

# Izražaj cirkulirajućih mikronaRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a) u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom

---

**Mandac Rogulj, Inga**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:973293>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Inga Mandac Rogulj**

**Izražaj cirkulirajućih mikroRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a) u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Inga Mandac Rogulj**

**Izražaj cirkulirajućih mikroRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a) u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice „Merkur“.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Slobodanka Ostojić Kolonić, dr. med.

Posebno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Slobodanki Ostojić Kolonić, dr. med. na velikoj podršci, motivaciji i pruženom povjerenju, kako u izradi ovog rada tako i tijekom cijele dosadašnje karijere.

Zahvaljujem se osoblju Zavoda za hematologiju i Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, posebno prof. dr. sc. Mirjani Mariani Kardum Paro, spec. med. biok.

Veliko hvala i osoblju Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur na prijateljskim savjetima prilikom izrade ove disertacije.

Hvala i kolegi hematologu Goranu Rinčiću na pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima i sestrama što su mi kroz život uvijek bili bezuvjetna podrška.

Posebna zahvala i „Zakladi Ana Rukavina“ na financijskoj pomoći kod izrade disertacije.

Ovaj rad posvećujem svojoj kćeri Ani.

# SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	
Popis oznaka i kratica .....	
1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. MDS.....	3
1.2. Epidemiologija i etiologija MDS .....	4
1.3. Patogeneza MDS .....	6
1.4. Klinička slika i dijagnostički postupak kod bolesnika s MDS .....	10
1.5. Klasifikacije MDS .....	14
1.6. Prognostički čimbenici u MDS .....	16
1.7. Terapijski pristup u MDS.....	20
1.7.1. Liječenje MDS bolesnika niskog rizika.....	20
1.7.2. Liječenje MDS bolesnika visokog rizika.....	22
1.7.3. Ostali oblici liječenja MDS .....	23
1.8. Biologija miRNA.....	24
1.8.1. Sinteza miRNA .....	24
1.8.2. Uloga miRNA u hematopoezi .....	27
1.8.3. Izražaj miRNA u MDS.....	32
1.9. Svrha rada .....	36
2. HIPOTEZA .....	37
3. CILJEVI RADA .....	38
3.1. Opći cilj .....	38
3.1. Specifični ciljevi .....	38
4. MATERIJALI I METODE .....	39
4.1. Materijali .....	39
4.1.1. Ispitanici .....	39
4.2. Metode.....	40
4.2.1. Klinički parametri i laboratorijski testovi .....	40
4.2.2. Uzorkovanje i izolacija miRNA.....	40
4.2.3. Statističke metode .....	44
5. REZULTATI.....	45
5.1. Karakteristike bolesnika.....	45
5.2. Izražaj miRNA.....	49
5.3. Opisna statistika pojedinih miRNA ovisno o WHO-klasifikaciji .....	55

6. RASPRAVA.....	58
7. ZAKLJUČAK.....	63
8. KRATKI SADRŽAJ .....	64
9. SUMMARY .....	66
10. POPIS LITERATURE .....	68
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	77

## Popis oznaka i kratica

Ago – Argonaut protein

ALL – akutna limfoblastična leukemija

AlloSCT (eng. allogeneic stem cell transplantation) – alogenična transplantacija matičnih stanica

ALT – alanin-aminotransferaza

ANC (eng. absolute neutrophil count) – apsolutni broj neutrofila

AST – aspartat-aminotransferaza

AutoSCT (eng. autogeneic stem cell transplantation) – autologna transplantacija matičnih stanica

AML – akutna mijeloična leukemija

ATG – antitimocitnog globulina

BCR (eng. breakpoint cluster region) – regija u kojoj se grupiraju prijelomi

BCR-ABL – fuzijski gen/protein tipičan za kroničnu mijeloičnu leukemiju koji se sastoji od BCR i ABL (eng. Abelson tyrosin kinase; hrv. Abelsonova tirozin kinaza)

BMI (eng. body mass index) – indeks tjelesne mase

CD (eng. cluster of differentiation) – klasifikacijska molekula na površini stanica

CCUS (eng. clonal cytopenia of undetermined significance) – klonalna citopenija neodređenog značenja

cDNA (eng. complementary DNA) – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

CEA (eng. carcinoembrional antigen) – karcinoembrionalni antigen

CHIP (eng. clonal hematopoiesis of indeterminate potential) – klonalna hematopoeza neodređenog potencijala

CNA (eng. copy number aberrations) – poremećaji u broju kopija gena

CRP – C reaktivni protein

$\Delta$ CT (eng. difference in threshold cycles) – razlika između rednih brojeva ciklusa lančane reakcije polimeraze u kojima nastupa prag detekcije amplikona

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA deoksiribonukleinska kiselina

E – eritrociti

EBV – Epstein-Barrov virus

EDTA – etilendiamintetraacetat

EKG – elektrokardiogram

EPO – eritropoetin

ESA (eng. erythropoiesis stimulating agents) – lijekovi za stimuliranje eritropoeze

ET – esencijalna trombocitemija

FAB – francusko-američko-britanska grupa

FISH (eng. fluorescence in situ hybridization) – fluorescentna hibridizacija in situ

GCSF (eng. granulocyte-colony stimulating factor) – čimbenik rasta granulocita

GGT – gama-glutamiltransferaza

GUK – glukoza u krvi

HCV – virus hepatitisa C

Hgb – hemoglobin

HIV – virus humane imunodeficijencije

HSC (eng. hematopoietic stem cell) – hematopoetska matična stanica

HMA (eng. hypomethylating agents) – hipometilirajući lijekovi

ICUS (eng. idiopathic cytopenia of undetermined significance) – idiopatska citopenija neodređenog značenja

ICUS-A – idiopatska citopenija neodređenog značenja s anemijom

ICUS-N – idiopatska citopenija neodređenog značenja s neutropenijom

ICUS-PAN – idiopatska citopenija neodređenog značenja s bi/pancitopenijom

ICUS-T – idiopatska citopenija neodređenog značenja s trombocitopenijom

IDUS (eng. idiopathic dysplasia of undetermined significance) – idiopatska displazija neodređenog značenja

IL – interleukin

IPSS (eng. international prognostic scoring system) – internacionalni prognostički sustav bodovanja

IPSS-R (eng. revised international prognostic scoring system) – revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja

ITP – imunotrombocitopenija

KLL – kronična limfocitna leukemija

KML – kronična mijeloična leukemija

KMML – kronična mijelomonocitna leukemija

L – leukociti

Ly – limfociti



LDH – laktat dehidrogenaza

MCV (eng. mean corpuscular volume) – prosječni volumen eritrocita

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

MDS – mijelodisplastični sindrom

MDS-EB1 (eng. with excess blasts) – mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1

MDS-EB2 (eng. with excess blasts) – mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2

MDS-MLD (eng. with multilineage dysplasia) – mijelodisplastični sindrom s multilinijskom displazijom

MDS-RS (eng. with ring sideroblasts) – mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroplastima

MDS-SLD (eng. with single line dysplasia) – mijelodisplastični sindrom s jednolinijskom displazijom

MDS-U (eng. unclassified) – neklasificirani mijelodisplastični sindrom

MiRNA – mikroribonukleinska kiselina

miRISC (eng. micro ribonucleotid acid induced silencing complex) – kompleks za utišavanje induciran molekulom miRNA

MF – mijelofibroza

MM – multipli mijelom

MPS – mijeloproliferativni sindrom

mRNA (eng. messenger RNA) – glasnička ribonukleinska kiselina

NHL – ne-Hodgkinov limfom

NPM (eng. nucleophosmin) – nukleofosmin

OS (eng. overall survival) – ukupno preživljenje

PCR (eng. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze

PFS (eng. progression free survival) – vrijeme bez znakova aktivnosti bolesti

piRNA (eng. piwi interacting RNA) – piwi-vezujuća ribonukleinska kiselina

PMF – primarna mijelofibroza

PNH – paroksizmalna noćna hemoglobinurija

PPP (eng. platelet-poor plasma) – plazma siromašna trombocitima

PSA – prostata specifični antigen

qPCR (eng. quantitative polymerase chain reaction) – kvantitativna lančana reakcija polimeraze

RA – refraktorna anemija

RAEB (eng. refractory anemia with excess blasts) – refraktorna anemija s viškom blasta

RAEB-1 – refraktorna anemija s viškom blasta tip 1

RAEB-2 – refraktorna anemija s viškom blasta tip 2

RARS (eng. refractory anemia with ring sideroblasts) – refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima

RCMD (eng. refractory cytopenia with multilineage dysplasia) – refraktorna citopenija s multilinijskom displazijom

RCUD (eng. refractory cytopenias with unilineage dysplasia) – refraktorna citopenija s jednolinijskom displazijom

ROC krivulja (eng. receiver operating characteristic curve) – krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika

rRNA – ribosomalna ribonukleinska kiselina

PRV – policitemija rubra vera

RNA – ribonukleinska kiselina

Rtc – retikulociti

RT – reverzna transkripcija

RT-PCR (eng. real time polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

RDW (eng. red cell distribution width) – širina distribucije volumena crvenih krvnih stanica

s.c. – subkutano

SE – sedimentacija eritrocita;

shRNA (eng. short hairpin ribonucleic acid) – kratka RNA poput ukosnice

siRNA (eng. small interfering RNA) – mala interferirajuća ribonukleinska kiselina

snRNA (eng. small nuclear RNA) – mala jezgrina ribonukleinska kiselina

TGF- $\beta$  (eng. transforming growth factor beta) – transformirajući čimbenik rasta beta

TIBC (eng. total iron binding capacity) – ukupni kapacitet vezanja željeza

tMDS – terapijom inducirani mijelodisplastični sindrom

TNF $\alpha$  – tumor nekrotizirajući faktor alfa

TPO – trombopoetin

Trc – trombociti

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

UIBC (eng. unsaturated iron binding capacity) – nezasićeni kapacitet vezanja željeza

WHO (eng. World health organization) – Svjetska zdravstvena organizacija

WPSS (eng. World health organization classification based prognostic scoring system) – prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World health organization* (WHO)) maligne bolesti su najveći zdravstveni problem diljem svijeta i drugi najčešći uzrok smrti. Nedavno objavljeni podaci o mortalitetu u Sjedinjenim Američkim Državama za 2018. godinu, ukazuju na pojavnost više od 4700 novih slučajeva malignih bolesti svakog dana (1).

Kako bi se čim ranije krenulo u liječenje i povećala stopa preživljenja bolesnika s malignom bolesti, postoji potreba za pravovremenim postavljanjem dijagnoze.

Tumorske stanice mogu pokazivati svoju aktivnost preko brojnih mehanizama, a neki od najvažnijih su tumorski biomarkeri. U pojedinim tipovima tumora tumorskim markerima moguće i postaviti sumnju na postojanje tumora i puno prije nego li se razvije puna klinička slika maligne bolesti. Dijagnoza maligne bolesti u ranoj fazi, dok je asimptomatska, zahtijeva razvoj učinkovitih metoda probira koje se potom mogu uvrstiti u svakodnevnu kliničku praksu (2).

Idealan tumorski biomarker bio bi protein ili razgradni produkt proteina kojeg inače nema kod zdravog pojedinca, a koji bi se jednostavno mjerio u krvi ili mokraći bolesnika.

Gold i Freedman prvi su 1965. godine u krvi bolesnika s karcinomom kolona uočili parametar koji se uobičajeno nalazi u fetalnim tkivima i nazvali ga karcinoembrionalnim antigenom (eng. *carcinoembryonal antigen* (CEA)). Do kraja 70-ih godina prošlog stoljeća, nekoliko je različitih potencijalnih serumskih tumorskih biomarkera pronađeno, a jedan od najpouzdanijih u ranom otkrivanju tumora je specifični antigen za prostatu (eng. *prostate specific antigen* (PSA)) (3).

Međutim, još uvijek postoje brojne maligne bolesti kod kojih nema pouzdanih biomarkera koji bi imali visoku osjetljivost i specifičnost u ranoj dijagnostici tumora.

Visoka prediktivna vrijednost biomarkera nije samo važna zbog dijagnoze maligne bolesti, nego je početni korak u razumijevanju bioloških puteva i regulatornih mehanizama uključenih u samu patofiziologiju tumora. Poznato je kako su pojedini dijagnostički biomarkeri potencijalni ciljni biljezi i za antitumorske lijekove (3).

Unatoč nedavnim otkrićima u molekularnoj biologiji, patohistološka dijagnostika je zlatni standard za najveći broj tumora. S obzirom da je patohistološka dijagnostika invazivna metoda, često bolna, a time i neugodna za bolesnike, u novije

vrijeme se u dijagnostičke algoritme pokušavaju uključiti alternativne metode otkrivanja neinvazivnih tumorskih biomarkera.

Određivanje neinvazivnih biomarkera, poput cirkulirajućih nukleinskih kiselina, predstavlja bolji izbor za bolesnike od patohistološke dijagnostike, jer je te biomarkere lakše uzorkovati, prikupljanje je manje bolno za bolesnike, a vjerojatno budu i ekonomski isplativiji kad postupak jednom uđe u širu primjenu.

Biološke molekule kao što su proteini, deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA) su potencijalno optimalni tumorski biomarkeri, jer ih je moguće izolirati iz različitih bioloških materijala.

RNA biomarkeri pružaju bolji uvid u dinamiku staničnog ciklusa, a neke specifične RNA kao što je cirkulirajuća RNA i mikroRNA (miRNA) su stabilne u većini staničnih tekućina (4, 5).

U ovom radu analizirat će se izražaj odabranih miRNA kao mogućih dijagnostičkih biomarkera u mijelodisplastičnom sindromu (MDS).

## 1.1. MDS

MDS predstavlja skupinu malignih klonalnih hematoloških poremećaja s displazijom jedne ili više hematopoetskih loza u koštanoj srži i heterogenom kliničkom slikom. Samo porijeklo riječi "mijelodisplazija" proizlazi iz pojmova "mijelo" što znači koštana, i "displazija", što znači abnormalan razvoj.

MDS je karakteriziran sniženim krvnim brojevima, poremećajem u razvoju krvnih stanica (posljedica morfološke displazije u jednoj ili više loza), s manje od 20% mijeloblasta u razmazu periferne krvi ili koštane srži, klonalnim genetičkim promjenama (prisutnost citogenetičkih i molekularnih promjena u oko 90% bolesnika) i povećanim rizikom za razvoj akutne mijeloične leukemije (AML) (6).

## 1.2. Epidemiologija i etiologija MDS

U općoj populaciji, incidencija MDS je 4,9 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje. Taj poremećaj rijetko se pojavljuje kod djece i kod osoba mlađih od 40 godina i kod njih incidencija je 0,1 na 100 000 stanovnika godišnje. Kod osoba životne dob od 70 do 79 godina incidencija je znatno viša i iznosi 30,2, dok je kod još starijih, iznad 80 godina života incidencija i 59,8 na 100 000 stanovnika. Medijan dobi pojave MDS je 65 godina s nešto većom učestalošću kod muškaraca (6).

Kongenitalni poremećaji, kao što je Fanconijeva anemija, kao i izloženost benzenu u cigaretnom dimu, otapalima (profesionalna izloženost u bojanju, pesticidi) povećavaju rizik za pojavnost MDS (7,8).

Neke su studije potvrdile pozitivnu povezanost indeksa tjelesne mase (eng. *body mass index* (BMI)) i razvoja MDS. Osobe s BMI između 25 i 29,9 te iznad 30 imaju 1,15 odnosno 2,18 puta veći relativni rizik za razvoj MDS u odnosu na one koji imaju BMI manji od 25. Posebno su rizični za razvoj MDS osobe čiji je BMI iznad 35 (9).

Biološki mehanizmi povezanosti antropometrijskih čimbenika i hematoloških malignih bolesti nisu do kraja razjašnjeni. Pretpostavlja se da su viši pojedinci izloženi i većim razinama hormona rasta, imaju više stanica pa time je i veća mogućnost mutacija i replikacija (10).

Poznato je kako kod osoba s prekomjernom tjelesnom težinom postoji stanje kronične upale i oštećenog imuniteta, poremećaj u koštanom mikrookolišu, a adipociti mogu imati aktivnu ulogu u leukemogenezi (11,12).

Sekundarni MDS nastaje iz nekog ranije dijagnosticiranog hematološkog poremećaja, kao što su primjerice aplastične anemije, mijeloproliferativni poremećaj, ili kao posljedica ranije izloženosti citostaticima ili radioterapiji. Takav MDS naziva se i terapijom inducirani MDS (tMDS) te čini 5 do 15% svih slučajeva MDS (13).

Poznata je pozitivna veza između sekundarnog MDS i AML, a povećani je rizik za MDS i nakon liječenja alkilirajućim citostaticima/klorambucilom, ili etopozidom prije autologne transplantacije matičnih stanica (eng. autogeneic stem cell transplantation (AutoSCT)).

Izdvojeno tMDS čini oko 10% svih MDS slučajeva s medijanom dobi bolesnika između 40 i 60 godina u trenutku postavljanja te dijagnoze. Prvi put se tMDS kao entitet pojavljuje u WHO klasifikaciji 2001. godine. Procjenjuje se da bolesnici koji su liječeni

kemoterapijom i/ili radioterapijom, imaju 4,7 puta veći rizik za razvoj mijeloproliferativnih poremećaja u usporedbi s općom populacijom (13,14).

Učestalost MDS je veća kod bolesnika nakon transplantacije solidnog organa. Premda su studije o čimbenicima rizika i kliničkoj prezentaciji oskudne, smatra se kako je takva povezanost posljedica najvećim dijelom imunosupresivne terapije i infekcija (15).

U retrospektivnoj analizi 6000 transplantiranih bolesnika medijan postavljanja dijagnoze MDS iznosio je 6 mjeseci do 10 godina nakon transplantacije uz sedmerostruki porast incidencije MDS u toj skupini bolesnika u odnosu na opću populaciju (15,16).

Autologna transplantacija perifernih matičnih stanica (eng. *autogenic stem cell transplantation* (AutoSCT)) odavna je prepoznata kao značajan rizični čimbenik za t-MDS, osobito kad se čini u muškaraca starijih od 45 godina života te kad se provodi liječenje s više od tri linije kemoterapije (17).

Azatioprin se dovodi u vezu s patogenetskim zbivanjima u MDS/AML s obzirom da može utjecati na kromosomsku nestabilnost. Njegov metabolit 6-merkaptopurin interferira s popravkom DNA nakon što ju drugi lijekovi ili postupci oštete. Izloženost azatioprinu dovodi do sedam puta većeg rizika za razvoj mijeloidnih neoplazmi (15,18).



### 1.3. Patogeneza MDS

Patogeneza MDS do danas nije potpuno razjašnjena, jer se radi o poremećajima koji utječu na promjenu hematopoetske progenitorske stanice što rezultira displazijom i neučinkovitom hematopoezom. Kako postoje i drugi poremećaji koji se očituju citopenijama i/ili displazijama, važno ih je razlikovati od MDS (19).

Heterogenost ovih poremećaja uočava se po njihovim kliničkim, laboratorijskim i morfološkim značajkama (19,20).

Ponekad se pojedini poremećaji preklapaju (npr. mijelodisplastični/mijeloproliferativni poremećaji), a preciznijoj dijagnostici tada pomaže procjena celularnosti koštane srži (hipocelularna, normocelularna, hipercelularna) i etiologija poremećaja matične stanice (primarni poremećaj u odnosu na klonalnu evoluciju kao posljedica direktnog utjecaja citostatika, epigenetskih promjena i sl.) (20).

MDS je jedan od najvećih izazova u dijagnostičkom smislu, jer je definiran po nekoliko različitih karakteristika (citopenija, displazije, klonalna hematopoeza), ali nijedna od tih karakteristika nije specifična za MDS.

Klasifikacije MDS oslanjaju se na citomorfološke karakteristike neoplastičnih stanica koštane srži ili periferne krvi. Kako je MDS molekularno i funkcionalno heterogen poremećaj, prognoza MDS razlikuje se ovisno o somatskim mutacijama, kariotipu, promjenama zahvaćenog klona, dobi i komorbiditetima bolesnika (21).

Mnoge mutacije koje su opisane kod MDS bolesnika, mogu se naći i kod zdravih pojedinaca. Neki od njih mogu u laboratorijskim nalazima imati i citopenije, ali i dalje ne ispunjavati sve dijagnostičke kriterije za MDS.

U mnogim slučajevima krvni brojevi ostaju stabilni godinama, i ne razvija se MDS ili koji neki drugi klonalni hematološki poremećaj. U zadnjih nekoliko godina, definirano je nekoliko različitih pre-MDS stanja, takozvanih indolentnih mijeloidnih hematopoetskih poremećaja (23).

