

# Prognostički značaj citogenetike u mijelodisplastičnom sindromu

---

Perica, Dražen

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:105:350536>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dražen Perica**

**Prognostički značaj citogenetike u mijelodisplastičnom sindromu**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju, Klinike za internu medicinu  
Kliničke bolnice Merkur, pod vodstvom prof.dr.sc Slobodanke Ostojić Kolonić i predan je na  
ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

Mentor: prof. dr. sc. Slobodanka Ostojić Kolonić

## Popis kratica korištenih u pisanju rada

**AML** – akutna mijeloična leukemija

**del(5q)** – Delecija dugog kraka 5. Kromosoma

**FISH** – fluorescentna in situ hibridizacija

**IPSS** - International Prognostic Scoring System (Internacionalni prognostički sustav bodova)

**IPSS-R** – Revised international Prognostic Scoring System (Revidirani internacionalni prognostički sustav bodova)

**KS** – koštana srž

**LOM** – liječnik obiteljske medicine

**MDS** – mijelodisplastični sindrom

**MDS-EB** - Mijelodisplastični sindrom sa suviškom blasta

**MDS-MLD** - Mijelodisplastični sindrom s višelinijском displazijom

**MDS-RS** - Mijelodisplastični sindrom sa prstenastim sideroblastima

**MDS-RS-MLD** - Mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima i višelinijском displazijom

**MDS-RS-SLD** - Mijelodisplastični sindrom s prstenastim sideroblastima i jednolinijском displazijom

**MDS-SLD** - Mijelodisplastični sindrom sa jednolinijском displazijom

**MDS-U** – Mijelodisplastični sindrom neklasificirani

**PK** – periferna krv

**RA** - refraktorna anemija

**RAEB-1**- Refraktorna anemija sa suviškom blasta 1

**RAEB-2** -Refraktorna anemija sa suviškom blasta 2

**RARS** - Refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima

**RCMD** - Refraktorna citopenija s višelinijском displazijom

**RCUD** - Refraktorna citopenija s unilinijском displazijom

**RN** - refraktorna neutropenija

**RT** - refraktorna trombocitopenija

**SZO** – Svjetska zdravstvena organizacija

**WPSS** - WHO classification-based Prognostic Scoring System (prognostički sustav bodova baziran na klasifikaciji SZO)

# Sadržaj

Sažetak

Summary

Uvod .....	1
Definicija .....	1
Klasifikacija.....	1
Epidemiologija.....	4
Etiopatogeneza .....	4
Klinička slika .....	5
Dijagnostika.....	5
Prognostički rizik .....	5
IPSS.....	6
IPSS-R .....	7
WPSS .....	8
Citogenetika .....	9
Liječenje .....	9
Liječenje MDS niskog rizika .....	9
Liječenje sindroma del(5q).....	10
Liječenje MDS visokog rizika .....	10
Hipoteza .....	11
Cilj rada .....	11
Metode i ispitanici .....	12
Izrada kariograma .....	12
Kratkotrajna kultura stanica koštane srži .....	12
Priprema predmetnih stakalaca.....	13
GTG – pruganje kromosoma .....	13
Statistika.....	13
Rezultati .....	14
Rasprava.....	34
Zaključak .....	36
Limitacije.....	38
Zahvale.....	39
Literatura .....	40
Životopis .....	41

## Sažetak

### **Dražen Perica: Prognostički značaj citogenetike u mijelodisplastičnom sindromu**

#### Uvod

Mijelodisplastični sindrom (MDS) je skupina klonalnih hematopoetskih poremećaja koji se očituju jednom ili više citopenija te sklonošću za transformaciju u akutnu mijeloičnu leukemiju. Kariogram pri dijagnozi ima veliku ulogu u stratificiranju ovih bolesnika u različite rizične skupine s obzirom na ishod te bolesti.

#### Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je bilo odrediti prognostički značaj MDS-a u retrospektivnoj skupini bolesnika liječenih u periodu 1.11.2014. do 1.4.2017. godine u jednoj ustanovi.

#### Metode:

Retrospektivno smo analizirali sve povijesti bolesti bolesnika s novo dijagnosticiranim MDS-om u Kliničkoj bolnici Merkur. Glavni ključni kriterij je bio postojanje kariograma.

#### Rezultati:

U istraživanje je uključen ukupno 30 bolesnika medijana starosti 68.4 godine. Medijan preživljenja ovih bolesnika je bio 13 mjeseci s dvogodišnjim preživljenjem od 24%. U analizi povezanosti bolesnika s kariogramom prema IPSS i IPSS-R prognostičkim indeksima nije bilo statistički značajne povezanosti, vjerojatno zbog malenog broja ispitanika u ovoj skupini. Kao sekundarne ciljeve postavili smo povezanost dijagnoze podtipa prema klasifikaciji SZO i broja blasta u aspiratu koštane srži. U bolesnika s MDS-om RAEB I i II postajala je statička tendencija lošijem preživljenju ( $p=0.066$ ) s jasnom separacijom krivulja. Što se tiče broja blasta u koštanoj srži, oni bolesni s manje od 2% blasta su imali bolje ishode s tendencijom prema statističkoj značajnosti ( $p=0.06$ )

#### Zaključak:

U ovom istraživanju, najvjerojatnije zbog malenog broja bolesnika, nije pokazana povezanost ukupnog preživljenja s nalazom kariograma, no time se ne odbija značaj ove pretrage u MDS-u jer su originalne i validacijske studije rađene na puno većem broju ispitanika. Nadalje, medijan preživljenja u našoj skupini je nešto niži od drugih studija što se može obrazložiti nedostupnosti pojedinih lijekova za ovu populaciju. Najvažniji nalaz ovog istraživanja da je uključeno tek 30 bolesnika što ukazuje da u svakodnevnoj praksi ova bolest ostaje dijagnostički zanemarena.

Ključne riječi: MDS, citogenetika, prognoza

## Summary

### **Dražen Perica Prognostic value of cytogenetics in myelodysplastic syndrome**

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a group of clonal haematopoietic disorders that are manifested by one or more cytopenia and have a tendency to transform into acute myeloid leukaemia. Cytogenetic analysis has a significant role in stratifying these patients in different risk groups regarding the outcome of the disease.

Research goals:

The aim of this study was to determine the prognostic significance of MDS in a retrospective group of patients treated in the period from 1.11. 2014 to 1.4. 2017 in one institution.

Methods:

The history of illness of the patients with newly diagnosed MDS in the Merkur University Hospital in Zagreb was retrospectively analysed. The main inclusion criteria was the existence of a cytogenetic analysis.

Results:

The study included a total of 30 patients, the median of age was 68.4 years. The median survival rate of these patients was 13 months with two-year survival rate of 24%. There was no statistically significant correlation between the survival rate and cytogenetic analysis based on the IPSS and the IPSS-R prognostic index, probably due to the small number of subjects in this group. As a secondary objective, the relationship between subtype diagnosis according to the World Health Organization classification and the number of blasts in the aspiration of the bone marrow was analysed. In patients with MDS RAEB I and RAEB II, a static tendency for poorer survival rate ( $p = 0.066$ ) with a clear separation of curves became apparent. As for the patients with the blasts in their bone marrow, those which had less than 2% of blasts had better outcomes with a tendency towards statistical significance ( $p = 0.06$ ).

Conclusion:

In this study, most likely due to the small number of patients, no correlation of total survival rate with the finding of the cytogenetic analysis has been demonstrated, but this does not negate the significance of this diagnostic method for MDS since the original and validation studies were conducted on a much larger number of subjects. Furthermore, median survival rate in our group is somewhat lower than other studies, which may be explained by the unavailability of certain drugs for this population. The most important finding of this study is that only 30 patients are involved in it, which indicates that in daily practice this disease remains diagnostically neglected.

Key words: MDS, cytogenetics, prognosis

# Uvod

## Definicija

Mijelodisplastični sindrom (MDS) obuhvaća skupinu klonalnih poremećaja krvotvorne matične stanice u koštanoj srži (KS). Obilježena su različitim kvantitativnim i kvalitativnim poremećajima koji mogu zahvaćati jednu ili sve tri mijeloične loze. Također uz zatajivanje KS prisutne su i razne citogenetičke i molekularne abnormalnosti. MDS se prezentira citopenijama u perifernoj krvi, infekcijama, krvarenjem, a kod oko 30% bolesnika ima rizik progresije u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML). (1)(2)

## Klasifikacija

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) 2016. godine revidirala je klasifikaciju MDS zbog eksponencijalnog rasta broja informacija i novih saznanja o genetici MDS-a. Upravo zbog toga je došlo do spoznaje da se prošla klasifikacija SZO iz 2008. godine. (3) uglavnom oslanjala na stupanj displazije, postotak blasta i specifičan tip citopenije ( eg, refraktorna anemija ) koji u novoj klasifikaciji nema velikog značaja. Nadalje, pokazalo se da displazije pojedinih loza / linija morfološki nije odgovarala specifičnim citopenijama. Zato se odbacila stara klasifikacija i uvela nova koja u obzir uzima: jednolinijske ili multilinijske displazije, prstenaste sideroblaste, suvišak blasta, citogenetičku abnormalnost del( 5q) i neklasificirane. (Vidi tablicu 1 ) (2). Kako je klasifikacija iz 2016. godine relativno nova, danas je još uvijek u upotrebi klasifikacija iz 2008. ( Vidi tablicu 2 ) (3)



**Tablica 1 Klasifikacija SZO 2016. (2)**

Naziv	Displastične linije	Citopenije*	Prstenasti sideroblasti % KS eritoidnih elemenata	Broj blasta u KS i PK	Citogenetika Kariotip
<b>MDS sa jednolinijskom Displazijom (MDS-SLD)</b>	1	1 ili 2	<15%/5%	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji,osim ako ne zadovoljava kriterije za MDS sa izoliranim del(5q)
<b>MDS s višelinijom displazijom (MDS-MLD)</b>	2 ili 3	1-3	<15%/<5%	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji,osim ako ne zadovoljava kriterije za MDS sa izoliranim del(5q)
<b>MDS sa prstenastim sideroblastima (MDS-RS)</b>					
<b>MDS-RS s jednolinijskom displazijom (MDS-RS-SLD)</b>	1	1 ili 2	≥15%/≥5%	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji,osim ako ne zadovoljava kriterije za MDS sa izoliranim del(5q)
<b>MDS-RS sa višelinijom displazijom (MDS-RS-MLD)</b>	2 ili 3	1-3	≥15%/≥5%	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji,osim ako ne zadovoljava kriterije za MDS sa izoliranim del(5q)
<b>MDS sa izoliranim del(5q)</b>	1-3	1-2	Nema ili bilo koji	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	del(5q) sama ili jedna dodatna abnormalnost, osim -7 ili del(7q)
<b>MDS sa suviškom blasta (MDS-EB)</b>					
<b>MDS-EB-1</b>	0-3	1-3	Nema ili bilo koji	KS5%-9% PK2%-4% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji
<b>MDS-EB-2</b>	0-3	1-3	Nema ili bilo koji	KS10%-19% PK5%-19% Ili Aurerovi štapići	Bilo koji
<b>MDS, neklasificirani (MDS-U)</b>					
<b>Sa 1% blasta u krvi</b>	1-3	1-3	Nema ili bilo koji	KS<5%,PK=1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji
<b>S jednolinijskom displazijom i pancitopenijom</b>	1	3	Nema ili bilo koji	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	Bilo koji
<b>Definirajuća citogenetička abnormalnost</b>	0	1-3	<15%	KS<5%,PK<1% Bez Aurerovih štapića	MDS-definirajuća abnormalnost
<b>Refraktorna citopenija u djetinjstvu</b>	1-3	1-3	Nema	KS<5%,PK<2%	Bilo koji

\*Citopenija se definira kao: hemoglobin <10g/dL; broj trombocita<100x10<sup>9</sup>/L; i broj neutrofila <1.8x10<sup>9</sup>/L

**Tablica 2 Klasifikacija SZO 2008.(3)**

Naziv	Nalaz PK	Nalaz KS
<b>Refraktorna citopenija s unilinijskom displazijom (RCUD) refraktorna anemija (RA) refraktorna neutropenija (RN) refraktorna trombocitopenija (RT)</b>	Ucitopenija ili Bicitopenija Nema ili rijetki blasti <1%	Unilinijska displazija ≥ 10% stanica iz jedne mijeloične linije <5% blasta <15% eritroidnih prekursora su prstenasti sideroblasti
<b>Refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (RARS)</b>	Anemija Bez blasta	≥ 15% eritroidnih prekursora su prstenasti sideroblasti
<b>Refraktorna citopenija s višelinijjskom displazijom (RCMD)</b>	Citopenija/e Bez ili rijetki blasti <1% Bez Aurerovih štapića < 1x10 <sup>9</sup> /L monocita	Displazija ≥ 10% stanica ≥ 2 mijeloične linije <5% blasta Bez Aurerovih štapića ±15% prstenastih sideroblasta
<b>Refraktorna anemija sa suviškom blasta (RAEB-1)</b>	Citopenija/e <5% blasta Bez Aurerovih štapića < 1x10 <sup>9</sup> /L monocita	Unilinijska ili višelinijjska displazija 5%-9% blasta Bez Aurerovih štapića
<b>Refraktorna anemija sa suviškom blasta (RAEB-2)</b>	Citopenija/e 5%-9% blasta Aurerovi štapići ± < 1x10 <sup>9</sup> /L monocita	Unilinijska ili višelinijjska displazija 10%-19% blasta Aurerovi štapići ±
<b>MDS- neklasificirani (MDS-U)</b>	Citopenije <1% blasta	Nejednolika displazija <10% stanica jedne ili više mijeloične linije praćene citogenetičkim abnormalnostima <5% blasta
<b>MDS sa izoliranim del(5q)</b>	Anemija Normalan ili povišen broj trombocita Bez ili rijetki blasti <1%	Normalni ili povećan broj megakariocita sa hipolobuliranom jezgrom <5% blasta Izolirana del(5q) Bez Aurerovih štapića

## Epidemiologija

MDS je bolest starijih s incidencija od 5.1 na 100.000 stanovnika u godini dana. Primijećeno je da incidencija raste s godinama tako da u skupini od 65-69 godina incidencija doseže 13.5 na 100.000 stanovnika u godini dana, dok kod starijih od 85 godina dostiže čak 63.6 na 100.000 stanovnika.(1) Medijan dijagnoze bolesti je 71 godinu, a muškarci obolijevaju češće od žena.(4) Iz ovih podataka je vidljivo da je MDS najčešća hematološka bolest starije dobi. Medijan preživljena je 18 mjeseci. Preživljene ovisi o prognostičkom riziku. Pacijenti s MDS-om najčešće umiru od progresije bolesti u AML, zatim od infekcija, krvarenja, a velik broj ih umire od uzroka koji nisu direktno povezani s MDS-om.(4)

## Etiopatogeneza (5)

Još uvijek nije u potpunosti razjašnjena patogeneza ni etiologija MDS-a. Uzrok je poznat samo u oko 15% slučajeva, a radi se uglavnom o sekundarnom MDS koji je posljedica liječenja neke druge primarne neoplazme. Uglavnom se radi o radioterapiji i citostaticima najčešće iz skupine alkilirajućih lijekova i inhibitora topoizomerase II. MDS se može javiti i nakon okolišnoj izloženosti benzenu, ionizirajućem zračenju i pesticidima. Nasljedne sklonosti nisu vidljive kod starijih pacijenata, ali su vidljivi u pedijatrijskoj populaciji pogotovo kod djece s Downovim sindromom, Fanconijevom anemijom i neurofibromatozom. Razvoj MDS-a započinje oštećenjem jedne hematopoetske matične stanice koja postaje primarni klon. Taj klon ima citogenetička oštećenja koja dovode do drugih mutacija. Tako klon kroz vrijeme poprima somatske mutacije i dolazi do mutacije gena koji kodiraju transkripcijske faktore ( TP53), ali najviše su pogođeni epigenetski regulatori koji su zaduženi za metilaciju (DNMT3A) i hidroksimetilaciju (TET2, IDH1, IDH2) citozina ili kovalentnu modifikaciju histiona.(6) Te mutacije odgovorne su za klonalnu dominaciju i progresiju. Te mutacije nalazimo i u drugim mijeloidnim neoplazmama. Mutacije koje su specifične za MDS zahvaćaju gene koji kodiraju komponente spliceosoma (SF3B1). Pretpostavlja se da doprinose abnormalnoj retenciji željeza u mitohondrijima eritrocitnih prekursora i tako dovode do stvaranja prstenastih sideroblasta koji su specifični za MDS. Ovo su samo neki od mehanizama odgovornih za nastanak klonalne stanice koja izbjegava normalne regulacije staničnog ciklusa i izbjegava apoptozu što dovodi do propagacije danjih klonova. Nakon što jedna stanica klona bude izložena još mutacijama, onda postaje subklon i njena propagacija dovodi do bujanja i razvoja blasta koji vode do nastanka AML.

