

# Neoangiogeneza i mikrovaskularna gustoća u mijelodisplastičnom sindromu

---

**Novačić, Bruno**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:105:033734>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruno Novačić**

**Neoangiogeneza i mikrovaskularna gustoća u  
mijelodisplastičnom sindromu**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruno Novačić**

**Neoangiogeneza i mikrovaskularna gustoća u  
mijelodisplastičnom sindromu**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur pod vodstvom doc.dr.sc. Anite Škrtić, dr.med i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## Sadržaj

SAŽETAK.....	I
SUMMARY .....	II
1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiologija i etiologija .....	1
1.2. Klinička slika.....	1
1.3. Dijagnostika.....	2
1.4. Morfološka klasifikacija .....	3
1.5. Prognoza i prediktivni čimbenici.....	4
1.6. Terapija.....	8
1.7. Prognostički značaj mikrovaskularne mreže u mijelodisplastičnim sindromima.....	10
2. HIPOTEZA .....	12
3. CILJEVI .....	13
4. MATERIJALI I METODE.....	14
5. REZULTATI.....	15
5.1. Određivanje morfoloških obilježja neoangiogeneze u biopsijama koštane srži .....	15
5.2. Usporedba morfoloških obilježja neoangiogeneze u biopsijama koštane srži.....	16
5.3. Određivanje korelacije morfometrijskih varijabli s kliničkopatološkim karakteristikama u mijelodisplastičnim sindromima .....	17
5.4. Prognostički značaj morfometrijskih varijabli bolesnika s MDS-om.....	19
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI .....	23
8. ZAHVALE .....	24
9. LITERATURA.....	25
10. ŽIVOTOPIS.....	27

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

AML – akutna mijeloična leukemija (eng. *acute myeloid leukemia*)

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

CCSS – Sveobuhvatni citogenetički sustav bodovanja (eng. *Comprehensive Cytogenetic Scoring System*)

CD34 – eng. *cluster of differentiation 34*

CMML – kronična mijelomonocitna leukemija (eng. *chronic myelomonocytic leukemia*)

HE – hemalaun-eozin bojanje

HRP – peroksidaza hrena (eng. *horseradish peroxidase*)

ICUS – idiopatska citopenija neodređenoga značaja (eng. *idiopathic cytopenia of undetermined significance*)

IDUS – idiopatska displazija neodređenoga značaja (eng. *idiopathic dysplasia of undetermined significance*)

IPSS – Međunarodni sustav stratifikacije rizika (eng. *International Prognostic Scoring System*)

IPSS-R – Revidirani Međunarodni sustav stratifikacije rizika (eng. *International Prognostic Scoring System-Revised*)

KB – klinička bolnica

LSAB – obilježeni streptavidin-biotin (eng. *labeled streptavidin-biotin*)

MDACC – Centar za rak MD Anderson (eng. *MD Anderson Cancer Center*)

MDS – mijelodisplastični sindrom (eng. *myelodysplastic syndrome*)

MDS-EB – mijelodisplastični sindrom sa prekobrojnim blastima (eng. *myelodysplastic syndrome with excess blasts*)

MDS-MLD – mijelodisplastični sindrom s displazijom više loza (eng. *myelodysplastic syndrome with multilineage dysplasia*)

MDS-NOS – mijelodisplastični sindrom, neklasificirani (eng. *myelodysplastic syndrome - not otherwise specified*)

MDS-RS-SLD – mijelodisplastični sindrom sa prstenastim sideroplastima i displazijom jedne loze (eng. *myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts and single lineage dysplasia*)

MDS-SLD – mijelodisplastični sindrom s displazijom jedne loze (eng. *myelodysplastic syndrome with single lineage dysplasia*)

MDS-U – mijelodisplastični sindrom, neklasificirani (eng. *myelodysplastic syndrome – unclassified*)

MPN – mijeloproliferativna novotvorina (eng. *myeloproliferative neoplasm*)

MVD – mikrovaskularna gustoća (eng. *microvascular density*)

PAS – eng. *periodic acid-Schiff*

RA – refraktorna anemija (eng. *refractory anemia*)

RAEB – refraktorna anemija sa prekobrojnim blastima (eng. *refractory anemia with excess blasts*)

RARS – refraktorna anemija sa prstenastim sideroplastima (eng. *refractory anemia with ring sideroblasts*)

RCMD – refraktorna citopenija sa displazijom više loza (eng. *refractory cytopenia with multilineage dysplasia*)

RTU – za neposrednu uporabu (eng. *ready-to-use*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)

## SAŽETAK

Neoangiogeneza i mikrovaskularna gustoća u mijelodisplastičnom sindromu

Autor: Bruno Novačić

Mijelodisplastični sindromi (MDS) su skupina bolesti monoklonalnih krvotvornih matičnih stanica obilježenih citopenijom, displazijom u jednoj ili više mijeloidnih loza, neučinkovitom hematopoezom, rekurentnim genetičkim abnormalnostima i povećanim rizikom od razvoja akutne mijeloidne leukemije. Prema etiologiji MDS se dijeli na primarni koji se pojavljuje *de novo* i sekundarni koji se pojavljuje kod osoba koje su liječene kemoterapijom ili su bile izložene zračenju. Dijagnoza MDS-a se postavlja mikroskopskom analizom aspirata i bioptata koštane srži. Proces angiogeneze sudjeluje i u patogenezi i tijeku MDS-a, a mikrovaskularna gustoća (MVD) u biopatima koštane srži jedan je od prognostičkih čimbenika koji utječe na progresiju MDS-a.

Opći cilj ovoga rada je bilo određivanje učestalosti morfoloških obilježja neoangiogeneze i MVD-a u biopatima koštane srži bolesnika oboljelih od MDS-a. Specifični ciljevi su bili usporedba morfoloških obilježja neoangiogeneze i MVD-a između skupina ispitanika, utvrđivanje korelacije morfometrijskih varijabli s kliničkopatološkim karakteristikama u MDS-u i određivanje prognostičkoga značaja morfometrijskih varijabli u skupini bolesnika s MDS-om. U retrospektivnom istraživanju bila su uključena 44 pacijenta od kojih 32 s MDS-om, 12 s kroničnom mijelomonocitnom leukemijom (CMML), i 8 ispitanika u kontrolnoj skupini. Skupina bolesnika s MDS-om je imala značajno veći MVD i najveći dijametar krvnih žila u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedina je statistički značajna razlika u najmanjim dijametrima krvnih žila zabilježena između kontrolne skupine i skupine bolesnika s CMML-om. Kariotipizirani bolesnici su podijeljeni u prognostičke podskupine prema Sveobuhvatnom citogenetičkom sustavu bodovanja (CCSS). Analiza varijance (ANOVA) je pokazala najveću zastupljenost dobre CCSS prognostičke podskupine među bolesnicima s MDS-om. Svim je bolesnicima izračunata ukupna IPSS-R bodovna vrijednost i proučen daljnji tijek bolesti analizom podataka o transfuzijskome liječenju, progresiji bolesti i mogućem smrtnom ishodu. Najmanje polovica bolesnika s MDS-om razvila je potrebu za transfuzijskim liječenjem. Veći udio bolesnika s progresijom bolesti opažen je u skupinama MDS-a čiji je MVD bio viši. Nije opažena korelacija najmanjega dijametra krvnih žila i ukupnoga preživljenja bolesnika. Statistički značajne razlike u vrijednostima MVD-a i morfometrijskih varijabli među skupinama bolesnika s MDS-om upućuju na izraženiju angiogenezu u koštanoj srži bolesnika s MDS-om višega rizika u odnosu na bolesnike s MDS-om nižega rizika. Velika mikrovaskularna gustoća i dijametri krvnih žila u skupini bolesnika s CMML-om ukazuju na angiogeni učinak mijeloproliferativne komponente CMML-a na mikrovaskulaturu koštane srži.

**Ključne riječi:** angiogeneza; morfometrija; MDS



## SUMMARY

Neoangiogenesis and microvascular density in myelodysplastic syndrome

Author: Bruno Novačić

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by cytopenia, dysplasia in one or more of the major myeloid lineages, ineffective hematopoiesis, recurrent genetic abnormalities and increased risk of developing acute myeloid leukemia (AML). Based on etiology, MDS is divided into primary, which occurs *de novo*, and secondary, which occurs due to chemotherapy or radiation exposure. MDS is diagnosed by microscopic examination of bone marrow smear and bone marrow trephine biopsy. The process of angiogenesis plays a role in the pathogenesis and course of MDS, and microvascular density (MVD) in bone marrow trephine biopsies is one of prognostic factors which affect MDS progression.