Indolentni mijeloidni hematopoetski poremećaji mogu se podijeliti u 4 grupe: idiopatska citopenija neodređenog značenja (eng. *idiopathic cytopenia of undetermined significance* (ICUS)), idiopatska displazija neodređenog značenja (eng. *idiopathic dysplasia of undetermined significance* (IDUS)), klonalna hematopoeza neodređenog potencijala (eng. *clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (CHIP)) i klonalna

citopenija neodređenog značenja (eng. *clonal cytopenia of undetermined significance* (CCUS)) (23,24).

ICUS je karakterizirana perzistentnom citopenijom bez značajne displazije i specifične citogenetičke ili genetičke promjene povezane s MDS. Za postavljanje dijagnoze ICUS citopenija treba biti prisutna duže od 4 mjeseca. ICUS se ovisno o nalazima može podijeliti u ICUS s anemijom (ICUS-A), ICUS s neutropenijom (ICUS-N), ICUS s trombocitopenijom (ICUS-T) te ICUS s bi/pancitopenijom (ICUS-PAN) (23-25).

ICUS-N se diferencijalno dijagnostički može naći i u lijekovima induciranoj neutropeniji, autoimunim poremećajima, kroničnom hepatitisu i cikličkoj neutropeniji. ICUS-T treba razlikovati od imunotrombocitopenije (ITP) u kojoj je karakterističan brži pad broja trombocita u odnosu na ICUS-T u kojem broj trombocita ostaje stabilan. S obzirom na nepredvidiv klinički tijek ICUS dio bolesnika može razviti MDS, AML, neki od limfoproliferativnih poremećaja ili mastocitozu.

IDUS karakterizira displazija u razmazu periferne krvi (Pseudo Pelger, hipogranulirani neutrofili, makrocitoza) i koštanoj srži. Citopenija najčešće nije prisutna (ili je minimalna), a ključno je da u tih bolesnika nema somatskih mutacija ili klonalnih kariotipskih promjena.

CHIP je poremećaj u kojem postoje somatske mutacije određenih gena, ali nema ostalih dijagnostičkih kriterija za hematološki maligni poremećaj.

CCUS opisuje klinički značajnu neobjašnjivu citopeniju uz prisutnost klonalnih mutacija, koje ne zadovoljavaju kriterije za ostale hematološke neoplazme. U tih bolesnika nalazi se displazija (manje od 10%), ali se promjene specifične za MDS ne mogu dokazati citogenetikom, histologijom ni protočnom citometrijom (tablica 1) (23,24,25,26).

Tablica 1. Indolentni mijeloidni hematopoetski poremećaji

	ICUS	IDUS	CHIP	CCUS
Somatske mutacije	-	-	+/-	+/-
Klonalne kariotipske abnormalnosti	-	-	+/-	+/-
Displazija u koštanoj srži	-	+	-	-
Citopenija	+	-	-	+

*ICUS = idiopatska citopenija neodređenog značenja; IDUS = idiopatska displazija neodređenog značenja; CHIP = klonalna hematopoeza neodređenog potencijala; CCUS = klonalna citopenija neodređenog značenja*

U bolesnika s nekim od gore navedenih poremećaja, preporuka je kontrolirati periferne krvne brojeve svakih 6 mjeseci, po potrebi i češće (ovisno o odluci nadležnog hematologa) (25,26).

Učestalost MDS je u porastu kod starijih od 70 godina. I MDS i starenje su multifaktorijalni procesi i kod oba postoji stanična intrinzična i ekstrinzična aktivnost koja pridonosi razvijanju oba procesa. Brojna istraživanja koja proučavaju mehanističke principe starenja hematopoetskih matičnih stanica pokušavaju otkriti čimbenike potrebne za klonalnu selekciju u kontekstu stečenih somatskih mutacija i omogućiti napredak u dijagnostici i liječenju MDS (27,28).

Genetički poremećaji (kromosomske aberacije, mutacije gena, abnormalna genska ekspresija) česti su u MDS. Iako su klonalne citogenetičke promjene prisutne kod dijagnoze MDS, pojedine klonalne promjene mogu se pojaviti i nakon dijagnoze, a povezane su s pogoršanjem kliničkog stanja bolesnika (27).

Unatoč brojnim istraživanjima još nije posve jasno koja je tzv. „stanica porijekla“ u MDS i AML. Rani stadij MDS karakterizira pojačana apoptoza i fagocitoza te smanjena diferencijacija zahvaćenih stanica, što za posljedicu ima perifernu citopeniju iako je koštana srž hipercelularna. Nije razjašnjen ni mehanizam pojačane apoptoze koji se dijelom objašnjava imunološkom reakcijom usmjerenom prema MDS/AML povezanim antigenima ili MDS/AML specifičnim neoantigenima izraženim na malignim klonovima. No, apoptoza može predstavljati i integralni dio patofiziologije MDS (28).

U progresiji MDS smanjuje se apoptotička aktivnost, a oštećeni su i mehanizmi fagocitoze. Brojne stečene somatske mutacije tijekom progresije MDS i MDS u AML, imaju za posljedicu smanjenu diferencijaciju i povećan proliferacijski potencijal klonalnih stanica u kasnijoj fazi bolesti. Postupno dolazi do ekspanzije malignog klona (displastičnog, leukemijskog) i nadvladavanja imunološke kontrole. Uočavaju se strukturne, epigenetičke, kvantitativne i funkcionalne promjene komponenti strome koštane srži kod bolesnika s MDS i AML. Rane promjene mezenhimalne matične progenitorne stanice uključuju brojne intrinzične funkcionalne aberacije sa smanjenim rastom, sniženim proliferacijskim i diferencijacijskim potencijalom uz oštećen kapacitet

za normalnu hematopoezu. Tijekom progresije bolesti mezenhimalna matična progenitorna MDS stanica posjeduje proliferacijski i diferencijacijski potencijal te njihov udio u koštanoj srži u agresivnijoj slici bolesti raste (29,30).

U patogenezi MDS važnu ulogu ima i niša matičnih stanica koštane srži te mikrookoliš koji posreduje u interakciji malignih stanica i zdrave hematopoetske matične stanice. Prekomjerna proizvodnja upalnih citokina (najčešće tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF $\alpha$ ) i interleukin (IL) 6) je zajednička karakteristika mnogih hematoloških poremećaja. Neki su citokini (IL-4, IL-10, IL-13) viši kod bolesnika s mijeloidnim poremećajima te se pretpostavlja kako je kronična stimulacija imunološkog sustava mogući okidač za razvoj hematoloških poremećaja poput MDS i AML (28,29).

Poznato je da je učestalost MDS viša kod bolesnika s pernicioznom anemijom, reumatoidnim artritismom i Behçetovom bolesti (31).

Spoznaje o staničnom sastavu normalne, displastične ili leukemijske niše kao i brojne složene stanične interakcije u nadolazećim će godinama postati sve zanimljivije, a možda i otkriti odgovor terapijskom pristupu MDS.

#### 1.4. Klinička slika i dijagnostički postupak kod bolesnika s MDS

Znakovi i simptomi kod bolesnika s MDS najčešće su nespecifični u trenutku dijagnoze, a nalazi krvne slike mogu upućivati na anemiju, neutropeniju ili trombocitopeniju.

Postojanje najmanje jedne citopenije neophodno je za dijagnozu MDS, uz uvjet da je razina hemoglobina  $<100$  g/dL, trombocita  $<100 \times 10^9/L$ , apsolutni broj neutrofilnih granulocita  $<1.8 \times 10^9/L$ . Monociti u perifernoj krvi moraju biti niži od  $1 \times 10^9/L$ .

Za postavljenje dijagnoze MDS citopenija treba biti prisutna 6 mjeseci ili dulje, ako nije dokazana i specifična kromosomska abnormalnost ili bilinijska displazija. U slučaju da su specifična kromosomska abnormalnost ili bilinijska displazija dokazane, za postavljanje dijagnoze MDS dovoljno je 2 mjeseca praćenja citopenije (24,25,32).

Dijagnostički postupak treba započeti neinvazivnim postupcima radi isključivanja drugih uzroka citopenije, u prvom redu detaljnom anamnezom s kliničkim pregledom te određivanja krvne slike, osnovnih biokemijskih pretraga i citološke analize perifernog krvnog razmaza.

Kod sumnje na MDS, anamneza mora biti detaljna s posebnim osvrtom na prijašnje bolesti i liječenje, kao i podatke o izloženosti toksičnim tvarima i ionizirajućem zračenju. U najvećem broju slučajeva, MDS je stečeni poremećaj povezan sa starenjem, dok je kod manjeg broja bolesnika povezan s izloženosti okolišnim čimbenicima (kemikalije, benzen, radioaktivne tvari, pušenje, citostatska i imunosupresivna terapija), ili naslijeđenim genetskim abnormalnostima (trisomija 21, Fanconijeva anemija, ataxia teleangiectazija).

Upravo zbog izrazito heterogene kliničke prezentacije, diferencijalna dijagnoza MDS može biti lijekovima inducirana citopenija, manjak vitamina B12, folne kiseline, cinka ili bakra, uzimanje većih količina alkohola kroz duže vrijeme, izloženost teškim metalima (olovo, arsen), infekcije (virus humane imunodeficijencije (HIV), Epstein-Barrov virus (EBV), virus hepatitisa C (HCV), parvovirus, lišmanioza), hemofagocitna limfocitocitoza, anemija kronične bolesti, autoimuna citopenija te metabolički poremećaji zbog kronične bolesti jetre ili bubrega.

Klinički pregled bolesnika također mora biti detaljan i treba obuhvatiti sve organske sustave (32,33). Kod svih bolesnika nužno je napraviti rendgenogram srca i pluća, elektrokardiogram (EKG) i ultrazvuk abdomena.

Komorbidity poput kroničnog srčanog popuštanja i kronične opstruktivne bolesti pluća, su značajni i nezavisni čimbenici preživljenja bolesnika s MDS, jer obje bolesti mogu biti u značajnom pogoršanju zbog anemije i infekcija. S druge strane, komorbidity poput šećerne bolesti i cerebrovaskularnih poremećaja ne utječu na preživljenje bolesnika s MDS (34).

Od laboratorijskih pretraga uz krvnu sliku potrebno je odrediti broj retikulocita, jetrene i bubrežne funkcionalne testove, razinu serumskog željeza, zasićenost transferina i feritin, razinu beta2-mikroglobulina u serumu te koncentraciju eritropoetina, vitamina B12 i folne kiseline u serumu (tablica 2).

Tablica 2. Dijagnostička obrada citopenije pri sumnji na mijelodisplaziju

Obavezna početna obrada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kompletna krvna slika, retikulociti/</li> <li>- biokemijske pretrage (AST, ALT, GGT, LDH, GUK, bilirubin, kreatinin, željezo, UIBC, TIBC, feritin, beta-2-mikroglobulin, elektroforeza serumskih bjelančevina)</li> <li>- koncentracija eritropoetina, koncentracija vitamina B12 i folne kiseline</li> <li>- citološki leukogram, citološka analiza aspirata koštane srži, biopsija koštane srži, kariogram, fluorescentna in situ hibridizacija</li> <li>- elektrokardiogram, ehokardiografija, rentgen srca i pluća, ultrazvuk abdomena</li> </ul>
Proširena obrada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- protočna citometrija punktata koštane srži</li> <li>- protočna citometrija periferne krvi na CD55 i CD59, hemosiderin u urinu</li> <li>- Coombsov test, elektroforeza hemoglobina</li> <li>- hormoni štitnjače</li> </ul>

*AST = aspartat-aminotransferaza; ALT = alanin-aminotransferaza; GGT = gama-glutamiltransferaza; LDH = laktat-dehidrogenaza; GUK = glukoza u krvi; UIBC = nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC = ukupni kapacitet vezanja željeza.*

Dijagnostički će se postupak, ovisno o tim nalazima te kliničkoj sumnji na mogući drugi uzrok citopenije, nadopuniti Coombsovim testom, elektroforezom

hemoglobina, određivanjem hormona štitnjače. Kod dijela bolesnika potrebno je isključiti paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju (PNH) određivanjem hemosiderina u prvome jutarnjem urinu i zastupljenosti CD55 i CD59 na granulocitima i eritrocitima periferne krvi. Dijagnostiku PNH potrebno je napraviti i kod bolesnika s hipoplastičnim MDS, kao i kod onih s aplastičnom anemijom, jer je poznato preklapanje ovih triju entiteta (32,33).

Kod bolesnika s MDS anemija je najčešći nalaz u trenutku postavljanja dijagnoze. Takvi bolesnici se često žale na izražen umor (ponekad i intenzivniji nego što je očekivan s obzirom na stupanj anemije), slabost, intoleranciju napora, vrtoglavicu i slabljenje kognitivnih funkcija. U laboratorijskom nalazu uočava se snižen postotak retikulocita, povišen ili uredan prosječni volumen eritrocita (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)), povišena širina distribucije volumena crvenih krvnih stanica (eng. *red cell distribution width* (RDW)), tj. anizocitoza, uredna prosječna koncentracija hemoglobina u eritocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)).

Kod bolesnika s neutropenijom, koja je najčešće apsolutna, mogu se uočiti cirkulirajući neutrofilni granulociti (mijelociti, promijelociti i mijeloblasti), ali postotak blasta ne prelazi 20% diferencijalnih leukocita.

Infektivne komplikacije kod bolesnika s MDS nastaju zbog neutropenije, ali i disfunkcije granulocita (oštećena kemotaksija i aktivnost prema mikrobiološkim uzročnicima). Limfopenija sa smanjenim brojem CD4+ stanica je obrnuto proporcionalna broju transfuzija krvnih derivata, dok su CD8+ T-limfociti u referentnim vrijednostima ili blago povišeni. Hipogamaglobulinemija, poliklonalna hipergamaglobulinemija i monoklonalna gamapatija u tih bolesnika također pridonose povećanom riziku za infekcije.

Trombocitopenija se može naći kod oko 25% bolesnika i nezavisan je čimbenik rizika za preživljenje radi čega je i uvrštena u novije prognostičke indekse. Izolirana trombocitopenija, za razliku od anemije, je vrlo rijetka u MDS (izuzetak je MDS s delecijom 20q). Mehanizmi nastanka trombocitopenije su višestruki i uključuju poremećaj u diferenciranju megakariocitnih progenitornih stanica, što dovodi do displastičnih, hipolobuliranih megakariocita s višim stupnjem apoptoze. Disregulacija u signalnom putu trombopoetina i povećano uništavanje trombocita preko imunoloških i neimunoloških mehanizama, česti su poremećaji u MDS.

Trombocitoza se može naći kod 5q-sindroma i MDS s prstenastim sideroblastima (32,33).

Dobro je poznata pozitivna povezanost MDS s autoimunim poremećajima. Aktivacija urođene imunosti, proupalnog stanja i deregulacije imunološkog sustava u procesu kronične upale, dovode se u vezu s većom učestalosti MDS.

MDS bolesnici s autoimunim bolestima imaju bolje ukupno preživljenje i manji rizik za leukemijsku transformaciju. Najčešći autoimuni poremećaji kod MDS bolesnika su reumatoidni artritis, perniciozna anemija, psorijaza, polimijalgija reumatika, Sweet sindrom (akutna febrilna neutrofilna dermatiza) i kožni vaskulitisi (35).

Loš nutritivni status, manjak vitamina B12, folata, bakra i povišena razina cinka rezultiraju s makrocitozom, sniženim postotkom retikulocita i pancitopenijom. Stoga je važno provjeriti nutritivni status kod starijih bolesnika s makrocitnom anemijom.



## 1.5. Klasifikacije MDS

Godine 1976. francusko-američko-britanska (FAB) grupa za klasifikaciju hematoloških poremećaja načinila je morfološku klasifikaciju akutnih leukemija. Podijelili su ih na najčešće tipove akutnih leukemija i one poremećaje kod osoba starijih od 50 godina, a koji nisu zahtijevali rano liječenje i često su bili bez značajnijih simptoma.

Bennet i suradnici su takve poremećaje svrstali u dismijelopoetske ili MDS, uz izdvajanje refraktorne anemije s viškom blasta (RAEB) i kronične mijelomonocitne leukemije (KMML) (36). Predloženo je da se u MDS svrsta onaj poremećaj kod kojeg zbroj blasta i promijelocita ne prelazi 30%. Ukoliko zbroj prelazi više od 30%, odnosno 50% nukleiranih stanica, radilo bi se o akutnoj leukemiji.

FAB grupa se na sastanku u Parizu 1980. godine dogovorila kako će učiniti temeljitu analizu 50 bolesnika s MDS i morfoloških karakteristika u njihovoj koštanoj srži i na osnovi tih rezultata definirati podtipove MDS. Dvije godine kasnije FAB grupa objavila je prvi klasifikacijski sustav koji je uključio MDS te je definirano pet kategorija MDS: refraktorna anemija s viškom blasta tip 1 (RAEB-1), refraktorna anemija s viškom blasta tip 2 (RAEB-2), refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (eng. *refractory anemia with ring sideroblasts* (RARS)), refraktorna anemija (RA) i KMML (27,36).

FAB sustav je prvi put revidiran 2001. godine od strane WHO (37,38). WHO klasifikacija MDS temeljila se tada na prisutnosti citopenija (anemija, neutropenija, trombocitopenija), displastičnih promjena na krvotvornim stanicama, udjelu patoloških prstenastih sideroblasta (ring sideroblasti), postotku blasta u perifernoj krvi i aspiratu koštane srži te prisutnosti/odsutnosti karakterističnih citogenetskih abnormalnosti.

Tih 5 kategorija MDS dodatno je bilo revidirano 2008. godine, a potom i 2016. godine zbog značajnog rasta broja informacija i novih saznanja o genetici MDS. Klasifikacija iz 2008. godine temeljila se na stupnju displazije, postotku blasta i specifičnom tipu citopenije. Pokazalo se da displazije pojedinih hematopoetskih loza morfološki nisu odgovarale specifičnim citopenijama pa je posljednja WHO klasifikacija iz 2016. godine napravila podjelu na jednolinijske ili multilinijske displazije, prstenaste sideroblaste, suvišak blasta, citogenetičku abnormalnost deleciju 5q i neklasificiran MDS (36,37).

Kao poseban podtip izdvaja se i refraktorna anemija s kromosomskom abnormalnosti delecija 5q (MDS-del(5q)) koju osim specifične citogenetske abnormalnosti prati povećan broj trombocita uz anemiju i manje od 1% blasta u perifernoj krvi (27, 32, 37). Bitno je napomenuti da kad se analizira postotak mijeloblasta za postavljanje dijagnoze MDS, uzimaju se u obzir sve nukleirane stanice koštane srži (37, 38).

## 1.6. Prognostički čimbenici u MDS

Prognostički čimbenici u MDS ovise o tome jesu li vezani uz bolesnika ili aktivnost bolesti. Čimbenici koje treba uzeti u obzir, a vezani su uz bolesnike uključuju njihovu dob, komorbiditete i opće stanje bolesnika.

Prognostički čimbenici vezani uz MDS, uključuju morfološke i laboratorijske čimbenike kao što je primjerice postotak blasta, koji se mnogo puta mogu i preklapati u koštanoj srži i u perifernoj krvi.

Unazad nekoliko godina je postavljeno nekoliko različitih prognostičkih indeksa, koji su definirani po citogenetskim čimbenicima, postotku blasta u koštanoj srži, citopenijama i ovisnosti o transfuziji (39,40).

Prognoza MDS nije procjena u jednoj vremenskoj točki (npr. kod postavljanja dijagnoze), nego je dinamičan proces. Stoga bi i prognostički indeksi trebali biti definirani po dinamičnim čimbenicima i primijeniti se u različitim fazama bolesti.

Tablica 3. Internacionalni prognostički sustav bodovanja (eng. *international prognostic scoring system (IPSS)*).

Prognostički čimbenik	Bodovi				
	0	0,5	1	1,5	2
Kariotip*	dobar	intermedijarni	loš	-	-
Blasti†	<5	5-10	-	11-20	21-30
Citopenije (N)‡	0-1	2-3	-	-	-

Stratifikacija rizika prema bodovima: 0 – niski rizik; 0,5-1 – intermedijarni rizik 1; 1,5-2 – intermedijarni rizik 2;  $\geq 2,5$  – visoki rizik;

\* kariotip: dobar – normalan kariotip; -Y; delecija 5q; delecija 20q; loš – kompleksan kariotip ( $\geq 3$  abnormalnosti); abnormalnost kromosoma 7; intermedijarni – kariotip ima sve ostale abnormalnosti;

† postotak blasta u koštanoj srži;

‡ citopenije: hemoglobin  $< 100$  g/L; broj neutrofila  $< 1800/\mu\text{L}$ ; broj trombocita:  $< 100 \times 10^9/\text{L}$ .

