



ETIČKI ASPEKTI TRANSFUZIJSKOG LIJEČENJA

Zibar L.^{1,2,3}

¹ Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

² Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

³ Hrvatska liječnička komora

ladazibar@gmail.com

Nedavno sam susrela prijateljicu iz djetinjstva u završnom stupnju zloćudne bolesti. Bila je prisebna, orijentirana, nasmijana, teže pokretna zbog općeg lošeg stanja i zbog obilnog malignog ascitesa. Bila je hospitalizirana putem hitne službe radi reevaluacije bolesti i tada je utvrđen završni stupanj bolesti. Teže je disala i brzo se umarala. Nisam sigurna je li bila stvarno svjesna svoje tužne i vremenski kratke prognoze. Kaže doduše, usput, da joj jest bilo rečeno da nema aktivnog liječenja i da će uskoro kući. Priča mi da ima dvoje djece srednoškolske dobi i supruga. Raduje se povratku kući, bit će kod mame, „*tamo joj je tako lijepo, osobito u dvorištu*“. Svi njezini će doći i svi će joj ugađati... Imala je koncentraciju hemoglobina u krvi 70 g/l, saturaciju arterijske krvi kisikom 92 %, sistolički krvni tlak 85 mmHg i srčanu frekvenciju 100/min. Ti su nalazi bili bez promjene u odnosu na nalaze pri primitku u bolnicu prije tjedan dana. Bila je bez vidljivih znakova krvarenja. „*Samo kad ne bih bila tako strašno slaba i kad bih imala više zraka*.“ rekla mi je. Postavlja se pitanje zašto ne dobije transfuziju krvi. U razmatranjima o transfuziji krvi u palijativnoj skrbi navode se prednosti i rizici, poput olakšanja simptoma, s jedne strane, i zabilježene veće smrtnosti ubrzo nakon transfuzije, s druge strane. (*Raval, J.S. Transfusion as a Palliative Strategy. Curr Oncol Rep 21, 92 (2019)*)

I tako krećem u navođenje etičkih dvojbi i etičkih područja koja se susreću povezana s transfuzijom krvi i krvnih pripravaka. Namjerno izbjegavam započeti s temom odbijanja transfuzije krvi Jehovinih svjedoka na koju, prema pretrazi pomoću hrvatskih riječi „*etika*“ i „*transfuzija*“, nailazim gotovo isključivo, barem na prvim stranicama ekrana. **Etička područja u transfuzijskoj medicini** puno su šira od aspekata koji se tiču samo Jehovinih svjedoka. U primjeru s početka prepoznajemo područje indikacija za transfuziju krvi, osobito u području palijativne skrbi. Sljedeća područja odnose se na poznavanje pravila – i propisa i struke, filozofiju etike, (ne) profitabilnost, kontraindikacije za darovanje krvi, informiranost i pristanke, hemovigilanciju, osiguranje dostatnosti transfuzije krvi i razvoj transfuzijske medicine.

Odnos etike i zakona je paralelan i trebao bi biti usklađen. No, to nije uvijek tako. Zakon je često etički neutralan (Kant) pa je za optimalnu primjenu propisa u praksi nužna i etika, kao svojevrsni *fine tuning* u postupanju, koja medicinskom profesionalizmu daje humanističko obilježje. Kako filozofija razlikuje moral od etike, pojednostavit ću distinkciju i reći da je moral intrinzični osjećaj za dobro, a da etika predstavlja načela dobrog postupanja. Tako je etika u transfuziji propisana etičkim kodeksom kojega je po prvi put donio International Society of Blood Transfusion 1980. godine. Aktualna je verzija iz 2017. godine. (https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/ISBT_Code_Of_Ethics_English.pdf) Na internetu je taj **kodeks** dostupan na osam jezika, među kojima nema hrvatskoga (!?). U Kodeksu se polazi od načela da opskrba krvlju i krvnim pripravcima treba biti sigurna, učinkovita i dostatna. A etičnost se osigurava prema darovatelju (donoru) i primatelju krvi/krvnih pripravaka. Pri tomu je najvažnija odgovornost stručnjaka. Uvijek je nužno uvažiti načela biomedicinske etike – autonomiju, neškodljivost, dobrobit i pravdu, pa se i odredbe Kodeksa temelje na tim načelima.

U vezi s etičnošću **prema primatelju** krvi neizostavno je osigurati njegov informirani pristanak. Ukoliko ga se ne može dobiti, tada treba postupiti u najboljem interesu pacijenta. U svakom slučaju treba poštovati anticipirane naredbe (eng. *advanced directive*), ukoliko postoje. I, evo nas već kod teme prava Jehovinih svjedoka – prava na odbijanje transfuzijskog liječenja. Sukobi u argumentaciji za donošenje odluke liječnika postoje na barem tri razine – poštovanje autonomije, odredba zakona o spašavanju života u hitnim stanjima i bez pristanka pacijenta i odgovornost pred Europskim sudom za ljudska prava (ESLJP). O tome detaljno pišemo i u članku u Liječničkom vjesniku iz 2017. godine, 139 (3–4) – Pravo Jehovinih svjedoka na ostvarivanje kirurške zdravstvene zaštite u Republici Hrvatskoj – prema vrijedećim zakonima (de lege lata), Roksandić Vidlička, S., Zibar, L. i dr. Pripadnici vjerske zajednice Jehovinih svjedoka odbijaju transfuziju pune krvi, eritrocita i leukocita, seruma i plazme. (*Petrini C. Ethical and legal aspects of refusal of blood transfusions by Jehovah's Witnesses, with particular reference to Italy. 2014;12 Suppl 1:s395–401.*) Oni vjeruju da Biblija zahtijeva „apstiniranje od krvi“, budući da oni krv

smatraju svetom jer predstavlja vrijedan dar života. (*Ariga T. Refusal of blood by Jehovah's Witnesses and the patient's right to self-determination. Leg Med (Tokyo). 2009;11 Suppl 1:S138–40.*) Kršenje ovih religijskih uvjerenja ima za posljedicu izolaciju iz vjerske zajednice i ekskomunikaciju iz Crkve. (*Z. B. Odbijanje transfuzije krvi zbog vjerskih razloga – pravni aspekti. Hrvatska pravna revija. 2005;9:71–7.*) Tzv. pravo na samoodređenje pretpostavlja pravo davanja ili uskrate pristanka na preporučeni medicinski postupak. Ono se primjenjuje čak i kada prema mišljenju ordinirajućeg liječnika odbijanje pojedinog postupka može rezultirati pogoršanjem pacijentovog zdravlja ili njegovom smrću. Ilustrativna je presuda prizivnog suda pokrajine Ontario u Kanadi iz 1990. godine, prema kojoj čak i u slučaju hitnosti liječnik mora poštivati pacijentove prijašnje upute, pa bilo to i odbijanje transfuzije krvi. (*Bodnaruk ZM, Wong CJ, Thomas MJ. Meeting the clinical challenge of care for Jehovah's Witnesses. Transfusion medicine reviews. 2004;18(2):105–16.*) Kod odbijanja transfuzije krvi u osnovi se radi o sukobu između interesa države da zaštiti život i zdravlje svojih građana i prava pojedinca na osobnu autonomiju u pogledu fizičkog integriteta i vjerskih uvjerenja. Kada postoji takav sukob država je dužna primijeniti načelo proporcionalnosti. (<http://hudoc.echr.coe.int/eng?i=001-99221>) Tekst o proporcionalnosti sadržan je u članku 16. Ustava Republike Hrvatske: „Slobode i prava mogu se ograničiti zakonom samo da bi se zaštitila sloboda i prava drugih ljudi te pravni poredak, javni moral i zdravlje. Svako ograničenje slobode ili prava mora biti razmjerno naravi potrebe za ograničenjem u svakom pojedinom slučaju.“ (www.zakon.hr/z/94/Ustav-Republike-Hrvatske) ESLJP smatra da pravo pojedinca da sam izabere svoj način života uključuje i mogućnost bavljenja aktivnostima koje je moguće u fizičkom pogledu smatrati štetnima ili opasnim po njega. „U području medicine, čak i kad odbijanje određenog medicinskog postupka može dovesti do smrtnog ishoda nametanje medicinskog postupka bez pristanka mentalno zdravog, odraslog pacijenta predstavljalo bi zadiranje u njegov tjelesni integritet i povredu prava zaštićenih člankom 8. Konvencije.“ (<http://hudoc.echr.coe.int/eng?i=001-99221>) Konvencija za zaštitu ljudskih prava i temeljnih sloboda iz Rima, od 4. studenoga 1950.