The primary goal of this paper was to determine the frequency of morphological features of neoangiogenesis and MVD in bone marrow trephine biopsies of patients with MDS. The specific objectives were to compare the morphological features and MVD among patient groups, to determine correlation of morphometric variables with clinicopathologic characteristics in MDS. This retrospective research included 44 patients (32 with MDS, 12 with chronic myelomonocytic leukemia (CMML)) and 8 subjects in control group. MDS group had significantly higher MVD and major axis values than the control group. The only statistically significant minor axis value difference was observed between control group and CMML group. Patients with known karyotypes were divided into prognostic subgroups according to the Comprehensive Cytogenetic Scoring System (CCSS). Analysis of variance (ANOVA) showed that the good CCSS prognostic subgroup was the most represented subgroup among MDS groups. Patients' total IPSS-R score was calculated and information pertaining to patients' transfusion therapy, disease progression and possible fatal outcome was examined. Half of all MDS patients or more eventually required transfusion therapy. MDS groups with higher MVD values showed a higher proportion of patients with disease progression. No correlation was observed between minor axis values and overall patient survival. Statistically significant differences in MVD and morphometric variable values among MDS groups indicate more active angiogenesis in bone marrows of higher risk MDS patients than in bone marrows of lower risk MDS patients. High MVD and major axis values in CMML patients indicate the angiogenic effect of myeloproliferative component of CMML on bone marrow microvascular structures.

**Keywords:** angiogenesis; morphometry; MDS

## 1. UVOD

Mijelodisplastični sindromi (MDS) su skupina bolesti monoklonalnih krvotvornih matičnih stanica obilježenih citopenijom, displazijom u jednoj ili više mijeloičnih loza, neučinkovitim hematopoezom, rekurentnim genetičkim abnormalnostima i povećanim rizikom od razvoja akutne mijeloične leukemije (AML). MDS se dijagnosticira mikroskopskom analizom aspirata i bioptata koštane srži (1).

### 1.1. Epidemiologija i etiologija

MDS se najčešće javlja u starijih odraslih osoba, pri čemu je medijan dobi oboljelih osoba 70 godina. Predominantno su zahvaćeni muškarci. Godišnja incidencija MDS-a je 3 do 5 slučajeva na 100 000 osoba u općoj populaciji, dok je u populaciji osoba starijih od 70 godina incidencija barem 20 slučajeva na 100 000 osoba (2). U Sjedinjenim Američkim Državama godišnje se dijagnosticira više od 10 000 novooboljelih od MDS-a. Uspoređujući incidenciju prema rasnoj pripadnosti, najviša je stopa incidencije među osobama bijele rase. Preživljenje oboljelih od MDS-a je nisko, osobito kod oboljelih osoba muškoga spola i onih kojima je dijagnoza postavljena u starijoj životnoj dobi. Trogodišnja stopa preživljenja iznosi tek 35% (3).

Prema etiologiji MDS se dijeli na primarni i sekundarni. Primarni se MDS pojavljuje *de novo*, dok se sekundarni MDS pojavljuje kod osoba koje su liječene kemoterapijom ili su bile izložene zračenju (1).

Mogući uzroci primarnoga MDS-a uključuju izloženost benzenu (dozama višim od zakonski dozvoljenih), pušenje cigareta (djelomično zbog prisutnosti benzena u dimu cigareta), izloženost pesticidima i otapalima koji se rabe u poljoprivredi te prisutnost zloćudnih bolesti krvotvornoga sustava u obiteljskoj anamnezi (4).

Neki nasljedni hematološki poremećaji kao što su Fanconijeva anemija, *dyskeratosis congenita*, Shwachman-Diamond sindrom i Diamond-Blackfan anemija, također su povezani s povećanim rizikom od nastanka MDS-a (1).

### 1.2. Klinička slika

Većina pacijenata oboljelih od MDS-a ima simptome vezane uz citopeniju. Pacijenti najčešće pokazuju simptome anemije (npr. umor, dispneja), no kod nekih pacijenata mogu biti prisutne modrice, krvarenja ili petehije (zbog trombocitopenije) ili rekurentne infekcije (zbog neutropenije). Većini pacijenata koji ne liječe svoj MDS u jednom će trenutku biti potrebno dati transfuzije eritrocita (5). Organomegalija se rijetko opaža kod oboljelih od MDS-a (1).

Komorbidity koji pogađaju oboljele od MDS-a su bolesti srca (infarkt miokarda, kongestivno zatajenje srca, aritmije), dijabetes, dispneja, bolesti jetre i zarazne bolesti. Pacijenti kojima su potrebne transfuzije eritrocita imaju veću učestalost komorbiditeta u odnosu na pacijente kojima nisu potrebne transfuzije eritrocita. Kod pacijenata oboljelih od MDS-a veća je prevalencija razvoja akutne mijeloične leukemije (AML) u odnosu na opću populaciju, a razvoju AML-a osobito su skloni pacijenti s MDS-om ovisni o transfuzijama eritrocita (6).

Najčešći uzroci smrti pacijenata oboljelih od MDS-a su infekcije (pneumonija i sepsa), transformacija u AML i krvarenje (u središnji živčani sustav, probavni sustav i pluća). Najčešći uzrok smrti oboljelih od MDS-a koji nije vezan uz MDS su kardiovaskularne bolesti (7).

### **1.3. Dijagnostika**

Dijagnoza MDS-a temelji se na morfološkoj analizi aspirata koštane srži i biopsije koštane srži. Aspirat koštane srži omogućava detaljnu procjenu morfologije stanica i procjenu postotka blasta. Biopsija koštane srži omogućava procjenu celularnosti i arhitekture koštane srži. Dijagnoza se postavlja na postojanju displazije stanica hemocitopoeze. Morfološka klasifikacija pacijenata oboljelih od MDS-a temelji se na klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (8).

Analiza citogenetičkih promjena u stanicama hemocitopoeze je dodatna dijagnostička pretraga u pacijenta oboljelih od MDS-a. Dodatne su pretrage potrebne da se dovrši laboratorijska dijagnostika pacijenta oboljelog od MDS-a. Poznato je da su citogenetičke promjene vrlo heterogene u MDS-u (9). Citogenetika je važna za određivanje prognoze bolesti i za odabir adekvatne terapije. Najnovija klasifikacija citogenetičkoga rizika u MDS-u sadrži pet različitih podskupina koje obuhvaćaju dvadeset različitih citogenetičkih promjena (10).

Dijagnoza MDS-a je očita kada je uz displastične promjene na stanicama prisutan povećan postotak blasta u koštanoj srži, ali je upitna kada se dijagnoza temelji na displaziji u odsutnosti povećanoga postotka blasta. Za pacijente s minimalnom ili odsutnom displazijom potrebna je klinička procjena. U ovakvim se slučajevima preporuča isključivanje ostalih uzroka citopenije. Rutinske pretrage uključuju analizu anemije i trombocitopenije te isključivanje uzroka krvarenja ili upalnih procesa. Kada se isključe ostali potencijalni uzroci citopenije, dodatne pretrage poput citogenetičke analize, protočne citometrije i sekvencioniranja DNA pomažu u dijagnostici i predviđanju ishoda bolesti (11).

#### 1.4. Morfološka klasifikacija

Morfološka klasifikacija MDS-a se temelji na postotku blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi, tipu i stupnju displazije, te postotku prstenastih sideroblasta. Broj blasta u mijeloidnim neoplazmama se izražava u koštanoj srži kao postotak svih stanica s jezgrom (uključujući eritroidne stanice s jezgrom); te u perifernoj krvi kao postotak leukocita (izuzev eritroidnih stanica s jezgrom). MDS u kojima nije povećan postotak blasta pokazuju displaziju jedne ili više krvotvornih loza, pri čemu se signifikantnom displazijom smatra onom u kojoj je displastično 10% ili više od 10% krvotvornih stanica određene loze. Klasifikacija SZO-e iz 2016. godine razlikuje MDS sa displazijom jedne loze, MDS sa displazijom više loza, MDS s prstenastim sideroblastima, MDS s izoliranom delecijom dugoga kraka kromosoma 5 (del 5q), MDS s prekomjernim blastima i neklasificirani MDS (MDS-NOS) (8).

