

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**DAVOR PETROVIĆ**

**UČESTALOST I UTJECAJ HIPOVITAMINOZE D NA NOVOOTKRIVENU IMUNU  
TROMBOCITOPENIJU U DJECE**

**DOKTORSKI RAD**

**SPLIT, 2021.**

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za hematologiju, onkologiju i kliničku genetiku, Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split i Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Split.

**Voditelj rada:** izv. prof. prim. dr. sc. Joško Markić, dr. med.

*Želio bih se zahvaliti svim kolegama i suradnicima koji su sudjelovali u ovome istraživanju, posebno liječnicama i medicinskim sestrama Zavoda za hematologiju, onkologiju i kliničku genetiku Klinike za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split, kao i prof. dr. sc. Jeleni Roganović iz Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Istaknuo bih prof. dr. sc. Srđanu Čulić koja me je usmjerila i pomogla mi u počecima ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem svom učitelju i mentoru prof. dr. sc. Jošku Markiću na velikoj pomoći u izradi ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, posebno svojim roditeljima i bratu na podršci i pomoći kroz sve godine mog školovanja.*

*Na kraju, najveću zahvalu posvećujem svojoj supruzi Ani i kćeri Evi bez čije ljubavi i potpore ovo nikad ne bih uspio učiniti.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>7</b>
1.1. <b>Imuna trombocitopenija.....</b>	<b>8</b>
1.1.2. Nomenklatura imune trombocitopenije.....	8
1.1.3. Patofiziologija imune trombocitopenije.....	8
1.1.4. Epidemiologija imune trombocitopenije.....	9
1.1.5. Klinička slika imune trombocitopenije i sustavi bodovanja.....	9
1.1.6. Dijagnostička obrada i diferencijalna dijagnoza imune trombocitopenije.....	12
1.1.7. Prognoza imune trombocitopenije.....	13
1.1.8. Liječenje imune trombocitopenije.....	13
1.2. <b>Vitamin D.....</b>	<b>14</b>
1.2.2. Sinteza vitamina D.....	15
1.2.3. Fiziologija vitamina D.....	16
1.2.4. Preporučene razine vitamina D.....	17
1.2.5. Funkcije vitamina D.....	17
1.2.6. Vitamin D i bolesti.....	21
<b>2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE.....</b>	<b>25</b>
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI.....</b>	<b>28</b>
3.1. Ustroj istraživanja.....	29
3.2. Ispitanici.....	29
3.3. Postupci.....	30
3.4. Materijali.....	31
3.5. Statistički postupci.....	32
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>33</b>

4.1.	Povezanost između razine 25(OH)D i SMOG ocjene.....	36
4.2.	Povezanost između razine 25(OH)D i IBLS ocjene.....	38
4.3.	Povezanost između razine 25(OH)D i broja trombocita.....	38
4.4.	Povezanost spola i dobi bolesnika s razinom 25(OH)D i SMOG ocjenom.....	39
4.5.	Povezanost između razine 25(OH)D i z vrijednosti indeksa tjelesne mase.....	41
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>42</b>
5.1.	Demografija i klinička prezentacija ITP-a.....	43
5.2.	Razina 25(OH)D i učestalost hipovitaminoze D.....	44
5.3.	Povezanost između hipovitaminoze D i ITP-a.....	45
5.4.	Povezanost između razine 25(OH)D i kliničke prezentacije ITP-a.....	47
5.5.	Povezanost dobi bolesnika s razinom 25(OH)D i težinom kliničke slike ITP-a	48
5.6.	Povezanost između razine 25(OH)D i z vrijednosti indeksa tjelesne mase.....	48
5.7.	Ograničenja i nedostaci studije.....	49
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>76</b>
<b>11.</b>	<b>DODATAK.....</b>	<b>80</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1,25(OH)2D	1,25-dihidroksivitamin D (kalcitriol)
25(OH)D	25-hidroksivitamin D (kalcidiol)
AIC	Akaiake-jev informacijski kriterij
Anti-D	Rh <sub>0</sub> (D) imuni globulin
ASH	Američko hematološko društvo (engl. <i>American Society of Hematology</i> )
CI	Interval pouzdanosti (eng. <i>Confidence interval</i> )
CMV	Citomegalovirus
CVID	Sindrom varijabilne imunodeficijencije (eng. <i>Common variable immune deficiency</i> )
CYP24	Citokrom P450 obitelj 24 (engl. <i>Cytochrome P450 family 24</i> )
CYP27B1	Citokrom P450 obitelj 27, podobitelj B, član 1 (engl. <i>Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1</i> )
DBP	Vitamin D vezni protein (engl. <i>vitamin D binding protein</i> )
DIK	Diseminirana intravaskularna koagulacija
EBV	Ebstein Barr virus
FGF23	Faktor rasta fibroblasta-23
HCV	Hepatitis C virus <sup>7</sup>
HIV	Virus humane imunodeficijencije
HOMA-IR	Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije
IBLS	ITP ljestvica krvarenja (engl. <i>ITP bleeding scale</i> )
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL-2	Interleukin 2
ITM	Indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i> , BMI)
IU	Internacionalne jedinice (engl. <i>international units</i> )
IVIG	Intravenski imunoglobulini
IWG	Međunarodna radna skupina (engl. <i>International Working Group</i> )

ITP	Imuna trombocitopenija
MoPaRu	Cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubeole
PTH	Paratireoidni hormon
SLE	Sistemski lupus eritematosus
SMOG	Koža-sluznice-organi ocjena (engl. <i>Skin, mucose, organ gradation</i> )
TGF $\beta$ -1	Transformirajući faktor rasta beta 1
TLR	Toll-like receptori
UVB	Ultraljubičasto B zračenje
VD	Vitamin D
VDR	Vitamin D nuklearni receptor
VNN-1	Vanin 1 gen

## **1. UVOD**



## **1.1. Imuna trombocitopenija**

Imuna trombocitopenija (ITP) stečena je autoimuna bolest kojoj je osnovna karakteristika izolirana trombocitopenija definirana brojem trombocita u perifernoj krvi  $<100 \times 10^9/L$  (1). U većine bolesnika broj trombocita je manji od  $30 \times 10^9/L$ . Čak 80% njih ima ukupne trombocite niže od  $20 \times 10^9/L$ , dok 44% bolesnika ima manje od  $10 \times 10^9/L$  (2, 3). Kada je ukupni broj trombocita manji od  $10 \times 10^9/L$  radi se o teškoj trombocitopeniji (1). U rijetkim slučajevima, teška trombocitopenija definira se i kao vrijednost trombocita niža od  $20 \times 10^9/L$  (4-7). Najčešće se radi o benignoj bolesti koja se spontano povlači u razdoblju od 3-6 mjeseci (1, 8).

### **1.1.2. Nomenklatura imune trombocitopenije**

Trenutno ime bolesti (imuna trombocitopenija) službeno se koristi od 2009. kada je Međunarodna radna skupina (engl. *International Working Group*, IWG) stručnjaka za ITP u pedijatrijskoj i odrasloj dobi donijela smjernice za definiciju, dijagnozu i liječenje ITP. Stari naziv imuna ili idiopatska trombocitopenična purpura napustio se jer često ITP ima blagu kliničku sliku bez purpore. Ako ne postoje drugi uzroci ili bolesti udruženi s trombocitopenijom, onda se ITP definira kao primarna, dok je sekundarna ITP povezana s postojanjem drugog poremećaja ili bolesti, kao i kada je izazvana lijekovima (9).

ITP ima tri forme bolesti podijeljene po duljini trajanja. ITP koja traje do 3 mjeseca se definira kao novodijagnosticirana ili novootkrivena ITP. ITP koja traje 3-12 mjeseci definira se kao perzistentna ITP, dok se ITP koja traje više od 12 mjeseci definira kao kronična ITP (9-11).

### **1.1.3. Patofiziologija ITP-a**

Smatra se da je ključni patofiziološki mehanizam za razvijanje ITP-a gubitak imunološke samotolerancije, a prati ga razvijanje autoantitijela protiv antigene membrane trombocita, najčešće glikoproteinskih kompleksa IIb/IIIa. Nastala protutijela inhibiraju stvaranje trombocita, a protutijela spojena na membranu trombocita skraćuju životni vijek trombocita koji su već u perifernoj krvi (1).

Proliferacija autoreaktivnih T stanica, pogotovo povišena aktivnost Th17 i smanjena aktivnost Tregs, potiče stvaranje autoprotutijela. Spomenuti mehanizam onemogućava normalno održavanje tolerancije prema vlastitim antigenima trombocita što je temelj nastanka

ITP-a. Postoje naznake i za genetsku sklonost za razvijanje ITP-a. Naime, ITP češće se javlja u nekih genetskih sindroma kao hiper IgM sindroma, a postoje i rijetki slučajevi obiteljske ITP (12).

U većini slučajeva ITP nastaje nakon preboljene virusne infekcije, najčešće gornjih dišnih putova (8). Kako neki trombocitni antigeni imaju sličnu topografiju s virusima, jedan od patofizioloških mehanizama je nastanak križno reaktivnih protutijela koji ciljaju uz viruse i antigene membrane trombocita. Najčešći virusi povezani s ITP su DNA virusi kao varičela zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), adenovirus i citomegalovirus (CMV) koji imaju do 220 homolognih sekvenci aminokiselina s glikoproteinskim kompleksom IIb/IIIa. Uz njih dosta homolognih sekvenci imaju i virusi zaušnjaka, ospica i rubeole, dok se manji broj homolognih sekvenci našao u parvovirusu, Coxsackie B virusu i virusu humane imunodeficijencije (HIV) (13). U malom broju djece (3 slučaja na 100 000 cijepljenja) nastanak ITP-a je povezan s cijepljenjem cjepivom protiv ospica, zaušnjaka i rubeole (MoPaRu)(14).

#### **1.1.4. Epidemiologija imune trombocitopenije**

Godišnja incidencija ITP-a je između 1.9 i 8.8 slučaja na 100 000 djece (1, 8, 15-17). Bolest se najčešće javlja u djece između druge i pete godine, a nešto manje u adolescentnoj dobi. Nešto češće se javlja u dječaka. U dojenačkoj dobi omjer muškog i ženskog spola je 1,7:1, dok je predominacija muškog spola u starije djece minimalna (2, 5). U velikoj međunarodnoj studiji 70% djece razvilo je bolest između prve i desete godine. Također se opisuje i sezonsko javljanje bolesti, s najvišom incidencijom u proljeće, a najmanjom u jesen (2). Kronična trombocitopenija javlja se u oko 20-30% bolesnika (1, 9).

#### **1.1.5. Klinička slika imune trombocitopenije i sustavi bodovanja**

ITP se očituje brzim razvijanjem kožnih krvarenja u prethodno zdravog djeteta. Promjene po koži u vidu purpuričnih promjena, u sklopu kojih su petehije, hematomi i ekhimoze, nalaze se u 60% djece, dok se krvarenja u sluznicama (epistaksa, bukalno krvarenje, hematurija, menoragija i gastrointestinalno krvarenje) pojavljuju u 40% djece (18, 19). U otprilike 3% djece razviju se teška krvarenja (4). Najteža komplikacija ITP-a je intrakranijsko krvarenje s učestalošću 0.1-0.8%. Ono se češće dogodi u djece kojima je broj trombocita manji od  $10 \times 10^9/L$  (1, 4, 20). Neki od kliničkih znakova ITP-a mogu se vidjeti na slici 1.



**Slika 1.** Prikaz nekkih od kliničkih znakova imune trombocitopenije. a) Ekhimoze po koži trbuha. b) Petehije po koži potkoljenica. c) Hemoragične bule na jeziku. Preuzeto s: <http://itpbat.fondazioneematologia.it/>, uz zahvalu dr. F. Rodeghierou (25).

U skoro dvije trećine ITP bolesnika postoje anamnestički podatci o nedavno preboljenoj virusnoj infekciji. Naime, ITP najčešće nastaje dva tjedna nakon preboljele virusne infekcije (8).

Pri odlučivanju o potrebi liječenja ITP potrebno je, uz određivanje broja trombocita u perifernoj krvi, kliničkim pregledom odrediti i težinu kliničke slike ITP. S obzirom na to da djeca s teškom trombocitopenijom ( $<10 \times 10^9/L$ ) mogu imati samo blage simptome, pri određivanju težine bolesti klinički pregled je značajniji od nalaza broja trombocita u perifernoj krvi (21).

Na sastanku 2009., IWG je također istaknuo važnost kliničke slike u procjeni težine bolesti. Oni smatraju da se termin **teška ITP** treba koristiti samo u bolesnika koji imaju klinički značajno krvarenje. To je definirano kao postojanje krvarenja koje zahtijeva mijenjanje dosadašnje ili započinjanje nove terapije (9).

Za procjenu težine krvarenja u bolesnika koji boluju od ITP-a koristi se više različitih sustava bodovanja krvarenja. Oni se koriste s ciljem ujednačavanja izbora načina liječenja i praćenja bolesnika s ITP (11, 22-25).

Bolton-Meggs i Moon su podijelili simptome ITP-a u 4 kategorije po težini: asimptomatski, blagi (hematomi i petehije, manje epistakse, simptomi bez utjecaja na svakodnevni život), srednje teški (nekoliko kožnih manifestacija, lezije mukoze, srednje jaka epistaksa i menoragija) i teški (jaka epistaksa, melena, menoragija, intrakranijsko krvarenje, krvarenje koje zahtijeva žurno bolničko liječenje i transfuziju) (22).

Buchanan i Adix su osmislili sustav bodovanja, odnosno procjene krvarenja u ITP koji se temelji na kliničkom pregledu i povijesti krvarenja tijekom razdoblja od 24 sata prije postavljanja dijagnoze. Prema tom sustavu, ocjena težine krvarenja je od nula (bez krvarenja) do pet (životno ugrožavajuće ili fatalno krvarenje) (Tablica 1) (23).

**Tablica 1.** Sustav bodovanja težine krvarenja po Buchananu i Adixu

0 – **Bez krvarenja** – definitivno nema novog krvarenja ikakve vrste.

1 – **Manje** – nekoliko petehija ( $\leq 100$  ukupno) i/ili  $\leq 5$  manjih hematoma (promjera  $\leq 3$  cm); bez krvarenja sluznica.

2 – **Blago** – mnogo petehija ( $> 100$  ukupno) i/ili  $> 5$  velikih hematoma (promjera  $> 3$  cm); bez krvarenja sluznica.

3 – **Srednje teško** – očito krvarenje sluznice (epistaksa, krvarenje gingiva, orofaringealne hemoragične bule, menoragija, gastrointestinalno krvarenje) koje ne zahtijeva žurno medicinsko zbrinjavanje.

4 – **Teško** – krvarenje sluznica ili sumnja na unutarnje krvarenje (u mozak, pluća, mišiće, zglobove) koje zahtijeva žurno medicinsko zbrinjavanje.

5 – **Životno ugrožavajuće ili fatalno** – dokumentirano intrakranijsko krvarenje ili životno ugrožavajuće odnosno fatalno krvarenje bilo koje lokalizacije.

Preuzeto iz: Buchanan GR, Adix L. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. J Pediatr. 2002 Nov;141(5):683-8. (23).

Edslev i suradnici predložili su sustav bodovanja krvarenja kojim se, na temelju šest kliničkih značajki, predviđa imaju li ITP bolesnici niski rizik za razvijanje težeg krvarenja i komplikacija bolesti. Korištene kliničke značajke su: nagli početak bolesti, dob  $< 10$  godina, prethodna infekcija, broj trombocita  $< 5 \times 10^9/L$ , sluzničko krvarenje (uglavnom na sluznici usne šupljine), muški spol (26).

U našem istraživanju koristili smo dva novija sustava bodovanja, *ITP Bleeding Scale* (IBLS)(24) i *Skin-Mucosa-Organ-Grading* (SMOG)(25), a koji su detaljnije pojašnjeni u odjeljku „Materijali i metode“.

### 1.1.6. Dijagnostička obrada i diferencijalna dijagnoza imune trombocitopenije

Izolirana trombocitopenija je glavna laboratorijska karakteristika ITP (19). Druge hematološke promjene opisuju se u sklopu nastanka ili posljedica ITP-a, kao što je limfocitoza nakon virusne infekcije i/ili mikrocitna anemija nakon krvarenja. Uz spomenute promjene često se uočava i eozinofilija (19). Međutim, kada se u razmazu periferne krvi uoče vrlo veliki trombociti, mali trombociti, shistociti, sferociti, polikromazija i povećan broj retikulocita, treba razmišljati o mogućoj sekundarnoj trombocitopeniji u sklopu kliničke slike druge bolesti (1).

Dijagnoza ITP-a postavlja se na temelju sljedećih kriterija: broj trombocita  $<100 \times 10^9/L$ , ostatak kompletne krvne slike i diferencijalne krvne slike s retikulocitima je uredan, nema patoloških promjena na razmazu periferne krvi, nema kliničkih simptoma koji se standardno povezuju s ITP-om (povećanje limfnih čvorova, jetre i/ili slezene, vrućica, anoreksija, bol u zglobovima i kostima, gubitak tjelesne mase, atipično dugotrajno krvarenje, postojanje klinički značajne sistemske bolesti). Kod ovakve tipične kliničke i laboratorijske prezentacije u djece dobi od jedne do deset godina može se postaviti dijagnoza ITP bez daljnje obrade. U slučaju pojavljivanja opisanih zabrinjavajućih kliničkih simptoma i znakova, daljnja dijagnostička obrada obavlja se ovisno o njima te diferencijalnoj dijagnozi. Tijekom takve obrade, potrebno je isključiti moguću malignu bolest (punkcija koštane srži), autoimunu hemolitičku anemiju (direktni antiglobulinski test), autoimuni limfoproliferativni sindrom, hemolitičko uremijski sindrom, trombotičku trombocitopeničku purpuru, koagulopatiju, diseminiranu intravaskularnu koagulaciju (DIK), autoimune sistemske bolesti (sistemski eritematozni lupus), infekciju HIV-om, hepatitis C virus (HCV), CMV, EBV, malariju i imunodeficijencije (Sindrom varijabilne imunodeficijencije (CVID), DiGeorgeov sindrom, Wiskott-Aldrichov sindrom) (1). Diferencijalno dijagnostički je kod pronalaska izolirane trombocitopenije, koja nije praćena simptomima, potrebno isključiti pseudotrombocitopeniju (periferni razmaz krvi, koristiti alternativni antikoagulant) (19).

Prema smjernicama Američkog društva za hematologiju (engl. *American Society of Hematology*, ASH), testiranje na antitrombocitna protutijela nije potrebno tijekom dijagnostičke obrade ITP. Također, preporuka ASH je da se punkcija koštane srži rutinski ne radi u obradi bolesnika s tipičnom kliničkom slikom ITP, čak i kod slabog odgovora na prvu liniju terapije (27).

### 1.1.7. Prognoza imune trombocitopenije

Djeca s ITP-om imaju veliku vjerojatnost ozdravljenja s i bez terapije. Otprilike 70-80% djece s dijagnosticiranom ITP oporavi se unutar prva tri mjeseca (1). Iako je „*watch and wait*“ pristup učinkovit u većine djece (2, 7), pokazalo se da djeca u kojih je započeta farmakološka terapija imaju bolju kvalitetu života i manje relapsa bolesti (28-31). Novija istraživanja su utvrdila sljedeće čimbenike rizika kronične ITP-a: starija dob, podmukli razvoj bolesti, nepostojanje podataka o ranijem cijepljenju ili infekciji, blago krvarenje, veći broj trombocita kod prezentacije bolesti ( $>20 \times 10^9/L$ )(32). Također su se pronašla dva moguća genetska čimbenika rizika kronične ITP, a to su pretjerana ekspresija vanina-1 (VNN-1) i Q63R varijanta kanabinoidnog receptora tipa 2 (33).

