najčešće je rituksimab, a opcije u sklopu treće linije terapije uključuju splenektomiju ili neke druge oblike oralne imunosupresije (npr. azatioprin, ciklosporin ili mikofenolat mofetil) (11,16,17). Sljedeće terapijske opcije uključuju primjenu ciklofosfamida, danazola, bortezomiba, ali i eventualnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (TMS) (11). U hitnim stanjima, u slučaju kad transfuzija KE nije dostatna za održavanje zadovoljavajuće razine hemoglobina, mogu se primijeniti intravenski imunoglobulini (IVIg) zajedno s intravenskim metilprednizolonom, eritropoetin, a u obzir dolaze i postupci kao što su plazmafereza i hitna splenektomija (11,16,17).

Sekundarna wAIHA najčešće nastaje uslijed hematoloških poremećaja i limfoproliferativnih bolesti, autoimunskih i upalnih stanja, infekcija, solidnih tumora ili kao nuspojava lijekova (11), a u odraslih je, prema literaturi, oko 50% wAIHA sekundarno (11). U bolesnika koji imaju kroničnu limfocitnu leukemiju (KLL) te su u A stadiju bolesti ili u kojih je wAIHA predominantna prezentacija, mogu se zbrinuti kao primarne wAIHA-e: kortikosteroidi kao prva, a rituksimab kao druga linija terapije (11). Bolesnici koji ne odgovaraju na navedenu terapiju ili imaju aktivan KLL trebaju se liječiti terapijom ciljanom prema KLL-u (11). Ne postoje specifične smjernice za terapiju bolesnika kojima je podležuća bolest sistemski eritematozni lupus (SLE, eng. *systemic lupus erythematosus*), no većina bolesnika postigne dobar inicijalni odgovor primjenom kortikosteroida (11).

## **Hladna AIHA**

Hladna AIHA (cAIHA, eng. *cold autoimmune hemolytic anemia*) najčešće je posredovana mono- ili oligoklonalnim IgM pentamerima koji su usmjereni protiv polisaharidnih antigena na membranama eritrocita, a optimalna reakcija aglutinacije *in vitro* događa se pri temperaturama 0-4°C (13,18); takva se antitijela nazivaju hladnim aglutininima (CA, eng. *cold agglutinins*). Prema etiopatogenezi, cAIHA se može podijeliti na bolest hladnih aglutinina (CAD, eng. *cold agglutinin disease*) te na sindrom hladnih aglutinina (CAS, eng. *cold agglutinin syndrome*). CAD označava primarnu cAIHA-u, odnosno klonalni limfoproliferativni poremećaj, a CAS se odnosi na klinički entitet koji nalikuje CAD-u, no prisutna je podležuća bolest (npr. postojanje autoimunosne bolesti, limfoma ili drugog malignoma te infekcija (karakteristični uzročnici su *Mycoplasma pneumoniae* te Ebstein-Barrov virus)) (18,19).

Bolesnici s cAIHA-om najčešće imaju blagu do umjereno tešku anemiju. Egzacerbacije se javljaju prilikom izloženosti hladnoj temperaturi, a mogu biti potaknute infekcijama, cjepivima,



velikim operativnim zahvatima ili traumom (11,18). Bolesnici mogu imati akrocijanozu ili Raynaudov fenomen koji se obično aktivno ne liječe, već se preporuča izbjegavanje hladnoće; također je potrebno izbjegavati primjenu hladnih transfuzija te se pobrinuti da hospitalizirani bolesnici budu adekvatno utopljeni (18).

CAD bez prisutnosti simptoma ne zahtjeva aktivno liječenje, već redovito praćenje bolesnika. Nužna je rana primjena antibiotika u slučaju sumnje na bakterijsku infekciju kako bi se izbjegao nastanak hemolitičke krize (11). U slučaju akutnih egzacerbacija ili u slučaju rizičnih situacija (npr. dugotrajni letovi) preporuča se primijenjivati tromboprolifilaksu (11). U slučaju postojanja simptoma, najčešće se primjenjuje rituksimab u četiri doze kroz četiri tjedna (11). Nordijskom multicentričnom nerandomiziranom prospektivnom studijom uočeno je da rituksimab u kombinaciji s bendamustinom dovodi do većeg udjela kompletnih remisija u usporedbi s monoterapijom rituksimabom (20). Terapijski izbor u prvoj liniji liječenja treba biti individualiziran s obzirom na karakteristike i komorbiditete bolesnika (11). Opcije u sklopu druga linije terapije uključuju kombinaciju rituksimaba i bendamustina (ukoliko ta opcija nije primijenjena u prvoj liniji), kombinaciju rituksimaba i fludarabina te terapiju bortezomibom (11). Terapija u životnougrožavajućim hemolitičkim krizama uključuje primjenu transfuzija ugrianih koncentrata eritrocita (KE) te primjenu eculizumaba (*anti-C5* monoklonalno antitijelo) kako bi se zaustavio kaskadni niz aktivacije komplementa i time spriječila intravaskularna hemoliza (11); druge mogućnosti uključuju kortikosteroide u visokim dozama,IVIg te plazmaferezu (11). Terapija za CAS uključuje liječenje osnovne bolesti, a ostale terapijske mogućnosti su slabo istražene i ispitane (11). Splenektomija se nije pokazala kao dobra terapijska opcija za bolesnike s cAIHA-om(11).

## **Miješana AIHA**

Miješana AIHA (mAIHA, eng. *mixed autoimmune hemolytic anemia*) odnosi se na pojavu kad su u bolesnika identificirana topla i hladna autoprotutijela (13). Dijagnoza mAIHA-e postavlja se kad je prisutan DAT+ za C3d komponentu komplementa ili za IgG, hladno antitijelo termalne amplitude >30°C te IAT+ toplo IgG protutijelo (11). Smatra se kako je primarni uzročnik hemolize najčešće topla komponenta (13), a simptomi karakteristični za CA kao što su Raynaudov fenomen i akrocijanoza rijetko se pojavljuju (21). Terapija najčešće uključuje kortikosteroide kao monoterapiju ili u kombinaciji s rituksimabom (11).

## **Paroksizmalna hladna hemoglobinurija**

Paroksizmalna hladna hemoglobinurija (PCH, eng. *paroxysmal cold hemoglobinuria*) je rijedak oblik AIHA-e za koju je karakteristična produkcija hladnih IgG antitijela, usmjerenih najčešće protiv polisaharidnih P antigena eritrocitne membrane (Donath-Landsteinerova antitijela), a dijagnosticira se Donath-Landsteinerovim testom (11,13,19). Većina bolesnika koji boluju od PCH su djeca, a u odraslih je ova vrsta AIHA-e rijetka; najčešće je prisutna umjereno teška do teška anemija uz hemoglobinuriju, a simptomi najčešće počinju nakon izloženosti hladnim temperaturama (13). U odraslih je PCH najčešće u sklopu podležeće autoimunosne ili limfoproliferativne bolesti (13). PCH je najčešće samoograničavajućeg karaktera, a oporavak je spontan (11,13). U slučajevima teške anemije indicirana je transfuzija (ugrijanim) KE; u kroničnim ili refrakternim slučajevima, koristi se terapija imunosupresivima ili rituksimabom (11)

## **DAT negativna AIHA**

DAT negativne AIHA-e najčešće u podlozi imaju topla IgG, IgA ili IgM antitijela niskog afiniteta što rezultira negativnim DAT-om. Otprilike 5% AIHA je DAT-, a dijagnozu je moguće postaviti posebnim mikrohemaglutinacijskim DAT-om (eng. *microcolumn DAT*). Uočeno je kako bolesnici s ovim podtipom AIHA-e imaju teži klinički tijek i lošije preživljenje. *DAT- AIHAe nisu uvrštene u ovo istraživanje.*

## **Evansov sindrom**

Evansov sindrom je rijetka autoimunosna bolest koju karakterizira prisutnost DAT+ AIHA-e te imunosne trombocitopenije (ITP) (22): ova se dva poremećaja mogu javiti odjednom, a moguće su i situacije kad jedan prethodi drugome (23). Prava incidencija Evansovog sindroma nije poznata, no poznato je da se, prema kohortnim studijama, javlja u 40-70% bolesnika s AIHA-om (22). Ponekad, uz ITP i AIHA-u može biti prisutna i autoimunosna neutropenija (23), što se javlja u oko 15% bolesnika s ovim sindromom. Terapija se obično zasniva na terapijskim opcijama za pojedinačni poremećaj pa najčešće može uključivati primjenu kortikosteroida, rituksimaba, splenektomiju te potpuno liječenje (23).

## **2. Hipoteza**

Hipoteza ovog rada je da su serološka klasifikacija AIHA-e te terapija rituksimabom čimbenici koji značajno utječu na tijek bolesti autoimunosne hemolitičke anemije što će doprinijeti razumijevanju AIHA-e te potencijalno doprinijeti promjeni u načinu liječenja bolesnika s AIHA-om.

### **3. Ciljevi rada**

Cilj ovog rada je ispitati kliničke karakteristike odraslih bolesnika s AIHA-om te identificirati čimbenike koji utječu na tijek bolesti prateći ispitanike kroz vrijeme.

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

1. Opisati kliničke karakteristike bolesnika s AIHA-om
2. Odrediti stopu smrtnosti te identificirati čimbenike koji utječu na smrtnost
3. Odrediti stopu postizanja kompletne remisije bolesti te identificirati čimbenike koji utječu na postizanje remisije
4. Odrediti stopu relapsa bolesti nakon postignute kompletne remisije te identificirati čimbenike koji utječu na relaps bolesti.

## 4. Ispitanici i metode

### 4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (KBC Zagreb), koji je tercijarni centar, a ujedno i najveća bolnica u Republici Hrvatskoj. U ovo unicentrično retrospektivno kohortno istraživanje uključeni su punoljetni bolesnici s novodijagnosticiranom AIHA-om u razdoblju od 1. siječnja 2014. do 31. lipnja 2020., dijagnosticirani u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju kojima je učinjen DAT test koji je bio pozitivan, i koji su u trenutku provođenja DAT-a imali laboratorijske znakove hemolitičke anemije (Slika 2). Ispitanici su praćeni u unaprijed određenim vremenskim točkama od uključivanja u istraživanje do 26. travnja 2021. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog KBC-a Zagreb (8.1-18/227-2; 8.1-19/1-2). Skrb bolesnika provedena je na Klinici za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb (većinom na Zavodu za hematologiju, a u nekih bolesnika na Zavodu za kliničku imunologiju i reumatologiju te Zavodu za intenzivnu medicinu).

Uključni kriteriji:

1. DAT+ učinjen u razdoblju od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2020.
2. Koncentracija Hb<130 g/L u muškaraca, Hb<120 g/L u žena
3. Laboratorijski znakovi hemolize (povišene koncentracije bilirubina, LDH i/ili retikulocita, snižena koncentracija haptoglobina) u trenutku DAT-a

Isključni kriteriji:

1. Bolesnici mlađi od 18 godina u trenutku postavljanja dijagnoze
2. Bolesnici kojima je postavljena dijagnoza druge vrste hemolitičke anemije

3. Bolesnici kojima je prije 1. siječnja 2014. postavljena dijagnoza autoimunosne hemolitičke anemije

Vremenske točke istraživanja uključivale su: dan uključivanja u istraživanje; razdoblje hospitalizacije pri dijagnozi (ukoliko je bila potrebna); 2. i 4. tjedan od uključivanja u istraživanje; 2., 3., 6., 12. i 18. mjesec od uključivanja u istraživanje; 2., 3., 4. i 5. godinu od uključivanja u istraživanje; zadnji dostupan podatak o bolesniku u dostupnoj medicinskoj dokumentaciji te provjeru je li ispitanik doživio smrtni ishod na dan 26. travnja 2021.

Praćeni klinički ishodi bolesti bili su kompletna remisija, parcijalna remisija, refrakтерна bolest, relaps bolesti te smrtni ishod (smrt zbog svih uzroka, eng. *all-cause mortality*), a za potrebe ovog istraživanja definirani su sljedećim kriterijima:

*Kompletna remisija (KR)* definirana je sljedećim kriterijima: normalizacija Hb (*Hb*>130 g/L za muškarce, *Hb*>120g/L za žene) bez transfuzije KE u posljednjih sedam dana i izostanak laboratorijskih znakova hemolize (normalni bilirubin, LDH, haptoglobin i retikulociti).

*Parcijalna remisija (PR)* definirana je sljedećim kriterijima: a) povišenje Hb>20g/L u odnosu na nadir Hb pojedine hemolitičke krize, ali koncentracija Hb je ispod donje granice referentnog raspona; bolesnik nije primio transfuziju KE u posljednjih sedam dana; ili b) koncentracija Hb je unutar referentnog raspona, ali laboratorijski znaci hemolize su prisutni, a bolesnik nije primio transfuziju KE u posljednjih sedam dana.

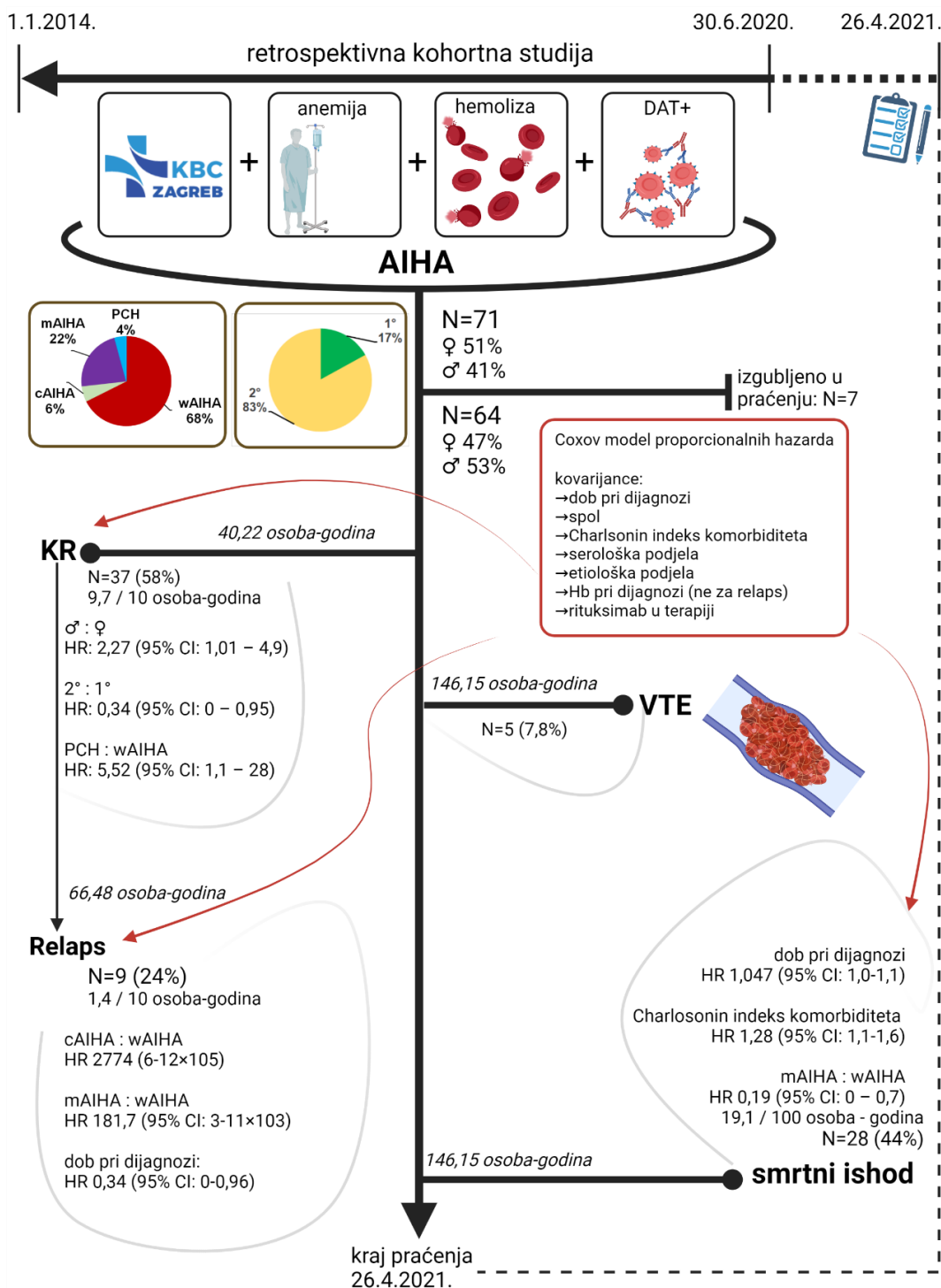
*Relaps bolesti (Re)* definiran je kao anemija uz pozitivne laboratorijske znakove hemolize nakon što je postignuta KR.

*Smrtni ishod* bilježen je bez obzira na uzrok (eng. *all-cause mortality*).