Kako su Internacionalni prognostički sustav bodovanja (eng. *international prognostic scoring system* (IPSS)) (tablica 3), Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja (eng. *revised international prognostic scoring system* (IPSS-R)) (tablica 4) i Prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World health organization (WHO) classification based prognostic scoring system* (WPSS)) (tablica 5) razvijeni za novodijagnosticirane bolesnike, razvijen je dodatno i prognostički model Centra za rak MD Anderson Sveučilišta u Teksasu u Sjedinjenim Američkim Državama kojim se procjenjuje prognoza MDS u bilo kojoj fazi bolesti uzimajući u obzir dob, stanje bolesnika, broj leukocita, trombocita, razinu hemoglobina, postotak blasta u koštanoj srži, kromosomske abnormalnosti, ranije transfuzije (40,41,42). No, taj zadnji prognostički model nije ušao u rutinsku primjenu i nije korišten u ovom istraživanju.

Prognostičku važnost u MDS pokazali su čimbenici vezani morfoloiju koštane srži (procjena celularnosti- hipocelularan uzorak u odnosu na fibrozu), povišena laktat dehidrogenaza (LDH) i b2 mikroglobulin, serumski albumin, dob, spol te brojne somatske mutacije (43,44,45,47).

Tablica 4. Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja (eng. *revised international prognostic scoring system* (IPSS-R)).

Prognostički čimbenik	Bodovi						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Kariotip*	vrlo dobar	-	dobar	-	intermedijarni	loš	vrlo loš
Blasti†	≤2	-	>2 i <5	-	5-10	>10	-
Hemoglobin‡	>100	-	80-100	-	<80	-	-
Trombociti§	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrofilili	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

Stratifikacija rizika prema bodovima: 0-1,5 – vrlo niski rizik; 2-3 – niski rizik; 3,5-4,5 – intermedijarni rizik; 5-6 – visoki rizik; >6 – vrlo visoki rizik;

\* kariotip: vrlo dobar – -Y; delecija 11q; dobar – normalan kariotip, delecija 5q, delecija 12p, delecija 20q; intermedijarni – delecija 7q, +8, +19, i 17q, ili bilo koji pojedinačni ili dvostruki nezavisni klon; loš – -7, inverzija 3 / translokacija 3q / delecija 3q uključujući deleciju 7q; kompleksan – 3 abnormalnosti kariotipa; vrlo loš – kompleksan kariotip, >3 abnormalnosti;

† postotak blasta u koštanoj srži;

‡ koncentracija hemoglobina (g/L);

§ broj trombocita ( $\times 10^9/L$ );

|| apsolutni broj neutrofila.

Somatske mutacije su neovisni prognostički čimbenici u MDS. Danas se učinak somatske mutacije na ukupno preživljenje ili progresiju bolesti, uglavnom procjenjuje samo na osnovu prisutnosti/odsutnosti mutacije. Jednako tako od iznimne važnosti je pokušati definirati i karakteristike mutacije (učestalost, varijantu alela), smještaj mutacije na genu, jer nije isti rezultat na funkciju proteina kao genskog produkta, ukoliko se mutacija nalazi na samom početku gena, u odnosu ako se nalazi u funkcionalnoj domeni gena (46,47).

Tablica 5. Prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World health organization (WHO) classification based prognostic scoring system (WPSS)*).

Prognostički čimbenik	Bodovi			
	0	1	2	3
WHO*	RCUD/RARS/5q-	RCMD	RAEB-1	RAEB-2
Kariogram†	dobar	intermedijarni	loš	-
Transfuzija‡	neovisan	redovite transfuzije	-	-

Stratifikacija rizika prema bodovima: 0- vrlo niski; 1 – niski; 2 – intermedijarni; 3-4 – visoki; 5-6 – vrlo visoki;

\* tip prema klasifikaciji WHO; RCUD = refraktorna citopenija s jednolinijskom displazijom; RARS = refraktorna anemija s prstenastim sideroplastima; RCMD = refraktorna citopenija s multilinijskom displazijom; RAEB-1 = refraktorna anemija s viškom blasta tip 1 (2-4% blasta u perifernoj krvi); RAEB-2 = refraktorna anemija s viškom blasta tip 2 (5-19% blasta u perifernoj krvi);

† kariotip: dobar – normalan kariotip, delecija 5q, delecija 20q, -Y; loš kariotip – kompleksni kariotip (≥3 anomalije), anomalije kromosoma 7; intermedijarni kariotip – sve ostale aberacije;

‡ ovisnost o transfuziji barem jedna transfuzija svakih osam tjedana tijekom tri mjeseca.

Mutacija TP53 gena povezana je s lošijom prognozom. No, prognoza ovisi i o tome da li je varijanta frekvencije gena manja od 25%, što ima bolju prognozu, u odnosu na varijantu frekvencije višu od 50%, što nosi lošiju prognozu (46,47).

Važno je stoga uzeti u obzir i karakteristike mutacije, kako bi se potpuno iskoristio njen prognostički profil.

## 1.7. Terapijski pristup u MDS

Liječenje MDS ovisi o stupnju rizika, pa se tako značajno razlikuje liječenje MDS niskog u odnosu na MDS visokog rizik. MDS panel hematologa je predložio stratifikaciju bolesnika s klinički značajnom citopenijom u dvije grupe (40):

- 1) Bolesnike s nižim rizikom (IPSS: niski i intermedijarni rizik 1; IPSS-R: vrlo niski, niski, intermedijarni rizik; WPSS vrlo niski, niski, intermedijarni rizik)
- 2) Bolesnike s visokim rizikom (IPSS: intermedijarni rizik 2 i visoki rizik; IPSS-R: visoki, vrlo visoki rizik; WPSS: visoki, vrlo visoki rizik).

### 1.7.1. Liječenje MDS bolesnika niskog rizika

Bolesnici koji imaju MDS niskog rizika i koji nisu ovisni o transfuzijama krvi mogu biti samo klinički praćeni. Nekoliko je retrospektivnih studija do danas pokazalo kako se očekivano preživljenje kod bolesnika s niskim MDS rizikom (npr. RA i izolirana delecija 5q, stariji od 70 godina), bitno ne razlikuje od opće populacije.

Kad se kod bolesnika razvije ovisnost o transfuzijama, potrebno je učiniti reevaluaciju stanja bolesti i dogovoriti terapijski pristup. Kako je ranije navedeno, procjena prognoze kod MDS bolesnika zahtijeva dinamičan pristup. Stoga je i kod niskorizičnog MDS moguće definirati čimbenike koji bi ih svrstavali u „agresivniji“ niskorizični MDS, a najčešće se pritom misli na otkrivanje somatskih mutacija (27,40).

Danas analiza somatskih mutacija još ne predstavlja „zlatni standard“, ali je točno „predviđanje“ tijeka bolesti pojedinog bolesnika ključan klinički interes.

Pojedine mutacije koje uključuju epigenetski modificirajuće gene (DNMT3A, TET2, ASXL1, EZH2) ili dijelove RNA spliceosoma (SF3B1, SRSF2, U2AF1) mogu se uočiti u ranim fazama MDS, rjeđe u transformaciji prema AML.

Za razliku od njih, mutacije u signalnim putevima čimbenika rasta (NRAS, KRAS, PTPN11, FLT3) se rijetko nađu u ranijim fazama bolesti i često su stečene te se umnožavaju u sub-klonovima tijekom progresije u visokorizični MDS ili AML (27,40, 48, 49).

Kod niskorizičnog MDS, terapijski pristup je uglavnom potporno liječenje transfuzijama, a cilj liječenja je poboljšanje kvalitete života.

Anemija je najčešći nalaz u tih bolesnika i oni se često žale na izražen umor (ponekad i intenzivniji nego što je očekivan s obzirom na stupanj anemije), slabost,

intoleranciju napora, vrtoglavicu i slabljenje kognitivnih funkcija. U laboratorijskom nalazu uočava se snižen postotak retikulocita, povišen ili uredan MCV, povišen RDW (anizocitoza), uredan MCHC (32,50,51).

Lijekovi za stimuliranje eritropoeze (eng. *erythropoiesis stimulating agents* (ESA)) mogu smanjiti ili minimizirati potrebu za transfuzijama kod bolesnika s niskim ili umjereno rizičnim oblicima MDS.

Studije su pokazale kako se u MDS niskog rizika može postići eritroidni odgovor u 40 do 60% bolesnika. Eritropoetin potiče eritropoezu sprečavanjem apoptoze eritroidnih progenitora, a najbolji odgovor se može očekivati kod bolesnika s razinom serumskog eritropoetina  $\leq 500$  mU/ml, a koji su ovisni o transfuzijama eritrocita i zahtijevaju manje od 2 jedinice koncentrata eritrocita (KE) mjesečno. Preporuke za primjenu početne doze eritropoetina (EPO) alfa ili beta kreću se u širokom rasponu dozi od 30-80 000 IU s.c. tjedno ili darbepoetina alfa 150-300  $\mu$ g tjedno, odnosno 300-500  $\mu$ g svaka dva tjedna (32,53).

Ukoliko na uvodnu terapiju ESA nije došlo do odgovora nakon 8 tjedana, potrebno je povisiti dozu ESA ili dodati čimbenik rasta granulocita (eng. *granulocyte-colony stimulating factor* (GCSF)).

Odgovor na terapiju ESA i GCSF značajno je veći od odgovora na povišenje doze ESA te se on može očekivati u 50% bolesnika koji nisu reagirali na ESA. Kod MDS bolesnika s delecijom 5q kraći je, ali i slabiji odgovor na liječenje s ESA, pa je delecija 5q značajan prediktor kraćeg terapijskog učinka ESA.

S obzirom da su raniji rezultati analize primjene ESA kod ne-MDS bolesnika s komorbiditetima (primjerice kronična bubrežna bolest) pokazali povišene rizike za tromboembolijski događaj ili višu smrtnost, preporuka MDS panela je da se kod primjene ESA održava maksimalna razina hemoglobina 100-120 g/L, a izbjegavati primjenu ukoliko dolazi do porasta hemoglobina iznad 120 g/L.

Dugotrajno liječenje transfuzijama eritrocita dovodi do opterećenja željezom, a posljedično tome i do oštećenja ciljnih organa. Zato se kod svih bolesnika koji redovito primaju transfuzije eritrocita preporuča činiti kontrolu razine željeza i feritina u serumu te zasićenja transferina svaka tri mjeseca. Kako su retrospektivne studije pokazale da preopterećenje željezom pridonosi povećanom mortalitetu i morbiditetu u ranom MDS (IPSS niski i intermedijarni rizik 1), savjetuje se liječenje nekim od kelatora željeza (deferasiroks, deferoxamin) radi održavanja razine serumskog feritina ispod 1000 ng/ml (32).



Kako i kelatori željeza mogu izazivati nuspojave (poremećaji krvnih brojeva, poremećaji testova funkcije bubrega i jetre), savjetuje se pažljivo praćenje bolesnika tijekom terapije (52,53).

Transfuzije trombocita su neophodne ukoliko kod bolesnika postoje znakovi krvarenja, ili je povećan rizik od krvarenja. Brojni su radovi pokazali da incidencija krvarenja nije značajnije povećana ukoliko je broj trombocita iznad  $20 \times 10^9/L$ . No, pritom u obzir treba uzeti i komorbiditete tih bolesnika, jer uzimanje nekih lijekova (antikoagulantna terapija, acetilsalicilna kiselina) mogu povećavati rizik za krvarenje (32,54).

Agonisti trombopoetina (TPO), romiplostin i eltrombopag, dokazali su svoju učinkovitost u liječenju bolesnika s MDS. No, uočeno je pri primjeni tih lijekova i povećanje broja blasta te su zbog opasnosti od povećanja rizika od transformacije u AML potrebna daljnja istraživanja, koja će odrediti sigurnost liječenja TPO agonistima.

Iz navedenih razloga, ovog trenutka ne može se preporučiti rutinska primjena niti jednog od agonista TPO receptora u liječenju trombocitopenije kod bolesnika s MDS, a daljnja istraživanja trebaju odrediti mjesto ove skupine lijekova u liječenju MDS (32,51-54).

### **1.7.2. Liječenje MDS bolesnika visokog rizika**

Hipometilirajući lijekovi (eng. hypomethylating agents (HMA)), kao što su primjerice 5-azacitidin i decitabin, su standard u liječenju MDS bolesnika s visokim rizikom, ukoliko bolesnik nije kandidat za liječenje intenzivnom kemoterapijom, za liječenje alotransplantacijom kad se hipometilirajući lijekovi mogu dati kao „premoštenje“ u fazi čekanja na alotransplantaciju; te ukoliko se ne očekuje da će bolesnik odgovoriti na ESA ili imunosupresivnu terapiju (21,32,33).

Rezultati brojnih retrospektivnih studija pokazali su odgovor na terapiju hipometilirajućim lijekovima kod više od 50% bolesnika uz postizanje medijana preživljenja od 24,4 mjeseca u odnosu na medijan od 15 mjeseci kod drugih oblika liječenja te kasniju progresiju u AML i značajno smanjenje ovisnosti o transfuzijama.

Ukoliko kod bolesnika postoji odgovor na 5-azacitidin, hematološki odgovor se može uočiti nakon najmanje 2 do 4 ciklusa, a morfološki odgovor (uz analizu koštane srži) procjenjuje se nakon 6 ciklusa terapije.

Ukoliko se postigne zadovoljavajući odgovor na 5-azacitidin (češće se koristi od decitabina koji se smatra terapijom nižeg intenziteta), bolesnici nastavljaju s liječenjem do minimalno 12 ciklusa, a često i duže, ukoliko se zadržava terapijski odgovor, ne uočava se progresija bolesti i nema klinički značajne toksičnosti.

Bolesnici koji nisu odgovorili na HMA, ili su izgubili raniji odgovor, imaju izuzetno lošu prognozu. Kod većine takvih bolesnika treba nastaviti samo potporno liječenje.

Transplantacija alogeničnih matičnih stanica (eng. allogeneic stem cell transplantation (AlloSCT)) je jedina metoda izlječenja bolesnika s MDS visokog rizika. Čimbenici koji utječu na ishod transplantacije su dob, komorbiditet, IPSS i IPSS-R skor rizika, nalaz citogenetske analize, ovisnost o transfuzijama eritrocita, preopterećenje željezom, protokol kondicioniranja, broj blasta u koštanoj srži, odnosno faza bolesti u kojoj se bolesnik transplantira te vrijeme od dijagnoze do transplantacije.

Kod bolesnika koji imaju manje od 5% blasta u koštanoj srži, a svrstani su u MDS visokog rizika, liječenje transplantacijom treba provesti odmah, odnosno čim ranije je to moguće. Kod bolesnika s RAEB-2, prije transplantacije treba pokušati smanjiti broj blasta na manje od 10% terapijom HMA, ili intenzivnom kemoterapijom nekim od indukcijskih protokola za AML (32,33).

### **1.7.3. Ostali oblici liječenja MDS**

Primjena antitimocitnog globulina (ATG) u kombinaciji s ciklosporinom ili bez njega pokazala se najučinkovitija kod MDS bolesnika mlađih od 60 godina, niskog rizika (manje od 5% blasta u koštanoj srži), hipocelularnom koštanom srži, prisutnim HLA-DR15 uz PNH pozitivan klon (21,32,33).

Lenalidomid je lijek iz skupine imunomodulatora koji je pokazao svoju učinkovitost (hematološki odgovor, smanjena ovisnost o transfuzijama eritrocita, citogenetski odgovor) kod oko 60% bolesnika s MDS delecijom 5q, ali uz mijelosupresivni učinak kod oko 50% bolesnika (neutropenija, trombocitopenija) (32).

## 1.8. Biologija miRNA

### 1.8.1. Sinteza miRN

RNA nosi genetičku informaciju i dijeli se na glasničku RNA (eng. *messenger* (mRNA)), ribosomalnu RNA (rRNA) te transportnu RNA (tRNA).

Uz to, postoje razredi malih, nekodirajućih molekula RNA poput male interferirajuće RNA (eng. *small interfering* (siRNA)), miRNA, piwi-vezujuće (eng. piwi interacting (piRNA)), male jezgrine RNA (eng. small nuclear (snRNA)) itd. (55-59).

MiRNA su male jednolančane RNA približne veličine 22 nukleotida kodiranih od strane različitih gena. Nalaze se u mikrovezikulama (egzosomima) koje otpuštaju tumorske stanice i u kojima cirkuliraju od jedne do druge stanice. MiRNA se ne prepisuju u proteine, već reguliraju ekspresiju drugih gena režući, ili češće, smanjujući translaciju njihove mRNA. Identifikacija specifičnih miRNA i praćenje promjena u njihovom izražaju u stanicama ili tkivima je važna u razumijevanju regulacije gena, kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima.

Ne-kodirajuće male miRNA reguliraju više od 1/3 ljudskih gena djelujući na posttranskripcijskoj razini i utječući na izražaj proteina smanjujući translaciju, ili destabilizirajući ciljanu Mrna (59,60).

Oko 50% poznatih miRNA gena je smješteno na fragilnim mjestima koja se dovode u vezu s nastankom tumora. Cirkulirajuće i stabilne miRNA mogu se naći su različitim tjelesnim tekućinama: plazmi, serumu, slini, cerebrospinalnom likvoru te majčinom mlijeku. Imaju važnu ulogu u brojnim razvojnim procesima koji uključuju metabolizam, apoptozu, stanični rast, diobu matičnih stanica, diferencijaciju miocita te morfogenezi mozga (60-62).

MiRNA se sintetiziraju u dva koraka, djelovanjem dva enzima endoribonukleaza III lokalizirana u jezgri i citoplazmi. Zrela miRNA ulazi u kompleks s proteinom Argonaut (Ago) u kompleks za utišavanje induciran molekulom miRNA (eng. *micro ribonucleotid acid induced silencing complex* (miRISC)) koji je prvi puta opisan kod roda *Drosophila* (60). Proteini Ago predstavljaju jezgru kompleksa miRISC budući da imaju egzonukleaznu aktivnost dok molekula miRNA osigurava specifičnost u odabiru ciljane mRNA.

MiRNA geni se prepisuju u jezgri i nazivaju se primarne miRNA s više od 1000 parova baza.

Enzim Drosha potom cijepa pre-miRNA u prekursore (pre-miRNA) sa 60 do 100 nukleotida. Potom se pre-miRNA prenosi u citoplazmu pomoću Exportina 5 i cijepa pomoću Dicera u miRNA duplikate s 15 do 20 nukleotida u dužini. Takvi „duplikati“ se potom cijepaju na zrele miRNA i putujuće miRNA. Ne cijepaju se svi miRNA duplikati. Neki od njih imaju funkcionalnu ulogu u reguliranju homeostaze miRNA te djeluju na transkripciju i translaciju RNA i DNA (61).

Zrela RNA inkorporirana je u RNA inducirani kompleks utišavanja te se veže na komplementarnu sekvencu u 3'UTR regiji mRNA. Mehanizam inhibicije translacije ovisi o stupnju miRNA-mRNA komplementarnosti (potpuna ili nepotpuna), a koja potom rezultira inhibicijom sinteze proteina ili degradacijom mRNA (62).

Postoje i policistronske transkripcijske jedinice u kojima se nekoliko lokusa miRNA nalazi u blizini, što upućuje na to da se više od jedne pre-miRNA može doraditi iz istog primarnog transkripta (63). Geni miRNA koji se nalaze u intronima dijele promotor s genom "domaćinom" s kojim su zajedno prepisani i potom zasebno dorađeni (64).

Regulacija ekspresije miRNA je vrlo složena s obzirom da miRNA mogu imati vlastite promotore unutar introna i imaju više mjesta početka transkripcije (65).

Cirkulirajuće miRNA počele su se proučavati i kao dijagnostički biomarkeri novije generacije. Prema nedavno objavljenom radu Lombardi i suradnika cirkulirajuće miRNA mogu se mjeriti u 12 tipova staničnih tekućina (npr. u plazmi i serumu gdje se nalaze u većim koncentracijama, punoj krvi, urinu, cerebrospinalnoj tekućini, slini itd.) i 61 vrsti tkiva (66). Validacija i utjecaj analize miRNA na svakodnevne kliničke odluke još nije do kraja razjašnjena zbog manjka analitičke i postanalitičke standardizacije. Unatoč manjkavostima standardizacije uzorka, abnormalni izražaj pojedinačne miRNA ili obitelji miRNA se opisuje u različitim bolestima poput kardiovaskularnih bolesti, kroničnih bolesti (šećerna bolest, kronična bubrežna bolest, ciroza jetre), autoimune i upalne bolesti te maligne bolesti (67).

RNA može biti prijenos genetičke informacije, ali i subjekt transkripcijske i posttranskripcijske regulacije, stoga ne iznenađuje što je RNA osjetljivija i više specifična nego proteinski biomarker. U usporedbi s DNA biomarkerima, RNA biomarkeri predstavljaju dinamički prikaz stanja unutar stanice i regulatornih procesa, postoje u puno većem broju kopija u stanici (prenose više informacija od DNA) te su stabilniji u plazmi ili serumu (66).