### 1.1.8. Liječenje imune trombocitopenije

Pristup liječenju bolesnika s ITP-om je individualan i izaziva kontroverze u pedijatrijskoj hematologiji. Navedeno nastaje zbog, za sada, nedovoljno jasno definiranog početnog pristupa liječenju ITP-a. Neki od stručnjaka pobornici su što dužeg promatranja i čekanja (engl., „*watch and wait*“), dok je dio stručnjaka sklon što ranijem započinjanju farmakološkog liječenja (1). Zagovornici „*watch and wait*“ pristupa navode kako se 80% bolesnika s ITP-om oporavi unutar prvih tri do šest mjeseci bolesti te kako većinom nemaju teška krvarenja (1, 2). Naime, samo 0,9% bolesnika s početnom blagom ili srednje teškom kliničkom slikom razvije teško krvarenje (4). Zagovornici farmakološkog pristupa navode kako se započinjanjem farmakološkog liječenja smanjuje duljina trajanja bolesti i da se broj trombocita brže normalizira (29). Odluka o liječenju donosi se uzimajući u obzir mnoge čimbenike, kao što su dob, tjelesna aktivnost i pridružene bolesti (komorbiditeti). Međutim, najbitniji čimbenik je sama težina krvarenja. Uobičajeno se u početku najčešće koristi „*watch and wait*“ pristup dok se farmakološka terapija počinje kasnije po procjeni liječnika (27, 34, 35). Iako je „*watch and wait*“ pristup učinkovit u većine djece (2, 7), pokazalo se da djeca u kojih je započeta farmakološka terapija imaju bolju kvalitetu života i manje relapsa bolesti (28-31).

U liječenju najčešće se koriste sljedeći lijekovi: intravenski imunoglobulini (IVIG), intravenski anti-D imunoglobulin (anti-D), glukokortikoidi te u posljednje vrijeme agonisti trombopoetinskih receptora (TPO-R) (1, 36). Prva terapija izbora su IVIG i kortikosteroidi. Do 1981. kortikosteroidi su bili jedina moguća terapija, međutim u posljednje vrijeme IVIG se pokazao kao moguća bolja prva linija terapije. Naime, metaanaliza šest randomiziranih

kontroliranih kliničkih pokusa s ukupno 401-im bolesnikom pokazala je kako IVIG uspješnije podiže broj trombocita u perifernoj krvi od kortikosteroida i „*watch and wait*“ pristupa (37). Najčešći način primjene IVIG-a je 0.8-1 g/kg u jednoj dozi, a iste doze se mogu ponavljati ovisno o broju trombocita i kliničkoj slici (35). Iz skupine kortikosteroida najčešće se daje prednizon u dozi 1-4 mg/kg/dan tijekom 1-4 tjedna (9). Moguće je primjenjivati visoke doze kortikosteroida metilprednizolona ili deksametazona u bolesnika koji nisu imali povoljan terapijski odgovor na konvencionalnu terapiju. Kao sljedeća opcija prve linije terapije po američkim smjernicama koristi se Anti-D u djece s ITP-om koji su Rh pozitivni i nesplenektomirani. Anti-D se ne preporučuje u Rh pozitivnih bolesnika s niskim hemoglobinom i u bolesnika u kojih se sumnja na hemolizu (27).

Kao druga linija terapije u djece koja nisu odgovorila na prvu liniju terapije koristi se rituksimab. Splenektomija se smatra zadnjom opcijom (27).

U slučaju životno ugrožavajućeg krvarenja, prema smjernicama se koristi kombinacija terapije koja uključuje brzu nadoknadu trombocita, IVIG (1 g/kg/dan kroz 2 dana) te visoke doze kortikosteroida (metilprednizolon 30 mg/kg/dan) (35). I ovdje se zadnjom opcijom, u bolesnika koji nisu odgovorili na raniju terapiju, smatra hitna splenektomija (1).

U liječenju perzistentne i kronične ITP-e u djece, IVIG i kortikosteroidi koriste se za kratkotrajno poboljšavanje stanja. IVIG se nije pokazao kao dobra terapijska opcija za liječenje kronične ITP, dok se dugotrajnija primjena kortikosteroida izbjegava zbog nuspojava. Kao opcija u liječenju kronične ITP može se koristiti monoklonsko protutijelo anti CD-20 (rituksimab), a u novije vrijeme i agonisti trombopoetinskih receptora (TPO-R) (1, 36). Splenektomija se u djece nastoji odgoditi dok je god to moguće. Iako oko 60-80% djece klinički odgovori nakon splenektomije, postoji povećan rizik za razvijanje komplikacija, prvenstveno u smislu teških sepsi (1).

## **1.2. Vitamin D**

Vitamin D (VD) je prohormon koji ima obilježja steroidnog hormona (steroid s otvorenim B prstenom) te nastaje iz 7-dehidrokolesterola. On je i mikronutrijent iz skupine vitamina topivih u mastima. Za razliku od ostalih vitamina, VD se uz alimentarni unos može sintetizirati u koži pod utjecajem ultraljubičastog zračenja. Aktivni oblik VD regulira apsorpciju kalcija i fosfata iz crijeva, mobilizaciju kalcija iz kostiju te reapsorpciju kalcija u bubrezima. Međutim, njegova funkcija nije ograničena samo na poznatu homeostazu kalcija (38-40).

### 1.2.2. Sinteza vitamina D

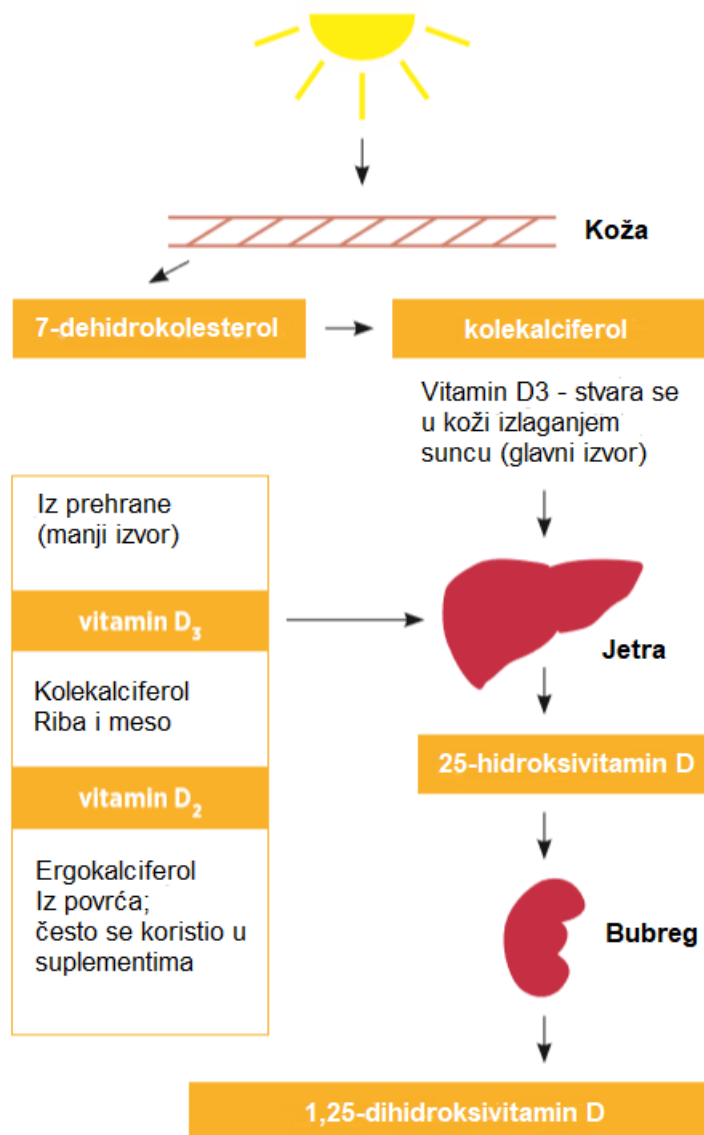
Postoje dvije najpoznatije vrste vitamina D. Kolekalciferol ili vitamin D<sub>3</sub> više se nalazi u organizmu sisavaca, a ergokalciferol ili vitamin D<sub>2</sub> nalazi se više u biljnim izvorima (41, 42). Oko 80–90% potrebne količine vitamina D stvara se endogenom sintezom vitamina D<sub>3</sub> u koži pod utjecajem UVB zraka valne duljine 290–315 nm, dok se ostalih 20% unosi probavnim sustavom (39). Samo kolekalciferol se može sintetizirati u koži pod utjecajem UVB zračenja. Vitamin D u početnom obliku je biološki inertan, a kako bi se aktivirao mora se prvo metabolizirati u jetri u 25-hidroksivitamin D (25(OH)D, ergokalciferol), a potom u bubrezima u 1 $\alpha$ , 25 hidroksivitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol)(41, 42).

Početak same sinteze VD počinje u koži djelovanjem alfa-7 reduktaze gdje iz kolesterola nastaje 7-dehidrokolesterol ili provitamin D<sub>3</sub>. Pod utjecajem UVB zračenja fotokemijskom reakcijom 7-dehidrokolesterol se pretvara u previtamin D<sub>3</sub> (prekolekalciferol) koji se termalnom izomerizacijom pretvara u vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol). Vezan za vitamin D vezni protein (DBP, engl. *vitamin D binding protein*) preko cirkulacije dolazi u jetru gdje se dijelom pohranjuje u masnom tkivu, a drugi dio započinje prvu hidroksilaciju (43, 44).

U jetri prvom hidroksilacijom, pomoću enzima 25-hidroksilaze, vitamin D<sub>3</sub> i vitamin D<sub>2</sub> (koji je unesen probavnim sustavom) pretvaraju se u 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) ili kalcidiol. Njegovo trajanje poluživota u plazmi je dva tjedna. Taj oblik vitamina D je najbolji pokazatelj statusa VD u organizmu, ali u fiziološkim koncentracijama biološki je neaktivan (38).

U bubrezima se drugom hidroksilacijom 25(OH)D aktivira u aktivni oblik 1,25-dihidroksivitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D (kalcitriol) pomoću mitohondrijskog enzima  $\alpha$ -hidroksilaze. Taj proces je pod kontrolom paratireoidnog hormona (41, 44). Manji dio kalcitriola sintetizira se i u stanicama crijeva, glatkih mišićnih stanica krvnih žila, B limfocitima, monocitima i dendritičkim stanicama (45). Metabolizam VD u tijelu prikazan je na slici 2.





**Slika 2.** Shematski prikaz metabolizma vitamina D. Preuzeto iz: Glendenning P. Measuring vitamin D. Australian prescriber. 2015 Feb;38(1). (46).

Vitamin D se inaktivira na dva načina, prvim u bubregu s enzimom 24-hidroksilazom kada se pretvara u 24,25-dihidroksivitamin D (24,25(OH)<sub>2</sub>D) te drugim pomoću citokromoma P450 (CYP24) u oblik 1 $\alpha$ ,24(R),25-trihidroksivitamin D<sub>3</sub> (38).

### 1.2.3. Fiziologija vitamina D

Aktivnost VD posredovana je VD nuklearnim receptorima (VDR) koji su dio superobitelji receptora steroidnih hormona i hormona štitne žlijezde (40, 47). Ovaj receptor je skoro ubikvitarno izražen na stanicama organizma, što objašnjava kako vitamin D utječe na brojne

funkcije organizma. Aktivni se oblik VD veže za VDR, ulazi u stanicu i aktivira ekspresiju gena. Smatra se da se čak 1250 gena direktno ili indirektno regulira s 1,25(OH)2D (48, 49).

#### **1.2.4. Preporučene razine vitamina D**

Dostatna razina 25(OH)D u djece je >75 nmol/L, dok se sve ispod te razine smatra hipovitaminozom D. Razina 25(OH)D između 50 i 75 nmol/L smatra se insuficijencijom VD, dok se razina 25(OH)D manja od 50 nmol/L smatra deficijencijom VD (50-52).

#### **1.2.5. Funkcije vitamina D**

Održavanje optimalne koncentracije kalcija u plazmi i mineralizacija kostura su klasični učinci VD. Neklasični učinci VD mogu se razvrstati u tri glavne skupine: regulacija sekrecije hormona, regulacija imunoloških funkcija i regulacija stanične proliferacije i diferencijacije (53).

##### **1.2.5.1. Funkcija vitamina D u mineralizaciji koštanog sustava i održavanju razine kalcija i fosfora**

Najpoznatija uloga vitamina D vezana je uz mineralizaciju koštanog sustava i ima važnu ulogu u regulaciji koncentracije kalcija i fosfora u plazmi. VD regulira koncentraciju kalcija u plazmi na tri načina: kontroliranjem crijevne apsorpcije kalcija, mobiliziranjem kalcija iz kostiju (aktivacijom osteoklasta) i stimulacijom reapsorpcije kalcija u distalnim tubulima bubrega. Za navedeno je, uz VD, važan i PTH i njihova međusobna interakcija (38).

##### **1.2.5.2. Utjecaj vitamina D na sekreciju hormona**

Od neklasičnih funkcija VD-a prva za spomenuti je regulacija sekrecije hormona. Naime, 1,25(OH)2D inhibira sintezu i sekreciju PTH, kao i proliferaciju paratiroidne žlijezde (54). Kako PTH stimulira produkciju 1,25(OH)2D u bubregu, PTH i 1,25(OH)2D stvaraju važnu povratnu spregu u homeostazi kalcija u organizmu.

Aktivni oblik VD-a (1,25(OH)2D) stimulira sekreciju inzulina iako taj mehanizam nije još u potpunosti definiran (55). U novijoj *in vitro* studiji na kulturama humanih i mišjih stanica pronađeno je da 1,25(OH)2D preko VDR-a utječe na ulaz kalcija u beta stanice gušterače i

time stimulira sekreciju inzulina (56). Direktnim i parakrinim putem, VD utječe na gušteraču odnosno na osjetljivost na inzulin, a VDR modulira ionske kanale za kalcij te povećava ukupno otpuštanje inzulina iz beta stanica (57-59). Smatra se kako VD pojačava izražaj receptora za inzulin koji omogućava povećan unos glukoze u stanice perifernog tkiva (57, 60).

VD također utječe i na stvaranje čimbenika rasta fibroblasta-23 (FGF23) koji se primarno stvara u kostima, odnosno osteoblastima i osteoklastima. FGF23 je hormon koji sudjeluje u kontroli homeostaze fosfata, primarno preko stimulacije fosfaturije. FGF23 smanjuje cirkulirajuću koncentraciju 1,25(OH)2D i time se također stvara povratna sprega između njega i VD-a čime se regulira razina fosfata u plazmi. Povećana koncentracija FGF23 povezana je s rahitisom i osteomalacijom (61).

### **1.2.5.3. Utjecaj vitamina D na imunološki sustav**

U zadnjih nekoliko godina intenzivno se istražuje važnost VD-a u imunom i upalnom odgovoru. Imunološke stanice imaju VDR te imaju sposobnost vezanja s VD-om čime VD utječe na imunološki odgovor, proliferaciju kao i diferencijaciju stanica (53). VD smanjuje upalni odgovor u eksperimentalnim životinjskim i staničnim *in vitro* studijama (62). VD je selektivni regulator imunološkog sustava, regulator hematopoetskog sustava, modulira aktivaciju i proliferaciju limfocita, potiče diferencijaciju monocita u promijelocite te modificira lučenje citokina u T stanicama (63, 64).

Nezhad i sur. pokazali su učinak VD-a preko VDR-a na imunološke stanice promjenom ekspresije gena koji su uključeni u apoptozu, imunološku funkciju, regulaciju transkripcije, epigenetsku modifikaciju, aktivnost staničnog ciklusa i diferencijaciju (48).

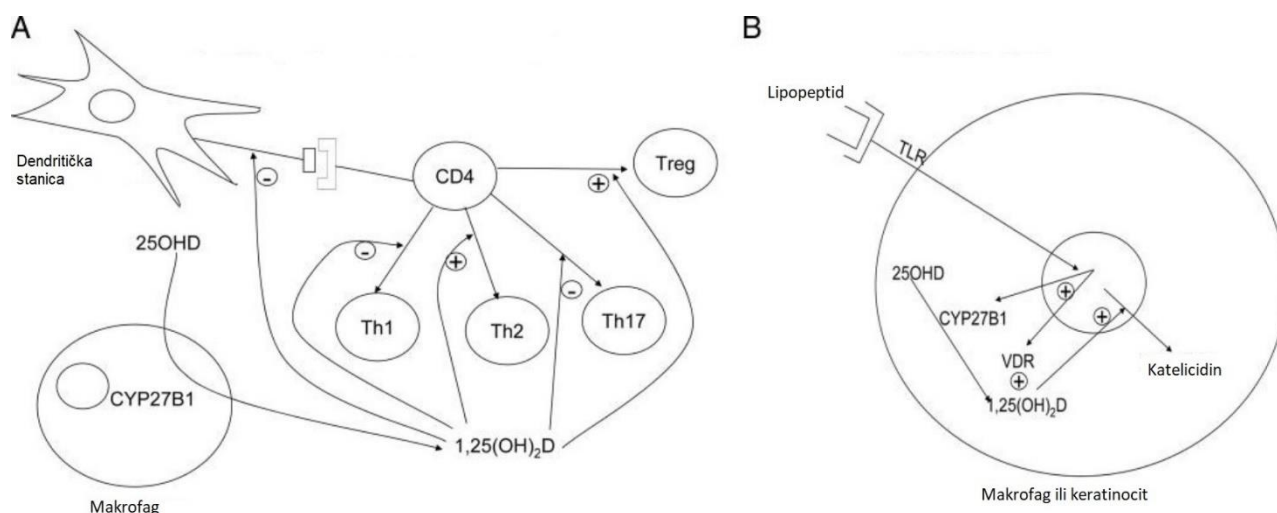
Razne su studije pokazale sposobnost VD-a da suzbija sintezu interferona gama ( $IFN\gamma$ ) i interleukina 2 (IL-2) u limfocitima periferne krvi kao i u T staničnim linijama što opet govori u prilog njegove imunomodulatorne funkcije (65, 66). Uz spomenute citokine VD stimulira i stvaranje interleukina 4 kao i transformirajućeg faktora rasta ( $TGF\beta$ -1) koji sudjeluju u upalnom odgovoru (47, 67, 68).

VDR se pronašao na antigen prezentirajućim imunološkim stanicama, kao T limfocitima, denditičkim stanicama i makrofazima (47, 67, 69-72). VD modulira i humoralni imuni odgovor utjecajem na proliferaciju i produkciju imunoglobulina u B limfocitima, diferencijaciju prekursora B limfocita u plazma stanice (73). Pokazalo se da nadoknada VD-a potiče Th1

posredovani autoimuni odgovor (74) te da nedostatak VD-a usmjerava imuni odgovor prema gubitku tolerancije (70, 75).

Svim opisanim učincima VD modulira stečeni imunološki odgovor. VD modulira karakterističnu sposobnost stečenog imunološkog odgovora da T i B limfociti stvaraju citokine i imunoglobuline protiv antigena koji su im prethodno predočili makrofazi i dendritičke stanice. Sposobnost VD-a da suprimira stečeni imunološki odgovor posebno je važna u situacijama kada je imunološki sustav usmjeren prema sebi, odnosno u autoimunosti (53) (Slika 3).

VD utječe i na urođeni imunitet aktivacijom toll like receptora (TLR) u polimorfonuklearima, monocitima i makrofagima kao i epitelnim stanicama. Preko TLR2 i citokroma P450 (engl. *Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1 - CYP27B1*), VD sudjeluje u ekspresiji antimikrobnog peptida katelicidina u spomenutim stanicama (76). Urođeni imunološki sustav funkcionira ne samo u limfopoetskom sustavu nego i u epitelnim stanicama koje tvore zaštitnu barijeru raznih tkiva, a VDR se može pronaći u svim tim tkivima (53). Utjecaj na stečeni i urođeni imunološki sustav shematski je prikazan u Slici 3.



**Slika 3.** Shematski prikaz utjecaj vitamina D na stečeni (A) i urođeni (B) imunološki sustav. Preuzeto iz: Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan;94(1):26-34. (53).

#### 1.2.5.4. Utjecaj vitamina D na proliferaciju i diferencijaciju stanica

VD inhibira proliferaciju keratinocita u bazalnom sloju epidermisa te potiče njihovu diferencijaciju utjecanjem na ekspresiju gena čiji produkti, u konačnici, stvaraju permeabilnu barijeru na koži (77). VD preko VDR-a utječe i na cikluse folikula dlake. Keratinociti koji se

pronalaze u dlaci imaju izražene VDR koji sudjeluju u proliferaciji i diferencijaciji stanica u folikulu dlake (78).