(*„Narodne novine – Međunarodni ugovori“ br. 18/97., 6/99. – proč. tekst, 8/99 – ispr., 14/02.*) – s izmjenama i dopunama iz Protokola br. 14. uz Konvenciju koji je stupio na snagu 1. lipnja 2010. (*„Narodne novine – Međunarodni ugovori“ br. 1/06.*) u članku 8. kaže da „Svatko ima pravo na poštovanje svoga privatnog i obiteljskog života, doma i dopisivanja.“ i da se „Javna vlast neće miješati u ostvarivanje tog prava, osim u skladu sa zakonom i ako je u demokratskom društvu nužno radi interesa državne sigurnosti, javnog reda i mira, ili gospodarske dobrobiti zemlje, te radi sprječavanja nereda ili zločina, radi zaštite zdravlja ili morala ili radi zaštite prava i sloboda drugih.“ (https://www.usud.hr/sites/default/files/doc/KONVENCIJA_ZA_ZASTITU_LJUDSKIH_PRAVA_I_TEMELJNIH_SLOBODA_s_izmjenama_i_dopunama_iz_PROTOKOLA_br._14.pdf) ESLJP se nastavlja na Konvenciju i kaže da su „Brojne nadležnosti razmatrale slučajeve Jehovinih svjedoka koji su odbili transfuziju krvi i zaključile da se javni interes u očuvanju života i zdravlja pacijenta, iako je on nesporno zakonit i vrlo snažan, treba podrediti snažnijem interesu pacijenta da sam odluči kako će živjeti.... Naglašeno je da su sloboda izbora i samoodređenje temeljne sastavnice života te da se država, u slučaju nepostojanja potrebe za zaštitom trećih strana ... mora suzdržavati od zadiranja u slobodu izbora pojedinca u području zdravstvene zaštite, jer se takvim zadiranjem može samo umanjiti vrijednost života, a nikako povećati.“ Da bi mogle interferirati u ova prava pacijenta, nacionalne zdravstvene vlasti dužne su dokazati postojanje neodložne društvene potrebe (npr. zaštita djece i osoba koje ne mogu samostalno donositi odluke) i pronaći relevantne i dostatne dokaze kojima je moguće opravdati ograničenje prava Jehovinih svjedoka da odbiju transfuziju krvi. (<http://hudoc.echr.coe.int/eng?i=001-99221>) Ovdje moram spomenuti da je međunarodni pravni standard sadržan u Europskoj konvenciji za zaštitu ljudskih prava i temeljnih sloboda da „Pravo na život nije apsolutno pravo.“ (članak 2). (NN, *Međunarodni ugovori, br. 18/1997, 6/1999, 8/1999, 14/2002*) Je li nedavanje transfuzije krvi koje bi spasilo život bolesniku koji je Jehovin svjedok i to odbija vrsta sudjelovanja u asistiranom suicidu? Članak 114. Kaznenog zakona Republike Hrvatske kaže „Tko navede drugoga na samoubojstvo ili mu iz niskih pobuda pomogne u samoubojstvu pa ono bude počinjeno ili pokušano, kaznit će se kaznom zatvora do tri godine.“ (NN 125/11, 56/15, 61/15) U presudi ESLJP-a 2010. u predmetu *Moskovski Jehovini svjedoci i ostali protiv Rusije*, ESLJP je naglasio da se odbijanje primanja transfuzije krvi ne može izjednačiti sa samoubojstvom zato što se okolnosti pacijenta koji traži ubrzanje smrti prekidom liječenja razlikuju od okolnosti u kojima se nalaze pacijenti koju se, poput Jehovinih svjedoka, samo odlučuju za određeni medicinski postupak, pri čemu i dalje žele ozdraviti i ne odbijaju svako liječenje. (*Zahtjev br. 302/02, pravomoćna presuda od 22.11.2010. http://hudoc.echr.coe.int/eng?i=001-99221.*) Tako da izostanak primjene transfuzije krvi nije asistiran suicid. Članak 181. Kaznenog zakona kaže „Doktor medicine, doktor dentalne medicine ili drugi zdravstveni radnik koji obavljajući zdravstvenu djelatnost primijeni očito nepodobno sredstvo ili način liječenja ili na drugi način očito ne postupi po pravilima zdravstvene struke ili očito nesavjesno postupi pa time prouzroči pogoršanje bolesti ili narušenje zdravlja druge osobe, kaznit će se kaznom zatvora do jedne godine.“ (zakonopropisi.

com/hr/zakon/kazneni-zakon/134-clanak-povreda-prava-iz-socijalnog-osiguranja) Dakle, oblik nesavjesnog ponašanja liječnika može biti i ukoliko u bolesnika nastupi pogoršanje bolesti. Do čega može doći zbog izostanka primjene transfuzije krvi. Zakon je u Hrvatskoj dodatno nejasan i proturiječan jer se informirani pristanak traži bezuvjetno, ali s druge strane zakon daje mogućnost da ga se ne treba tražiti kada je intervencija neodgodiva. Prema Zakonu o zaštiti prava pacijenata, članak 16, „Pacijent ima pravo prihvatiti ili odbiti pojedini dijagnostički, odnosno terapijski postupak, osim u slučaju neodgodive medicinske intervencije čije bi nepoduzimanje ugrozilo život i zdravlje pacijenta ili izazvalo trajna oštećenja njegovoga zdravlja.“ I prema Zakonu o liječništvu, članak 18, „... U hitnim stanjima liječnik je dužan pružiti pomoć svakom bolesniku bez odlaganja... Hitnim stanjima... smatraju se ona stanja kod kojih bi zbog nepružanja liječničke pomoći mogle nastati trajne štetne posljedice po zdravlje (invalidnost) ili po život bolesnika.“ Interpretacija Zakona o liječništvu i Zakona o zaštiti prava pacijenata je sljedeća – preporučuje se dati transfuziju krvi bez pitanja, u slučaju neodgodive medicinske intervencije kada bi nedavanje ugrozilo život (što je zapravo upitno je li u skladu s Konvencijom). Etičnost prema primatelju krvi nadalje uključuje povjerljivost informiranja i anonimnost između donora i primatelja. Osiguranje sigurnosti pripravaka za primatelja (uključujući testove pripravaka na zarazne bolesti) je *conditio sine qua non* etičnog transfuziološkog pristupa. Kao i informiranje o ev. naknadnim saznanjima o potencijalnoj štetnosti (npr. kada je donor nedugo nakon darovanja krvi postao pozitivan na HIV) i postupanje u skladu sa situacijom.