Najbolji odgovor je jedan od prethodno definiranih stanja (KR, PR ili Re), a odnosi se na najbolji odgovor na terapiju postignut tijekom vremena praćenja (*KR je bolji odgovor od PR; PR*

*je bolji odgovor od ne postizanja odgovora (BO, bez odgovora). U ispitanika koji su postigli nekoliko „identičnih najboljih odgovora“ između kojih se dogodio relaps bolesti, kao najbolji odgovor uzet je onaj koji je postignut prvi.).*





**Slika 2.** Grafički prikaz dizajna studije i najvažnijih rezultata. AIHA – autoimunosna hemolitička anemija, cAIHA – hladna AIHA, CI – interval pouzdanosti, DAT+ - pozitivan direktni antiglobulinski test, Hb – koncentracija hemoglobin, HR – omjer hazarda, KR – kompletna remisija, PCH – paroksizmalna hladna hemoglobinurija, VTE – venska tromboembolija, wAIHA – topla AIHA; 1° - primarna AIHA, 2° - sekundarna AIHA; ♂ - muški spol; ♀ - ženski spol.

## 4.2. Metode

Podatci o bolesnicima preuzeti su retrospektivno iz medicinske dokumentacije KBC-a Zagreb. Prikupljeni parametri pobliže su prikazani u Tablici 1, a uključuju „transfuziološke parametre“ (karakteristike DAT-a i IAT-a), podatke o komorbiditetima, koncentraciju Hb, znakove hemolize te potrebu za transfuzijom i hospitalizacijom prilikom dijagnoze. Bolesnicima je u svakoj vremenskoj točki praćena koncentracija Hb, postojanje znakova hemolize, terapija koju primaju te klinički ishod bolesti. Na kraju istraživanja određen je najbolji odgovor na terapiju za pojedinog ispitanika, vremenski trenutak postizanja najboljeg odgovora te vremenski interval od dijagnoze do najboljeg odgovora. Relapsi su izraženi vremenskim intervalom od postizanja KR do relapsa. Uz navedeno, praćena je i pojavnost VTE.

**Tablica 1.** Prikaz prikupljenih parametara tijekom istraživanja

Podatci iz razdoblja uključivanja u istraživanje	Podatci iz razdoblja pripadajuće vremenske točke praćenja
1. Transfuziološki parametri: <ul style="list-style-type: none"> <li>• DAT parametri</li> <li>• IAT specifičnost autoprotutijela</li> <li>• <b>Serološki tip AIHA-e</b></li> </ul> 2. Komorbiditeti           3. <b>Etiološki tip AIHA-e</b> (pretpostavljeni, potvrđeni)           4. Hematološki parametri <ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentracija Hb (pri dijagnozi i otpustu)</li> <li>• Hematokrit</li> <li>• Broj retikulocita</li> <li>• Bilirubin</li> <li>• LDH</li> <li>• Koncentracija haptoglobina</li> </ul> 5. Postojanje trombocitopenije u trenutku dijagnoze ili eventualne hospitalizacije           6. Primjena transfuzije           7. Charlsonin indeks komorbiditeta	1. Klinički ishod bolesti 2. Koncentracija Hb 3. Terapija <b>Podatci određeni na kraju istraživanja</b> 1. Najbolji odgovor 2. Vrijeme od dijagnoze do najboljeg odgovora 3. Pojava relapsa 4. Vrijeme od KR do relapsa 5. Modaliteti terapije primijenjivani u razdoblju praćenja 6. Pojava VTE tijekom razdoblja praćenja 7. Revizija etiološkog tipa AIHAe prema eventualnim novonastalim podacima tijekom razdoblja praćenja

Prikupljeni podatci obrađeni su u programima *Excel*, *XLSTAT* (24) i *Jamovi* (25), a grafički prikazi napravljeni su u programima *draw.io* (26) te *BioRender* (27). Komorbiditeti su za potrebe istraživanja sažeti u obliku Charlsoninog indeksa komorbiditeta (eng. *Charlson comorbidity index*) (28). Aluvijalni dijagram (eng. *alluvial*, *Sankey diagram*) (29) za potrebe prikaza kliničkog tijeka bolesti, napravljen je u programu *RAWGraphs 2.0* (30): postavljeni klasteri (čvorovi, eng. *clusters*) bili su KR, PR, BO i Re, ali i podatci koji nedostaju za pojedinu točku (\*); vremenske točke su: sve prethodno navedene točke praćenja od 2 tjedna do 2 godine. Aluvijalni dijagram je posebna vrsta prikaza koja omogućava praćenje dinamičkih promjena kroz vrijeme: omogućava praćenje pojedinih „tokove“ koji izlaze iz pojedinih čvorova od jedne vremenske točke do susjedne vremenske točke te na taj način omogućava uočavanja promjenu stanja unutar klastera (PR, KR, Re) kroz vrijeme (29).

Vrijednost pogreške tipa I ( $\alpha$ ) postavljena je na 0,05.

Rezultati koji opisuju karakteristike ispitanika sažeti su odgovarajućim metodama deksriptive statistike: rezultati kategoričkih varijabli prikazani su kao frekvencija (postotak), a kontinuiranih varijabli kao prosječna vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) u slučaju parametrijski te kao medijan (donja (Q1) i gornja (Q3) kvartila) u slučaju neparametrijski distribuiranih varijabli.

Analiza podataka o preživljenju, KR i Re prikazana je metodom analize preživljenja (eng. *survival analysis*): uklapanjem u Coxovov regresijski model proporcionalnih rizika (eng. *Cox proportional hazards regression model*). Pretpostavke modela provjerene su testom proporcionalnosti.

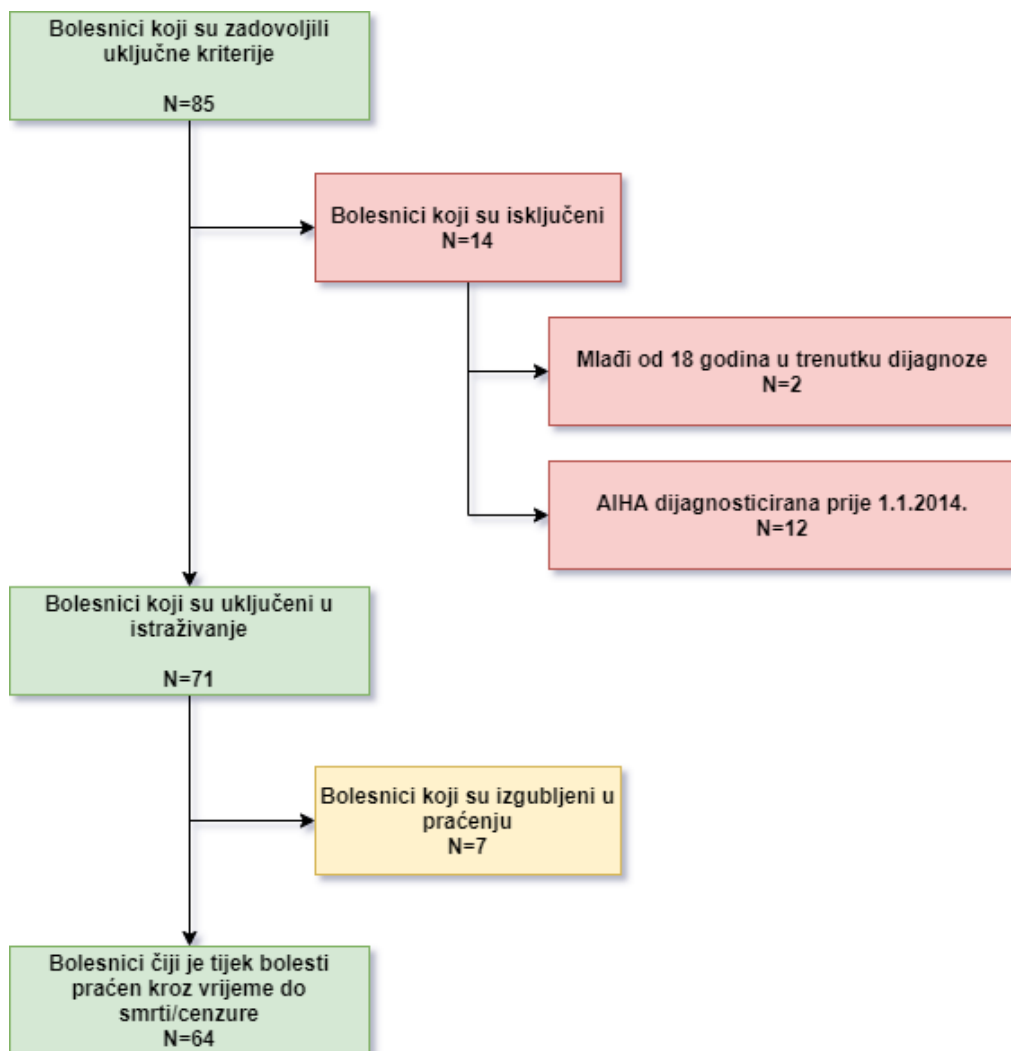
Za potrebe analize preživljenja kohorte (smrtnosti svih uzroka), model je kreiran sljedećim parametrima: smrtni ishod je postavljen kao događaj (eng. *event*), vremenska varijabla predstavljala je vrijeme praćenja od postavljanja dijagnoze (uvrštenja u kohortu) do smrti (ukoliko se dogodila) ili do kraja praćenja (cenzura). Za potrebe analize postizanja KR, model je kreiran

sljedećim parametrima: „događaj“ je postizanje KR, vremenska varijabla predstavljala je vrijeme praćenja od postavljanja dijagnoze (uvrštenja u kohortu) do KR (ukoliko se ona dogodila) ili do kraja praćenja (cenzura). Kvantitativne kovarijance oba kreirana modela bile su: dob u godinama pri dijagnozi, koncentracija Hb pri dijagnozi te vrijednost Charlsoninog indeksa komorbiditeta pri dijagnozi; a kvalitativne su bile: spol, etiološka i serološka podjela. Za potrebe analize Re, model je kreiran sljedećim parametrima: „događaj“ je relaps nakon postignute KR, vremenska varijabla predstavljala je vrijeme praćenja od postizanja KR do pojave relapsa (ukoliko se dogodio) ili do kraja praćenja ili smrti (cenzura). Kovarijance su bile dob pri dijagnozi u godinama (kvantitativna kovarijanca) te spol, etiološka podjela (na primarnu i sekundarnu AIHA-u) te serološka podjela AIHA-e. Statistička značajnost pojedinog cjelokupnog modela ocijenjena je vjerojatnostnim (eng. *likelihood*) testom. Modelima je izračunat omjer proporcionalnih rizika (HR, *hazard ratio*) za pojedinu kovarijancu, a statistička značajnost koeficijenta regresije kovarijanci unutar modela određena je Waldovim  $\chi^2$  testom. Kako bi se učinila distinkcija između pojmova „rizik (eng. *risk*)“ i „rizik (eng. *hazard*)“, za potonji se pojam u daljnjem tekstu koristi anglosaksonizirani pojam „hazard“ (31). Medijan preživljenja procijenjen je Kaplan-Meierovom metodom, a rezultati su grafički prikazani Kaplan-Meierovim krivuljama radi lakše vizualne interpretacije, gdje su varijable „događaj“ te vremenski period postavljeni kao što je ranije navedeno.

Razlika između vremenskih skupina u koncentraciji Hb formalno je procijenjena neparametrijskom analizom varijanci za ponovljena mjerenja (eng. *non-parametric repeated measures analysis of variance*, ANOVA) koja se naziva i Friedmanovim testom za razdoblje praćenja od dijagnoze do 3. godine praćenja: vremenske točke za 4. i 5. godinu nisu uključene zbog malenog dostupnih broja opažanja. Međusobne analize pojedinih vremenskih točaka provedene su Durbin-Conoverovom metodom.

## 5. Rezultati

Uključne kriterije zadovoljilo je 85 bolesnika, a temeljem isključnih kriterija isključeno ih je 14. Proces probira shematski je prikazan na Slici 3. U ovo je retrospektivno kohortno istraživanje na kraju uključen 71 ispitanik s novodijagnosticiranom AIHA-om; 7 (9,9%) bolesnika potpuno je izgubljeno u praćenju. Bolesnici uključeni u praćenje (N=64, 90,1%) ukupno su praćeni 146,15 osoba-godina. Medijan razdoblja praćenja iznosio je 2,11 (0,60 – 3,49) godina.



**Slika 3.** Shematski prikaz postupka probira bolesnika za uključivanje u istraživanje te dostupnosti podataka za pojedinu analizu

## 5.1. Osnovne značajke bolesnika uključenih u istraživanje

Od 71 novodijagnosticiranih bolesnika s AIHA-om, 36 (51%) su bile žene. Medijan dobi pri dijagnozi iznosio je 65 (50,5 – 72) godina. Većina oboljelih imalo je sekundarnu AIHA-u (N=59, 83%), a najčešći podležeci uzrok bila je bolest iz skupine limfoproliferativnih poremećaja (N=35, 59%). Prema vrsti protutijela, 48 (68%) bolesnika imalo je wAIHA-u, 4 (6%) cAIHA-u, 16 (23%) mAIHA-u te 3 (4%) PCH. Podjela etioloških podtipova prema podležecoj serološkoj vrsti prikazana je na Slici 4, a karakteristike bolesnika detaljnije su prikazane u Tablici 2.

Medijan koncentracije Hb pri dijagnozi iznosio je 67 (56,5 – 87) g/L, a 50 (70%) bolesnika imalo je tešku anemiju. Od laboratorijskih znakova hemolize, koncentracija LDH pri dijagnozi iznosila je 421 (297 – 644) U/L, broj retikulocita iznosio je  $160 (94,3 – 252) \times 10^9/L$ , a koncentracija ukupnog bilirubina 35,5 (22 – 50,8)  $\mu\text{mol/L}$ . Medijan koncentracije haptoglobina iznosio je 0,3 (<0,1 – 0,66) g/L. Transfuziju KE primilo je 50 (70%) bolesnika, a hospitaliziran je 51 (72%) bolesnik medijanom boravka u bolnici od 13 (9 – 19) dana; 4 (8%) hospitalizirana bolesnika su preminula u bolnici, tj. 6% iz cijele kohorte. Bolesnici su otpušteni iz bolnice s medijanom hemoglobina 93,5 (83,3 – 100) g/L. Karakteristike bolesnika prilikom dijagnoze i hospitalizacije detaljnije su prikazane u Tablici 3. Evansov sindrom imalo je 7 (10%) ispitanika.

**Tablica 2.** Osnovne karakteristike bolesnika s AIHA-om, uključujući demografske karakteristike bolesnika te etiološke i serološke tipove bolesti.