**Tablica 1.** Kriteriji klasifikacije mijelodisplastičnih sindroma SZO-e iz 2016. godine.<sup>1</sup>

Tip	Broj loza s displazijom	Broj loza s citopenijom <sup>2</sup>	Postotak prstenastih sideroblasta u eritroidnim elementima koštane srži	Postotak blasta	Citogenetički profil
MDS-SLD	1	1 ili 2	RS<15% (ili <5% <sup>3</sup> )	u PK<1% u KS<5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji, osim ako ne zadovoljava kriterije za izoliranu del(5q)
MDS-MLD	2 ili 3	1-3	RS<15% (ili <5% <sup>3</sup> )	u PK<1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji, osim ako ne zadovoljava kriterije za izoliranu del(5q)
MDS-RS					
MDS-RS-SLD	1	1 ili 2	RS≥ 15% (ili ≥5% <sup>3</sup> )	u PK <1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji, osim ako ne zadovoljava kriterije za izoliranu del(5q)
MDS-RS-MLD	2 ili 3	1-3	RS≥ 15% (ili ≥5% <sup>3</sup> )	u PK <1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji, osim ako ne zadovoljava kriterije za izoliranu del(5q)
MDS sa izoliranom del(5q)	1-3	1-2	Nula ili bilo koji	u PK <1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	izolirana del(5q) ili sa 1 dodatnom abnormalnosti osim -7 ili del(7q)
MDS-EB					
MDS-EB-1	0-3	1-3	Nula ili bilo koji	u PK 2-4% ili u KS 5-9%, nema Auerovih štapića	Bilo koji
MDS-EB-2	0-3	1-3	Nula ili bilo koji	u PK 5-19% ili u KS 10-19% ili Auerovi štapići	Bilo koji
MDS-U sa 1% blasta u perifernoj krvi	1-3	1-3	Nula ili bilo koji	u PK=1% <sup>4</sup> , u KS < 5%, Auerovi štapići	Bilo koji
sa SLD and pancitopenijom	1	3	Nula ili bilo koji	u PK <1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji
Definirajuća citogenetička abnormalnost	0	1-3	<15% <sup>5</sup>	u PK<1% u KS <5%, nema Auerovih štapića	Abnormalnost koja definira MDS
RCC	1-3	1-3	Nema ih	u PK< 2% u KS< 5%, nema Auerovih štapića	Bilo koji

\*SZO: Svjetska zdravstvena organizacija; MDS: mijelodisplastični sindromi; PK: periferna krv; KS: koštana srž; RS: prstenasti sideroblasti;

\*MDS-SLD: MDS sa displazijom jedne loze; MDS-MLD: MDS sa displazijom više loza; MDS-EB: MDS sa suvišnim blastima;

\*MDS-U: MSD, neklasificirani; RCC: refraktorna citopenija u djetinjstvu.

<sup>1</sup>Prema: WHO (2016), str. 99, uz dopuštenje International Agency for Research on Cancer

<sup>2</sup>Citopenije koje definiraju MDS: hemoglobin u krvi < 100g/L, broj trombocita u krvi <  $100 \times 10^9/L$ , apsolutni broj neutrofila u krvi <  $1.8 \times 10^9/L$ ; apsolutni broj monocita u krvi <  $1.0 \times 10^9/L$ ;

<sup>3</sup>sa *SF3B1* mutacijom;

<sup>4</sup>1% blasta u perifernoj krvi mora biti opaženo u najmanje dva zasebna promatranja;

<sup>5</sup>>15% prstenastih sideroblasta i značajna displazija eritroidne loze, klasificirano kao MDS-RS-SLD.

MDS/MPN predstavlja skupinu bolesti koja u trenutku dijagnoze zadovoljavaju kliničke, morfološke i laboratorijske kriterije i MDS-a i MPN-a. Unutar ove skupine bolesti najbolje je istražena kronična mijelomonocitna leukemija (CMML) (12). Dijagnoza CMML-a postavlja se na temelju perzistentne monocitoze veće od  $1 \times 10^9/L$  i manje od 20% blasta u perifernoj krvi; više od 10% monocita u diferencijalnoj krvnoj slici; displazije minimalno jedne mijeloične loze; isključnih kriterija MPN bolesti i mijeloidnih/limfoidnih novotvorina s eozinofilijom. CMML se danas dijeli u tri kategorije definirane postotkom blasta i promonocita u perifernoj krvi i koštanoj srži. Kategorija CMML-0 obuhvaća bolesnike koji imaju manje od 2% blasta u perifernoj krvi i manje od 5% blasta u koštanoj srži, kategorija CMML-1 obuhvaća bolesnike koji imaju 2-4% blasta u perifernoj krvi i/ili 5-9% blasta u koštanoj srži, a kategorija CMML-2 obuhvaća bolesnike koji imaju 5-19% blasta u perifernoj krvi, 10-19% blasta u koštanoj srži i/ili Auerove štapiće (1).

## 1.5. Prognoza i prediktivni čimbenici

Podtipove MDS-a se u načelu može svrstati u tri skupine rizika na temelju preživljenja bolesnika i incidencije razvoja akutne mijeloične leukemije (AML). Skupina niskoga rizika obuhvaća MDS s displazijom stanica jedne krvotvorne loze, MDS s prstenastim sideroblastima i displazijom stanica jedne loze, te MDS s izoliranom del 5q. Skupina srednjega rizika obuhvaća MDS s displazijom više krvotvornih loza i MDS s prstenastim sideroblastima i displazijom više loza. Skupina visokoga rizika obuhvaća MDS s prekobrajnim blastima. Kategorija MDS-a koji se ne mogu drugdje klasificirati (MDS-NOS) obuhvaća slučajeve s heterogenom kliničkom slikom (1).

Budući da je prognoza pacijenata s MDS-om vrlo heterogena, razvijeni su prognostički sustavi koji stratificiraju rizik i pomažu u izboru terapije. Međunarodni sustav stratifikacije rizika (IPSS) MDS je prognostički sustav koji je osnovan 1997. godine. Ovaj prognostički sustav temelji se na postotku blasta, broju citopenija i citogenetici. IPSS je korišten u svrhu određivanja prognoze preživljenja više od dva desetljeća. Jednostavan je za korištenje, ali postoje ograničenja u njegovoj primjeni. IPSS nije

precizan u određivanju prognoze preživljenja bolesnika s MDS-om nižega rizika. Druga mana IPSS-a je što citogenetičke promjene imaju relativno mali utjecaj na prognozu (**13**).

Sve veće znanje o utjecaju citogenetičkih abnormalnosti na prognozu preživljenja oboljelih od MDS-a dovelo je do razvoja Sveobuhvatnoga citogenetičkoga sustava bodovanja (CCSS). Trenutni CCSS za MDS sadrži pet prognostičkih podskupina s različitim prognozama preživljenja i rizicima progresije MDS-a u AML.

**Tablica 2.** Sveobuhvatni citogenetički sustav bodovanja (CCSS) za mijelodisplastične sindrome.<sup>1</sup>

Prognostička podskupina	Definirajuće citogenetičke abnormalnosti
Vrlo dobra	Gubitak kromosoma Y del(11q)
Dobra	Normalan kariotip del(5q) del(12p) del(20q) Dvije istovremeno, uključujući del(5q)
Srednje dobra	del(7q) Umnažanje kromosoma 8 Umnažanje kromosoma 19 Izokromosom 17q Jedna ili dvije abnormalnosti koje nisu određene u drugim podskupinama Dva ili više neovisna klona nekompleksnoga kariotipa
Loša	Gubitak kromosoma 7 inv(3), t(3q) ili del(3q) Dvije istovremeno uključujući gubitak kromosoma 7 ili del(7q) Kompleksan kariotip (3 abnormalnosti)
Vrlo loša	Kompleksan kariotip (> 3 abnormalnosti)

<sup>1</sup> Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 2017.

Vrlo dobra prognoza bolesti prema CCSS-u povezana je s gubitkom Y kromosoma i delecijom dugoga kraka kromosoma 11 (del 11q). Dobra prognoza bolesti povezana je s normalnim kariotipom, delecijom dugoga kraka kromosoma 5 (del 5q), kratkoga kraka kromosoma 12 (del 12p) i dugoga kraka kromosoma 20 (del 20q). Srednje dobra prognoza bolesti povezana je s delecijom dugoga kraka kromosoma 7 (del 7q), umnažanjem kromosoma 8, umnažanjem kromosoma 19 i izokromosomom dugoga kraka kromosoma 17 (i 17q). Loša prognoza bolesti povezana je s gubitkom kromosoma 7, inverzijom kromosoma 3 (inv 3), translokacijom dugoga kraka kromosoma 3 (t 3q) i delecijom dugoga kraka kromosoma 3 (del 3q). Vrlo loša prognoza bolesti povezana je s istovremenom prisutnosti više od tri citogenetičke abnormalnosti (**10**).

2012. godine utemeljen je Revidirani međunarodni sustav stratifikacije rizika MDS-a (IPSS-R). IPSS-R se temelji na postotku blasta u koštanoj srži, citogenetičkoj skupini rizika prema CCSS-u i stupnju citopenije u svakoj lozi, a radi prognoze preživljenja i rizika razvoja AML. Na temelju ukupnoga broja bodova dobivenoga iz ovih parametara definirano je pet IPSS-R stupnjeva rizika: vrlo nizak ( $\leq 1.5$  do 3 boda), srednji ( $>3$  do 4.5 boda), visok ( $>4.5$  do 6 boda) i vrlo visok ( $>6$  boda) stupanj rizika (14).