Donor je jednako važan objekt i subjekt etičnosti. Pri tome je važno informirati ga o obilježjima i rizicima darovanja krvi i dobiti njegov pristanak za darovanje. Neizostavno je osigurati povjerljivost informacija kao i sigurnosti za donora. Potrebno je informirati ga i o eventualnim rizicima za primatelja i kontraindikacijama za darovanje krvi, pri čemu on, kao tako informirani potencijalni donator ujedno postaje subjekt etičnosti prema objektu – primatelju. Pri tome postoji i odgovornost donora koji mora biti svjestan da ne smije štetiti primatelju („Donors must be made aware of their responsibility not to harm the recipient” https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/ISBT_Code_Of_Ethics_English.pdf) Zašto je biti MSM (od eng. *men who have sex with men*, muškarcima koji imaju seks s muškarcima) – kontraindikacija za darovanje krvi? Zato što za svaku bolest koja se prenosi krvlju postoji tzv. razdoblje „window” u kojemu je uzročnika nemoguće otkriti suvremenim pretragama, a istodobno je od novootkrivenih pozitivnih na HIV u Hrvatskoj 80 % upravo pripadnika zajednice MSM. (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hiv-surveillance-report-2020.pdf>) Kao i u slučaju primatelja etično je i donora informirati o saznanjima o potencijalnim bolestima (npr. kada je u donora u obradi utvrđen pozitivitet na hepatitis B ili C) i postupati u skladu sa situacijom.

Bitan etički zahtjev u darovanju krvi jest **neprofitabilnost** (eng. *Not-for-Profit*), a neprihvatljiv komercijalizam, tj. plaćanje darovateljima. Darovanje krvi mora se temeljiti na motivima altruizma i mora biti dobrovoljno (voluntarizam), dok je bilo kakva prisila (eng. *coercion*) neetična. (*Council of Europe. Recommendation No. R (95) 14 Of The Committee Of Ministers To Member States On The Protection Of Health Of Donors And Recipients. The Area Of Blood Transfusion. 1995.*)

Načelo **pravde** (eng. *justice*) ogleda se kroz pravilo Kodeksa da se pristup pripravcima treba temeljiti na kliničkim potrebama (isključivo!) te da je potrebno osigurati izbjegavanje bacanja pripravaka. Etičnost uključuje i dobro gospodarenje, odnosno **upravljanje** transfuzijskim sustavom (eng. *stewardship*). Kodeks zahtijeva i samo osiguranje sustava transfuzijskog liječenja (i kvalitetu sustava u skladu sa standardima) i osiguranje razvoja transfuzijskog liječenja. I Kodeks medicinske etike i deontologije (NN 139/15) u članku 9, stavak 9, kaže da je „Obveza liječnika stalno obrazovanje i praćenje napretka u struci.“ Iz čega proizlazi da je nestručnost neetična!

Za kraj, važno je biti svjestan svih **odgovornosti** u transfuzijskom radu, subjekata te odgovornosti (transfuziolozi i drugi transfuziološki djelatnici, kliničari, donori, primatelji, pravne osobe koje donose odredbe vezane za transfuziju krvi) kao i razina odgovornosti (disciplinska na razini institucije npr. zaposlenika, stručna i etička na razini Hrvatske liječničke komore, odnosno Časnoga suda, građansko pravna, pri čemu se uglavnom radi o naknadi štete, kazneno pravna koja u pozitivnim propisima u Hrvatskoj predviđa nesavjesno liječenje u članku 182 Kaznenog zakona, i konačno odgovornost pred ESLjP-om gdje ipak ne odgovara pojedinac, već država). Najveća je odgovornost prema svojoj savjesti i to je najveća i najteža etička odgovornost, osobito u situacijama gdje nema jasnih pisanih i obvezujućih etičkih odredaba. Liječnici koji užurbanim tempom ulažu trud činiti najbolje, često u okolnostima pretpostavljenog timskog povjerenja i vremenskih improvizacija, nisu svjesni kako se u odgovornosti pred sudom sve mijenja i kako tada tamo ostajemo sami. „Gotovo automatsko prebacivanje odgovornosti toliko uobičajeno u modernom društvu iznenada se prekida čim stupite u sudnicu. Sva opravdanja nespecifične apstraktne naravi, od duha vremena pa do Edipovog kompleksa po kojima nismo ljudi nego funkcija ovoga ili onoga, te u tom smislu zamjenjivi – gube tlo pod nogama.“ kaže Hannah Arendt (u „O zlu“).

POREMEĆAJI HEMOSTAZE I TROMBOZE U COVID-19 BOLESNIKA

PULANIĆ D.¹

¹ KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu

• Odjel za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti

Uvod: Hemostatski poremećaji i tromboze koje nastanu u značajnog broja oboljelih od koronavirusne bolesti 2019. (engl. *Coronavirus Disease 2019*, COVID-19) predmet su golemog medicinskog interesa. Cilj ovog rada prikaz je dosadašnjeg znanja o trombozama i koagulacijskim poremećajima, te postojećim smjernicama za tromboprolifaksu u COVID-19 bolesnika.

Materijali i metode: Pretražen je PubMed i ostala dostupna medicinska literatura o trombozama, koagulacijskim poremećajima, te smjernicama za tromboprolifaksu u COVID-19.

Rezultati: Venske tromboembolije (VTE) uočene su kao važne komplikacije bolesnika hospitaliziranih zbog COVID-19, čak i u onih koji primaju farmakološku tromboprolifaksu. Opisane su i arterijske tromboze kao komplikacije COVID-19 bolesnika, uključujući ishemijske moždane udare. Bolesnici s COVID-19 imaju često prisutna sva tri elementa Virchowljeva trijasa za nastanak tromboze: otežanu pokretljivost ili nepokretljivost, akutna upalna zbivanja koja dovode do hiperkoagulabilne krvi, te oštećenje endotela krvnih žila. Opisane su povišene aktivnosti faktora VIII, von Willebrandovog faktora, fibrinogena i D-dimera kao pokazatelja hiperkoagulabilnosti u COVID-19 bolesnika. Hospitalizirani COVID-19 bolesnici koji imaju teži oblik bolesti, pogotovo uz dodatne rizične čimbenike (nepokretni, stari, adipozni, muškarci, ranije preboljela VTE, rak, drugi komorbiditeti, hospitalizacija u jedinici intenzivnog liječenja) imaju i veći rizik nastanka tromboze nego oni s blagim ili asimptomatskim oblikom COVID-19. Studije temeljene na obdukcijama utvrdile su mikrovaskularne tromboze u COVID-19 bolesnika, koje mogu zahvatiti pluća i druge organe. Razmatra se i utjecaj terapije protiv COVID-19 (antivirusni lijekovi, kortikosteroidi, anti-citokini, monoklonalna protutitijela, rekovalescentna plazma) na protrombotski rizik kao i na interakcije s farmakološkom tromboprolifaksom. Razvoj diseminirane intravaskularne koagulacije jedan je od najznačajnijih pokazatelja lošeg ishoda u COVID-19. Također je i trombocitopenija u hospitaliziranih COVID-19 bolesnika povezana s povećanim rizikom smrti. Brojna međunarodna medicinska udruženja objavila su preporuke o tromboprolifaksi bolesnika s COVID-19, često se ograđujući da se preporuke temelje na niskoj razini i niskoj snazi dokaza s obzirom na to da je riječ o novoj bolesti.

Zaključak: Postojeća saznanja ukazuju da je COVID-19 protrombogensa bolest. Za očekivati je da će se preporuke o najadekvatnijoj tromboprolifaksi redovito obnavljati i doradivati s protokom vremena i ovisno o novim podacima o COVID-19.