## Klinička slika (7)

MDS nema specifične kliničke slike, zato često bude ne prepoznat od strane liječnika obiteljske medicine (LOM). Može biti slučajan nalaz anemije, trombocitopenije ili neutrofilije pri rutinskom nalazu krvi. Simptomi su uglavnom vezani za lozu koja je najviše zahvaćena pa su prisutni umor, bljedilo i slabost (anemija), epistaksa, petehije, podljevi i krvarenje u sluznice (trombocitopenija), vrućica i infekcije (neutropenija). U kliničkom pregledu može se naći hepatosplenomegalija.

## Dijagnostika (8)

Svakom pacijentu sa sumnjom na MDS trebalo bi napraviti sljedeće pretrage: kompletnu krvnu sliku, biokemijske pretrage, koncentraciju eritropoetina i posebno biopsiju KS s patohistološkom analizom, na prvom mjestu da se isključe neka druga stanja koja se također prezentiraju s citopenijom. Nadalje, trebalo bi napraviti aspiraciju stanica KS da se odredi točan broj blasta, kariogram i dokazati standardnim bojenjem i imunohistokemijskim metodama kromosomske abnormalnosti. Od dodatnih pretraga se može još napraviti protočna citometrija punktata KS i PK na CD55 i CD59 za isključenje paroksizmalne noćne hemoglobinurije .(8)

## Prognostički rizik

Radi lakšeg odabira liječenja i procjene rizika transformacije u AML ukazala se potreba razvoja sustava bodova. Danas su u uporabi tri sustava prognostičkog rizika, koji smo koristili i u ovom radu: Internacionalni prognostički sustav bodova (IPSS)(9), revidirani internacionalni prognostički sustav bodova (IPSS-R)(10) i prognostički sustav bodova baziran na klasifikaciji SZO (WPSS)(11). Važno je napomenuti da je to rizik kod pacijenata koji nisu liječeni. Svaki od ovih sustava ima zasebne varijable koje se uzimaju u izračun, ali im je svima zajedničko da svi u izračunu uključuju citogenetiku. Kao što je već spomenuto citogenetičke abnormalnosti su česte i igraju veliku ulogu u liječenju MDS-a. IPSS i WPSS imaju po tri citogenetička razreda dok IPSS-R ima pet. Neke abnormalnosti poput del(5q) imaju bolju prognozu, dok neke poput abnormalnosti 7. kromosoma imaju lošiju.(9)(10)(11)

## IPSS

IPSS za izračun rizika koristi: broj blasta u KS, kariotip, i broj citopenija. Kriteriji za citopeniju su: neutrofili  $< 1.5 \times 10^9/L$ , trombociti  $< 100 \times 10^9/L$ , hemoglobin  $< 10 \text{ g/dL}$  (9)

Vidi tablicu 3

**Tablica 3 Računanje IPSS (9)**

BODOVI	BLASTI U KS (%)	KARIOTIP	CITOPENIJE
0	< 5	Dobar	0 ili 1
0.5	5 - 10	Intermedijarni	2 ili 3
1.0		Loš	
1.5	11 - 20		
2.0	21 - 30		

RAZRED KARIOTIPA	NALAZ KARIOGRAMA
DOBAR	normal, -Y, del(5q-), del(20q-)
INTERMEDIJARAN	Ostale abnormalnosti
LOŠ	Kompleksan ( $\geq 3$ abnormalnosti), abnormalnosti 7. kromosoma

BODOVI	KATEGORIJA RIZIKA	MEDIAN PREŽIVLJENJA BEZ LIJEČENJA (GODINE)	MEDIAN PREŽIVLJENJA BEZ AML (GODINE)
0	Nizak	5.7	5.7
0.5 - 1.0	Intermedijaran 1	3.5	2.7
1.5 - 2.0	Intermedijaran 2	1.2	0.95
$\geq 2.5$	Visok	0.4	0.3

## IPSS-R

IPSS-R je najnoviji i najkompleksniji sustav izračuna. U obzir uzima: broj blasta u KS, razinu hemoglobina, broj neutrofila i broj trombocita. Još jedna vrlo važna razlika je u tome što postoje pet razreda kariotipova, a ne tri kao u prethodnim klasifikacijama što stavlja poseban naglasak na važnost citogenetike u MDS. Vidi tablicu 4 (10)

**Tablica 4 Računanje IPSS-R (10)**

<b>BODOVI</b>	<b>RAZRED KAROTIPA</b>	<b>BLASTI U KS (%)</b>	<b>HEMOGLOBIN (G/DL)</b>	<b>TROMBOCITI (X 10<sup>9</sup>/L)</b>	<b>NEUTROFILI (X 10<sup>9</sup>/L)</b>
<b>0</b>	Jako dobar	≤ 2	≥ 10	≥ 100	≥ 0.8
<b>0.5</b>				50 - 99	< 0.8
<b>1.0</b>	Dobar	2.1 - 4.9	8 - 9.9	< 50	
<b>1.5</b>			< 8		
<b>2.0</b>	Intermedijaran	5 - 10			
<b>3.0</b>	Loš	> 10			
<b>4.0</b>	Jako loš				

<b>RAZRED KARIOTIPA</b>	<b>NALAZ KARIOGRAMA</b>
<b>JAKO DOBAR</b>	-Y, del(11q)
<b>DOBAR</b>	del(5q), del(12p), del(20q), dupla uključujući del(5q)
<b>INTERMEDIJARAN</b>	del(7q), +8, +19, i(17q), bilo koji jedan ili dubli klon
<b>LOŠ</b>	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dupla uključujući -7/del(7q), kompleksan s 3 abnormalnosti
<b>JAKO LOŠ</b>	Kompleksan >3 abnormalnosti

<b>BODOVI</b>	<b>KATEGORIJA RIZIKA</b>	<b>MEDIAN PREŽIVLJENJA BEZ LIJEČENJA (GODINE)</b>	<b>MEDIAN DA SE U 25% BOLESNIKA RAZVIJE AML (GODINE)</b>
≤ 1.5	Jako nizak	8.8	NR
2.0 - 3.0	Nizak	5.3	10.8
3.5 - 4.5	Intermedijaran	3.0	3.2
5.0 - 6.0	Visok	1.6	1.4
> 6.0	Vrlo visok	0.8	0.73

## WPSS

WPSS za izračun rizika koristi klasifikaciju SZO iz 2008.godine, kariotip i potrebu za transfuzijom. Vidi tablicu 5 (11)

**Tablica 5 WPSS (11)**

<b>BODOVI</b>	<b>SZO KLASIFIKACIJA</b>	<b>KARIOTIP</b>	<b>POTREBA ZA TRANSFUZIJOM</b>
<b>0</b>	RA, RARS, 5q-	Dobar	Nema potrebe
<b>1</b>	RCMD	Intermedijaran	Regularno
<b>2</b>	RAEB-1	Loš	
<b>3</b>	RAEB-2		

<b>RAZRED KARIOTIPA</b>	<b>NALAZ KARIOGRAMA</b>
<b>DOBAR</b>	normal, -Y, del(5q-), del(20q-)
<b>INTERMEDIJARAN</b>	Ostale abnormalnosti
<b>LOŠ</b>	Kompleksan ( $\geq 3$ abnormalnosti), abnormalnosti 7. kromosoma

<b>BODOVI</b>	<b>KATEGORIJA RIZIKA</b>	<b>MEDIAN PREŽIVLJENJA BEZ LIJEČENJA (MJESECI)</b>	<b>VJEROJATNOST PROGRESIJE U AML U SLJEDEĆE 2 GODINE</b>
<b>0</b>	Jako nizak	141	3%
<b>1</b>	Nizak	66	6%
<b>2</b>	Intermedijaran	48	21%
<b>3 - 4</b>	Visok	26	38%
<b>5 - 6</b>	Vrlo visok	9	80%

## Citogenetika(12)

Kao što smo već rekli MDS je bolest u kojoj citogenetika igra veliku ulogu, ne samo u dijagnostici nego i u liječenju. Kromosomske abnormalnosti nađene su u 50% do 60% pacijenta s MDS-om(12) Neke od najčešćih abnormalnosti koje se pojavljuju i za koje bi se moglo reći da su dokaz MDS su: del(5q), del(7q) i monosomija 7. kromosoma.(13) Ako standardno bojenje kromosoma tako zvano G-pruganje nije moguće napraviti, mora se napraviti fluorescentna in situ hibridizacija (FISH). Nedostatak te metode je što se s njom ne može raditi probir, nego treba tražiti točno određene abnormalnosti, preporučuje se da se naprave ranije navedene najčešće abnormalnosti.(12)

## Liječenje(8)

Kao što smo već spomenuli liječenje ovisi o riziku. Tako postoji shema za liječenje pacijenta s niskim rizikom i visokim rizikom. Pod nizak rizik spada: IPSS niskog i intermedijarnog-1 rizika(9), IPSS-R vrlo niskog, niskog i intermedijarnog rizika(10) i WPSS vrlo niskog, niskog i intermedijarnog rizika(11). Pod visoki rizik spada: IPSS intermedijarnog-2 i visokog rizika(9), IPSS-R intermedijarnog, visokog i vrlo visokog rizika(10) i WPSS visokog i vrlo visokog rizika.(11)

## Liječenje MDS niskog rizika(8)

Najveći naglasak je na liječenju signifikantne anemije što se definira razinom hemoglobina ispod 90 g/L kod muškaraca, a kod žena 80 g/L.(8) Prva linija je transfuzija eritrocita s ili bez keliranja željeza ( ovisi o broju transfuzija). Zbog učestalog broja transfuzija dolazi do nakupljanja željeza u ciljnim organima ( jetra, srce, mozak) koji ih onda oštećuje zato je potrebna kelacija i redovno praćenje feritina. Preporučuje se deferasiroks. Ako pacijenti imaju razinu eritropoetina <500mU/mL i manje od dvije transfuzije mjesečno mogu se liječiti eritropoetinom alfa ili beta. Ako na terapiju nije bilo odgovora može se dodati čimbenik rasta granulocita.



### Liječenje sindroma del(5q)(8)

Ova citogenetska promjena je izdvojena kao posebni entitet u svim klasifikacijama(3)(1) zbog dobre prognoze i specifičnog načina liječenja. Glavna klinička manifestacija ovog sindroma je anemija. Ako pacijenti imaju razinu eritropoetina  $<500\text{mU/mL}$  i manje od dvije transfuzije mjesečno liječe se isto kao i pacijenti niskog rizika. Ako imaju razinu eritropoetina  $>500\text{mU/mL}$  i više od dvije transfuzije mjesečno, onda se preporučuje liječenje lenalidomidom.

### Liječenje MDS visokog rizika(8)

Jedina metoda izlječenja pacijenata s visokim rizikom je transplantacija alogeničnih matičnih hematopoetskih stanica. Zato svi pacijenti koji su mlađi od 65 godina treba odrediti jesu li kandidati za transplantaciju. Ako su kandidati treba napraviti HLA tipizaciju i početi tražiti srodnog darivatelja ili nesrodnog HLA-podudarnog nesrodnog darivatelja. Ako pacijenti imaju manje od 10% blasta u KS može se započeti transplantacijski protokol. Ako pacijenti imaju više od 10 % blasta u KS prije započinjana transplantacijskog protokola treba primijeniti terapiju 5-azacitidinom ili intenzivnu kemoterapiju prema indukcijskim protokolima za AML. Ako pacijenti nisu kandidati za transplantaciju onda treba primijeniti terapiju 5-azacitidinom u najmanje 6 ciklusa. Ako je došlo do hematološkog odgovora, preporuča se napraviti citološku punkciju KS radi reevaluacije bolesti nakon 4 ciklusa.(14) Ako nema odgovora ni nakon 6 ciklusa možemo reći da je bolest refraktorna na terapiju i treba nastaviti samo s potpornim liječenjem.

## Hipoteza

Kariogram pri dijagnozi je povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenata sa MDS-om.

## Cilj rada

1. Kariogram po IPSS i WPSS kategorijama je povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenata s MDS-om.
2. Kariogram po IPSS-R kategorijama je povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenta s MDS-om.
3. Podtip MDS-a je povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenta s MDS-om.
4. Broj blasta u KS je povezan s ukupnim preživljenjem kod pacijenata s MDS-om.

## Metode i ispitanici

Podatke o pacijentima dobili smo retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije u bolničkom arhivu i informacijskom sustavu (BIS). Istraživanje je uključivalo 30 pacijenata s dijagnozom MDS-a u razdoblju od 1.11.2014. do 1.4.2017.godine. Svi pacijenti su liječeni u Kliničkoj bolnici Merkur. Uključni kriteriji su dijagnoza MDS po klasifikaciji iz SZO 2008.(3) i dostupnost kariograma. Isključni kriteriji su dijagnoza MDS/MPN, sindrom preklapanja i nedostupan kariogram.

### Izrada kariograma

Protokol laboratorija za citogenetiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb

#### Kratkotrajna kultura stanica koštane srži

Postupak kultiviranja radi se u sterilnom prostoru, koriste se isključivo sterilne otopine i sterilni pribor.