Cirkulirajuća miRNA se pasivno otpušta iz stanica zbog fiziološkog obnavljanja i apoptoze te se prenosi proteinima nosačima poput Ago i nukleofosmina 1 (eng. nucleophosmin (NPM)), ili se aktivno izlučuje inkapsulirana unutar mikrovezikula/egzosoma ciljajući ostale stanice ili tkiva (63-66).

Koncentracija miRNA u plazmi se mjeri kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (eng. *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR)) i varira između 1 i 308 qg/L (66,67).

Konačan rezultat koncentracije miRNA ovisi o stabilnosti miRNA u odabranom uzorku. Nekoliko je studija potvrdilo veću stabilnost miRNA u plazmi, nego u serumu, a kad se analizira plazma, ključan je izbor antikoagulansa. Plazma je tekući dio krvi i prenosi krvne stanice, ali i razne bjelančevine, čimbenike zgrušavanja krvi. Priprema se centrifugiranjem uz dodatak antikoagulansa. Serum se priprema centrifugiranjem koaguliranih uzoraka, i jednostavniji je za rad, ali se u postupku pripreme iz trombocita može otpustiti mnogo izvanstaničnih vezikula koje sadrže miRNA i tako utjecati na sastav izvanstaničnih RNA kao potencijalnih biomarkera (66,67).

Etilendiamintetraacetat (EDTA) kalijeve soli (K2 i K3) koje se mogu ukloniti iz lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* (PCR)) su se zasad pokazale kao najbolji antikoagulans u analizi cirkulirajuće miRNA (65).

Nekoliko je preanalitičkih varijabli ključno za kvantifikaciju cirkulirajuće miRNA (izbor uzorka, deplecija trombocita, vrijeme od uzimanja uzorka do skladištenja i temperatura skladištenja). Plazma siromašna trombocitima (eng. *platelet-poor plasma* (PPP)), iz K2EDTA plazme je najbolji matriks koji poboljšava optimalnu stabilnost i detekciju miRNA, neovisno o temperaturi čuvanja uzorka (66).

U zadnjih nekoliko godina objavljeni su brojni rezultati o utjecaju aberantnog izražaja miRNA u malignim poremećajima, pri čemu su se miRNA pokazali kao tumor supresorski geni ili onkogeni (69).

U pojedinim su tumorima miRNA prepoznate kao dijagnostički i prognostički čimbenici, te mogući terapijski ciljevi.

Cirkulirajuće miRNA u dosadašnjim istraživanjima pokazale su se kao pouzdani biomarkeri. Po definiciji, idealni biomarker trebao bi biti specifičan, neinvazivno lako mjerljiv, lako korišten u dijagnostici i praćenju, visoke prediktivnosti i osjetljivosti. Većina danas dostupnih biomarkera u plazmi ili serumu su niske specifičnosti i osjetljivosti, jednim dijelom i jer se uglavnom radi o proteinima koje sintetiziraju i zdrave i maligne stanice (66,67,69).

### 1.8.2. Uloga miRNA u hematopoezi

Hematopoeza je regulirana složenom mrežom molekularnih mehanizama koji reguliraju diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu. Brojne citogenetske promjene matične stanice i mutacije gena te epigenetski mehanizmi unazad nekoliko godina zauzimaju sve veću dijagnostičku i prognostičku važnost (70).

Hematopoetska matična stanica ima sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije prema pojedinoj hematopoetskoj liniji.

Tijekom fetalnog razvoja, hematopoetska matična stanica nastaje iz specijaliziranih endotelnih stanica. Takve novonastale stanice migriraju i koloniziraju fetalnu jetru te ulaze u aktivni stanični ciklus.

U odrasloj dobi, hematopoetska matična stanica lokalizirana je u koštanoj srži i pod nadzorom je brojnih mikrokolišnih čimbenika u takozvanoj hematopoetskoj niši.

U normalnom stanju, hematopoetska stanica miruje, nema aktivnog dijeljenja. Pretpostavlja se da je mirovanje matične stanice poželjno radi što manjeg akumuliranja replikacijskih grešaka DNA i posljedične leukemijske transformacije.

Ravnoteža hematopoetske matične stanice je izravno vezana uz održavanje i funkcionalnost same stanice.

Postavlja se pitanje koji čimbenici utječu na ravnotežu hematopoetske matične stanice i nalaze li se odgovori u epigenetici?

Epigenetske promjene u hematopoetskom induktivnom mikrokolišu i niši matičnih stanica uključuju DNA metilaciju, modifikaciju histona, remodeliranje kromatina i nekodirajuću RNA (70,71,72).

Nekodirajuće RNA su funkcionalne male RNA molekule koje se ne prevode u proteine. DNA koja sačinjava ljudski genom, sadrži oko bilijun parova baza, od kojih se 5 do 10% stabilno prepisuje, a geni koji kodiraju proteine se nalaze u manje od 2% ljudskog genoma. Oko 3 do 8% genoma je u nekodirajućim prijepisima, a koji uključuju i nekodirajuće RNA. Nekodirajuće RNA se dijele u dvije kategorije ovisno o njihovoj funkciji: osnovni geni i regulatorni geni. Regulatorne, nekodirajuće RNA, obuhvaćaju miRNA i cirkulirajuće RNA (cRNA) koje su uključene u transkripciju i translaciju gena.

Nekodirajuće RNA imaju manje od 200 nukleotida, i uključuju male interferirajuće RNA (siRNA prema engleskom small interfering RNA), mala nukleolarna RNA (snoRNA prema engleskom small nucleolar RNA), piwi-interacting RNA (piRNA,

nekodirajuća RNA s interakcijom prema Piwi subklasom proteina Argonauta, i sudjeluje utišavanju transpozona preko DNA metilacije), mikroRNA.

Duge nekodirajuće RNA, su endogene stanične RNA sa više od 200 nukleotida u dužini, i manje od 100 aminokiselina koje reguliraju izražaj gena i utječu na lokalizaciju proteina (59, 60, 72).

Hematološke maligne bolesti su klonalni poremećaji matičnih i progenitornih stanica koji nastaju kao posljedica genetskih i epigenetskih promjena. U njima dolazi do poremećaja u prijenosu signala i izražaja gena, poremećaja samoobnavljanja, proliferacije i diferencijacije stanica.

U karcinogenezi sudjeluje nekoliko skupina gena, od kojih su tri najveće onkogeni, tumor-supresorski geni i geni koji osiguravaju stabilnost genoma.

MiRNA imaju ulogu u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, apoptozi, hemostazi, onkogenezi i angiogenezi.

Geni koji kodiraju miRNA sačinjavaju 1 do 5% ljudskog genoma. DNA sekvence koje kodiraju miRNA su vrlo konzervirane, oko 70% njih se nalazi u intronima i egzonima ostalih gena koji kodiraju proteine i nekodirajuće RNA.

MiRNA su negativni regulatori izražaja gena, iako je njihova uloga puno šira, jer pojedina miRNA može utjecati na izražaj nekoliko gena, a geni su komplementarni prema nekoliko različitih miRNA (59,60, 73, 74).

Oko 50% opisanih miRNA su smještene unutar regija genoma koji sudjeluju u malignoj transformaciji, u fragilnim regijama, na mjestu gubitka heterozigotnosti i amplifikacijskim područjima. Promjene u izražaju miRNA u karcinogenezi mogu rezultirati i promjenama u regulaciji transkripcije.

Neki miRNA su kontrolirani transkripcijskim čimbenicima kodiranim onkogenima ili supresorskim genima, a izražaj ostalih miRNA ovisi o promjenama metilacijskog statusa promotora.

MiRNA su ključni u fiziološkim i patološkim procesima kao što je stanična diferencijacija (proces u kojem nasljedno jednake stanice strukturno i funkcionalno postaju različite), ontogeneza (pojedinačne faze razvoja ljudskog tijela), upala i angiogeneza.

Brojni su dokazi o sudjelovanju miRNA, cirkulirajuće miRNA i ostalih nekodirajućih miRNA u patogenezi većine hematoloških poremećaja (69-74).

O'Connell i suradnici su u dugoživućim hematopoetskim matičnim stanicama identificirali miR-125a, miR-125b, miR-155, miR-99a, miR-126, miR-196b, miR-130a.

Izdvojene su zbog pojačanog izražaja miR-125b, miR-126 i miR-155 koje mogu posredovati u samoobnavljanju hematopoetske matične stanice (75).

Ukoliko je nekoliko miRNA smješteno u policistronu, pojedinačna miRNA može ući u interakciju i utjecati na promjene u fenotipu.

Tricistron miR-99a/100, let-7 uz miR-125b koji se nalazi na kromosomu 11 i 21 je pojačano izražen u hematopoetskim matičnim stanicama kao i akutnoj megakarioblastičnoj leukemiji. Tricistron miR-99a/100~125b se prepisuje kao policistronska poruka preko HOXA10 gena te blokira put transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ ). Posljedično dolazi do smanjenja aktivnosti tumor supresorskog gena adenomatozne polipoze kolona 2 (APC2) te se pojačava signalni put Wnt. Tako se mijenja ravnoteža između Wnt i TGF $\beta$  signalnog puta, i smanjuje uloga TGF- $\beta$  kao tumor supresorskog proteina.

Pojačan izražaj miR-21 povezuje se sa redukcijom SMAD7 u progenitornim hematopoetskim stanicama koštane srži i pojačanom aktivnosti TGF-  $\beta$  (76).

Prvi rad koji je povezoao izražaj miRNA u malignim poremećajima, bio je upravo iz područja hematologije. Calin i suradnici su identificirali dvije miRNA (miR-15a i miR-16) koje su bile smještene u kromosomskoj regiji 13q14. Ova genomska regija je izbrisana kod većine slučajeva B-kronične limfocitne leukemije, a dvije navedene miRNA su slabijeg izražaja kod oko 70% nositelja ove delecije (77).

MiR-15 i miR-16 su tumor-supresorske miRNA, i njihov izražaj obrnuto korelira sa izražajem anti-apoptotskog proteina BCL2, pa će pojačan izražaj obje miRNA pojačati apoptozu u leukemijskim stanicama. Isto tako, delecija miR-15 i miR-16, pojačava leukemogenezu izbjegavanjem apoptoze (78).

Otkriće nekodirajućih RNA (nkRNA) otvorilo je novo područje u dijagnostici, prognozi i liječenju AML (79).

Kako je već ranije navedeno, miRNA se vežu na ciljnu glasničku mRNA i negativno reguliraju izražaj ciljnog gena na transkripcijskoj razini (prepisivanje iz DNA u RNA).

MiRNA u patogenezi AML sudjeluje na nekoliko razina (varijacije u broju kopija u ljudskom genomu, promjene u onkogenoj regiji genoma zbog translokacije dijelova genoma, epigenetske promjene, aberantno ciljanje miRNA promotorske regije promijenjenim transkripcijskim čimbenicima ili onkoproteinima te poremećajima funkcije miRNA (79,80).



U AML svaki podtip izražava različit profil miRNA, koji ih odvaja od ostalih podtipova AML (79,80).

MiR-9 je onkogena miRNA, koja je pojačano izražena u AML miješane celularnosti (miješana leukemija). Inhibicijom miR-9 može se značajno usporiti stanični rast/vijabilnost i potaknuti apoptoza (80).

MiR-10a/b je značajno povišen kod AML s translokacijom 8;21, translokacijom 9;11, NPM1 mutacijom i u podtipovima M1, M2, M3 gdje dovodi do nekontrolirane proliferacije nezrelih progenitora i poremećenog sazrijevanja krvotvornih stanica (81).

Hornick i suradnici su 2015. godine opisali set miRNA u AML egzosomima iz seruma imunodeficientnih miševa NOD/SCID IL-2 ry null, kao što je miR let-7a, miR-99b, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-191, miR-1246. Navedene miRNA mogu prema autorima poslužiti kao platforma u razvoju neinvazivnih dijagnostičkih biljega u AML, ali i kao rani pokazatelji relapsa bolesti (82).

Pojačan izražaj miR-150 i miR-155 uočen kod AML u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike ima osjetljivost od 91,4%, i specifičnost od 87,5%. AML se pokazao kao jedan od najboljih modela bolesti za pouzdanu primjenu vrijednosti razine miRNA u dijagnostičke svrhe (83).

Uloga miRNA analizirana je i u refraktornoj/relapsnoj AML.

Studije su pokazale da je miRNA uključena u refraktornost AML na kemoterapiju preko mehanizama koji uključuju apoptozu, stanični ciklus i adenozin tri fosfat vezujući transporter koji posreduje u otpornosti na citostatike.

Analizirajući AML stanične linije, uočen je snižen izražaj miR-138 kod doksorubicin-rezistentnih AML-stanica (84).

Leukemijska matična stanica je osnovni izvor egzosoma. Stoga je uklanjanje štetnih miRNA putem egzosoma mehanizam samozaštite hematopoetske matične stanice. MiRNA su dobri prognostički biomarkeri u AML, jer se nalaze u različitim odjeljcima, visokorezistentnim sekvencama, jednostavni su i osjetljivi za detekciju te stabilni u ekstremnim uvjetima (82,83,84).

U B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji (B-KLL), česte su promjene kromosoma (delecija 13, 14.3, 11q, 23, 6q12, trisomija 12). Kod bolesnika s delecijom 13q14.3, izražaj miR-15a i miR-16-1 je inhibiran, ili su iste u vrlo niskim razinama. MiR15-a je sniženog izražaja kod oko 25% bolesnika s KLL, dok je niski miR-16-1 opisan kod 45% bolesnika (86).

Monoalelna delecija može rezultirati u pojačanom izražaju *bcl2*, koji ima ulogu antagonista apoptoze. MiR15a i miR-16-1 negativno koreliraju s izražajem *bcl2* u KLL-u na posttranskripcijskoj razini.

MiR-34a, član miR-34 obitelji, reguliran je tumor supresor genom p53, niži izražaj miR34a može se naći u bolesnika s kemorefraktnim B-KLL i delecijom p53.

SIRT1 i TLC1 su transkripcijski čimbenici koji imaju važnu ulogu u inhibiciji stanične smrti, i pojačano su izraženi u većini slučajeva B-KLL.

Snižen izražaj miR-34a je opisan kod agresivnijih p53 pozitivnih B-KLL bolesnika refraktnih na terapiju fludarabinom, a kraće ukupno preživljenje opisano je u grupi KLL bolesnika kod kojih je uočen visok izražaj miR-221/222 (87).

Moussay i suradnici analizirali su izražaj miRNA u grupi KLL bolesnika koji su bili ZAP-70 pozitivni i negativni, a usporedili su ih sa zdravim pojedincima te bolesnicima s multiplim mijelomom i trihroleukemijom. U plazmi ZAP-70 negativnih KLL bolesnika, izdvojena je povišena vrijednost miR-150 koja je pozitivno korelirala sa agresivnijom prezentacijom bolesti. Snižena razina miR-20a i pozitivan izražaj ZAP-70 kod dijagnoze, definirali su grupu KLL bolesnika s bržom progresijom bolesti i potrebom za ranijim liječenjem (88).

Stamatopoulos i suradnici su uočili povišen miR-150 u serumu kod KLL bolesnika s nepovoljnim citogenetskim promjenama i pozitivnim CD38. Razvili su kvantitativni PCR zbroj koji uključuje prognostičke čimbenike ZAP70, lipoprotein lipazu (LPL) i miR-29c kod bolesnika s KLL. Prisutnost lošijih prognostičkih parametara (visok izražaj ZAP70, LPL i niska razina miR-29c) povezani su s lošijim ukupnim preživljenjem. Visok miR-21 se uz del17p pokazao izrazito lošim prognostičkim čimbenikom ukupnog preživljenja kod bolesnika s KLL (89).

MiRNA su grubo podijeljene u tumor supresorske gene i onkogene, a pojedina miRNA može u jednom tumoru biti tumorski supresor, a u drugom onkogen. Svaki tumor ima sebi specifične miRNA koji mogu biti različito izražene. MiRNA ima i kritičnu ulogu u reguliranju razvoja matične stanice i progenitornih stanica u zreloj mijeloidnoj stanici, a njihov pojačan ili smanjen izražaj pokazao se značajnim u onkogenezi i diferenciranju unutar pojedinih hematopoetskih odjeljaka (73,75).

Visok izražaj pojedinih miRNA u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (ALL), AML, KML, NHL-DLBCL te B-KLL povezan je sa lošijim preživljenjem, slabijim odgovorom na terapiju i većim rizikom relapsa, iako su pojedini autori pokazali i da snižena razina pojedinih miRNA može pozitivno korelirati s rizikom za relaps ili neuspjehom liječenja.

Također je uočeno kako izražaj miRNA u pojedinim hematološkim poremećajima može pridonijeti u određivanju tijeka bolesti, pa i kad su prognostički čimbenici povoljni (89-97).

### **1.8.3. Izražaj miRNA u MDS**

Nekoliko je studija dokazalo povezanost izražaja pojedinih miRNA s podtipovima MDS te ostalim dosad poznatim prognostičkim čimbenicima.

Hussein i suradnici su analiziranjem 365 miRNA kod 25 MDS bolesnika pokazali globalno sniženu regulaciju miRNA koje su uključene u normalnu hematopoezu, ukazujući na sličnost sa smanjenim izražajem miRNA u ostalim malignim bolestima (97).

Izražaji miRNA-10a i miRNA-34a mogu diferencirati MDS nižeg u odnosu na visoki rizik. Tako je profil izražaja miRNA u RAEB-1 bio sličan izražajima kod IPSS niskog rizika, dok su u MDS RAEB-2 pokazali sličnost s miRNA profilom kod AML bolesnika (98,99).

Jedna od studija koja je pokušala povezati izražaj različitih miRNA s poznatim prognostičkim čimbenicima, uključila je 44 MDS bolesnika te definirala 68 miRNA koje su bile različitog izražaja među MDS bolesnicima visokog i niskog rizika. Izdvojena je miR-181b koja je bila pojačano izražena u obje grupe, ali je njen pojačan izražaj u MDS grupi niskog rizika bio povezan s kraćim preživljenjem (100).

Pons i suradnici analizirali su 25 uzoraka koštane srži bolesnika s MDS i identificirali 12 pojačano eksprimiranih miRNA u koštanoj srži te 6 u perifernoj krvi. Većina tih miRNA je pripadalo miR-17-92 skupini čija je funkcija povezana s deregulacijom proliferacije i antiapoptotičkim mehanizmima što može objasniti poremećenu proliferaciju hematopoetskih stanica u MDS. U daljnoj analizi 6 miRNA je bilo pojačano izraženo i u uzorcima periferne krvi, dok su 3 miRNA (miR-181a, 222 i 155) bile pojačano izražene u MDS visokog rizika za razliku od njihove niske ekspresije u MDS niskog rizika.

U drugom istraživanju miRNA-1/miRNA-133a grupa je bila pojačano eksprimirana u svim uzorcima (101)

Dostalova i suradnici su identificirali 13 pojačano izraženih miRNA te 9 smanjeno izraženih miRNA. U daljnoj analizi bolesnici su podijeljeni na RAEB 1, RAEB

2 i AML. Profil RAEB-a 1 bio je sličan zdravim kontrolama, dok je RAEB 2 bio sličan AML-u. Autori su izdvojili dvije miRNA; miR-10-a i 34-a.

MiR-10-a bila je povezana s leukemijskom transformacijom u RAEB 2 podtipu, dok je miR-34-a bila povezana s alteracijom hematopoeze. Ovo je ujedno prva studija koja je pokazala patogenetski mehanizam miRNA u MDS (102).

Erdogan i suradnici su analizirali 44 519 miRNA proba u niskorizičnom MDS.

5 miRNA je ostalo značajno u validacijskoj skupini s konstruiranim algoritmom od čak 50 ciljanih gena koji su varirali od transkripcijske regulacije do RNA translacije pokazujući da malen broj miRNA može ciljati multiple mRNA ciljnih gena (103).

Calin i suradnici analizirali su razine 2 miRNA u plazmi 50 MDS bolesnika i 706 zdravih kontrolnih ispitanika. Cirkulirajuće let-7a i miR-16 su bile podjednako izražaja kod zdravih ispitanika, a značajno snižene kod MDS bolesnika. Raspodjela obje miRNA kod MDS bolesnika je bila bimodalna, i njihove razine su bile značajno povezane s vrijeme bez znakova aktivnosti bolesti (eng. *progression free survival* (PFS)) i ukupnog preživljenja (eng. *overall survival* (OS)) kod MDS bolesnika.

Multivarijatna analiza je pokazala kako je let-7a snažan nezavisni čimbenik i prediktor OS u skupini MDS bolesnika (104).