FETALNA I NEONATALNA ALOIMUNA TROMBOCITOPENIJA (FNAIT) U 2021. GODINI

TOMIČIĆ M.¹

¹ Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za dijagnostiku trombocita, leukocita i hemostazu

Fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija (FNAIT) je klinički sindrom, koji nastaje zbog nepodudarnosti trombocitnih antigena (HPA), koje je fetus naslijedio od oca, a nisu prisutni na majčinim trombocitima. Bolest je slična hemolitičkoj bolesti novorođenčeta (HBFN) uzrokovanoj aloimunizacijom na eritrocitne antigene. Točna učestalost FNAIT u većini zemalja nije poznata, jer se zabilježeni slučajevi odnose samo na pojedine Ustanove ili Referalne centre, u kojima je moguća serološka potvrda dijagnoze. Procijenjena učestalost FNAIT je 0,3 do 1 slučaj na 1000 do 5000 živorođene djece. U 20–59% slučajeva, FNAIT se opaža u prvorodene djece. Iako je bolest rijetka, težina kliničkih simptoma i posljedice povezane s krvarenjem u središnji živčani sustav nalažu ranu serološku laboratorijsku dijagnostiku i liječenje.

Neonatalnu aloimunu trombocitopeniju (NATP) prvi je opisao Harington 1953. godine, u dvoje novorođenčadi s trombocitopenijom i krvarenjem, rođenih od majki s normalnim brojem trombocita. Unatoč teškom krvarenju i brojnim komplikacijama oporavak je nastupio nakon 2 odnosno 8 tjedana. Serološka potvrda dijagnoze nije bila moguća sve do 1962. godine, kada su Shulman i suradnici opisali prvi specifični trombocitni aloantigen, nazvali ga PlA1 (danas HPA-1a) i dokazali da je trombocitopenija u novorođenčeta bila posljedica prijelaza majčinih aloprotutijela u krvotok djeteta i vezanja na fetalne trombocite.

Od tada do danas otkriveno je više od 30 trombocitih specifičnih aloantigena (HPA), koji potencijalno mogu uzrokovati FNAIT. Ipak, HPA-1a inkompatibilnost ima najveće kliničko značenje.

Inunosni odgovora na HPA-1a antigen, snažno je povezan sa sustavom tkivne snošljivosti razreda II, odnosno alelom DRB3*01:01, koji je prisutan u 90% žena imuniziranih na HPA-1a alel.

Uvođenje molekularnih metoda za HPA genotipizaciju umnogome je unaprijedilo serološku potvrdu bolesti. Epidemiološke studije učestalosti HPA alela u populaciji pojedinih zemalja značajno su doprinijele razvoju novih metoda određivanja HPA specifičnosti protutijela i njihovog kliničkog značenja. Ujedno, omogućile su probirno prijenatalno ispitivanje trudnica, te razvoj lijekova za sprječavanje FNAIT. Određivanje HPA alela u dobrovoljnih davatelja koncentrata trombocita na staničnom separatoru omogućilo je liječenje HPA antigen negativnim krvnim pripravkom.

Prije tridesetak godina, za sprječavanje fetalne trombocitopenije najčešće su primjenjivane intrauterine transfuzije trombocita (IUT). Nedostatak IUT je složenost postupka i česta, jednotjedna ponavljanja zbog kratkog poluvijeka transfudiranih trombocita. Najteže komplikacije IUT su produženo krvarenje iz mjesta punkcije pupkovine ili tromboza pupkovine. Rizik za fetalnu smrt ili hitni prijevremeni carski rez, nakon IUT iznosi oko 10%. Stoga se one danas primjenjuju izuzetno rijetko. Bussel i suradnici prvi su počeli s primjenom intravenoznih gama globulina (IVIG), kako bi izbjegli komplikacije IUT. Točan mehanizam djelovanja IVIG-a nije poznat, pretpostavlja se da djeluje na više razina. Najvažnija je ometanje transplacentnog prijelaza HPA protutijela i stabilizacija endotela krvnih žila. Iskustva prikupljena liječenjem i sprječavanjem HBFN značajno su unaprijedila postupke prijenatalnog liječenja FNAIT. Posebno se to odnosi na HPA genotipizaciju fetalne "cell free DNA" iz uzorka krvi majke tijekom trudnoće, primjenu hiperimunog globulina ("NAITgam, anti-HPA-1a), te inhibiciju neonatalnih Fc gama receptora (FcRn).

Sumnja na FNAIT postavlja se kada je u novorođenčeta nakon poroda prisutna neobjašnjena izolirana trombocitopenija (najčešće $10 \times 10^9/L$ do $30 \times 10^9/l$). Broj trombocita u majčinoj krvi obično je normalan.

Specifična trombocitna aloprotutijela IgG razreda, koja stvara majčin imunološki sustav tijekom fetalnog razdoblja, mogu prijeći placentu, vezati se na fetalne trombocite i uzrokovati njihovu pojačanu razgradnju. Kako su fetalni HPA antigeni razvijeni već od 16. tjedna, trombocitopenija može uzrokovati krvarenja i dugotrajno ugrožavati fetus i prije poroda.

80–90% FNAIT uzrokovano je anti-HPA-1a protutijelima. Anti-HPA 5a su druga protutijela prema učestalosti, dok se protutijela ostalih specifičnosti rijetko nalaze. Uloga anti-HLA razreda I u nastanku FNAIT nije potpuno jasna. Za konačnu potvrdu dijagnoze nužno je učiniti laboratorijsko serološko ispitivanje za FNAIT, kojim se dokazuju specifična trombocitna protutijela IgG razreda u serumu majke, koja su transplacentarno prešla u krvotok djeteta i vezala se na fetalne/neonatalne trombocite.

Algoritam laboratorijskog ispitivanja za FNAIT obično obuhvaća probirno serološko ispitivanje antitrombocitnih protutijela u uzorku krvi majke i djeteta, određivanje HPA specifičnosti prisutnih aloprotutijela, HPA genotipizaciju majke i djeteta/oca, određivanje titra protutijela, odabir trombocita za transfuziju i tumačenje rezultata. U serološkoj dijagnostici FNAIT potrebno je primijeniti metode koje imaju najbolju osjetljivost i specifičnost. Za probirno ispitivanje za antitrombocitna protutijela najčešće se koristi test imunofluorescencije (protočna citometrija). Za određivanje specifičnosti anti-HPA protutijela najčešće se koristi enzimsko-imunološka metoda imobilizacije trombocitnih glikoproteina pomoću monoklonskih protutijela (MAIPA, monoclonal antibody immobilization of platelet antigens, *engl.*) i Luminex (protočna imunofluorescencija s mikro kuglicama, PLX). Za križnu probu i određivanje titra anti-HPA-1a protutijela koristi se indirektni MAIPA test. U konačnoj potvrdi serološkog nalaza, poželjno je odrediti HPA fenotip/genotip majke i djeteta/oca. Za HPA genotipizaciju, najčešće je to metoda polimerazne lančane reakcije sa začetnicama specifičnim za sekvencu (PCR-SSP, polymerase chain reaction-sequence specific primers, *engl.*). Ako je probirno serološko ispitivanje pozitivno, slijedi određivanje specifičnosti aloprotutijela u serumu/plazmi majke. Ukoliko se specifična trombocitna protutijela ne dokažu, može se učiniti križna proba s trombocitima oca i serumom majke, izvedena MAIPA metodom, i ispitati prisutnost HLA protutijela razreda I. U slučaju kada majka boluje od autoimune trombocitopenije (AITP), direktni test za ATA s trombocitima majke je pozitivan, a u serumu majke u indirektnom testu mogu se dokazati samo panreaktivna slobodna autoprotutijela IgG razreda. Iako majčina autoprotutijela najčešće ne uzrokuju trombocitopeniju u djeteta ili je prisutan samo blago snižen broj trombocita bez kliničkih simptoma, opisano je nekoliko slučajeva teškog oblika neonatalne trombocitopenije uzrokovane samo majčinim autoprotutijelima. Protutijela IgM razreda, koja također mogu biti prisutna u majčinoj cirkulaciji nemaju utjecaja na patogenezu FNAIT. Nepodudarnost HPA genotipa majke i djeteta/oca, dopunjuje i potvrđuje nalaz serološkog ispitivanja.