<b>Demografske karakteristike</b>	Ukupno bolesnika <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>71</b>
			Muškarci	35 (49%)
			Žene	36 (51%)
	Dob u godinama pri dijagnozi <i>medijan (Q1-Q3)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>65 (50,5 – 72)</b>
			Muškarci	65 (59 – 73)
			Žene	59 (45,5 – 69,3)
<b>Etiološka podjela</b>	Primarna AIHA <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>12 (17%)</b>
			Muškarci	7 (20%)
			Žene	5 (14%)
	Sekundarna AIHA <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>59 (83%)</b>
			Muškarci	28 (80%)
			Žene	31 (86%)
	Podležeća bolest <i>N (%)</i>	Limfoproliferativna bolest	<b>Ukupno</b>	<b>35 (59%)</b>
			Muškarci	22 (79%)
			Žene	13 (42%)
		Autoimunosna bolest	<b>Ukupno</b>	<b>13 (22%)</b>
			Muškarci	1 (4%)
			Žene	12 (39%)
		Druga maligna bolest	<b>Ukupno</b>	<b>3 (5%)</b>
			Muškarci	0
			Žene	3 (10%)
		Lijek	<b>Ukupno</b>	<b>1 (2%)</b>
			Muškarci	0
			Žene	1 (3%)
		Infekcija	<b>Ukupno</b>	<b>1 (2%)</b>
			Muškarci	0
			Žene	1 (3%)
		Alogena TMS	<b>Ukupno</b>	<b>4 (7%)</b>
			Muškarci	3 (11%)
Žene			1 (3%)	
MDS		<b>Ukupno</b>	<b>2 (3%)</b>	
		Muškarci	2 (7%)	
		Žene	0	
<b>Serološka podjela</b>	Topla AIHA <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>48 (68%)</b>
			Muškarci	27 (77%)
			Žene	21 (58%)
	Hladna AIHA <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>4 (6%)</b>
			Muškarci	2 (6%)
			Žene	2 (6%)
	Miješana AIHA <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>16 (23%)</b>
			Muškarci	4 (11%)
			Žene	12 (33%)
	PCH <i>N (%)</i>		<b>Ukupno</b>	<b>3 (4%)</b>
			Muškarci	2 (6%)
			Žene	1 (3%)

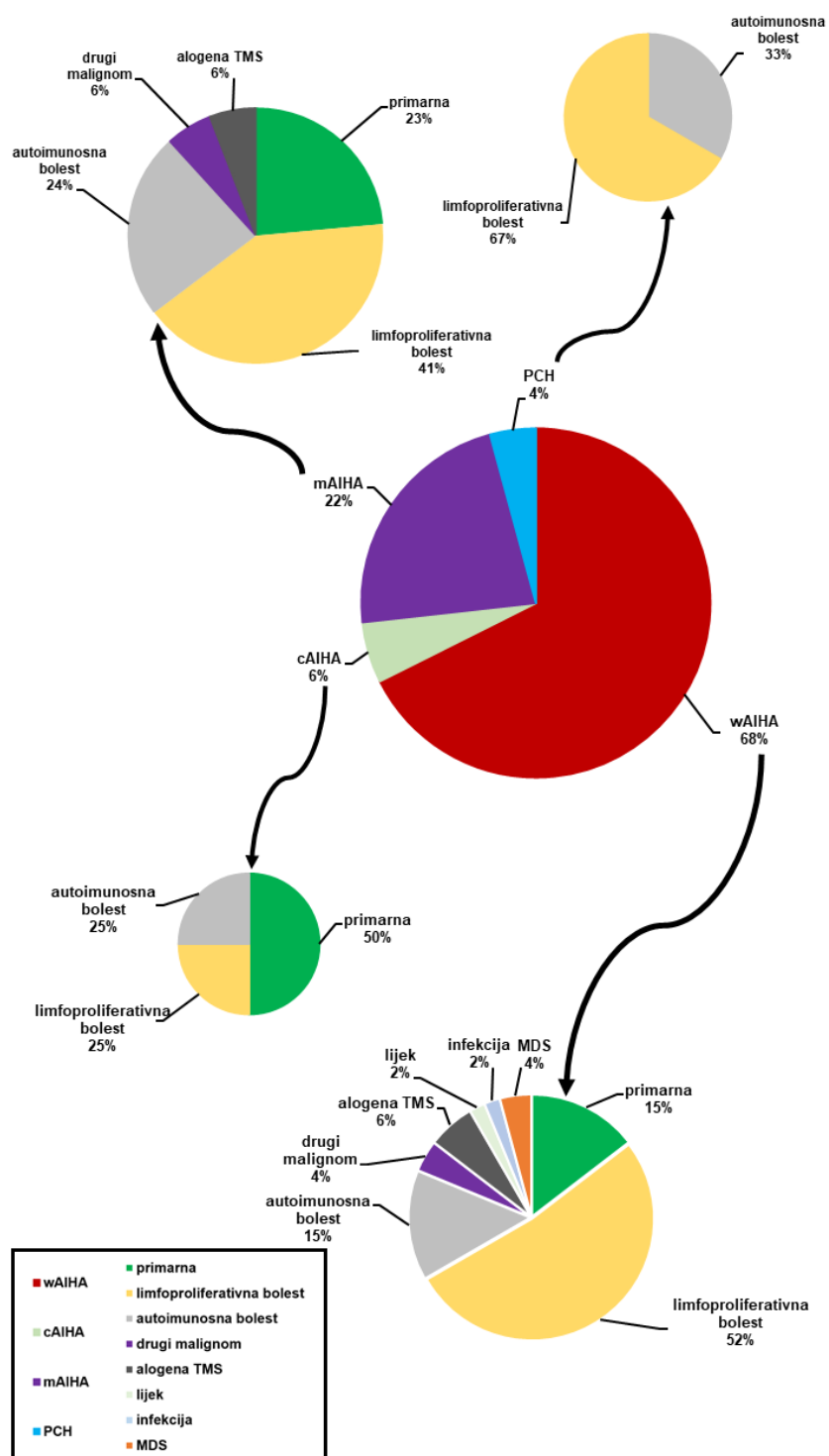
Postotci su zaokruženi na cijele brojeve, a predstavljaju udio oboljelih prema spolu, osim u dijelu tablice koja odgovara podležećim bolestima gdje predstavljaju udio sekundarnih AIHA prema spolu. AIHA – autoimunosna hemolitička anemija, MDS – mijelodisplastični sindrom, TMS – transplantacija matičnih stanica, Q1 – prva kvartila, Q3 – treća kvartila

**Tablica 3.** Prikaz laboratorijskih parametara u trenutku postavljanja dijagnoze te učestalosti primijenjene transfuzije koncentratima eritrocita, hospitalizaciji te ishodu bolničkog liječenja.

Parametri prilikom postavljanja dijagnoze			
Koncentracija Hb <i>medijan (Q1-Q3)</i> g/L		Ukupno	<b>67 (56,5 – 87)</b>
		Muškarci	66 (58,5 – 85,5)
		Žene	67 (50,5 – 87,3)
Stupanj anemije <i>N (%)</i>	Blaga anemija	Ukupno	<b>5 (7%)</b>
		Muškarci	1 (3%)
		Žene	4 (11%)
	Umjerena anemija	Ukupno	<b>16 (23%)</b>
		Muškarci	9 (26%)
		Žene	7 (19%)
	Teška anemija	Ukupno	<b>50 (70%)</b>
		Muškarci	25 (71%)
		Žene	25 (69%)
Retikulociti <i>medijan (Q1-Q3)</i> $\times 10^9/L$		Ukupno	<b>160 (94,3 – 252)</b>
		Muškarci	140 (77,5 – 214)
		Žene	179 (119 – 275)
Ukupni bilirubin <i>medijan (Q1-Q3)</i> $\mu\text{mol/L}$		Ukupno	<b>35,5 (22 – 50,8)</b>
		Muškarci	34 (21 – 57)
		Žene	37 (23,5 – 47)
Haptoglobin <i>medijan (Q1-Q3)</i> g/L		Ukupno	<b>0,3 (&lt;0,1 – 0,66)</b>
		Muškarci	0,465 (0,278 – 1,22)
		Žene	0,17 (<0,1 – 0,540)
LDH <i>medijan (Q1-Q3)</i> U/L		Ukupno	<b>421 (297 – 644)</b>
		Muškarci	411 (280 – 559)
		Žene	457 (311 – 691)
Transfuzije KE <i>N (%)</i>		Ukupno	<b>50 (70%)</b>
		Muškarci	29 (83%)
		Žene	21 (58%)
Parametri prilikom hospitalizacije i otpusta			
Hospitalizacija pri dijagnozi <i>N (%)</i>		Ukupno	<b>51 (72%)</b>
		Muškarci	26 (74%)
		Žene	25 (69%)
Duljina hospitalizacije <i>medijan (Q1-Q3)</i> <i>broj dana</i>		Ukupno	<b>13 (9 – 19)</b>
		Muškarci	15 (9 – 25,5)
		Žene	12 (8 – 16)
Koncentracija Hb pri otpustu <i>medijan (Q1-Q3)</i> g/L		Ukupno	<b>93,5 (83,3 – 100)</b>
		Muškarci	92 (84,8 – 96)
		Žene	96,5 (83,3 – 102)
Smrtni ishod tijekom hospitalizacije <i>N (%) hospitaliziranih) [% svih]</i>		Ukupno	<b>4 (8%) [6%]</b>
		Muškarci	3 (12%) [9%]
		Žene	1 (4%) [2,7%]

Hb – hemoglobin, KE – koncentracija eritrocita, LDH – laktat dehidrogenaza; Q1 – prva kvartila, Q3 – treća kvartila. Koncentracija Hb pri otpustu prikazana je samo za bolesnike koji nisu imali smrtni ishod u bolnici.





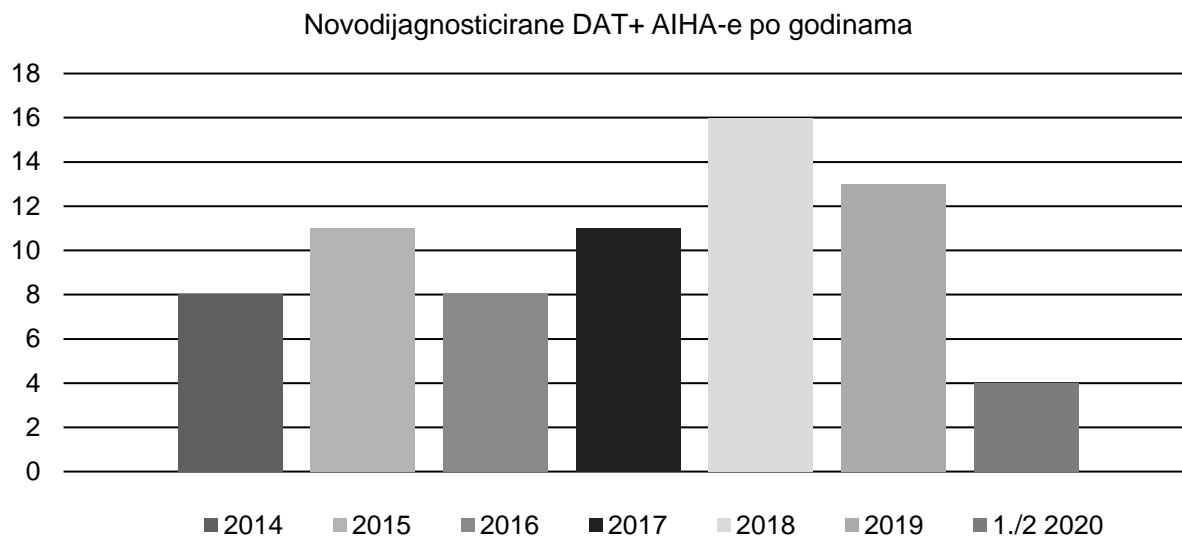
**Slika 4.** Etiološka podjela autoimunosnih hemolitičkih anemija (AIHA) ovisno o pojedinom serološkom tipu. *wAIHA* – topla AIHA, *cAIHA* – hladna AIHA, *mAIHA* – miješana AIHA, *PCH* – paroksizmalna hladna hemoglobinurija, *TMS* – tranplantacija matičnih stanica, *MDS* – mijelodisplastični sindrom.

## 5.2. Osnovne značajke liječenja AIHA-e

Podatci o terapiji postoje za 64 bolesnika. Većina je primala kortikosteroidnu terapiju kao prvu liniju liječenja: 59 (92%). Rituksimab je primilo 22 (34%) bolesnika, od čega je u 13 (59%) bolesnika primijenjen u sklopu prve linije terapije (zajedno s kortikosteroidima). Bolesnici koji su primali rituksimab u prvoj liniji većinom su imali limfoproliferativnu bolest (10 slučajeva, 76%), a rituksimab je kao prva linija primijenjen u jednom slučaju (7,6%) primarne AIHA-e, u slučaju podležeće autoimunosne bolesti (vitiligo) te u slučaju gdje je najvjerojatniji uzrok AIHA-e bila infekcija *Mycoplasma pneumoniae*. Ostali bolesnici (9 slučajeva, 41%) primili su rituksimab u sklopu druge ili treće linije liječenja. IVIg je primilo 10 (14,1%) ispitanika, a 3 (4,7%) ih je podvrgnuto splenektomiji.

## 5.3. Godišni broj novih slučajeva

Bilježenjem svih novodijagnosticiranih slučajeva DAT+ AIHA moguće je izračunati njihovu godišnju frekvenciju na razini KBC-a Zagreb. Ukupno vrijeme prikupljanja podataka novodijagnosticiranih AIHA iznosi 6,5 godina (1.4.2014 - 31.6.2020), broj novodijagnosticiranih AIHA po godini prikazan je na Slici 5. U razdoblju praćenja uključeno je 71 punoljetnih ispitanika s novodijagnosticiranom DAT+ AIHA-om: prosječan broj novodijagnosticiranih DAT+ AIHA u odraslih na razini KBC-a Zagreb (tijekom razdoblja praćenja) iznosi 10,9 ( $\pm 3,9$ ) slučajeva godišnje.



**Slika 5.** Histogram novodijagnosticiranih DAT+ AIHA prema godini za koju su prikupljeni podatci.

#### 5.4. Smrtnost bolesnika tijekom razdoblja praćenja

##### 5.4.1. Sveukupna smrtnost

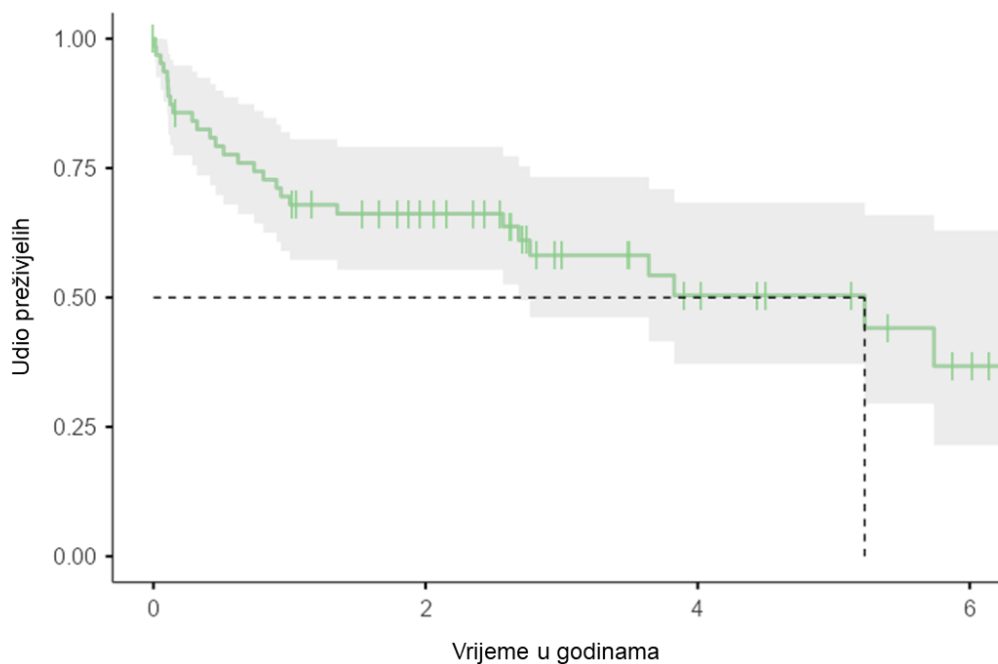
Praćenje je bilo moguće za 64 ispitanika, a praćeni su 146,15 osoba-godina. Tijekom razdoblja praćenja umrlo je 28 (43,8%) ispitanika, krivulja preživljenja prikazana je na Slici 6. Stopa smrtnosti iznosi 19,1 na 100 osoba-godina.

Podatci o smrtnosti za 64 ispitanika za koje je omogućeno praćenje analizirani su uklapanjem u Coxov regresijski model proporcionalnih hazarda (prethodno detaljnije opisano), gdje je smrtni ishod postavljen kao „događaj“. Kreirani model statistički je značajan ( $-2 \text{ Log(Likelihood)} = 24,94$ ;  $p=0,003$ ). Regresijski koeficijenti za pojedinu varijablu prikazani su Tablicom 4. Kreiranim modelom, uočen je statistički značajan utjecaj na smrtnost za sljedeće varijabe: dob pri dijagnozi (u godinama) (HR 1,047 (95% CI: 1,0-1,1),  $p=0,001$ ), Charlsonin indeks komorbiditeta (HR 1,28 (95% CI: 1,1-1,6),  $p=0,013$ ) te za mAIHA-u (vs. wAIHA) (HR 0,19 (95% CI: 0 – 0,7),  $p=0,011$ ).