Različita istraživanja pokazala su kako postoji mogućnost da VD ima utjecaj na razvoj malignih bolesti obzirom da dosta malignih stanica izražava VDR. To se posebno odnosi na 1,25(OH)<sub>2</sub>D koji stimulira ekspresiju inhibitora staničnog ciklusa p21 i p27, ekspresiju transmembranskog proteina E-kadherina te inhibira transkripcijsku aktivnost β-katenina (79, 80). VD potiče popravak DNA oštećenja nastalih UV zračenjem u keratinocitima (53). Kako je VD supresor aktivnog imuniteta i induktor urođene imunosti, njegov je utjecaj vrlo zanimljiv u onkologiji (81, 82). Vitamin D posjeduje antiproliferativni učinak, inhibira angiogenezu i dovodi do odumiranja određenih tumorskih staničnih linija različitih bolesti (82). Novija istraživanja se posebno baziraju na povezanost polimorfizma VDR-a s razvojem i prognozom malignih bolesti. Najviše istraživanja rađeno je na povezanosti VDR-a s karcinomom dojke, rakom prostate, malignim melanomom i karcinomom bubrega (81). Istraživanja su pokazala bolje ishode liječenja u bolesnika s melanomom i akutnom mijeloičnom leukemijom koji imaju više razine VD (83, 84).

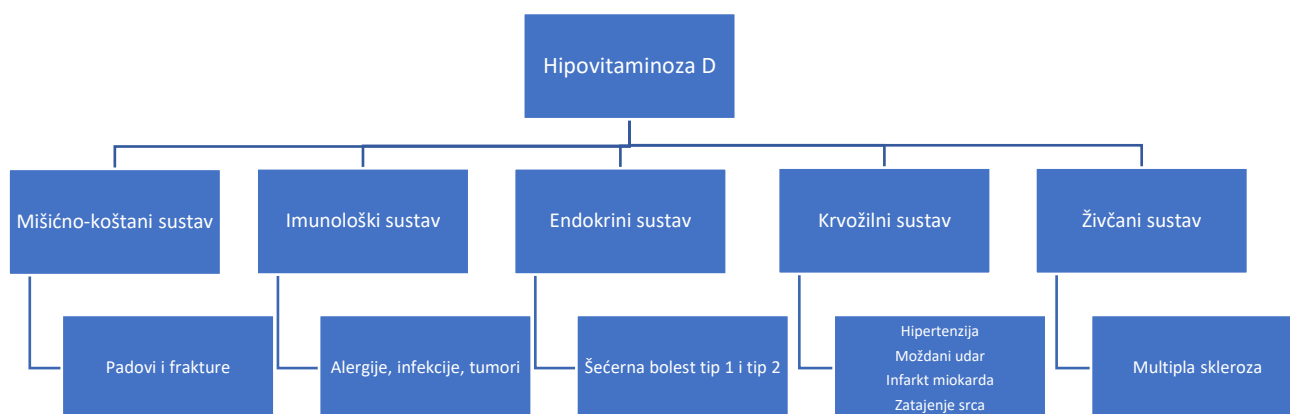
VD inhibira napredovanje staničnog ciklusa i rast tumorskih stanica u nekoliko staničnih linija raka i time sprječava proliferaciju stanica, inducira apoptozu ili suzbija ekspresiju molekula stanične adhezije i faktora rasta koji pridonose metastazi raka (85).

Istraživanja na karcinomu prostate i dojke pokazuju da VD modulacijom ekspresije različitih površinskih proteina smanjuje maligni potencijal stanica raka (86, 87).

Bhattacharya i sur. pronašli su da djeca s akutnom limfoblastičnom leukemijom imaju manjak VD te da je on povezan s lošijim ishodom bolesti. Razina VD bila je značajno niža u djece koja su umrla, u onih koji su imala komplikacije, u djevojčica i onih s ALL visokog rizika (88).

### 1.2.6. Vitamin D i bolesti

Nedostatak VD može potaknuti razvoj bolesti više organskih sustava, kao muskuloskeletnog, imunološkog, endokrinog, kardiovaskularnog, neurološkog sustava (89)(Slika 4).



**Slika 4.** Moguća povezanost hipovitaminoze D s kroničnim bolestima. Preuzeto iz: Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical Vitamin D Action. *Nutrients*. 2010 Apr; 2(4): 408–25. (89).

#### 1.2.6.1. Povezanost vitamina D i pretilosti i metaboličkog sindroma

Utvrđena je negativna korelacija između indeksa tjelesne mase i koncentracije 25(OH)D u pretiloj djece (90, 91). Smatra se da pohranjeni VD u masnom tkivu vjerojatno regulira upalni odgovor, ekspresiju gena koji reguliraju adipogenezu i adipocitnu apoptozu te utječe na lučenje leptina, adiponektina i regulaciju metabolizma (92, 93).

Utjecaj VD-a na razvoj metaboličkog sindroma još je nerazjašnjen, međutim postoje studije koje potvrđuju tu tvrdnju. U studiji Forda i sur. pronađeno je da se prevalencija metaboličkog sindroma u odraslih ispitanika smanjuje s povećanjem razina 25(OH)D (94). VD utječe na osjetljivost inzulina odnosno na razvoj inzulinske rezistencije kao i izražaj receptora za inzulin čime omogućava povećan unos glukoze u stanice (57). U nekoliko opažajnih studija pokazana je povezanost između VD-a i pojedinih odrednica metaboličkog sindroma poput arterijske hipertenzije i poremećaja lipidograma (95). Šimunović i sur. pokazali su na pedijatrijskoj

populaciji da su razine 25(OH)D bile značajno niže u bolesnika s metaboličkih sindromom te da razina 25(OH)D ima značajnu korelaciju s homeostatskim modelom procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR) (96).

### **1.2.6.2. Povezanost vitamina D i autoimunih bolesti**

U mnogim studijama pronašla se povezanost između hipovitaminoze D i veće incidencije upala i autoimunih bolesti (67, 69, 70, 97-99). Postoje studije koje su pokazale povezanost hipovitaminoze D-a s višom incidencijom šećerne bolesti tip I. Također se pokazalo kako je nadoknada VD-a povezana s poboljšanjem kontrole glikemije i sporim padom ostatne funkcije beta-stanica u djece s DM tip 1 (100-102).

VD je značajan modulator imunološkog nastanka autoimunih bolesti štitnjače poput Gravesove bolesti i Hashimotovog tireoiditisa. On ima protuupalne i imunoregulacijske učinke djelovanjem na polimorfizam gena VDR-a te vezanjem 1-alfa-hidroksilaze i 25-hidroksilaze pojačava urođeni imunološki odgovor (103). Kivity je u svojoj studiji pokazao značajno učestaliju prevalenciju hipovitaminoze D u bolesnika s autoimunim bolestima štitnjače. Također se pokazalo da nadoknada VD-a može pozitivno utjecati na pojavnost autoimunih bolesti štitnjače (104).

Uloga VD u nastanku i tijeku multiple skleroze povezuje se s genetskim polimorfizmima koji su uključeni u metabolizam VD-a. VD svoj utjecaj vrši preko VDR-a koji može izmijeniti ekspresiju HLA-DRB1 koji je bitan u nastanku multiple skleroze (105). Runia i sur. su pokazali da su niske razine VD-a povezane s povećanim rizikom relapsa multiple skleroze (106). U studiji Mungera i sur. pronađeno je da nadoknada VD-a smanjuje rizik za razvijanje multiple skleroze za 40% (107).

Hipovitaminoza D je učestala u upalnim bolestima crijeva. Povezana je s aktivnošću bolesti, češćim relapsima, učestalijim postoperativnim recidivima, lošijom kvalitetom života i općenito slabijim odgovorom na biološke pripravke u usporedbi s bolesnicima s dostatnim razinama 25(OH)D (108). U genetski predisponiranih osoba nedostatak vitamina D može biti čimbenik razvoja upalne bolesti crijeva (109). Također se pokazalo da nadoknada VD može pozitivno utjecati na klinički tijek Chronove bolesti (110).

### **1.2.6.3. Povezanost vitamina D i astme**

VDR su prisutni na stanicama koje su uključene u upalu i imunomodulaciju respiratornog epitela, a utvrđena je i veza između polimorfizma VDR-a i astme (111). Metaanaliza i sustavni pregled deset studija pokazala je povezanost niske razine VD-a s učestalim egzacerbacijama, češćom upalom dišnih putova, smanjenom funkcijom pluća i lošijom prognozom u astmatičnih bolesnika (112). Novija istraživanja pokazala su da bi rana nadoknada VD-a u roditelja i postnatalno u dojenčadi mogla spriječiti razvijanje astme i ponavljajućih opstrukcija u prve 3 godine života (113).

U randomiziranom kontroliranom ispitivanju u djece oralno se ordinirao VD u dozi od 60 000 internacionalnih jedinica (engl. *international units* - IU) mjesečno. Nakon 6 mjeseci nadoknade autori su u skupini djece koja su uzimala VD utvrdili poboljšanje ekspiratornog protoka, bolju kontrolu astme, smanjenu potrebu za hitnim posjetama liječniku i za oralnom upotrebom steroida u usporedbi sa skupinom djece koja je primala placebo (114). Velika metaanaliza 14 randomiziranih kontroliranih kliničkih pokusa (1421 ispitanik) pokazala je da nadoknada VD-a smanjuje učestalost pogoršanja astme, pogotovo u bolesnika s nedostatkom VD-a (115).

### **1.2.6.4. Povezanost vitamina D i kardiovaskularnih bolesti**

Wang i sur. su u metaanalizi pokazali inverznu linearnu povezanost između cirkulirajuće razine vitamina D i rizika od srčano-žilnih bolesti. U ispitanika čija je razina 25(OH)D bila između 20 i 60 nmol/L pronađen je značajno viši rizik od srčano-žilnih bolesti (116). Veliko nacionalno istraživanje u SAD-u pokazalo je da afroamerička populacija s niskom razinom VD-a ima povišen krvni tlak u usporedbi s bijelcima (117).

### **1.2.6.5. Povezanost vitamina D i imune trombocitopenije**

U literaturi se tijekom posljednjeg desetljeća istraživala učestalost i utjecaj hipovitaminoze D u autoimunim bolestima među kojima je i imuna trombocitopenija. Fatizzo i sur. pronašli su da odrasli bolesnici s ITP-om imaju niske razine 25(OH)D (118), ali smatraju da su potrebne daljnje studije oko spomenute teme.



Koliko nam je poznato, ne postoje objavljena istraživanja o utjecaju hipovitaminoze D na težinu kliničke slike ITP-a u djece, pogotovo studije koje koriste razne sustave bodovanja krvarenja u ITP-u.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Glavni ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti učestalost hipovitaminoze D u bolesnika s novootkrivenim ITP-om
2. Odrediti srednju vrijednost razine 25(OH)D u bolesnika s novootkrivenim ITP-om.
3. Odrediti povezanost razine 25(OH)D s brojem trombocita u perifernoj krvi u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
4. Odrediti povezanost razine 25(OH)D s težinom krvarenja u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a koristeći SMOG i IBLS sustave bodovanja krvarenja.
5. Odrediti povezanost spola i dobi bolesnika s težinom krvarenja novootkrivenog ITP-a koristeći SMOG sustav bodovanja krvarenja.
6. Odrediti povezanost spola i dobi bolesnika s razinom 25(OH)D u bolesnika s novootkrivenim ITP-om.

Sporedni ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti povezanost razine 25(OH)D sa z vrijednosti ITM-a u bolesnika s novootkrivenim ITP-om.
2. Odrediti broj bolesnika s kroničnim ITP-om u vremenskom razdoblju istraživanja.
3. Odrediti najčešće godišnje doba dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
4. Utvrditi koji načini liječenja su se provodili u bolesnika s novootkrivenim ITP-om.

Hipoteze ovog istraživanja su sljedeće:

1. Većina bolesnika s novootkrivenim ITP-om ima hipovitaminozu D.
2. Bolesnici ženskog spola imaju nižu srednju vrijednost razine 25(OH)D i višu srednju vrijednost ocjene SMOG sustava bodovanja krvarenja.
3. Bolesnici s nižom razinom 25(OH)D u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a imaju težu kliničku sliku određenu korištenjem SMOG i IBLS sustava bodovanja krvarenja.
4. Bolesnici s nižom razinom 25(OH)D u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a imaju niže vrijednosti broja trombocita u perifernoj krvi.
5. Postoji negativna korelacija između razine 25(OH)D i dobi bolesnika u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
6. Postoji pozitivna korelacija između dobi bolesnika i vrijednosti ocjene SMOG sustava bodovanja krvarenja u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
7. Postoji negativna korelacija između razine 25(OH)D i z vrijednosti ITM-a u bolesnika s novootkrivenim ITP-om.
8. Novootkrivena ITP se najčešće dijagnosticira tijekom zime.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### **3.1. Ustroj istraživanja**

Istraživanje je s obzirom na pristup opisno. Glede načina dobivanja podataka riječ je o primarnom istraživanju, dok je vremenska orijentacija prospektivna. Specifični ustroj koji će se koristiti je presječno istraživanje. Istraživanje će se provesti u Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split, Zavodu za hematologiju, onkologiju i kliničku genetiku Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Rijeka i u njihovim akreditiranim laboratorijima. U istraživanju sudjeluju liječnici opće medicine, specijalisti pedijatri i magistri medicinske biokemije. Koordinator istraživanja je mentor izrade doktorskog rada.

### **3.2. Ispitanici**

Ispitanici su bolesnici hospitalizirani zbog novootkrivene ITP u Zavod za hematologiju i onkologiju Klinike za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2020. te u Zavod za hematologiju, onkologiju i kliničku genetiku Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2020.

Kriteriji za uključivanje u studiju su: dob između 0 i 18 godina, ITP dijagnosticirana kliničkim pregledom i laboratorijskom dijagnostičkom obradom (broj trombocita u perifernoj krvi  $<100 \times 10^9/L$ ). Iz istraživanja smo isključili bolesnike kojima roditelji nisu pristali na sudjelovanje u istraživanju te nisu potpisali obrazac informiranog pristanka, bolesnike u kojih nedostaje dio medicinske dokumentacije, bolesnike koji su primili krvne pripravke u razdoblju od mjesec dana prije postavljanja dijagnoze ITP kao i one bolesnike koji boluju od sekundarne trombocitopenije koja je posljedica druge dijagnosticirane akutne ili kronične bolesti.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split (08.03.2016. Klasa: 500-03/17-01/77, Ur.br.: 2181-147-01/06/M.S-17-2) te Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka (Klasa: 003-05/18-1/103, Ur.br.:2170-2902/1-18-2. Roditelji svih ispitanika potpisali su Obrazac informiranog pristanka.

### 3.3. Postupci

Za svakog ispitanika određeni su sljedeći parametri: razina 25(OH)D, broj trombocita u perifernoj krvi, težina kliničke slike utvrđena korištenjem SMOG i IBLS sustava bodovanja krvarenja, ITM sa z vrijednosti. Također su se prikupili podatci o bolesnikovoj dobi, spolu, mjestu i datumu liječenja na dan dijagnoze ITP. Navedeno se prikupljalo temeljem dostupne medicinske dokumentacije. Prema datumu dijagnoze ITP-a određivali smo godišnje doba dijagnoze: proljeće (21. ožujka - 21. lipnja), ljeto (21. lipnja - 23. rujna), jesen (23. rujna - 21. prosinca) i zima (21. prosinca - 21. ožujka).

Periferna venska krv bolesnika uzorkovala se u standardni BD Vacutainer® SSTII Advance (BD, Plymouth, UK) spremnik te je radi daljnje analize poslana u akreditirani Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split i Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Razina 25(OH)D u serumu je analizirana koristeći komercijalno dostupni Elecsys Vitamin D ukupni test s Cobase601 analizatorom (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Švicarska). Ovaj test mjeri razinu 25(OH)D koristeći kompetitivnu tehniku vezanja elektrokemiluminiscencije. Raspon detekcije testa iznosi 7,5-175 nmol/L 25(OH)D, a osjetljivost testa je 5 nmol 25(OH)D. Metoda je standardizirana na temelju međunarodnih standarda. Dostatna razina 25(OH)D u djece je >75 nmol/L, dok se sve ispod te razine smatra hipovitaminozom D (50, 52). Ako je razina 25(OH)D između 50 i 75 nmol/L smatra se insuficijencijom VD, dok se razine 25(OH)D manje od 50 nmol/L smatraju deficijencijom VD.

U trenutku postavljanja dijagnoze ITP bolesnici su klinički pregledani te je određena težina kliničke slike korištenjem sustava bodovanja krvarenja u skladu sa smjernicama međunarodne ITP radne skupine (IWG) za SMOG sustav bodovanja (25) te smjernicama Page i Psalle za IBLS sustav bodovanja (24).

SMOG sustav bodovanja krvarenja je sustav koji kategorizira krvarenje u bolesnika s ITP-om. Ocjena krvarenja prema SMOG sustavu izračunava se na ovaj način: krvarenja su grupirana u 3 glavna dijela: koža (S-*skin*), sluznice (M-*mucous membranes*), organi (O-*organs*) s ocjenjivanjem intenziteta krvarenja (G-*gradation*). Ocjene se dodjeljuju u vrijeme pregleda, a u rasponu su od 0 do 3 ili 4 (s ocjenom 5 za fatalno krvarenje). Za sluznice (na primjer epistaksa) i za organe (osim intrakranijsko i intraokularnog krvarenja) daju se ocjene od 0 do 4. Za ostala mjesta krvarenja (kožu) daju se ocjene od 0 do 3. U slučaju da bolesnik navodi krvarenje, ali za to nema dokaza u medicinskoj dokumentaciji, daje se ocjena 1. Unutar svakog

dijela daje se ista ocjena za krvarenja sa sličnim kliničkim utjecajem. Za točnu procjenu krvarenja u svakom dijelu koristi se tablica S1 (dostupna u Dodatku), kao i slikovne upute dostupne na službenoj internetskoj stranici IWG-a (<http://itpbat.fondazioneematologia.it/>)(25). Naprimjer, ako je ocjena za dio kože 2, sluznica i organa 1 onda je konačna ocjena S2M1O1. Bodovanje se također može koristiti i kao zbroj spomenutih dijelova SMOG sustava kako bi se dobila ukupna brojčana ocjena. Viša SMOG ocjena predstavlja teže krvarenje. Za statističku analizu u ovoj studiji koristili smo SMOG ukupnu ocjenu kao i pojedinačne ocjene krvarenja po dijelovima (koža, sluznice i organi) (25).

U IBLS sustavu bodovanja krvarenja dodjeljuju se ocjene od 0-2 za 9 pojedinih anatomskih mjesta (koža, usta, epistaksa, gastrointestinalno, urinarno, ginekološko, pulmonalno, intrakranijsko, subkonjuktivalno) (24).

Svim ispitanicima izvršena su i antropometrijska mjerenja. Tjelesna masa i visina izmjereni su na standardiziranim baždarenim visinomjerom i vagom (Seca, Hamburg, Njemačka). Djeca su mjerena bez cipela, u donjem rublju. Mjerilo se tri puta, pri čemu bi se uzimala srednja sredina izmjerenih vrijednosti. Indeks tjelesne mase izračunat je kao tjelesna masa (kg) podijeljena s kvadratom tjelesne visine ( $m^2$ ). Kod pedijatrijske populacije procjena uhranjenosti se određuje prema prilagođenim centilnim krivuljama ITM-a za dob i spol, a iz kojih se izračunava standardna devijacija te se vrijednost prikazuje u obliku z vrijednosti (engl. *z score*).

### **3.4. Materijali**

Za uzorkovanje periferne krvi koristio se spremnik BD Vacutainer® SSTII Advance (BD, Plymouth, UK). Pri određivanju razine 25(OH)D u perifernoj krvi koristio se Elecsys® Vitamin D ukupni test s analizatorom Cobas e601 (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Švicarska).

Za kvantificiranje težine kliničke slike ITP-a odnosno težine krvarenja koristili su se SMOG sustav bodovanja krvarenja (25) i IBLS sustav bodovanja (24). Iz medicinske dokumentacije izvukli su se sljedeći podatci bolesnika: dob, spol, datum i mjesto liječenja novodijagnosticirane ITP, tjelesna visina i tjelesna masa.



Pretilost je definirana kao ITM z vrijednost  $>2$  prilagođena za dob i spol, a izračunata je za sve ispitanike prema centilnim krivuljama Svjetske zdravstvene organizacije pomoću softvera AnthroPlus (WHO, Ženeva, Švicarska) (119-121).