Posebno je važna za dokazivanje specifičnosti protutijela na rijetke antigene u populaciji, ali sama HPA inkompatibilnost između majke i djeteta, bez ostalih pozitivnih laboratorijskih nalaza i kliničke slike bolesti, nije dovoljna za konačnu potvrdu dijagnoze.

Liječenje se provodi transfuzijom koncentrata trombocita, odabranih prema nalazu HPA specifičnosti aloprotutijela dokazanih u serumu majke. Za neonatalnu transfuziju priprema se koncentrat trombocita jednog davatelja, čiji trombociti nemaju odgovarajući aloantigen, odabranog iz baze podataka HPA tipiranih davatelja trombocita na staničnom separatoru u HZTM-u. Iznimno se mogu primijeniti majčini trombociti, koji su također aloantigen negativni. U slučaju kada je FNAIT uzrokovana majčinim autoprotutijelima, za transfuziju se primjenjuju trombociti slučajno odabranog davatelja pripremljeni aferezom, jer su protutijela panreaktivna za glikoproteinske komplekse trombocitne membrane. Trombocitni krvni pripravak uvijek mora biti sa smanjenim brojem leukocita (filtriran), a ukoliko se primjenjuju majčini trombociti nužno je ukloniti plazmu, u kojoj se nalaze HPA aloprotutijela, te ozračiti pripravak, radi sprječavanja GVHD. Trombocitni pripravak treba biti ABO podudaran s antigenima novorođenčeta, a ukoliko nije, treba također ukloniti plazmu iz pripravka. Nije opravdano odgađati trombocitnu transfuziju u slučaju vitalne indikacije, teške trombocitopenije i krvarenja, zbog čekanja na rezultate laboratorijskog ispitivanja. Tada novorođenče dobiva trombocitnu transfuziju slučajno odabranog davatelja, a slijedeća transfuzija se priprema prema nalazu HPA specifičnosti dokazanih aloprotutijela. Također se primjenjuje liječenje novorođenčeta IVIG-om, u dozi 1 g/kg tjelesne težine tijekom 2–3 dana, a rjeđe kortikosteroidima. U slučaju da je prethodno novorođenče imalo intrakranijalno krvarenje (IKK) indicirano je prijenatalno liječenje, jer je rizik fetalnog krvarenja ukoliko izostane liječenje tijekom trudnoće, oko 79%. Tijekom zadnja dva desetljeća terapija IVIG-om je gotovo u potpunosti zamijenila IUT, uz 98%-tnu uspješnost u prevenciji fetalnog krvarenja.

Sustavnim pregledom i analizom podataka iz 27 studija o FNAIT/NAIT (Medline, EMBASE, Cochrane) za razdoblje od 1946. do 2017. godine, međunarodna radna skupina predvođena Liebermanom i suradnicima donijela je 2019. godine preporuke za dijagnostiku i liječenje FNAIT.

Preporučene su smjernice za liječenje IVIG-om i kombinacijom IVIG-a s kortikosteroidima, te protokoli za doze i trajanje liječenja. Oni se odabiru prema anti-HPA-a specifičnosti aloprotutijela i anamnestičkom podatku o IKK u prethodnoj trudnoći. Ukoliko je u prethodnoj trudnoći bilo IKK, radi se o visokom riziku za krvarenje, te se trudnice liječe višim dozama IVIG-a, u dužem terapijskom ciklusu. Doze IVIG kreću se od 0.5 do 2.0g/ 1 kg majčine težine. Nizozemska grupa predložila je za visoko rizične trudnoće, dozu IVIG-a, 1.0 g/ 1kg, jednom tjedno. Liječenje treba započeti između 12. i 16. tjedna i nastaviti do 36. tjedna, kada treba planirati porođaj. Najviše preporučene doze IVIG-a su 2,0 g/ 1kg tjedno, kombinirane s prednisonom, u dozi 0,5 mg/ kg dnevno. Za nisko rizične trudnoće, bez prethodnih IKK, doza IVIG-a je obično 0.5g / 1kg. U svim protokolima, liječenje IVIG-om treba kontrolirati ultrazvučnim pregledima mozga, u intervalima od 2 do 4 tjedna. Posebnu pažnju treba usmjeriti na prepoznavanje intra i ekstrakranijalnih krvarenja. U studijama Tiller-ove i suradnika pokazana je pozitivna prediktivna vrijednost određivanja titra anti-HPA-1a protutijela u predviđanju teške trombocitopenije u neonatusa, veća od 90%. Suprotno tome, objavljeni su slučajevi FNAIT s teškim fetalnim krvarenjima i malim titrom anti-HPA-1a protutijela. Iako titar HPA-1a protutijela nije pouzdan u procjeni trombocitopenije u fetusa i ne mora uvijek korelirati s brojem trombocita, pad titra protutijela u krvi majke neizravno može upućivati na dobar terapijski učinak prijenatalne primjene IVIG-a. Takav nalaz sukladan je nalazu broja trombocita iz pupkovine nakon porođaja i negativnom nalazu direktnog testa na antitrombocitna protutijela IgG razreda u novorođenčeta.

Način porođaja u slučaju FNAIT također je varijabilan. Većina Centara radi carski rez između 36. i 38. tjedna ako je u prethodnoj trudnoći bilo IKK. Međutim, prema podacima manjih kohortnih studija, nema dokaza da vaginalni porođaj povećava rizik za IKK.

Prijenatalni probir trudnica za FNAIT, ne radi se rutinski i nije obavezan. On je opravdan, ako ga slijedi sigurna i isplativa profilaksa, kojom se postiže značajno smanjenje incidencije bolesti (prema kriterijima WHO). U većini europskih zemalja, koje su provele velike populacijske studije za FNAIT, probir se radio određivanjem HPA-1 genotipa u trudnica koje su prethodno rodile dijete s FNAIT uzrokovane anti-HPA-1a aloprotutijelima, odnosno ako je postojao anamnestički podatak o IKK ili drugom velikom krvarenju u prethodnog djeteta. Takvim načinom probira, incidencija teške trombocitopenije u neonatusa bila je 3 do 5 puta viša, nego u slučaju kada je probir rađen bez prethodne klinički potvrđene FNAIT. Važan je podatak da je 75% trudnica, koje su rodile djecu s novootkrivenom FNAIT uzrokovanu anti-HPA-1a protutijelima bilo imunizirano tijekom porođaja u prvoj trudnoći. Taj se podatak značajno razlikuje od podataka o klinički potvrđenim slučajevima FNAIT,

koji su otkriveni u majčinoj prvoj trudnoći u 60 % slučajeva. Ako je trudnica HPA-1bb genotipa (oko 2% u populaciji Bijelaca), nastavlja se serološko ispitivanje i HPA genotipizacija oca djeteta. Ako je otac heterozigot, HPA-1ab, tada postoji 50%-tna vjerojatnost da je fetus HPA-1bb. U tom slučaju indicirana je amniocenteza radi provjere fetalnog genotipa. Ukoliko je fetalni genotip HPA-1bb, može se isključiti bolest jer je identičan s majčini genotipom. Unatrag nekoliko godina, HPA genotipizacija fetusa može se učiniti i analizom “slobodne” fetalne DNA iz majčine plazme. Pretragu je moguće učiniti od 10. tjedna gestacije, ali za sada samo za HPA-1 genotip. Određivanje DRB3*0101 alela pokazalo se važnim u procjeni rizika za HPA-1a imunizaciju tijekom trudnoće i predloženo je za sastavni dio probira za FNAIT, uz HPA-1ab genotipizaciju.