**Tablica 4.** Rezultati Coxovog regresijskog modela proporcionalnih rizika, gdje je događaj smrtni ishod. Statistički značajni rezultati su podebljani

Varijabla	Reg. koef. ( $\pm$ SE)	Wald $\chi^2$	Pr > $\chi^2$	HR (95% CI)
<b>Dob pri dijagnozi (u godinama)</b>	<b>0,05 (<math>\pm</math>0,01)</b>	<b>10,36</b>	<b>0,001</b>	<b>1,047 (1,02 - 1,08)</b>
Hb (g/L) pri dijagnozi	-0,01 ( $\pm$ 0,01)	0,45	0,50	0,993 (0,97-1,01)
<b>Charlsonin indeks komorbiditeta</b>	<b>0,25 (<math>\pm</math>0,10)</b>	<b>6,24</b>	<b>0,013</b>	<b>1,28 (1,05 - 1,55)</b>
Spol: ženski (vs. muški)	-0,08 ( $\pm$ 0,45)	0,03	0,87	0,93 (0,39 - 2,22)
Etiologija: sekundarna (vs prim.) AIHA	0,10 ( $\pm$ 0,54)	0,03	0,85	1,1 (0,39 - 3,17)
Serologija: cAIHA (vs. wAIHA)	-0,67 ( $\pm$ 1,1)	0,78	0,54	0,51 (0,06 - 4,39)
<b>Serologija: mAIHA (vs. wAIHA)</b>	<b>-1,67 (<math>\pm</math>0,66)</b>	<b>6,48</b>	<b>0,011</b>	<b>0,19 (0,00 - 0,68)</b>
Serologija: PCH (vs. wAIHA)	-0,60 ( $\pm$ 1,08)	0,31	0,58	0,55 (0,07 - 4,58)
Rituksimab	-0,56 ( $\pm$ 0,48)	1,34	0,25	0,57 (0,22 - 1,47)

HR – omjer hazarda (*hazard ratio*); PCH – paroksizmalna hladna hemoglobinurija; Reg. Koef. – regresijski koeficijent; prim. – primarna; SE – standardna pogreška (*standard error*)



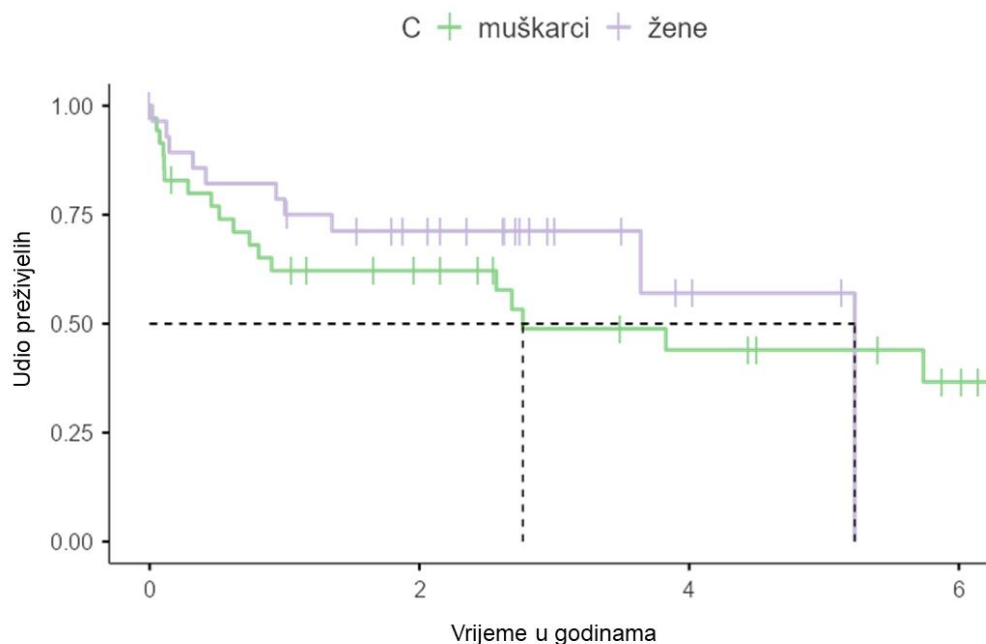
**Slika 6.** Prikaz krivulje preživljenja za cijelu kohortu. Zelena linija predstavlja krivulju preživljenja, a zasivljeno područje odgovara 95% intervalu pouzdanosti; znak „+“ označava cenzuru. Isprekidane linije predstavljaju medijan preživljenja.

### 5.4.2. Smrtnost ovisno o spolu

Stopa incidencije smrtnosti za muškarce iznosi 2,14 na 10 osoba-godina, a za žene 1,61 na 10 osoba-godina (Tablica 5). Relativni rizik smrtnog ishoda za muški spol iznosi 1,33 (95% CI: 0,61– 2,88). Krivulja preživljenja po spolovima prikazana je na Slici 7. Procijenjeni medijan preživljenja za muškarce iznosi je 2,77 (Q1: 0,9 – Q3: nije postignut), a za žene 5,23 (Q1: 3,6 – Q3: nije postignut).

**Tablica 5.** Prikaz stope smrtnosti ovisno o spolu kao tablica kontingencije

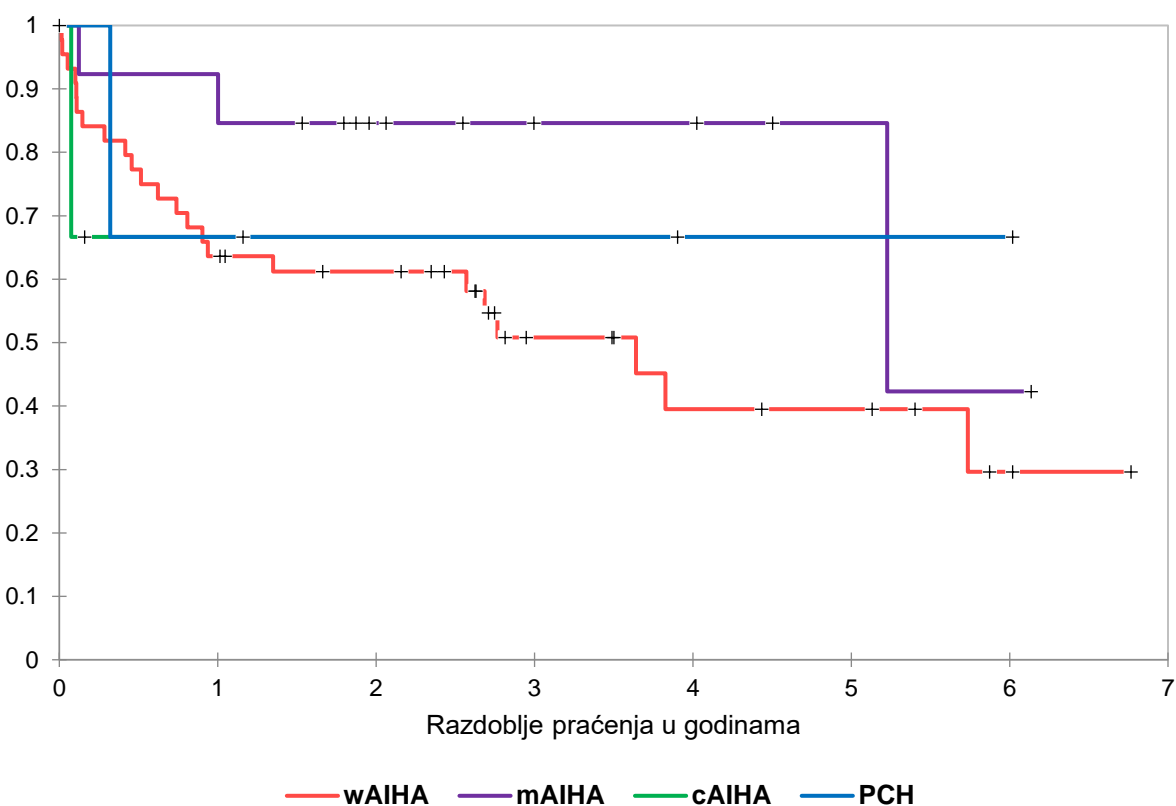
Spol	Umrli	Preživjeli	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije smrtnosti
Muški	18	16	34	84,14	0,214
Ženski	10	23	33	62,01	0,161
Ukupno	28	36	64	146,15	0,192



**Slika 7.** Krivulja preživljenja tijekom razdoblja praćenja po spolovima. *Znak „+“ odgovara cenzuri, isprekidane linije predstavljaju medijane preživljenja. Isprekidane linije predstavljaju medijan preživljenja.*

#### 5.4.4. Smrtnost prema serološkom tipu AIHA-e

Stopa smrtnosti za wAIHA-u, cAIHA-u, mAIHA-u i PCH redom iznosi 0,223; 0,724; 0,056 te 013 smrti / osoba-godina (Tablica 6). Relativni rizik za smrtni ishod u osoba sa mAIHA-om (u usporedbi s wAIHA-om) iznosi 0,25 (95% CI: 0,06-1,06). Krivulje preživljenja prema serološkom tipu prikazane su Slikom 8. Kreiranim modelom, uočena je statistički značajna razlika omjera hazarda između mAIHA-e i wAIHA-e: HR 0,19 (95% CI: 0 – 0,7),  $p=0,011$ , što znači da je vjerojatnost za smrtni ishod za 81% manja u skupini mAIHA-e u usporedbi sa skupinom wAIHA-e za bilo koji trenutak tijekom razdoblja praćenja.



**Slika 8.** Krivulja preživljenja tijekom razdoblja praćenja prema serološkoj podjeli autoimunosne hemolitičke anemije (AIHA). wAIHA – topla AIHA, cAIHA – hladna AIHA, mAIHA – miješana AIHA, PCH – paroksizmalna hladna hemoglobinurija. Znak „+“ predstavlja cenzuru.

**Tablica 6. Prikaz stope smrtnosti ovisno o spolu kao tablica kontingencije**

Serologija	Umrli	Preživjeli	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije smrtnosti
Topla	22	23	45	98,7	0,223
Hladna	3	0	3	4,14	0,724
Miješana	2	11	13	35,79	0,056
PCH	1	2	3	7,5	0,13
Ukupno	28	36	64	146,15	0,192

## 5.5. Odgovor bolesnika na terapiju

Promatranje tijeka bolesti bilo je moguće za 64 ispitanika (4 bolesnika su potpuno izgubljena u praćenju, a za 3 je poznat jedino status smrti). KR je postiglo 37 (57,8%), PR je postiglo 8 (12,5%) ispitanika, a preostalih 19 (29,7%) nije odgovorilo na terapiju.

### 5.5.1. Kompletna remisija

#### 5.5.1.1. Kompletna remisija kohorte

Medijan razdoblja praćenja od dijagnoze do kompletne remisije iznosi 226 (95% CI: 155-524) dana, grafički prikaz postizanja KR nalazi se na Slici 9. Razdoblje praćenja od dijagnoze do kompletne remisije iznosilo je 14679 osoba-dana, odnosno 40,22 osoba-godina. Stopa incidencije kompletne remisije iznosi 9,2 KR na 10 osoba-godina.

Podatci o postizanju KR za 64 navedenih ispitanika analizirani su uklapanjem u Coxov regresijski model proporcionalnih hazarda (prethodno detaljnije opisano), gdje je postizanje KR postavljeno kao „događaj“. Kreirani model je statistički značajan (-2 Log (likelihood) = 14,35; p=0,045). Koeficijenti regresije za pojedinu kovarijancu ovog modela prikazani su Tablicom 7.

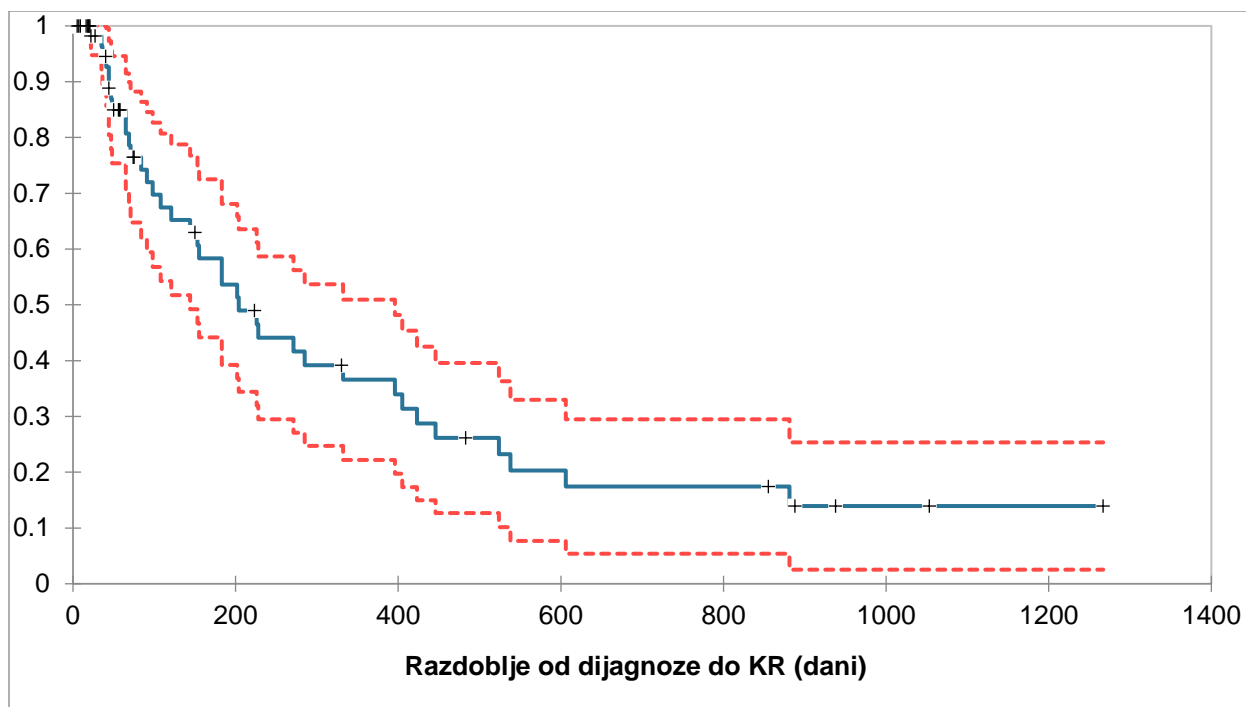
Značajan utjecaj na postizanje KR pronađen je za spol (HR za ženski spol: 2,27 (95% CI: 1,01 - 4,9),  $p=0,037$ ), etiološku podjelu (HR za sekundarnu AIHA-u u usporedbi s primarnom iznosi 0,34 (95% CI: 0-0,95),  $p=0,039$ ) te za PCH u usporedbi s wAIHA-om (HR 5,52 (95% CI: 1,1 – 27,73),  $p=0,038$ ).

**Tablica 7.** Rezultati Coxovog regresijskog modela proporcionalnih rizika, gdje je događaj postizanje KR. Statistički značajni rezultati su podebljani

<b>Varijabla</b>	<b>Reg. koef. (<math>\pm</math>SE)</b>	<b>Wald <math>\chi^2</math></b>	<b>Pr &gt; <math>\chi^2</math></b>	<b>HR (95% CI)</b>
Dob pri dijagnozi (u godinama)	0,01 ( $\pm$ 0,01)	0,46	0,49	1,01 (0,98-1,03)
Hb (g/L) pri dijagnozi	-0,001 ( $\pm$ 0,01)	0,02	0,99	0,99 (0,98-1,02)
Charlsonin indeks komorbiditeta	0,03 ( $\pm$ 0,1)	0,09	0,77	1,03 (0,85-1,25)
<b>Spol: ženski (vs. muški)</b>	<b>0,82 (<math>\pm</math>0,39)</b>	<b>4,35</b>	<b>0,037</b>	<b>2,27 (1,05-4,92)</b>
<b>Etiologija: sekundarna (vs prim.) AIHA</b>	<b>-1,09 (<math>\pm</math>0,53)</b>	<b>4,27</b>	<b>0,039</b>	<b>0,34 (0 – 0,95)</b>
Serologija: cAIHA (vs. wAIHA)	-0,54 ( $\pm$ 1,08)	0,25	0,62	0,58 (0,07-4,48)
Serologija: mAIHA (vs. wAIHA)	-0,59 ( $\pm$ 0,44)	1,75	0,19	0,56 (0,23-1,33)
<b>Serologija: PCH (vs. wAIHA)</b>	<b>1,71 (<math>\pm</math>0,82)</b>	<b>4,31</b>	<b>0,038</b>	<b>5,52 (1,1 – 27,73)</b>
Rituksimab	-0,501 ( $\pm$ 0,43)	1,38	0,24	0,6 (0,26-1,39)

HR – omjer hazarda (*hazard ratio*); PCH – paroksizmalna hladna hemoglobinurija; Reg. Koef. – regresijski koeficijent; prim. – primarna; SE – standardna pogreška (*standard error*)





**Slika 9.** Kaplan-Meierova krivulja koja predstavlja razdoblje od dijagnoze do kompletne remisije (KR) u danima, gdje je kompletna remisija postavljena kao „događaj“, tj. ordinatna os prikazuje udio ispitanika koji (još) nisu postigli kompletnu remisiju. *Plava linija predstavlja krivulju KR, crvena isprekidana linija predstavlja 95% interval pouzdanosti. Oznaka „+“ predstavlja cenzuru*

### 5.5.1.2. Kompletna remisija ovisno o spolu

Kompletnu remisiju postiglo je 16 (45,7%) muškaraca te 21 (72,4%) žena tijekom razdoblja praćenja. Stopa incidencije KR za muškarce iznosi 6,7 KR na 10 osoba godina, a za žene 13 KR na osoba-godina (Tablica 8). Relativni rizik za postizanje KR za muškarce iznosi 0,52 (95% CI: 0,27 - 0,99). Obrnuto, relativni „rizik“ za postizanje KR za ženski spol iznosi 1,94 (95% CI: 1,01 - 3,7), što znači da je vjerojatnost za postizanje KR tijekom cjelokupnog vremena praćenja, za žene 1,94 puta veća u odnosu na muškarce.