### 3.5. Statistički postupci

#### 3.5.1. Računanje minimalne veličine uzorka

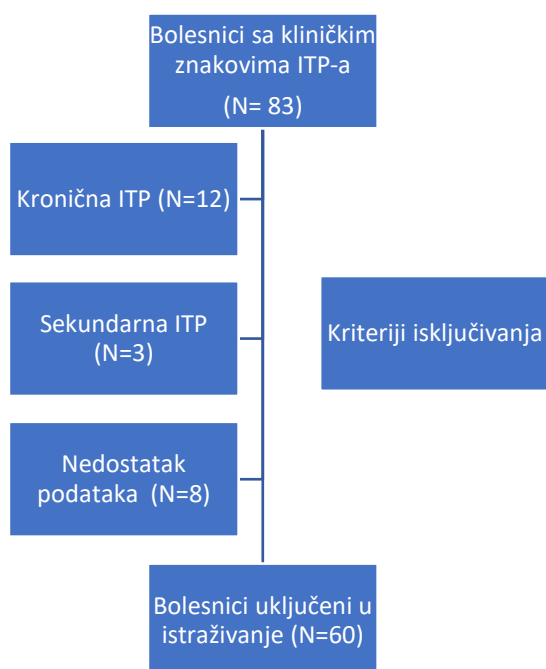
Za potvrdu hipoteze povezanosti 25(OH)D i težine kliničke slike ITP-a korišteni su neobjavljeni i objavljeni podatci iz pilot studije Čulić i suradnika kako bi se izračunala minimalna veličina uzorka (122). U toj pilot studiji uključen je 21 ispitanik. Za modeliranje korelacije između 25(OH)D i SMOG ocjene koristio se linearni model i Demingova metodologija (123). Na temelju podataka iz pilot studije čak i s 21 ispitanikom postigao se statistički relevantan nagib korelacijskog modela ( $-0.06$ , 95%CI  $(-0.22,-0.05)$ ). U konačnici se u studiju uključilo 60 bolesnika, te je naknadno urađen izračun *post hoc* snage studije za glavnu hipotezu (povezanost 25(OH)D i SMOG ocjene). Tako da je snaga studije u konačnici iznosila 98% uz veličinu pogreške tipa jedan od 5%.

#### 3.5.2. Statistički testovi koji se koriste u istraživanju

Ovisno o distribuciji, deskriptivni podatci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, te minimum i maksimum. Kako bi prikazali korelaciju između SMOG ocjene i razine 25(OH)D koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije, a daljnji odnos između dotičnih varijabli opisali linearnim modelom korelacije (F test). Iste tehnike smo koristiti i za korelaciju između IBLS ocjene i razine 25(OH)D kao i broja trombocita i razine 25(OH)D. Nadalje, odnos između pojedinih dijelova SMOG ocjene i razine 25(OH)D testirali smo testom linearnog trenda ili t testom. Za analizu odnosa 25(OH)D i z vrijednosti ITM-a koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije i linearni model pri opisu korelacije. Kod analize odnosa SMOG ocjene i spola koristili smo Mann-Whitneyev test, a kod analize odnosa 25(OH)D i spola t test. Za analizu odnosa SMOG ocjene i dobi bolesnika koristili smo linearni model pri opisu korelacije i Spearmanov koeficijent korelacije, a za analizu odnosa 25(OH)D i dobi koristili smo Pearsonov koeficijent korelacije i linearni model pri opisu korelacije. Statističku analizu smo učinili s GraphPad softverom (La Jolla, California USA), dok smo razinu značajnosti (p vrijednost) postavili na 0.05 uz interval pouzdanosti (engl. *confidence interval* - CI) od 95%. Kao statističke mjere dokaza koristili smo 95% interval pouzdanosti, p vrijednosti, te koeficijente korelacije (r) i determinacije ( $R^2$ ). Razina značajnosti što se tiče p vrijednosti je postavljena na 5%.

#### **4. REZULTATI**

Za vrijeme trajanja istraživanja, u ukupno 83 bolesnika postavljena je sumnja na imunu trombocitopeniju zbog postojanja kliničkih znakova ITP. Od toga 63 je liječeno u Kliničkom bolničkom centru Split, a 20 u Kliničkom bolničkom centru Rijeka. Od ukupnog broja bolesnika iz istraživanja su isključena 23 bolesnika (27.7%), a zbog: postavljene dijagnoze kronične trombocitopenije (N=12), dijagnoze sekundarne trombocitopenije nastale kao dio potvrđene druge akutne ili kronične bolesti (N=3) i nedostatka podataka (N=8). Ukupno 60 bolesnika (72.2%) uključeno je u istraživanje. Hodogram uključivanja bolesnika u istraživanje je prikazan u slici 5.



**Slika 5.** Hodogram uključivanja ispitanika u istraživanje.

Među ispitanicima bilo je 29 bolesnika muškog spola (48.3%) i 31 bolesnik ženskog spola (51.7%). Insuficijencija VD je pronađena u 24 bolesnika (40%), deficijencija VD u 14 bolesnika (23.3%), a 22 bolesnika (36.7%) imala dostatne razine 25(OH)D u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.

Detaljni podaci o dobi, broju trombocita, razini 25(OH)D, ITM-u, ITM z vrijednosti, SMOG i IBLS ocjeni u ispitanika su prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2.** Podatci o dobi, razini 25(OH)D, broju trombocita, ITM-u, ITM z vrijednosti, te IBLS i SMOG ocjeni u bolesnika s novootkrivenom ITP (N=60).

	<b>Svi bolesnici (N=60)</b>	<b>Dostatna razina 25(OH)D (N=22)</b>	<b>Hipovitaminoza D (N=38)</b>
	Srednja vrijednost ± SD (Min-Max)		
<b>Dob u vrijeme dijagnoze, godine</b>	5,7 ± 4,9 (0,2-17,5)	3,3 ± 3,7 (0,2-13,1)	7,1 ± 5 (0,8-17,5)
<b>25(OH)D, nmol/l</b>	66 ± 24 (13,9-125,1)	92 ± 14 (75,4-125,1)	52 ± 14 (13,9-74,2)
<b>Trombociti, x10<sup>9</sup>/L</b>	9,4 ± 8,8 (1-39)	7,2 ± 6,6 (2-30)	10 ± 9,8 (1-39)
<b>IBLS<sup>a</sup></b>	4,6 ± 1,8 (1-9)	4,0 ± 1,8 (1-9)	4,9 ± 1,7 (1-9)
<b>SMOG<sup>b</sup></b>	4,1 ± 1,4 (2-7)	3,3 ± 1,3 (2-6)	4,5 ± 1,4 (3-7)
<b>ITM<sup>c</sup>, kg/m<sup>2</sup></b>	16 ± 2,1 (14,1-23,7)	16 ± 1,3 (14,2-18,9)	17 ± 2,4 (14,1-23,7)
<b>ITM z vrijednost</b>	0,09 ± 1,01 (-3,0-1,6)	-0,02 ± 1,0 (-2,3-1,6)	0,16 ± 1,0 (-3,0-1,63)

<sup>a</sup>IBLS – *Immune thrombocytopenia Bleeding Scale* sustav za bodovanje krvarenja (24);

<sup>b</sup>SMOG – *Skin-Mucose-Organ-Gradation* sustav za bodovanje krvarenja (25); <sup>c</sup>ITM – Indeks tjelesne mase; SD – standardna devijacija; Min – minimum; Max - maksimum.

Analizom datuma prijema na bolničko liječenje, utvrđeno je da je najmanje bolesnika s ITP-om dijagnosticirano za vrijeme ljeta (N=9, 15%), dok je najviše bolesnika dijagnosticirano tijekom zime (N=19, 31.7%). U proljeće je dijagnosticirano 18 bolesnika (30%), dok ih je u jesen dijagnosticirano 14 (23.3%).

Među ispitanicima, 30% bolesnika (N=18) imalo je teže krvarenje iz sluznica ili teže organsko krvarenje (u SMOG ocjeni M ili O vrijednost >2) u trenutku dijagnosticiranja ITP-a. Od tih 18 bolesnika, 10 je imalo krvarenje samo iz sluznica, 5 organsko krvarenje, dok su 3 bolesnika imala oba krvarenja. Nije bilo slučajeva intrakranijskog krvarenja.

Od ukupnog broja bolesnika s novodijagnosticiranom ITP, 26 bolesnika (43.3%) liječeno je „*watch and wait*“ pristupom. IVIG je bio je najčešći tip farmakološkog liječenja. Samo njime je liječeno ukupno 26 bolesnika (43.3%), a u 6 bolesnika (10%) kombiniran je s kortikosteroidima. Isključivo kortikosteroidima liječena su 2 bolesnika (3.3%).

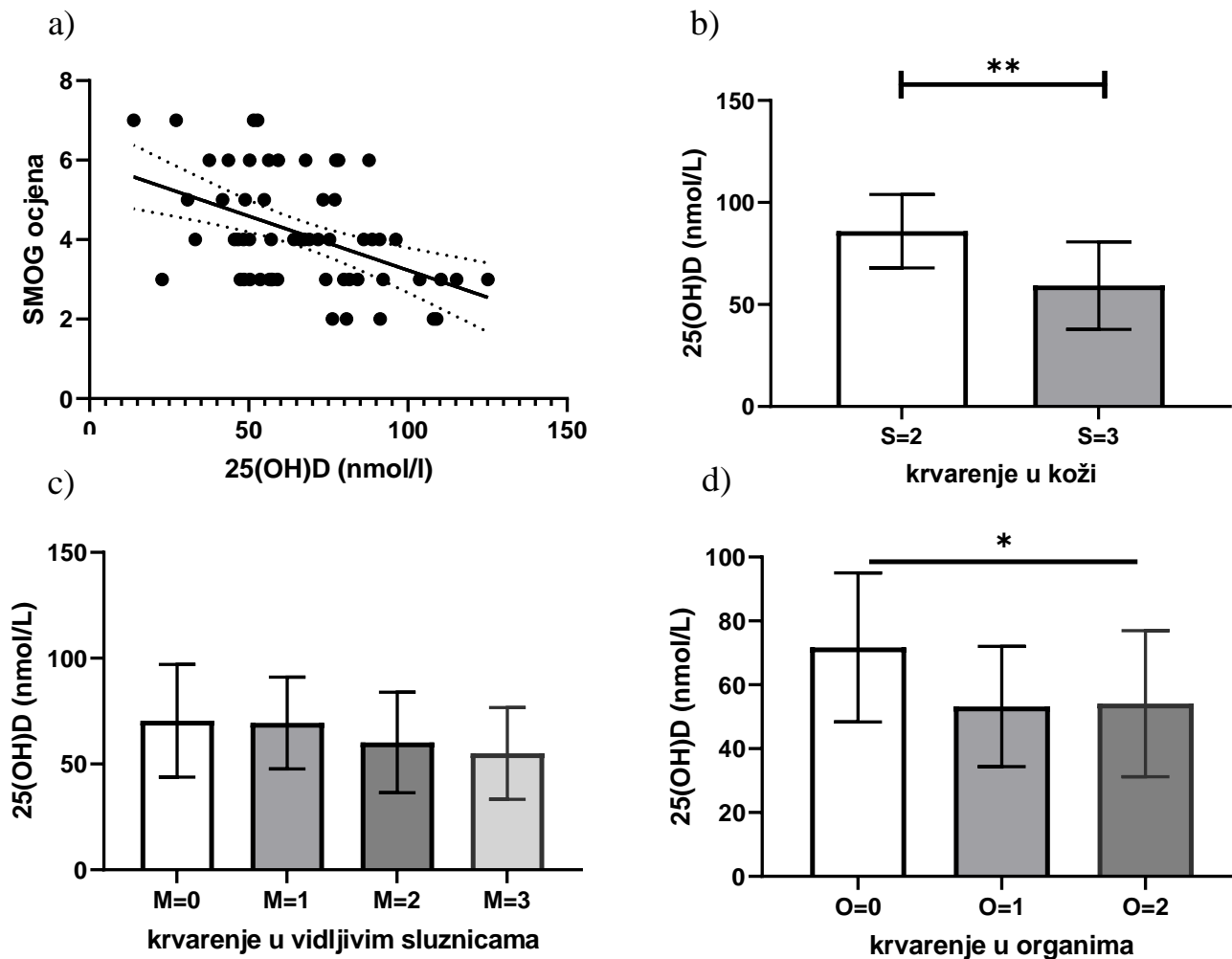
Zbog moguće pristranosti u regrutaciji između dva centra u kojima se odvijala studija, usporedili smo sljedeće varijable između centara: koncentracija vitamina D u krvi, SMOG ocjena, IBLS ocjena, broj trombocita u krvi, ITM Z vrijednost te dob. Za ni jednu varijablu se ne može sa sigurnošću od 95% tvrditi da postoji razlika između centara (Tablica S2 u Dodatku). Nadalje za glavnu hipotezu (povezanost SMOG ocjene i razina vitamina D u krvi) su uspoređena dva modela, jedan koji za nezavisnu varijablu ima samo razinu vitamina D u krvi, te drugi koji uz razinu vitamina D ima i kodirajuću varijablu za centar. Prvi model je 2.3 puta vjerojatniji od drugog (razlika u Akaiake-jevom informacijskom kriteriju (AIC-u) je 1.676) s obzirom na prikupljene podatke. Stoga u konačnici ne možemo sa sigurnošću tvrditi da ima razlika između pacijenata u oba centra (Tablica S3 u Dodatku).

#### **4.1. Povezanost između razine 25(OH)D i SMOG ocjene**

Pronašli smo značajnu linearnu povezanost između razine 25(OH)D i SMOG ocjene ( $p=0,002$ , F test) što znači da bolesnici s nižom razinom 25(OH)D imaju veće vrijednosti SMOG ocjene. Kako bi dodatno potvrdili da hipovitaminoza D inverzno korelira sa SMOG ocjenom, usporedili smo razine 25(OH)D sa svakim pojedinim dijelom SMOG ocjene.

Analizirajući težinu krvarenja u koži (S dio SMOG ocjene) pronašli smo kako bolesnici s nižim razinama 25(OH)D imaju teža krvarenja u koži s razlikom srednjih vrijednosti od  $26 \pm 5$  nmol/L ( $p<0,0001$ , t test).

Nije bilo značajne povezanosti između težine krvarenja u sluznicama i razine 25(OH)D. Pronašli smo značajan negativni trend ( $p=0,01$ , test linearnog trenda) koji pokazuje da su češća teža organska krvarenja u bolesnika s nižim razinama 25(OH)D. Ovi rezultati detaljno se prikazuju u slici 6.



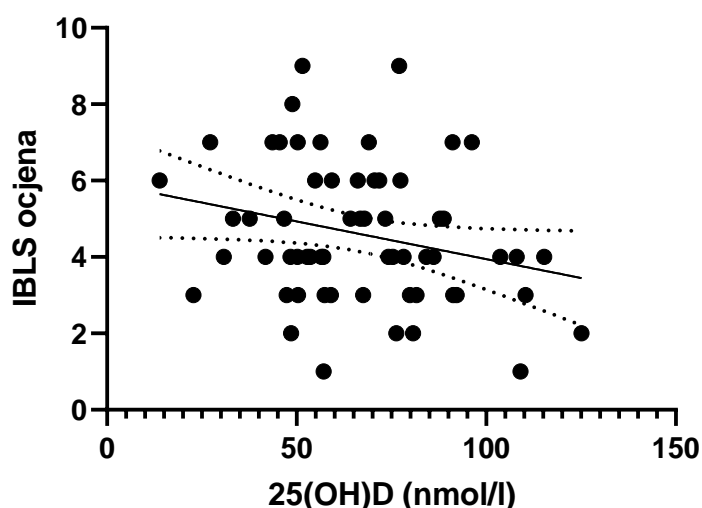
**Slika 6.** a) Graf linearne korelacije između razine 25(OH)D i SMOG ocjene krvarenja. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je  $-0,027$  (95% CI  $-0,04$  do  $-0,007$ ) s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) na  $5,99$  (95% CI  $4,97$  do  $6,93$ ).  $R^2=0,21$ ,  $p=0,0002$ , F test. b) Razlika između srednjih vrijednosti razina 25(OH)D kod dvije grupe bolesnika sa S2 i S3 krvarenjem u koži izračunatim SMOG ocjenom (t test,  $p<0,0001$ , razlika  $26,67$  nmol/L, 95% CI  $14,88$  do  $38,46$ ). c) Razdioba srednjih vrijednosti razina 25(OH)D u grupama bolesnika s različitim težinama krvarenja u sluznicama (prikazani SMOG ocjenom) koristeći test linearnog trenda nalazi se prosječan pad razine 25(OH)D od  $5,17$  nmol/L (95% CI  $1,29$  do  $-11,64$ ,  $p=0,12$ ) s težinom krvarenja. d) Razdioba srednjih vrijednosti razine 25(OH)D u grupama bolesnika s različitim težinama krvarenja u

organima (prikazani SMOG ocjenom) koristeći test linearnog trenda nalazi se prosječan pad razine 25(OH)D od 10,19 nmol/L (95% CI -1,83 do -18,54,  $p=0,017$ ) s porastom ocjene. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

U konačnici, pošto je SMOG ocjena diskretna varijabla, koristeći Spearmanovu korelaciju, također smo pronašli statistički značajnu povezanost između razine 25(OH)D i SMOG ocjene ( $p=0,0006$ , Spearman  $r=-0,43$ ).

#### 4.2. Povezanost između razine 25(OH)D i IBLS ocjene

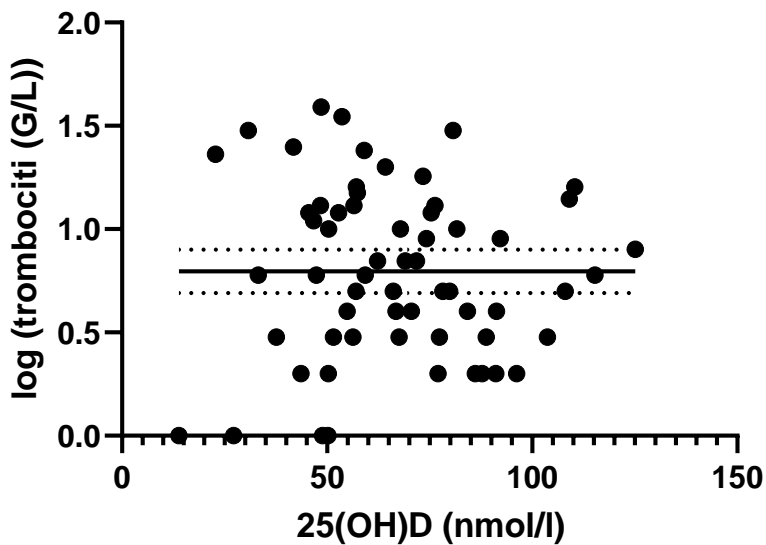
Opisujući odnos razine 25(OH)D i IBLS ocjene krvarenja linearnom korelacijom, pronašli smo statistički značajnu negativnu korelaciju dvije varijable ( $p=0,048$ , F test) (Slika 7). Koristeći Spearmanovu korelaciju dobili smo rezultat koji je na granici statističke značajnosti (Spearman  $r=-0,24$ ,  $p=0,058$ ).



**Slika 7.** Graf linearne korelacije između razine 25(OH)D i IBLS ocjene krvarenja. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je -0,02 (95% CI -0,03 i  $-9,88 \times 10^{-5}$ ) s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) od 5,92, dok je 95% CI za odsječak na ordinati 4,46 do 7,29.  $R^2=0,06$ ,  $p=0,048$ , F test.