Profilaktička primjena “NAITgam”-a, hiperimunog gama globulina, koji se dobiva iz plazme žena koje su rodile dijete s klinički dokazanom FNAIT uzrokovanu anti-HPA-1a alopolutijelima, također je u početnoj fazi kliničkog ispitivanja. Nužno je nastaviti s kliničkim ispitivanjima kako bi se potvrdila učinkovitost i sigurnost primjene, ali i financijska isplativost, o kojima ovisi uvođenje obveznog probira za FNAIT.

Najnovija istraživanja lijekova koji blokiraju neonatalne Fc gama receptore, čija se primjena ispituje za liječenje HBFN, daju obećavajuće rezultate. Njihova primjena u FNAIT omogućila bi prevenciju i liječenje neoviso o specifičnosti HPA alopolutijela, što predstavlja ogroman iskorak u pristupu liječenju svih neonatalnih citopenija.

Zaključak

Točna učestalost FNAIT nije poznata u većini zemalja, jer se zabilježeni slučajevi odnose samo na određene referalne centre pojedinih zemalja. Iako je bolest rijetka, težina kliničkih značajki i posljedica povezanih s krvarenjem u središnjem živčanom sustavu, nalažu ranu serološku dijagnostiku.

Prijenatalni serološki/ molekularni probir za FNAIT nije točno propisan. Radi se samo u slučaju teškog oblika FNAIT u prethodnoj trudnoći, uzrokovane anti-HPA-1a protutijelima. Razlog je niska učestalost bolesti, slaba dostupnost metoda za HPA genotipizaciju, te nepostojanje odobrenoga lijeka za sprječavanje bolesti za rutinsku primjenu. Stoga se FNAIT uglavnom dijagnosticira i liječi kada postoji anamnestički podatak o FNAIT, posredovanoj anti-HPA-1a protutijelima u prethodnoj trudnoći. Dijagnoza se ponekad postavi već u prvoj trudnoći, ako se na ultrazvuku nađe intra ili ekstrakranijalno krvarenje. Izbor trombocita za neonatalnu transfuziju prema HPA genotipu majke dobiven od HPA negativnog davatelja postupkom afereze, danas je najučinkovitija metoda liječenja FNAIT. Primjena IVIG-a tijekom trudnoće, u slučajevima potvrđene FNAIT uzrokovane anti-HPA-1a protutijelima značajno doprinosi prevenciji i usmjerenom liječenju ove bolesti.

U budućnosti će vjerojatno većina ovih potupaka biti u drugom planu i zamijenjena obveznim probirom za FNAIT metodom HPA-1ab genotipizacije majke, određivanjem HPA genotipa iz fetalne “cell free DNA” u krvi majke, profilaktičkom primjenom hiperimunog globulina (“NAITgam”-anti-HPA-1a), te lijekovima koji inhibiraju neonatalne Fc gama receptore (FcRn).

LITERATURA

1. *Backhoul T, Bassler D, Heckmann M, Thiele T, Kiefer V, Gross I i sur.* Management of infants born with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia: the role of platelet transfusions and intravenous immunoglobulin. *Transfusion* 2014; 54(3):640–5.
2. *Borros A i sur.* Neonatal immune incompatibilities between newborn and the mother. *J Clin Med.* 2000;9(5): 1470, doi: 10.3390/jnm9051470
3. *Bussel JB, Vander Haar EL, Berkowitz RL.* New developments in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;225(2):120–127
4. *Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R.* Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *An Int Med.* 1953;38:433–469.
5. *Kaplan C.* Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Haematologica* 2008; 93(6): 805–807.
6. *Williamson LM, Hackett G, Rennie J i sur.* The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PLA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood.* 1998; 92:2280–2287.
7. *Peterson JA, Mc Farland JG, Curtis B, Aster RH.* Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol,* 2013; 161(1):3–14
8. *Tiller H, Killie MK, Chen B, Eksteen M, Husebekk A, Skogen B i sur.* Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion* 2012;52(7):1446–57
9. *Tiller H, Husebekk A, Ahlen MT, Stuge TB, Skogen B.* Current perspectives on fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – increasing clinical concerns and new treatment opportunities. *Int J Womens Health.* 2017; 19(9):223–234.

REVISION OF THE UNION LEGISLATION ON BLOOD, TISSUES AND CELLS

Fehily D.¹

¹Substances of Human Origin Team, DG Santé, European Commission

Evaluation of the EU legislation on blood, tissues and cells

The Blood Directive 2002/98/EC and the Tissues and Cells Directive 2004/23/EC (the BTC legislation) have helped ensure the safety of millions of patients undergoing blood transfusion, transplantation and medically assisted reproduction. The legislation sets out quality and safety requirements for all steps from donation to human application, unless the donations are used to manufacture medicinal products or medical devices, in which case the legislation only applies to donation, collection and testing. After more than 16 years in place, the legislation cannot cater for all the new scientific and technical developments that have taken place since. Shortcomings of the legislation were identified in a 2019 evaluation of the legislation on blood, tissues and cells¹. The evaluation findings were endorsed by stakeholders and national competent authorities, and welcomed in the Council Working party on health, and in the European Parliament.

The COVID-19 pandemic highlighted some of the shortcomings, in particular those impacting on blood transfusions. The strong reliance on the United States for a sufficient supply of plasma for medicinal product manufacture emerged as a threat to an open strategic autonomy. This is underlined the need for timely action. A potential revision was included in the Commission Work Programme 2021.

The revision aims to address the following gaps and shortcomings identified in the evaluation:

1. Patients are not fully protected from avoidable risks:

The EU safety and quality requirements have not kept up-to-date with frequently changing scientific and epidemiological developments, potentially exposing patients treated with BTC to avoidable risks. The European Centre for Disease Prevention and Control provides up-to-date but non-binding guidance on safety measures, the Council of Europe provides guidance on quality and safety of BTC and many Member States put more stringent requirements in place. In addition, while new therapies have emerged since the BTC legislation was adopted, it is not always clear whether, and if so which, of the BTC Directives apply, leaving these substances unregulated or regulated in divergent ways (e.g., donated breast milk, serum eye drops, faecal microbiota transplants).

2. Divergent approaches to oversight cause unequal levels of safety and quality and barriers to the exchange of BTC across the EU

Divergent national interpretations and implementations of the legislation lead to unequal protection and a lack of mutual trust between national authorities. This in turn creates barriers to cross-border exchange and to availability of BTC.

3. Avoidable risks for BTC donors and for children born from donated eggs, sperm or embryos

Current BTC legislation contains only very limited measures to protect and monitor BTC donors and children born from donated sperm, eggs or embryos. In particular, the requirements to report donor adverse reactions are too limited and provisions for testing egg and sperm donors for genetic conditions are out-of-date with the technology available. Growing demand by commercial companies (e.g. egg banks for IVF, plasma collectors for medicinal product manufacture) increases the pressure to donate and consequently the need for robust donor protection measures.