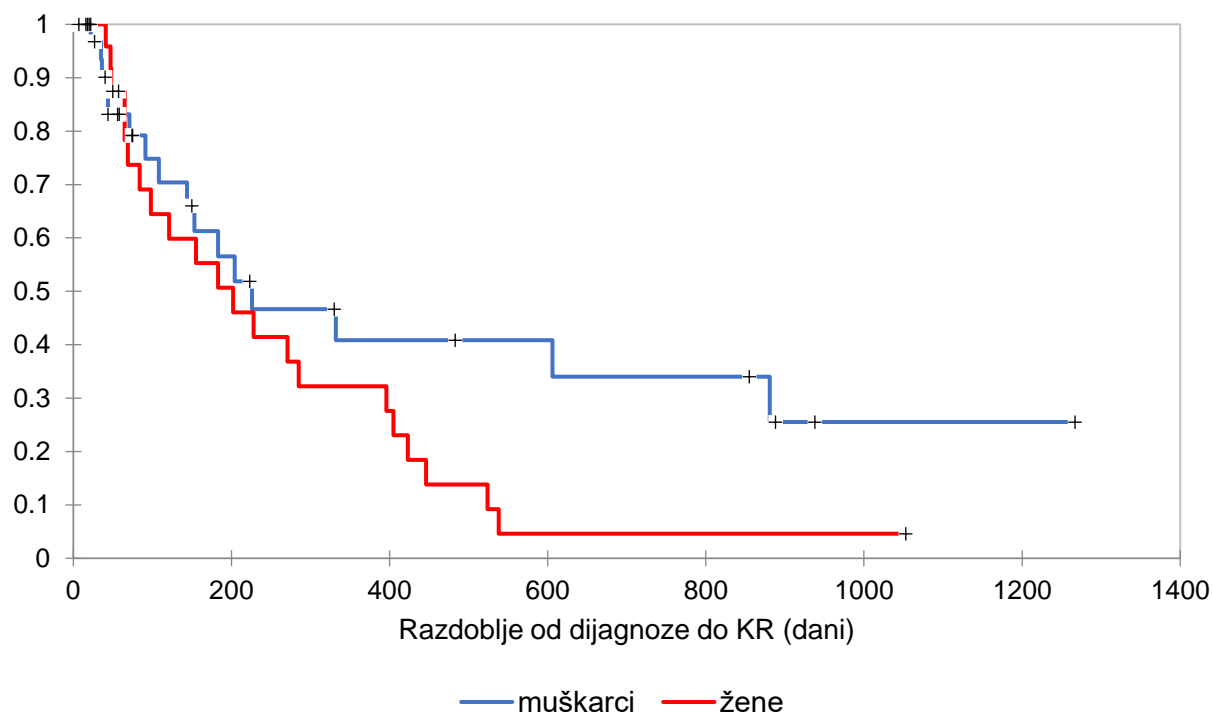
Žene su, prema ranije opisanom Coxovom modelu, imale 2,27 (95% CI: 1,01-4,9) puta veći „hazard“ za razvoj KR (Tablica 8): što znači da je vjerojatnost u bilo kojem trenutku u vremenu

praćenja za postizanje KR 2,6 puta veća u odnosu na muškarce. Radi zornijeg prikaza, Kaplan-Meierove krivulje KR za muški i ženski spol prikazane su Slikom 10.

**Tablica 8.** Tablica kontingencije kompletne remisije prema spolu.

Spol	KR	NPKR	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije KR
Muškarci	16	19	35	23,95	0,67
Žene	21	8	29	16,27	1,30
Ukupno	37	27	64	40,22	0,92

KR – kompletna remisija, NPKR – nisu postigli KR



**Slika 10.** Kaplan-Meierove krivulje koje za pojedini spol predstavljaju funkciju postizanja kompletne remisije (KR) u razdoblju od dijagnoze do kompletne remisije u danima, gdje je kompletna remisija postavljena kao „događaj“, tj. ordinatna os prikazuje udio bolesnika koji (još) nisu postigli kompletnu remisiju. Oznaka „+“ predstavlja cenzuru.

### 5.5.1.3. Kompletna remisija ovisno o etiološkom tipu

Tijekom razdoblja praćenja do KR je došlo u 6 (66,7%) slučajeva primarnih AIHA te u 31 (56,4%) slučajeva sekundarnih AIHA. Stopa incidencije kompletne remisije iznosi 2,3 KR po osobi-godini za primarnu, a 0,82 KR po osobi-godini za sekundarnu AIHA-u (Tablica 10). Grafički prikaz u obliku Kaplan-Meierovih krivulja predstavljen je Slikom 11.

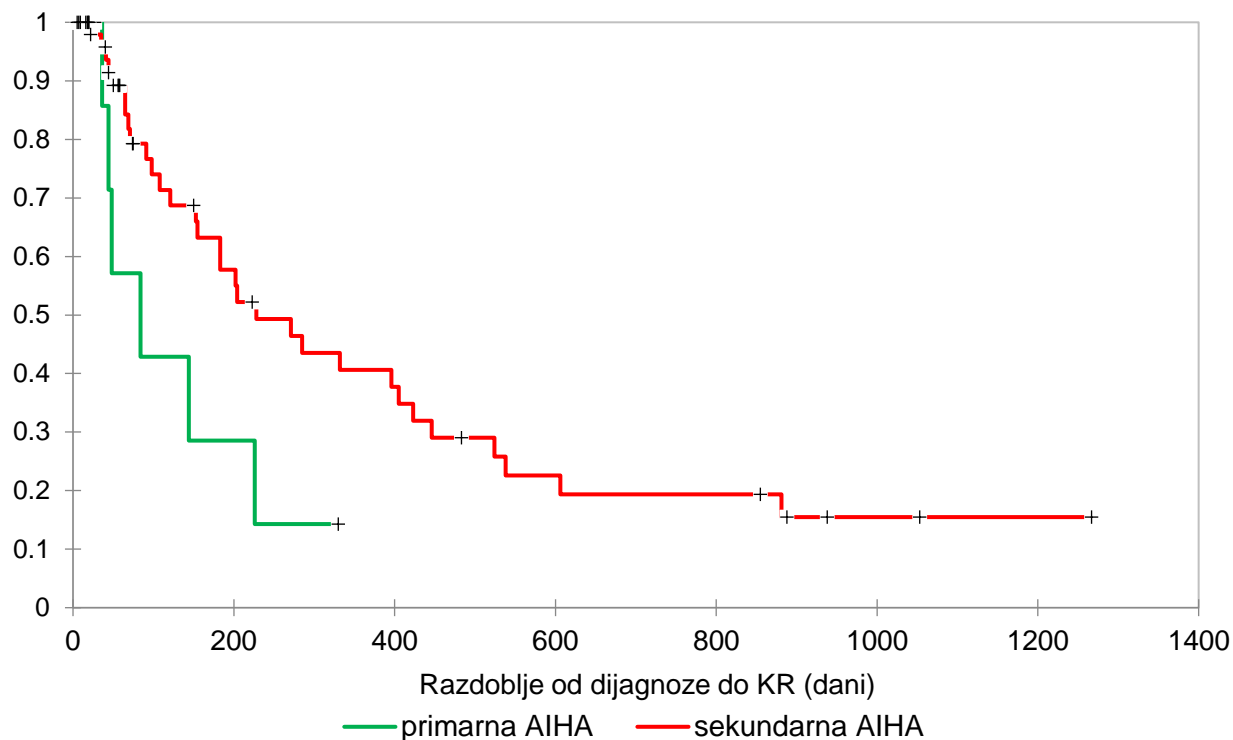
Relativni rizik za postizanje KR za sekundarnu AIHA-u iznosi 0,36 (95% CI: 0,15-0,86): što znači da su bolesnici sa sekundarnom AIHA-om imali 64% manju vjerojatnost postizanja KR u odnosu na bolesnike s primarnom AIHA-om u cjelokupnom trajanju praćenja.

Ispitanici sa sekundarnom AIHA-om su, prema ranije opisanom modelu, imali HR 0,34 (95% CI: 0 – 0,95) za postizanje KR u odnosu na ispitanike s primarnom AIHA-om (Tablica 7): što znači da su bolesnici sa sekundarnom AIHA-om imali 69% manju vjerojatnost postizanja KR u odnosu na bolesnike s primarnom u bilo kojem pojedinom trenutku praćenja.

**Tablica 10.** Tablica kontingencije kompletne remisije prema etiološkom tipu AIHA-e.

Etiologija	KR	NPKR	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije KR
Primarna	6	3	9	2,63	2,28
Sekundarna	31	24	55	37,59	0,82
Ukupno	37	27	64	40,22	0,92

KR – kompletna remisija, NPKR – nisu postigli KR



**Slika 11.** Kaplan-Meierove krivulje koje za etiološki tip AIHA-e predstavljaju funkciju postizanja KR u razdoblju od dijagnoze do kompletne remisije u danima, gdje je kompletna remisija postavljena kao „događaj“, tj. ordinatna os prikazuje udio ispitanika koji (još) nisu postigli kompletnu remisiju. Oznaka „+“ predstavlja cenzuru.

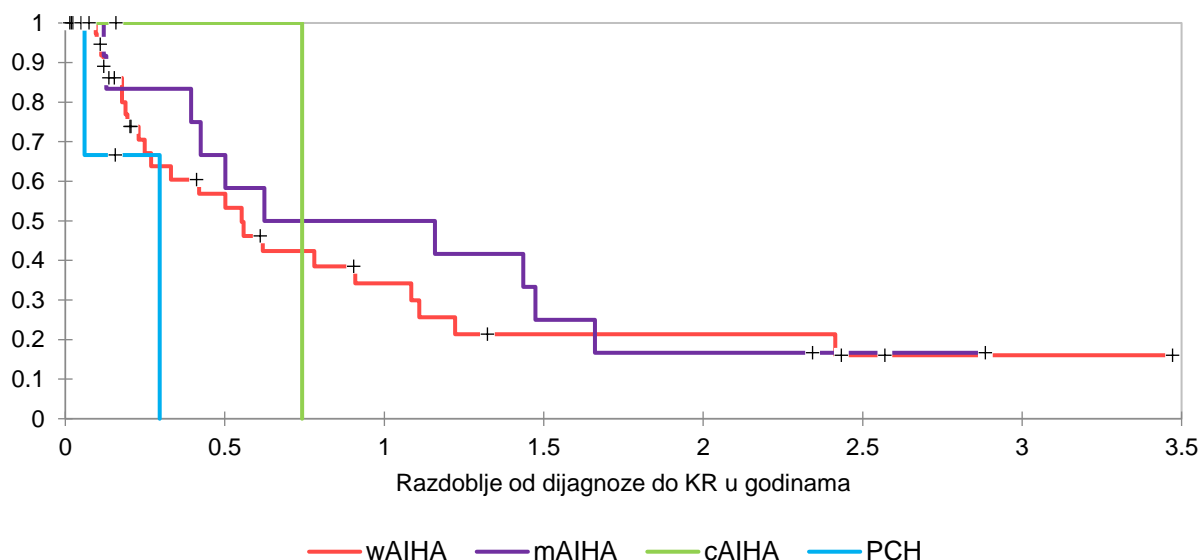
#### 5.5.1.4. Kompletna remisija ovisno o serološkom tipu

Tijekom razdoblja praćenja došlo je do kompletne remisije u 24 (53,3%) wAIHA-e, u 1 slučaju (33,3%) cAIHA-e, 10 (76%) mAIHA-e te 2 (66,6%) PCH. Stopa incidencije KR za wAIHA, cAIHA, mAIHA te PCH iznosi redom 0,94; 1,03; 0,76 i 3,92 KR / osoba-godina (Tablica 11). Relativni rizik za PCH u usporedbi s wAIHA iznosi 4,16 (95% CI: 0,97 – 27,28). Grafički prikaz postizanja KR Kaplan-Meierovim krivuljama za serološku klasifikaciju predstavljen je na Slici 12.

Prema ranije opisanom modelu, uočen je statistički značajan HR za PCH u usporedbi s wAIHA: HR 5,52 (95% CI: 1,1 – 27,73), što znači da je vjerojatnost za postizanje KR u bilo kojem trenutku tijekom razdoblja praćenja 5,52 puta veći za ispitanike s PCH u odnosu na one s wAIHA-om.

**Tablica 11.** Tablica kontingencije prema serološkoj klasifikaciji AIHA-e

Serologija	Umrli	Preživjeli	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije smrtnosti
Topla	24	21	45	25,53	0,94
Hladna	1	2	3	0,97	1,03
Miješana	10	3	13	13,2	0,76
PCH	2	1	3	0,51	3,92
Ukupno	37	27	64	40,22	0,92

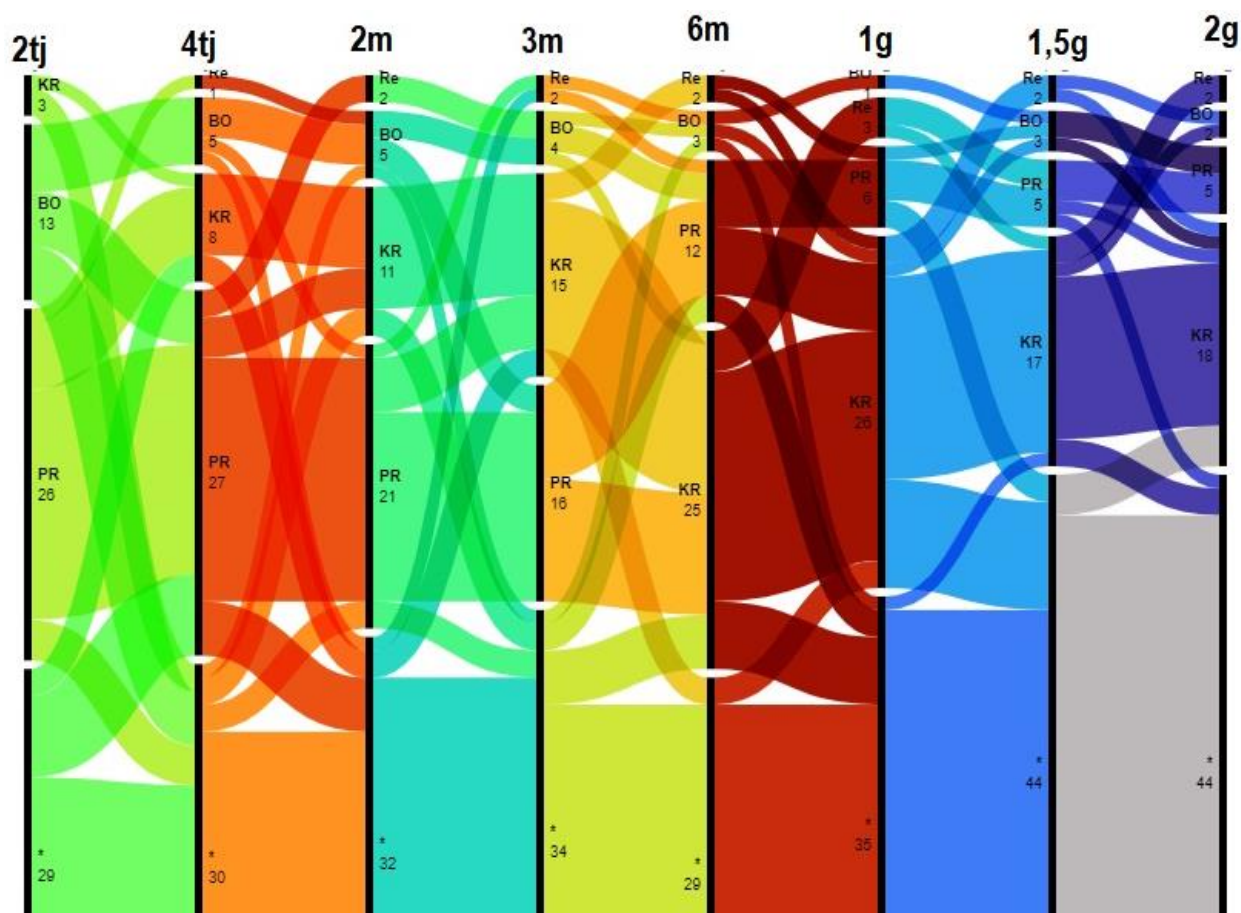


**Slika 12.** Kaplan-Meierove krivulje za razvoj KR prema serološkoj klasifikaciji AIHA-e

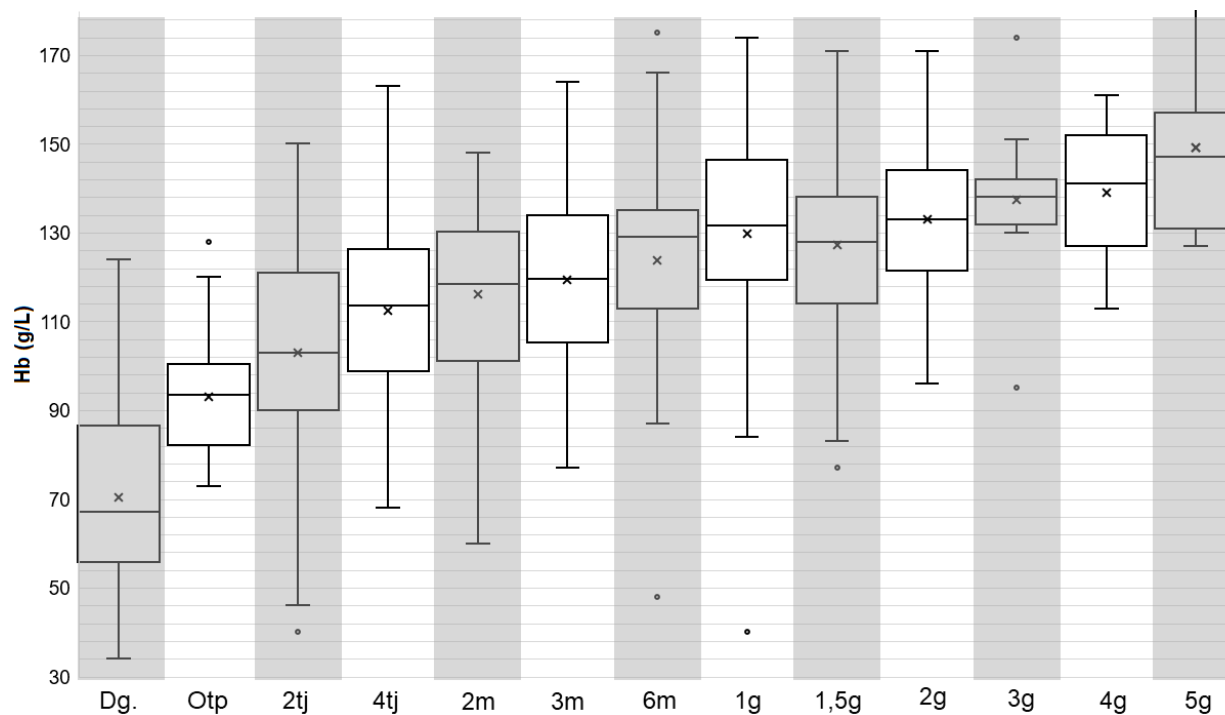
### 5.5.2. Praćenje odgovora na terapiju kroz vrijeme