#### 4.3. Povezanost između razine 25(OH)D i broja trombocita

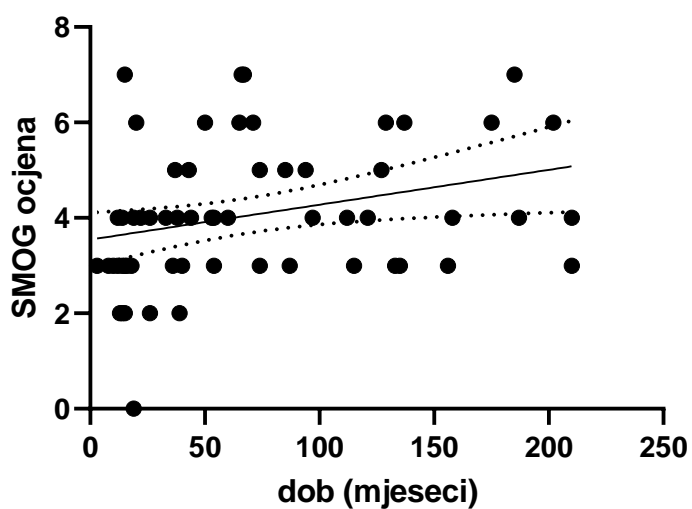
Nije nađena značajna linearna korelacija između razine 25(OH)D i broja trombocita u ispitanika ( $R^2=0,0001$ ,  $p=0,87$ , F test) niti korištenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije ( $r=-0,18$ ,  $p=0,172$ )(Slika 8).



**Slika 8.** Graf linearne korelacije između razine 25(OH)D i broja trombocita. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je -0.0003 (95% CI -0,0049 do 0,0042) s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) na 0,81 (95% CI 0,49 do 1,14).  $R^2=0,0001$ ,  $p=0,87$ , F test.

#### 4.4. Povezanost spola i dobi bolesnika s razinom 25(OH)D i SMOG ocjenom

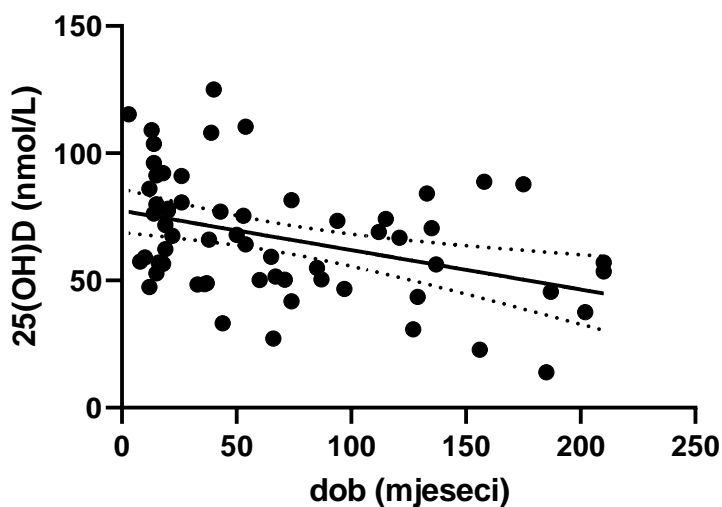
Pronašli smo linearni odnos između dobi bolesnika i vrijednosti SMOG ocjene (Slika 9). Isto se dobije i Spearmanovom korelacijom ( $r=0,38$ ,  $p=0,002$ ), što znači da stariji bolesnici imaju više vrijednosti SMOG ocjene.





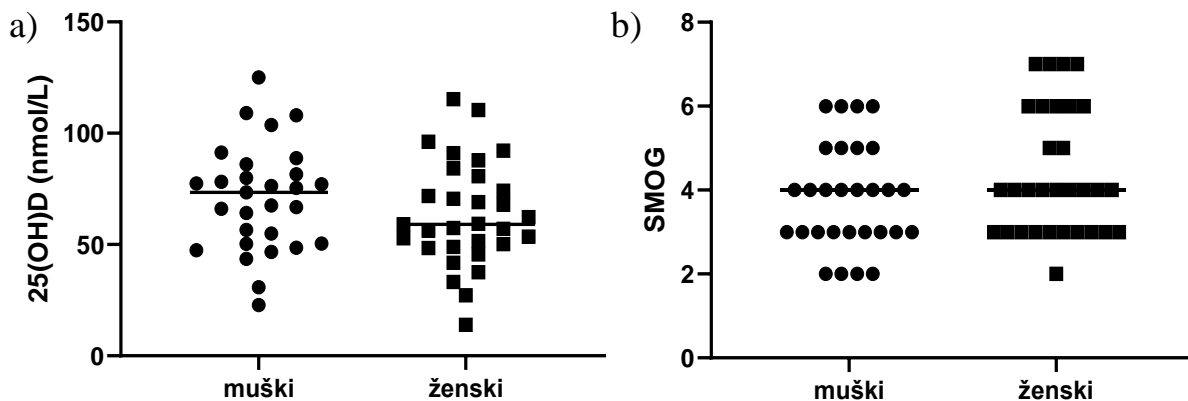
**Slika 9.** Graf linearne korelacije između dobi bolesnika i SMOG ocjene. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je 0,017 (95% CI 0,0001 do 0,02 s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) 3,54 (95% CI 2,98 do 4,11).  $R^2=0,08$ ,  $p=0,02$ , F test.

Pronađen je linearni odnos između dobi bolesnika i razina 25(OH)D (Slika 10). Pearsonova korelacija ( $r=-0,39$ ,  $p=0,001$ ) ukazuje također na isti odnos, što znači da stariji bolesnici imaju niže razine 25(OH)D.



**Slika 10.** Graf linearne korelacije između dobi bolesnika i razine 25(OH)D. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je -0,15 (95% CI -0,24 i -0,05) s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) od 77,41 (95% CI 68,8 do 86,2).  $R^2=0,15$ ,  $p=0,001$ , F test.

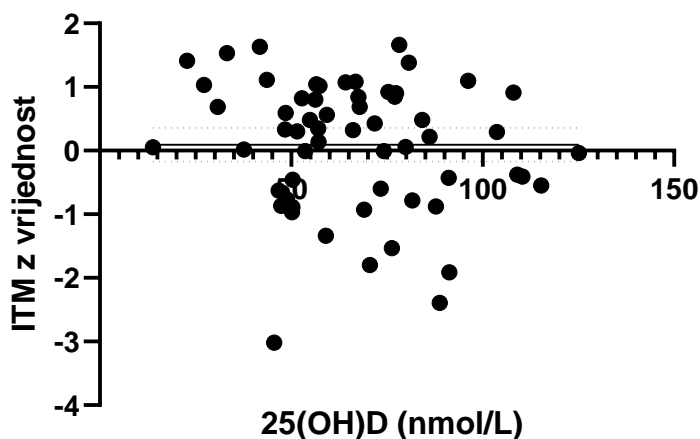
Nismo pronašli razlike u vrijednosti SMOG ocjene između spolova (iste srednje vrijednosti SMOG ocjene za oba spola, Mann Whitney test  $p=0,28$ ), kao ni značajne razlike u razini 25(OH)D između spolova (razlika srednjih vrijednosti razina 25(OH)D između muškog i ženskog spola bila je  $7,14 \pm 6,1$ ,  $p=0,24$ , t test)(Slika 11).



**Slika 11.** a) Povezanost spola s razinom 25(OH)D. Razlika srednjih vrijednosti razina 25(OH)D između muškog i ženskog spola bila je  $7,14 \pm 6,1$  (t test,  $p=0,24$ , 95% CI -19,36 do 5,062). b) Povezanost spola sa SMOG ocjenom. Razlika srednjih vrijednosti SMOG između dva spola 0 (Mann Whitney test,  $p=0,28$ ).

#### 4.5. Povezanost između razine 25(OH)D i z vrijednosti indeksa tjelesne mase

Analizom povezanosti z vrijednosti ITM-a i razine 25(OH)D, nismo pronašli statistički značajnu linearnu povezanost ( $p=0,197$ , F test) (Slika 12) niti Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $p=0,2$ ).



**Slika 12.** Graf linearne korelacije između z vrijednosti indeksa tjelesne mase i razine 25(OH)D. Prosječni nagib ( $\beta_1$ ) je 0 s odsječkom na ordinati ( $\beta_0$ ) od 0,09 (95% CI između -0,17 i 0,035),  $R^2=0$ ,  $p=0,197$ , F test.

## **5. RASPRAVA**

Ovim istraživanjem dobiveno je više značajnih rezultata. Kao prvo, bolesnici s nižim razinama 25(OH)D imaju teža krvarenja u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a, a što je utvrđeno korištenjem SMOG sustava bodovanja krvarenja. To potvrđuje hipotezu kako pedijatrijski bolesnici s nižim razinama 25(OH)D imaju teža krvarenja u sklopu ITP-a. Nadalje, rezultati su pokazali kako većina bolesnika s novodijagnosticiranim ITP-om ima hipovitaminozu D. Nismo pronašli korelaciju između razine 25(OH)D i broja trombocita u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.

### **5.1. Demografija i klinička slika ITP-a**

Ispitanici u ovom istraživanju slični su i usporedivi s bolesnicima u drugim pedijatrijskim studijama o ITP-u (2, 124, 125). Prosječna dob bolesnika s novootkrivenom ITP u našoj studiji bila je  $5,7 \pm 4,9$  godine, što je slično drugim studijama gdje je dob bila između 4,9 i 6,1 godina. Prosječni broj trombocita pri postavljanju dijagnoze ITP u našoj studiji ( $9,4 \pm 8,8 \times 10^9/L$ ) također je sličan rezultatima u literaturi ( $5,0-11,5 \times 10^9/L$ ), kao i omjer muškog i ženskog spola (124, 125). Temeljem tih podataka možemo zaključiti da imamo kvalitetan uzorak, usporediv s ostalim pedijatrijskim istraživanjima o ITP-u.

Teška krvarenja utvrđena su u 30% bolesnika (N=18), što je nešto viša učestalost težih krvarenja u usporedbi s rezultatima sustavnog pregleda gdje su djeca imala teška krvarenja u 20% slučajeva. Autori tog sustavnog pregleda navode kako inače postoje velike razlike u učestalosti teških krvarenja između studija. To objašnjavaju činjenicom da autori koriste različite sustave bodovanja krvarenja čime različito definiraju teška krvarenja, osim za intrakranijsko krvarenje za koje su kriteriji jedinstveni (126). U našem istraživanju nije bilo bolesnika s intrakranijskim krvarenjem koje je najteža i relativno rijetka komplikacija ITP-a, a javlja se u 0.4% djece (126).

Donedavno glavni pokazatelj težine ITP-a bio je broj trombocita. Međutim, zaključeno je da je klinička slika, koju izražavamo primarno kroz epizode krvarenja, bitnija u procjeni težine ITP-a (21, 127). Stoga, dijagnoza teškog ITP-a postavlja se onda kada bolesnici imaju klinički značajno krvarenje i zahtijevaju dodatnu terapijsku intervenciju ili promjenu trenutne terapije ITP-a (127).

U nedavnim studijama također se naglašava problem kvantifikacije, odnosno objektivne procjene težine krvarenja u ITP-u. Iako postoji više sustava procjene težine krvarenja, nijedan

nije široko prihvaćen (126, 128). U našoj studiji koristili smo dva novija sustava procjene težine krvarenja (SMOG i IBLS) koji su se dokazali kao korisni sustavi u određivanju težine krvarenja (126, 128, 129). Smatramo da je potreban standardni, ujednačeni visokokvalitetni sustav za procjenu težine krvarenja kako bi se kvalitetno i što objektivnije odredile težine kliničke slike u ITP-u. Korištenjem različitih sustava krvarenja mogu se stvoriti razlike u procjenama kliničkih stanja bolesnika, utvrditi različita učestalost teških krvarenja, a što može utjecati i na različiti pristup liječenju ITP bolesnika u različitim kliničkim centrima. Također, kada bi postojao jedinstveni sustav bodovanja krvarenja u ITP-u onda bi rezultati različitih studija bili usporedivi i ponovljivi, te iskoristiviji za metaanalize i sustavne preglede. U konačnici bi to imalo i pozitivan učinak na kliničku praksu.

## **5.2. Razina 25(OH)D i učestalost hipovitaminoze D**

U našoj studiji srednja vrijednost razine 25(OH) u ispitanika bila je  $66 \pm 24$  nmol/L, a što se smatra hipovitaminozom D (50, 52, 130). Iako nedostatak vitamina D predstavlja globalni problem, posebno u djece, postoji tek manji broj studija iz područja jugoistočne Europe o ovoj problematici. Karin i sur. pronašli su kako predškolska djeca imaju visoku učestalost hipovitaminoze D, s razinama 25(OH)D  $<50$  nmol/L u čak više od 50% djece (131). Šimunović i sur. su također pronašli niske razine 25(OH)D u djece, a posebno u pretile djece s metaboličkim sindromom (96).

Zabrinjavajuća je činjenica o visokoj prevalenciji hipovitaminoze D utvrđenoj u tri studije na djeci iz obalne Hrvatske, obzirom da je poznato da je osnovni način stvaranja VD u koži pod utjecajem UV zračenja. U literaturi može se naći da u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju postoji negativni trend izloženosti sunčevom svjetlu, kao i učestalo korištenje proizvoda za zaštitu od sunca. Prema literaturi, ovaj trend izbjegavanja izloženosti sunčevom svjetlu počeo je oko 2000. godine. Stanovnici Sjedinjenih Američkih Država (SAD) imali su niže prosječne vrijednosti razine VD-a u razdoblju od 2000. do 2004., uspoređujući ih s razdobljem između 1988. i 1994. (132). Osnovnim uzrocima te razlike smatra se pretjerano korištenje proizvoda za zaštitu od sunca, izbjegavanje sunca kao i učestalo nošenje odjeće s dugim rukavima kod izlaska na sunce. Ti trendovi mogu se naći i u zemljama koje imaju visok broj sunčanih dana kroz godinu (132-135). Stoga, moguće je da se sličan trend vjerojatno pojavljuje i u Hrvatskoj.

U naših bolesnika ITP se najčešće dijagnosticirao tijekom zime i proljeća, a najrjeđe ljeti. To je sukladno s istraživanjima drugih autora koji su pokazali višu prevalenciju hipovitaminoze D tijekom zime i proljeća (136-138). S obzirom na to da je razina VD-a u tijelu prvenstveno ovisna o količini izloženosti suncu, odnosno UVB zračenju, za očekivati je da je hipovitaminoza D najučestalija u zimskim i ranim proljetnim mjesecima kada su zalihe VD-a u tijelu potrošene. Količina VD-a proizvedena i pohranjena od svibnja do rujna nije dovoljno jamstvo optimalne razine VD-a tijekom preostalih mjeseci u godini, osobito u prisutnosti čimbenika koji ograničavaju izloženost suncu ljeti. Uzimajući u obzir povezanost hipovitaminoze D s autoimunim bolestima, možemo pretpostaviti kako su učestalost i vrijeme manifestacije ITP-a, kao i drugih autoimunih bolesti, vjerojatno indirektno povezani s mjesecima kada je izloženost suncu najmanja.

### **5.3. Povezanost između hipovitaminoze D i ITP-a**

U našoj studiji srednja vrijednost razine 25(OH)D bila je nešto viša nego u drugim studijama o ITP-u. Liu i sur. utvrdili su srednju vrijednost razine 25(OH)D od  $43 \pm 13$  nmol/L u odraslih bolesnika s ITP-om, dok su Yesil i sur. našli srednju vrijednost razine 25(OH)D od  $47 \pm 21$  nmol/L u djece s ITP-om (139, 140). Ta se razlika može objasniti različitim geografskim podrijetlom bolesnika uključenih u studiju. Naši ispitanici dolaze iz priobalne Hrvatske, regije s visokom učestalošću sunčanih dana u godini (141) i zbog toga vjerojatno imaju više srednje vrijednosti razine 25(OH)D. U istraživanju Čulić i sur., u kojem su uključeni bolesnici iz slične geografske regije, pronađene su srednje vrijednosti razine 25(OH)D u bolesnika s akutnim ITP-om ( $59 \pm 26$  nmol/L) slične našim rezultatima, dok su u bolesnika s kroničnim ITP-om pronađene vrlo niske srednje vrijednosti razine 25(OH)D ( $35 \pm 20$  nmol/L) (122).

Slično kao i u našoj studiji, u literaturi je visoka učestalost hipovitaminoze D (do 80%) nađena u djece s ITP-om (142). Autori koji su istraživali odrasle bolesnike s autoimunim citopenijama uključujući ITP, smatraju da VD utječe na imunološki sustav tako da potiče Th1 imunološki odgovor i time smanjuje vjerojatnost za razvijanje autoimunih citopenija uključujući ITP (118).

Prema našim saznanjima nema puno studija koje povezuju ITP s hipovitaminozom D. Međutim, postoji puno studija koje povezuju hipovitaminozu D s drugim autoimunim bolestima time potvrđujući imunomodulatorni utjecaj VD-a. Visoka učestalost hipovitaminoze D je pronađena u bolesnika sa šećernom bolesti tipa I (100), autoimunim bolestima štitnjače

(104, 143), multiplom sklerozom (144), sistemskim eritematoznim lupusom (145, 146), reumatskim artritismom (147-149) i Crohnovom bolesti (150). U studiji Skaabya i sur. (151) pronađena je inverzna povezanost između razine VD-a i razvoja autoimunih bolesti. Bizzaro i sur. (130) su također potvrdili kako su razine 25(OH)D i polimorfizam VDR-a povezani s raznim autoimunim bolestima. Kako je ITP autoimuna bolest sa sličnim patofiziološkim mehanizmom, možemo pretpostaviti da postoji ista ili slična povezanost VD-a i ITP-a kao i u gore navedenim slučajevima.

Neki su autori napravili i korak naprijed te su primjenjivali VD kao terapiju za autoimune bolesti kao reumatski artritis (152) i psorijatični artritis (153) s obećavajućim rezultatima. Anđelković i sur. su bolesnicima s aktivnim reumatskim artritismom, uz njihovu osnovnu terapiju, dodali alfacalcidol koji je aktivni metabolit vitamina D3. Aktivnost bolesti se smanjila u 89% njihovih bolesnika (152). U drugoj studiji, autori su bolesnicima s aktivnim psorijatičnim artritismom započeli terapiju s 1,25(OH)2D kroz razdoblje od 6 mjeseci. Dobili su poboljšanje kliničkog stanja u 75% svojih bolesnika (153).

Vezano s ITP-om, Bockow i Kaplan opisali su dva slučaja ITP-a refraktorna na standardno liječenje koje su uspješno liječili visokim dozama VD-a i hidrosiklorokina. U prvog bolesnika došlo je do porasta broja trombocita nakon započinjanja terapije s 50,000 IU VD-a tjedno uz hidrosiklorokin. Kada je terapija VD-om prekinuta, broj trombocita je pao da bi se nakon ponovnog uključivanja VD-a ponovno normalizirao. Bolesnik je cijelo vrijeme primao hidrosiklorokin. Drugi bolesnik imao je niske vrijednosti razine VD-a u vrijeme postavljanja dijagnoze ITP-a. Također mu se poboljšao broj trombocita nakon započinjanja terapije istim dozama VD-a (154).

U nekoliko studija gdje se primjenjivala terapija s VD-om, donja granica razine 25(OH)D pri kojoj se započinjala terapija bila je 50 nmol/L (100, 104) ili 75 nmol/L (154). Britansko društvo za hematologiju (engl. *British Society for Haematology*) preporučilo je nadoknadu VD-a u bolesnika s ITP-om kao prevenciju osteoporoze inducirane glukokortikoidima (155).

Na temelju naših rezultata, smatramo da treba preporučiti nadoknadu VD-a u bolesnika s novootkrivenim ITP-om koji imaju potvrđenu hipovitaminozu D. U djece mlađe od 12 mjeseci preporuka je započeti s 2000 IU VD dnevno, u djece između 12 mjeseci i 12 godina s 3000-6000 IU VD dnevno, a u djece starije od 12 godina s 6000 IU VD dnevno. Nadoknada VD-a trebala bi trajati 90 dana (156).

#### 5.4. Povezanost između razine 25(OH)D i kliničke prezentacije ITP-a

U ovoj studiji određivali smo broj trombocita u perifernoj krvi i dva sustava bodovanja težine krvarenja (IBLS i SMOG). Koristeći linearni model pri opisu korelacije i Spearmanov koeficijent korelacije pronašli smo značajnu negativnu korelaciju između razine 25(OH)D i SMOG ocjene. Pronašli smo negativnu korelaciju između razine 25(OH)D i IBLS ocjene koja je bila značajna u linearnoj korelaciji, a granično značajna koristeći Spearmanov koeficijent korelacije. Nije bilo značajne korelacije između razine 25(OH)D i broja trombocita kao trećeg pokazatelja težine kliničke slike ITP-a. Neki autori smatraju kako broj trombocita uopće nije kvalitetan pokazatelj težine kliničke slike ITP-a (127), što bi moglo djelomično objasniti naš rezultat.