4. BTC legislation lags behind innovation

New ways of processing donations in BTC establishments may bring significant benefits. However, these new therapies can also put patients at risk, as current authorisation procedures for new BTC processes do not require evidence that risk is justified by benefits. Moreover, this lack of adequate procedures does not inspire trust and prevent healthcare actors from developing and adopting innovative processes. In addition, there are sometimes difficulties in defining the borderlines for novel BTC with other regulatory frameworks, in particular where medicinal products and medical devices are concerned.

5. EU vulnerable to interruptions in supply of some BTC

For some essential BTC, the EU is highly dependent on imports to ensure sufficiency. In particular, the EU relies on the United States for an adequate supply of plasma used to manufacture plasma-derived medicines. In the

¹ Evaluation of the EU legislation on blood, tissues and cells

current legislation, sufficiency of supply through voluntary unpaid donation is encouraged, though without concrete measures to protect or increase supply. This approach has not proven adequate to protect EU patients from the risk of shortages or sudden supply disruption. The lack of EU and national monitoring provisions for the supply of BTC makes it difficult to predict EU supply interruptions and to take action to mitigate the risks to patients.

The COVID-19 pandemic highlighted the risks for supply interruptions, the need for adequate donor and recipient protection and for adequate authorisations of health innovation through blood transfusion. By providing a framework for such cooperation, based on a common set of rules, EU-level measures are best placed to address such issues effectively. Establishing rules at an EU level could bring significant efficiencies for Member States, avoiding the need for multiple exercises in risk, benefit and cost analysis.

Objectives of the revision of the EU legislation on blood, tissues and cells

The overall objective of the revision is to ensure a high level of health protection for EU citizens. The EU legal framework should:

1. Ensure safety and quality for patients treated with BTC therapies, for donors and for children born from in vitro fertilization, and enforcement of safety and quality requirements.
2. Optimize access to, and avoid shortages of BTC therapies.
3. Ensure the framework is future-proof and facilitates the development of innovative BTC therapies.

Three policy options for the future legislation

Three options are being assessed in an impact assessment to help decide on the best approach to the revision.

Policy option 1: Strengthened quality and safety requirements defined by blood and tissue establishments with strengthened national inspection, EU audits and classification advice

This option would strengthen safety of recipients, donors and offspring through a system of **self-regulation** by establishing general safety and quality principles at EU level, complemented by technical rules and specifications to be set and regularly updated by BTC establishments. Establishments would be required to base their own specific rules on documented risk assessment and scientific evidence, and to update them whenever the need arises.

Substantially strengthened oversight principles would be laid down in the legislation, addressing independence of inspectors, conflicts of interest, and competency requirements for staff in authorities. The Commission would perform controls in Member States, including audits of national systems of inspection, authorisation and vigilance. To improve access to and sufficiency of BTC, mandatory EU monitoring and notification of sufficiency data and measures for emergency supply responses would be introduced. To accommodate innovative BTC therapies, the scope of the BTC legislation would be clarified to include novel substances of human origin currently used but not regulated at the EU level. For major changes in the steps of collection, processing and use of BTC, competent authorities would have to grant prior authorisation based on data demonstrating safety and benefit for patients that justifies any risks associated with treatment with BTC prepared in innovative ways. An EU level mechanism would be set up to advise Member States on whether the BTC framework should be applied for particular novel BTC.

Policy option 2: EU-level safety and quality requirements defined by European Expert Bodies and strengthened national inspection, EU audits and classification advice

Safety of donors, recipients and offspring would be strengthened through a system of **co-regulation**. As under option 1, general safety and quality principles would be established at EU level, but with the obligation for establishments to take into account technical rules and specifications that would be defined and updated by authoritative bodies such as the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Council of Europe's European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM).

The approach would be complemented by similar measures as under policy option 1 for strengthening oversight, including risk-based inspections by national authorities and EU level audits of national control systems. In addition a framework for joint compliance inspections (by two or more Member States), where appropriate, would be introduced. New measures relating to ensuring sufficiency and supporting innovation, once shown to be safe and beneficial for patients, would be as in Option 1.

Policy option 3: EU-level safety and quality requirements laid down in the BTC legislation with improved national inspections systems and classification advice

Safety of donors, recipients and offspring would be strengthened through general safety and quality principles established at EU level, as under options 1 and 2, but the EU BTC legislation would also define common binding technical rules and specifications for their implementation, along with a mechanism for regular updates to respond to changing risks and technologies under Comitology rules through a system of **central regulation**.

The approach would be complemented by similar oversight measures as in option 2 except that no controls system audits by the Commission would be proposed. New measures relating to ensuring sufficiency and supporting innovation, once shown to be safe and beneficial for patients, would be as in Options 1 and 2.

Comparing the impact of the policy options

An impact assessment has been carried out to support the preparation of this initiative and to provide a robust evidence base for the contents of the legal proposal(s). The impact assessment process has drawn evidence from comprehensive stakeholder consultation and two external studies conducted by contractors. It quantifies, as far as possible, the costs and benefits of the changes described in the options presented above.

Stakeholder consultation included two online surveys open for 12 weeks – one addressed to the public and one targeted at organisations familiar with the legislation. The consultations closed on April 14 2021.

The Public Consultation gathered a total of 214 replies. The breakdown of the respondents by activities reflected the key role of BTC establishments in the sector, as well as the role of healthcare providers and academia. Member State competent authorities, ministries and other public administration bodies were also well represented. Non-governmental organisations representing donors and patients and ethics bodies also responded, as well as private industry. The majority of the responding organisations work both in the blood and the tissues & cells sector (126), while 19 indicated to be active exclusively in the blood sector and 22 exclusively in the tissues & cells sector.

Across all stakeholder categories, the majority of respondents indicated that expert bodies (such as ECDC or EDQM) would be their preferred option for setting technical rules to effectively achieve safety and quality for patient protection. However, it is noted that BTC establishments also frequently selected ‘professionals’ for this role, e.g. when asked about setting the rules on the technical characteristics of BTC that will be provided to patients (49 establishments selected expert bodies, while 45 selected professionals in their answers). It is also noted that, when asked about elements that relate to oversight, e.g. criteria/templates to report Serious Adverse Reactions and Events, many respondents believe these should partly be set in EU law. A full report of the public consultation is available on the European Commission Have Your Say web pages².

A series of 14 stakeholder workshops and hearings were held to explore in greater depth the key topics under consideration for the revision. Summaries of the results are published on the DG Santé website³. The external studies have costed the various measures defined in the policy options and assessed their efficacy to achieve the objectives of the revision. The ICF study has also developed a series of borderline cases studies through literature research and expert interview and the Deloitte study is exploring the future digital needs for the EU BTC framework.

The final Impact Assessment report, together with the legal proposal for the revision, the results of the targeted consultation and the external study report and will be published late in 2021 or early in 2022. Once the legal proposal is adopted by the Commission, it will be debated in the European Parliament and Council until the final text is agreed and published in the Official Journal of the European Union.