Praćenje odgovora na terapiju kroz vrijeme ilustrativno je prikazano aluvijalnim dijagramom na Slici 13, čiji „tokovi“ prikazuju promjenu stanja (KR, PR, BO, Re) kroz vrijeme.

Promjena koncentracije Hb kroz vrijeme pokazuje uzlazan trend (Slika 14, Tablica 12), a razlika između skupina formalno je provjerena Friedmanovim testom:  $\chi^2$  37,1;  $p < 0,001$ ; usporedbe među skupinama (eng. *pairwise comparisons*) učinjene Durbin-Conoverovim testom prikazane su Tablicom 13.



**Slika 13** Aluvijalni (Sankey) dijagram koji prikazuje dinamiku promjene odgovora bolesnika na terapiju. KR – kompletna remisija, PR - parcijalna remisija, Re – relaps, BO – bez odgovora; \* - podatci koji nedostaju za pojedinu vremensku točku.



**Slika 14.** Promjena koncentracije Hb (g/L) kroz vrijeme. *Dg.* – vremenska točka postavljanja dijagnoze; *g* – godina; *m* – mjesec; *Otp* – vremenska točka otpusta iz bolnice; *tj* – tjedan.

**Tablica 12.** Prikaz medijana koncentracije Hb po vremenskim točkama. N predstavlja broj opažanja po vremenskoj skupini

Vremenska točka	N	Medijan koncentracije Hb (Q1-Q3) g/L
Pri dijagnozi	71	67,0 (56,5 – 87)
Pri otpustu iz bolnice	50	93,5 (83,3 – 100)
2 tjedna od dijagnoze	43	103,0 (90,0 – 121)
4 tjedna od dijagnoze	42	114,0 (99,3 – 125)
2 mjeseca od dijagnoze	40	119,0 (101 – 130)
3 mjeseca od dijagnoze	38	120,0 (105 – 134)
6 mjeseci od dijagnoze	41	129,0 (113 – 135)
1 godina od dijagnoze	36	132,0 (119 – 147)
1,5 godina od dijagnoze	25	128,0 (114 – 138)
2 godine od dijagnoze	27	133,0 (122 – 144)
3 godine od dijagnoze	12	138,0 (132 – 142)
4 godine od dijagnoze	9	141,0 (127 – 152)
5 godina od dijagnoze	5	147,0 (131 – 157)

**Tablica 13.** Usporedbe među vremenskim točkama analizom parova Durbin-Conoverovim (pairwise comparisons) testom.

<b>Pairwise Comparisons (Durbin-Conoverov test)</b>				
Par			Statistika	p
Dg	-	Otp	1,347	0,186
Dg	-	2tj	1,010	0,318
Dg	-	4tj	1,852	0,071
Dg	-	2mj	2,778	0,008
Dg	-	3mj	2,526	0,016
Dg	-	6mj	5,725	< 0,001
Dg	-	1g	5,556	< 0,001
Dg	-	1,5g	6,566	< 0,001
Dg	-	2g	6,566	< 0,001
Dg	-	3g	4,967	< 0,001
Otp	-	2tj	0,337	0,738
Otp	-	4tj	0,505	0,616
Otp	-	2mj	1,431	0,160
Otp	-	3mj	1,179	0,246
Otp	-	6mj	4,378	< 0,001
Otp	-	1g	4,209	< 0,001
Otp	-	1,5g	5,219	< 0,001
Otp	-	2g	5,219	< 0,001
Otp	-	3g	3,620	< 0,001
2tj	-	4tj	0,842	0,405
2tj	-	2mj	1,768	0,085
2tj	-	3mj	1,515	0,138
2tj	-	6mj	4,714	< 0,001
2tj	-	1g	4,546	< 0,001
2tj	-	1,5g	5,556	< 0,001
2tj	-	2g	5,556	< 0,001
2tj	-	3g	3,957	< 0,001
4tj	-	2mj	0,926	0,360

<b>Pairwise Comparisons (Durbin-Conoverov test)</b>				
Par			Statistika	p
4tj	-	3mj	0,673	0,505
4tj	-	6mj	3,873	< 0,001
4tj	-	1g	3,704	< 0,001
4tj	-	1,5g	4,714	< 0,001
4tj	-	2g	4,714	< 0,001
4tj	-	3g	3,115	0,003
2mj	-	3mj	0,253	0,802
2mj	-	6mj	2,946	0,005
2mj	-	1g	2,778	0,008
2mj	-	1,5g	3,788	< 0,001
2mj	-	2g	3,788	< 0,001
2mj	-	3g	2,189	0,035
3mj	-	6mj	3,199	0,003
3mj	-	1g	3,031	0,004
3mj	-	1,5g	4,041	< 0,001
3mj	-	2g	4,041	< 0,001
3mj	-	3g	2,441	0,019
6mj	-	1g	0,168	0,867
6mj	-	1,5g	0,842	0,405
6mj	-	2g	0,842	0,405
6mj	-	3g	0,758	0,453
1g	-	1,5g	1,010	0,318
1g	-	2g	1,010	0,318
1g	-	3g	0,589	0,559
1,5g	-	2g	0,000	1,000
1,5g	-	3g	1,600	0,118
2g	-	3g	1,600	0,118



## 5.6. Relaps bolesti

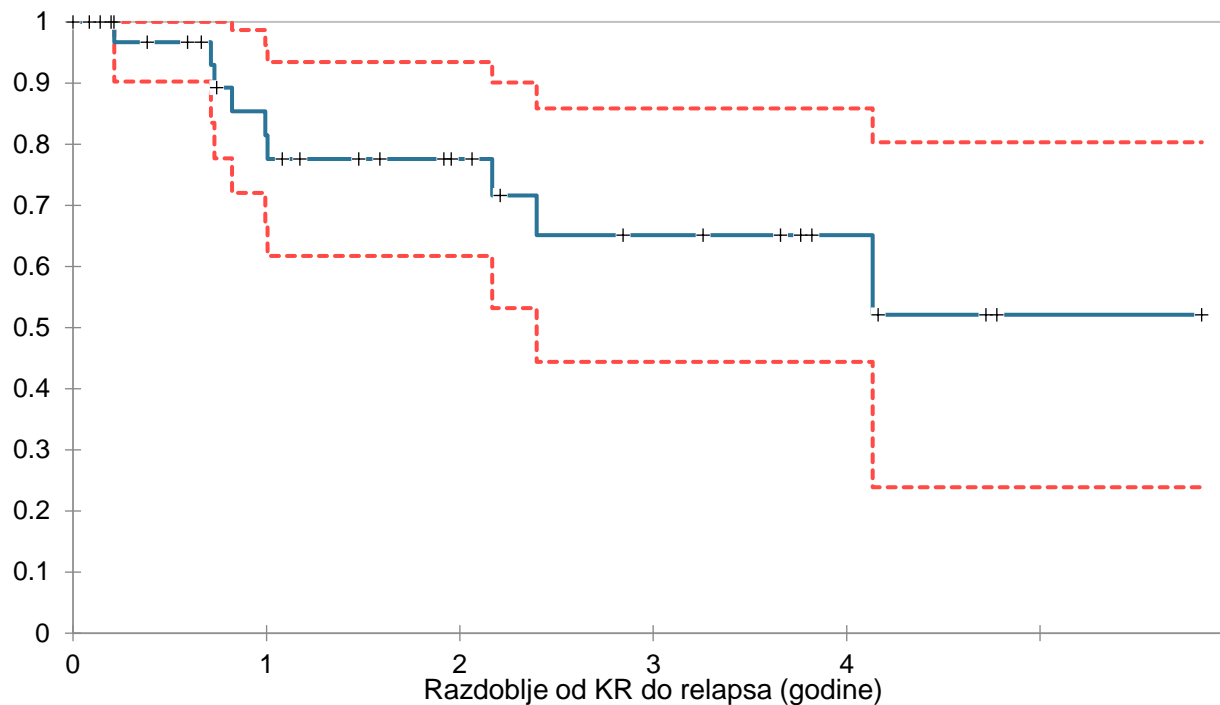
Od 37 osoba koje su postigle KR, 9 (24%) je doživjelo relaps AIHA-e. Vrijeme praćenja od postizanja KR do pojave relapsa ili kraja praćenja/smrtnog ishoda iznosi 24268 osoba-dana, tj. 66,49 osoba-godina. Medijan praćenja od KR do pojave relapsa iznosio je 1,48 (0,71 – 3,26) godina. Stopa incidencije relapsa bolesti iznosi 1,4 relapsa na 10 osoba-godina. Krivulja preživljenja prikazana je na Slici 15.

Podatci o relapsu nakon KR analizirani su uklapanjem u Coxov regresijski model proporcionalnih hazarda (prethodno detaljnije opisano), gdje je relaps postavljen kao „događaj“. Kreirani model nije bio statistički značajan. Rezultati ovog modela prikazani su u Tablici 11. Značajan utjecaj na pojavu relapsa nakon KR, uočen je unutar kovarijance „serološka podjela“: HR za cAIHA 2774 ( $6-12 \times 10^5$ ),  $p=0,011$ , a HR za mAIHA 181,7 (95% CI:  $3-11 \times 10^3$ ),  $p=0,038$ . Značajna kovarijanca bila je i dob pri dijagnozi: HR 0,34 (95% CI: 0-0,96),  $p=0,04$ .

**Tablica 11.** Rezultati Coxovog regresijskog modela proporcionalnih rizika, gdje je događaj relaps bolesti. Statistički značajni rezultati su podebljani.

Varijabla	Reg. koef. ( $\pm$ SE)	Wald $\chi^2$	Pr > $\chi^2$	HR (95% CI)
<b>Dob pri dijagnozi (u godinama)</b>	<b>-1,07 (<math>\pm</math>0,53)</b>	<b>4,16</b>	<b>0,04</b>	<b>0,34 (0 – 0,96)</b>
Charlsonin indeks komorbiditeta	-0,06 ( $\pm$ 0,03)	3,79	0,051	0,94 (0,89 – 1)
Spol: ženski (vs. muški)	-0,53 ( $\pm$ 0,98)	0,29	0,58	0,59 (0,09 – 4,02)
Etiologija: sekundarna (vs prim.) AIHA	-0,02 ( $\pm$ 1,2)	0	0,99	0,9 (0,09 – 10)
<b>Serologija: cAIHA (vs. wAIHA)</b>	<b>7,9 (<math>\pm</math>3,1)</b>	<b>6,54</b>	<b>0,011</b>	<b>2774 (<math>6-12 \times 10^5</math>)</b>
<b>Serologija: mAIHA (vs. wAIHA)</b>	<b>5,2 (<math>\pm</math>2,1)</b>	<b>6,14</b>	<b>0,013</b>	<b>181,7 (3 – <math>11 \times 10^3</math>)</b>
Serologija: PCH (vs. wAIHA)	-19,8 ( $\pm$ 9892)	0	1	(0 - $\infty$ )
Rituksimab	-3,72 ( $\pm$ 2,14)	3,01	0,083	0,024 (0 – 1,6)

HR – omjer hazarda (*hazard ratio*); Reg. Koef. – regresijski koeficijent; SE – standardna pogreška (*standard error*)



**Slika 15.** Kaplan-Meierova krivulja relapsa bolesti nakon postignute kompletne remisije (KR). Plava linija predstavlja krivulju relapsa, a isprekidane crvene linije predstavljaju granice 95% intervala pouzdanosti

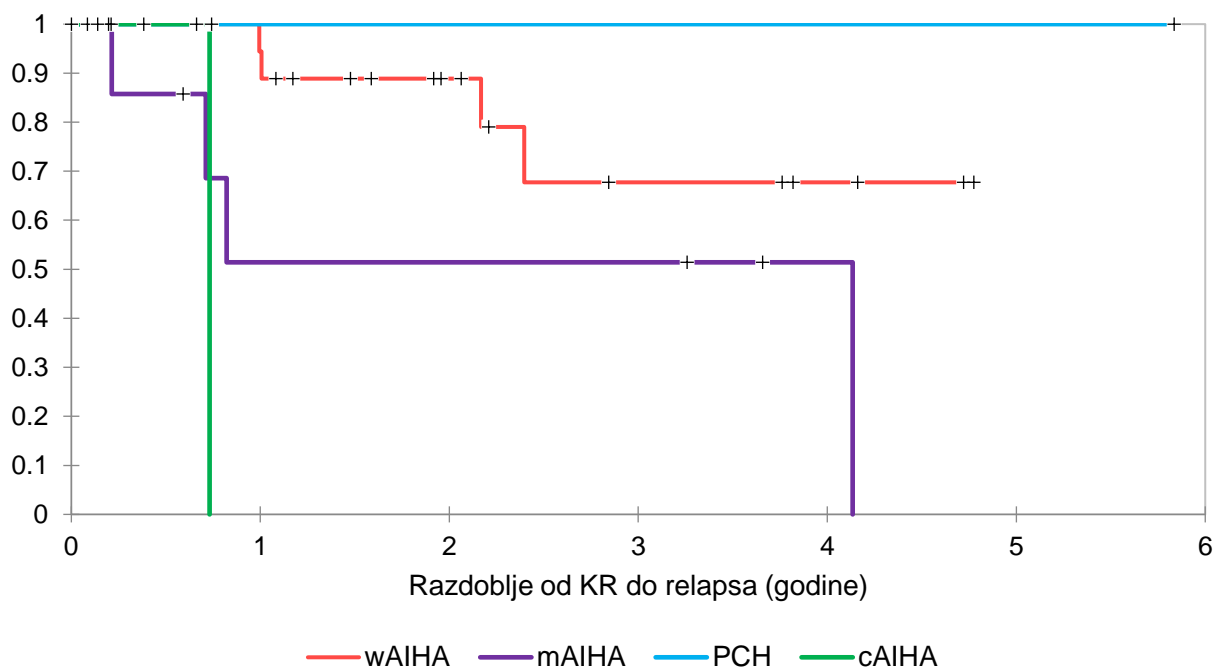
### 5.6.1. Relaps bolesti nakon KR prema serološkom tipu

Unutar subpopulacije ispitanika koji su postigli kompletnu remisiju, uočeno je 4 (16,6%) relapsa u skupini wAIHA-e, 1 (100%) u skupini cAIHA, 4 (40%) u skupini mAIHA te 0 u skupini PCH. Stopa incidencije relapsa za wAIHA-u, cAIHA-u, mAIHA-u te PCH redom iznosi 0,09; 1,3; 0,3 i 0 relapsa na 1 osobu-godinu. Podjela prema serološkom tipu prikazana je tablicom kontingencije (Tablica 12) te Kaplan-Meierovim krivuljama (Slika 16).