Kako bi dalje istražili povezanost između SMOG ocjene i 25(OH)D, usporedili smo svaki dio SMOG ocjene s razinom 25(OH)D, i pronašli da bolesnici s nižim razinama 25(OH)D imaju teža krvarenja u koži i organima. Po našem mišljenju, opis krvarenja u SMOG sustavu vrlo je detaljan i s njim se može dobiti točnija i objektivnija konačna ocjena težine krvarenja. Međutim, on oduzima previše vremena, a što bi mogao biti problem u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Činjenicu da smo dobili statistički manje značajan rezultat povezanosti između 25(OH)D i IBLS sustava, nego 25(OH)D i SMOG sustava možemo objasniti razlikom u kvaliteti dva sustava bodovanja, gdje je SMOG sustav precizniji.

Koliko nam je poznato, ne postoje studije koje povezuju razinu 25(OH)D i kliničku prezentaciju ITP-a na način kao u našoj studiji. Fattizzo i sur. su u odraslih pronašli korelaciju između razine VD-a i težine bolesti kod prvog nastupa autoimunih citopenija uključujući i ITP (118), ali nisu koristili sustave bodovanja krvarenja kako bi procijenili težinu kliničke slike ITP-a. Neki su ranije spomenuti autori pronašli povezanost između razine 25(OH)D i aktivnosti ili težine nekih drugih autoimunih bolesti (145, 148, 150). Temeljem tih rezultata i povezanosti VD-a s incidencijom i aktivnošću autoimunih bolesti, VD je predložen kao moguća terapija istih (145, 146, 157). Antico i sur. smatraju da bi VD u visokim dozama mogao utjecati na razvoj i simptomatologiju autoimunih bolesti (99). Prema tome, neki od autora predlažu VD kao novu terapijsku opciju za liječenje ITP-a (118, 122, 140). Međutim, većina autora smatra kako je potrebno još studija, posebno randomiziranih kontroliranih kliničkih pokusa, kako bi se preciznije istražio utjecaj VD-a na autoimune bolesti.



### **5.5. Povezanost dobi bolesnika s razinom 25(OH)D i težinom kliničke slike ITP-a**

U našem istraživanju pronašli smo pozitivnu korelaciju između dobi bolesnika i SMOG ocjene. Nađena je negativna korelacija između dobi bolesnika i razine 25(OH)D.

Dva pedijatrijska istraživanja u Iranu pokazala su da su razine 25(OH)D negativno povezane s dobi (158, 159), a što je sukladno našim rezultatima. Također, istraživanje u Turskoj pokazalo je veću učestalost manjka 25(OH)D u starije djece (138). Više razine 25(OH)D u mlađe djece možemo objasniti činjenicom kako dojenčad i mlađa djeca često dobivaju profilaktičke doze VD-a. Možemo pretpostaviti i da mlađa djeca imaju veću fizičku aktivnost i više vremena provode vani te imaju zdraviju prehranu pod roditeljskim nadzorom.

U istraživanju Tarantina i sur. uočeno je da su troškovi liječenja ITP-a u bolnicama u SAD-u veći u starije djece koja imaju veću učestalost teških krvarenja (160). S obzirom na to da su i naši bolesnici starije dobi imali više vrijednosti SMOG ocjene, odnosno teža krvarenja, rezultati su nam sukladni s Tarantinovim istraživanjem.

### **5.6. Povezanost između razine 25(OH)D i z vrijednosti indeksa tjelesne mase**

Sporedni cilj je bio prikazati povezanost razine 25(OH)D sa z vrijednosti ITM-a. Linearnom korelacijom i neparametrijskom korelacijom nismo dobili statistički značajnu povezanost između njih.

Mehanizam utjecaja VD na pretilost nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da pohranjeni vitamin D u masnom tkivu vjerojatno regulira upalni odgovor i ekspresiju gena koji reguliraju adipogenezu i adipocitnu apoptozu. Također, VD utječe na lučenje leptina i adiponektina te regulaciju metabolizma (92, 93). Povećanje broja masnih stanica negativno utječe na pohranjivanje vitamina D u masnom tkivu, što smanjuje biodostupnost vitamina D i stvara "začarani krug" uzajamnog djelovanja vitamina D i pretilosti (161, 162).

U literaturi, više autora u SAD-u i Europi pronašlo je kako pretili bolesnici imaju veću učestalost hipovitaminoze D (162-164). Šimunović i sur. su također pronašli visoku učestalost hipovitaminoze D u pretilo djece, a radili su istraživanje na uzorku bolesnika iz istog geografskog područja kao i ovom istraživanju (96). U našoj studiji nismo dobili rezultate koji su u skladu s rezultatima navedenih studija, a što je vjerojatno posljedica različitosti uzorka ispitivane skupine.

## 5.7. Ograničenja i nedostaci studije

U ovoj studiji uključili smo bolesnike iz obalnog područja Hrvatske te stoga postoji mogućnost pristranosti u odabiru ispitanika vezano za zemljopisno podrijetlo bolesnika. Moguće je da bolesnici koji žive u južnoj Hrvatskoj imaju veću izloženost suncu nego u drugim geografskim regijama i time imaju veću srednju razinu 25(OH)D nego bolesnici u drugim studijama (141). Da bi provjerili postoji li razlika između uzorka iz dva centra koji su uključeni u studiju (KBC Rijeka i KBC Split) učinjena je usporedba sljedećih varijabli po centrima: koncentracija vitamina D u krvi, SMOG ocjena, IBLS ocjena, broj trombocita u krvi, Z zbroj te dob. Za ni jednu varijablu se ne može sa sigurnošću od 95% tvrditi da postoji razlika između centara (Tablica S2 u Dodatku). Nadalje za glavnu hipotezu (povezanost SMOG ocjene i razina vitamina D u krvi) su uspoređena dva modela, jedan koji za nezavisnu varijablu ima samo razinu vitamina D u krvi, te drugi koji uz razinu vitamina D ima i kodirajuću varijablu za centar. Prvi model je 2.3 puta vjerojatniji od drugog (razlika u AIC-u=1.676) s obzirom na prikupljene podatke. Stoga u konačnici ne možemo sa sigurnošću tvrditi da ima razlika između ispitanika u oba centra (Tablica S3 u Dodatku).

Drugo ograničenje studije mogla bi biti pristranost u prikupljanju podataka. SMOG i IBLS ocjene krvarenja izračunavaju se temeljem smjernica koje uključuju kliničke znakove krvarenja. Pedijatrijski hematolozi bilježe te znakove tijekom kliničkog pregleda bolesnika. Kako bolesnike pregledavaju različiti hematolozi, postoji šansa pristranosti u prikupljanju podataka radi subjektivne interpretacije kliničkih znakova krvarenja. Standardizacijom kliničkog pregleda i korištenjem dostupnih uputa izračunavanja ocjena krvarenja nastojala se izbjeći ova vrsta pristranosti. Primjer tablice koja se koristila u dodjeljivanju SMOG ocjene prikazan je u Dodatku (Tablica S1).

Treće ograničenje studije je širok raspon kronološke dobi i vremena dijagnoze ITP-a, a što može biti temelj za buduća multicentrična istraživanja.

Kako bi se otklonili mogućnost slučajnog nalaza zbog male veličine uzorka učinili smo izračun *post hoc* snage studije. U konačnici se u studiju uključilo 60 bolesnika, te je naknadno urađenim izračunom *post hoc* snage studije za glavnu hipotezu (povezanost 25(OH)D i SMOG ocjene) dobijeno da je snaga studije u konačnici iznosila 98% uz veličinu pogreške tipa jedan od 5%.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Hipovitaminoza D postoji u većine bolesnika s novootkrivenim ITP-om.
2. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između razine 25(OH)D i vrijednosti SMOG ocjena u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
3. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između razine 25(OH)D i vrijednosti IBLS ocjena u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
4. Nije pronađena statistički značajna korelacija između razine 25(OH)D i broja trombocita u perifernoj krvi u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
5. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između razine 25(OH)D i dobi bolesnika u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
6. Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između vrijednosti SMOG ocjene i dobi bolesnika u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
7. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između razine 25(OH)D i spola bolesnika u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
8. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između vrijednosti SMOG ocjene i spola bolesnika u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
9. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između razine 25(OH)D i z vrijednosti ITM-a u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a.
10. Novootkriveni ITP se najčešće dijagnosticira zimi, a najrjeđe ljeti.
11. Bolesnici s novootkrivenim ITP-om su najčešće liječeni „*watch and wait*“ pristupom i IVIG-om.

Hipovitaminoza D je učestala u djece s autoimunim bolestima uključujući ITP. Danas je poznato da VD ima imunomodulatornu funkciju te da nedostatak istog može biti jedan od čimbenika koji utječe na učestalost kao i težinu autoimunih bolesti. Hipovitaminoza D utječe na težinu kliničke slike ITP-a i može se smatrati čimbenikom rizika za težu kliničku sliku ITP-a. Stoga bi pedijatrijski hematolozi trebali razmotriti opciju određivanja razine VD-a unutar standardnog protokola dijagnostičke obrade bolesnika koji boluju od ITP-a. U slučaju potvrde hipovitaminoze D, nadomjesnu terapiju VD-om trebalo bi početi što ranije, čime bi se moglo utjecati na daljnji tijek liječenja ITP-a. Dodatno, rezultati ovog istraživanja upućuju da se sustavi bodovanja krvarenja u imunoj trombocitopeniji trebaju koristiti kako bi se što bolje kvantificirala i objektivno procijenila težina kliničke slike ITP-a koja je, za razliku od broja trombocita, bitnija u prognozi bolesti.

Zaključno, potrebna su dodatna istraživanja, posebno randomizirani kontrolirani klinički pokusi, kako bi se u potpunosti razjasnila povezanost hipovitaminoze D s učestalosti i težinom ITP-a, kao i s ostalim autoimunim bolestima.

## **7. SAŽETAK**

Imuna trombocitopenija (ITP) stečena je autoimuna bolest karakterizirana izoliranom trombocitopenijom koju definiramo brojem trombocita u perifernoj krvi  $<100 \times 10^9/L$ . ITP se očituje naglim razvojem krvarenja u prethodno zdravog djeteta. Promjene po koži u vidu petehija, hematoma i ekhimoza nalaze se u 60% djece, dok se krvarenja u sluznicama i organima pojavljuju u 40% djece.

Vitamin D (VD) je prohormon koji se proizvodi iz 7-dehidrokolesterola pod utjecajem ultraljubičastog zračenja. Aktivni oblik VD-a regulira apsorpciju kalcija i fosfata iz crijeva, mobilizaciju kalcija iz kostiju te reapsorpciju kalcija u bubrežima. U zadnjih nekoliko godina posebno se istražuje uloga VD-a u imunom i upalnom odgovoru. VD je regulator hematopoetskog sustava, modulira aktivaciju i proliferaciju limfocita, potiče diferencijaciju monocita te inhibira lučenje nekoliko citokina u T stanicama. Nadoknada VD-a potiče Th1 posredovani autoimuni odgovor, a nedostatak VD-a usmjerava imuni odgovor prema gubitku tolerancije. Pronađena je povezanost između hipovitaminoze D i veće pojavnosti autoimunih bolesti, među kojima su i autoimune citopenije.

Cilj istraživanja bio je pronaći poveznicu između razine 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) i težine kliničke slike novootkrivenog ITP-a koristeći IBLS i SMOG sustave bodovanja krvarenja. Također, analizirali smo i odnos između razine 25(OH)D i broja trombocita u vrijeme dijagnoze ITP-a. Analiziran je i odnos dobi i spola bolesnika s razinom 25(OH)D i vrijednosti SMOG ocjene. Utjecaj tjelesne mase na razinu VD-a smo analizirali korelacijom između z vrijednosti indeksa tjelesne mase (ITM) i razine 25(OH)D.

Ispitanici su 60 pedijatrijskih bolesnika iz obalne Hrvatske s novodijagnosticiranim ITP-om. Težinu kliničke slike procijenili smo korištenjem IBLS i SMOG sustava bodovanja krvarenja.

Pronašli smo statistički značajnu negativnu korelaciju između razine 25(OH)D i SMOG ocjene ( $p=0,002$ ) kao i 25(OH)D i IBLS ocjene ( $p=0,048$ ). Djeca s nižim razinama 25(OH)D su imala više vrijednosti SMOG i IBLS sustava bodovanja krvarenja, odnosno teža krvarenja u vrijeme dijagnoze novootkrivenog ITP-a. Uspoređujući razinu 25(OH)D s djelovima SMOG ocjene, nađeno je da bolesnici s nižim razinama 25(OH)D imaju teža krvarenja u koži ( $p<0,0001$ ) i organima ( $p=0,01$ ). Nismo pronašli povezanost između razine 25(OH)D i broja trombocita. Utvrdili smo statistički značajnu negativnu korelaciju između razine 25(OH)D i dobi bolesnika ( $p=0,001$ ), kao i statistički značajnu pozitivnu korelaciju između vrijednosti

SMOG ocjene i dobi bolesnika ( $p=0,02$ ). Nije pronađena povezanost između razine 25(OH)D i z vrijednosti ITM-a.

Ova studija je pokazala da hipovitaminoza D utječe na težinu kliničke slike novootkrivenog ITP-a u djece. Stoga bi terapija s pripravkom VD-a mogla biti jedna od novih terapijskih opcija za liječenje ITP-a, a za što su potrebna daljnja istraživanja.



## **8. SUMMARY**

Immune thrombocytopenia (ITP) is an acquired autoimmune disorder characterized by isolated thrombocytopenia defined as platelet count in peripheral blood  $<100 \times 10^9/L$ . ITP manifests with sudden purpura and hematoma in previously healthy children. Skin changes such as petechiae and purpura can be found in 60% of children, whereas mucous membrane and organ bleeding can be found in 40% of children.

Vitamin D (VD) is a pro-hormone produced from 7-dehydrocholesterol when being exposed to radiation of ultraviolet light. The active form of VD affects the absorbance of calcium and phosphate in the intestine, calcium mobilization in bones and reabsorbance of calcium in the kidneys. In recent years the importance of VD has been examined in immune and inflammatory response. VD is also the regulator of the hematopoietic system, it modulates activation and proliferation of lymphocytes, induces differentiation of monocytes and inhibits secretion of several cytokines in T-cells. It has been demonstrated that supplementation with VD is beneficial for Th1- mediated autoimmune response, and that VD insufficiency turns immune response towards loss of tolerance. Scientists have found connection between hypovitaminosis D and higher incidence of autoimmune diseases, including autoimmune cytopenias.

Aim of this study was to find correlation between values of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and severity of clinical presentation of newly diagnosed ITP using IBLS and SMOG bleeding scores. We also analyzed correlation between 25(OH)D values and platelet count. As our secondary outcome we assessed the correlation between the patient gender and age with SMOG score value, and also correlation of the same variables with 25(OH)D values. Influence of body mass on the VD values and clinical severity of ITP we analyzed with a correlation between body mass index (BMI) z score and 25(OH)D values.

Medical records of 60 pediatric patients with newly diagnosed immune thrombocytopenia in the coastal region of Croatia were evaluated. The severity of bleeding was assessed using two bleeding scores, ITP Bleeding Scale (IBLS) and Skin-Mucosa-Organ-Gradation (SMOG).

We found statistically significant negative correlation between 25(OH)D values and SMOG score ( $p=0,002$ ), and between 25(OH)D values and IBLS score ( $p=0,048$ ). Children with lower 25(OH)D values had higher values of the SMOG and IBLS scores and respectively more severe bleeding at the diagnosis of ITP. With further analysis of main domains of SMOG score, we found that patients with lower 25(OH)D value had more severe bleeding in the skin ( $p<0,0001$ ) and organs ( $p=0,01$ ). We did not find any statistically significant correlation

between 25(OH)D value and platelet count. However, there was statistically significant negative correlation between 25(OH)D value and patients age ( $p=0,001$ ), as well as statistically significant positive correlation between SMOG score and patients age ( $p=0,02$ ). We did not find statistically significant correlation between 25(OH)D value and BMI z score.

In conclusion, our findings suggest that hypovitaminosis D influences the severity of the clinical presentation of ITP in children at the initial diagnosis of the disease. Therefore, therapy with VD could be a new potential option for treatment of ITP but for that further studies are needed.

## **9. POPIS LITERATURE**

1. Bussel J. Immune thrombocytopenia (ITP) in children. U: Mahoney DH editor. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 2020 Nov 20]:. Dostupno na: <http://www.uptodate.com/>.
2. Kühne T, Buchanan GR, Zimmerman S, Michaels LA, Kohan R, Berchtold W, i sur. A prospective comparative study of 2540 infants and children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) from the Intercontinental Childhood ITP Study Group. *J Pediatr*. 2003 Nov;143(5):605-8.
3. Kühne T, Berchtold W, Michaels LA, Wu R, Donato H, Espina B, i sur. Newly diagnosed immune thrombocytopenia in children and adults: a comparative prospective observational registry of the Intercontinental Cooperative Immune Thrombocytopenia Study Group. *Haematologica*. 2011 Dec;96(12):1831-7.
4. Neunert CE, Buchanan GR, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Bennett CM, Neufeld EJ, i sur. Severe hemorrhage in children with newly diagnosed immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008 Nov;112(10):4003-8.
5. Zeller B, Rajantie J, Hedlund-Treutiger I, Tedgård U, Wesenberg F, Jonsson OG, i sur. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease. *Acta Paediatr*. 2005 Feb;94(2):178-84.
6. Neunert C, Arnold DM. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review: reply. *J Thromb Haemost*. 2015 Aug;13(8):1522-3.
7. Rosthøj S, Hedlund-Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Jonsson OG, Elinder G, i sur. Duration and morbidity of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in children: A prospective Nordic study of an unselected cohort. *J Pediatr*. 2003 Sep;143(3):302-7.
8. Labarque V, Van Geet C. Clinical practice: immune thrombocytopenia in paediatrics. *Eur J Pediatr*. 2014 Feb;173(2):163-72.
9. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, i sur. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009 Mar;113(11):2386-93.

10. Donato H, Picón A, Martínez M, Rapetti MC, Rosso A, Gomez S, i sur. Demographic data, natural history, and prognostic factors of idiopathic thrombocytopenic purpura in children: a multicentered study from Argentina. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Apr;52(4):491-6.
11. Imbach P, Kühne T, Müller D, Berchtold W, Zimmerman S, Elalfy M, i sur. Childhood ITP: 12 months follow-up data from the prospective registry I of the Intercontinental Childhood ITP Study Group (ICIS). *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Mar;46(3):351-6.
12. McKenzie CG, Guo L, Freedman J, Semple JW. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP). *Br J Haematol*. 2013 Oct;163(1):10-23.
13. Elalfy M, Nugent D. Viruses, anti-viral therapy, and viral vaccines in children with immune thrombocytopenia. *Seminars in hematology*. 2016 Apr;53 Suppl 1.
14. Mantadakis E, Farmaki E, Buchanan GR. Thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella vaccination: a systematic review of the literature and guidance for management. *J Pediatr*. 2010 Apr;156(4):623-8.
15. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The Incidence of Immune Thrombocytopenic Purpura in Children and Adults: A Critical Review of Published Reports. *American journal of hematology*. 2010 Mar;85(3).
16. D'Orazio J, Neely J, Farhoudi N. ITP in children: pathophysiology and current treatment approaches. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013 Jan;35(1).
17. Shaw J, Kilpatrick K, Eisen M, Tarantino M. The incidence and clinical burden of immune thrombocytopenia in pediatric patients in the United States. *Platelets*. 2019 Jul 4:1-8.
18. Blanchette V, Bolton-Maggs P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010 Feb;24(1):249-73.
19. Roganović J. Idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Acta Medica Academica*. 2009;38(1):21-34.
20. Psaila B, Petrovic A, Page LK, Menell J, Schonholz M, Bussel JB. Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases. *Blood*. 2009 Nov;114(23):4777-83.
21. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol*. 2003 Feb;120(4):574-96.