U plazmi 72 bolesnika s MDS i normalnim kariogramom u usporedbi s 12 zdravih kontrolnih ispitanika, analiziran je izražaj 800 proba humane cirkulirajuće miRNA. Uzorci plazme su uzeti kod novodijagnosticiranih bolesnika prije bilo kakvog liječenja, i 6 mjeseci nakon. Glavni cilj studije bio je identificirati miRNA u plazmi bolesnika koji mogu biti prognostički biomarkeri ukoliko ne postoje citogenetske abnormalnosti niti ostali rizični čimbenici. Pronađen je profil od 7 miRNA (let 7a,144, 16, 25, 451, 651 i 655) koji je mogao podijeliti bolesnike s obzirom na ishod u dvije skupine s rizikom za smrt u iznosu od 6,54%, te tijekom MDS s većom točnošću (75%) od samog IPSS bodovnog sustava (50%).

Kod MDS bolesnika s diploidnim kariotipom i bez poznatih somatskih mutacija povezanih sa MDS, gotovo da i ne postoje dosad poznati kliničkopatološki i biološki markeri koji bi prognostički stratificirali ovu grupu. Od izdvojenih miRNA, miR-144 i 451 lokus se nalazi na kromosomu 17 i sudjeluje u eritroidnom razvoju i homeostazi. MiR-25 je prepoznata kao regulator p53 i uključena u „programiranje“ matične stanice (105).

Studija koja je koristila miRNA kao prognostički čimbenik za liječenje hipometilirajućim agensima, 5-azacitidinom i decitabinom je uključivala 58 bolesnika s primarnim ishodom ukupnog odgovora. Bolesnici su podijeljeni po izražaju cirkulirajuće

miR-21 u dvije skupine. Skupina s visokim izražajem miRNA imala je značajno manju stopu odgovora (41,2%) za razliku od skupine s niskim izražajem (73,2%) s osjetljivošću od 83,3% te specifičnosti od 45,8% za navedeni biomarker miR-21.

Nije pokazana značajna razlika u ukupnom preživljenju, no vrijeme bez leukemijske transformacije bilo je značajno dulje u skupini s niskim izražajem miR-21 (44,5 vs. 14 mjeseci) (106).

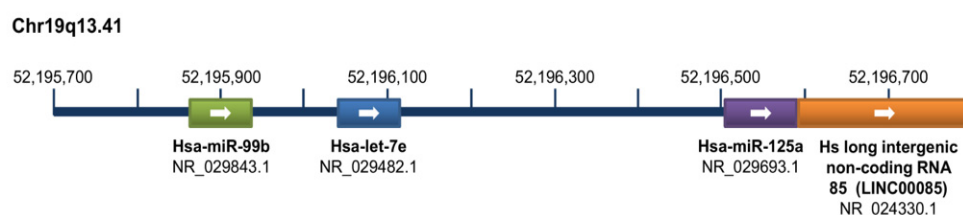
Povišen izražaj miR-126 kod bolesnika s MDS povezan je s lošijim preživljenjem, većom učestalosti relapsa i pojačanim izražajem onkogenih (107).

MiR-125b ima više ciljnih molekula preko kojih paralelno kontrolira pro-proliferativne i pro-apoptotske signalne puteve, a koji moraju biti usko regulirani u fiziološkim uvjetima. Ako se tijekom karcinogeneze izgube mehanizmi regulacije, dolazi do aktiviranja ili blokiranja onkogenih ili tumor supresornih puteva.

Ako je miR-125b smanjenog izražaja, izgubljena je njegova funkcija tumorskog supresora, te dolazi do aktiviranja onkogenih puteva, zaustavljanja pro-apoptotske kaskade te maligne transformacije. Ukoliko je miR-125b pojačano izražen zbog kromosomskih translokacija ili transkripcijskih aktivacija, potaknuti su onkogeni signalni putevi koji smanjuju aktivnost p53 ili ostalih apoptotskih mehanizama. Analizom izražaja miRNA u brojnim hematopoetskim subpopulacijama, uočeno je kako je miR-125b među najviše zastupljenim miRNA u matičnim stanicama i sudjeluje kao regulator hematopoeze na razini matične stanice (108, 109, 110, 111)

MiR-125a inhibira eritroidnu diferencijaciju u staničnim linijama leukemije i MDS, ali utječe i na granulocitno/monocitnu te megakariocitnu lozu.

Gomez i suradnici su pokazali da razina izražaja miR-125a obrnuto proporcionalno korelira s preživljenjem bolesnika s MDS, a slično vrijedi i za cirkulirajuće miR-99b i let-7e. Ektopični izražaj miR-99b može inducirati pojačanu aktivnost NF-Kb, dok je miR-125a snižava. Uočili su koordiniranu regulaciju miR-125b i tri komponente klastera miR-99b/let-7e/miR-125a (112).



Slika 1. Položaj miR-99b, let-7e i miR-125a na kromosomu 19 (preuzeto iz Gañán-Gómez I, i sur. Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF- $\kappa$ B activation and enhances erythroid differentiation arrest. PLoS One. 2014;9(4):e93404. (110)).

Dosadašnja dinamička istraživanja miRNA pokušavaju odgovoriti na pitanja koliko njihov izražaj može biti koristan u kliničkoj praksi, ali i kako iskoristiti miRNA u liječenju hematoloških poremećaja kontrolirajući izražaj njihovih ciljnih gena. Inhibiranjem određenih miRNA može doći do redukcije tumorske proliferacije (113-115).

Područje istraživanja ovih malenih, nekodirajućih miRNA golemo je i raste iz dana u dan donoseći nam nove spoznaje o njihovoj važnosti u patogenezi različitih tumora.

## 1.9. Svrha rada

MDS pripada skupini heterogenih klonalnih hematoloških poremećaja hematopoetskih matičnih stanica s neučinkovitom hematopoezom jedne ili više staničnih linija, posljedičnim citopenijama i s povećanim rizikom od progresije u AML.

Danas se dijagnoza MDS zasniva na citomorfološkoj analizi stanica periferne krvi (PK) i koštane srži (KS) i određivanju postotka blasta, tipa i stupnja displazije i prisustva prstenastih sideroblasta, te citogenetskoj analizi stanica KS.

Nedavna istraživanja su pokazala da kratke ne- kodirajuće molekule miRNA duljine 18 do 25 nukleotida zasigurno doprinose patogenezi hematoloških malignih poremećaja modulacijom tumorskih onkogeni, tumor supresor gena ili u slučaju patogeneze MDS, regulacijom epigenetskih mehanizama. Posljednjih godina su otkrivene i istraživane različite miRNA kako u oboljelih od MDS pa je tako dokazan veći izražaj let-7a u oboljelih od MDS niskog rizika, a dosadašnji rezultati pokazuju da je izražaj klastera miR-99b/let-7a/miR-125a i 125b, reguliran istim mehanizmom i da su i miR-99b i miR-125a/b klinički značajne miRNA u oboljelih od MDS.

MiR-125a udružen s miR-99b i let-7a zasigurno bi mogao biti potencijalan biljeg za ranu dijagnozu i klasifikaciju MDS.

S obzirom na mogućnost molekularnih metoda, eventualni dijagnostički značaj izražaja pojedinih miRNA mogao bi predstavljati nove neinvazivne dijagnostičke biljege prilikom same dijagnoze MDS.

Moguća povezanost pojedinog ispitivanog miRNA i prognostičkih indeksa, mogla bi imati dodatnog utjecaja na praćenje bolesnika s MDS i na terapijski pristup. Daljnja istraživanja bilo bi potrebno usmjeriti ka prepoznavanju onih miRNA koje bi omogućile razlikovanje oboljelih od MDS niskog rizika i oboljelih od MDS visokog rizika.

## **2. HIPOTEZA**

Razina cirkulirajućih miRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b) je povišena, a razina miR-let-7a snižena, kod bolesnika s MDS u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike te ovaj klaster od 5 miRNA može predstavljati neinvazivan dijagnostički biomarker MDS.



### **3. CILJEVI RADA**

#### **3.1. Opći cilj**

Opći cilj ovog istraživanja je istražiti izražaj cirkulirajućih miRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a) u skupini bolesnika s MDS u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

#### **3.1. Specifični ciljevi**

Specifični ciljevi istraživanja su:

- 1) Utvrditi razliku izražaja profila odabranih miRNA kod neliječenih bolesnika s MDS u usporedbi sa zdravim ispitanicima;
- 2) Utvrditi korelira li koncentracija pojedinih miRNA s kliničkim i prognostičkim čimbenicima u bolesnika s MDS (po IPSS, WPSS, R-IPSS) kod dijagnoze;
- 3) Pokazati postoji li povezanost izražaja odabranih miRNA sa specifičnim somatskim mutacijama (TET2, DNMT3A, TP53, SF3B1, ASXL1, RUNX1, NRAS) u MDS; te
- 4) Pokazati postoji li povezanost izražaja pojedinih miRNA s tipom MDS po WHO klasifikaciji iz 2016. godine.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Materijali**

#### **4.1.1. Ispitanici**

Istraživanje je provedeno u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur od 2015. godine do 2019. godine. Izražaj navedenih miRNA određivan je u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. U analizu je uključen 41 bolesnik s MDS, od planiranih 45. Kod 4 bolesnika nisu bile potvrđene dijagnoze MDS, nego se radilo o MDS/ mijeloproliferativnom sindromu (MPS).

Planirano je određivanje somatskih mutacija na uzorcima pune krvi i koštane srži, ali navedeno nije učinjeno radi nemogućnosti izolacije DNA iz arhiviranih uzoraka plazme, seruma i koštane srži, unatoč višestrukim pokušajima.

Za kontrolu je odabrano 20 zdravih ispitanika, kontroliranih za dob i spol.

Svi bolesnici i zdravi ispitanici su prije uključivanja u studiju potpisali informirani pristanak, uzorci za studiju su prikupljeni u skladu s Etičkim principima Helsinške deklaracije, na način da je identitet bolesnika u svakom trenutku bio zaštićen. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur.

## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Klinički parametri i laboratorijski testovi**

Bolesnici su prilikom evaluacije pregledani na standardni način uz uzimanje anamneze i fizikalni pregled.

Dijagnoza MDS postavljena je na temelju citomorfološke analize stanica periferne krvi i koštane srži, određivanjem postotka blasta, tipa i stupnja displazije, prisutnosti prstenastih sideroblasta i citogenetičke analize stanica koštane srži, i to sukladno hrvatskim smjernicama Radne skupine za MDS Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM).

Zabilježeni su osnovni demografski podaci (dob i spol) i učinjene slijedeće biokemijske i hematološke pretrage: laktat-dehidrogenaza (LD), C-reaktivni protein, broj retikulocita (Rtc), a u okviru diferencijalne krvne slike (DKS) broj leukocita (Lkc), koncentracija hemoglobina (Hb), prosječni volumen eritrocita (MCV), broj trombocita (Trc) i različite populacije leukocita (neutrofilni granulociti i limfociti).

Kod svakog bolesnika su određeni prognostički parametri prema kliničkim, laboratorijskim i morfološkim pokazateljima prilikom dijagnoze: IPSS, R-IPSS, WPSS.

Genske ekspresije specifičnih miRNA (125a, 99b, 126, 125b i let7a) određene su u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, akreditiranom prema normi EN ISO 15189:2012.

### **4.2.2. Uzorkovanje i izolacija miRNA**

- 1) Uzorkovanje/uzorak: plazma

Puna krv, ukupno 12 mL, uzeta je u 2 spremnika s antikoagulansom EDTA (BD Vacutainer K2EDTA, 6,0 mL, Fisher Scientific, Waltham, Sjedinjene Američke Države); uzorci su ostavljeni na temperaturi od 15 do 25°C tijekom najdulje 60 minuta.

- 2) Izolacija miRNA

Izolacija i purifikacija ekstracelularne miRNA (veličine 18 - 100 nukleotida) iz plazme učinjena je komercijalnim kitom miRNeasy Serum/Plasma Kit (50) (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) prema protokolu proizvođača.

Princip izolacije miRNA je liza stanica i denaturacija kompleksa proteina QIAzol Lysis reagensom (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) koji uklanja većinu ostatnih DNA. Proteini se iz lizata uklanjaju organskom ekstrakcijom, a miRNA se nakon dodatka etanola izdvaja i purificira na silika membrani kolone (Rneasy MinElute spin kolona, QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) prema protokolu proizvođača i eluira kao vodena otopina miRNA.

Za izolaciju se prema preporukama proizvođača koristilo najviše 200  $\mu$ L uzorka (plazme) kojem je dodano 5 volumena QIAzol Lysis reagensa. Uzorku je nakon liziranja QIAzol Lysis reagensom dodan kloroform (istog volumena kao uzorak). Potom je ostavljen na sobnoj temperaturi od 15 do 25°C tijekom 5 minuta i centrifugiran na 12000 g tijekom 15 minuta na 4°C. Gornja vodena faza je odijeljena u novu epruveticu bez doticanja međufaze uz dodatak 1,5 volumena 100% etanola i miješanje pipetiranjem. 700  $\mu$ L tako priređenog uzorka naneseo je na kolonu (Rneasy MinElute spin kolona, QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) i centrifugirano  $\geq$  8000 g tijekom 15 sekundi na sobnoj temperaturi od 15 do 25°C. Eluat se odbacio, a postupak ponovio na istoj koloni s ostatkom uzorka. Kolona se zatim isprala sa 700  $\mu$ L RWT pufera (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) uz centrifugiranje  $\geq$  8000 g tijekom 15 sekundi, a zatim s 500  $\mu$ L RPE pufera (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) uz centrifugiranje  $\geq$  8000 g tijekom 15 sekundi. Na kolonu je dodano 500  $\mu$ L 80% etanola uz centrifugiranje  $\geq$  8000 g tijekom 2 minuta radi ispiranja membrane uz odbacivanje eluata. Kolona je postavljena na novu epruveticu i centrifugirana  $\geq$  12000 g tijekom 5 minuta da se kolona osuši. MiRNA je eluirana u novu epruveticu dodatkom 14  $\mu$ L RNase-free water (Fisher Scientific, Waltham, Sjedinjene Američke Države) direktno na kolonu i centrifugirana  $\geq$  12000 g tijekom 1 minute.

Za otkrivanje uzoraka loše kvalitete i normalizaciju mogućih varijabilnosti pri izolaciji miRNA, praćenje učinkovitosti reverzne transkripcije (miRNA u komplementarnu DNA (cDNA) i kao endogena kontrola za određivanje razine ekspresije miRNA korišten je komercijalni kit miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, *Caenorhabditis elegans* miR-39 miRNA (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka), koji je dodan uzorku nakon dodatka QIAzol Lysis reagensa, a prije dodatka kloroforma i odvajanja faza.

3) Reverzna transkripcija (RT) i relativna kvantifikacija lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR* (RT-PCR))

Za detekciju, kvantifikaciju i određivanje profila najznačajnijih miRNA u bolesnika s MDS korišten je miScript PCR System (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) koji se sastoji od:

- miScript II Reverse Transcription Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka),
- miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) i
- Custom miScript miRNA PCR Array, CMIPA9696-12; 8 genes x 12 samples, (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) dizajniran za određivanje profila slijedećih miRNA: miR-125a, miR-99b, miR-126 i miR-125b, miR-let-7a.

Svaki Custom miScript miRNA PCR Array uključuje slijedeće kontrolne uzorke:

- a) endogenu kontrolu za otkrivanje uzoraka miRNA loše kvalitete: Spike-In Control (Cel-miR-39),
- b) endogenu kontrolu reverzne transkripcije: miRNA reverse-transcription Control (miRTC),
- c) kontrolu učinkovitosti relativne kvantifikacije uz real-time PCR: pozitivna kontrola za PCR (PPC).

Detekcija, kvantifikacija i određivanje profila uz miScript PCR System uključivala je reverznu transkripciju (prepisivanje miRNA u cDNA) tijekom 1 sata na temperaturi 37°C, razrjeđivanje cDNA uz dodatak miScript SYBR Green PCR mastermiksa, miScript Universal Primera i ultra čiste vode te alikvotiranje uzorka u Custom miScript miRNA PCR Array ploču s 96 jažica. Nakon relativne kvantifikacije RT-PCR pod standardnim uvjetima umnažanja, dobiveni podaci su uneseni u miScript miRNA PCR Array Data Analysis Software i analizirani.

4) Normalizacija i analiza podataka dobivenih RT-PCR

Normalizacija podataka napravljena je prema najstabilnijoj miR-126.

Za analizu podataka korišten je miScript miRNA PCR Array Data Analysis Software kojem se slobodno pristupa putem mrežne stranice: <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=632197ff-7c69-419d-91e4-526f62cc084e&lang=en>.

Istovremeno se pristupa miScript miRNA PCR Array Data Analysis Software-u i miScript miRNA PCR Array Data Analysis Excell Template- u u koje se upisuju dobiveni podaci o Ct vrijednostima (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>, <https://dataanalysis.qiagen.com/mirna/arrayanalysis.php>).

Oba automatski kvantificiraju koristeći  $\lambda$  Ct metodu relativne kvantifikacije i interpretiraju rezultate kontrolnih uzoraka, a rezultate prikazuju u nekoliko različitih formata (tablično, grafički, trodimenzionalno).

Uz preporučene vrijednosti praga broja ciklusa umnožavanja (eng. *threshold cycle* (Ct)) (Ct = 15 – 35) i nagiba pravca za cell-miR-39 (-2,887) dobila se zadovoljavajuća učinkovitost q-RT PCR (115,6%), čija je specifičnost procijenjena na temelju disocijacijskih krivulja specifičnih miRNA nastalih završetkom standardnog programa taljenja neposredno nakon završetka q-RT PCR. Istovjetne maksimalne vrijednosti disocijacijskih krivulja specifičnih odabranih miRNA potvrdile su visoku specifičnost miRNA i odsutnost nespecifičnih produkata. Postavkom bazne linije na istu razinu iznad pozadinske fluorescencije i jednake uvjete reakcije tijekom svih ciklusa umnožavanja osigurane su usporedivost i analiza dobivenih rezultata.

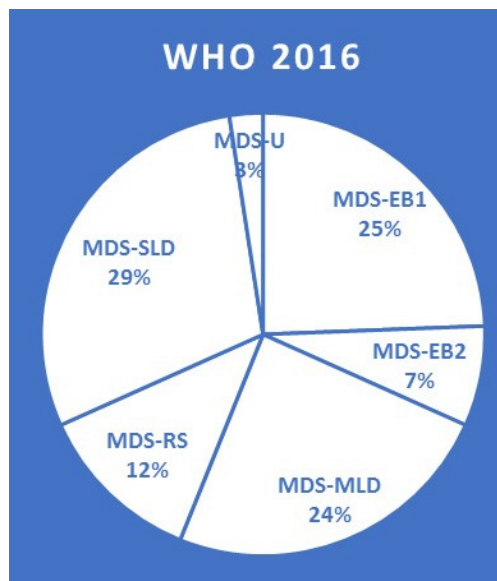
### 4.2.3. Statističke metode

Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone a razlike između njih analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom) te prikazane Box i Whiskerovom plotu unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 1,5 interkvartilna raspona. Spearmanovi koeficijenti korelacije rho korišteni su u analizi povezanosti ispitivanih razina miR s pojedinim kliničkim karakteristikama, IPSS i WPSS klasifikacijama te laboratorijskim nalazima. Pojedine razine miR su normalizirane u odnosu na vrijednost miR-126 kao referentnu vrijednost prema formuli  $2^{(-\text{vrijednost razlike od miR-126})}$ . P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>) te MedCalc for Windows, verzija 19.0.3 (MedCalc Statistical Software version 19.0.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike bolesnika

Analiziran je ukupno 41 bolesnik s MDS (tablica 6). Medijan dobi bio je 70 godina, većina analiziranih bolesnika bili su muškarci (70,7%). Najčešći podtip MDS bio je MDS s unilinijskom displazijom (29,2%) (slika 2).



Slika 2. Prikaz raspodjele bolesnika prema klasifikaciji mijelodisplastičnog sindroma (MDS) Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2016. godine.

*MDS-EB1 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1; MDS-EB2 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2; MDS-MLD = mijelodisplastični sindrom s multilinijskom displazijom; MDS-RS = mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima; MDS-SLD = mijelodisplastični sindrom s jednolinijskom displazijom; MDS-U = neklasificirani mijelodisplastični sindrom.*



Tablica 6. Opisna statistika ispitivanog uzorka obzirom na spolnu raspodjelu, kliničke varijable i prognostičke sustave bodovanja.