#### 1. Dan

1. U sterilnu epruvetu u kojoj se nalazi hranilište za kultiviranje stavi se  $1 \times 10^6$  stanica po 1 mL hranilišta uzorka koštane srži, zatvori i lagano promiješa.
2. Epruveta sa uzorkom se ostavi u CO<sub>2</sub> – inkubatoru na 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kroz 2 sata
3. Zatim se u epruvetu doda 0,1 mL otopine MTX (Otopina A )

#### 2. Dan

1. Slijedeće jutro doda se 0,1 mL otopine timidina (Otopina B) i inkubira se 5 sati u CO<sub>2</sub>-inkubatoru kroz 5 sati
2. Nakon 5 sati u epruvetu se dodaje 40 µL otopine Colhicina koji ostaje u kulturi tijekom 40 min
3. Uzorak se nakon toga centrifugira 5 min/2000 okretaja/min., zatim se odvoji supernatant, a talog stanica lagano resuspendira (vortex)
4. U epruvetu se doda 5 ml hipotonične otopine KCl (0,075 M) i ostavi stajati 10 min na sobnoj temperaturi
5. Uzorak se ponovo centrifugira 5 min./2000 okretaja/min., odvoji supernatant do 0,5 mL iznad staničnog sedimenta i lagano resuspendira (vortex) -uzorak
6. Zatim se dodaje 5 mL modificirane IBRAIMOVE otopine (92 mL H<sub>2</sub>O + 5 mL octene kiseline + 3 mL metanola)

7. Ponovno se centrifugira uzorak 5 min./2000 okretaja/min., izbac se supernatant do 0,5 mL iznad staničnog sedimenta i resuspendira talog (vortex)
8. U epruvetu se nakon toga doda 5 mL Carnoy otopine za fiksaciju (3:1, metanol : octena kiselina) i resuspendira se uzorak
9. Uzorak se potom centrifugira 10 min./1100 okretaja/min., i zatim se izbac supernatant do 1 mL. Ovaj postupak se ponavlja nekoliko puta, dok se ne dobije čisti talog (bijeke boje). Nakon što se dobije čisti talog, izbac se supernatant što je više moguće.
10. Talog se zatim resuspendira paster pipetom
11. Nakon toga odpipetira se 50  $\mu$ L uzorka i kapne na vlažno staklo
12. Stakla se ostave sušiti na zraku i potom se pohranjuju

#### Priprema predmetnih stakalaca

1. Predmetna stakalca ispiru se u hladnoj tekućoj vodi minimalno 20 minuta
2. Nakon čega se urone u 96% etanol u kojem stoje minimalno 30 minuta
3. stakalca se zatim ostave u 96% etanolu i dolije se dietil-eter (96% etanol:dietil-eter u omjeru 50:50)

#### GTG – pruganje kromosoma

1. Za GTG-pruganje kromosoma mikroskopski preparat mora odstajati 2 do 3 dana na sobnoj temperaturi.
2. Predmetno staklo uroniti u staklenu kadicu s tripsinom (na 37°C) na 10 – 50 sekundi.
3. Staklo isprati u Ringer puferu kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina.
4. Staklo uroniti u staklenu kadicu u pripremljenu otopinu Giemse (84 mL pufera I + 156 mL pufera II – odvoji se 80 mL u koji se doda 20 mL boje Giemsa, ostatak otopine pufera se koristi za ispiranje u sljedećem koraku).
5. Nakon 3 do 5 minuta, staklo izvaditi iz otopine za bojanje te isprati u ostatku otopine pufera I i II.
6. Staklo isprati u destiliranoj vodi i pustiti da se osuši.
7. Gledanje uzorka na svjetlosnom mikroskopu i grupiranje parova kromosoma

#### Statistika

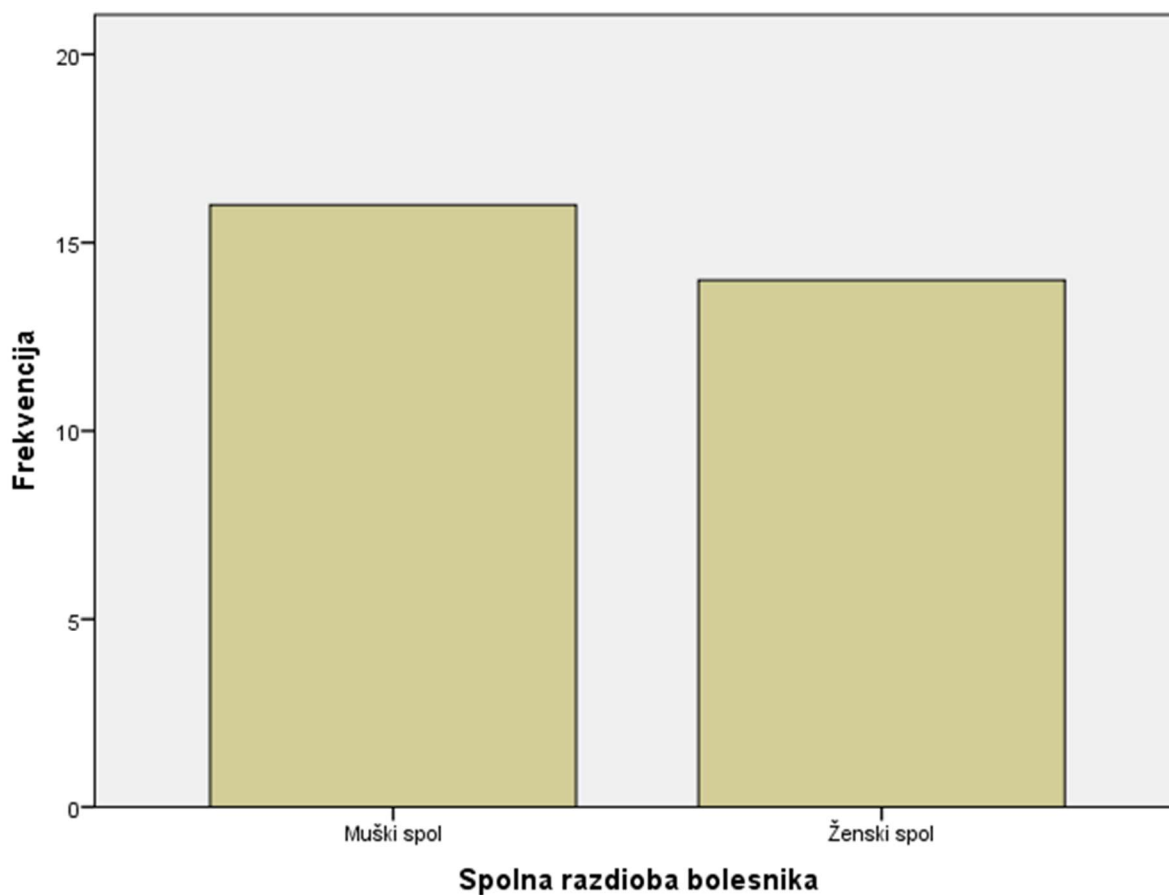
Nakon deskriptivne metodologije u procjeni ukupnog preživljena korištena je metoda životnih tablica te Kaplan-Meier krivulje. Analiza prognostičkih čimbenika bila je testirana log-rank testom sa statističkom vjerojatnošću od 0,05. Statistička analiza napravljena je na programu IBM SPSS Statistics for Windows version 20.(15)

## Rezultati

U ovu retrospektivnu analizu uključeno je ukupno 30 bolesnika s postavljenom dijagnozom MDS-a u Kliničkoj Bolnici Merkur u razdoblju od 1.2014 do 1. 2017. godine.

Spolna razdioba bolesnika prikazana je na tablici 6.

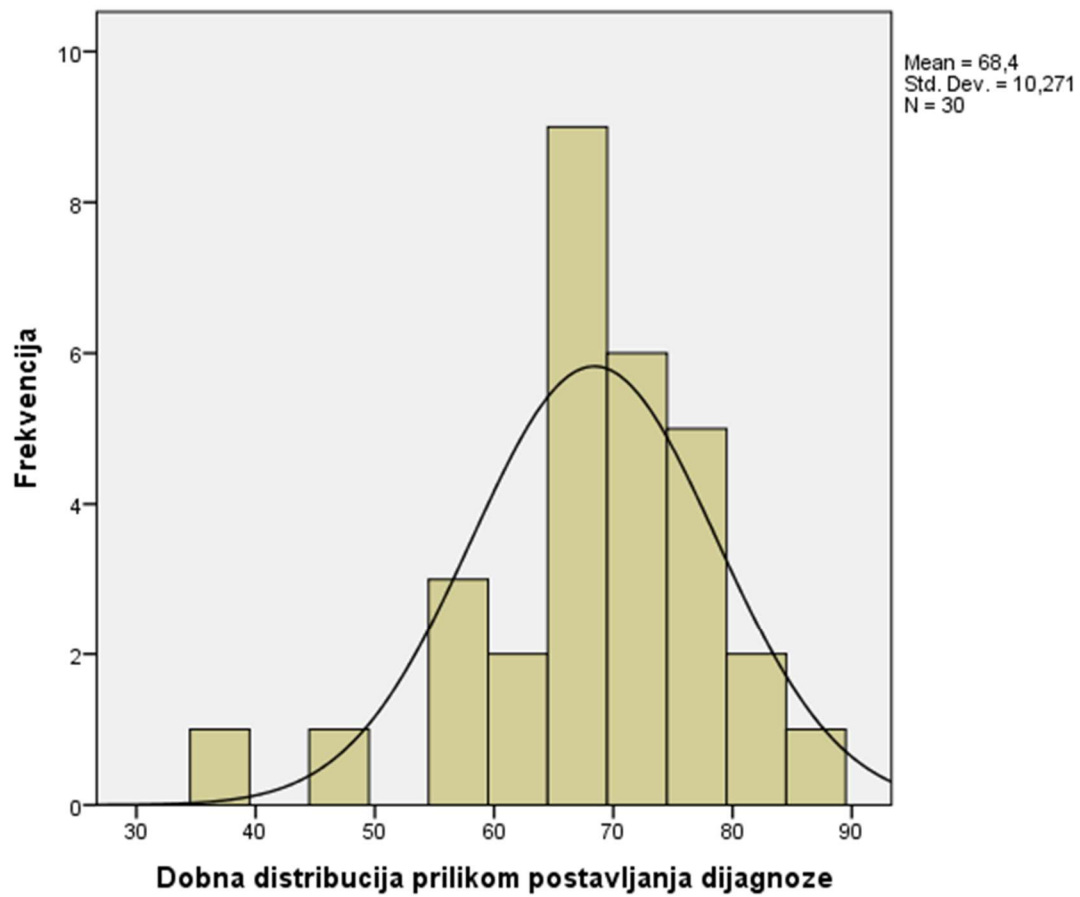
**Tablica 6. Spolna razdioba bolesnika**



Ukupno 16 bolesnika (53.3%) je bilo muškog spola, a ukupno 14 bolesnika je bilo ženskog spola (46.7%).

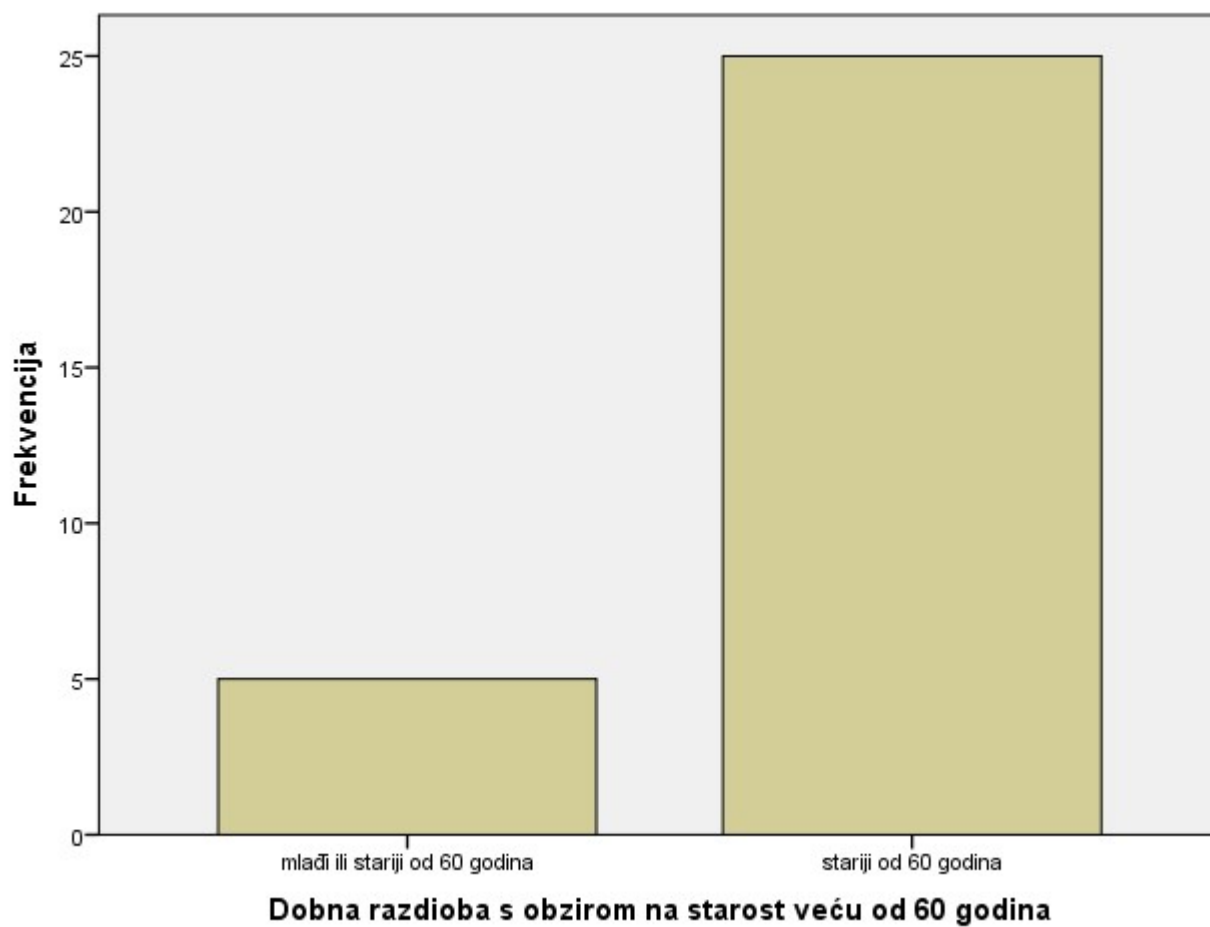
Medijan dobi bolesnika pri postavljanju dijagnoze je bio 68.4 godine (SD=10.27) prikazanoj na tablici 7.