22. Bolton-Maggs PH, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet*. 1997 Aug;350(9078):620-3.
23. Buchanan GR, Adix L. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr*. 2002 Nov;141(5):683-8.
24. Page LK, Psaila B, Provan D, Michael Hamilton J, Jenkins JM, Elish AS, i sur. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. *Br J Haematol*. 2007 Jul;138(2):245-8.
25. Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, Ruggeri M, Blanchette V, Bussel JB, i sur. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*. 2013 Apr;121(14):2596-606.
26. Edslev PW, Rosthøj S, Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Jonsson OG. A Clinical Score Predicting a Brief and Uneventful Course of Newly Diagnosed Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Children. *British journal of haematology*. 2007 Aug;138(4).
27. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA, i sur. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011 Apr;117(16):4190-207.
28. Tarantino MD, Young G, Bertolone SJ, Kalinyak KA, Shafer FE, Kulkarni R, i sur. Single dose of anti-D immune globulin at 75 microg/kg is as effective as intravenous immune globulin at rapidly raising the platelet count in newly diagnosed immune thrombocytopenic purpura in children. *J Pediatr*. 2006 Apr;148(4):489-94.
29. Blanchette VS, Luke B, Andrew M, Sommerville-Nielsen S, Barnard D, de Veber B, i sur. A prospective, randomized trial of high-dose intravenous immune globulin G therapy, oral prednisone therapy, and no therapy in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr*. 1993 Dec;123(6):989-95.
30. Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Henter JI, Elinder G, Rosthøj S, i sur. Does treatment of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura reduce morbidity? *Arch Dis Child*. 2007 Aug;92(8):704-7.
31. Blanchette V, Imbach P, Andrew M, Adams M, McMillan J, Wang E, i sur. Randomised trial of intravenous immunoglobulin G, intravenous anti-D, and oral prednisone in childhood acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1994 Sep;344(8924):703-7.

32. Heitink-Pollé KM, Nijsten J, Boonacker CW, de Haas M, Bruin MC. Clinical and laboratory predictors of chronic immune thrombocytopenia in children: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2014 Nov;124(22):3295-307.
33. Yacobovich J, Revel-Vilk S, Tamary H. Childhood Immune Thrombocytopenia--Who Will Spontaneously Recover? *Seminars in hematology*. 2013 Jan;50 Suppl 1.
34. Vesely S, Buchanan GR, Cohen A, Raskob G, George J. Self-reported diagnostic and management strategies in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: results of a survey of practicing pediatric hematology/oncology specialists. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Jan-Feb;22(1):55-61.
35. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010 Jan;115(2):168-86.
36. Grainger JD, Locatelli F, Chotsampancharoen T, Donyush E, Pongtanakul B, Komvilaisak P, et al. Eltrombopag for children with chronic immune thrombocytopenia (PETIT2): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015 Oct;386(10004):1649-58.
37. Beck CE, Nathan PC, Parkin PC, Blanchette VS, Macarthur C. Corticosteroids Versus Intravenous Immune Globulin for the Treatment of Acute Immune Thrombocytopenic Purpura in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The Journal of pediatrics*. 2005 Oct;147(4).
38. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.
39. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A Global Perspective for Health. *Dermato-endocrinology*. 2013 Jan;5(1).
40. Yee YK, Chintalacharuvu SR, Lu J, Nagpal S. Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer. *Mini Rev Med Chem*. 2005 Aug;5(8):761-78.
41. Antonucci R, Locci C, Clemente M, Chicconi E, Antonucci L. Vitamin D Deficiency in Childhood: Old Lessons and Current Challenges. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*. 2018 Mar;31(3).
42. Marquina C, Mousa A, Scragg R, de Courten B. Vitamin D and cardiometabolic disorders: a review of current evidence, genetic determinants and pathomechanisms. *Obesity*



reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity. 2019 Feb;20(2).

43. Brommage R, DeLuca HF. Evidence That 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Is the Physiologically Active Metabolite of Vitamin D<sub>3</sub>. *Endocrine reviews*. 1985 Fall;6(4).

44. Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: A Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013 Oct;45(2).

45. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, i sur. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-hydroxylase in Human Health and Disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007 Mar;103(3-5).

46. Glendenning P. Measuring vitamin D. *Australian prescriber*. 2015 Feb;38(1).

47. Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Féron F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Dec;34 Suppl 1:S265-77.

48. Hossein-nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of Vitamin D Status and Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation on Genome Wide Expression of White Blood Cells: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *PloS one*. 2013;8(3).

49. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular Nature of the Vitamin D Receptor and Its Role in Regulation of Gene Expression. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2001 Apr;2(2).

50. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009 Feb;19(2):73-8.

51. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jul;84(1):18-28.

52. Saggese G, Vierucci F, Prodam F, Cardinale F, Cetin I, Chiappini E, i sur. Vitamin D in pediatric age: consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. *Ital J Pediatr*. 2018 May 8;44(1):51.

53. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan;94(1):26-34.
54. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the Human Parathyroid Hormone Gene That Bind the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Receptor and Mediate Transcriptional Repression in Response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992 Jan;89(17).
55. Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Pancreatic Beta-Cell Function: Vitamin D Receptors, Gene Expression, and Insulin Secretion. *Endocrinology.* 1994 Apr;134(4).
56. Kjalarsdottir L, Tersey SA, Vishwanath M, Chuang JC, Posner BA, Mirmira RG, *i sur.* 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Enhances Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Mouse and Human Islets: A Role for Transcriptional Regulation of Voltage-Gated Calcium Channels by the Vitamin D Receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2019 Jan;185.
57. Zakharova I, Klimov L, Kuryaninova V, Nikitina I, Malyavskaya S, Dolbnya S, *i sur.* Vitamin D Insufficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents. *Frontiers in endocrinology.* 2019 Jan;10.
58. Maestro B, Dávila N, Carranza M, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2003 Feb;84(2-3).
59. Zeitz U, Weber K, Soegiarto D, Wolf E, Balling R, Erben R. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2003 Mar;17(3).
60. Wright D, Hucker K, Holloszy J, Han D. Ca<sup>2+</sup> and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes.* 2004 Feb;53(2).
61. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, *i sur.* 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Upregulates FGF23 Gene Expression in Bone: The Final Link in a Renal-Gastrointestinal-Skeletal Axis That Controls Phosphate Transport. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2005 Dec;289(6).

62. Jørgensen SP, Bartels LE, Agnholt J, Glerup H, Nielsen SL, Hvas CL, i sur. Vitamin D insufficiency--possible etiologic factor of autoimmune diseases. *Ugeskr Laeger*. 2007 Oct;169(43):3655-60.
63. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jul;289(1):F8-28.
64. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1717S-20S.
65. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition*. 2011 Apr;27(4):399-404.
66. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol*. 1998 Oct;28(10):3017-30.
67. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2579-85.
68. Schwalfenberg GK. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Jan;55(1):96-108.
69. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med*. 2011 Aug;59(6):881-6.
70. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2002 Jun;2(7):1017-28.
71. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2010 May;88(5):441-50.
72. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Dec;229(11):1136-42.
73. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation. *Journal of immunology*. 2007 Jan;179(3).
74. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*. 2007 Sep;66(9):1137-42.

75. Zold E, Barta Z, Bodolay E. Vitamin D deficiency and connective tissue disease. *Vitam Horm.* 2011;86:261-86.
76. Liu PT, Stengen S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, i sur. Toll-like Receptor Triggering of a Vitamin D-mediated Human Antimicrobial Response. *Science.* 2006 Mar;311(5768).
77. Bikle DD, Pillai S. Vitamin D, Calcium, and Epidermal Differentiation. *Endocrine reviews.* 1993 Feb;14(1).
78. Cianferotti L, Cox M, Skorija K, Demay MB. Vitamin D Receptor Is Essential for Normal Keratinocyte Stem Cell Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007 May;104(22).
79. Ingraham BA, Bragdon B, Nohe A. Molecular Basis of the Potential of Vitamin D to Prevent Cancer. *Current medical research and opinion.* 2008 Jan;24(1).
80. Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, i sur. Vitamin D(3) Promotes the Differentiation of Colon Carcinoma Cells by the Induction of E-cadherin and the Inhibition of Beta-Catenin Signaling. *The Journal of cell biology.* 2001 Jul;154(2).
81. Köstner K, Denzer N, Müller C, Klein R, Tilgen W. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer research.* 2009 Sep;29(9).
82. Díaz L, Díaz-Muñoz M, García-Gaytán A, Méndez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients.* 2015 Jun;7(6).
83. Ogbah Z, Visa L, Badenas C, Ríos J, Puig-Butille J, Bonifaci N, i sur. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and vitamin D receptor variants in melanoma patients from the Mediterranean area of Barcelona. *BMC medical genetics.* 2013 Feb;14.
84. Seyedalipour F, Mansouri A, Vaezi M, Gholami K, Heidari K, Hadjibabaie M. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients and Its Adverse Outcome. *International journal of hematology-oncology and stem cell research.* 2017 July;11(3).
85. Zhu M, Tan Z, Luo Z, Hu H, Wu T, Fang S, i sur. Association of the vitamin D metabolism gene GC and CYP27B1 polymorphisms with cancer susceptibility: a meta-analysis and trial sequential analysis. *Bioscience reports.* 2019 Sep;39(9).

86. Karthikayan A, Sureshkumar S, Kadambari D, Vijayakumar C. Low serum 25-hydroxy vitamin D levels are associated with aggressive breast cancer variants and poor prognostic factors in patients with breast carcinoma. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2018 Aug;62(4).
87. Shiota M, Fujimoto N, Kashiwagi E, Eto M. The Role of Nuclear Receptors in Prostate Cancer. *Cells*. 2019 Jun;8(6).
88. Bhattacharya S, Verma N, Kumar A. Prevalence of vitamin D deficiency in childhood acute lymphoblastic leukemia and its association with adverse outcomes during induction phase of treatment. *Nutrition and cancer*. 2020;72(8).
89. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical Vitamin D Action. *Nutrients*. 2010 Apr; 2(4): 408–25.
90. Censani M, Hammad HT, Christos PJ, Schumaker T. Vitamin D Deficiency Associated With Markers of Cardiovascular Disease in Children With Obesity. *Global pediatric health*. 2018 Jan;5.
91. Miraglia del Giudice E, Grandone A, Cirillo G, Capristo C, Marzuillo P, Di Sessa A, i sur. Bioavailable Vitamin D in Obese Children: The Role of Insulin Resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015 Oct;100(10).
92. Frelut M, Girardet J, Bocquet A, Briend A, Chouraqui J, Darmaun D, i sur. Impact of obesity on biomarkers of iron and vitamin D status in children and adolescents: The risk of misinterpretation. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2018 Jan;25(1).
93. Vidailhet M, Mallet E, Bocquet A, Bresson J, Briend A, Chouraqui J, i sur. Vitamin D: still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2012 Mar;19(3).
94. Ford E, Ajani U, McGuire L, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes care*. 2005 May;28(5).
95. Challa A, Makariou S, Siomou E. The relation of vitamin D status with metabolic syndrome in childhood and adolescence: an update. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*. 2015 Nov;28(11-12).

96. Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, Paradzik M, Bozic J, i sur. The relationship of vitamin D status, adherence to the Mediterranean diet and physical activity in obese children and adolescents. *J Med Food*. 2020 Aug.
97. Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):500S-6S.
98. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, i sur. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. *Autoimmun Rev*. 2013 Aug;12(10):976-89.
99. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):127-36.
100. Hafez M, Hassan M, Musa N, Abdel Atty S, Azim SA. Vitamin D status in Egyptian children with type 1 diabetes and the role of vitamin D replacement in glycemic control. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017 Apr 1;30(4):389-94.
101. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D Supplementation in Early Childhood and Risk of Type 1 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Archives of disease in childhood*. 2008 Jun;93(6).
102. Panjiyar RP, Dayal D, Attri SV, Sachdeva N, Sharma R, Bhalla AK. Sustained Serum 25-hydroxyvitamin D Concentrations for One Year With Cholecalciferol Supplementation Improves Glycaemic Control and Slows the Decline of Residual  $\beta$  Cell Function in Children With Type 1 Diabetes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2018;2018(3):111-7.
103. Kim D. The Role of Vitamin D in Thyroid Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2017 Sep;18(9).
104. Simsek Y, Cakır I, Yetmis M, Dizdar OS, Baspinar O, Gokay F. Effects of Vitamin D treatment on thyroid autoimmunity. *J Res Med Sci*. 2016 Oct;21:85.
105. Elkama A, Karahalil B. Role of Gene Polymorphisms in Vitamin D Metabolism and in Multiple Sclerosis. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2018 Mar;69(1).
106. Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RQ. Lower Serum Vitamin D Levels Are Associated With a Higher Relapse Risk in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2012 Jul;79(3).

107. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, i sur. Vitamin D Intake and Incidence of Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2004 Jan;62(1).
108. Cantorna MT. Vitamin D and Its Role in Immunology: Multiple Sclerosis, and Inflammatory Bowel Disease. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006 Sep;92(1).
109. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: Current State of the Art. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016 Jan;13(1).
110. Jørgensen SP, Agnholt J, Glerup H, Lyhne S, Villadsen GE, Hvas CL, i sur. Clinical Trial: Vitamin D3 Treatment in Crohn's Disease - A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2010 Aug;32(3).
111. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, i sur. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms With Childhood and Adult Asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Nov;170(10).
112. Zhang LL, Gong J, Liu CT. Vitamin D With Asthma and COPD: Not a False Hope? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genet Mol Res*. 2014 Feb;13(3):7607-16.
113. Litonjua A. Vitamin D and childhood asthma: causation and contribution to disease activity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2019 Apr;19(2).
114. Yadav M, Mittal K. Effect of vitamin D supplementation on moderate to severe bronchial asthma. *Indian journal of pediatrics*. 2014 Jul;81(7).
115. Wang M, Liu M, Wang C, Xiao Y, An T, Zou M, i sur. Association between vitamin D status and asthma control: A meta-analysis of randomized trials. *Respiratory medicine*. 2019 Apr; 150:85-94.
116. Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, März W, Michaëlsson K, i sur. Circulating 25-hydroxy-vitamin D and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2012 Nov;5(6).
117. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, Ethnicity, and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American journal of hypertension*. 2007 Jul;20(7).
118. Fattizzo B, Zaninoni A, Giannotta JA, Binda F, Cortelezzi A, Barcellini W. Reduced 25-OH vitamin D in patients with autoimmune cytopenias, clinical correlations and literature review. *Autoimmun Rev*. 2016 Jul;15(7):770-5.

119. WHO. AnthroPlus for Personal Computers Manual: Software for Assessing Growth of the World's Children and Adolescents. Geneva; 2009.
120. de Onis M, Onyango A, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization*. 2007 Sep;85(9).
121. Weiss R, Dziura J, Burgert T, Tamborlane W, Taksali S, Yeckel C, i sur. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *The New England journal of medicine*. 2004 Jun;350(23).
122. Čulić S, Markić J, Petrović D, Konjevoda P, Pavelić J. Serum vitamin D levels in children with newly diagnosed and chronic immune thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 2016 Apr;53 Suppl 1:S67-9.
123. Quinn G, Keough M. *Experimental Design and Data Analysis for Biologist* New York: Cambridge University Press; 2002 [Internet]. Dostupno na: <http://www.lacbiosafety.org/wp-content/uploads/2011/09/experimental-design-and-data-analysis-for-biologists1.pdf>.
124. Alam MM. Idiopathic thrombocytopenic purpura in children: a 10 years experience at tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*. 2014 Dec;64(12):1358-62.
125. Paling A, Stefan DC. Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: a 10-year audit. *Hematology*. 2008 Jun;13(3):175-80.
126. Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan GR, Goy J, Nazi I, i sur. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 2015 Mar;13(3):457-64.
127. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, i sur. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2386-93.
128. Arnold DM. Platelet count or bleeding as the outcome in ITP trials? *Am. J. Hematol*. 2012 Jun. 87:945–6.
129. Kumar M, Dutta S, Bhatyacharyya M. Application of ITP-BAT bleeding score in clinical practice. *Int J Hematol*. 2015 Feb;101(2):207-8.



130. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Isr Med Assoc J.* 2017 Jul;19(7):438-43.
131. Karin Z, Gilic B, Supe-Domic D, Sarac Z, Ercegovic K, Zenic N, i sur. Vitamin D Status and Analysis of Specific Correlates in Preschool Children: A Cross-Sectional Study in Southern Croatia. *International journal of environmental research and public health.* 2018 Nov;15(11).
132. Looker AC, Pfeiffer CM, Lacher DA, Schleicher RL, Picciano MF, Yetley EA. Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988-1994 compared with 2000-2004. *Am J Clin Nutr.* 2008 Dec;88(6):1519-27.
133. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *J Pharmacol Pharmacother.* 2012 Apr;3(2):118-26.
134. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr;87(4):1080S-6S.
135. Linos E, Keiser E, Kanzler M, Sainani KL, Lee W, Vittinghoff E, i sur. Sun protective behaviors and vitamin D levels in the US population: NHANES 2003-2006. *Cancer Causes Control.* 2012 Jan;23(1):133-40.
136. Mazzoleni S, Magni G, Toderini D. Effect of vitamin D3 seasonal supplementation with 1500 IU/day in north Italian children (DINOS study). *Italian journal of pediatrics.* 2019 Jan;45(1).
137. Fernández Bustillo J, Fernández Pombo A, Gómez Bahamonde R, Sanmartín López E, Gualillo O. Vitamin D levels in a pediatric population of a primary care centre: a public health problem? *BMC research notes.* 2018 Nov;11(1).
138. Sahin O, Serdar M, Serteser M, Unsal I, Ozpinar A. Vitamin D levels and parathyroid hormone variations of children living in a subtropical climate: a data mining study. *Italian journal of pediatrics.* 2018 Mar;44(1).
139. Yesil S, Tanyildiz HG, Tekgunduz SA, Toprak S, Fettah A, Dikmen AU, i sur. Vitamin D receptor polymorphisms in immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Int.* 2017 Jun;59(6):682-5.

140. Liu W, Li H, Hao Y, Li Y, Lv M, Xue F, i sur. Decreased immunosuppressive actions of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 in patients with immune thrombocytopenia. *Mol Immunol*. 2016 Oct;78:89-97.
141. Smec L. *Climate atlas of Croatia*. Zagreb: Meterological and Hydrological Service of Croatia; 2008. 83-5 p.
142. Lassandro G, Carriero F, Palmieri V, Palladino V, Amoruso A, Gallone MF, i sur. Serum D vitamin levels in children with immune thrombocytopenia. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020;20(2):221-6.
143. Wang J, Lv S, Chen G, Gao C, He J, Zhong H, i sur. Meta-analysis of the association between vitamin D and autoimmune thyroid disease. *Nutrients*. 2015 Apr 3;7(4):2485-98.
144. Miclea A, Bagnoud M, Chan A, Hoepner R. A Brief Review of the Effects of Vitamin D on Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2020 May 6;11:781.
145. Amital H, Szekanecz Z, Szucs G, Danko K, Nagy E, Csepany T, i sur. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):1155-7.
146. Wright TB, Shults J, Leonard MB, Zemel BS, Burnham JM. Hypovitaminosis D is associated with greater body mass index and disease activity in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Pediatr*. 2009 Aug;155(2):260-5.
147. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2012 Dec;31(12):1733-9.
148. Lin J, Liu J, Davies ML, Chen W. Serum Vitamin D Level and Rheumatoid Arthritis Disease Activity: Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146351.
149. Kerr GS, Sabahi I, Richards JS, Caplan L, Cannon GW, Reimold A, i sur. Prevalence of vitamin D insufficiency/deficiency in rheumatoid arthritis and associations with disease severity and activity. *J Rheumatol*. 2011 Jan;38(1):53-9.
150. Sadeghian M, Saneei P, Siassi F, Esmailzadeh A. Vitamin D status in relation to Crohn's disease: Meta-analysis of observational studies. *Nutrition*. 2016 May;32(5):505-14.