		N	%
Spol	m	29	70,7
	ž	12	29,3
WHO 2016	MDS-EB1	10	24,4
	MDS-EB2	3	7,3
	MDS-MLD	10	24,4
	MDS-RS	5	12,2
	MDS-SLD	12	29,2
	MDS-U	1	2,4
Patološki kariogram	ne	33	80,5
	da	8	19,5
IPSS	niski	18	43,9
	intermedijarni 1	18	43,9
	intermedijarni 2	4	9,8
	visoki	1	2,4
IPSS-R	vrlo niski	17	41,5
	niski	12	29,3
	intermedijarni	5	12,2
	visoki	5	12,2
	vrlo visoki	2	4,9
WPSS	vrlo niski	12	29,3
	niski	9	22
	intermedijarni	10	24,4
	visoki	8	19,5
	vrlo visoki	2	4,9

*N = broj; WHO 2016 = Klasifikacija mijelodisplastičnih sindroma Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016; MDS-EB1 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1; MDS-EB2 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2; MDS-MLD = mijelodisplastični sindrom s multilinijском displazijom; MDS-RS = mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima; MDS-SLD = mijelodisplastični sindrom s jednolinijском*

displazijom; MDS-U = neklasificirani mijelodisplastični sindrom; IPSS = Internacionalni prognostički sustav bodovanja; IPSS-R = Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja; WPSS = Prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije.

Patološki kariogram imalo je 8 (19,5%) bolesnika. Od 41 bolesnika, njih 87,8% po IPSS bodovnom sustavu, imao je niski ili intermedijarni 1 prognostički skor.

Analizirajući R-IPSS kod 70,8% bolesnika je nađen niski ili vrlo niski prognostički skor (tablica 7), a u analizi WPSS-a pokazalo se kako je 51,3% bolesnika imalo vrlo niski i niski prognostički skor.

Tablica 7. Prikaz laboratorijskih vrijednosti, dobi u godinama te prognostičkih sustava bodovanja (kao kontinuiranih vrijednosti) bolesnika s mijelodisplastičkim sindromom.

	Centil				
	Min	Max	25.	Medijan	75.
E ( $\times 10^{12}/L$ )	2,07	4,79	2,80	3,06	3,25
Hgb (g/L)	75,00	143,00	92,50	101,00	112,00
MCV (fL)	77,50	115,00	91,90	99,00	105,00
Rtcdg ( $\times 10^9/L$ )	5,50	351,20	21,35	39,00	46,40
L ( $\times 10^9/L$ )	0,69	13,60	2,84	4,00	3,80
ANC ( $\times 10^9/L$ )	0,13	9,20	1,08	2,16	3,80
Ly ( $\times 10^9/L$ )	0,30	2,60	0,92	1,30	1,96
Trc ( $\times 10^9/L$ )	6,00	427,00	83,00	145,00	257,00
LDH (U/L)	97,00	546,00	153,50	176,00	195,50
CRP (mg/L)	0,20	61,60	1,30	3,50	11,50
SE (mm/3,6 ks)	2,00	120,00	11,50	20,00	46,00
Dob (godine)	31,00	84,00	63,00	70,00	76,00
IPSS skor	0,00	3,00	0,00	0,50	0,50
IPSS-R skor	0,00	9,50	1,05	2,00	3,70
WPSS skor	0,00	6,00	0,00	1,50	2,50

*E = eritrociti; Hgb = hemoglobin; MCV = prosječni volumen eritrocita; Rtc dg = retikulociti; L = leukociti; ANC = apsolutni broj neutrofila; Ly = limfociti; Trc = trombociti; LDH = laktat dehidrogenaza; CRP = C reaktivni protein; SE = sedimentacija eritrocita; Dob = godine života u trenutku postavljanja dijagnoze; IPSS = Internacionalni prognostički sustav bodovanja; IPSS-R = Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja; WPSS = Prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije.*

Ispitivana je populacija MDS bolesnika karakterizirana slijedećim parametrima krvne slike: srednja vrijednost broja E iznosila je  $3,06 \times 10^{12}/L$ , koncentracija Hb 101,00 g/L, MCV 99,00 fL, Rtc  $39,00 \times 10^9/L$ , MCH  $28,47 \pm 3,22$  pg.

Srednja vrijednost parametara crvene krvne slike u ispitivanoj grupi MDS bolesnika, ukazuje na makrocitnu anemiju, koja je i najčešća laboratorijska karakteristika u MDS. Najviša zabilježena vrijednost eritrocita iznosila je  $4,79 \times 10^{12}/L$ , a najniža  $2,07 \times 10^{12}/L$ . Najviša zabilježena vrijednost Hb iznosila je 143,00 g/L, a najniža 75,00 g/L. Srednja vrijednost broja L kod MDS bolesnika iznosila je  $4,00 \times 10^9/L$  (raspon od 0,69 do 13,6). Srednja vrijednost broja Trc bila je  $145 \times 10^9/L$  (raspon od 6,00 do 427,00).

## 5.2. Izražaj miRNA

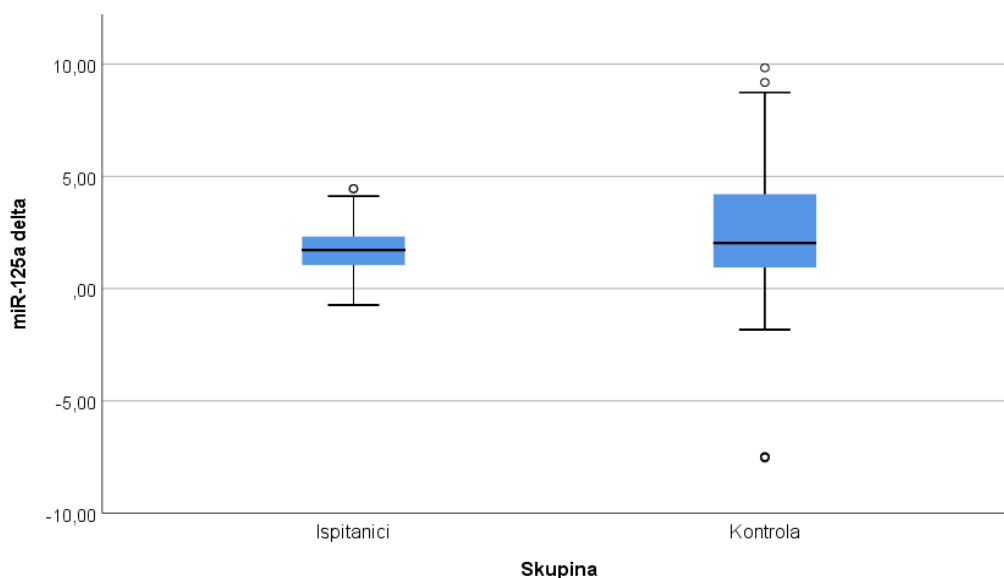
Razlike u promjenama miR u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane MDS i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 8, dok su razlike u odnosu na normalizirane vrijednosti miR prikazane u Tablici 9. Razvidne su značajne razlike između ispitivane skupine i zdrave kontrole u razini miR-99b gdje se kod normaliziranih vrijednosti vidi povećana razina kod ispitanika u odnosu na kontrolu za 4,521 puta ( $P=0,004$ ).

Tablica 8. Razlike u promjenama miR u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane (I) i kontrolne (K) skupine: Mann-Whitney U test.

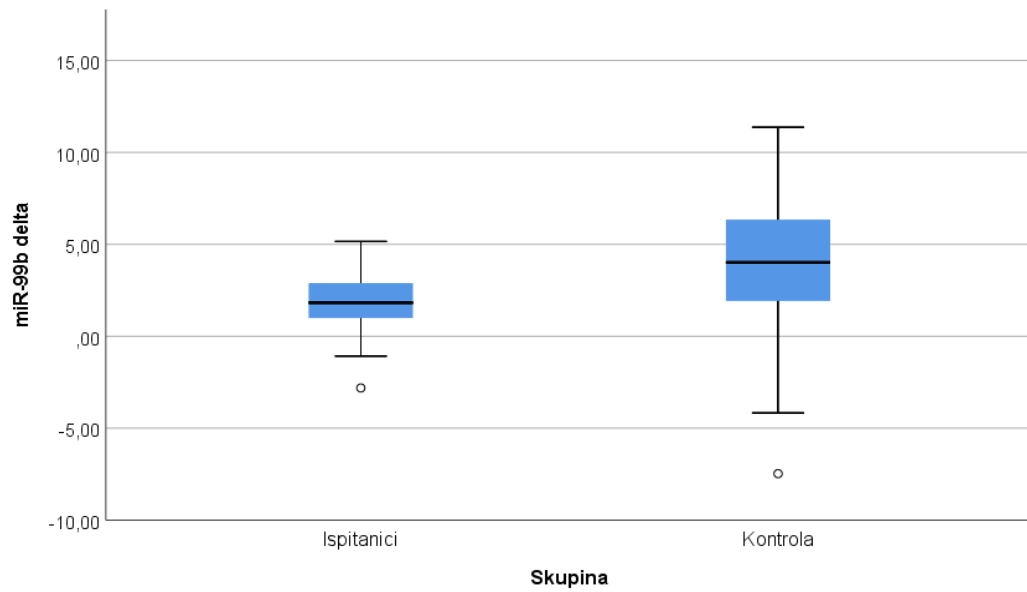
Skupina	N	Min	Max	Centil			MW U	Z	P	
				25.	Medijan	75.				
miR-125a delta	I	41	-0,731	4,449	1,026	1,716	2,462	462,000	-0,914	0,361
	K	26	-7,545	9,834	0,674	<b>2,034</b>	4,279			
miR-99b delta	I	41	-2,812	5,163	0,883	<b>1,824</b>	2,962	308,000	-2,895	<b>0,004</b>
	K	26	-7,472	11,373	1,656	4,023	6,361			
miR-125b delta	I	41	1,096	4,918	1,724	2,427	3,174	431,000	-1,312	0,189
	K	26	-8,861	11,083	1,057	2,937	5,424			
milet7a delta	I	10	-2,972	0,502	-1,034	-0,751	-0,360	97,000	-0,529	0,597
	K	22	-3,991	8,443	-2,094	-0,401	1,861			

Tablica 9. Razlike u normaliziranim vrijednostima miR (2<sup>Δ</sup> (-vrijednost razlike od miR-126) između ispitivane (I) i kontrolne (K) skupine: Mann-Whitney U test.

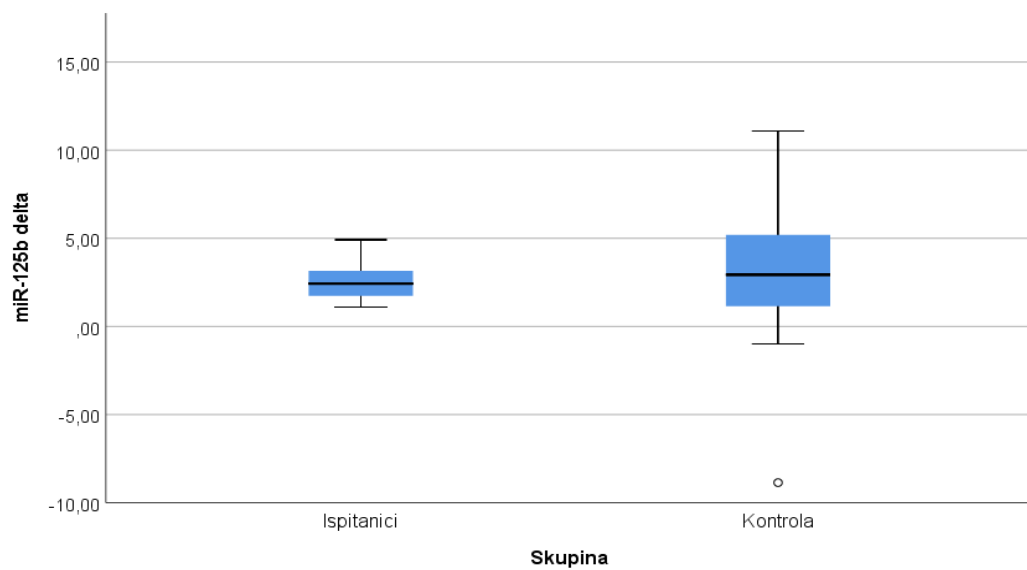
Skupina	N	Min	Max	Centil			X	MW U	Z	P	
				25.	Medijan	75.					
miR-125a delta	I	41	0,046	1,659	0,183	0,304	0,491	1,244	461,500	-0,920	0,358
	K	26	0,001	186,108	0,052	0,244	0,663				
miR-99b delta	I	41	0,028	7,013	0,128	<b>0,283</b>	0,543	<b>4,521</b>	<b>308,000</b>	<b>-2,895</b>	<b>0,004</b>
	K	26	0,000	177,294	0,012	<b>0,063</b>	0,337				
miR-125b delta	I	41	0,033	0,467	0,111	0,186	0,303	1,405	431,500	-1,306	0,192
	K	26	0,000	464,650	0,024	0,132	0,484				
milet7a delta	I	10	0,707	7,835	1,282	1,688	2,052	1,250	97,000	-0,529	0,597
	K	22	0,003	15,889	0,281	1,350	4,274				



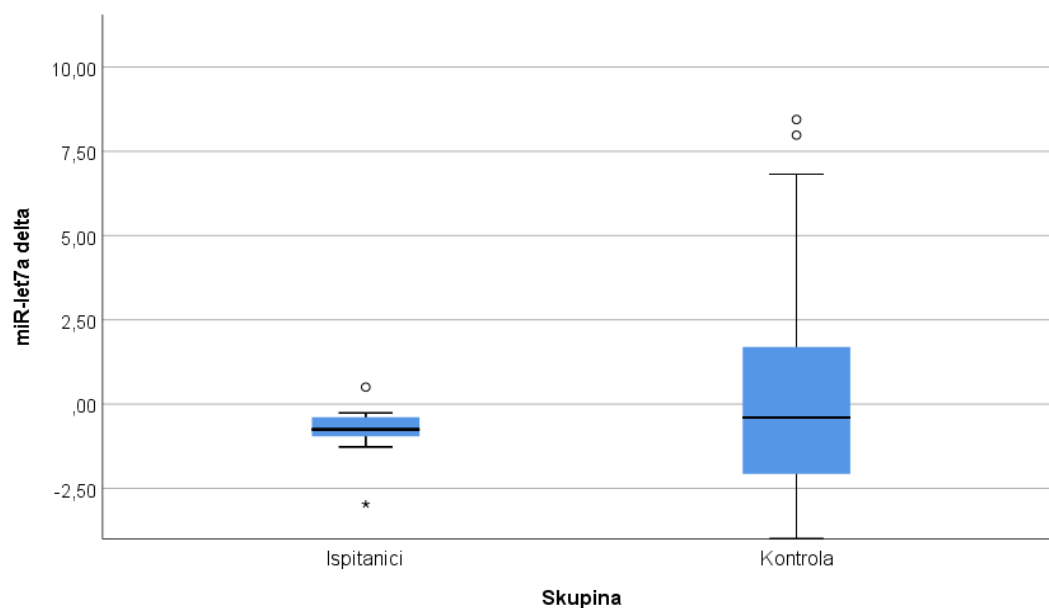
Slika 3. Razlike u promjenama miR-125a u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane i kontrolne skupine.



Slika 4. Razlike u promjenama miR-99b u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane i kontrolne skupine



Slika 5. Razlike u promjenama miR-125b u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane i kontrolne skupine.



Slika 6. Razlike u promjenama miR-let7a u odnosu na miR-126 kao referentnu vrijednost između ispitivane i kontrolne skupine.

Tablica 10. Korelacijski koeficijenti (KK) između prognostičkih sustava bodovanja, dobi u odnosu na pojedine razine mikroRNA (miR) prikazanih kroz normalizirane vrijednosti.

		miR-125a	miR-99b	miR-125b	miR-let7a
Broj ispitanika		41	41	41	10
IPSS skor	KK (Rho)	0,235	-0,017	-0,114	0,006
	P	0,139	0,918	0,477	0,986
IPSS-R skor	KK (Rho)	0,132	0,002	-0,081	0,018
	P	0,412	0,992	0,616	0,960
WPSS skor	KK (Rho)	0,213	0,037	-0,203	0,228
	P	0,182	0,817	0,202	0,526
Dob (godine)	KK (Rho)	0,065	-0,057	0,020	-0,305
	P	0,685	0,725	0,899	0,392

IPSS = Internacionalni prognostički sustav bodovanja; IPSS-R = Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja; WPSS = Prilagođen prognostički sustav bodovanja Svjetske zdravstvene organizacije; Dob = godine života u trenutku postavljanja dijagnoze.

Nije bilo značajnih korelacijskih koeficijenata između IPSS, IPSS-R, WPSS, dobi u odnosu na pojedine razine miR prikazanih kroz normalizirane vrijednosti.

Tablica 11. prikazuje korelacijske koeficijente između pojedinih laboratorijskih vrijednosti u odnosu na pojedine razine miR prikazanih kroz normalizirane vrijednosti. Značajne su negativne korelacije između razine miR-125a i broja eritrocita ( $\rho=-0,326$ ;  $P=0,038$ ) i hemoglobina ( $\rho=-0,381$ ;  $P=0,014$ ). miR-99b značajno pozitivno korelira s brojem leukocita ( $\rho=0,310$ ;  $P=0,048$ ). Ostali korelacijski koeficijenti nisu bili statistički značajni.



Tablica 11. Korelacijski koeficijenti (KK) između pojedinih laboratorijskih vrijednosti u odnosu na pojedine razine mikroRNA (miR) prikazanih kroz normalizirane vrijednosti.

		miR-125a	miR-99b	miR-125b	miR-let7a
Broj ispitanika		41	41	41	10
E	KK (Rho)	-0,362	0,018	-0,066	-0,321
	P	0,038	0,911	0,683	0,365
Hgb	KK (Rho)	-0,381	-0,030	-0,082	-0,109
	P	0,014	0,851	0,608	0,763
MCV	KK (Rho)	-0,266	0,036	-0,105	0,479
	P	0,092	0,825	0,512	0,162
Rtcdg	KK (Rho)	-0,048	0,037	-0,011	0,515
	P	0,763	0,821	0,947	0,128
L	KK (Rho)	-0,194	0,310	-0,115	-0,164
	P	0,225	0,048	0,474	0,651
ANC	KK (Rho)	-0,155	0,266	-0,028	0,164
	P	0,334	0,093	0,860	0,650
Ly	KK (Rho)	-0,157	0,225	-0,243	-0,450
	P	0,325	0,107	0,126	0,192
Trc	KK (Rho)	-0,226	-0,099	-0,079	-0,418
	P	0,155	0,538	0,621	0,229
LDH	KK (Rho)	0,035	0,213	-0,072	0,255
	P	0,826	0,181	0,655	0,476
CRP	KK (Rho)	0,158	-0,035	-0,241	0,273
	P	0,325	0,830	0,130	0,446
SE	KK (Rho)	-0,099	-0,075	-0,159	-0,394
	P	0,538	0,640	0,321	0,260

*KK = korelacijski koeficijent; dob = godine života u trenutku postavljanja dijagnoze; E = eritrociti; Hgb = hemoglobin; MCV = prosječni volumen eritrocita; Rtcdg = retikulociti; L = leukociti; ANC = apsolutni broj neutrofila; Ly = limfociti; Trc = trombociti; LDH = laktat dehidrogenaza; CRP = C reaktivni protein; SE = sedimentacija eritrocita*

### 5.3. Opisna statistika pojedinih miRNA ovisno o WHO-klasifikaciji

S obzirom na mali broj ispitanika, ne mogu se analizirati ni uspoređivati izražaji pojedinih miRNA ovisno o WHO podtipu MDS. Ipak, kako je prikazano u tablici 12, više srednje vrijednosti miR-125a uočene su kod MDS bolesnika s viškom blasta i multilinijskom displazijom.

Tablica 12. Izražaj mikroRNA-125a (miR-125a) ovisno o podtipu mijelodisplastičnog sindroma (MDS) po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). *N = broj; MDS-EB1 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1; MDS-EB2 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2; MDS-MLD = mijelodisplastični sindrom s multilinijskom displazijom; MDS-RS = mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima; MDS-SLD = mijelodisplastični sindrom s jednolinijskom displazijom; MDS-U = neklasificirani mijelodisplastični sindrom.*

		miR-125a norm			
		N	Medijan	25. percentil	75. percentil
WHO klasifikacija	MDS-EB1	10	0,3370	0,2269	0,4830
	MDS-EB2	3	0,4532	0,3035	0,6029
	MDS-MLD	10	0,3057	0,1416	0,4506
	MDS-RS	5	0,2892	0,2238	0,3439
	MDS-SLD	12	0,2517	0,0928	0,7170
	MDS-U	1	0,0458	0,0458	0,0458

Najviša srednja vrijednost miR-99b uočena je u grupi MDS bolesnika višeg rizika (EB2) uz medijan 4,1135 (tablica 13).