**Tablica 7. Dobna distribucija bolesnika**



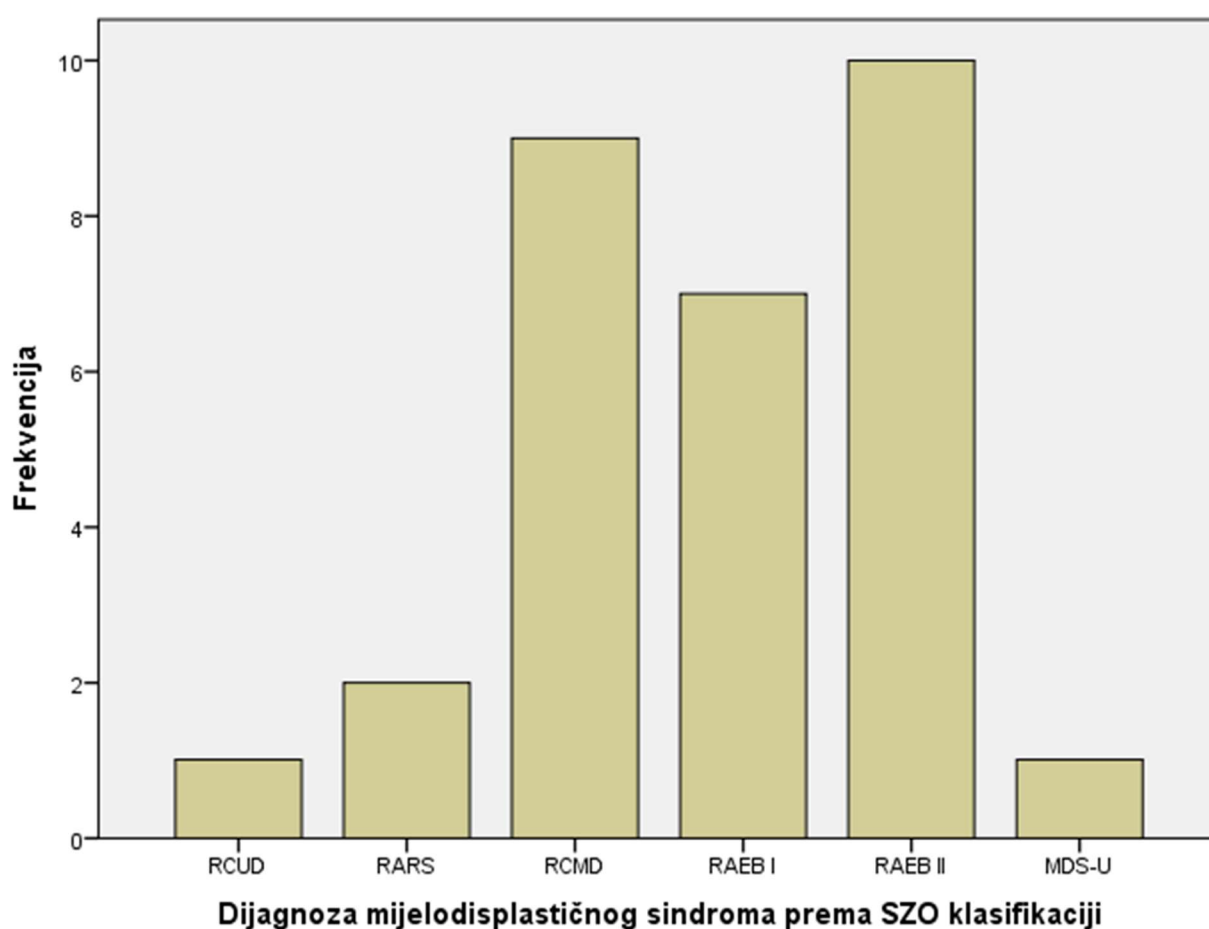
Ukupno je 5 bolesnika bilo staro ili mlađe od 60 godina, dok je 25 bolesnika bilo starije od 60 godine što je prikazano na tablici 8.

**Tablica 8. Dobna razdioba s obzirom na starost veću od 60 godina prilikom postavljanja dijagnoze**



Prema klasifikaciji SZO mijeloidnih neoplazmi, izdvojila su se tri entiteta po učestalosti. Najučestaliji entitet je bila dijagnoza refraktorne anemije sa suviškom blasta tipa II (N=10, 33.3%), refraktorne citopenije s multilinijskom displazijom (N=9, 30%) te refraktorne anemije sa suviškom blasta tipa I (N=7, 23.3 %). Ostali entiteti u našoj kohorti nisu bili toliko zastupljeni. Navedeno je prikazano na tablici 9.

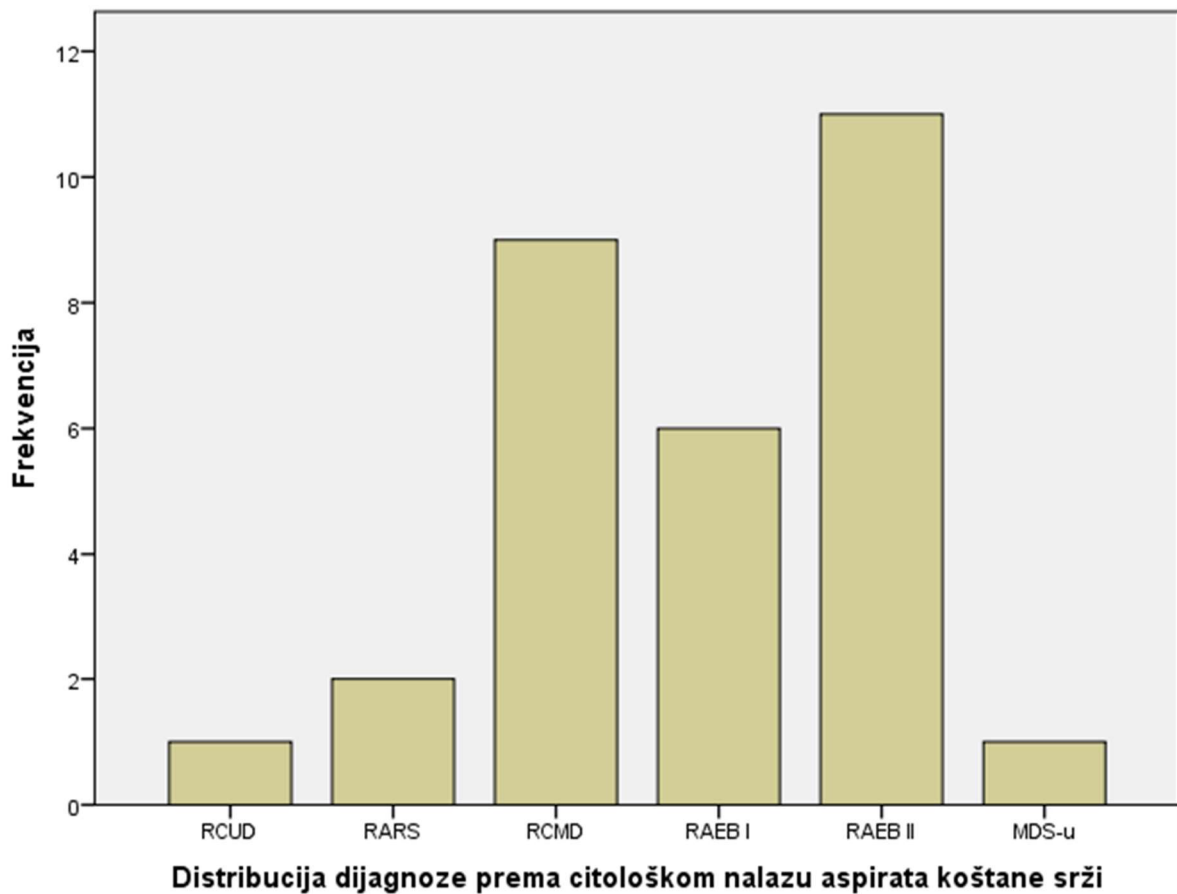
**Tablica 9. Distribucija pojedinih entiteta mijelodisplastičnih sindroma prema SZO klasifikaciji**





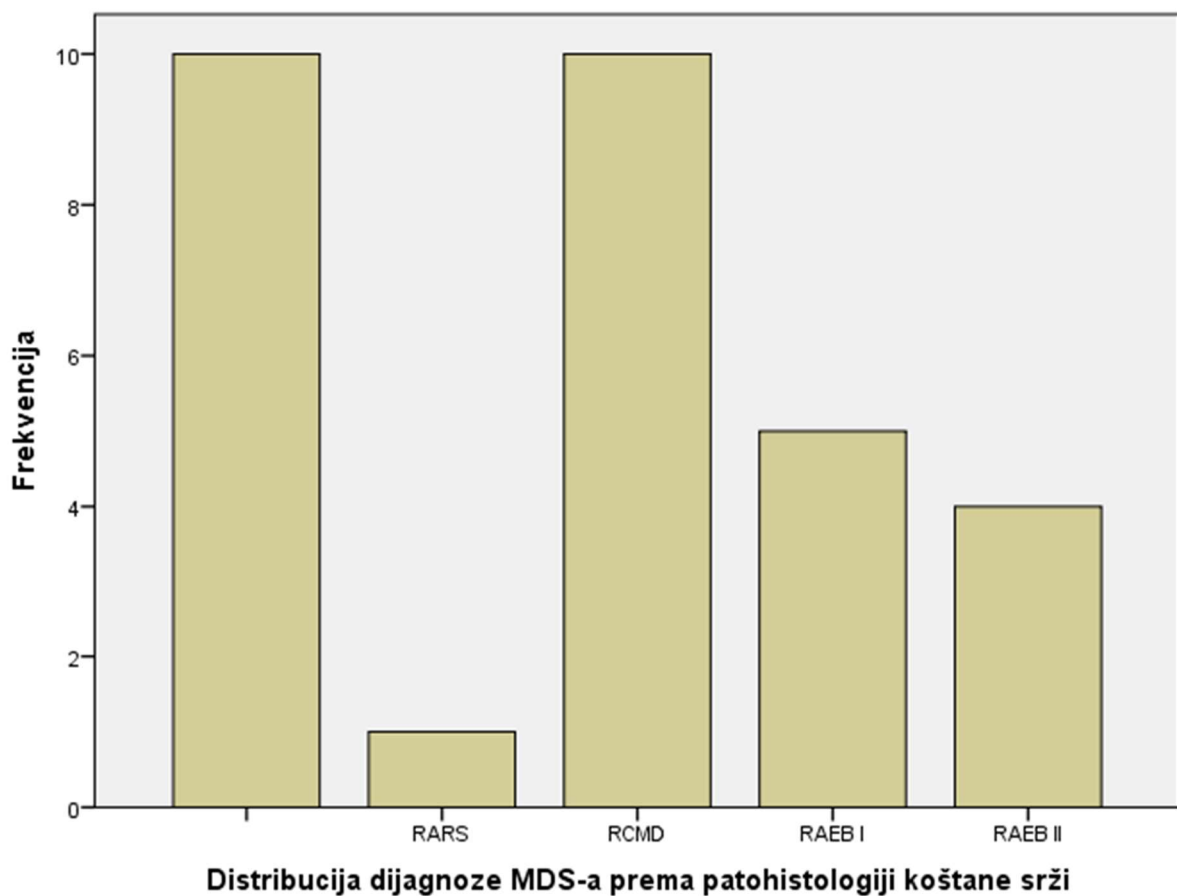
U svih bolesnika je prilikom postavljanja dijagnoze učinjena citološka aspiracija koštane srži. Najčešći podtip prema citološkoj dijagnozi je bila refraktorna anemija sa suviškom blasta tipa II (N=11, 36.7%). Slijedila je po učestalosti refraktorna anemija s multilinijskom displazijom (N=9, 30%) te potom refraktorna anemija sa suviškom blasta tipa I (N=6, 20%). Navedeno je prikazano u tablici 10.

**Tablica 10. Distribucija dijagnoze MDS-a prema citološkom nalazu aspirata koštane srži.**



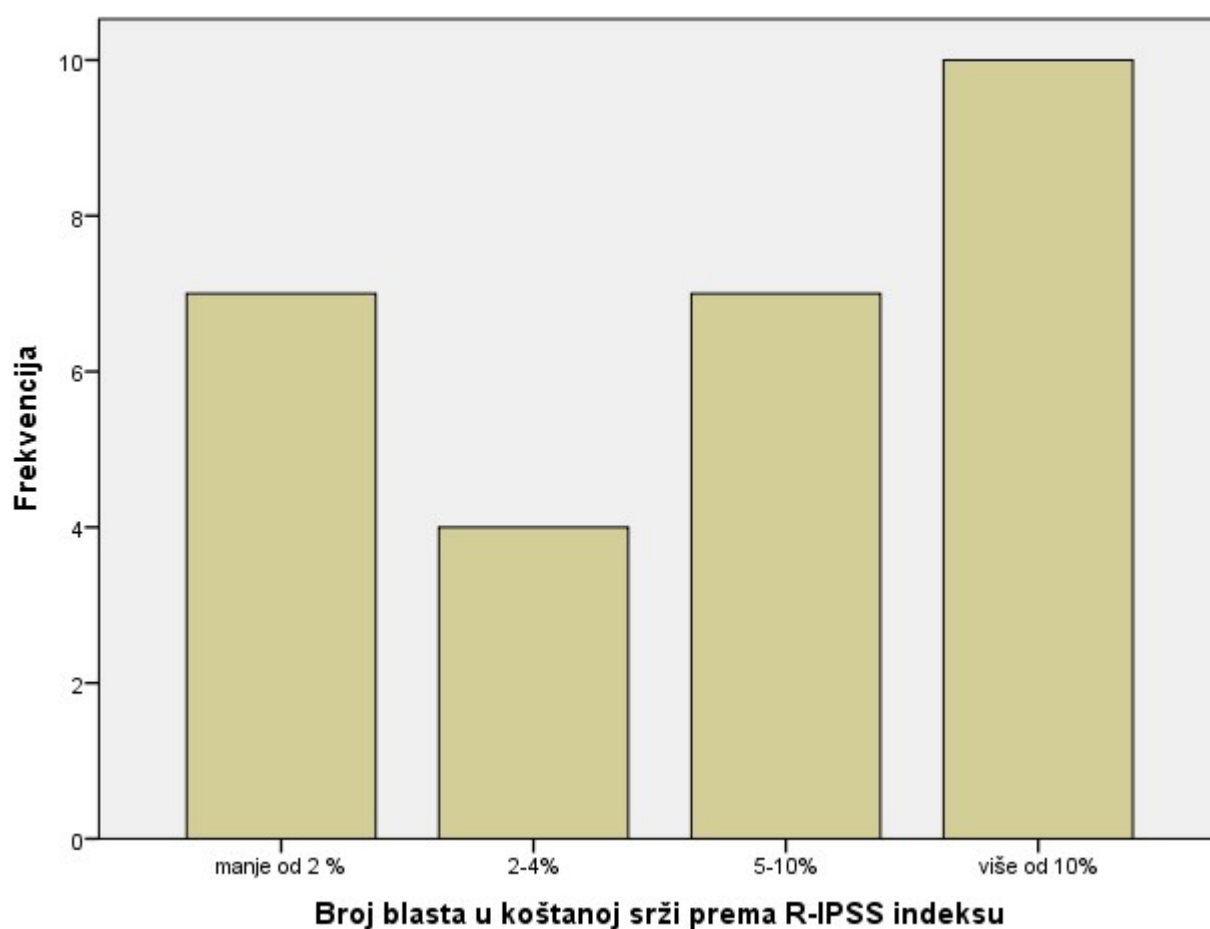
U većine bolesnika (N=25, 83,3%) kao dodatna dijagnostika učinjena je patohistološka analiza koštane srži. Začuđujuće u 10 bolesnika (33.3%) patohistologija nije pridonijela dijagnozi, te se distribucija razlikovala od citološke distribucije. Najviše bolesnika je imalo refraktornu citopeniju s multilinijskom displazijom (N=10, 33.3%. Potom su slijedili refraktorna anemija sa suviškom blasta tip I (N=5, 16.7%) te refraktrona anemija sa suviškom blasta tipa II (N=4, 13.3 %). Navedeno je prikazano u tablici 11.