151. Skaaby T, Husemoen LL, Thuesen BH, Linneberg A. Prospective population-based study of the association between vitamin D status and incidence of autoimmune disease. *Endocrine*. 2015 Sep;50(1):231-8.
152. Andjelkovic Z, Vojinovic J, Pejnovic N, Popovic M, Dujic A, Mitrovic D, i sur. Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 1999 Jul-Aug;17(4):453-6.
153. Huckins D, Felson DT, Holick M. Treatment of psoriatic arthritis with oral 1,25-dihydroxyvitamin D3: a pilot study. *Arthritis Rheum*. 1990 Nov;33(11):1723-7.
154. Bockow B, Kaplan TB. Refractory immune thrombocytopenia successfully treated with high-dose vitamin D supplementation and hydroxychloroquine: two case reports. *J Med Case Rep*. 2013 Apr 4;7:91.
155. Hill QA, Grainger JD, Thachil J, Provan D, Evans G, Garg M, i sur. The prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with immune thrombocytopenia receiving steroids: a British Society for Haematology Good Practice Paper. *Br J Haematol*. 2019 May;185(3):410-7.
156. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, i sur. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb;101(2):394-415.
157. Wang Y, Zhang F, Wang S, Shang X, Luo S, Zhou H, i sur. Serum Vitamin D Level is Inversely Associated With Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Level and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients. *Arch Rheumatol*. 2016 Mar;31(1):64-70.
158. Saki F, Dabbaghmanesh M, Omrani G, Bakhshayeshkaram M. Vitamin D deficiency and its associated risk factors in children and adolescents in southern Iran. *Public health nutrition*. 2017 Jul;20(10).
159. Nikooyeh B, Abdollahi Z, Hajifaraji M, Alavi-Majd H, Salehi F, Yarparvar A. Vitamin D Status, Latitude and their Associations with Some Health Parameters in Children: National Food and Nutrition Surveillance. *Journal of tropical pediatrics*. 2017 Feb;63(1).
160. Tarantino M, Danese M, Klaassen R, Duryea J, Eisen M, Bussel J. Hospitalizations in pediatric patients with immune thrombocytopenia in the United States. *Platelets*. 2016 Jul;27(5).

161. Miraglia dGE, Grandone A, Cirillo G, Capristo C, Marzuillo P, Di Sessa A, i sur. Bioavailable Vitamin D in Obese Children: The Role of Insulin Resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015 Oct;100(10).
162. Plesner J, Dahl M, Fonvig C, Nielsen T, Kloppenborg J, Pedersen O. Obesity is associated with vitamin D deficiency in Danish children and adolescents. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*. 2018 Jan;31(1).
163. Censani M, Hammad H, Christos P, Schumaker T. Vitamin D Deficiency Associated With Markers of Cardiovascular Disease in Children With Obesity. *Global pediatric health*. 2018 Jan;5:2333794X17751773.
164. Ekbom K, Marcus C. Vitamin D deficiency is associated with prediabetes in obese Swedish children. *Acta paediatrica*. 2016 Oct;105(10).

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OPĆI PODATCI**

**Ime i prezime:** Davor Petrović

**Datum i mjesto rođenja:** 03.01.1985., Sarajevo

**Adresa:** Vukovarska 115

**Telefon:** +385 98 1700 330

**Elektronička pošta:** dpetrovic@kbsplit.hr

**Državljanstvo:** Hrvatsko

## **IZOBRAZBA:**

1999. – 2003. - III. gimnazija u Splitu

2003. - 2009. - integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina,

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2012. – 2013. - sveučilišni poslijediplomski specijalistički studij iz Pedijatrije, Medicinski

fakultet Sveučilišta u Rijeci

2017. - sveučilišni poslijediplomski doktorski studij – Translacijsko istraživanje u biomedicini (TRIBE), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

## **ZAPOSLENJA I AKTIVNOSTI:**

2010. – 2011. liječnik opće medicine u ordinaciji obiteljske medicine, Split i Trogir, Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije

2012. - 2018. liječnik na specijalizaciji iz pedijatrije za potrebe Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split

2018. – 2021. liječnik specijalist pedijatar u Klinici za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split

## **MATERINSKI JEZIK**

- Hrvatski jezik

## **OSTALI JEZICI**

- Engleski jezik
- Talijanski jezik

## **OSTALE AKTIVNOSTI**

- član Hrvatskog pedijatrijskog društva
- član Hrvatskog društva za pedijatrijsku kardiologiju
- član muškog pjevačkog zbora „Splitski liječnici pjevači“
- član rock/metal benda „Prevail“

## **POPIS PUBLIKACIJA**

1. Čulić V, Miyake N, Janković S, Petrović D, Šimunović M, Đapić T, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by TNNI2 mutation. Hum Genome Var. 2016 Oct 13;3:16035.
2. Čulić S, Markić J, Petrović D, Konjevoda P, Pavelić J Serum vitamin D levels in children with newly diagnosed and chronic immune thrombocytopenia. Semin Hematol. 2016 Apr;53 Suppl 1:S67-9.
3. Mirceta M, Petrović D, Čulić S, Karin Ž, Šupe-Domic D, Markić J. Vitamin D Status in Pediatric Patients with Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia in University Hospital of Split. Central Eur J Paed 2018;14(2):154-159.
4. Čulić S, Markić J, Petrović D, Armanda V, Konjevoda P, Pavelić J. Vitamin D Status in Pediatric Patients with Newly Diagnosed Malignant Disease: Preliminary Results. Central Eur J Paed 2018;14(2):160-166.
5. Armanda V, Čulić S, Petrović D. Diagnostic approach to the child with anemia. Paediatrica Croatica, Supplement 57:192-197.

6. Petrović D, Benzon B, Batinic M, Culic S, Roganovic J, Markic J. Hypovitaminosis D Influences the Clinical Presentation of Immune Thrombocytopenia in Children with Newly Diagnosed Disease. *J Clin Med*. 2019 Nov 3;8(11).
7. Katić J, Anić A, Brešković T, Jurišić Z, Borovina A, Kovačević T, Petrović D. Ablation for WpW syndrome in a 12-year-old boy without using X ray fluoroscopy. [https://www.researchgate.net/publication/328920216\\_Ablation\\_for\\_WPW\\_syndrome\\_in\\_a\\_12-year-old\\_boy\\_without\\_using\\_X\\_ray\\_fluoroscopy](https://www.researchgate.net/publication/328920216_Ablation_for_WPW_syndrome_in_a_12-year-old_boy_without_using_X_ray_fluoroscopy) [accessed Dec 10 2019].
8. Mesirović Dinarević S, Joguncic Grit A, Saric K, Cambj Sapunar L, Petrović D, Topić B, Krzelj V i sur. The influence of mother's nutrition and oral health on the child's blood vessel development. *Nursing Diagnosis, Parasitology & Pediatric Cardiology*. 2019, Florence, Italy.
9. Petrović D, Čulić V, Swinderek-Asayed Z. Three Cases of Joubert Syndrome in a Consanguineous Syrian Family and a Interesting Case of Multinational Collaboration. *J Pediatr Genet*. 2020 Dec. DOI: 10.1055/s-0040-1721826



## **11. DODATAK**

Tablica S1. Tablica koja se koristi kod ocjenjivanja krvarenja prema SMOG sustavu (25):

Grading of bleeding symptoms at presentation and at each subsequent evaluation<sup>1</sup>

Type of bleeding	GRADES BASED ON THE WORST INCIDENT EPISODE SINCE LAST VISIT <sup>2</sup>				
	0	1	2	3	4
<b>SKIN</b>					
<b>Petechiae</b> (does not include steroid-induced or senile purpura)	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Less than or equal to 10 in a patient's palm-sized area <sup>3</sup> in the most affected body area <sup>4</sup>  <input type="checkbox"/> Any number if reported by the patient	<input type="checkbox"/> More than 10 in a patient's palm-sized area or more than 5 in at least 2 patient's palm-sized areas located in at least 2 different body areas <sup>4</sup> , one above and one below the belt (in the most affected body areas) <sup>4</sup>	<input type="checkbox"/> More than 50, if scattered both above and below the belt	
<b>Ecchymoses</b>	<input type="checkbox"/> None or up to 2 in the same body area <sup>4</sup> , but smaller than a patient's palm-sized area, if a) spontaneous or b) disproportionate to trauma/constriction <sup>5</sup>	<input type="checkbox"/> 3 or more in the same body area <sup>4</sup> , but all smaller than a patient's palm-sized area, if a) spontaneous or b) disproportionate to trauma/constriction <sup>5</sup>  <input type="checkbox"/> At least 2 in two different body areas <sup>4</sup> , smaller than a patient's palm-sized area, if a) spontaneous or b) disproportionate to	<input type="checkbox"/> From 1 to 5 larger than a patient's palm-sized area, if a) spontaneous or b) disproportionate to trauma/constriction <sup>5</sup> with or without smaller ones	<input type="checkbox"/> More than 5 larger than a patient's palm-sized area, if a) spontaneous or b) disproportionate to trauma/constriction <sup>5</sup>	

	trauma/constriction <sup>5</sup>			
	<input type="checkbox"/> Any number and size if reported by the patient			
<b>Subcutaneous hematomas</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> 1 smaller than a patient's palm-sized area  <input type="checkbox"/> Any number and size if reported by the patient	<input type="checkbox"/> 2 smaller than a patient's palm-sized area, spontaneous  <input type="checkbox"/> 2 smaller than a patient's palm-sized area, disproportionate to trauma <sup>5</sup>	<input type="checkbox"/> More than 2 smaller or at least 1 larger than a patient's palm-sized area, spontaneous  <input type="checkbox"/> More than 2 smaller or at least 1 larger than a patient's palm-sized area, disproportionate to trauma <sup>5</sup>
<b>Bleeding from minor wounds<sup>6</sup></b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Lasting < 5 min  <input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Lasting > 5 min or interfering with daily activities	<input type="checkbox"/> Requiring protracted medical observation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> Medical report describing patient's evaluation by a physician
<b>MUCOSAL</b>				

<b>Epistaxis<sup>7</sup></b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Lasting < 5 min  <input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Lasting > 5 min or interfering with daily activities	<input type="checkbox"/> Packing or cauterization or in-hospital evaluation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> Medical report describing packing or cauterization or in-hospital evaluation	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL
<b>Oral cavity – gum bleeding<sup>7</sup></b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Lasting < 5 min  <input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Lasting > 5 min or interfering with daily activities	<input type="checkbox"/> Requiring protracted medical observation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> Medical report describing patient's evaluation by a physician	
<b>Oral cavity – hemorrhagic bullae or blisters</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Less than 3 <input type="checkbox"/> Any number if reported by the patient	<input type="checkbox"/> From 3 to 10 but no difficulty with mastication	<input type="checkbox"/> More than 10 or more than 5 if difficulty with mastication	
<b>Oral cavity - bleeding from bites to lips &amp; tongue or after deciduous teeth</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Lasting < 5 min  <input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Lasting > 5 min or interfering with daily activities	<input type="checkbox"/> Interventions to ensure hemostasis or in-hospital evaluation at the time of this visit	

<b>loss</b>	<input type="checkbox"/> Medical report describing interventions to ensure hemostasis or in- hospital evaluation				
<b>Subconjunctival hemorrhage (not due to conjunctival disease)</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Petechiae/ hemorrhage partially involving one eye  <input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Petechiae/ hemorrhage partially involving both eyes, or diffuse hemorrhage in one eye	<input type="checkbox"/> Diffuse hemorrhage in both eyes	
<b>ORGAN (and internal mucosae)</b>					
<b>GI bleeding not explained by visible mucosal bleeding or lesion:</b> Hematemesis, Melena, Hematochezia, Rectorrhagia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Present at the visit <input type="checkbox"/> Described in a medical report	<input type="checkbox"/> Requiring endoscopy <sup>8</sup> or other therapeutic procedures or in-hospital evaluation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> Medical report prescribing endoscopy <sup>8</sup> or other therapeutic procedures or in-hospital evaluation	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL

<b>Lung bleeding</b> Hemoptysis Tracheobronchial bleeding	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient	<input type="checkbox"/> Present at this visit <input type="checkbox"/> Described in a medical report	<input type="checkbox"/> Requiring bronchoscopy <sup>8</sup> or other therapeutic procedures or in-hospital evaluation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL
<b>Hematuria</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Any episode if reported by the patient  <input type="checkbox"/> Microscopic (lab analysis)	<input type="checkbox"/> Macroscopic <input type="checkbox"/> Described in a medical report	<input type="checkbox"/> Macroscopic, and requiring cystoscopy <sup>8</sup> or other therapeutic procedures or in-hospital evaluation at the time of this visit  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL
<b>Menorrhagia (compared to pre-ITP or to a phase of disease with normal platelet count)<sup>9</sup></b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Doubling nr. of pads or tampons in last cycle compared to pre-ITP or to a phase of disease with normal platelet count	<input type="checkbox"/> Changing pads more frequently than every 2 hrs. or clot and flooding  <input type="checkbox"/> Requiring combined treatment with antifibrinolytics and	<input type="checkbox"/> Acute menorrhagia requiring hospital admission or endometrial ablation (either at this visit or	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL

		<input type="checkbox"/> Score > 100 using PBAC in the last cycle, if normal score in pre-ITP cycles or in a phase of disease with normal platelet count	hormonal therapy or gynecological investigation (either at this visit or described in a medical report)	described in a medical report)	
<b>Intramuscular hematomas</b> (only if diagnosed by a physician with an objective method)	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Post trauma, diagnosed at this visit, if judged disproportionate to trauma  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> Spontaneous, diagnosed at this visit  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> Spontaneous or post trauma (if judged disproportionate to trauma) diagnosed at this visit and requiring hospital admission or surgical intervention  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL
<b>Hemarthrosis</b> (only if diagnosed by a physician with an objective method)	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Post trauma, diagnosed at this visit, function conserved or minimally impaired, if judged disproportionate to trauma  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in	<input type="checkbox"/> Spontaneous, diagnosed at this visit, function conserved or minimally impaired  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> Spontaneous or post trauma (if judged disproportionate to trauma), diagnosed at this visit and requiring immobilization or joint aspiration  <input type="checkbox"/> An equivalent	<input type="checkbox"/> Spontaneous or post trauma (if judged disproportionate to trauma) diagnosed at this visit and requiring surgical intervention  <input type="checkbox"/> An equivalent

		a medical report	episode if described in a medical report	episode if described in a medical report	
<b>Ocular bleeding</b> (only if diagnosed by a physician with an objective method)	<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Any post trauma vitreous or retinal hemorrhage involving one or both eyes with or without impaired/blurred vision present at this visit if judged disproportionate to trauma  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> Spontaneous vitreous or retinal hemorrhage involving one or both eyes with impaired /blurred vision present at this visit  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report	<input type="checkbox"/> Spontaneous vitreous or retinal hemorrhage with loss of vision in one or both eyes present at this visit  <input type="checkbox"/> An equivalent episode if described in a medical report
<b>Intracranial bleeding<sup>10</sup>:</b> intracerebral, intraventricular, subarachnoidal, subdural, extradural  (only if diagnosed with an objective method at the visit or described in a medical report provided by the patient)	<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Any post trauma event requiring hospitalization	<input type="checkbox"/> Any spontaneous event requiring hospitalization in presence of an underlying intracranial lesion	<input type="checkbox"/> Any spontaneous event requiring hospitalization without an underlying intracranial lesion



<b>Other internal bleeding:</b> hemoperitoneum hemopericardium hemothorax retroperitoneal bleeding hepatic and splenic peliosis with organ rupture retroorbital bleeding metrorrhagia etc. <b>(only if diagnosed with an objective method at the visit or described in a medical report provided by the patient)</b>	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Any event requiring hospitalization < 48 hrs.	<input type="checkbox"/> Any event requiring hospitalization > 48 hrs. or RBC transfusion or Hb drop > 2g/dL
---	-----------------------------	--	--

Grading is based on physical examination at the time of the visit by the physician or expert nurse or on patient's history supplemented by available medical reports. Bleeding manifestations reported by the patient but not visible at the time of data collection are graded 1. Grade 5 is assigned to fatal bleeding.

In addition to the guidance offered in the table, it is advised to refer to the Supplemental Appendix 3 for more detailed definitions and to the data collection form in Supplemental Appendix 4. Illustrative examples are available on the website of the Hematology Project Foundation (<http://itpbat.fondazioneematologia.it/>)

To receive a grade > 1, all non-overt skin and non-overt mucosal bleeding (petechiae, ecchymoses, subcutaneous hematomas, vesicles/bullae subconjunctival bleeding) should be visible at the time of visit for grading by the physician or expert nurse taking the history.

For bleeding from minor wounds and overt-mucosal bleeding (epistaxis, gum, bleeding from bites to lips & tongue or after deciduous teeth loss/extraction) and all organ bleeding, a medical record describing the symptom or indicating a specific intervention/prescription should be also taken into account for grading.

Requirement for ITP specific treatments and antifibrinolytics (apart from menorrhagia) was not considered for grading, due to their subjective nature and their adoption not only to control actual bleeding but also to reduce the "risk" of impendent or future bleeding (see supplemental appendix 1).

<sup>1</sup> In case of patients examined for the first time, all types of bleeding occurring at the visit and in the 15 days preceding the visit should be considered.

<sup>2</sup> Each type of bleeding should be graded based on the worst bleeding manifestation that occurred during each observation period or in the 15 days preceding the first visit.

<sup>3</sup> Patient's own palm size is commonly considered to be proportional to body surface area. Palm = The inner surface of the hand stretching between the distal crease of the wrist and the bases of the fingers (fingers surface excluded).

<sup>4</sup> Body areas include: face, neck, right and left upper limbs (considered separately), right and left lower limbs (considered separately), trunk, abdomen, and recumbent areas (for the ambulatory patient means the area below the knees).

<sup>5</sup> Bleedings considered proportionate to trauma/constriction on a clinical ground should not be reported for skin domain

<sup>6</sup> Minor wound means superficial skin cuts (e.g., by shaving razor, knife, or scissors).

<sup>7</sup> Epistaxis and gum bleeding are also reported in some normal subjects. Thus, a critical judgment is required in grading these manifestations: they should be reported only if judged more severe when compared with pre-ITP bleeding, if any.

<sup>8</sup> Any endoscopic investigations should be considered for grading only if performed for therapeutic purpose and not solely for diagnostic purpose.

<sup>9</sup> In girls at menarche grade 1 cannot be assigned, lacking comparison with previous cycles.

<sup>10</sup> Intracranial bleeding should always be reported, irrespective of its grade. For example, if a woman had S2 (subcutaneous hematoma) M2 epistaxis O3 (menorrhagia) and an intracranial bleeding grade 2 (post trauma, requiring hospitalization), the SMOG index is S2M2O3 intracranial 2). If the same patient also had intracranial bleeding grade 3, the SMOG index is S2M2O3 (intracranial 3) (see text)

Tablica S2. Usporedba varijabla između dva centra u kojima se provodila studija (KBC Split i KBC Rijeka)

<b>Varijabla</b>	<b>KBC Rijeka</b>	<b>KBC Split</b>	<b>Jedinica</b>	<b>P vrijednost</b>
<b>25(OH)D</b> (Ar. sredina ± SD)	68,83 ± 36.33	66,21 ± 22,99	nmol/L	0,741, t test
<b>SMOG<sup>a</sup></b> (Medijan, IQR)	3 (3-4)	4 (3-6)		0,083, Mann Whitney
<b>IBLS<sup>b</sup></b> (Medijan, IQR)	4 (3-4,7)	5 (3,2-6)		0,086, Mann Whitney
<b>Broj trombocita</b> (Ar. sredina ± SD)	12,44 ± 8,52	8.41 ± 8.92	G/L	0,124, t test
<b>ITM<sup>c</sup> Z vrijednost</b> (Medijan, IQR)	-0,01 (-0,63 do 0,35)	0,45 (-0,85 do 0,99)		0,244, Mann Whitney
<b>Dob</b> (Ar. sredina ± SD)	6,68 ± 5,88	5,43 ± 4,48	godina	0,338, t test

<sup>a</sup>IBLS – *Immune thrombocytopenia Bleeding Scale* sustav za bodovanje krvarenja (24);  
<sup>b</sup>SMOG – *Skin-Mucose-Organ-Gradation* sustav za bodovanje krvarenja (25); <sup>c</sup>ITM – Indeks tjelesne mase; SD – standardna devijacija; IQR – interkvartilni raspon.

Tablica S3. Usporedba dva modela koristeći korigirane Akaiake-jeve informacijske kriterije (cAIC)

<b>Model</b>	<b>Neovisne varijable</b>	<b>cAIC</b>	<b>Omjer dokaza (E)</b>
<b>Broj 1</b>	[25(OH)D]	34,56	<b>2.3</b>
<b>Broj 2</b>	[25(OH)D] i centar	36.23	