Tablica 13. Izražaj mikroRNA-99b (miR-99b) ovisno o podtipu mijelodisplatičnog sindroma (MDS) po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). *N = broj; MDS-EB1 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1; MDS-EB2 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2; MDS-MLD = mijelodisplastični sindrom s multilinijskom displazijom; MDS-RS = mijelodisplastični sindrom s prstenastim*

*sideroblastima; MDS-SLD = mijelodisplastični sindrom s jednolinijskom displazijom; MDS-U = neklasificirani mijelodisplastični sindrom.*

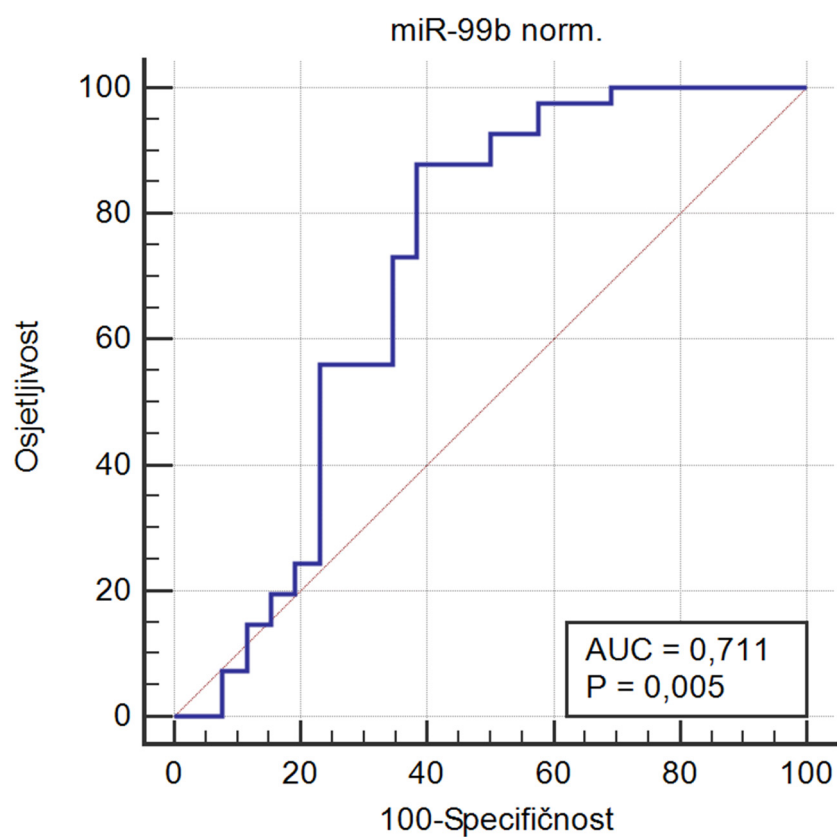
		miR-99b norm			
		N	Medijan	25. percentil	75. percentil
WHO klasifikacija	MDS-EB1	10	0,2977	0,1191	0,4263
	MDS-EB2	3	4,1135	1,2142	7,0128
	MDS-MLD	10	0,2148	0,1224	0,6552
	MDS-RS	5	0,2349	0,0994	0,2698
	MDS-SLD	12	0,3322	0,2132	0,6113
	MDS-U	1	0,1921	0,1921	0,1921

Tablica 14. Izražaj mikroRNA-125b (miR-125b) ovisno o podtipu mijelodisplastičnog sindroma (MDS) po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). *N = broj; MDS-EB1 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 1; MDS-EB2 = mijelodisplastični sindrom s viškom blasta 2; MDS-MLD = mijelodisplastični sindrom s multilinijskom displazijom; MDS-RS = mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima; MDS-SLD = mijelodisplastični sindrom s jednolinijskom displazijom; MDS-U = neklasificirani mijelodisplastični sindrom.*

		miR-125b norm			
		N	Medijan	25. percentil	75. percentil
WHO klasifikacija	MDS-EB1	10	0,1462	0,1008	0,2553
	MDS-EB2	3	0,2722	0,1029	0,4414
	MDS-MLD	10	0,1708	0,1397	0,2994
	MDS-RS	5	0,1550	0,1207	0,3487
	MDS-SLD	12	0,2132	0,1044	0,4353
	MDS-U	1	0,2300	0,2300	0,2300

Kako je miR-let-7a analiziran na samo 10 bolesnika, nije učinjena korelacija s WHO-podtipom MDS.

Učinjena je ROC analiza (eng. Receiver Operating Curve) izražaja miR-99b (slika 7).



Slika 7. Krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika (ROC krivulja) izražaja miR-99b.

Pomoću Youdenovog J indeksa je pokazano područje ispod krivulje (eng. Area Under Curve; AUC) s vrijednošću  $> 0,7$  što upućuje na statističku značajnost testa. Određena je granična vrijednost područja najveće osjetljivosti (87,8%) i specifičnosti (61,54%).

## 6. RASPRAVA

U ovom radu je prvi put opisan izražaj odabranog klastera miRNA (125a, 125b, 126, 99b, let-7a) u plazmi neliječenih MDS bolesnika. Dokazana je značajna razlika između ispitivane skupine i zdrave kontrole u razini miR-99b gdje se kod normaliziranih vrijednosti u odnosu na miR-126, uočava povećana razina kod ispitanika u odnosu na kontrolu za 4,521 puta ( $P=0,004$ ).

U posljednjih nekoliko godina objavljeni su brojni rezultati o utjecaju aberantnog izražaja miRNA u malignim poremećajima, pri čemu su se miRNA pokazale kao geni koji suprimiraju tumor ili onkogeni. U pojedinim su tumorima miRNA prepoznati kao dijagnostički i prognostički parametri te mogući terapijski ciljevi.

Dosad su provedena mnoga istraživanja o molekularnim mehanizmima i epigenetičkim putovima u MDS te njihovu prognostičkom i terapijskom značenju, ali je malo studija o važnosti miRNA u MDS.

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, u ispitanika s MDS niskog rizika dokazana je povišena razina genske ekspresije miR-let-7a u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS visokog rizika. U ovom radu, s obzirom da je let-7a analiziran kod njih 10, nije utvrđena statistički značajna korelacija.

Poznata je povišena razina genske ekspresije miR-125a u ispitanika s MDS-om u odnosu prema genskoj ekspresiji u zdravih dobrovoljaca (109). U ovom radu, uočena je povišena razina miR-125a kod MDS bolesnika s viškom blasta i multilinijskom displazijom (MDS visokog rizika) što odgovara literaturnim podacima. Naime, razina izražaja miR-125a obrnuto proporcionalno korelira s preživljenjem bolesnika s MDS-om. Dosadašnji radovi o mehanizmu djelovanja miR-125a u hematopoezi, pokazali su kako miR-125a inhibira eritroidnu diferencijaciju u staničnim linijama leukemije i MDS-a, ali utječe i na granulocitno/monocitnu te megakariocitnu lozu. U ovom radu pokazano je kako postoji značajna negativna korelacija između razine miR-125a i broja eritrocita ( $\rho=-0,326$ ;  $P=0,038$ ) i hemoglobina ( $\rho=-0,381$ ;  $P=0,014$ ), što odgovara i podacima iz literature (112).

Analizom krvne slike kod bolesnika s MDS-om, najčešće (do 80%) se uočava makrocitna ( $MCV > 97,2$  fL) ili normocitna anemija uz snižen broj retikulocita (113). U

ovom radu je srednja vrijednost parametara crvene krvne slike ukazivala na makrocitnu anemiju (medijan MCV 99fL).

Pancitopenija (anemija s  $Hb < 100 \text{ g/L}$ , trombocitopenija  $< 100 \times 10^9 / \text{L}$ , leukociti  $< 4 \times 10^9 / \text{L}$ ) se uočava kod 30 do 50% bolesnika s MDS-om u trenutku dijagnoze. Manje od 5% bolesnika u trenutku dijagnoze MDS-a ima izoliranu neutropeniju, trombocitopeniju ili monocitozu (114). U ovom radu je srednja vrijednost broja leukocita iznosila  $4,00 \times 10^9$  (raspon od 0,69 do 13,6); srednja vrijednost neutrofilnih granulocita  $2,16 \times 10^9 / \text{L}$  (raspon 0,13 do 9,20), a srednja vrijednost broja Trc bila je  $145 \times 10^9 / \text{L}$  (raspon od 6,00 do 427,00).

MiR-99b značajno pozitivno korelira s brojem leukocita ( $\rho=0,310$ ;  $P=0,048$ ).

Povišene razine genskih ekspresija miR-125a i miR-99b (povišene više od 2 puta od onih u zdravih dobrovoljaca) otkrivene su u približno 30% ispitanika s MDS-om (96,109).

Pretpostavlja se da je koekspresija njihovih genskih ekspresija posljedica kodiranosti istim klasterom DNA.

Literaturni podaci upućuju na gensku ekspresiju klastera miR-99b/let-7a/miR-125a reguliranu istim mehanizmom i pretpostavku da bi miR-99b i miR-125a mogle biti klinički važne u ispitanika s MDS-om (98,100, 109, 110).

U radu je razina promjene genske ekspresije miR-99b u ispitanika s MDS-om bila više od četiri puta viša od normaliziranih razina genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca, što bi moglo upućivati na to da je upravo ovaj MDS-specifičan miRNA-i najvažniji član klastera u patogenezi MDS-a.

Koristeći ROC analizu izražaja miR-99b, nađeno je područje ispod krivulje s vrijednošću  $> 0,7$  što upućuje na statističku značajnost testa. Određena je granična vrijednost područja najveće osjetljivosti (87,8%) i specifičnosti (61,54%). Ovaj rezultat potvrđuje dijagnostičku vrijednost izražaja miR-99b u plazmi bolesnika s MDS.

Iako analizirane na malom broju MDS bolesnika, u ovom radu uočene su više srednje razine izražaja miR-125a, 125b i 99b kod MDS bolesnika višeg rizika po WHO-klasifikaciji.

Kako su odabrane miRNA uključene u brojne epigenetske mehanizme hematopoeze, praćenje razine promjene miRNA u plazmi pomoglo bi na neinvazivan način u praćenju MDS bolesnika niskog ili intermedijarnog rizika.

MDS bolesnici nižeg rizika u trenutku dijagnoze su najčešće praćeni ili trebaju potpuno liječenje, ali neki od njih mogu pokazati puno agresivniji tijek bolesti koji se dosadašnjim prognostičkim modelima ne može na vrijeme identificirati.

Noviji prognostički model LR-PSS (engl. Low Risk Prognostic Scoring System) pokušao je identificirati rizične kategorije MDS-bolesnika niskog rizika (po IPSS-u). Analizirajući dob (stariji od 60 godina), razinu hemoglobina (<100g/L), broj trombocita (<50x10<sup>9</sup> ili 50 do 200 x10<sup>9</sup>), postotak blasta u koštanoj srži (>4%) i nepovoljnu citogenetiku, svrstao je bolesnike u 3 prognostičke kategorije.

Medijan preživljenja u kategoriji 1 iznosio je 80,3 mjeseca (4-godišnje preživljenje 65%), odnosno 14,2 mjeseca u kategoriji 3 (4-godišnje preživljenje 7%).

S obzirom da i ovaj prognostički sustav koristi postotak blasta u koštanoj srži u sklopu invazivne dijagnostičke reevaluacije (punkcija/biopsija koštane srži), poželjno bi bilo naći neinvazivne biomarkere, poput miRNA u plazmi, radi praćenja tijeka bolesti i pravovremene intervencije.

Blaža simptomatska, makrocitna anemija, rjeđe pancitopenija, je čest razlog upućivanja bolesnika starijih od 65 godina na pregled hematologu. Ukoliko se isključe svi drugi uzroci makrocitne anemije, neobjašnjena anemija često bude razlog upućivanja bolesnika na analizu koštane srži, pa i onda kad se radi o asimptomatskoj anemiji.

Nedavni rad Oстера i suradnika, opisao je neinvazivni dijagnostički test na osnovi kliničkih i laboratorijskih parametara (dob, spol, Hb, MCV, broj leukocita, trombocita). ROC analizom dobili su AUC od 0,748 te pokazali kako neinvazivnim dijagnostičkim modelom mogu postaviti ili isključiti MDS kod oko 50% bolesnika starijih od 65 godina. Radi poboljšanja osjetljivosti i specifičnosti testa, autori su istaknuli potrebu pronalaska dodatnih laboratorijskih parametara koji bi pomogao u točnijoj neinvazivnoj dijagnozi MDS-a (117).

Iako je MDS bolest starijih osoba (medijan dobi iznosi 70 godina), može se javiti u bilo kojoj dobi. U ovom je istraživanju sudjelovao 41 bolesnik s MDS-om (medijan dobi 70; raspona godina 31 – 84), većina analiziranih bolesnika bili su muškarci (70,7%). Demografske karakteristike bolesnika u ovom radu, odgovaraju i literaturnim podacima.

Incidencija MDS-a raste sa starenjem, a noviji literaturni podaci navode kako se MDS češće pojavljuje kod muškaraca koji u svim dobnim skupinama obolijevaju češće od žena. Porast incidencije bolesti u starijih od 70 godina (s 3/100.000 na

20/100.000) mogao bi biti razlog povećanog broja muškaraca među ispitanicima s MDS-om (40).

Uočeno je lošije preživljenje muškaraca u odnosu na žene ukoliko se radi o RCMD i MDS uz deleciju 5q, dok nije nađena značajnija razlika u preživljenju ukoliko se radilo o MDS-EB ili sekundarnom MDS-u. Muškarci imaju kraće preživljenje, u usporedbi sa ženama i zbog brojnijih komorbiditeta, bržeg starenja metiloma i kraćih telomera. Tijekom liječenja 5-azacitidinom ili decitabinom, uočeno je kako oboljeli muškarci imaju slabiji terapijski odgovor u odnosu na žene. Navedeno se objašnjava višom razinom citidin deaminaze (CDA) koja brže inaktivira decitabin i 5-azacitidin (115,116).

Najčešći podtip MDS-a bio je MDS s unilinijskom displazijom (29,2%) što je i u skladu s podacima iz literature.

Premda su skupine zdravih dobrovoljaca i ispitanika s MDS-om malene s obzirom na broj ispitanika (18 zdravih ispitanika i 41 ispitanik s MDS-om), u literaturi su uspoređivane i manje grupe (1 – 20 zdravih dobrovoljaca i 20 – 45 ispitanika s MDS-om). No, valja pretpostaviti da je nepostojanje statistički značajne razlike genske ekspresije specifičnih miRNA u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema ispitanicima s MDS-om moguće i zbog malog broja ispitanika u skupinama, kao i da bi istraživanje provedeno na većem broju ispitanika vjerojatno moglo utvrditi statistički značajne razlike genske ekspresije ovih miRNA.

U literaturi se povišene razine genskih ekspresija miR-125a i miR-99b dovode u vezu s lošijom prognozom MDS-a, najvjerojatnije zbog poremećene hematopoeze i stanične diferencijacije koje uzrokuju funkcionalne promjene stanica periferne krvi (anemiju, trombocitopeniju i, rjeđe, neutropeniju) (98, 100).

Kardum Paro i suradnici su na 33 MDS bolesnika i 4 kontrolna ispitanika analizom genskih ekspresija miR-125a i miR-99b, našli gotovo dvostruku vrijednost u odnosu prema normaliziranim razinama genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca (cell-miR-39; 2,30 prema 1,90), a razina promjene genskih ekspresija miR-125a i miR-99b bila je više od dva puta viša od razine promjene genske ekspresije miR-125b.

Statistički značajna razlika genske ekspresije specifičnih miRNA u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS nije nađena. Ostali korelacijski koeficijenti nisu bili statistički značajni (111).



Ograničenja ovog rada su relativno mali broj bolesnika te heterogena populacija MDS bolesnika.

Unatoč tom ograničenju, ovi rezultati ukazuju na moguću važnost miR-99b i miR-125a kao dijagnostičke markera kod MDS-a, dok klaster miR-125a, miR-125b, miR-99b, let-7a može predstavljati koristan dijagnostički biljeg u MDS. Unatoč malom broju MDS bolesnika, miR-125a se pokazao i kao prognostički biljeg MDS.

S obzirom na nedavne studije o neinvazivnom dijagnostičkom modelu u MDS, cirkulirajuća miRNA može biti dodatni parametar koji će doprinijeti većoj osjetljivosti i specifičnosti neinvazivnih dijagnostičkih testova.

## 7. ZAKLJUČAK

U ovom radu dokazana je dijagnostička vrijednost miR-99b i miR-125a u grupi bolesnika s neliječenim MDS.

Razina promjene genske ekspresije miR-99b u ispitanika s MDS-om bila je više od četiri puta viša od normaliziranih razina genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca, što bi moglo upućivati na to da je upravo ovaj MDS specifičan miRNA najvažniji član klastera miR-125a, miR-125b, miR-99b i miR-let-7a u patogenezi MDS.

Razina miR-125a značajno negativno korelira s brojem eritrocita i razinom hemoglobina kod dijagnoze MDS, ali ima i prognostičku vrijednost.

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, u ispitanika s MDS-om niskog rizika dokazana je povišena razina genske ekspresije miR-let-7a u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS visokog rizika. U ovom radu, s obzirom da je miR-let-7a analiziran kod njih 10, nije utvrđena statistički značajna korelacija.

U ovom radu, uočena je povišena razina miR-125a kod MDS bolesnika s viškom blasta i multilinijskom displazijom (MDS visokog rizika).

miR-99b značajno pozitivno korelira s brojem leukocita. Iako analizirane na malom broju MDS bolesnika, u ovom radu uočene su više srednje razine izražaja miR-125a, miR-125b i miR-99b kod MDS bolesnika višeg rizika po WHO klasifikaciji.

Kako su odabrane miRNA uključene u brojne epigenetske mehanizme hematopoeze, praćenje razine promjene miRNA u plazmi pomoglo bi na neinvazivan način u praćenju MDS bolesnika niskog ili intermedijarnog rizika.

## 8. KRATKI SADRŽAJ

Mijelodisplastični sindrom (MDS) je skupina heterogenih klonskih hematoloških poremećaja hematopoetskih matičnih stanica, praćenih neučinkovitim hematopoezom jedne ili više staničnih linija uz pojavu posljedičnih citopenija s povišenim rizikom od progresije u akutnu mijeloičnu leukemiju. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije, dijagnoza MDS temelji se na morfološkim, kliničkim, citogenetičkim, imunofenotipskim i biološkim kriterijima.

U svakodnevnoj kliničkoj praksi dijagnoza MDS čini se invazivnom citomorfološkom analizom stanica periferne krvi i koštane srži, određivanjem postotka blasta, tipa i stupnja displazije, prisutnosti prstenastih sideroblasta i citogenetičkoj analizi stanica koštane srži.

Mikroglasničke ribonukleinske kiseline (miRNA) kratke su, nekodirajuće molekule duljine 18 do 25 nukleotida, koje imaju važnu ulogu u regulaciji razvoja i metabolizma stanica, njihovoj diferencijaciji i proliferaciji, regulaciji staničnog ciklusa i stanične smrti. Tumorske stanice oslobađaju miRNA u cirkulaciju (plazmu, serum) gdje ostaju relativno stabilni. Iako je njihovo otkriće omogućilo povezivanje bolesti i genske ekspresije miRNA, preduvjet za njihovu kliničku primjenu jest određivanje genske ekspresije kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu uz zadovoljavajuću učinkovitost i specifičnost. U literaturi se genska ekspresija miRNA dovodi u vezu s dijagnozom, klasifikacijom i progresijom različitih bolesti.

Provedena su istraživanja o molekularnim mehanizmima i epigenetičkim putovima u MDS te njihovu prognostičkom i terapijskom značenju, ali je ograničen broj studija dokazao važnost miRNA u dijagnostici MDS.

Cilj rada bilo je ispitivanje razine promjene genskih ekspresija specifičnih miRNA (miR-125a, miR-99b, miR-126, miR-125b, miR-let-7a) u plazmi zdravih dobrovoljaca i ispitanika s dijagnozom MDS.

Genske ekspresije navedenih, specifičnih miRNA određene su u uzorcima plazme zdravih dobrovoljaca (18) i ispitanika s MDS-om (41). U ovom radu je prvi put opisan izražaj odabranog klastera miRNA (125a, 125b, 99b, let-7a) u plazmi neliječenih MDS bolesnika.

Dokazana je značajna razlika između ispitivane skupine i zdrave kontrole u razini miR-99b, gdje se kod normaliziranih vrijednosti u odnosu na miR-126, uočava povećana razina kod ispitanika u odnosu na kontrolu za 4,521 puta ( $P=0,004$ ).

Uočena je dijagnostička, ali i prognostička važnost miR-125a koji negativno korelira s brojem eritrocita i razinom hemoglobina kod dijagnoze MDS.