**Tablica 11. Distribucija dijagnoze MDS-a prema patohistološkoj analizi koštane srži**



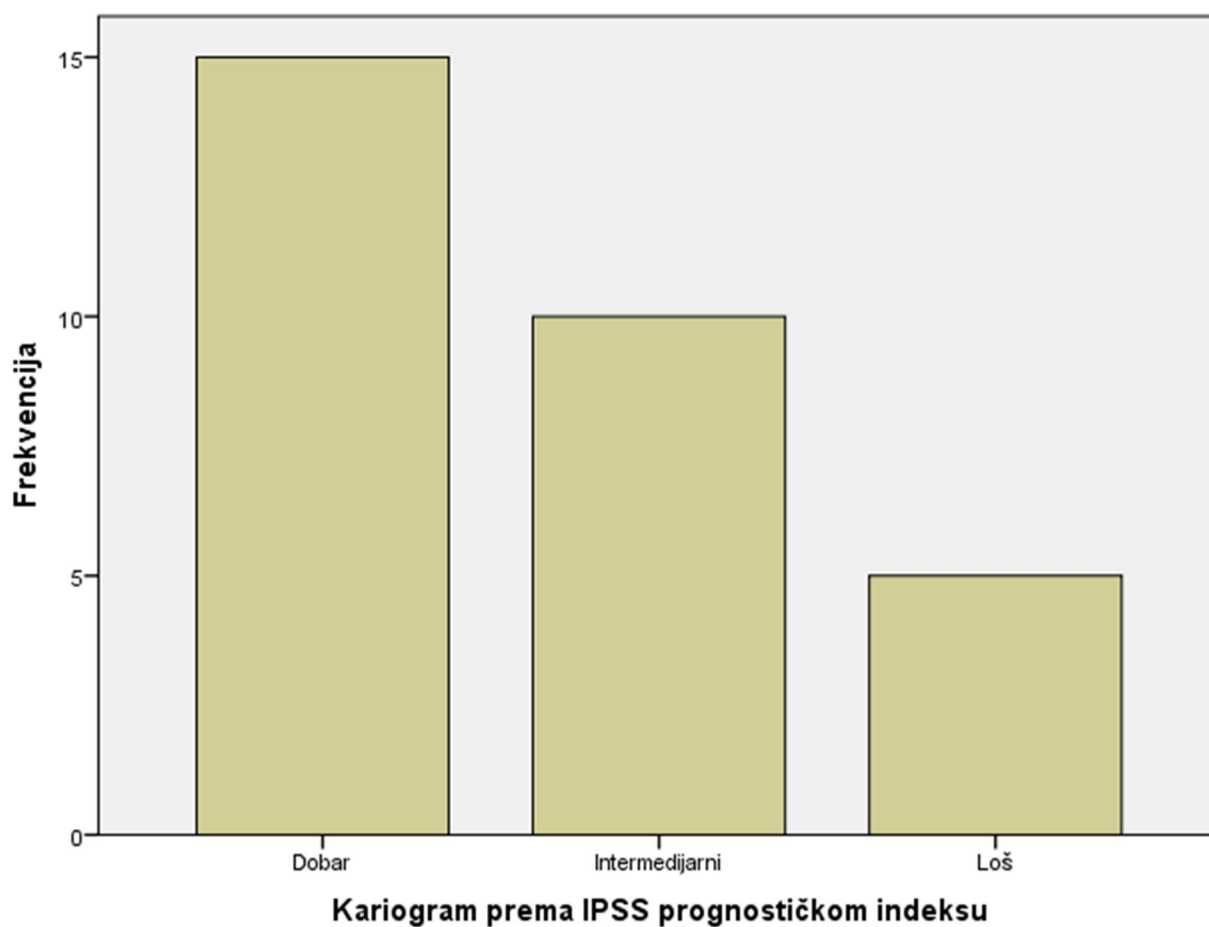
Kao jedan od čimbenika analiziran je broj blasta u koštanoj srži prema citološkom nalazu aspirata. Broj blasta je određivan prema R-IPSS prognostičkom indeksu. Većina bolesnika (N=10, 33.3%) imalo je više od 10 % blasta prilikom postavljanja dijagnoze, slijedeći sa skupinom između 5 do 10% blasta (N=7, 23.3%). Zanimljivo je da je velik broj ispitanika imao 2% ili manje blasta u koštanoj srži (N=7, 23.3%). Navedeno je prikazano u tablici 12.

**Tablica 12. Distribucija bolesnika prema broju blasta u koštanoj srži prema R-IPSS indeksu**



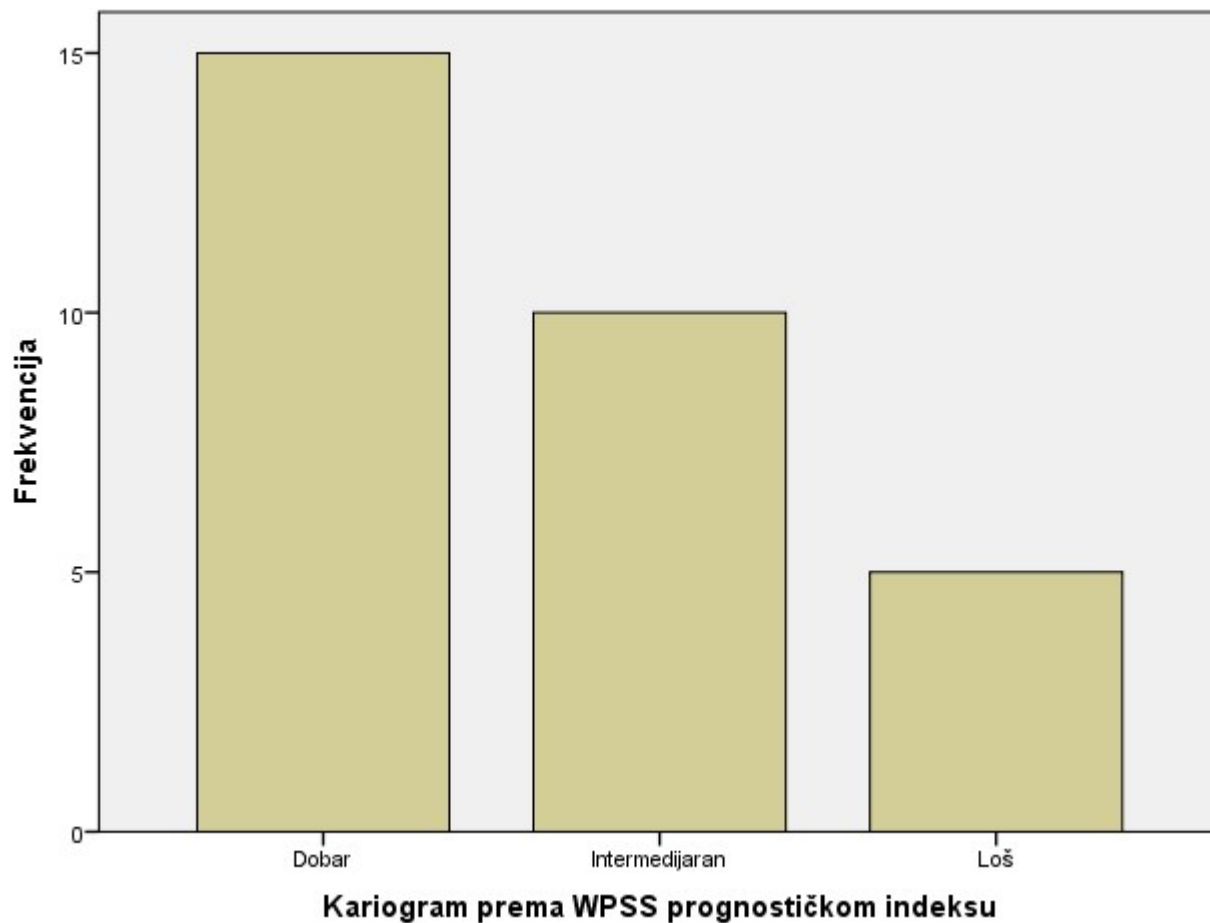
Kao jedan od čimbenika određivali smo kariogram prema IPSS prognostičkom indeksu. Većina bolesnika (N=15, 50%) imalo je kariogram dobrog rizika, slijedeći s 10 bolesnika (33.3%) intermedijarnog rizika te je 5 bolesnika imalo kariogram lošeg prognostičkog rizika (16.7%). Navedeno je prikazano u tablici broj 13.

**Tablica 13. Distribucija kariograma prema IPSS prognostičkom indeksu**



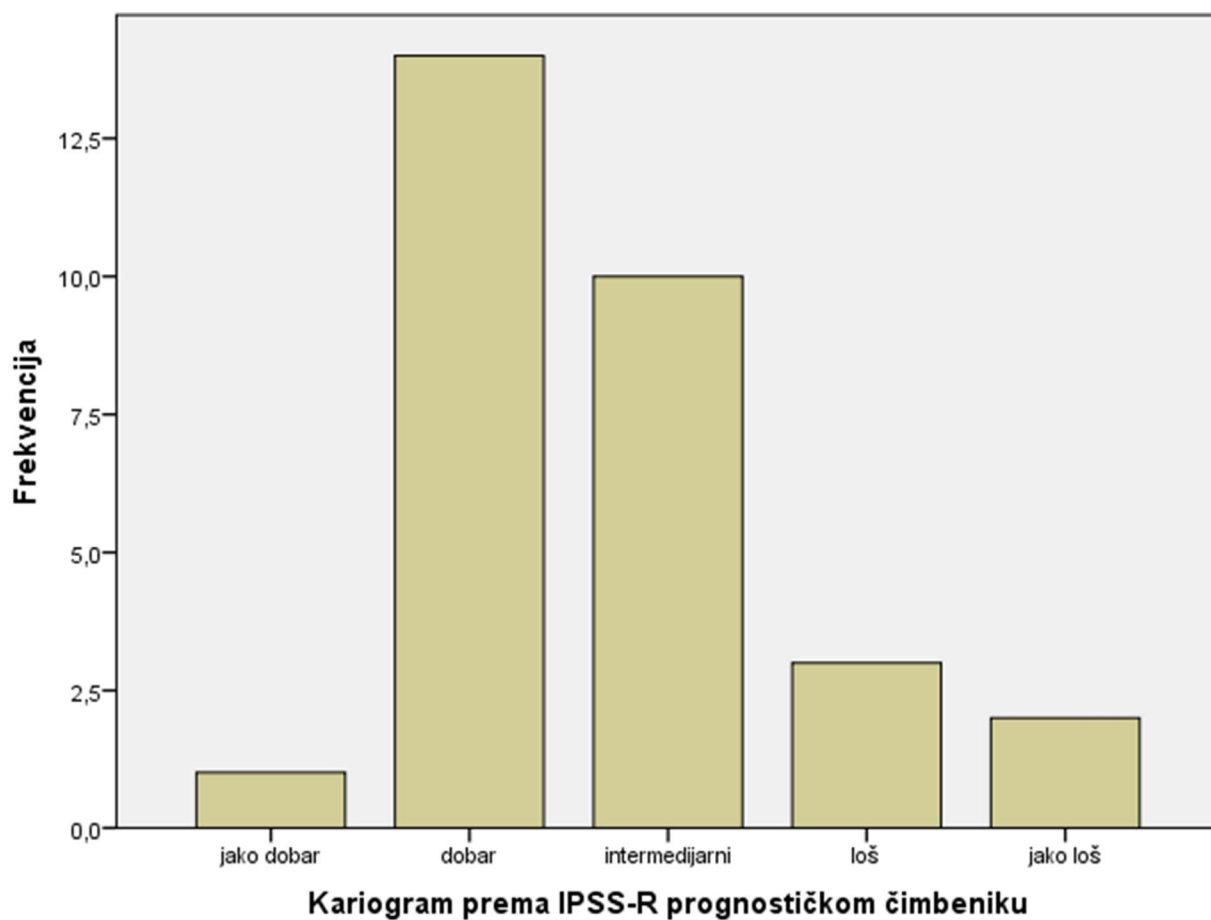
Kao drugi čimbenik održivali smo kariogram prema WPSS prognostičkom indeksu. Većina bolesnika (N=15, 50%) imalo je kariogram dobre prognoze dok je samo 5 bolesnika imalo kariogram loše prognoze (16.7%). Navedena distribucija je pokazana u tablici 14.

**Tablica 14. Distribucija kariograma prema WPSS prognostičkom indeksu**



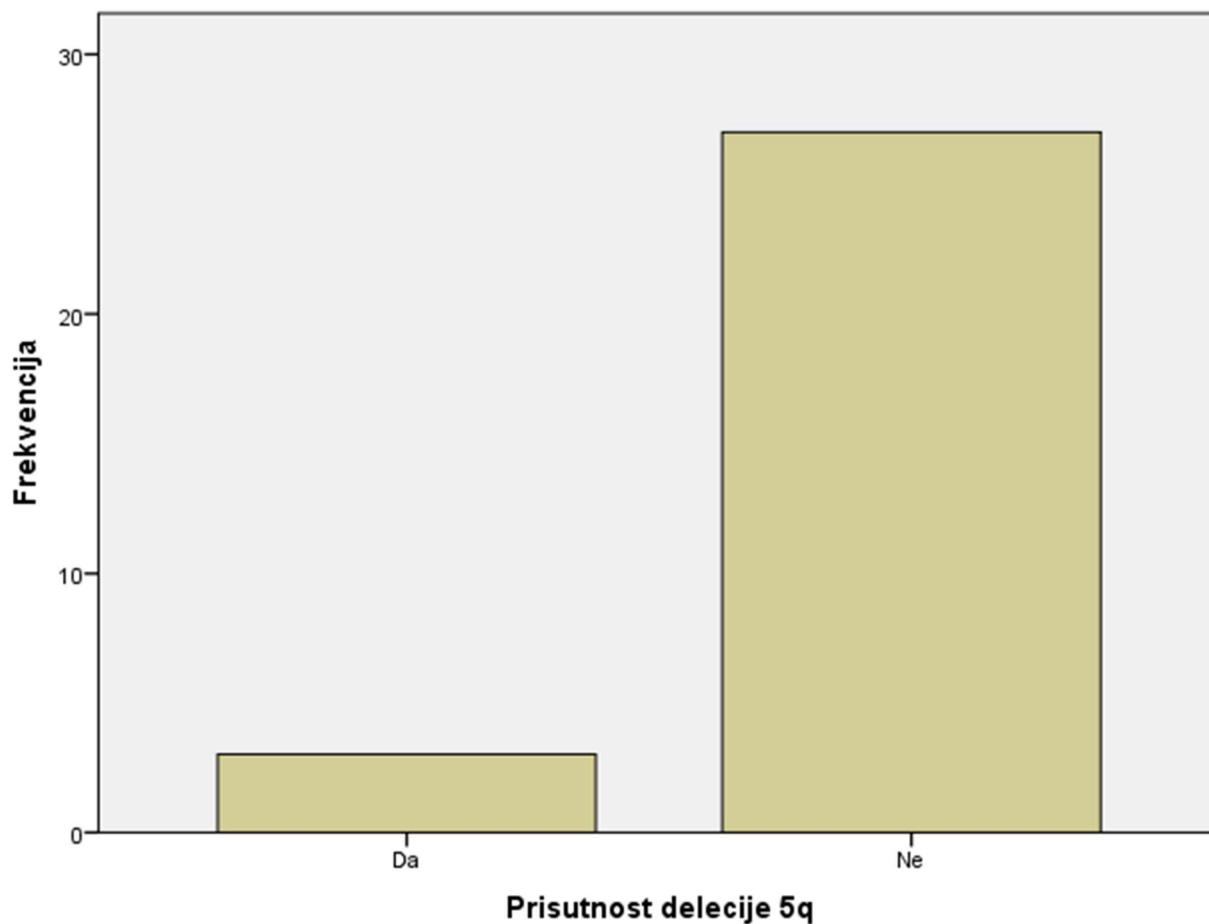
Kao jedan od čimbenika određen je kariogram prema R-IPSS prognostičkom indeksu. Većina bolesnika je imala kariogram dobrog prognostičkog indeksa (N=14, 46.7%), slijedeći s intemedijarnim (N=10, 33.3%). Navedeno je prikazano u tablici 15.