Uklapanjem podataka u prethodno opisani Coxov model, uočeni su statistički značajni omjeri hazarda za cAIHA-u te mAIHA-u: (HR za cAIHA 25,7 (95% CI: 1,5-446,8); HR za mAIHA 6,48 (95% CI: 1,11-37,8),  $p=0,038$ ).

**Tablica 12.** Tablica kontingencije za relaps bolesti prema serološkom tipu AIHA-e.

Serologija	Relaps	Cenzura	Ukupno	Ukupno osoba-godina	Stopa incidencije relapsa
Topla	4	20	24	45,73	0,087
Hladna	1	0	1	0,73	1,37
Miješana	4	6	10	13,53	0,296
PCH	0	2	2	6,49	0
Ukupno	9	28	37	66,48	0,135



**Slika 16.** Kaplan Meierove krivulje za relaps bolesti prema serološkom tipu

### 5.7. Pojava venskih tromboembolija

Od 64 ispitanika s DAT+ AIHA-om koji su praćeni kroz vrijeme, VTE je razvilo 5 (7,8%) ispitanika unutar razdoblja praćenja (146,15 osoba-godina). Vrijeme od dijagnoze do pojave VTE nije bilježeno.

## 6. Rasprava

Autoimunosne hemolitičke anemije su rijetka i heterogena skupina bolesti za koju mnogi kliničari smatraju da se lako liječi (kortikosteroidima) te da je njezin klinički značaj zanemariv u usporedbi s hematološkim poremećajima (32). Zbog rijetkosti ove skupine bolesti, izrazite heterogenosti (što pojedine oblike AIHA-e čini još rjeđima) i malenog kliničkog interesa, ovi su poremećaji općenito slabo istraženi (32)

Provedeno istraživanje po svom dizajnu je unicentrična retrospektivna kohortna studija jer sadrži sljedeće karakteristike: definiranu populaciju ispitanika (novodijagnosticirane DAT+ AIHA-e) praćenih kroz vrijeme (od dijagnoze do 24. travnja 2021.) te mogućnost izračuna rizika na temelju izloženosti (npr. *dob, spol, klasifikacija AIHA-e, rituksimab itd.*) u odnosu na ishod (smrt, KR, relaps) koji se dogodio tijekom vremena praćenja (Slika 2) (33). Osim navedenog, ovo istraživanje omogućuje i procjenu karakteristika novooboljelih punoljetnih bolesnika s DAT+ AIHA-om. U kohortu je uvršteno 71 ispitanik, a 9,9% kohorte je izgubljeno u praćenju: 64 ispitanika praćeno je u vremenu (*146,15 osoba-godina*) do smrti ili do 26. travnja 2021, a prosječan broj novootkrivenih AIHA-i na razini KBC-a Zagreb iznosi 10,9 ( $\pm 3,9$ ) slučajeva godišnje.

Ispitanici su bili približno jednako raspoređeni po spolu (51% ispitanica), a medijan dobi pri dijagnozi bio je 65 (50,5 – 72) godina. Gotovo svi bolesnici (92%) primali su kortikosteroidnu terapiju, a 34% ih je primilo rituksimab: najčešće u sklopu prve linije terapije ukoliko su zbog podležće bolesti imali indikaciju za primjenu rituksimaba. Većina bolesnika (70%) je imalo tešku anemiju pri dijagnozi te su pri dijagnozi primili transfuziju KE, 72% je hospitalizirano. Tijekom razdoblja praćenja (*146,15 osoba-godina*), VTE je imalo 7,8% praćenih ispitanika. Prema etiološkoj klasifikaciji, 83% ispitanika imalo je sekundarnu AIHA-u, s najčešćom podležćom bolesti limfoproliferativne etiologije (59% sekundarnih). Udio sekundarnih AIHA nešto je veći u usporedbi s hrvatskom prospektivnom multicentričnom studijom AIHA-e (2019. - 2020.) Radne

skupine za benigne hematološke bolesti KroHema u koju je bio uključen i KBC Zagreb (83% vs. 63%), gdje je 52% ispitanika sa sekundarnom AIHA-om imalo podležecu limfoproliferativnu bolest (34). Prema podacima iz svjetske literature, sekundarne AIHA-e čine oko polovinu AIHA u odraslih osoba (13,35). Unutar kohorte, 4 (5,6% kohorte) ispitanika imalo je sekundarnu AIHA-u koja je nastala kao posljedica alogene TMS: AIHA je poznata nuspojava alogenog TMS-a koja se javlja u 4-6% slučajeva transplantacije matičnih stanica (36). Veća odstupanja od literature i prospektivne studije KroHema zabilježena su u razmatranju serološke klasifikacije AIHA-e. Naime, provedenim retrospektivnim istraživanjem registrirano je 23% mAIHA-i (vs. 10% iz prospektivne multicentrične studije KroHema te podataka iz literature) (13,34); 77% ispitanika s mAIHA-om imalo je poznatu podležecu bolest (sekundarna AIHA), a najčešće se radilo o limfoproliferativnom poremećaju (Slika 3). Zanimljiv je i podatak o relativno malenom broju opaženih cAIHA (6%) što odstupa od očekivanog; odnosno od podataka iz literature (6% vs. 20-25%) (13) te prospektivne dvogodišnje studije KroHema (6% vs 15%) (34). Udio wAIHA odgovara podacima iz literature te podacima iz prospektivne studije (6% vs. 65-70% vs 75%) (13,34), udio PCH (4%) također odgovara navodima iz literature (1-3%) (13). Pitanje relativne disproporcije između mAIHA-e i cAIHA-e u odnosu na navode iz literature ostaje otvoreno: Potencijalno objašnjenje možda leži u mogućem različitom „pragu detekcije“ toplih i hladnih autoantitijela DAT-a između različitih ustanova (npr. korištenje poli- ili monospecifičnih reagensa (37)) pa je određeni broj ispitanika koji bi tradicionalno bili klasificirani kao cAIHA mogao biti uvršten među ispitanike s mAIHA-om; u literaturi je poznato da različite metode DAT-a imaju različitu osjetljivost i specifičnost (32,38,39).

Stopa smrtnosti iznosi 19,1 na 100 osoba-godina. Proučavana je smrtnost svih uzroka (*all-cause mortality*), a tijekom razdoblja praćenja umrlo je 44% kohorte: medijan dobi ispitanika prilikom postavljanja dijagnoze iznosila je 65 (50,5 – 72) godina, a mnogi su imali i komorbiditete. Medijan preživljenja iznosio je 5,23 godine (Q1: 2,68; Q3: nije postignut u razdoblju praćenja).

Prilikom analize preživljenja uočen je značajan utjecaj dobi, komorbiditeta te mAIHA-e u usporedbi s wAIHA-om. Dob pri dijagnozi statistički visokoznačajno utječe na smrtni ishod kohorte (HR 1,047 (95% CI: 1,0-1,1),  $p=0,001$ ), što znači da je za svaku dodatnu godinu pri dijagnozi ispitanik imao 4,7% veću vjerojatnost smrtnog ishoda, što vrijedi za bilo koji trenutak praćenja. Komorbiditeti izraženi u obliku Charlsoninog indeksa također značajno doprinose smrtnom ishodu (HR 1,28 (95% CI: 1,1-1,6),  $p=0,013$ ) – svaki dodatni bod na Charlsoninom indeksu povećao je vjerojatnost smrtnog ishoda za 28% u bilo kojem trenutku praćenja. Uzimajući u obzir da je većina bolesnika pri dijagnozi bila starije dobi te činjenicu da je Charlsonin indeks validirana metoda za procjenu očekivane smrtnosti u razdoblju od deset godina (28), ovi su rezultati u potpunosti očekivani. Unutar kohorte, ispitanici s mAIHA-om (HR 0,19 (95% CI: 0 – 0,7),  $p=0,011$ ) imali su 81% manju vjerojatnost od smrti u odnosu na one s wAIHA-om, u bilo kojem trenutku praćenja: ovi rezultati ponešto su u suprotnosti s dosadašnjom literaturom – naime, GIMEMA studija koja je proučavala 308 ispitanika isključivo s primarnom AIHA-om, povezuje mAIHA-u s agresivnijim tijekom, a takvi bolesnici zahtijevali su više linija terapije (40). No, navedena studija kao ni drugi podatci iz literature nisu pronašli povezanost smrtnog ishoda i serološkog tipa AIHA-e (32,40). Podatci o smrtnom ishodu oboljelih od mAIHA-e (ali i AIHA-e općenito) rijetki su u dosadašnjoj literaturi. Iako je nedostatak ovog dijela istraživanja je izostanak analize prema specifičnim uzrocima smrti, takva bi analiza zbog malog uzorka bolesnika bila otežana.

Koncentracija Hb kohorte pokazuje tendenciju porasta kroz vrijeme ( Slika 14). Naime, KR je postiglo 57,8% ispitanika, a stopa incidencije KR iznosi 9,2 na 10 osoba-godina, a medijan razdoblja od dijagnoze do KR iznosio je 226 (95% CI: 155-524) dana. Značajan utjecaj na postizanje KR uočen je za ženski spol, etiološki tip AIHA-e te za PCH u usporedbi s wAIHA-om. Žene oboljele od AIHA-e imale su 127% veću vjerojatnost za postizanje KR u bilo kojem trenutku praćenja (2,27 (95% CI: 1,01-4,9),  $p=0,037$ ). Bolesnici sa sekundarnom AIHA-om imali su 66% manju vjerojatnost razvoja KR u bilo kojem trenutku praćenja (HR 0,34 (95% CI: 0-0,95),

$p=0,039$ ). Bolesnici s PCH imali su statistički veću vjerojatnost od razvoja KR od ispitanika s wAIHA-om (HR 5,52 (95% CI: 1,1 – 27,73),  $p=0,038$ ) – iako je rezultat statistički značajan, svakako treba uzeti u obzir činjenicu da je u ovom istraživanju samo 3 bolesnika s PCH, od kojih je 2 (66%) ostvarilo KR; što je nedostatak ovog modela.

Relaps bolesti nakon KR doživjelo je 24% ispitanika koji su doživjeli KR. Stopa incidencije relapsa u vremenu praćenja (od KR do relapsa) iznosi 1,4 na 10 osoba-godina. Značajan utjecaj na relaps bolesti imali su dob te serološka klasifikacija bolesti. Dob pri dijagnozi (tj. dob pri uključivanju u kohortu) statistički povoljno utječe na relaps bolesti: za svaku godinu starosti pri dijagnozi, ispitanici su imali za 66% manju vjerojatnost razvoja relapsa bolesti (HR 0,34 (95% CI: 0-0,96),  $p=0,04$ ). Ovaj je nalaz usporediv s GIMEMA studijom bolesnika s primarnom AIHA-om, koji su također pronašli inverznu povezanost dobi i relapsa (40). Moguće objašnjenje je u tome da bolesnici koji su stariji imaju veću vjerojatnost smrtnog ishoda (što je pronađeno unutar ove studije) te su u slučaju smrtnog ishoda, za potrebe ove subanalize, cenzurirani. Model korišten u GIMEMA studiji to isključuje jer istraživači smrtni ishod uzimaju kao tzv. *competing risk* (40). Opisanim Coxovim modelom, serološka klasifikacija također je pokazala statistički značajan utjecaj na pojavu relapsa za bolesnike s cAIHA-om te mAIHA-om u usporedbama s wAIHA-om. Bolesnici s mAIHA-om imali su 81,7% veću vjerojatnost razvoja relapsa od ispitanika s wAIHA-om (HR za mAIHA 181,7 (95% CI:  $3-11 \times 10^3$ ), što je u skladu s literaturom koja povezuje mAIHA-e s agresivnijim tijekom (40). Unutar kohorte zabilježen je samo 1 ispitanik s cAIHA-om koji je postigao KR, a zatim je doživio i Re; iako postoji statistička značajnost unutar modela, nije moguće donositi zaključke o karakteristikama cAIHA-e u usporedbi s wAIHA-om na temelju jednog ispitanika. Barcellini i sur. nisu pronašli značajnu razliku u relapsu bolesti između bolesnika s wAIHA-om te onih s ostalim serološkim tipovima AIHA-e (32).

Analize ishoda istraživanja (smrtni ishod, postizanje KR i relaps bolesti nakon KR) učinjene opisanim Coxovim modelima imale su cilj identificirati potencijalne čimbenike koji utječu

na pojedini ishod, odnosno na tijek bolesti. Komorbiditeti su zbirno kvantificirani uklapanjem u Charlsonin indeks komorbiditeta, validiranu metodu koja se koristi u kliničkim istraživanjima za sumarno prilagođavanje za komorbiditete u statističkim modelima (28), koja je – kako je već navedeno, pokazala značajan utjecaj na smrtni ishod, ali ne i na KR te Re. Spol ima statistički značajan utjecaj na postizanje KR, gdje je uočeno da žene imaju 127% veću vjerojatnost postizanja KR od muškaraca. Razmatrajući etiološku podjelu AIHA-e, uočena je 66% manja vjerojatnost za postizanje KR u bolesnika sa sekundarnom AIHA-om, u usporedbi s onima s primarnom tijekom razdoblja praćenja. Nije uočen utjecaj spola niti etiološkog tipa AIHA-e na smrtni ishod ili relaps bolesti. Nadalje, pri analizi smrtnog ishoda i postizanja KR ispitivana varijabla bila je i koncentracija Hb pri dijagnozi; ova varijabla nije uključena u analizu bolesnika koji su nakon postizanja KR imali relaps bolesti – koncentracija Hb pri dijagnozi nije smatrana relevantnom budući da su ispitanici za ovu subanalizu praćeni od KR (kad je njihova koncentracija Hb u krvi bila unutar referentnog raspona) do relapsa, a ne od dijagnoze do relapsa. Zanimljivo je kako koncentracija Hb pri dijagnozi nije statistički značajno utjecala na postizanje KR, a niti na smrtnost. GIMEMA studija primarnih AIHA uočila je povezanost niže koncentracije Hb pri dijagnozi s povećanim relapsom bolesti, što u ovoj studiji nije ispitivano (40).

Potencijalni čimbenik koji bi mogao utjecati na tijek bolesti bila je i primjena rituksimaba koja se sve više koristi za liječenje ove skupine anemija, no njegov učinak u smanjenju smrtnosti i sprječavanju relapsa nedovoljno je razjašnjen (11,41): naime, kao što je već napomenuto, dvije dvostruko slijepe randomizirane studije pokazale su veću stopu oporavka nakon terapije kombinacijom rituksimaba i kortikosteroida u prvoj liniji liječenja, no nije razjašnjeno pridonosi li ovakav modalitet terapije dugotrajnoj remisiji (11,14,15). Ova studija pokazala je kako se rituksimab u Kliničkom bolničkom centru Zagreb najčešće primjenjuje u terapiji bolesnika sa sekundarnom AIHA-om uslijed limfoproliferativne bolesti, a ordinira se i kao druga linija terapije bolesnika s primarnom AIHA-om. U usporedbi s kortikosteroidnom terapijom, rituksimab je skuplja



terapijska opcija što predstavlja jedan od razloga zašto nije uobičajeno primijenjivati ga u prvoj liniji (42). Razvojem lijekova biosličnih (eng. *biosimilar*) rituksimabu došlo je do redukcije cijene rituksimabate time do češće i dostupnije primjene (43). Pulanić i sur. u prospektivnoj studiji bolesnika s AIHA-om uočili su povećanu učestalost primjene rituksimaba na razini KBC-a Zagreb u prethodne dvije godine u usporedbi s podacima iz ranijeg razdoblja (44,45). Ova retrospektivna kohortna studija nije pokazala statistički značajan utjecaj primjene rituksimaba u terapiji niti za jedan od ispitivanih ishoda (smrtni ishod, KR, Re). Prilikom tumačenja ovog rezultata važno je napomenuti kako je analizirana primjena rituksimaba neovisno o liniji terapije te je potrebno uzeti u obzir heterogenost AIHA-e, kao i činjenicu da je rituksimab najčešće (no ne i isključivo!) primijenjivan u pojedinih bolesnika s pratećim limfoproliferativnim poremećajem. Naime, uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice i relativno mali uzorak ispitanika, ova studija ne može negirati potencijalni učinak rituksimaba na tijek bolesti – drugim riječima, moguće je da biološka značajnost rituksimaba postoji, ali učinkovitost nije mogla biti ispitana ovakvim dizajnom studije.