**Tablica 3.** Bodovne vrijednosti Revidiranoga međunarodnoga sustava stratifikacije rizika (IPSS-R) za mijelodisplastične sindrome.<sup>1</sup>

Prognostička varijabla	Bodovne vrijednosti						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenetički profil	Vrlo dobar	—	Dobar	—	Srednje dobar	Loš	Vrlo loš
Blasti u koštanoj srži (%)	$\leq 2$	—	$>2\%$ do $<5\%$	—	5% do 10%	$>10\%$	—
Hemoglobin	$\geq 10$	—	8 do $<10$	$<8$	—	—	—
Broj trombocita	$\geq 100$	50 do $<100$	$<50$	—	—	—	—
Apsolutni broj neutrofila	$\geq 0.8$	$<0.8$	—	—	—	—	—

\*— označava da nije primjenjivo.

<sup>1</sup> Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 2017.

IPSS i IPSS-R razvijeni su radi prognoze preživljenja pacijenata u trenutku dijagnoze MDS-a u inicijalnoj fazi bolesti, ali nisu se odnosili na pacijente s proliferativnim značajkama bolesti, pacijente s CMML-om i na pacijente koji su primali terapiju (13)(14). Prognostički model Centra za rak MD Anderson (MDACC) MDS razvijen je kako bi se omogućila prognoza preživljenja pacijenata s MDS-om u bilo kojoj fazi njihove bolesti. Prognostički čimbenici u MDACC MDS modelu su opće tjelesno stanje bolesnika (*engl. performance status*), dob bolesnika, broj trombocita u perifernoj krvi, koncentracija hemoglobina u krvi, postotak blasta u koštanoj srži, broj bijelih krvnih stanica u perifernoj krvi, prethodno primanje transfuzije i abnormalnost kromosoma 7 ili prisutnost 3 ili više citogenetičkih abnormalnosti (15).

Navedeni prognostički modeli nisu primjenjivi na pacijente oboljele od MDS-a nižega rizika i loše prognoze, a kojima bi koristila rana terapijska intervencija. 2008. godine je u MDACC-u provedeno istraživanje na uzorku od 856 pacijenata s MDS-om nižega rizika radi razvoja prognostičkoga modela

za pacijente s MDS-om nižega rizika. Korištenjem multivarijatne analize dobiveni su čimbenici povezani s lošijim preživljenjem. Ti su čimbenici bili nizak broj trombocita, anemija, starija životna dob, viši postotak blasta u koštanoj srži i nepovoljan citogenetički profil. Na temelju ovih rezultata razvijen je MDACC sustav bodovanja za prognozu MDS-a nižega rizika. Svaki od navedenih čimbenika povezan s lošijim preživljenjem povezan je uz određen broj bodova, a ukupan broj bodova računa se zbrajanjem svih bodova. Ukupan broj bodova omogućuje izračun medijana perioda preživljenja izraženoga u mjesecima i vjerojatnost četverogodišnjega preživljenja **(16)**.



## 1.6. Terapija

Terapija se odabire na temelju stupnja IPSS-R rizika, potreba za transfuzijom, postotka blasta u koštanoj srži i citogenetičkih te mutacijskih profila. Cilj terapije MDS-a niskoga rizika je smanjiti potrebu za transfuzijom i spriječiti progresiju u MDS višega rizika ili AML, te produljiti preživljenje. Cilj terapije MDS-a visokoga rizika je produljiti preživljenje (11).

Trenutne mogućnosti liječenja za MDS niskoga rizika uključuju davanje čimbenika rasta, lenalidomid ili azanukleozide. Liječenje se započinje davanjem čimbenika rasta, a u slučaju izostanka odgovora na čimbenike rasta u terapiju se mogu uvesti lenalidomid ili azanukleozidi. Za pacijente čija bolest ne reagira ni na jedan od ovih oblika terapije treba razmotriti alogeničnu transplantaciju matičnih stanica i/ili sudjelovanje u kliničkim ispitivanjima. Za pacijente s MDS-om visokoga rizika u terapiji se mogu primijeniti alogenična transplantacija matičnih stanica, intenzivna kemoterapija ili azanukleozidi (17).

Multicentrično kliničko istraživanje provedeno od 2004. do 2006. godine usporedilo je učinak 5-azacitidina na ukupno preživljenje pacijenata s MDS-om visokoga rizika s učinkom potporne terapije, citarabina u niskoj dozi i intenzivne kemoterapije na ukupno preživljenje tih pacijenata. U skupini pacijenata liječenih azacitidinom medijan ukupnoga preživljenja bio je 24,5 mjeseci, a u skupini pacijenata liječenih konvencionalnim metodama medijan ukupnoga preživljenja bio je 15,0 mjeseci. Nakon 2 godine Kaplan-Meierove krivulje preživljenja preživjelo je 50,8% pacijenata u skupini liječenoj azacitidinom, a u skupini liječenoj konvencionalnim metodama preživjelo je 26,2% pacijenata. Na temelju toga istraživanja zaključeno je da primjena 5-azacitidina povećava preživljenje pacijenata s MDS-om visokoga rizika (18).

Alogenična transplantacija matičnih stanica može izliječiti MDS, ali sama transplantacija može dovesti do povećanja morbiditeta i mortaliteta. Cutler i suradnici koristili su Markovljev model kako bi analizirali uspješnost tri različita pristupa transplantaciji za pacijente s novodijagnosticiranim MDS-om. Prvi pristup je bio transplantacija u trenutku dijagnoze, drugi je pristup bio transplantacija u trenutku progresije u leukemiju, a treći je pristup bio transplantacija u intervalu od dijagnoze do progresije u leukemiju. Analize su provedene za sve skupine rizika prema Međunarodnome prognostičkome sustavu bodovanja (IPSS) koristeći podatke iz transplantacijskih i netransplantacijskih registara. Pacijenti oboljeli od MDS-a nižega rizika prema IPSS-u kojima je učinjena odgođena alogenična transplantacija matičnih stanica postigli su najveće ukupno preživljenje. Transplantacija učinjena prije progresije u leukemiju bila je povezana s duljim preživljenjem u odnosu na transplantaciju učinjenu u trenutku progresije bolesti u leukemiju. Povećanje preživljenja odgođene transplantacije u odnosu na transplantaciju u trenutku dijagnoze bilo je još izraženije u kohorti pacijenata mlađih od 40 godina. Međutim, pacijenti oboljeli od MDS-a višega rizika prema IPSS-u postigli su najveće ukupno preživljenje kada im je učinjena transplantacija u trenutku dijagnoze. Na temelju ove analize zaključeno je da se alogeničnom transplantacijom matičnih stanica postiže

maksimalno produljenje života kada se učini pacijentima oboljelima od MDS-a višega rizika u trenutku dijagnoze, a za pacijente oboljele od MDS-a nižega rizika ona bi se trebala primijeniti tek kasnije **(19)**.

### 1.7. Prognostički značaj mikrovaskularne mreže u mijelodisplastičnim sindromima

Jedan od prognostičkih čimbenika koji se sve više istražuje u zadnje vrijeme jest tumorska angiogeneza koja se mjeri određivanjem mikrovaskularne gustoće na preparatima obojanima imunohistokemijski koristeći biljege endotelnih stanica (krvožilne biljege). Pretpostavka je da gustoća mikrovaskulature unutar tumora pruža procjenu sposobnosti tumorskih stanica za angiogenezu, što onda odražava vjerojatnost progresije bolesti (20).

Proces angiogeneze ne događa se samo u solidnim tumorima, već sudjeluje i u patogenezi i tijeku MDS-a. Analiza mikrovaskularne gustoće (MVD) u bioptatima koštane srži pacijenata oboljelih od MDS-a pokazuje veći MVD nego u bioptatima koštane srži kontrolne skupine, što ukazuje na izraženi proces angiogeneze u MDS-u. Vrijednosti MVD-a su više u bioptatima koštane srži pacijenata oboljelih od AML-a i u bioptatima oboljelih od mijeloproliferativnih bolesti nego u bioptatima pacijenata oboljelih od MDS-a. Time je pokazana pozitivna korelacija između angiogeneze i progresije MDS-a u leukemiju (21). Vaskularni endotelni čimbenik rasta, bazični čimbenik rasta fibroblasta i čimbenik rasta hepatocita su čimbenici angiogeneze čije su plazmatske koncentracije značajno povišene u AML-u, kroničnoj mijeloičnoj leukemiji, kroničnoj limfocitnoj leukemiji, CMML-u i MDS-u. Navedeni čimbenici angiogeneze zajedno s MVD-om ukazuju na ulogu angiogeneze u progresiji MDS-a u leukemiju (22).

Chan Kyu Kim i suradnici su 2016. godine objavili retrospektivno istraživanje MVD, ekspresije vaskularnoga endotelna čimbenika rasta i biomarkera angiogeneze na bioptatima koštane srži prošetima parafinom dobivenima od 69 pacijenata s MDS-om. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine od kojih je jedna liječena hipometilirajućim agensima, dok je druga liječena suportivnom terapijom, oksimetolonom i piridoksinom. Medijan dobi pacijenata bio je 65 godina, a medijan perioda praćenja bio je 28 mjeseci. U skupini pacijenata liječenih hipometilirajućim agensima oni s dobrim odgovorom na terapiju imali su značajno niži MVD u usporedbi s pacijentima koji su imali loš odgovor na terapiju. Premda biomarkeri angiogeneze nisu pokazali značajnu povezanost sa ishodima preživljenja, visoki MVD ( $>10 \text{ n/mm}^2$ ) i snažna ekspresija vaskularnoga endotelna čimbenika rasta bili su povezani sa nižom stopom preživljenja. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da MVD i biomarkeri angiogeneze predstavljaju potencijalne prognostičke čimbenike MDS-a (23).