² https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12734-Revision-of-the-Union-legislation-on-blood-tissues-and-cells/public-consultation_en

³ https://ec.europa.eu/health/blood_tissues_organs/policy/revision_en

MESENCHYMAL STROMAL CELL THERAPY IN DAILY CLINICAL PRACTICE: EXPERIENCES FROM ST. CATHERINE SPECIALTY HOSPITAL

Primorac D.^{1,2,3,4,5,6,7}, Molnar V.¹, Matišić V.¹, Zenić L.⁸, Polančec D.⁸

¹ St. Catherine Specialty Hospital, 49210 Zabok/10000 Zagreb, Croatia

² Josip Juraj Strossmeyer University of Osijek, School of Medicine, 31000 Osijek, Croatia

³ Josip Juraj Strossmeyer University of Osijek, School of Medicine, 31000 Osijek, Croatia

⁴ University of Split, School of Medicine, 21000 Split, Croatia

⁵ University of Rijeka, School of Medicine, 51000 Rijeka, Croatia

⁶ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, PA, USA

⁷ University of New Haven, CT, USA

⁸ Childrens' hospital "Srebrnjak", 10000 Zagreb, Croatia

In recent years, due to the increasing use of Mesenchymal stromal cells (MSCs) in clinical practice around the world, research on MSCs has become increasingly extensive and relevant. Adult stem cells (MSCs) can be found in a variety of tissues throughout the body. In vitro, they can differentiate into a range of cell types, whereas in vivo, they secrete immunomodulatory and trophic signaling molecules that promote local regeneration by secretion of anti-apoptotic, anti-scarring, angiogenic and mitotic signaling molecules, and inhibit bacterial growth by secreting antimicrobial molecules (including LL-37, human β -defensin-2, hepcidin and lipocalin-2). These immunomodulatory and paracrine mechanisms are responsible for their clinical effect, putting them in the focus of regenerative medicine.

Osteoarthritis is a prevalent disorder that can compromise any of the body's joints. It occurs in all age groups, but the elderly is more likely to be affected. There is presently no treatment that can stop osteoarthritis from developing or progressing, and the gold standard end-stage treatment is still total joint replacement surgery, which comes with its own set of risks and complications. As a result, novel techniques for treating individuals who are not yet at the end-stage of osteoarthritis but are still experiencing the most frequent symptoms of pain and joint dysfunction are being investigated on a daily basis. MSC research paves the path for the development of new tools for osteoarthritis management, since their paracrine action improves clinical outcomes in osteoarthritis patients, giving a much-needed minimally invasive therapeutic option.

The main effects of MSC therapy on knee osteoarthritis (OA) is pain reduction and mobility improvement measured by visual analog scale (VAS), Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index (WOMAC) and Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), while the reported effect on the articular cartilage has not been constant, with studies reporting various end effects regarding both volume and structure, measured by MRI or second-look arthroscopies.

In St. Catherine Specialty Hospital, intraarticular autologous MSC application is a standard procedure performed on a daily basis. Three clinical studies were published by our group. In the first study, 20 patients with knee OA were followed up a year after the first application of microfragmented lipoaspirate. In 17 out of 20 patients a statistically significant clinical improvement was shown in WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), KOOS (Knee Osteoarthritis Scoring System) and VAS (Visual Analogue Scale) questionnaires (Hudetz et al. Early results of intra-articular micro-fragmented lipoaspirate treatment in patients with late stages knee osteoarthritis: a prospective study. *Croat Med J.* 2019. 13;60(3):227–236. doi: 10.3325/cmj.2019.60.227.). In the second and third study, we analyzed the glycosaminoglycan (GAG) content of the knee cartilage at application and 3, 6, 12 and 24 months after application of microfragmented lipoaspirate using a dedicated MRI sequence dGEMRIC (Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage) in 17 patients (32 knees). The majority of patients included in this study demonstrated increased GAG levels in the cartilage post-treatment up to 24 months, which was in line with VAS scores in these patients. These results suggested that the results of this method are long-lasting (Hudetz et al. The Effect of Intra-articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. *Genes (Basel).* 2017. 13;8(10):270. doi: 10.3390/genes8100270; Borić et al. A 24-Month Follow-Up Study of the Effect of Intra-Articular Injection of Autologous Microfragmented Fat Tissue on Proteoglycan Synthesis in Patients with Knee Osteoarthritis. *Genes (Basel).* 2019. 17;10(12):1051. doi: 10.3390/genes10121051).

Immunophenotypization of microfragmented adipose tissue and lipoaspirate cell content was also performed. We found that microfragmented adipose tissue contains mostly endothelial progenitor cells (CD31⁺CD34⁺), pericytes (CD31⁻CD34[±]CD146⁺), supraadventitious adipose stromal cells (CD31⁻CD34⁺CD146⁻) and to a lesser extent

mature endothelial cell (CD31⁺CD34⁻). The exact mechanism by which this clinical and biochemical improvement is made is still vastly unknown and is a matter of our ongoing research (Polančec et al. Immunophenotyping of a Stromal Vascular Fraction from Microfragmented Lipoaspirate Used in Osteoarthritis Cartilage Treatment and Its Lipoaspirate Counterpart. *Genes* (Basel). 2019. 21;10(6):474. doi: 10.3390/genes10060474).

During the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic a wide variety of therapeutic agents have been developed to combat COVID-19. The systemic use of MSCs is an emerging therapeutic strategy for the treatment of severely ill patients with COVID-19. The results of GvHD treatment, a systemic inflammatory condition, with regards to safety and efficiency encouraged clinicians to use MSCs also for other conditions with a number of studies being carried out across medical specialties, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), acute respiratory distress syndrome (ARDS), emphysema and other. With the growing number of inflammatory indications, where MSCs treatment was used, it became evident that systemic MSC treatment, being autologous or allogeneic, is safe in the reported literature. Patients with COVID-19 usually present with fever, body aches, breathlessness, malaise, dry cough, sore throat and gastrointestinal issues as non-specific symptoms. The Clinical condition of patients can deteriorate with pneumonia which is followed by either recovery or severe disease (ARDS, acute kidney injury (AKI) and multi-organ failure). When found in such a proinflammatory environment, MSCs react by secreting molecules that inhibit the overaggressive reaction of the immune system and establish a stable microenvironment for regenerative processes. After intravenous application, MSCs can largely be found in lungs after 24h which means they can modulate excessive immune response on-site. Later, they can be traced, as they migrate to other organs and tissues where they can be detected from 24 hours up to 14 days.

To date, several clinical trials and case report studies have been conducted to determine the safety and efficacy of MSC application in COVID-19 patients which our group reviewed in a recent paper (Primorac et al. Mesenchymal Stromal Cells: Potential option for COVID-19 treatment. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 16;13(9):1481. doi: 10.3390/pharmaceutics13091481.). In light of the previous research which found systemic MSC therapy both safe and effective for the treatment of systemic inflammatory conditions we treated a 50-year-old critical patient with COVID-19 pneumonia and ARDS (Primorac et al. Compassionate mesenchymal stem cell treatment in a severe COVID-19 patient: a case report. *Croat Med J*. 2021 Jun 30;62(3):288–296. doi: 10.3325/cmj.2021.62.288.). This case was the first of a person treated with MSCs for severe COVID-19 in Croatia. Progressive clinical worsening was observed in the patient from admission, which eventually led to the need for mechanical ventilation. As part of his treatment, the patient received corticosteroids, immunoglobulins and convalescent plasma; all of which were indicated for their anti-inflammatory properties. Remdesivir was also used, but with little success. We used ImmunoART™ (developed by Educell Ltd., member of Medical Biobank Swiss Institute SA (MBSI)) allogenic, HLA-incompatible and non-related bone marrow-derived MSCs in a dose of 10⁶/kg, delivered intravenously on three occasions during his stay in the ICU. Upon application, a reduction in leukocyte count, D-dimer levels, CRP levels and ferritin were observed, all of which are prognostic factors for COVID-19 severity.

These encouraging results provide a solid ground for COVID-19 patients suffering from severe and critical disease courses, who currently do not have any specific treatment options available to them, other than supportive care. Further research is needed to introduce systemic MSC application to routine clinical practice, but the research progress made in treating COVID-19 will undoubtedly bring this therapeutic option to patients who suffer from immune, degenerative and potentially other medical conditions.