Ispitivanje serološkog tipa AIHA-e učinjeno je postavljanjem modela uspoređujući redom cAIHA-u, mAIHA-u te PCH s najčešćim tipom, tj. wAIHA-om. Kao što je prethodno navedeno, mAIHA se u literaturi povezuje s agresivnim tijekom bolesti i potrebom za primjenom više linija terapije, no u literaturi nije opisan učinak mAIHA-e (u odnosu na druge serološke tipove) na smrtni ishod. Unutar ove retrospektivne kohorte podatci ukazuju kako mAIHA povoljno utječe na smrtnost, uz redukciju vjerojatnosti smrti za 81% u odnosu na wAIHA-u za bilo koji trenutak razdoblja praćenja. Nadalje, dihotomno je pronađena i za 81,7% veća vjerojatnost relapsa bolesti u ispitanika s mAIHA-om u odnosu na one s wAIHA-om. Uzimajući u obzir da je ispitivana smrtnost svih uzroka, nije isključena mogućnost da je ovakva dihotomija produkt slučajnosti, tj. da, unatoč statističkoj značajnosti, mAIHA nema biološki povoljan utjecaj na redukciju smrtnosti.

Učinak mAIHA-e na postizanje KR nije uočen. Unatoč statističkoj značajnosti, o utjecaju PCH na KR te cAIHA-e na Re nije moguće donositi zaključke zbog iznimno malenog broja opažanja.

Prednosti provedene studije su konsekutivno uključivanje svih novootkrivenih DAT+ AIHA te kontinuirano praćenje kroz vrijeme prateći klinički tijek bolesti što je omogućilo izračun stope smrtnosti, KR i Re. Nedostatci studije su provođenje ispitivanja na razini jednog centra, sekundarni izvori podataka: podatci su retrospektivno preuzeti iz medicinske dokumentacije koja je neujednačeno napisana za pojedine bolesnike, a podatci za pojedine vremenske točke često nedostaju. Dodatni nedostatci su i relativno malen uzorak (posebice uz činjenicu da se radi o heterogenoj skupini bolesti podijeljenoj kasnije u analizi na manje podskupine) te rasipanje ispitanika u praćenju (9,9% kohorte).

Znanstveni doprinos provedenog istraživanja uključuje izračun stope incidencije za razvoj KR, relapsa (*u vremenu nakon postizanja KR*) te stope smrtnosti; kao i identifikacija čimbenika koji utječu na tijek bolesti.

## 7. Zaključak

Provedenim retrospektivnim kohortnim istraživanjem novooboljelih odraslih bolesnika s DAT+ AIHA-om u razdoblju od 1.1.2014. do 30.6.2020., s praćenjem u vremenu do 26.4.2021. uočeno je:

1. U navedenom razdoblju bilo je 71 novooboljelih, od kojih su 51% bile žene; najčešći tip AIHA-e bila je sekundarna (83%) te topla (73%) AIHA.
2. Stopa smrtnosti iznosi 19,1 na 100 osoba-godina, a vjerojatnost za smrtni ishod značajno povećavaju dob pri dijagnozi, komorbiditeti (Charlsonin indeks), dok ju mAIHA u usporedbi s wAIHA-om smanjuje.
3. Stopa incidencije kompletne remisije iznosi 9,2 na 10 osoba-godina. Vjerotnost za postizanje KR statistički značajno povećava ženski spol (statistički i PCH u usporedbi s wAIHA-om, no PCH je imalo samo 3 ispitanika, od kojih su 2 postigla KR). Vjerojatnost za postizanje KR smanjuje sekundarna AIHA u usporedbi s primarnom.
4. Stopa incidencije relapsa nakon postignute KR iznosi 1,4 na 10 osoba-godina. Vjerojatnost za razvoj relapsa bolesti povećava mAIHA u usporedbi s wAIHA-om (statistički i cAIHA u usporedbi s mAIHA-om, no radi se o samo jednom bolesniku koji je postigao KR, a zatim razvio relaps). Vjerojatnost za razvoj relapsa bolesti smanjuje dob pri uključivanju u kohortu.

Provedenim istraživanjem nije uočen statistički značajan utjecaj primjene rituksimaba na smrtni ishod, postizanje kompletne remisije niti relapsa bolesti. Dihotomno je uočen smanjen rizik (eng. *hazard*) za smrtni ishod (neovisno o uzroku smrti) te povećan rizik (eng. *hazard*) za relaps bolesti u ispitanika s mAIHA-om u odnosu na najčešći serološki tip, wAIHA-u.

## 8. Zahvale

Prije svega, želim zahvaliti svom mentoru, doc. prim. dr. sc. Draženu Pulaniću, bez kojeg ovaj rad ne bi bio moguć, za podršku i motivaciju u pisanju ovog rada, ali i za to što mi je omogućio izradu znanstvenog diplomskog rada u jeku pandemije kad je to bilo otežano. Doc. Pulanić također je zaslužan i za razvitak mog interesa prema hematologiji koji se počeo razvijati na 4. godini studija.

Dr. sc. Mireli Raos dugujem veliku zahvalu jer je zaslužna za probir bolesnika te je započela s prikupljanjem podataka i time uvelike olakšala moj zadatak. Bez nje ovaj diplomski rad također nikako ne bi bio moguć. Također želim zahvaliti i doc. dr. sc. Mariju Šekeriji koji mi je dao vrijedne savjete i naputke vezane za epidemiološku terminologiju ovog rada te prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji za raspravu o statističkoj analizi preživljenja. Želim zahvaliti i osoblju Zavoda za hematologiju koje me je srdačno ugostilo prilikom izrade ovog istraživanja. Veliko hvala i prof. dr. sc. Evelini Miščin koja se velikodušno ponudila lektorirati englesku inačicu sažetka svim studentima.

Budući da ovaj rad predstavlja završetak mog studija, ovdje bih želio zahvaliti svojim prijateljima koje sam upoznao na fakultetu i kolegama koji zajedno sa mnom završavaju ovu trku. Također želim zahvaliti i onim nastavnicima kojima je uvijek bilo stalo do obrazovanja budućih liječnika te su se nesebično trudili prenijeti svoje znanje i vještine. Posebnu zahvalu dugujem prof. dr. sc. Lovorki Grgurević, koja mi je usadila znanstveni pristup razmišljanja i od koje sam, kroz dugogodišnju suradnju i volontiranje na Proteomici mnogo naučio tijekom studija.

Naposljetku, najviše želim zahvaliti svojim roditeljima Josipu i Zorici, bratu Nini, djedu Stjepanu i baki Ani te ostatku svoje obitelji, kao i prijateljima na kontinuiranoj ljubavi i podršci koju mi pružaju u svemu što činim i bez kojih ne bih mogao završiti ovaj studij.

*Soli Deo gloria!*

## 9. Literatura

1. Andreis I. Eritrociti. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Knjiga prva. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Str. 820-831.
2. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva, Switz World Heal Organ. 2011;1–6.
3. De Benoist B, McLean Erin, Egli I, Cogswell M. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO Glob Database Anaemia Geneva, World Heal Organ 2008.
4. Adamson JW, Longo DL. Anemia and Polycythemia. U: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, ur. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20. izd. New York: McGraw Hill; 2018. Str. 385-394
5. Watson HG, Culligan DJ, Manson LM. Haematology and Transfusion Medicine. U: Ralston SH, Penman ID, Strachan MWJ, Hobson RP, ur. Davidson's Principles and Practice of Medicine. 23. izd. London: Elsevier; 2018. Str. 911-979.
6. Wilkinson IB, Raine T, Wiles K, Goodhart A, Catriona H, O'Neill H. Oxford Handbook of Clinical Medicine. 10. izd. Oxford: Oxford University Press; 2017.Str. 323-376.
7. Azam B, Ur Rahman S, Irfan M, Awais M, Alshehri OM, Saif A, i sur. A Reliable Auto-Robust Analysis of Blood Smear Images for Classification of Microcytic Hypochromic Anemia Using Gray Level Matrices and Gabor Feature Bank. Vol. 22, Entropy . 2020. 22(9), 1040
8. Bachman AL. Macrocytic Hyperchromic Anemia in Early Infancy: Report Of a Case and Review of the Literature. Am J Dis Child 1936 Sep 1;52(3):633–47.
9. Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, Stanley L. Robbins and RSC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Str. 441-494.
10. Sawhney H, Weedon J, Gillette P, Solomon W, Braverman A. Predilection of hemolytic anemia-associated leg ulcers for the medial malleolus. Vasa - J Vasc Dis. 2002;31(3):191–3.
11. Jäger U, Barcellini W, Broome CM, Gertz MA, Hill A, Hill QA, i sur. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. Blood Rev. 2020;41:100648.

12. Barcellini W, Zaninoni A, Giannotta JA, Fattizzo B. New Insights in Autoimmune Hemolytic Anemia: From Pathogenesis to Therapy. *J Clin Med*. 2020;9(12):3859.
13. Qasim S, Niss O, Ware RE, Grimes AB. Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA). U: Despotovic JM, ur. *Immune Hematology*. Cham: Springer; 2018. Str. 83-152.
14. Michel M, Terriou L, Roudot-Thoraval F, Hamidou M, Ebbo M, Le Guenno G, i sur. A randomized and double-blind controlled trial evaluating the safety and efficacy of rituximab for warm auto-immune hemolytic anemia in adults (the RAIHA study). *Am J Hematol*. 2017;92(1):23–7.
15. Birgens H, Frederiksen H, Hasselbalch HC, Rasmussen IH, Nielsen OJ, Kjeldsen L, i sur. A phase III randomized trial comparing glucocorticoid monotherapy versus glucocorticoid and rituximab in patients with autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2013;163(3):393–9.
16. Yeşilbaş O. Current treatment options for severe autoimmune hemolytic anemia. *Turk Peditr Ars [Internet]*. 2018 Jun 1;53(2):129–30.
17. Barcellini W. Current treatment strategies in autoimmune hemolytic disorders. *Expert Rev Hematol*. 2015 Oct;8(5):681–91.
18. Berentsen S. New Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cold Agglutinin-Mediated Autoimmune Hemolytic Anemia. *Front Immunol*. 2020;11(April):12–4.
19. Michalak SS, Olewicz-Gawlik A, Rupa-Matysek J, Wolny-Rokicka E, Nowakowska E, Gil L. Autoimmune hemolytic anemia: current knowledge and perspectives. *Immun Ageing*. 2020;17(1):1–16.
20. Berentsen S, Randen U, Oksman M, Birgens H, Tvedt THA, Dalgaard J, i sur. Bendamustine plus rituximab for chronic cold agglutinin disease: results of a Nordic prospective multicenter trial. *Blood*. 2017;130(4):537–41.
21. Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. *Hematol (United States)*. 2018(1):382–9.
22. Jaime-Pérez JC, Elva P, Aguilar-Calderón, Salazar-Cavazos L, Gómez-Almaguer D. Evans syndrome: Clinical perspectives, biological insights and treatment modalities. *J Blood Med*. 2018;9:171–84.
23. Audia S, Grienay N, Mounier M, Michel M, Bonnotte B. Evans ' Syndrome : From

- Diagnosis to Treatment. 2020;1–22.
24. XLSTAT [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://www.xlstat.com/en/>
  25. The-jamovi-project. JAMOVI [Internet]. 2020. Dostupno na: <https://www.jamovi.org>
  26. diagrams.net [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://app.diagrams.net/>
  27. BioRender.com [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://app.biorender.com/>
  28. Austin SR, Wong Y-N, Uzzo RG, Beck JR, Egleston BL. Why Summary Comorbidity Measures Such As the Charlson Comorbidity Index and Elixhauser Score Work. *Med Care* [Internet]. 2015 Sep;53(9):e65–72. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23703645>
  29. Rosvall M, Bergstrom CT. Mapping Change in Large Networks. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan 27;5(1):e8694. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008694>
  30. RAWGraphs [Internet]. 2021. Available from: <https://app.rawgraphs.io/>
  31. Paradžik F. Coxov regresijski model [Internet]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za matematiku; 2017. Dostupno na: <https://repozitorij.mathos.hr/islandora/object/mathos:215>
  32. Barcellini W, Fattizzo B. The Changing Landscape of Autoimmune Hemolytic Anemia. Vol. 11, *Frontiers in Immunology* . 2020. p. 946.
  33. Olaf M. Dekkers, MD, PhD, MA Ms, Matthias Egger, MD Ms, Douglas G. Altman Ds, Jan P. Vandenbroucke, MD P. Distinguishing Case Series From Cohort Studies. *Ann Intern Med*. 2012;154(4):253–9.
  34. Pulanić D, Raos M, Salai G, Periša V, Mitrović Z, Blaslov V, i sur. Karakteristike novooboljelih bolesnika s autoimunosnom hemolitičkom anemijom: prospektivna opservacijska multicentrična studija KroHema. *Bilten Krohema*. 2021;13(1):50–1. Dostupno na: <https://www.krohema.hr/wp-content/uploads/2021/05/KroHem-bilten-13.1.pdf>
  35. Zanella A, Barcellini W. Treatment of autoimmune hemolytic anemias. *Haematologica*. 2014;99(10):1547–54.
  36. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. Management of refractory autoimmune hemolytic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: current perspectives. *J Blood Med*. 2019;10:265–78.

37. Win N, Tiwari D, Keevil VL, Needs M, Lakhani A. Mixed-type autoimmune haemolytic anaemia: Unusual cases and a case associated with splenic T cell angioimmunoblastic non-Hodgkins lymphoma. *Hematology*. 2007;12(2):159–62.
38. Novaretti MCZ, Jens E, Pagliarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J Clin Lab Anal*. 2004;18(5):255–8.
39. Dittmar K, Procter JL, Cipolone K, Njoroge JM, Miller J, Stroncek DF. Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusion*. 2001;41(10):1258–62.
40. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, Radice T, Nichele I, Di Bona E, i sur. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood*. 2014;124(19):2930–6.
41. Rodrigo C, Rajapakse S, Gooneratne L. Rituximab in the treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(5):709–19.
42. Murakhovskaya I. Rituximab Use in Warm and Cold Autoimmune Hemolytic Anemia. *J Clin Med [Internet]*. 2020 Dec 13;9(12):4034.
43. Rognoni C, Bertolani A, Jommi C. Budget impact analysis of rituximab biosimilar in Italy from the hospital and payer perspectives. *Glob Reg Heal Technol Assess Ital North Eur Spanish [Internet]*. 2018 Jan 29;2018:228424031878428. Dostupno na: <https://journals.aboutscience.eu/index.php/grhta/article/view/440>
44. Pulanic D, Raos M, Salai G, Vodanovic M, Boban A, Mikulic M, i sur. Prospective Analysis of Newly Diagnosed Autoimmune Hemolytic Anemia: A Single Center Study. *EHA2021 Virtual Congress*. 2021. EHA Library. Pulanic D. 06/09/21; 324216; PB1539.
45. Pulanić D, Raos M, Vinković M, Kilić P, Ranković E, Samardžić A, i sur. Characteristics of newly diagnosed autoimmune hemolytic anemia: 5-years of single-center experience. *U: European Hematology Association Congress*. 2019. PB1963.



## 10. Životopis

Rođen sam 3. travnja 1996, a trenutno sam student 6. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam u Belišću, a opću gimnaziju u Valpovu. Tijekom studija sudjelovao sam u održavanju nastave kao demonstrator iz sljedećih kolegija: Medicinska biologija (2016.-2018.), Fiziologija i Imunologija (2017.-2018.) te Patofiziologija (2018.–2020.).

U razdoblju od 2018. do 2020. volontirao sam pri Klinici za bolesti srca i krvnih žila Kliničkog bolničkog centra Zagreb na međunarodnom registru akutnog koronarnog sindroma „*International Survey of Acute Coronary Syndrome – Transitional Countries (ISACS-CT)*“ za čiju je djelatnost studentski tim 2019. godine dobio Rektorovu nagradu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici te sam koautor nekoliko sažetaka objavljenih na kardiološkim kongresima. Tijekom 2018./2019. akademske godine sudjelujem u vodstvu Studentske sekcije za kardiologiju kao član Vijeća sekcije te kao predavač u javnozdravstvenom projektu Čuvajmo naše srce.

Od kraja 2017. godine, pod mentorstvom prof. dr. sc. Lovorke Grgurević, volontiram na Odjelu za proteomiku pri Centru za translacijska i klinička istraživanja; 2018. godine položio sam tečaj za rad s eksperimentalnim životinjama, a 2020. završio sam besplatni online tečaj „*Statistics in Medicine*“ u organizaciji Sveučilišta Stanford na platformi za web-učenje *Lagunita*. Iste godine sam dobio Dekanovu nagradu za najbolji znanstveni rad naslovljen: „*Istraživanje uloge solubilnog receptora tipa III za transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (sTGF $\beta$ RIII) kao biljega upalnog stanja*“. Autor ili koautor sam nekoliko radova objavljenih u CC indeksiranim časopisima. 2020. godine, pod mentorstvom doc. dr. sc. Dražena Pulanića, pri Zavodu za hematologiju KBC-a Zagreb, započinjem izradu znanstvenog rada na temu autoimunskih hemolitičkih anemija koji naposljetku postaje moj diplomski rad. Zanimaju me translacijska istraživanja i područja unutar interne medicine.