Korkolopoulou P. i suradnici su 2001. godine objavili retrospektivno istraživanje više morfometrijskih mikrovaskularnih karakteristika u MDS-u i njihovu povezanost s kliničkopatološkim čimbenicima i prognozom bolesnika s MDS-om. Rezovi biopsija koštane srži 50 novodijagnosticiranih bolesnika s MDS-om su imunohistokemijski bojani na faktor VIII i uspoređeni su s jednako obrađenim rezovima biopsija koštane srži 20 kontrola, 10 bolesnika s CMML-om i 12 bolesnika s AML-om. Rezultati istraživanja su pokazali značajno više vrijednosti MVD-a, ukupne površine krvnih žila i najmanjega dijametra krvnih žila u MDS skupini nego u kontrolnoj skupini. MVD je bio viši u hipercelularnom

MDS-u i promjer krvnih žila je bio veći u RA/RARS skupini u odnosu na RAEB skupinu, što je objasnilo povoljan učinak povećanih vrijednosti parametara veličine krvnih žila na progresiju i/ili preživljenje bolesti. Manja kompaktnost i manji MVD bili su nezavisni prediktivni čimbenici duljega preživljenja bez progresije bolesti. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da je proces angiogeneze uključen u razvoj MDS-a i u progresiju bolesti u AML te da je progresija bolesti unutar MDS-a udružena s kvalitativnim promjenama mikrovaskularne mreže (24).

Postoji mnogo studija koje istražuju morfometrijske mikrovaskularne parametre u MDS-u, ali nema puno studija koje nastoje objasniti njihovu ulogu u evoluciji bolesti i klinički značaj angiogeneze. Navedene studije su koristile metode najsličnije onima koje su se koristile u ovom radu i rezultati navedenih studija će se usporediti s rezultatima ovoga rada u poglavlju rasprave.

## **2. HIPOTEZA**

Bolesnici oboljeli od mijelodisplastičnoga sindroma visokog rizika imat će veće vrijednosti morfoloških obilježja neoangiogeneze i povećanu mikrovaskularnu gustoću u biopsiji koštane srži u odnosu na bolesnike oboljele od mijelodisplastičnoga sindroma niskog i srednjih rizika.

### **3. CILJEVI**

**Opći cilj:** određivanje učestalosti morfoloških obilježja neoangiogeneze i mikrovaskularne gustoće (MVD) u biopsijama koštane srži bolesnika oboljelih od mijelodisplastičnog sindroma

**Specifični ciljevi:**

1. Odrediti morfološka obilježja neoangiogeneze u biopsiji koštane srži svih skupina bolesnika: najveći i najmanji dijametar krvnih žila; i MVD
2. Usporediti morfološka obilježja neoangiogeneze i MVD bolesnika sve tri skupine; bolesnika s MDS-om, CMML-om i kontrolnom skupinom
3. Odrediti korelaciju morfometrijskih varijabli s kliničkopatološkim karakteristikama u MDS-u
4. Odrediti korelacije između morfometrijskih varijabli u skupini bolesnika s MDS-om
5. Odrediti prognostički značaj morfometrijskih varijabli u skupini bolesnika s MDS-om

#### 4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je obuhvatilo 44 bolesnika od kojih 32 s klinički potvrđenom dijagnozom mijelodisplastičnoga sindroma i 12 s klinički potvrđenom dijagnozom kronične mijelomonocitne leukemije (CMML) (skupina mijelodisplastičnoga sindroma/mijeloproliferativne novotvorine (MDS/MPN)). Bolesnici su liječeni u Kliničkoj bolnici (KB) Merkur. Dijagnoze tipova MDS-a postavljene su prema dijagnostičkim kriterijima klasifikacije SZO-e (8). Kontrolna skupina od 8 ispitanika odnosila se na ispitanike u kojih su isključeni kriteriji mijeloidnih/limfoidnih novotvorina u koštanoj srži.

Svakom bolesniku učinjena je biopsija koštane srži u vrijeme dijagnostičkog postupka u sklopu postavljanja dijagnoze, a prije početka liječenja. Biopsija koštane srži obrađena je rutinski: hemalaun i eozinom (H&E), Giemsom, Berlinskim modrilom, PAS, Masson i Gömorii metodom (25). Serijski rezovi cilindara biopsije koštane srži debljine 4 µm korišteni su za imunohistokemijsko bojanje.

Morfološki kriteriji angiogeneze analizirani su informatičkim programom „AnalySIS“ (Olympus, Soft Imaging System GmbH, Germany). Čitavi rezovi biopsije koštane srži pregledani su na x100 povećanju radi identifikacije područja najizraženije vaskularizacije (*engl. hot spot*). *Hot spot* je odabran na temelju opažanja područja s najvećom gustoćom endotelnih stanica pozitivnih na faktor CD34 na jednom vidnom polju povećanja 100x. Nakon toga je u vidnom polju povećanja 200x definirano područje s najvećim brojem krvnih žila kao *hot spot*. *Hot spot*-ovi su odabrani u celularnim područjima koštane srži. Svaka smeđe obojena nakupina stanica s lumenom jasno odvojena od susjednih krvnih žila i ostalih stanica koštane srži smatrana je zasebnom krvnom žilom. MVD je definiran kao broj krvnih žila u *hot spot*-u. Krvnim su žilama mjereni najveći dijametar (udaljenost između dvije najudaljenije točke na suprotnim stranama stijenke krvne žile) i najmanji dijametar (udaljenost između dvije najbliže točke na suprotnim stranama stijenke krvne žile).

Provedena je statistička analiza morfoloških kriterija angiogeneze upotrebom  $\chi^2$  testa i testom analize varijance (ANOVA).

Rezovi biopsije koštane srži bili su imunohistokemijski bojani protutijelom CD34 (Dako; QBEnd 10, monoklonalno, RTU) koristeći LSAB HRP set za vizualizaciju izražaja navedenih proteina, primarno membranski, te pozitivne kontrole prema uputama proizvođača. Analiziran je bilo koji krvožilni prostor pozitivnih CD34 endotelnih stanica bez obzira na vidljivost lumena.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Određivanje morfoloških obilježja neoangiogeneze u biopsijama koštane srži

U kontrolnoj skupini (N) bilo je 5 ispitanika muškog spola te 3 ispitanice u dobi od 46 do 78 godina (medijan 68 godina).

Bolesnici su bili podijeljeni u 4 skupine: MDS u skupine niskog (MDS 1), srednjeg (MDS 2) i visokog (MDS 3) rizika; te CMML kao posebna skupina bolesnika (MDS 4).

Skupinu MDS 1 činili su bolesnici oboljeli od RA, RARS i MDS-NOS. Skupinu MDS 2 činili su bolesnici oboljeli od RCMD. Skupinu MDS 3 činili su bolesnici oboljeli od RAEB-1, RAEB-2. Skupinu MDS 4 činili su bolesnici oboljeli od CMML.

Skupinu 1 činili su 3 bolesnika muškog spola, te 3 bolesnice u dobi od 55 do 85 godina (medijan 70 godina). U skupini MDS 2 bolesnika bilo je 8 muškaraca i 1 žena u dobi od 61 do 85 godina (medijan 75 godina). U skupini MDS 3 bolesnika bilo je 7 muškaraca i 9 žena u dobi od 42 do 90 godina (medijan 76 godina). U skupini MDS 4 bilo je 12 muškaraca 1 žena u dobi od 44 do 90 godina (medijan 76 godina).

**Tablica 4.** Dob i spol ispitanika

Skupina ispitanika	Spol		Dob		
	Muški	Ženski	Minimum	Maksimum	Medijan
N	5	3	46	78	68
MDS 1	3	3	55	85	70
MDS 2	8	1	61	85	75
MDS 3	7	9	42	90	76
MDS 4	12	1	44	90	76

\*N = Kontrole

\*MDS 1 = RA, RARS, MDS-NOS

\*MDS 2 = RCMD

\*MDS 3 = RAEB-1, RAEB-2

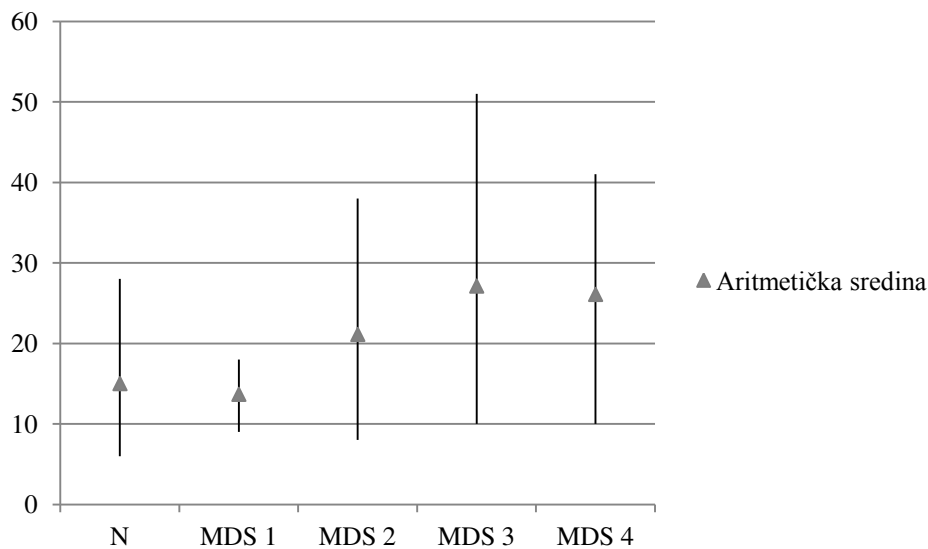
\*MDS 4 = CMML, CMML-1, CMML-2

Budući da je svakome bolesniku dijagnoza tipa MDS-a postavljena prije nastanka klasifikacije SZO-e 2016. godine, u opisivanju rezultata ovoga istraživanja koriste se nazivi tipova MDS-a iz klasifikacije SZO-e iz 2008. godine. Prema klasifikaciji SZO-e iz 2016. godine RA odgovara MDS-SLD, RARS odgovara MDS-RS-SLD, MDS-NOS odgovara MDS-U, RCMD odgovara MDS-MLD, RAEB-1 odgovara MDS-EB-1, a RAEB-2 odgovara MDS-EB-2.



Svakome su ispitaniku mjerena morfološka obilježja neoangiogeneze: MVD, najmanji dijametar krvnih žila ( $d_{min}$ ) i najveći dijametar krvnih žila ( $d_{max}$ ). U kontrolnoj skupini prosjek MVD-a bio je 15 (raspon 6-28), prosjek  $d_{min}$  6,78  $\mu\text{m}$  (raspon 4,48-9,76  $\mu\text{m}$ ), a prosjek  $d_{max}$  16,77  $\mu\text{m}$  (raspon 7,91-35,19  $\mu\text{m}$ ). U MDS 1 skupini bolesnika prosjek MVD-a bio je 13,67 (raspon 9-18), prosjek  $d_{min}$  3,82  $\mu\text{m}$  (raspon 1,43-5,89  $\mu\text{m}$ ), a prosjek  $d_{max}$  37,52  $\mu\text{m}$  (raspon 15,57-67,18  $\mu\text{m}$ ). U MDS 2 skupini bolesnika prosjek MVD-a bio je 21,11 (raspon 8-38), prosjek  $d_{min}$  4,24  $\mu\text{m}$  (raspon 2,56-6,50  $\mu\text{m}$ ), a prosjek  $d_{max}$  38,85  $\mu\text{m}$  (raspon 8,09-65,33  $\mu\text{m}$ ). U MDS 3 skupini bolesnika prosjek MVD-a bio je 27,125 (raspon 10-51), prosjek  $d_{min}$  4,10  $\mu\text{m}$  (raspon 2,31-6,30  $\mu\text{m}$ ), a prosjek  $d_{max}$  73,34  $\mu\text{m}$  (raspon 17,90-241,56  $\mu\text{m}$ ). U MDS 4 skupini bolesnika prosjek MVD-a bio je 26,08 (raspon 10-41), prosjek  $d_{min}$  3,12  $\mu\text{m}$  (raspon 1,28-5,15  $\mu\text{m}$ ), a prosjek  $d_{max}$  72,79  $\mu\text{m}$  (raspon 16,21-194,34  $\mu\text{m}$ ).

## 5.2. Usporedba morfoloških obilježja neoangiogeneze u biopsijama koštane srži



**Slika 1.** Grafikon vrijednosti MVD-a u promatranim biopsijama po skupinama ispitanika

Usporedbom izmjerenih vrijednosti MVD-a među skupinama opažena je manja prosječna vrijednost MVD-a u kontrolnoj skupini u odnosu na sve skupine bolesnika osim MDS 1 u kojoj je prosječna vrijednost MVD-a bila manja od prosječne vrijednosti MVD-a u kontrolnoj skupini. Usporedbom izmjerenih vrijednosti  $d_{min}$  krvnih žila među skupinama opažene su manje vrijednosti prosjeka  $d_{min}$  krvnih žila u svim skupinama bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedbom izmjerenih vrijednosti  $d_{max}$  krvnih žila među skupinama opažene su veće vrijednosti prosjeka  $d_{max}$  krvnih žila u svim skupinama bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu.

Provođenjem  $\chi^2$ -testa dobivene p-vrijednosti pokazuju statistički značajne razlike u  $d_{max}$  krvnih žila između svih skupina ispitanika, dok razlike u  $d_{min}$  krvnih žila nisu statistički značajne. Razlika  $d_{min}$  krvnih žila između kontrolne skupine i MDS 3 skupine bolesnika vrlo je izražena iako statistički

nedovoljno značajna ( $p=0,058$ ). Opažena je razlika u MVD-u između kontrolne skupine i MDS 1, između kontrolne skupine i MDS 4, te između MDS 1 i svih ostalih skupina.

**Tablica 5.** MVD,  $\chi^2$ -test; s.s.=1; p-vrijednost

Skupina	N(p)	MDS 1(p)	MDS 2(p)	MDS 3(p)	MDS 4(p)
N	—				
MDS 1	<b>0,035337</b>	—			
MDS 2	0,086268	<b>0,001309</b>	—		
MDS 3	<b>0,000167</b>	<b>&lt;0,000001</b>	0,080176	—	
MDS 4	<b>0,005442</b>	<b>0,000078</b>	0,457227	0,289218	—

**Tablica 6.** Najmanji dijametar krvnih žila ( $d_{min}$ ),  $\chi^2$ -test; s.s.=1; p-vrijednost

Skupina	N(p)	MDS 1(p)	MDS 2(p)	MDS 3(p)	MDS 4(p)
N	—				
MDS 1	<b>0,003455</b>	—			
MDS 2	0,100764	0,741582	—		
MDS 3	0,058355	0,826417	0,981104	—	
MDS 4	<b>0,000273</b>	0,868949	0,361132	0,497907	—

**Tablica 7.** Najveći dijametar krvnih žila ( $d_{max}$ ),  $\chi^2$ -test; s.s.=1; p-vrijednost

Skupina	N(p)	MDS 1(p)	MDS 2(p)	MDS 3(p)	MDS 4(p)
N	—				
MDS 1	<b>&lt;0,000001</b>	—			
MDS 2	<b>0,000002</b>	0,029983	—		
MDS 3	<b>&lt;0,000001</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>&lt;0,000001</b>	—	
MDS 4	<b>&lt;0,000001</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>&lt;0,000001</b>	—

### 5.3. Korelacija morfoloških obilježja neoangiogeneze i kliničkopatoloških karakteristika u MDS skupinama

Bolesnici skupine MDS 2 statistički su značajno stariji u odnosu na skupinu MDS 3 ( $p=0,011651$ ) i MDS 4 ( $p=0,031066$ ).

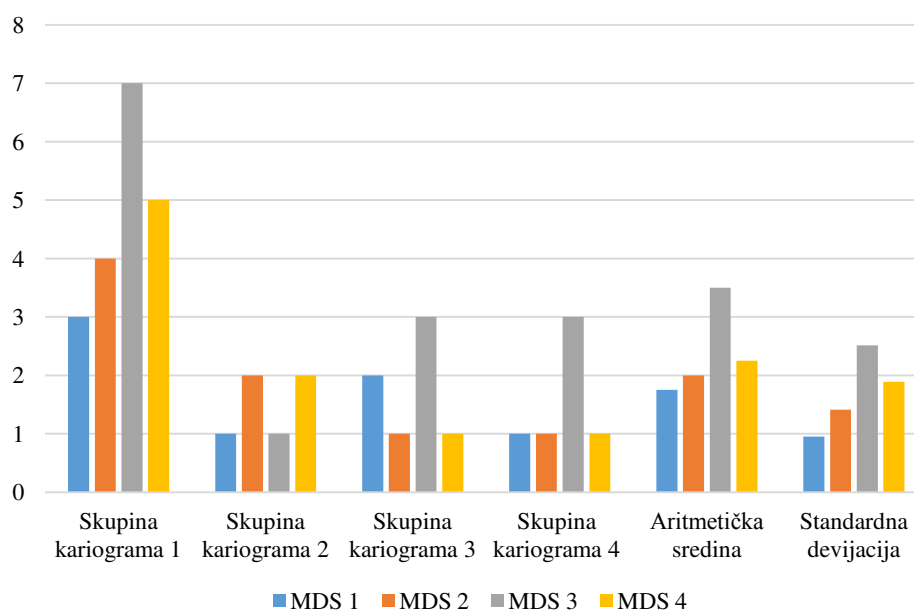
U 38 bolesnika učinjena je citogenetička analiza te su prema CCSS-u razvrstani u pripadajuće prognostičke podskupine. U MDS 1 skupini bilo je 3 bolesnika u dobroj CCSS podskupini, 1 bolesnik u srednje dobroj CCSS podskupini, 2 bolesnika u lošoj CCSS podskupini i 1 bolesnik u vrlo lošoj CCSS podskupini. U MDS 2 skupini bilo je 4 bolesnika u dobroj CCSS podskupini, 2 bolesnika u srednje dobroj CCSS podskupini, 1 bolesnik u lošoj CCSS podskupini i 1 bolesnik u vrlo lošoj CCSS podskupini. U MDS 3 skupini bilo je 7 bolesnika u dobroj CCSS podskupini, 1 bolesnik u srednje dobroj CCSS podskupini, 3 bolesnika u lošoj CCSS podskupini i 3 bolesnika u vrlo lošoj CCSS podskupini. U MDS 4 skupini bilo je 5 bolesnika u dobroj CCSS podskupini, 2 bolesnika u srednje

dobroj CCSS podskupini, 1 bolesnik u lošoj CCSS podskupini i 1 bolesnik u vrlo lošoj CCSS podskupini.

**Tablica 8.** Broj bolesnika pojedinih MDS skupina u pojedinim CCSS prognostičkim podskupinama

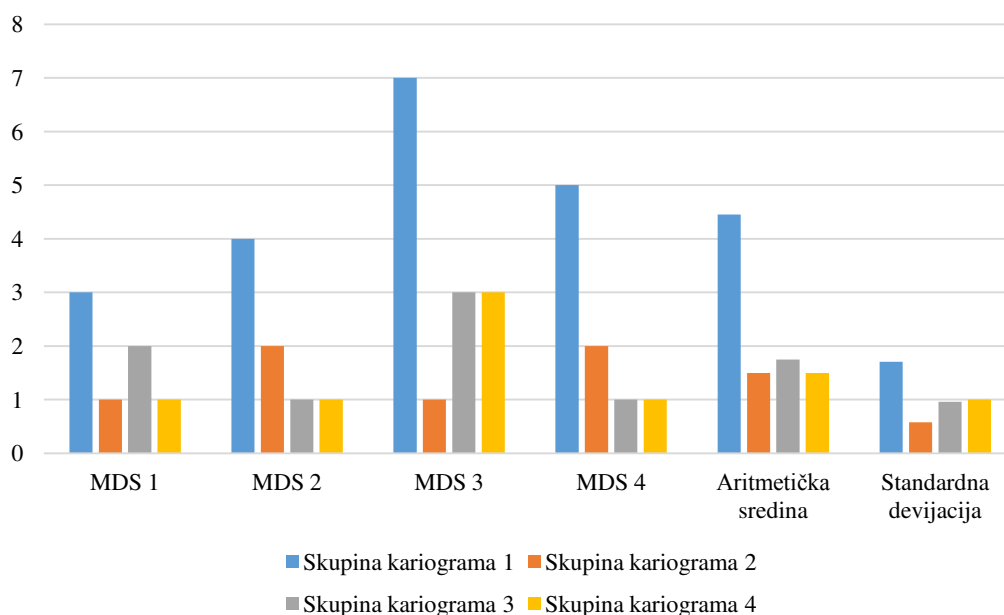
Skupina bolesnika	Dobra CCSS podskupina	Srednje dobra CCSS podskupina	Loša CCSS podskupina	Vrlo loša CCSS podskupina
MDS 1	3	1	2	1
MDS 2	4	2	1	1
MDS 3	7	1	3	3
MDS 4	5	2	1	1

Bolesnici su prema kariotipu razvrstani u četiri skupine. Ni u jednog ispitanika nije nađena citogenetička promjena vrlo dobre CCSS podskupine. Skupinu kariograma 1 činili su bolesnici s citogenetičkim promjenama dobre CCSS podskupine, skupinu kariograma 2 činili su bolesnici s citogenetičkim promjenama srednje dobre CCSS podskupine, skupinu kariograma 3 činili su bolesnici s citogenetičkim promjenama loše CCSS podskupine, a skupinu kariograma 4 činili su bolesnici s citogenetičkim promjenama vrlo loše CCSS podskupine. Testom analize varijance (ANOVA) analizirana distribucija MDS skupina između i unutar skupina kariograma pokazuje statistički značajnu razliku u zastupljenosti MDS skupina između i unutar skupina kariograma ( $F=7,80645; df=3,12, p=0,00373$ ). Skupina kariograma 1 je najčešća skupina u svih skupina MDS-a. U skupini kariograma 1 najčešće su zastupljeni bolesnici MDS 3 skupine. U skupini kariograma 4 također su najčešće zastupljeni bolesnici MDS 3 skupine.



**Slika 2.** Grafikon zastupljenosti MDS skupina između i unutar skupina kariograma

Analizom distribucije kariograma između skupina i unutar skupina MDS-a testom ANOVA nije opažena statistički značajna razlika ( $F=0,753247; df=3,12, p=0,541353$ ).



**Slika 3.** Grafikon distribucije skupina kariograma između skupina i unutar skupina MDS-a

Bolesnicima su prema IPSS-R izračunate bodovne vrijednosti. U MDS 1 skupini IPSS-R bodovne vrijednosti bile su u rasponu od 1 do 4. U MDS 2 skupini IPSS-R bodovne vrijednosti bile su u rasponu od 1 do 4,5. U MDS 3 skupini IPSS-R bodovne vrijednosti bile su u rasponu od 3 do 8. U MDS 4 skupini IPSS-R bodovne vrijednosti bile su u rasponu od 1 do 6.

**Tablica 9.** Broj bolesnika s određenim IPSS-R bodovnim vrijednostima u pojedinim MDS skupinama

Skupina	IPSS-R bodovna vrijednost											
	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8
MDS 1	1	1	1	1	1		1					
MDS 2	1	1	1	2	1			2				
MDS 3					1	4	2	1	1		4	1
MDS 4	1	1	2	1	1		1			1		

#### 5.4. Prognošički značaj morfometrijskih varijabli u skupinama bolesnika s MDS-om

Potrebu za transfuzijskim liječenjem razvilo je 3 od 6 bolesnika u MDS 1 skupini, 7 od 9 bolesnika u MDS 2 skupini, 8 od 16 bolesnika u MDS 3 skupini i 7 od 13 bolesnika u MDS 4 skupini.

Progresija bolesti u MDS višeg stupnja rizika ili AML nalazi se u 3 od 6 bolesnika u MDS 1 skupini, 4 od 9 bolesnika u MDS 2 skupini, 7 od 16 bolesnika u MDS 3 skupini i 6 od 13 bolesnika u MDS 4 skupini.

Smrtni ishod nastupio je kod 2 od 6 bolesnika u MDS 1 skupini, 3 od 9 bolesnika u MDS 2 skupini, 3 od 16 bolesnika u MDS 3 skupini i 3 od 13 bolesnika u MDS 4 skupini.

**Tablica 10.** Bolesnici s potrebom za transfuzijskim liječenjem, progresijom bolesti i smrtnim ishodom

<b>Skupina bolesnika</b>	<b>Potreba za transfuzijskim liječenjem</b>	<b>Progresija bolesti</b>	<b>Smrtni ishod</b>
MDS 1	3	3	2
MDS 2	7	4	3
MDS 3	2	7	3
MDS 4	5	6	3

## 6. RASPRAVA

Analizom morfoloških obilježja angiogeneze bolesnici oboljeli od mijelodisplastičnoga sindroma visokog rizika imaju veće vrijednosti morfoloških obilježja neoangiogeneze i povećanu mikrovaskularnu gustoću u biopsiji koštane srži u odnosu na bolesnike oboljele od mijelodisplastičnoga sindroma niskog i srednjih rizika. Bolesnici skupine MDS 3 i MDS 4 imali su veće vrijednosti MVD-a i *d max* krvnih žila u odnosu na skupine MDS 1 i MDS 2. Također, bolesnici skupine MDS 4 imali su veće vrijednosti MVD-a i *d max* krvnih žila u odnosu na skupine MDS 1 i MDS 2.

MVD u biopsijama bolesnika s MDS-om bio je veći u odnosu na MVD u biopsijama kontrolne skupine. Među skupinama bolesnika s MDS-om MVD je bio značajno viši u skupinama bolesnika s MDS-om srednjega i visokoga rizika u odnosu na skupinu bolesnika s MDS-om niskoga rizika, što je slično rezultatima studije Pruneri, G. i suradnika (21). Iako su u MDS 4 skupini 11 od 13 bolesnici s CMML-1 koji su prognostički nižeg rizika progresije i duljeg preživljenja, veće vrijednosti MVD-a i *d max* krvnih žila u odnosu na skupine MDS 1 i MDS 2 mogle bi se temeljiti na mijeloproliferativnim obilježjima MDS/MPN bolesti, te time biti sukladna s većim vrijednostima MVD i *d max* u MPN bolestima koje su također niskog rizika kao što je prikazano u studiji Medinger, M. i suradnika (26).

*D max* krvnih žila u biopsijama bolesnika s MDS-om bio je značajno veći u odnosu na *d max* krvnih žila u biopsijama kontrolne skupine. *D max* krvnih žila pokazao je tendenciju rasta duž skupina bolesnika s MDS-om s najvećim vrijednostima u skupini bolesnika s MDS-om visokoga rizika, što je u skladu s rezultatima studije Korkolopoulou P. i suradnika (24). *D min* krvnih žila u biopsijama bolesnika s MDS-om bio je manji u odnosu na *d min* krvnih žila u biopsijama kontrolne skupine, no statistički značajna razlika dobivena je samo uspoređujući kontrolnu skupinu i skupinu MDS 4. Rezultati ovoga istraživanja su u suprotnosti sa rezultatima studije Korkolopoulou P. i suradnika, u kojoj je *d min* krvnih žila u biopsijama bolesnika s MDS-om bio veći u odnosu na *d min* krvnih žila u biopsijama kontrolne skupine (24).

Najzastupljenija skupina kariograma među bolesnicima s MDS-om bila je dobra prognostička podskupina prema CCSS-u, a ta prognostička podskupina bila je najčešća i u studiji Schanz J. i suradnika koja je osmislila CCSS za mijelodisplastične sindrome (10). Za razliku od te studije, u ovome istraživanju niti jedan bolesnik nije pripadao vrlo dobroj prognostičkoj podskupini prema CCSS-u, a ni ostale prognostičke podskupine nisu zastupljene u jednakome postotku kao u studiji Schanz J. i suradnika, što se može objasniti malim uzorkom ispitanika u ovome istraživanju. Izračunate ukupne IPSS-R bodovne vrijednosti pokazuju da su skupine MDS-a niskoga, srednjega i visokoga rizika prema klasifikaciji SZO-e (RA, RARS, RCMD, RAEB-1, RAEB-2) ujedno i skupine niskoga, srednjega i visokoga rizika prema IPSS-R sustavu, što potvrđuje vrijednost i primjenjivost ove klasifikacije (1). S druge strane, skupina bolesnika s CMML-om ima relativno niske ukupne IPSS-

R bodovne vrijednosti, do čega je moglo doći zbog maloga uzorka, činjenice da nisu svim ispitanicima mogle biti izračunate ukupne IPSS-R bodovne vrijednosti i zato jer su samo 2 od 13 bolesnika bila s CMML-2, a preostalih 11 bolesnika s CMML-1 koji su prognostički nižeg rizika progresije i duljeg preživljenja (1).

Najmanje polovica bolesnika u svakoj skupini bolesnika s MDS-om razvilo je potrebu za transfuzijskim liječenjem, što je relativno visok udio u usporedbi sa udjelima transfuzijom liječenih bolesnika s MDS-om u studiji Malcovati L. i suradnika (27). Mogući uzrok ove razlike je veći udio komorbiditeta u bolesnika oboljelih od MDS-a (bolesti srca, dijabetes, dispneja, bolesti jetre, zarazne bolesti). Pacijenti kojima su potrebne transfuzije eritrocita imaju veću učestalost komorbiditeta. Veći udio bolesnika s progresijom bolesti opažen je u skupinama MDS-a čiji je MVD bio viši, što je slično rezultatima studije Korkolopoulou P. i suradnika (24). Međutim, u ovome istraživanju nije opažena korelacija najmanjega dijametra krvnih žila i ukupnoga preživljenja bolesnika kao u studiji Korkolopoulou P. i suradnika (24). Broj bolesnika sa smrtnim ishodom nije se razlikovao unutar skupina MDS-a, što može biti posljedica većeg udjela komorbiditeta u bolesnika oboljelih od MDS-a (bolesti srca, dijabetes, dispneja, bolesti jetre, zarazne bolesti) i veće učestalosti mortaliteta.

## 7. ZAKLJUČCI

Statistički značajne razlike u vrijednostima MVD-a i morfometrijskih varijabli među skupinama bolesnika s MDS-om upućuju na izraženiju angiogenezu u koštanoj srži bolesnika s MDS-om višega rizika u odnosu na bolesnike s MDS-om nižega rizika i u odnosu na kontrolnu skupinu.

Velika mikrovaskularna gustoća i dijometri krvnih žila u skupini bolesnika s CMML-om ukazuju na angiogeni učinak i mijeloproliferativne komponente na mikrovaskulaturu koštane srži. Međutim, radi smanjenja utjecaja pogrešaka na ishod budućih istraživanja potrebno je osigurati primjerenu veličinu uzorka.

Sveobuhvatni citogenetički sustav bodovanja (CCSS) stratificira bolesnike oboljele od MDS-a u odnosu na prognozu preživljenja i rizike progresije MDS-a u AML.

Klasifikacija MDS-a prema revidiranom međunarodnom sustavu stratifikacije rizika (IPSS-R) stratificira bolesnike oboljele od MDS-a u odnosu na prognozu preživljenja pacijenata u trenutku dijagnoze MDS-a u inicijalnoj fazi bolesti.



## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Aniti Škrtić, dr.med. na motivaciji, vremenu, trudu, stručnoj pomoći, pruženom znanju i strpljivosti tijekom izrade ovoga diplomskoga rada.

Zahvaljujem svojim prijateljima na pomoći u tehničkom oblikovanju ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i strpljenju tijekom moga školovanja.

## 9. LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, i sur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 2017. Str. 96-104.
2. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1992;82(2):358-67.
3. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. *Cancer.* 2007;109(8):1536-42.
4. Strom SS, Gu Y, Gruschus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: A case-control study. *Leukemia.* 2005;19(11):1912-8.
5. Wells RA, Buckstein R, Rezmovitz J. Myelodysplastic syndrome. *Can Med Assoc J.* 2016;188(10):751-751.
6. Goldberg SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, i sur. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol.* 2010;28(17):2847-52.
7. Dayyani F, Conley AP, Strom SS, Stevenson W, Cortes JE, Borthakur G, i sur. Cause of Death in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Cancer.* 2010;116(9):2174-9.
8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016.127(20):2391-405.
9. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, i sur. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385-95.
10. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, i sur. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):820-9.
11. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(1):129-147.
12. DiNardo CD, Daver N, Jain N, Pemmaraju N, Bueso-Ramos C, Yin CC, i sur. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy. *Leukemia.* 2014;28(4):958-61.
13. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, i sur. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079-88.
14. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, i sur. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-65.
15. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, Bennett JM, i sur. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer.* 2008;1351-61.
16. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, Cortes J, Ravandi F, Borthakur G, i sur. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2008;22(3):538-43.

17. Garcia-Manero G, Fenaux P. Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(5):516-23.
18. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, i sur. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):223-32.
19. Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, Deeg HJ, Pérez WS, Anasetti C, i sur. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: Delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood*. 2004;104(2):579-85.
20. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, i sur. Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(21):1603-12.
21. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, i sur. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999;81(8):1398–1401.
22. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, i sur. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96(6):2240-5.
23. Kim CK, Han DH, Ji YS, Lee MS, Min CW, Park SK, i sur. Biomarkers of angiogenesis as prognostic factors in myelodysplastic syndrome patients treated with hypomethylating agents. *Leuk Res*. 2016;50:21-28.
24. Korkolopoulou P, Apostolidou E, Pavlopoulos PM, Kavantzias N, Vyniou N, Thymara I, i sur. Prognostic evaluation of the microvascular network in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2001;15(9):1369-76.
25. Histology/Staining Protocols [Internet]. 2019 [pristupljeno 2019 May 14]. Dostupno na: <http://www.protocol-online.org/prot/Histology/Staining/index.html>
26. Medinger M, Skoda R, Gratwohl A, Theocharides A, Buser A, Heim D, i sur. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-/receptor expression in myeloproliferative neoplasms: Correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. *Br J Haematol*. 2009;146(2):150-7.
27. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, i sur. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503-10.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podaci**

Ime i prezime: Bruno Novačić  
Datum rođenja: 9. siječnja 1994.  
Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

### **Obrazovanje**

2012. - 2019. Medicinski fakultet, Zagreb  
2008. - 2012. Srednja škola Ivan Švear, Ivanić Grad

### **Znanja i vještine**

Strani jezici: engleski jezik (aktivno)  
Poznavanje rada s Microsoft Office alatima (Word, Excel i PowerPoint)