**Tablica 15. Distribucija kariograma prema IPPS-R prognostičkom indeksu**



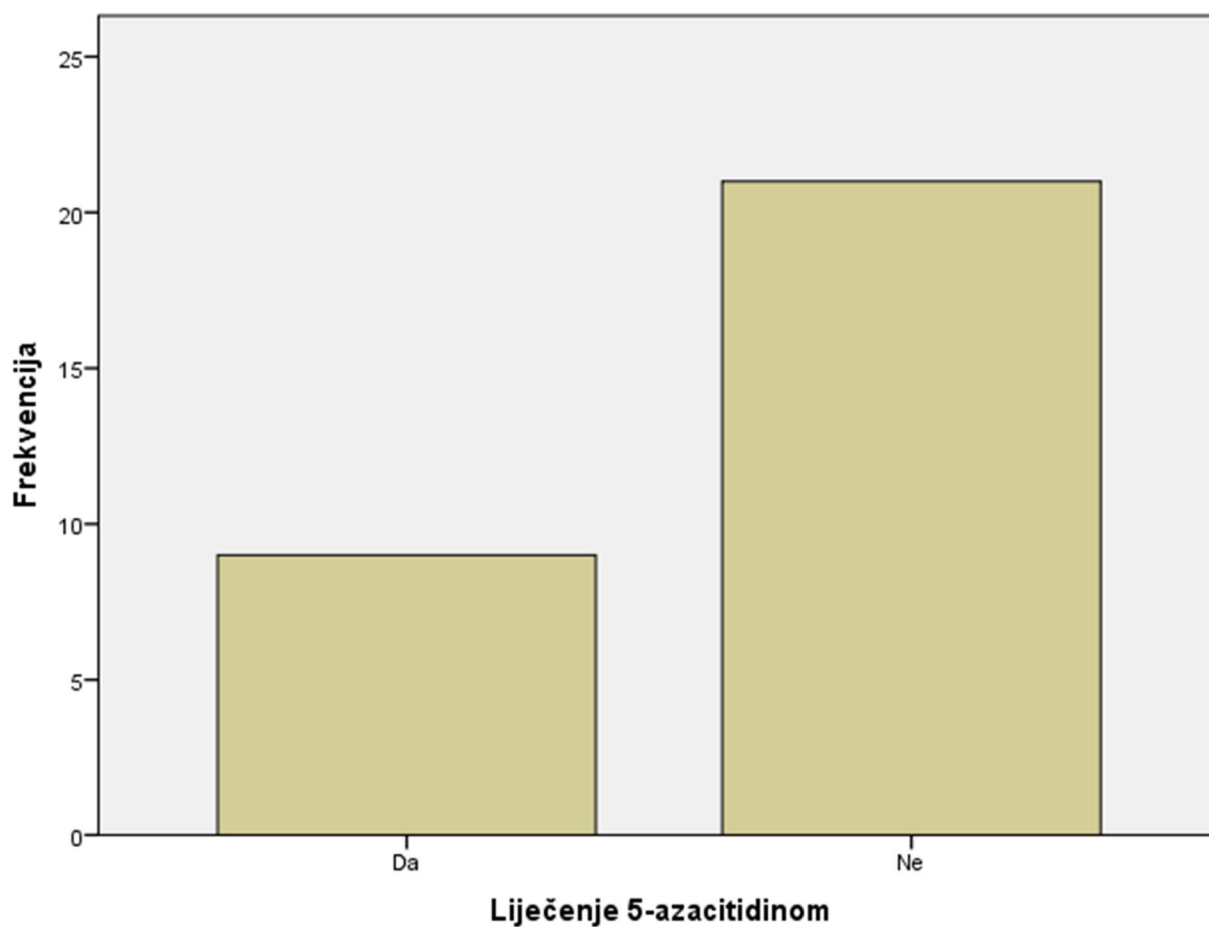
S obzirom da je MDS s del(5q) poseban entitet, analizirali smo koliko naših pacijenata u kohorti ima navedenu deleciju. Samo 3 bolesnika ima del(5q) (10%) što je prikazano u tablici broj 16.

**Tablica broj 16. Učestalost del 5q u kohorti MDS bolesnika**



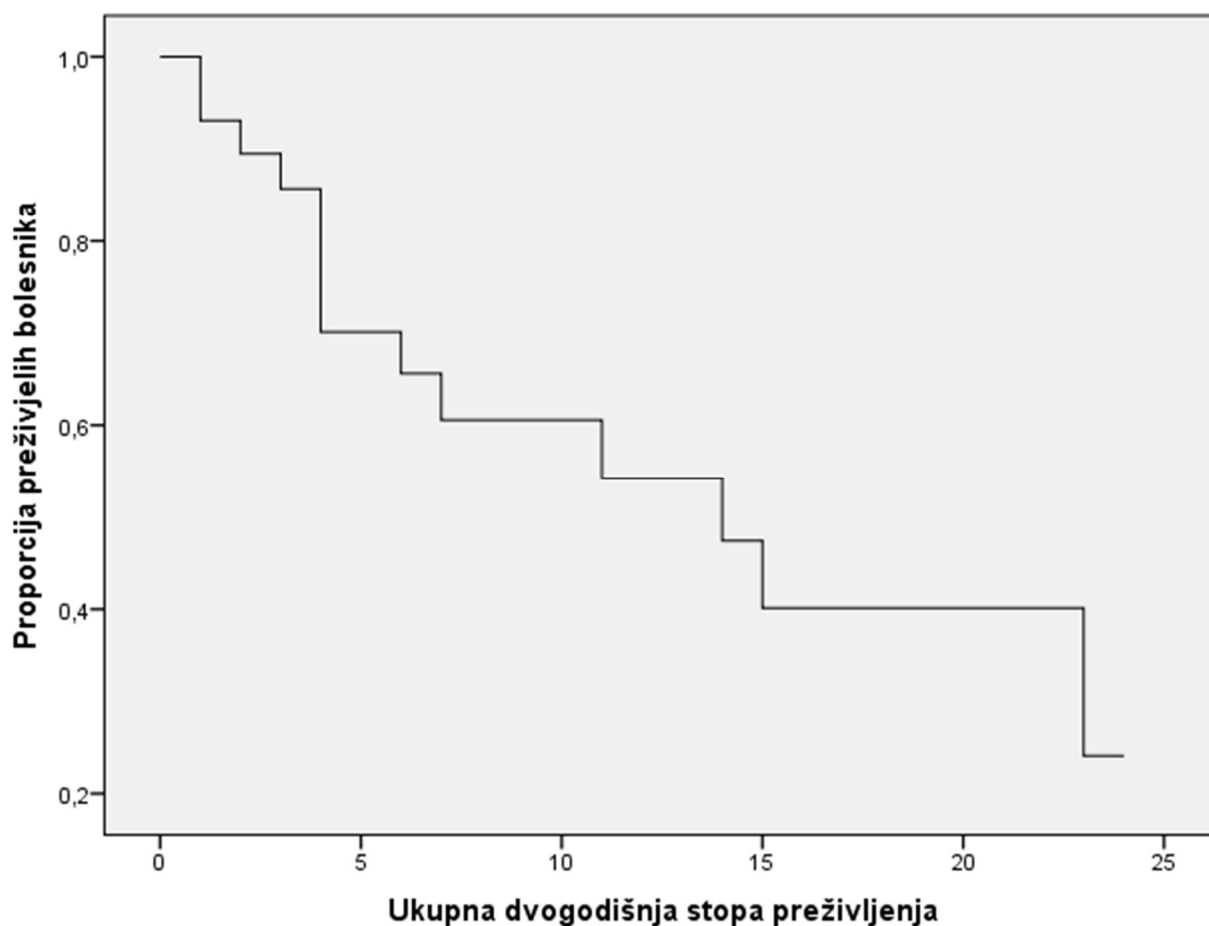
S obzirom na liječenje, analizirali smo koliki broj bolesnika je liječen 5-azacitidinom. U našoj kohorti 9 bolesnika (30%) je primilo navedeni lijek što je prikazano u tablici broj 17. Ostali bolesnici su primali suportivne mjere najčešće transfuzijsku poporu s koncentratima eritrocita ili trombocita.

**Tablica 17. Liječenje hipometilirajućim agensima**

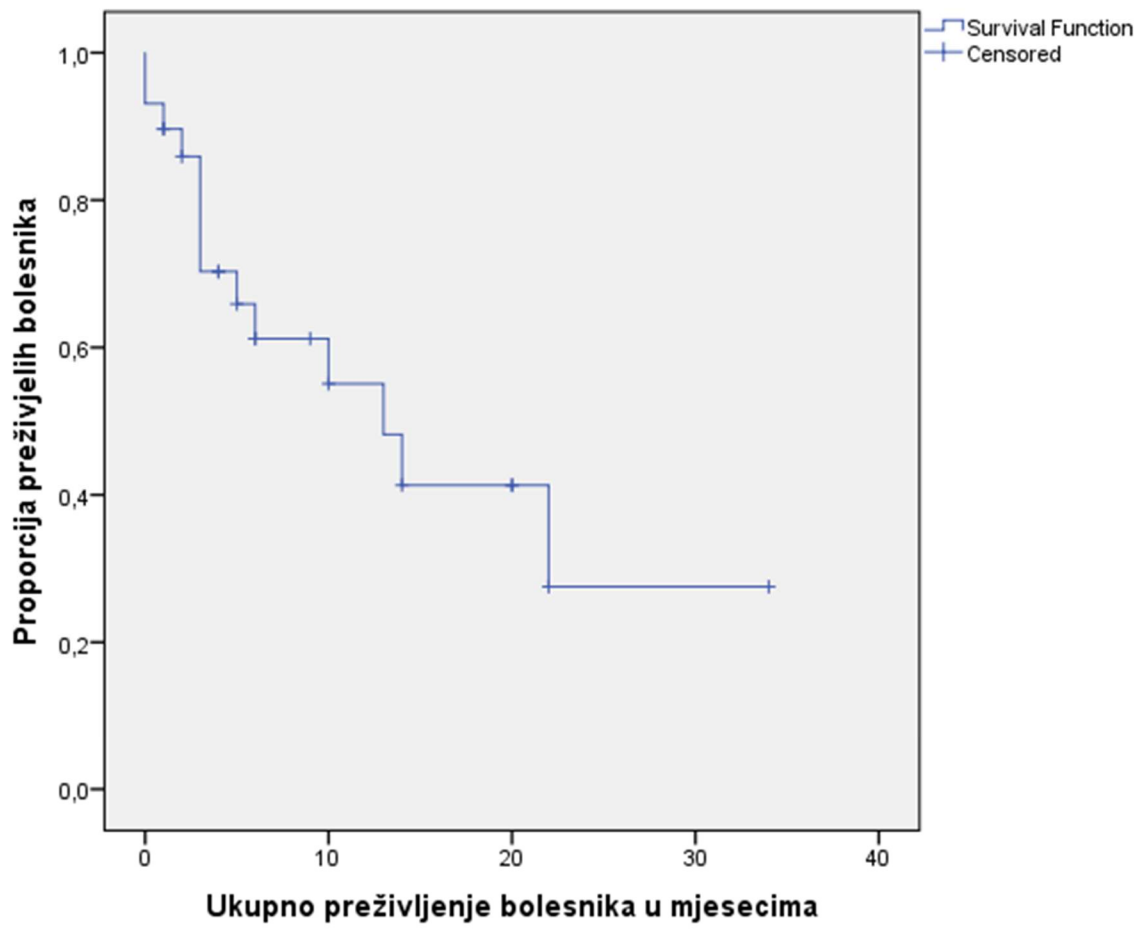




Medijan praćenja bolesnika je bio 5 mjeseci (SD=8.38). Kroz praćenje se dogodilo 14 smrtnih slučajeva. Ukupna dvogodišnja stopa ukupnog preživljenja za naše bolesnika iznosi 24%. Medijan ukupnog preživljenja iznosi 13 mjeseci. Kao što je vidljivo iz slike 1 i slike 2. nazire se plato krivulje, indicirajući da MDS nije izlječiva bolest, ali može biti indolentnog tijeka u manje od 20% bolesnika.

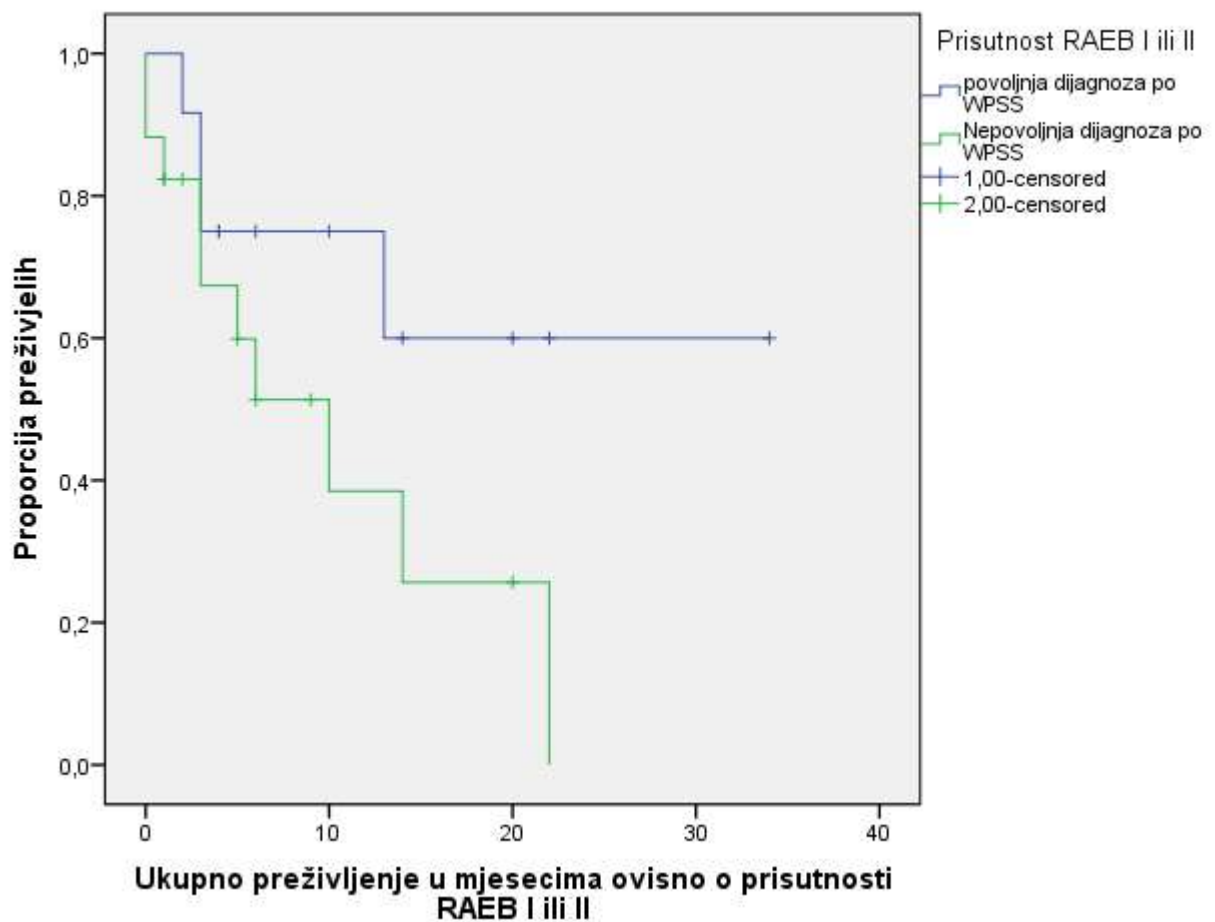


**Slika 1. Dvogodišnja stopa ukupnog preživljenja**



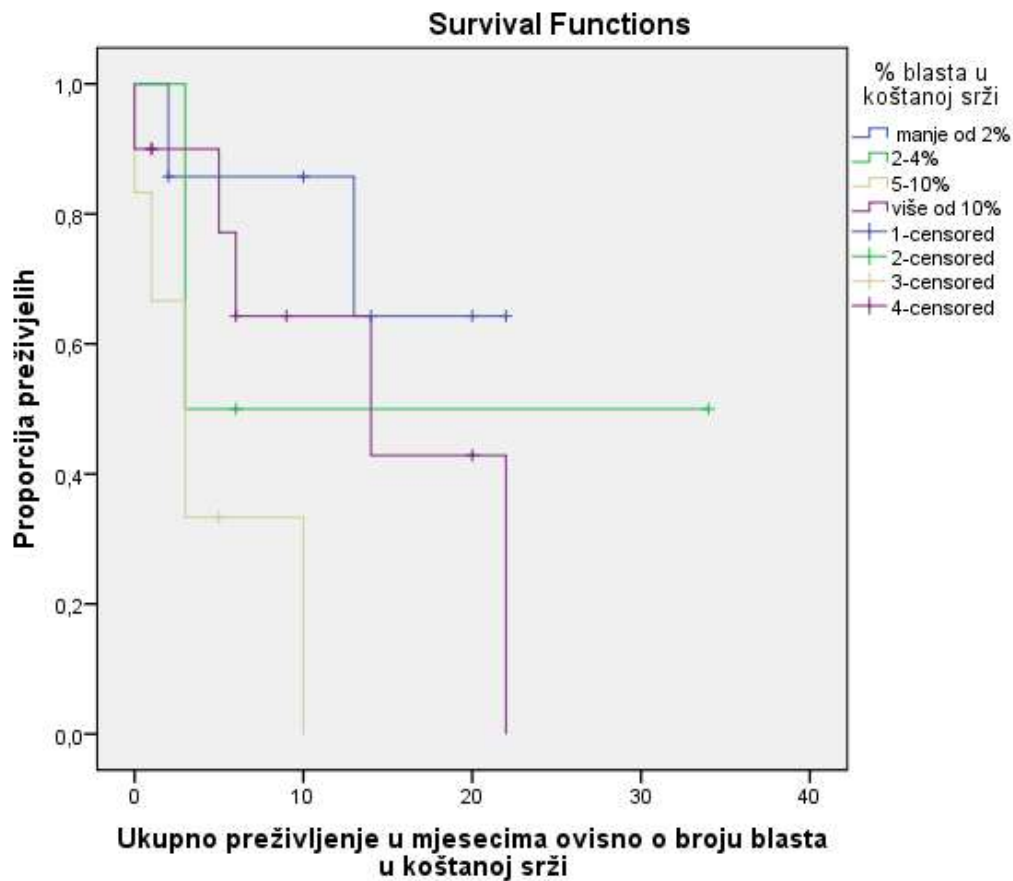
Slika 2. Medijan ukupnog preživljena kohorte bolesnika s MDS-om

Kao jedan od prognostičkih čimbenika, testirali smo da li je prisutnost RAEB I i II podtipa MDS-a prognostičkog dijela WPSS indeksa povezan s razlikom u ukupnom preživljenju. Usprkos jasnoj separaciji krivulja, postoji tek statistički značajna tendencija ( $\chi^2=3.08$ , DF=1, p=0.079) da bolesnici s REAB I ili II podtipom MDS-a imaju lošije preživljene (medijan preživljena 10 mjeseci), za razliku od ostalih bolesnika u kojih medijan nije postignut. Navedeno je prikazano na slici 3. Navedeno je i testirano po citološkoj dijagnozi gdje postoji statistička tendencija ( $\chi^2=3.372$ , DF=1, p= 0.066). Slika nije prikazana.



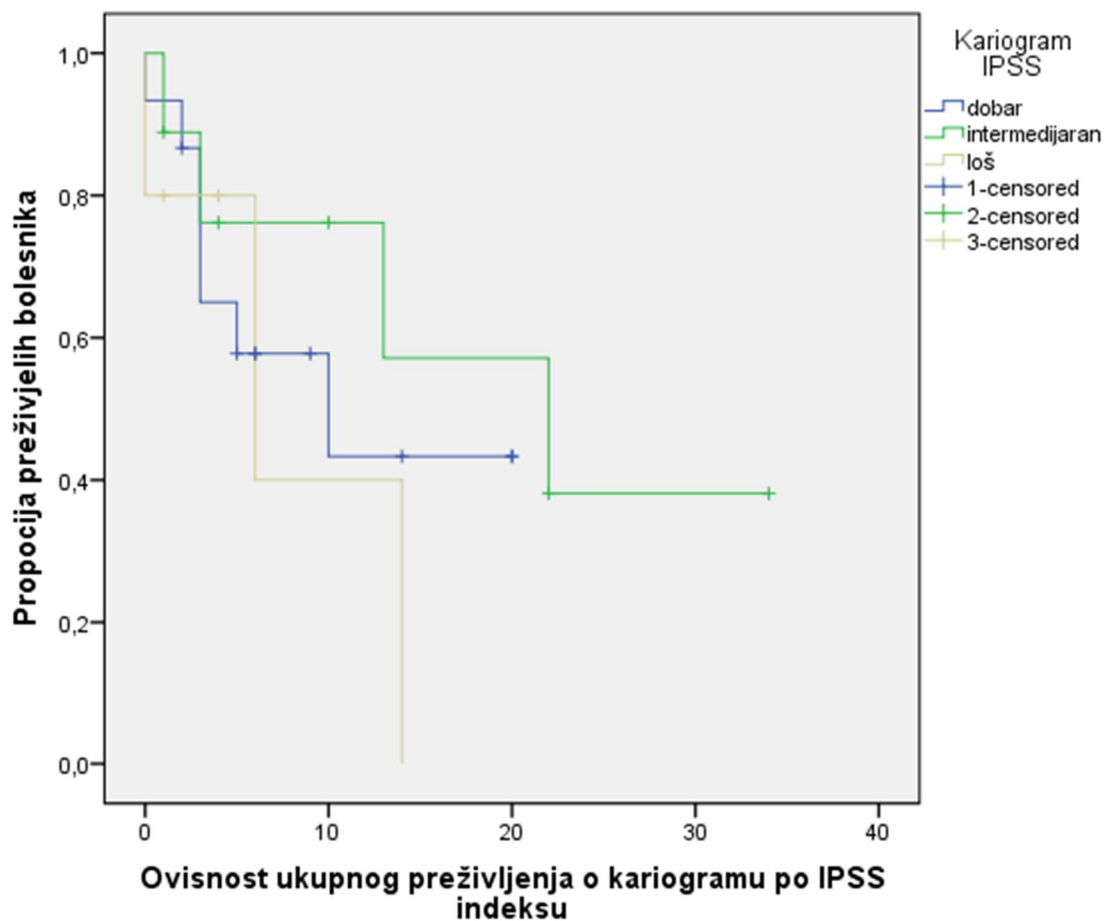
**Slika 3. Ovisnost preživljena ovisno o dijagnozi MDS visokorizičnog podtipa**

Kao jedan od prognostičkih čimbenika, testirali smo povezanost broja blasta u koštanoj srži pri dijagnozi s ukupnih preživljenjem. Seperaririla se krivulja bolesnika s manje od 2 % blasta u kojih medijan ukupnog preživljenja nije dosegnut, dok su ostale 3 kategorije imale podjednako loše preživljenje s tendencijom statističke značajnosti ( $\chi^2=7.396$ ,  $DF=3$ ,  $p=0.060$ ) prikazano na slici 4.

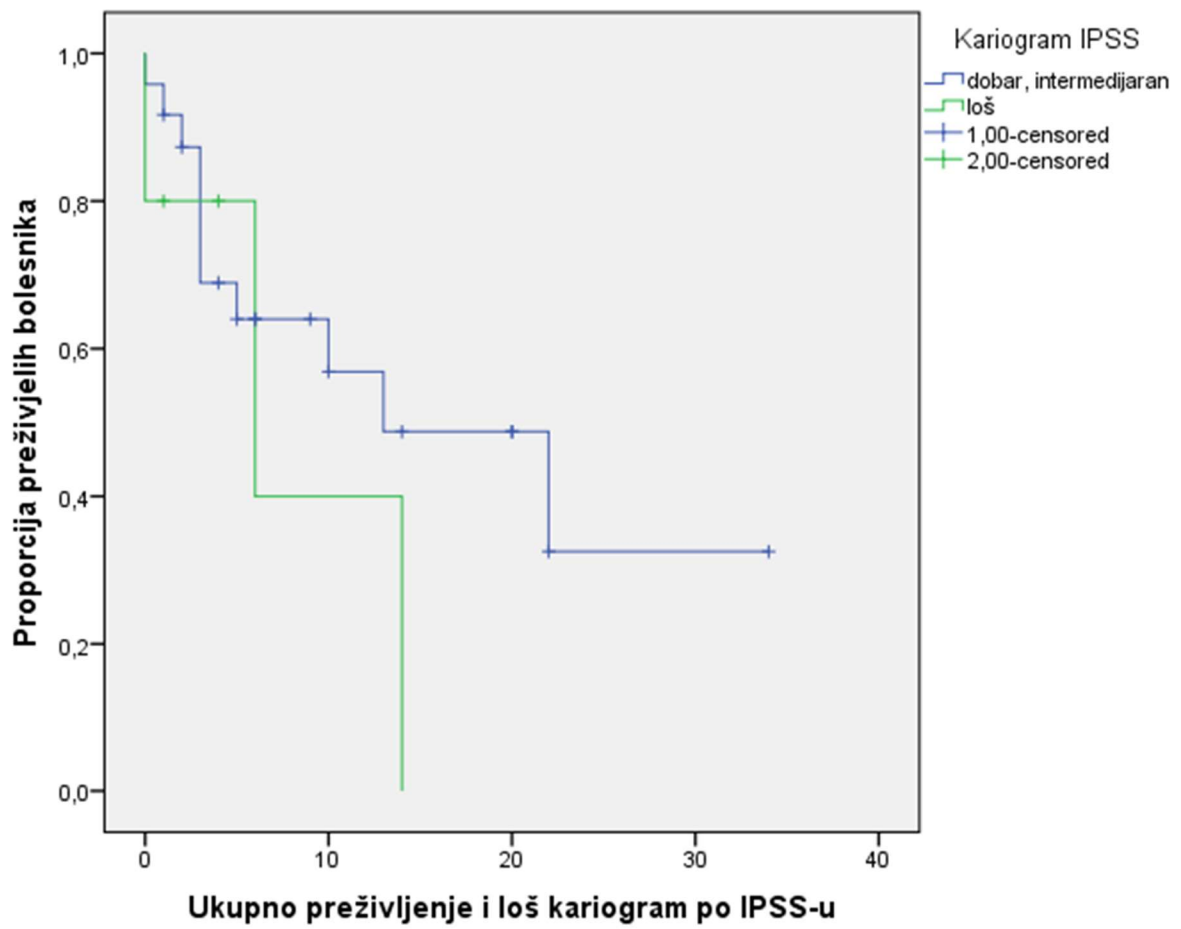


**Slika 4. Ovisnost ukupnog preživljenja o broju blasta u koštanoj srži po R-IPSS prognostičkom indeksu**

Kao prognostički čimbenik, analizirali smo kariogram po IPSS-u prognostičkom čimbeniku. Povezanost nije statistički bila značajna ( $\chi^2=1.482$ ,  $DF=2$ ,  $p=0.472$ ) što je prikazano na slici 5. U daljnjoj analizi grupirali smo bolesnike u dvije skupine. Prva skupina je uključivala bolesnike s dobrim i intermedijarnim kariogramom, dok je druga skupina uključivala bolesnika s lošim kariogramom. Također, usprkos separaciji krivulja, nije dobivena statistička značajnost ( $\chi^2=0.982$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.322$ ) što je prikazano na slici 6.



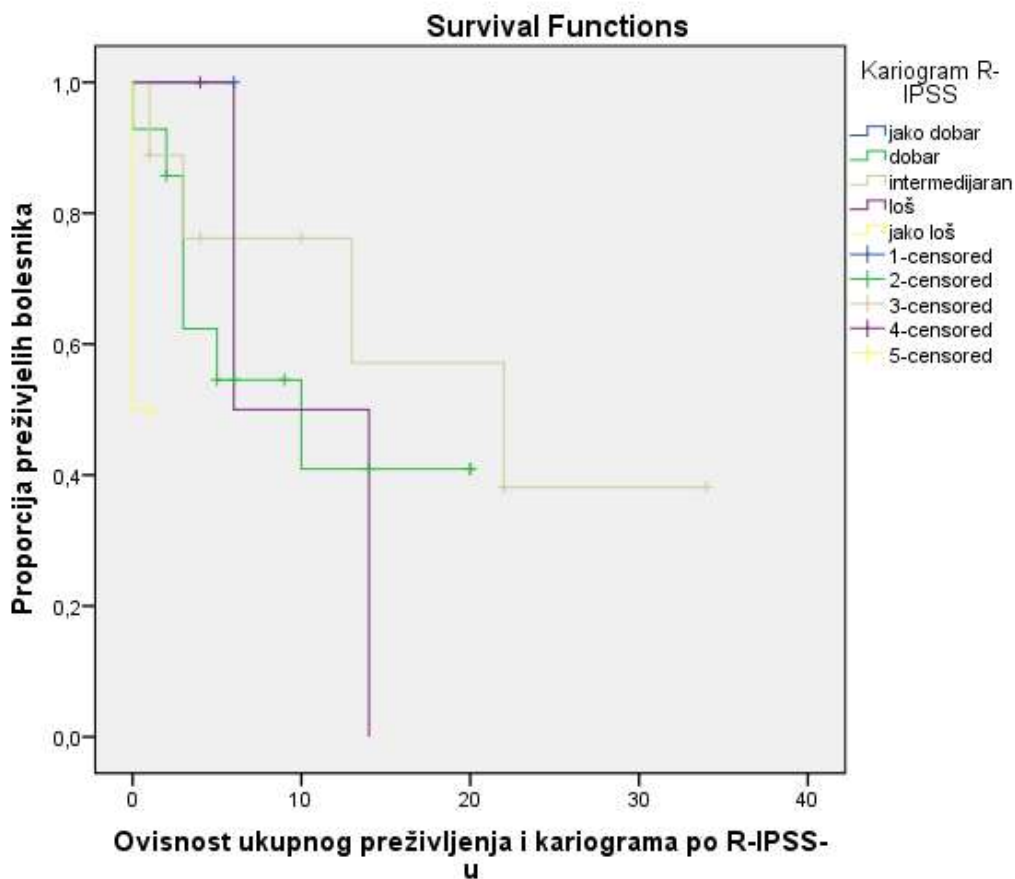
Slika 6. Ovisnost preživljenja i kariograma po IPSS-u



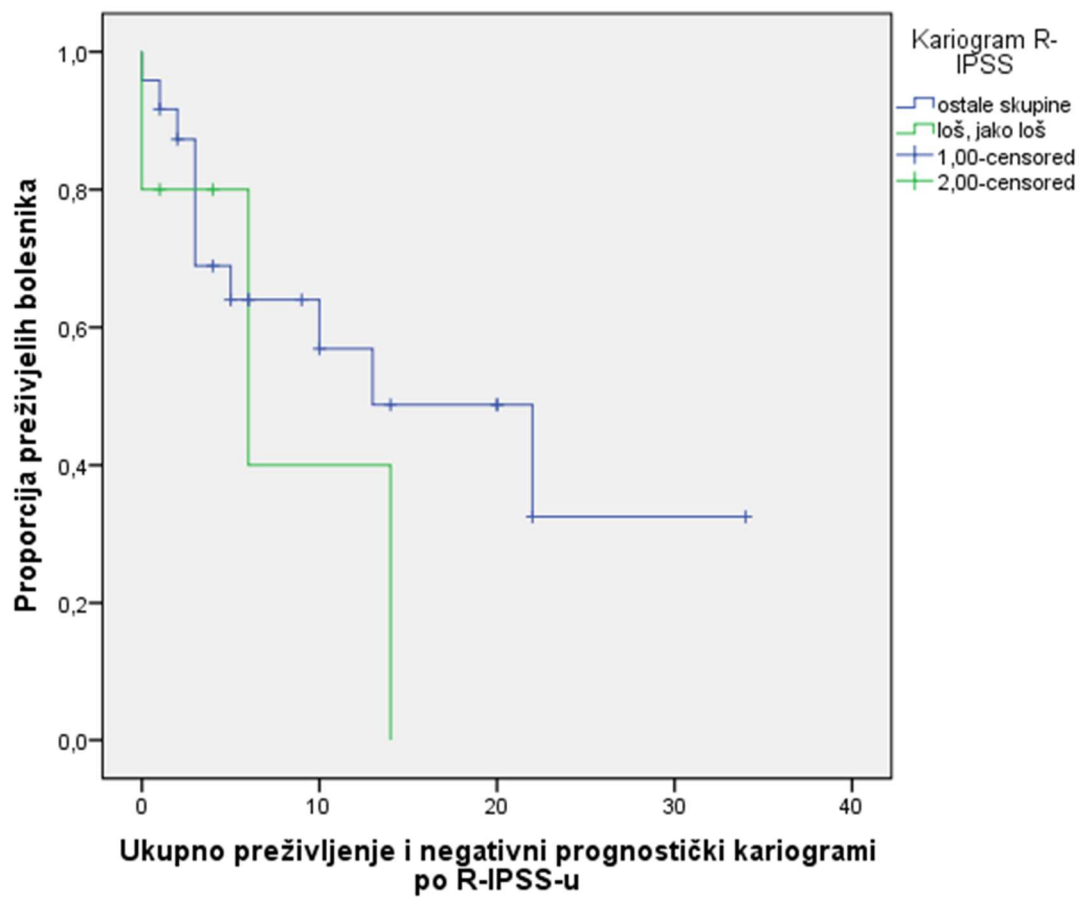
Slika 7. Ovisnost ukupnog preživljenja i „lošeg“ kariograma po IPSS indeksu

S obzirom da IPSS i WPSS imaju istu strukturu rizika po kariogramu, rezultati za WPSS su identični onima po IPSS-u.

Kao jedan od prognostičkih čimbenika, analizirali smo kariogram po R-IPSS skupini. Nije postajala statistički značajna razlika ( $\chi^2=5.54$ ,  $DF=4$ ,  $p=0.236$ ) što je prikazano na slici 8. U daljnjoj analizi podijelili smo bolesnike s lošim i jako lošim kariogramom naspram ostalih bolesnika. Usprkos seperacija krivulja i razlici u medijanima ukupnog preživljenja (13 vs. 6 mjeseci) nije dokazana statistički značajna razlika ( $\chi^2=0.982$ ,  $DF=1$ ,  $p=0.322$ ). To je prikazano na slici 9.



Slika 8. Ovisnost ukupnog preživljenja i kategorija kariograma po R-IPSS kategorijama



**Slika 9. Ovisnost ukupnog preživljenja i loše odnosno jako loše kategorije kariograma po R-IPSS-u**



## Rasprava

Kao prvi rezultat istraživanja moramo istaknuti medijan preživljenja koji iznosi 13 mjeseci s ukupnom stopom dvogodišnjeg preživljenja od 24%, što ukazuje na lošu prognozu ovih bolesnika. Nadalje, nadzire se plato u krivulji što može odgovarati da određena subpopulacija bolesnika s MDS-om ima indolentni oblik bolesti. S obzirom na limitacije ove studije ( nije analizirano liječenje, komplikacije same bolesti te drugi klinički čimbenici koji utječu na preživljenje) takva populacija se nije mogla jasno definirati. Nismo analizirali mortalitet specifičan za MDS ( progresija u AML, infekcije i krvarenje) te ne možemo s obzirom na stariju populaciju s multiplim komorbiditetima odrediti takav ishod, iako je u literaturnom pregledu jasno da većina pacijenata s MDS-om umire direktno od komplikacije povezano s osnovnom bolešću. (4) Medijan preživljena MDS-a u našoj kohorti je nešto manji nego studija u većem broju bolesnika(16) to možemo pripisati relativnoj nedostupnosti lijekova primarno eritroidno stimulirajućih agensa i kelatora željeza u nisko rizičnom MDS-u te činjenici da su hipometilirajući agensi ( 5-azacitadine) dostupni samo onim pacijentima sa visoko rizičnim MDS-om, za razliku od SAD-a gdje je ta indikacija puno šira. (17)

Prvi i drugi cilj ovog rada je bio usporediti povezanost kariograma pri dijagnozi s ukupnim preživljenjem . S obzirom na široku paletu patoloških nalaza koji se mogu naći u ovoj bolesti, analizirali smo kariogram po IPSS-u, WPSS i R-IPSS-u. Po ni jednoj kategoriji kariograma navedenih prognostičkih faktora nismo dobili statistički značajan rezultat, makar se vidi jasna separacija krivulje pogotovo u analizi IPSS kariograma po kategorijama. Navedeno možemo objasniti sample bias odnoso da je samo 30 pacijenata bilo uključeno u studiju dok su originalne studije uključivale oko tisuću pacijenata(9)(10)(11). Time ovo istraživanje nema veliku jačinu statističke moći da bi prepoznalo te razlike. Moramo naglasiti da ovim nalazom ne odbacujemo jačinu kariograma u svakodnevnoj kliničkoj praksi i istraživanju. U početku istraživanja imali smo 100 pacijenata, ali zbog nedostupnog kariograma, uključili smo samo 30 pacijenata pošto je kariogram uključni kriterij studije. To se može objasniti da navedena pretraga ne uspije u oko 25% bolesnika ili tehničkih razloga koje su se dogodile tijekom navedenog razdoblja istraživanja (došlo je do kvara uređaja). Čini se da IPSS i WPSS kariogrami zbog svoje jednostavnosti mogu bolje diskriminirati populaciju sa rizikom za smrt, za razliku od R-IPSS-a premda subanalizom navedenih varijabli u R-IPSS sustavu ( jako loš, loš vs ostale skupine) dobili smo separaciju krivulje makar nismo postigli statističku značajnu vrijednost.

Kao treći cilj analizirali smo dijagnostičke entitete po klasifikacije SZO iz 2008(3). Podijelivši varijable prema stupnjevima rizika po WPSS-u dobili smo statističku tendenciju lošijeg preživljenja onih pacijenata s RAEB1 i RAEB2 naspram ostalih entiteta. Navedeno je očekivano s obzirom na agresivniji klinički tijek tih entiteta i veće sklonosti progresije u AML, no moramo navesti da od klasifikacije SZO iz 2016(2) uvedeni su novi entiteti te je potrebna prospektivna istraživanja s validacijom istih u velikim kohortama i mogućem dobivanju novog indeksa koji će se temeljiti na novoj klasifikaciji. Iz tehničkih razloga ( vrijeme) bilo je nemoguće očitati sve dijagnostičke uzorke prema novoj klasifikaciji.

Kao četvrti cilj analizirali smo broj blasta u KS po citološkom aspiratu. Postoji jasna separacija krivulja u kojih medijan preživljenja nije dosegnut ( <2% blasta te 2-4% blasta) sa statističkom tendencijom koja nije dosegnuta. Bitno je napomenuti da broj blasta u KS treba periodično analizirati, pogotovo kod pacijenata s agresivnijim kliničkim tijekom bolesti.

Nadalje, iznenađujuće je to što je malen broj pacijenata čime ukazujemo da MDS kao entitet često nije prepoznat od strane LOM-a ili liječnika koji nije specijalist hematologije, unatoč činjenici da je to najčešća hematološka bolest starije dobi.(1) Razlog za to može biti da se radi o MDS-u nižeg rizika koji se prezentira samo s anemijom nepoznatog uzroka odnosno bolesnici nemaju većih tegoba koji bi zahtijevali daljnju specijalističku obradu.

## Zaključak

U našoj skupini bolesnika pokazan je medijan ukupni preživljenja od 13 mjeseci s dvogodišnjim ukupnim preživljenjem od 24%. Takav nalaz je i očekivan s obzirom na prirodan tijek bolesti i činjenicu da većina ovih bolesnika ne može podnijeti jedini kurativni postupak u ovoj bolesti odnosno alogeničnu transplantaciju matičnih stanica s obzirom na dob i komorbiditete. Nadalje, u ovom okružju je terapijski moguć samo jedan lijek 5-azacitidin, hipometilirajući agens za visokorizične bolesnika kojim je manji dio bolesnika liječen. Nadalje, medijan preživljenja je nešto niži nego u ostalim serijama što se može pripisati smanjenoj suportivnoj skrbi (kelacija željeza) u sekundarnoj hemokromatozi te nekorištenju eritropoetin stimulirajućih agenasa u bolesnika koji su kandidati za vid ovakvog liječenja prema Nordijskim kriterijima. Bitno je istaknuti da ovaj rad ukazuje na izuzetno lošu prognozu ovih bolesnika te potrebu za daljnjim otkrivanjem različitih lijekova s ciljem poboljšanih ishoda.

Drugi nalaz rada je malen broj uključenih bolesnika, odnosno kroz 3 godine u istraživanje je uključeno samo 30 bolesnika. Razlozi za to su višestruki. Prvi je sam uključni kriterij da bolesnik ima dostupan kariogram, no iz tehničkih razloga to može biti zahtjevno te se pretpostavlja da u 25% ta pretraga neće uspjeti. Drugi razlog je da je MDS, pogotovo oni podtipovi nižeg stupnja agresivnosti, često neprepoznat entitet s manifestacijom lakše anemije nepoznatog uzorka odnosno takvi pojedinci se ne upućuju hematologu na daljnju obradu.

U ovom radu nije dokazana primarna hipoteza odnosno da je nalaz citogenetike povezan s ukupnim preživljenjem. Mora se označiti da time ne odbacujemo vrijednost kariograma u svakodnevnoj kliničkoj praksi, nego zbog malog broja ispitanika i time male statističke jačine efekt kariograma na ukupno preživljenje se izgubio pogotovo u analizi kariograma prema R-IPSS-u koji sadrži 5 različitih kategorija, odnosno varijabli.

U analizi drugih prognostičkih čimbenika, pokazali smo da dvije varijable imaju tendenciju statističkoj značajnosti. Prva varijabla je broj blasta prema IPSS-R u aspiratu koštane srži gdje bolesnici s manje od 2% blasta imaju najbolji ishod u usporedbi s drugim bolesnicima s više blasta što govori u prilog da je R-IPSS najuvjerljiviji prognostički čimbenik kojim bi se trebalo rukovoditi jer jedino taj indeks koristi tu kategoriju.

Drugi prognostički čimbenik s tendencijom značajnosti je bio sam podtip MDS-a gdje se pokazalo da je moguće da oni bolesnici s RAEB I i RAEB II imaju lošije preživljenje nego drugi bolesnici. No, s obzirom na to da je MDS reklasificiran od strane SZO 2016. u nove entitete, stvarna klinička vrijednost takvog nalaza je upitna.

Usprkos nepostizanja statističke značajnosti u svim analizama, moramo shvatiti ovaj rad kao preliminarno istraživanje te će se u budućnosti s otvaranjem adekvatnih registara podaci o prirodnom tijeku MDS-a postati dostupni.

## Limitacije

Uključen je mali broj bolesnika iz činjenice da citogenetska analiza u MDS-u uspjeva u 75% slučajeva. S obzirom da su u istraživanje uzete samo 4 godine, nije za očekivati da će biti većeg broja bolesnika jer većina MDS-a ne bude prepoznata. Većina pacijenta se prezentira anemijom koja je ne bude prepoznata kao MDS od strane LOM-a. S obzirom da ni jedna varijabla koja je korištena kao prognostički čimbenik nije dosegla statističku značajnost od 0,05 nije bilo moguće provesti Cox regresijsku analizu. U ovoj studiji nije analizirano liječenje, komplikacije same bolesti te drugi klinički čimbenici koji utječu na preživljenje

## Zahvale

Želio bih se zahvaliti svojoj mentorici prof.dr.sc. Slobodanki Ostojić Kolonić na svojoj pomoći, vremenu i savjetima. Svom osoblju Zavoda za hematologiju Kliničke bolnice Merkur posebno dr.sc. Njetočki Gređelj-Šimec i dr. med. Ingi Mandac Rogulj. Posebno se zahvaljujem prim. Sanji Davidović Mrić iz laboratorija za citogenetiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb što mi je otvorila novi pogled u svijet citogenetike. Najviše se zahvaljujem dr. med. Viboru Milunoviću koji mi je svojim savjetima i ohrabrenjima pomogao da napišem ovaj rad i pri tome puno naučio. Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi bili vječna potpora i proživljavali sve moje uspjehe i stresove sa mnom. Zahvaljujem se i bakama i djedovima koji su uvijek vjerovali u mene. Također se zahvaljujem i svojim prijateljima koji su pokazali razumijevanje i potporu u teškim trenucima kada sam zbog pisanja ovog rada bio spriječen uživati u njihovom društvu.

## Literatura

1. Cogle CR. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep.* 2015;10(3):272–81.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–406.
3. Vardiman JW, Thiele J, ADEA. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2008;114(5):937–52.
4. Nachtkamp K, Stark R, Strupp C, Kündgen A, Giagounidis A, Aul C, et al. Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2016;95(6):937–44.
5. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet.* 2014;383(9936):2239–52.
6. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Loo P Van, et al. CME Article Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616–27.
7. Kumar P, Clark ML. Kumar and Clark's Clinical Medicine, 8th Edition. ELSEVIER SAUNDERS. 2012. 405 p.
8. Šimec Gredelj N, Gordana K, Škrtić A, Šiftar Z, Lasan-Trčić R, Valković T, et al. SMJERNICE ZA DIJAGNOZU I LIJEČENJE BOLESNIKA S MIJELODISPLASTIČNIM SINDROMOM. *Liječnički Vjesn.* 2017;(1–2):1–11.
9. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079–88.
10. Greenberg P, Tuechler H. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454–65.
11. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3503–10.
12. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: Recommendations from the European LeukemiaNet. Vol. 122, *Blood.* 2013. p. 2943–64.
13. Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26(4):337–53.
14. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, Pina S, Schiffer CA, Nimer SD, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000;96(12):3671–4.
15. IBM Corp. Released. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. 2011. 2011;
16. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. *Cancer.* 2007;109(8):1536–42.
17. Scott BL, Deeg HJ. Myelodysplastic Syndromes. *Annu Rev Med.* 2010;61(1):345–58.

## Životopis

Dražen Perica rođen 21.10.1991. u Ljubljani, Republika Slovenija. Završio osnovnu školu u Zagrebu i gimnaziju Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu. 2010. godine upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu. Tokom fakulteta sudjeluje u radu katedre za Histologiju i embriologiju kao demonstrator i radu katedre za Patofiziologiju kao demonstrator i aktivni član Seminaria Pathophysiologica Demonstratorum gdje je bio i predavač. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.