Rezultati istraživanja upućuju na to da bi genske ekspresije miR (125a, 125b, 99b, let7a) mogle biti regulirane istim mehanizmom i da bi mogle biti klinički važne u ispitanika s MDS.

Ključne riječi: mijelodisplastični sindrom, mikroRNA, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a

## 9. SUMMARY

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of heterogeneous clonal hematologic disorders of hematopoietic stem cells, followed by ineffective hematopoiesis of one or more cell lines with the onset of consequent cytopenia with an increased risk of progression to acute myeloid leukemia. According to the World Health Organization classification, the diagnosis of MDS is based on morphological, clinical, cytogenetic, immunophenotypic and biological criteria.

In everyday clinical practice, the diagnosis of MDS is based on invasive cytomorphological analysis of peripheral blood and bone marrow cells, determination of blast percent, type and degree of dysplasia, presence of ring sideroblasts, and cytogenetic analysis of bone marrow cells.

Micro Messenger Ribonucleic Acids (miRNAs) are short, non-coding molecules of 18 to 25 nucleotides in length that play an important role in regulating cell development and metabolism, their differentiation and proliferation, regulation of the cell cycle and cell death. Tumor cells release miRNAs into the circulation (plasma, serum) where they remain relatively stable. Although their discovery allowed linking of disease and miRNA gene expression, a precondition for their clinical application was the determination of gene expression by real-time quantitative polymerase chain reaction with satisfactory efficacy and specificity. In the literature, gene expression of miRNAs has been linked to the diagnosis, classification and progression of various diseases.

Many studies have been conducted so far about the molecular mechanisms and epigenetic pathways in MDS and their prognostic and therapeutic significance, but few studies have analyzed the importance of miRNAs in MDS.

The aim of this study was to examine the level of change of gene expression of specific mRNAs (miR-125a, miR-99b, miR-126, miR-125b, miR-let-7a) in plasma of healthy volunteers and subjects diagnosed with MDS.

Gene expression of these specific mRNAs was determined in plasma samples from healthy volunteers (18) and subjects with MDS (41). This paper describes for the first time the expression of a selected miRNA cluster (125a, 125b, 99b, let-7a) in the plasma of untreated MDS patients.

A significant difference was found between the study group and healthy control in miR-99b level, where at normalized values relative to miR-126, an increased level in subjects compared to control was observed 4,521 times ( $P = 0.004$ ).

Diagnostic and prognostic significance of miR-125a was observed and correlated negatively with erythrocyte count and hemoglobin level in the diagnosis of MDS. The results of the study suggest that gene expression of miRNA (125a, 125b, 99b, let7a) could be regulated by the same mechanism and may be clinically relevant in subjects with MDS.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome, microRNA, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a

**Expression of circulating microRNA (miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-99b, miR-let7a) in myelodysplastic syndrome patients (Inga Mandac Rogulj, MD, 2020)**

## 10. POPIS LITERATURE

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(1):7-30.
2. Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol.* 2005;1(1):37-50.
3. Tobore TO. On the need for the development of a cancer early detection, diagnostic, prognosis, and treatment response system. *Future Sci OA.* 2019;6(2):FSO439.
4. Zhang X, Sun XF, Shen B, Zhang H. Potential applications of DNA, RNA and protein biomarkers in diagnosis, therapy and prognosis for colorectal cancer: a study from databases to AI-assisted verification. *Cancers (Basel).* 2019;11(2).
5. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncol Lett.* 2018;15(3):2735-2742.
6. Rafael B, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2014;124(18):2793-2803.
7. Cogle CR. Incidence and burden of the myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Malignancy Rep.* 2015;10:272-281.
8. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer.* 2007; 109:1536-1542.
9. Ma X, Lim U, Park Y, Mayne ST, Wang R, Hartge P, et al. Obesity, lifestyle factors, and risk of myelodysplastic syndromes in a large US cohort. *Am J Epidemiol.* 2009;169(12):1492-1499.
10. Green J, Cairns BJ, Casabonne D, Wright FL, Reeves G, Beral V. Million Women Study collaborators. Height and cancer incidence in the Million Women Study: prospective cohort, and meta-analysis of prospective studies of height and total cancer risk. *Lancet Oncol.* 2011;12(8):785-794.
11. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29 (1): 415-445.
12. Veldhuis-Vlug AG, Rosen CJ. Clinical implications of bone marrow adiposity. *Intern Med.* 2018;283(2):121-139.
13. Aznab M, Kavianymoghadam K. Secondary myelodysplastic syndrome may happen same as paraneoplastic syndrome in a period of time and prior to the appearance of malignancy: A case study of 6 patients. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2013;7(2):30-34.
14. Konde AS, Srivastava P, Puppala M, Wong S, Pingali SR, Iyer SP. Risk of myelodysplasia in patients post solid organ transplant: A review of recent trends from a tertiary transplantation center. *JCO* 2016;34(15):7064-7064.

15. Ertz-Archambault N, Kosiorek H, Taylor GE, Kelemen K, Dueck A, Castro J, i sur. Association of therapy for autoimmune disease with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *JAMA Oncol.* 2017;3(7):936–943.
16. Ippoliti G, Rinaldi M, Pellegrini C, Viganò M. Incidence of cancer after immunosuppressive treatment for heart transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1):101-113.
17. Chua CC, Fleming S, Wei AH. Clinicopathological aspects of therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019;32(1):3-12.
18. Ahmad OF, Keane MG, McCartney S, Khwaja A, Bloom SL. Azathioprine-associated myelodysplastic syndrome in two patients with ulcerative colitis. *Frontline Gastroenterol.* 2013;4(3):205-209.
19. Visconte V, Tiu RV, Rogers HJ. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res.* 2014;49(4):216-227.
20. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2017;17(1):5-19.
21. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes. *Mayo Clinic Proceedings* 2015;90(7):969-983.
22. Zini G. Diagnostics and prognostication of myelodysplastic syndromes. *Ann Lab Med.* 2017;37(6):465-474.
23. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP i sur. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.*2015;126(1):9-16.
24. Valent P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: diagnostic criteria, separation from MDS and clinical implications. *Pathobiology.* 2019;86(1):30-38.
25. Tanaka TN, Bejar R. MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood.*2019;133(10):1086-1095.
26. Malcovati L, Cazzola M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:299-307.
27. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93:129-147.
28. Chung SS, Park CY. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2017;1(26):2572-2578.



29. Heuser M, Yun H, Thol F. Epigenetics in myelodysplastic syndromes. *Semin Cancer Biol.* 2018; 51:170-179.
30. Itzykson R, Kosmider O, Fenaux P. Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26(4):355-364.
31. Lee SJ, Park JK, Lee EY, Joo SH, Jung KC, Lee EB, i sur. Certain autoimmune manifestations are associated with distinctive karyotypes and outcomes in patients with myelodysplastic syndrome: a retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(13):e3091.
32. Gredelj Šimec Nj, Kaić G, Škrtić A, Šiftar Z, Lasan-Trčić R, Valković T, i sur. Smjernice za dijagnozu i liječenje bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom. *Liječ Vjesn.* 2017;139:1–11.
33. Weinberg OK, Hasserjian RP. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol.* 2019;56(1):15-21.
34. Wang R, Gross CP, Halene S, Ma X. Comorbidities and survival in a large cohort of patients with newly diagnosed myelodysplastic syndromes. *LeukRes.* 2009;33(12):1594-1598.
35. Segquier J, Gelsi-Boyer V, Ebbo M, Hamidou Z, Charbonnier A, Bernit E i sur. Autoimmune diseases in myelodysplastic syndrome favors patients survival: A case control study and literature review. *Autoimmun Rev.* 2019;18(1):36-42.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, i sur. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51(2):189-199.
37. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO classification of the myelodysplastic syndromes and related myeloid neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016;16(11):607-609.
38. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, LeBeau MM i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-2405.
39. Sanz-De Pedro M, Wang W, Kanagal-Shamanna R, Khoury JD. Myelodysplastic syndromes: laboratory workup in the context of new concepts and classification criteria. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018 ;13(6):467-476.
40. Greenberg P, Stone R, Al-Kali A, Bejar R, Bennett JM, Brunner AM, i sur. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of National Comprehensive Cancer Network* 2018 Oct.
41. Jonas BA, Greenberg PL. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015;28(1):3-13.

42. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120:2454-2465.
43. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, Nösslinger MT, Valent P, Fonatsch C, i sur. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2005;19:2223–2231.
44. Triantafyllidis I, Ciobanu A, Stanca O, Lupu AR. Prognostic factors in myelodysplastic syndromes. *Maedica (Buchar)*. 2012;7(4):295-302.
45. Sotirova T, Stojanovic A, Genadieva-Stavric S, Krstevska S, Spasovski D, Balkanov T. Influence of Prognostic Factors on Overall Survival in Myelodysplastic Syndromes. *Mater Sociomed*. 2014;26(5):292-296.
46. Gangat N, Mudireddy M, Lasho TL, Finke CM, Nicolosi M, Szuber N, i sur. Mutations and prognosis in myelodysplastic syndromes: karyotype-adjusted analysis of targeted sequencing in 300 consecutive cases and development of a genetic risk model. *Am J Hematol*. 2018;93(5):691-697.
47. Wang F, Ni J, Wu L, Wang Y, He B, Yu D. Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *J Cancer*. 2019;10(5):1325–1332.
48. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, i sur. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011;364:2496-2506.
49. Brunner AM, Steensma DP. Recent advances in the cellular and molecular understanding of myelodysplastic syndromes: implications for new therapeutic approaches. *Clin Adv Hematol Oncol* 2018;16(1):56-66.
50. Giagounidis A. Current treatment algorithm for the management of lower-risk MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017; 8;(1):453-459.
51. Santini V. Treatment of low-risk myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016; (1):462-469.
52. Castelli R, Schiavon R, Rossi V, Deliliers GL. Management of anemia in low-risk myelodysplastic syndromes treated with erythropoiesis-stimulating agents newer and older agents. *Med Oncol*. 2018;(5):76.
53. Almeida A, Fenaux P, List AF, Raza A, Platzbecker U, Santini V. Recent advances in the treatment of lower-risk non-del(5q) myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*. 2017;52:50-57.
54. Basood M, Oster HS, Mittelman M. Thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes: still an unsolved problem. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(1):e2018046.

55. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561.
56. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-296.
57. Suzuki HI, Miyazono K. Emerging complexity of microRNA generation cascades. *J Biochem*. 2011;149(1):15-25.
58. Bernardo BC, Charchar FJ, Lin RC, McMullen JR. A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques. *Heart Lung Circ*. 2012;21(3):131-42.
59. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(8):2697-706.
60. Rodriguez A1, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10A):1902-1910.
61. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009;7(4):147-154.
62. Faraldi M, Sansoni V, Perego S, Gomarasca M, Kortas J, Ziemann E, i sur. Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med (Zagreb)*. 2020;30(1):010703.
63. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, Houliind K, Andersen RF, Brasen CL. Quantification of microRNA levels in plasma - Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One*. 2018 ;13(7):e0201069.
64. Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb Haemost*. 2012;108(4):592-598.
65. Filipów S, Łaczmański Ł. Blood circulating mirnas as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response. *Front Genet*. 2019;10:169.
66. Sharma S, Gurudutta G. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cells. *Int J Stem Cells*. 2016;9(1):36-43.
67. Pronk E, Raaijmakers M. The mesenchymal niche in MDS. *Blood*. 2019;133:1031-1038.
68. Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:311-336.
69. Faruq O, Vecchione A. MicroRNA: diagnostic perspective. *Front Med*. 2015;3(2):51.

70. Vasilatou D, Papageorgiou SG, Dimitriadis G, Pappa V. Epigenetic alterations and microRNAs: new players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Epigenetics*. 2013;8:561-570.
71. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao SD, Gibson WSJ, Balazs AB, Baltimore D. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14235-14240.
72. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, Reimer C, Keihani S, Maroz A, i sur. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF $\beta$  and Wnt signaling. *GenesDev*. 2014;28(8):858-874.
73. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.
74. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, i sur. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-9.
75. Yeh CH, Moles R, Nicot C. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Mol Cancer*. 2016;15(1):37.
76. Wallace JA, O'Connell RM. MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. *Blood*. 2017;130(11):1290-1301.
77. Bi L, Sun L, Jin Z, Zhang S, Shen Z. MicroRNA-10a/b are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*. 2018;15(4):5611-5619.
78. Hornick NI, Huan J, Doron B, Goloviznina NA, Lapidus J, Chang BH, Kurre P. Serum exosome microRNA as a minimally-invasive early biomarker of AML. *Sci Rep*. 2015;5:11295.
79. Abdelhalim DA, Elgamal BM, ElKafoury MR, Hassan NM, Hussein MM, Elhefnawi MM, i sur. MicroRNA-150 down regulation in acute myeloid leukaemia patients and its prognostic implication. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(11):1993-2000.
80. Gabra MM, Salmena L. microRNAs and acute myeloid leukemia chemoresistance: a mechanistic overview. *Front Oncol*. 2017;7:255.
81. Stamatopoulos B, Van Damme M, Crompton E, Dessars B, Housni H, Mineur P. et al. Opposite Prognostic Significance of Cellular and Serum Circulating MicroRNA-150 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Med*. 2015;21(1):123-133.
82. Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Bühler A, Kienle D, i sur. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(16):3801-3808.
83. Giza DE, Calin GA. MicroRNA and chronic lymphocytic leukemia. *Adv Exp Med Biol*. 2015;889:23-40.

84. Moussay E, Wang K, Cho JH, van Moer K, Pierson S, Paggetti J, i sur. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6573-8.
85. Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Pieters K, Anthoine G, Mineur P, i sur. A molecular score by quantitative PCR as a new prognostic tool at diagnosis for chronic lymphocytic leukemia patients. *PLoS One*. 2010; 5(9).
86. Tagawa H. MicroRNA in Malignant Lymphoma. *Adv Exp Med Biol*. 2015;889:41-50.
87. Wang Y, Sun D, Wang J, Dou A, Zheng C. Predictive value of microRNAs as novel biomarkers in detection of lymphoma. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):14479-14489.
88. Wang G, Zhao R, Zhao X, Chen XI, Wang D, Jin Y, i sur. MicroRNA-181a enhances the chemotherapeutic sensitivity of chronic myeloid leukemia to imatinib. *Oncol Lett*. 2015;10(5):2835-2841.
89. Jurkovicova D, Lukackova R, Magyerkova M, Kulcsar L, Krivjanska M, Krivjansky V, i sur. MicroRNA expression profiling as supportive diagnostic and therapy prediction tool in chronic myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2015;62(6):949-958.
90. Rossi M, Tagliaferri P, Tassone P. MicroRNAs in multiple myeloma and related bone disease. *Ann Transl Med*. 2015;3(21):334.
91. Zhang J, Xiao X, Liu J. The role of circulating miRNAs in multiple myeloma. *Sci China Life Sci*. 2015;58(12):1262-1269.
92. Balatti V, Pekarky Y, Croce CM. Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. *J Hematol Oncol*. 2015;8:12.
93. Hussein K, Theophile K, Büsche G, Schlegelberger B, Göhring G, Kreipe H, Bock O. Aberrant microRNA expression pattern in myelodysplastic bone marrow cells. *Leuk Res*. 2010;34:1169-1174.
94. Liu L, Chen R, Zhang Y, Fan W, Xiao F, Yan X. Low expression of circulating microRNA-328 is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol*. 2015;10:109.
95. Shibayama Y, Kondo T, Ohya H, Fujisawa S, Teshima T, Iseki K. Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients. *Oncol Rep*. 2015;33(5):2176-2182.
96. Sokol L, Caceres G, Volinia S, Alder H, Nuovo GJ, Liu CG, i sur. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2011;153(1):24-32.
97. Pons A, Nomdedeu B, Navarro A, Gaya A, Gel B, Diaz T, i sur. Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(11):1854-1859.

98. Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, Belickova M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(3):313-9.
99. Erdogan B, Facey C, Qualtieri J, Tedesco J, Rinker E, Isett RB, i sur. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* 2011;39:915-926.
100. Rhyasen GW, Starczynowski DT. Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2012; 26:13-22.
101. Chen C. MicroRNAs in myelodysplastic syndromes: how much do we know and not know? *Leuk Res.* 2013; 37:241-2.
102. Calin GA, de Paula HM, Medeiros LJ, Fernandez MH, Shimizu M, Garcia-Manero G, i sur. Circulating microRNAs let-7a and miR-16 predict progression-free survival and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2011;118(2):413–415.
103. Zuo Z, Maiti S, Hu S, Loghavi S, Calin GA, Garcia-Manero G et al. Plasma circulating-microRNA profiles are useful for assessing prognosis in patients with cytogenetically normal myelodysplastic syndromes. *Mod Pathol.* 2015;28,373-382.
104. Kim Y, Cheong J-W, Kim Y-K, Eom J-I, Jeung H-K, Kim SJ, i sur. Serum microRNA-21 as a potential biomarker for response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes. *PLoS ONE* 2014;9(2):e86933.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086933>
105. de Leeuw DC, Denkers F, Olthof MC, Rutten AP, Pouwels W, Schuurhuis GJ, i sur. Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34+38- stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication. *Cancer Res.* 2014;74(7):2094-2105.
106. Zuo Z, Calin GA, de Paula HM, Medeiros LJ, Fernandez MH, Shimizu M, i sur. Circulating microRNAs let-7a and miR-16 predict progression-free survival and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2011;118:413-415.
107. Banzhaf-Strathmann J, Edbauer D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal.* 2014;12:30.
108. Ooi AG, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY. MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21505-21510.
109. Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, Pierce S, Bueso-Ramos C, Calin G, i sur. Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF-κB activation and enhances erythroid differentiation arrest. *PLoS One.* 2014;9(4):e93404.

110. Milunović V, Mandac Rogulj I, Planinc-Peraica A, Bulycheva E, Ostojic Kolonic S. The role of microRNA in myelodysplastic syndromes: beyond DNA methylation and histone modification. *Eur J Haematol.* 2016;96(6):553-563.
111. Kardum Paro MM, Mandac Rogulj I, Kaić G, Jelić Puškarić B, Kardum-Skelin I, Škrtić A i sur. Ekspresija mikroRNK (miRNK) u mijelodisplastičnom sindromu (MDS). *Liječ Vjesn.* 2019;141(7-8):226-232.
112. Mandac Rogulj I, Milunović V, Kardum Paro MM, Radić Krišto D, Kaić G, Ostojic Kolonic S. Izražaj cirkulirajućeg mikroRNK u mijelodisplastičnom sindromu. *Liječ Vjesn.* 2019;141(7-8):233-237.
113. Bastida JM, López-Godino O, Vicente-Sánchez A, Bonanad-Boix S, Xicoy-Cirici B, Hernández-Sánchez JM, i sur. Hidden myelodysplastic syndrome (MDS): A prospective study to confirm or exclude MDS in patients with anemia of uncertain etiology. *Int J Lab Hematol.* 2019;41(1):109-117.
114. Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(46):783-90. doi: 10.3238/arztebl.2013.0783. PMID: 24300826; PMCID: PMC3855821.)
115. Wang F, Ni J, Wu L, Wang Y, He B, Yu D. Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *J Cancer.* 2019;10(5):1325-1332.
116. Mohammad AA. Myelodysplastic syndrome from theoretical review to clinical application view. *Oncol Rev.* 2018;12(2):397.
117. Oster HS, Carmi G, Kolomansky A, Joffe E3, Kaye I Kirgner I, i sur. Is bone marrow examination always necessary to establish the diagnosis of myelodysplastic syndromes? A proposed non-invasive diagnostic model. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(9):2227-2232.

## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

Inga Mandac Rogulj, dr. med. rođena je 1979. godine u Sinju, gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Godine 1998. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je Dekanove nagrade u akademskoj godini 2003/2004. Diplomirala je 2004. godine. Od rujna 2004. godine do svibnja 2006. godine bila je znanstveni novak na Katedri za farmakologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od svibnja 2006. godine zaposlena je u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Merkur. Godine 2010. položila je specijalistički ispit iz interne medicine, a 2013. godine subspecijalistički ispit iz hematologije. U sklopu subspecijalizacije iz hematologije, provela je 6 mjeseci na usavršavanju u Seattle Cancer Care Alliance, University of Washington, Sjedinjene Američke Države.

Godine 2009. upisala je poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je odslušala i položila sve ispite.

Obavlja funkciju rizničarke u Hrvatskom društvu za hematologiju, gdje je i član Upravnog odbora. Sudjeluje u europskim projektima iz područja mijelodisplastičnog sindroma te je koordinator za Hrvatsku. Sudjeluje u domaćim znanstvenim projektima, te je istraživač/koordinator u nekoliko kliničkih ispitivanja iz područja hematologije.

Publicirala je niz radova od kojih je 10 indeksirano u Current Contents bazi. Sudjelovala je kao pozvani predavač na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima.