

# Neinvazivni dijagnostički model dijagnostike anemije u mijelodisplastičnom sindromu

---

**Hanžek, Antonio**

**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:105:626534>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

**Antonio Hanžek**

**Neinvazivni dijagnostički model dijagnostike  
anemije u mijelodisplastičnom sindromu**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Kliničke Bolnice Merkur pod vodstvom prof. dr. sc. Slobodanke Ostojić-Kolonić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

## SAŽETAK

Neinvazivni dijagnostički model dijagnostike anemije u mijelodisplastičnom sindromu

Antonio Hanžek

Aspiracija koštane srži predstavlja zlatni standard za postavljanje dijagnoze mijelodisplastičnog sindroma (MDS). U svrhu izbjegavanja spomenutog invazivnog dijagnostičkog postupka, razvijen je neinvazivni dijagnostički model temeljem lako dostupnih laboratorijskih parametara. Skupina pacijenata s MDS-om (n=53) uspoređena je s kontrolnom skupinom (n=121). Za kontrolnu skupinu odabrani su pacijenti s Ne-Hodgkin limfomom B i T-imunofenotipa, multiplim mijelomom, Waldenströmovom makroglobulinemijom, leukemijom vlasastih stanica i aplastičnom anemijom. Od ukupno analiziranih 15 parametara, u sklopu multivarijatne logističke regresije, njih 3 pokazalo se statistički značajnima u razlikovanju MDS skupine od kontrolne skupine: prosječni volumen eritrocita ( $p < .0001$ ), apsolutni broj neutrofila ( $p < .0001$ ) i prosječni volumen trombocita ( $p = .0036$ ). Širina distribucije volumena eritrocita pokazao se kao statistički granično značajan laboratorijski parametar ( $p = 0,0740$ ) te je stoga ostavljen u konačnom modelu. Površina ispod ROC (engl. *receiver operating characteristic*) krivulje iznosi 0,9567. Pomoću dobivenog modela koristeći formulu logističke regresije izračunata je vjerojatnost (P) postojanja MDS-a u svakog pojedinog pacijenta. Vrijednost vjerojatnosti 0,3 odabrana je kao granična vrijednost s osjetljivošću (86,79%), specifičnošću (86,78%), pozitivnom prediktivnom vrijednošću (74,19%) i negativnom prediktivnom vrijednošću (93,75%). Pacijenti s P vrijednošću iznad definirane granične ( $P = 0,3$ ) kategorizirani su kao „vjerojatni MDS“, a pacijenti s P vrijednošću ispod granične kategorizirani su kao „vjerojatno nije MDS“. P vrijednosti povezane su s izračunatim rizikom pri dijagnozi MDS-a; najviše pogrešno svrstanih pacijenata u sklopu interne validacije modela bilo je u skupini niskog rizika, njih 4 (30,8%).

Ključne riječi: MDS, multivarijatna logistička regresija, neinvazivna dijagnostika

## SUMMARY

### Noninvasive diagnostic model for diagnosis of myelodysplastic syndrome related anemia

Antonio Hanžek

Bone marrow aspiration is a gold standard for the diagnosis of myelodysplastic syndrome (MDS). For the purpose of avoiding this invasive diagnostic procedure, new diagnostic model based on easily available laboratory parameters was developed. Group of patients with MDS (n=53) was compared with the control group (n=121). For the control group, patients with B and T-cell non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, hairy cell leukemia and aplastic anemia were selected. Using multivariate logistic regression, of 15 parameters analysed in total, 3 of them were significantly different between groups: mean corpuscular volume ( $p < .0001$ ), absolute neutrophil count ( $p < .0001$ ) and mean platelet volume ( $p = .0036$ ). Red cell distribution width turned out to be borderline statistically significant laboratory parameter ( $p = 0,0740$ ) and therefore was included in the final model. The area under the ROC curve (AUC) was 0,9567. By using a developed model, probability (P) of having an MDS was calculated for each patient. Probability of 0,3 was chosen as a cut-off value with a sensitivity (86,79%), specificity (86,78%), positive predictive value (74,19%) and negative predictive value (93,75%). Patients with P value above cut-off value ( $P = 0,3$ ) were categorized as „probably MDS“, while patients with P value below cut-off were labeled as „probably not MDS“. P values were compared with MDS risk calculated at diagnosis; most of inaccurately classified patients within internal validation of model were in low risk group, 4 of them (30,4 %).

Keywords: MDS, multivariate logistic regression, noninvasive diagnosis

## SADRŽAJ:

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod.....  | 1  |
| 1.1. Općenito o mijelodisplastičnom sindromu.....   | 1  |
| 1.2. Postavljanje dijagnoze i procjena rizika.....  | 1  |
| 1.3. Terapija.....                                  | 2  |
| 1.4. Novosti u neinvazivnoj dijagnostici.....       | 3  |
| 2. Hipoteza i opći i specifični ciljevi rada.....   | 4  |
| 3. Materijali i metode.....                         | 4  |
| 3.1. Značajke ispitanika i odabranih varijabli..... | 4  |
| 3.2. Statistička analiza.....                       | 5  |
| 4. Rezultati.....                                   | 7  |
| 5. Rasprava.....                                    | 13 |
| 6. Zaključak.....                                   | 14 |
| 7. Zahvale.....                                     | 15 |
| 8. Popis literature.....                            | 16 |
| 9. Životopis.....                                   | 18 |

## **1. UVOD**

### **1.1. Općenito o sindromu**

Mijelodisplastični sindrom (MDS) objedinjuje heterogenu grupu klonalnih poremećaja hematopoetske matične stanice karakteriziranih citopenijama periferne krvi, neučinkovitom hematopoezom, displazijom jedne ili više mijeloičnih staničnih loza te povećanim rizikom progresije bolesti u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) (1–4). Klasifikacija pojedinih podtipova MDS-a temelji se na postotku blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi, tipu, odnosno stupnju izraženosti i broju displastičnih staničnih loza, prisutnosti/odsutnosti prstenastih sideroblasta te prisutnosti pojedinih abnormalnosti u građi kromosoma (2,4). Temeljem nove klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. razlikujemo nekoliko podtipova MDS-a: refraktorna citopenija s unilinijskom displazijom (RCUD), refraktorna citopenija s multilinijskom displazijom (RCMD), refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (RARS), refraktorna anemija s viškom blasta 1 (RAEB-1), refraktorna anemija s viškom blasta 2 (RAEB-2) i MDS s izoliranom del(5q). Incidencija MDS-a u općoj populaciji iznosi 4-5/100 000 stanovnika, uz izraženi porast incidencije u starijoj životnoj dobi; u osoba starijih od 60 god. incidencija iznosi 20-50/100 000 stanovnika (1,2,5). Etiologija MDS-a poznata je u približno 15% slučajeva, a kao mogući etiološki faktori navode se radioterapija, odnosno izlaganje ionizirajućem zračenju, prethodna izloženost kemoterapeutičima uz naglasak na alkilirajuće agense i purinske analoge te pušenje duhana (2). U etiopatogenezi MDS-a sudjeluju različiti mehanizmi od kojih se važnijim smatraju brojne somatske mutacije na razini multipotentne matične stanice i promjene u epigenetskoj kontroli genske ekspresije poput hipermetilacije pojedinih gena što rezultira utišavanjem prepisivanja gena i posljedično poremećajem u sazrijevanju stanica koštane srži (3,6,7).

### **1.2. Postavljanje dijagnoze i procjena rizika**

U inicijalnoj obradi nužno je napraviti kompletnu krvnu sliku (KKS) i diferencijalnu krvnu sliku (DKS) gdje se najčešće utvrdi postojanje anemije, nešto rjeđe trombocitopenije i/ili leukopenije, a kao odraz poremećene eritropoeze često bude prisutan i određeni stupanj makrocitoze i anizocitoze te ponekad retikulocitopenija. U inicijalnoj obradi preporuča se i određivanje feritina i LDH što primarno ima prognostički značaj te koncentracije endogenog eritropoetina što kasnije može poslužiti kao dobar vodič pri razmatranju primjene egzogenih derivata hematopoetskih čimbenika rasta (2). Dijagnoza MDS-a i dalje se temelji na citomorfološkoj analizi aspirata

koštane srži (AKS) i razmaza periferne krvi (RPK) gdje se određuju tip i stupanj displazije eritropoeze, granulopoeze i megakariopoeze, a pritom je iz navedenih uzoraka izrazito važno odrediti broj nezrelih stanica, odnosno blasta što ima veliku ne samo dijagnostičku, već i prognostičku vrijednost (1,2). Biopsija koštane srži (BKS) često se koristi kao dopunska dijagnostička metoda koja ima poseban značaj u procjeni stupnja fibroze koštane srži te pri postavljanju dijagnoze hipocelularnog MDS-a gdje aspiracija često bude otežana ili onemogućena (2). U svih pacijenata s MDS-om nužno je napraviti i citogenetsku analizu koštane srži: konvencionalna kariotipizacija i/ili fluorescentna in situ hibridizacija (FISH), a sve češće se u sklopu dijagnostičkih protokola koristi i imunofenotipizacija protočnom citometrijom (2). Specifične citogenetičke abnormalnosti, postotak blasta u koštanoj srži te broj/izraženost citopenija periferne krvi ključni su prognostički faktori u MDS-u. Izračun rizika prema IPSS-u (engl. *International prognostic scoring system*) te njegova revizija IPSS-R (engl. *Revised international prognostic scoring system*) temelje se na prethodno navedene 3 varijable (2). IPSS, kao i dalje najčešće korišteni bodovni sustav stratificira pacijente u 4 kategorije rizika koje se međusobno statistički značajno razlikuju u preživljenju te u vremenu do progresije u AML (8).

### 1.3. Terapija

Danas se u liječenju MDS-a koristi nekoliko terapijskih pristupa od kojih su najvažniji: transfuzije krvnih pripravaka te primjena hematopoetskih čimbenika rasta kao ključni oblici potpornog liječenja (1,9), imunomodulator lenalidomid (1), koji se u kontekstu MDS-a koristi isključivo kao terapija 5q-sindroma, hipometilirajući lijekovi poput azacitidina i decitabina koji su indicirani u pacijenata s visokorizičnim MDS-om (5) te transplantacija alogeničnih hematopoetskih matičnih stanica (10,11), uglavnom rezervirana za visokorizične pacijente dobrog općeg stanja i bez značajnijih komorbiditeta. Citološka punkcija koštane srži vrlo je neugodan i bolan invazivni dijagnostički postupak kojem pacijenti često nisu skloni, a također je prisutan niski, iako ne zanemariv rizik od infekcije ili krvarenja, posebice u pacijenata na antikoagulantnoj terapiji ili pacijenata s trombocitopenijom. Također, važno je naglasiti da će bol umjerenog, ponekad i jakog intenziteta često biti prisutna unatoč adekvatnoj aplikaciji lokalnog anestetika na mjesto uboda (12). U određenom postotku pacijenata s anemijom kod kojih je vjerojatnost postojanja MDS-a niska, navedeni bi se postupak mogao u potpunosti izbjeći ili odgoditi na određeno vrijeme, uz sustavno praćenje kliničkih i laboratorijskih parametara do eventualnog pogoršanja nalaza što bi zahtijevalo daljnju dijagnostičku obradu. U pacijenata s visokom vjerojatnošću da je u podlozi anemije prisutan MDS, potrebno je provesti gore navedenu kompleksnu i skupu dijagnostičku obradu primarno u svrhu određivanja rizika bolesti te u zavisnosti o njemu razmotriti potrebu o



liječenju te odabrati, ako postoji indikacija, prikladni terapijski modalitet. Dostupnost različitih modaliteta liječenja te nužnost da se s određenim terapijskim protokolima započne što prije stvaraju potrebu da se pacijenti s visokom vjerojatnošću postojanja MDS-a obrade što prije u svrhu postavljanja definitivne dijagnoze i započinjanja adekvatnog liječenja. Primjerice, u pacijenata s pojedinim podtipovima visokorizičnog MDS-a, posebice u onih s kompleksnim citogenetskim promjenama ili abnormalnostima kromosoma 7, postoji tendencija brze progresije bolesti u AML, zbog čega je nužno što ranije u terapiju uvesti hipometilirajući lijek azacitidin. Pokazalo se da rano uvođenje azacitidina u terapiju produljuje vrijeme do progresije i ukupno preživljenje (5).

#### **1.4. Novosti u neinvazivnoj dijagnostici**

2018. god izraelska MDS grupa napravila je prvi neinvazivni dijagnostički model za MDS, temeljem lako dostupnih kliničkih i laboratorijskih parametara koristeći pritom multivarijatnu logističku regresiju. Varijable korištene za izradu modela bile su dob, razina hemoglobina, MCV (engl. *mean corpuscular volume*), broj leukocita i trombocita, od kojih su statistički značajne bile broj leukocita i MCV. Navedene varijable kasnije su korištene za izračun vjerojatnosti postojanja MDS-a u svakog pojedinog pacijenta, a korištenjem spomenutog dijagnostičkog modela autori su MDS potvrdili ili isključili u približno 50% pacijenata, izbjegavajući pritom analizu koštane srži (13). Druga grupa autora izradila je sličan neinvazivni MDS dijagnostički model (14). Statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ), u sklopu provedene multivarijatne logističke regresije, dokazana je u sljedećih varijabli: MCV, apsolutni broj neutrofila i neutrofilna kompleksnost i širina disperzije Ne-WX (engl. *neutrophils complexity and width of dispersion*). Ne-WX relativno je novi laboratorijski parametar čija povećana vrijednost izravno korelira s heterogenošću pojedinih subpopulacija neutrofila, a do sada se pokazao primjenjivim u dijagnostici sepse i MDS-a (15). Također, nekoliko novijih radova sugerira mogućnost korištenja slobodne tumorske DNA PBcfDNA (engl. *peripheral blood circulating cell-free DNA*) iz periferne krvi, porijeklom iz raspadnutih displastičnih klonova u svrhu dijagnoze, procjene rizika i praćenja terapijskog odgovora. Treba istaknuti da je PBcfDNA vrijedna alternativa analizi stanica koštane srži, jer se količina izoliranog genskog materijala obaju uzoraka bitno ne razlikuje, relativno je lako dostupna, prikupljen uzorak je homogeniji i prikladniji za analizu pojedinih somatskih mutacija. Zbog svega navedenog postoji mogućnost da će u skoroj budućnosti PBcfDNA biti koristan biomarker u praćenju kliničkog stanja pacijenata (16,17).

## **2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

### **HIPOTEZA:**

Temeljem izrađenog neinvazivnog dijagnostičkog modela i izračunatih vjerojatnosti za svakog pojedinog pacijenta mogu se razlikovati pacijenti s MDS-anemijom od pacijenata kod kojih je u podlozi anemije neka druga hematološka bolest.

### **OPĆI CILJ:**

Izrada neinvazivnog dijagnostičkog modela temeljem lako dostupnih laboratorijskih parametara te procjena njegove valjanosti u predviđanju vjerojatnosti postojanja MDS-a u pacijenata s potvrđenom anemijom.

### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

Definirati laboratorijske parametre koji su najbolji za razlikovanje pacijenata s MDS-om od kontrolne skupine.

Definirati granične vrijednosti dijagnostičkog testa te odrediti osjetljivost, specifičnosti, pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) i negativnu prediktivnu vrijednost (NPV) za svaku.

Utvrditi postoji li razlika u izračunatoj vjerojatnosti postojanja bolesti u pojedinim podskupina MDS pacijenata prema izračunatom riziku pri dijagnozi.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Značajke ispitanika i varijabli**

Radi se o retrospektivnom istraživanju u sklopu kojeg je provedeno sustavno prikupljanje podataka na KB Merkur, a kao izvor podataka koristili smo bolnički informacijski sustav (BIS). Spomenuto istraživanje odobreno je od strane bolničkog etičkog povjerenstva. Provedena je analiza kliničkih i laboratorijskih parametara MDS pacijenata dijagnosticiranih na KB Merkur u vremenskom periodu od 2013. do 2019. Navedena skupina sastojala se od ukupno 53 MDS-pacijenata s definiranom anemijom (masena koncentracija Hb ispod donje granične vrijednosti za referentni raspon prema našem laboratoriju; ispod 119 g/l za žene te ispod 138 g/l za muškarce)

i prisutnim nalazom aspirata koštane srži kojim je dijagnoza potvrđena. Pacijentima je u svrhu procjene rizika pri dijagnozi izračunat IPSS score. Također, pacijenti su temeljem nalaza koštane srži svrstani u određeni tip MDS-a. Navedena skupina uspoređena je s kontrolnom skupinom za koju su odabrani pacijenti s Ne-Hodgkin limfomom B i T-imunofenotipa (NHL-B i NHL-T), multiplim mijelomom (MM), Waldenströmovom makroglobulinemijom (WM), leukemijom vlasastih stanica (LVS) i aplastičnom anemijom (AA). Pacijentima s NHL-om određen je tip limfoma pri dijagnozi. Navedena skupina sastojala se od 121 pacijenta dijagnosticiranog na KB Merkur u periodu od 2013. do 2019. kojima je dijagnoza postavljena u vremenskom intervalu od 2013. do 2017. na KB Merkur. Kriteriji uključenja u kontrolnu skupinu bili su: potvrđena anemija i prisutan nalaz biopsije i/ili aspiracije koštane srži temeljem kojeg je isključena dijagnoza primarnog MDS-a te eventualno potvrđena infiltracija koštane srži malignim stanicama. Kriteriji isključenja bili su: akutni infekt u periodu postavljanja dijagnoze zbog utjecaja na hematološke parametre, istovremena prisutnost nekog drugog objašnjivog uzroka anemije poput kronične bubrežne bolesti trećeg ili višeg stadija, uznapredovale ciroze jetre, hipovitaminoze B12, manjka folata, sideropenije, intrakorpuskularne hemolize, gastrointestinalnog krvarenja i slično. Također, pacijenti koji su u periodu postavljanja dijagnoze primali kemoterapiju i/ili radioterapiju zbog neke druge maligne bolesti bili su isključeni iz daljnje analize. Potrebno je naglasiti da su pacijenti u obje skupine kod kojih su laboratorijski nalazi bili dostupni tek nakon primitka terapije hematološke bolesti bili isključeni iz daljnje analize. Odabrano je ukupno 16 kliničkih i laboratorijskih parametara pri dijagnozi: spol, broj eritrocita (E), masena koncentracija hemoglobina (Hb), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (MCHC, engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*), širina distribucije volumena eritrocita (RDW, engl. *red cell distribution width*), apsolutni broj retikulocita (Rtc), frakcija nezrelih retikulocita (IRF, engl. *immature reticulocyte fraction*), ukupni broj leukocita (Leuk), apsolutni broj neutrofila (ANC, engl. *absolute neutrophil count*), apsolutni broj limfocita (Lymph), apsolutni broj monocita (Mono), apsolutni broj bazofila (Bazo), apsolutni broj eozinofila (Eo), broj trombocita (Trc) i prosječni volumen trombocita (MPV, engl. *mean platelet volume*).

### 3.2. Statistička analiza

Unutar pojedine skupine korištene su metode deskriptivne statistike radi izračunavanja mjera središnje tendencije (aritmetička sredina) i mjere raspršenja (standardna devijacija i raspon) za svaku mjerenu varijablu. Usporedba pojedinih nezavisnih varijabli MDS-skupine i kontrolne skupine prvotno je provedena univarijatnim statističkim testovima ovisno o tipu varijable. Studentov t-test za nezavisne uzorke korišten je za sve varijable, izuzev varijable spol. Izračunata

je distribucija spola u svakoj od skupina, međutim varijabla spol nije korištena za daljnju univarijatnu, odnosno multivarijatnu analizu. Potom je primjenom metode multivarijatne logističke regresije provedena obrada navedenih nezavisnih varijabli u svrhu stvaranja prediktivnog dijagnostičkog modela. Preliminarnom analizom varijabli (izuzev varijable spol) istovremeno su razmotreni međuodnosi više nezavisnih varijabli i način na koji one modeliraju jednu zavisnu binarnu (dihotomnu) varijablu (pacijent ima MDS=1, pacijent nema MDS=0). Preliminarnom regresijskom analizom filtrirani su statistički značajni ili granično značajni laboratorijski parametri koji su potom korišteni u konačnoj multivarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi po *stepwise* protokolu. Navedeni model predviđa vjerojatnost (P, engl. *probability*) postojanja MDS-a kao funkciju već spomenutih nezavisnih varijabli. Temeljem regresijske analize za svaku pojedinu varijablu određeni su parametri: regresijski koeficijent  $\beta$ , omjer šanse (OR, engl. *odds ratio*), 95% interval pouzdanosti (95% CI, engl. *confidence interval*) te p vrijednost (p). U svrhu izračunavanja vjerojatnosti (P) za svakog pojedinog pacijenta korištena je klasična formula logističke regresije (vidi kasnije). Za internu validaciju dijagnostičkog testa izračunata je površina ispod ROC (engl. *receiver operating characteristic*) krivulje (AUC, engl. *area under the curve*) za dani model. Nakon ispitivanja nekoliko graničnih vrijednosti vjerojatnosti (P) definirana je jedna, u svrhu kategorizacije pacijenata u 2 skupine: prva s niskom, a druga s visokom vjerojatnošću da boluje od MDS-a. Za svaku od ispitivanih graničnih vrijednosti izračunata je osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV). Za analizu podataka korišten je SAS 9,3 (engl. *Statistical Analysis System*) softver. Razina značajnosti ( $\alpha$ ) postavljena je na vrijednost 0,05, odnosno p vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

#### 4. REZULTATI

Provedena je analiza navedenih kliničkih i laboratorijskih varijabli od ukupno 174 pacijenata, U 53 pacijenata je temeljem analize aspirata koštane srži postavljena dijagnoza MDS-a. Navedena je skupina uspoređena s kontrolnom za koju je odabrano 121 pacijenta kojima je temeljem nalaza aspirate i/ili biopsije koštane srži isključena dijagnoza MDS-a. Od ukupno 53 MDS pacijenata, 2 je imalo RCUD (3,8%), 8 RARS (15,1%), 16 RCMD (30,2%), 12 RAEB-1 (22,6%), 12 RAEB-2 (22,6%), 2 s izoliranom del(5q) (3,8%) i 1 neklasificiran (1,9%). Koristeći IPSS sustav za izračunavanje rizika, 13 pacijenata svrstano je u nizak rizik (24,5%), 25 u intermedijarni rizik-1 (47,2%), 6 u intermedijarni rizik-2 (11,3%) i 9 u visoki rizik (17%). U kontrolnoj skupini bilo je 55 pacijenata s NHL-om (44,5%), 54 s MM-om (44,6%), 8 s WM-om (6,7%), 2 s LVS-om (1,6%) i 2 s AA-om (1,6%). Unutar NHL podskupine, 26 pacijenata (47,3%) s difuznim B-velikostaničnim limfomom (DLBCL, engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), 8 (14,6%) s folikularnim limfomom (FL), 7 (12,7%) s limfomom marginalne zone (MZL, engl. *marginal zone lymphoma*), 3 (5,4%) s limfomom plaštene zone (MCL, engl. *mantle cell lymphoma*), 1 (1,8%) s viloznim spleničnim, 1 (1,8%) s nespecificiranim i 9 (16,4%) s T-NHL-om. U skupini MDS-a bilo je 32 muškaraca (60,4%) i 21 (39,6%) žena, dok je u kontrolnoj skupini bio 71 muškarac (58,7%) i 50 žena (41,3%). Univarijatnom analizom varijabli utvrđena je statistički značajna razlika kod 11 varijabli: E, Hb, MCV, RDW, IRF, Leuk, ANC, Lymph, Mono, Trc i MPV. Rezultati analize prikazani su u tablicama 1.,2. i 3.

Tablica 1. Značajke nezavisnih varijabli.

| Grupa        |           | E            | Hb       | MCV              | MCHC     | RDW         |
|--------------|-----------|--------------|----------|------------------|----------|-------------|
| MDS n=53     | AS (± SD) | 3,10 (±0,62) | 97,04    | 95,28            | 331,80   | 18,11       |
| M/Ž=32/21    | Raspon    | 2,04-4,79    | (±15,86) | (±8,81)          | (±17,35) | (±3,64)     |
|              |           |              | 66-130   | 77,50-<br>115,90 | 280-369  | 13-34,30    |
| Kontrola     | AS (± SD) | 3,76 (±0,64) | 109,2    | 87,46            | 330,5    | 15,81       |
| n=121        | Raspon    | 1,89-4,90    | (±15,43) | (±6,31)          | (±30,66) | (±2,38)     |
| M/Ž=71/50    |           |              | 63-137   | 66,60-102,4      | 320-375  | 12,40-26,20 |
| Ukupno n=174 | AS (± SD) | 3,52 (±0,70) | 104,7    | 90,33            | 331      | 16,66       |
| M/Ž=103/71   | Raspon    | 1,89-4,90    | (±16,62) | (±8,22)          | (±26,53) | (±3,10)     |
|              |           |              | 63-137   | 66,60-115,9      | 280-375  | 12,40-34,30 |
| p vrijednost | -         | <.0001       | <.0001   | <.0001           | <.7377   | <.0001      |

AS=aritmetička sredina, SD=standardna devijacija, M=muški spol, Ž=ženski spol (E=x10<sup>12</sup>/L, Hb=g/L, MCV=fL, MCHC=g/L, RDW=%); p vrijednosti se odnose na univarijatnu analizu između skupina

Tablica 2. Značajke nezavisnih varijabli.

| Grupa        |           | Rtc              | IRF           | Leuk         | ANC          | Lymph        |
|--------------|-----------|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| MDS n=53     | AS (± SD) | 55,41            | 13,04         | 3,84 (±1,92) | 1,89 (±1,45) | 1,39 (±0,65) |
| M/Ž=32/21    | Raspon    | (±56,88)         | (±8,12)       | 0,81-9,80    | 0,11-6,62    | 0,56-3,76    |
|              |           | 2,90-351,50      | 0-43,10       |              |              |              |
| Kontrola     | AS (± SD) | 48,86            | 10,23 (±6,28) | 8,29 (±4,60) | 5,08 (±3,07) | 2,11 (±2,33) |
| n=121        | Raspon    | (±23,72)         | 0,40-29,40    | 2,40-27,72   | 0,12-18,19   | 0,39-17,25   |
| M/Ž=71/50    |           | 10,40-<br>139,80 |               |              |              |              |
| Ukupno       | AS (± SD) | 51,54            | 11,38         | 6,66 (±4,40) | 3,90 (±3,01) | 1,84 (±1,92) |
| n=174        | Raspon    | (±40,68)         | (±7,20)       | 0,81-27,72   | 0,11-18,19   | 0,39-17,25   |
| M/Ž=103/71   |           | 2,90-351,50      | 0-43,10       |              |              |              |
| p vrijednost | -         | <.3090           | <.0131        | <.0001       | <.0001       | <.0001       |

AS=aritmetička sredina, SD=standardna devijacija, M=muški spol, Ž=ženski spol (Rtc= $x10^9/L$ , IRF=%, Leuk=  $x10^9/L$ , ANC=  $x10^9/L$ , Lymph=  $x10^9/L$ ); p vrijednosti se odnose na univarijatnu analizu između skupina

Tablica 3. Značajke nezavisnih varijabli.

| Grupa        |                | Mono               | Bazo               | Eo                 | Trc             | MPV           |
|--------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| MDS n=53     | AS ( $\pm$ SD) | 0,43 ( $\pm$ 0,35) | 0,03 ( $\pm$ 0,05) | 0,08 ( $\pm$ 0,12) | 128,70          | 11,15         |
| M/Ž=32/21    | Raspon         | 0,03-1,68          | 0-0,39             | 0-0,64             | ( $\pm$ 100,2)  | ( $\pm$ 1,32) |
|              |                |                    |                    |                    | 6-420           | 8,60-14,20    |
| Kontrola     | AS ( $\pm$ SD) | 0,74 ( $\pm$ 0,45) | 0,07 ( $\pm$ 0,50) | 0,13 ( $\pm$ 0,16) | 226,3           | 10,01         |
| n=121        | Raspon         | 0,02-2,56          | 0-5,59             | 0-0,82             | ( $\pm$ 101,60) | ( $\pm$ 1,40) |
| M/Ž=71/50    |                |                    |                    |                    | 14-582          | 1,70-12,70    |
| Ukupno       | AS ( $\pm$ SD) | 0,62 ( $\pm$ 0,44) | 0,06 ( $\pm$ 0,40) | 0,11 ( $\pm$ 0,15) | 190,60          | 10,35         |
| n=174        | Raspon         | 0,02-2,56          | 0-5,59             | 0-0,82             | ( $\pm$ 111,30) | ( $\pm$ 1,47) |
| M/Ž=103/71   |                |                    |                    |                    | 6-582           | 1,70-14,20    |
| p vrijednost | -              | <.0001             | <.4556             | <.0704             | <.0001          | <.0001        |

AS=aritmetička sredina, SD=standardna devijacija, M=muški spol, Ž=ženski spol (Mono= $x10^9/L$ , Bazo=  $x10^9/L$ , Eo=  $x10^9/L$ , Trc=  $x10^9/L$ , MPV=fL); p vrijednosti odnose se na univarijatnu analizu između skupina

Pri analizi nezavisnih varijabli metodom multivarijatne logističke regresije zadovoljen je kriterij konvergencije; i kod preliminarne i kod konačne regresijske analize. U preliminarnoj regresijskoj analizi 3 varijable pokazale su se statistički značajne: MCV, ANC i MPV. Granično značajna varijabla bila je RDW. U konačnoj regresijskoj analizi, na kojoj se temelji naš dijagnostički model, korištene su isključivo 4 navedene varijable po *stepwise* protokolu. Za svaku su pojedinu varijablu izračunati ključni regresijski parametri (vidi u tablici 4.), a za izračunavanje vjerojatnosti (P) postojanja MDS-a u svakog pacijenta korištena je sljedeća formula:

$$P = \frac{e^{(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_4 x_4 + K)}}{1 + e^{(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_4 x_4 + K)}}$$

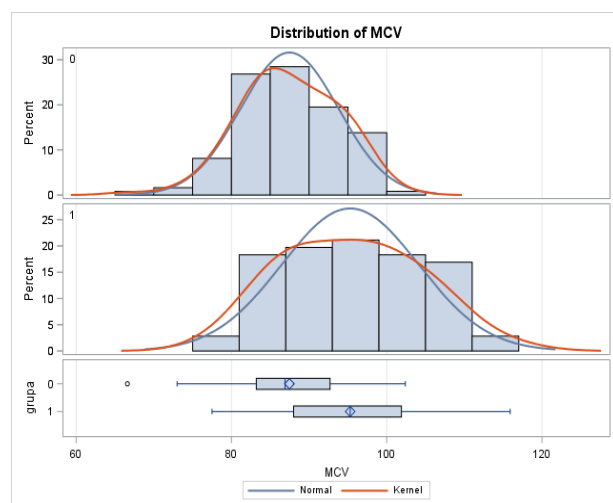
U prikazanoj formuli, P je vjerojatnost,  $x_n$  (gdje n predstavlja pojedinu nezavisnu varijablu,  $n=1 \dots 4$ ) označava vrijednost pojedine nezavisne varijable,  $\beta_n$  je logistički koeficijent pojedine nezavisne varijable, a K predstavlja konstantu logističkog modela. Prema navedenoj formuli, izračunata je

vjerojatnost (P) kod svakog pojedinog pacijenta. Slike 1., 2., 3., i 4. prikazuju raspodjelu vrijednosti varijabli (univarijatna analiza) korištenih u konačnom dijagnostičkom modelu.

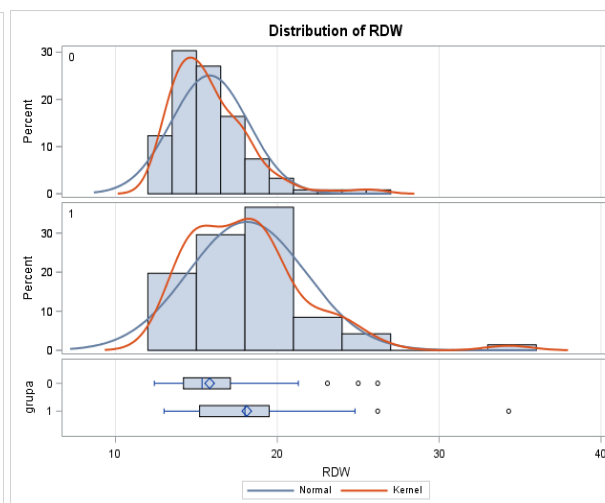
Tablica 4. Rezultati multivarijatne logističke regresije

| Varijabla  | SS | $\beta$  | Standardna greška | Wald Chi-Square | p      | OR    | 95% CI za OR |
|------------|----|----------|-------------------|-----------------|--------|-------|--------------|
| <b>K</b>   | 1  | -22,7513 | 5,0462            | 20,3271         | <.0001 | -     | -            |
| <b>MCV</b> | 1  | 0,1573   | 0,0401            | 15,4194         | <.0001 | 1,170 | 1,082-1,266  |
| <b>RDW</b> | 1  | 0,1954   | 0,1094            | 3,1909          | 0,0740 | 1,216 | 0,981-1,506  |
| <b>ANC</b> | 1  | -1,1372  | 0,2330            | 23,8278         | <.0001 | 0,321 | 0,203-0,506  |
| <b>MPV</b> | 1  | 0,6993   | 0,2404            | 8,4589          | 0,0036 | 2,012 | 1,256-3,224  |

K=konstanta, SS=stupnjevi slobode,  $\beta$ =logistički koeficijent za pojedinu nezavisnu varijablu, p=razina značajnosti, OR=omjer šansi

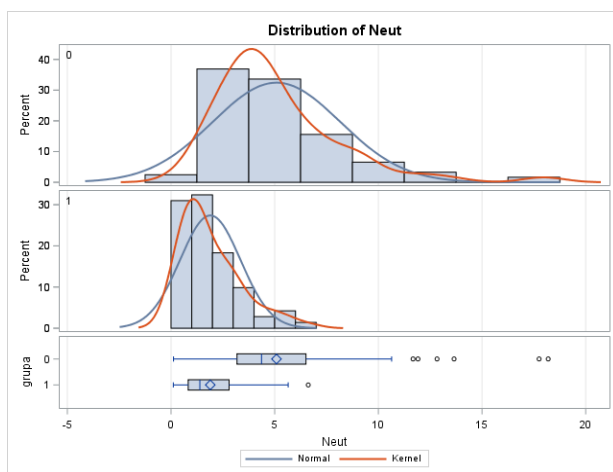


Slika 1. Grafički prikaz distribucije vrijednosti MCV-a pri univarijatnoj analizi

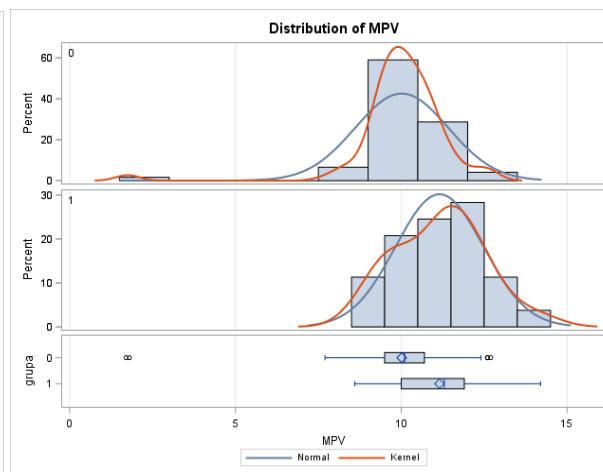


Slika 2. Grafički prikaz distribucije vrijednosti RDW-a pri univarijatnoj analizi



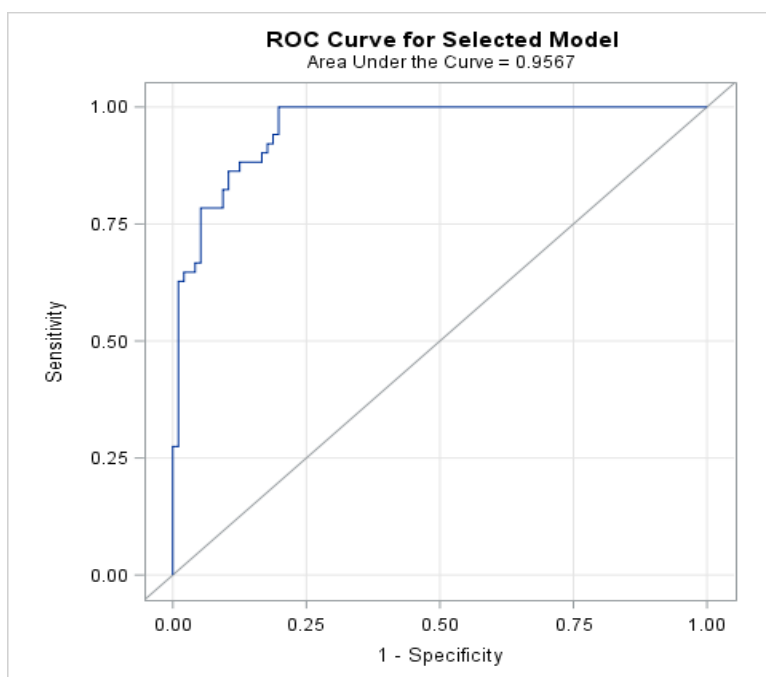


Slika 3. Grafički prikaz distribucije vrijednosti ANC-a pri univarijantnoj analizi (Neut=ANC)

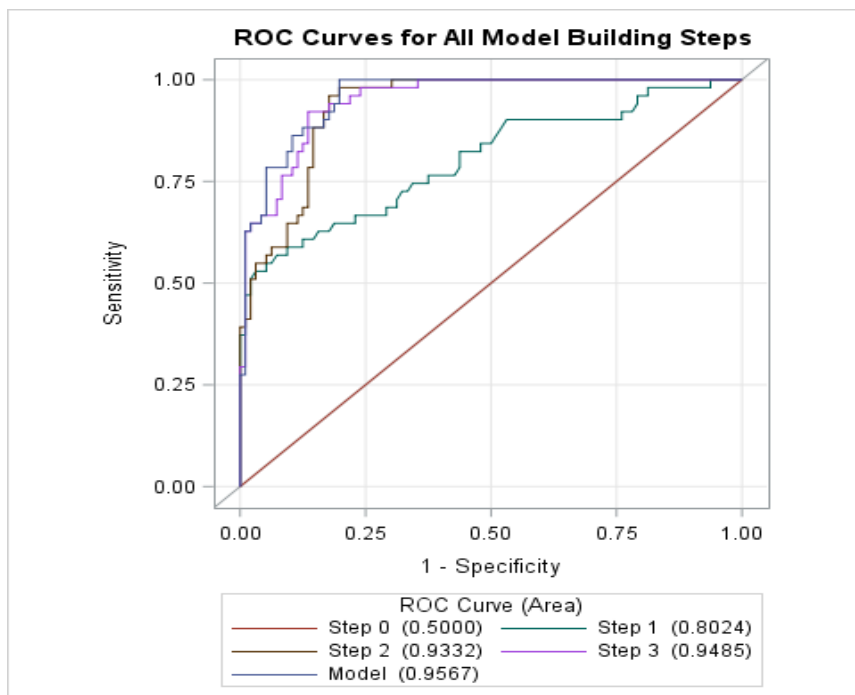


Slika 4. Grafički prikaz distribucije vrijednosti MPV-a pri univarijantnoj analizi

Grafički je nacrtana ROC-krivulja za navedeni dijagnostički model te je pritom izračunata površina ispod krivulje (AUC) čija vrijednost iznosi 0,9567 (slika 5.). Također, grafički je nacrtana ROC-krivulja prema *stepwise* protokolu koja prikazuje kako dodavanje pojedine varijable povećava osjetljivost i specifičnost dijagnostičkog modela, odnosno, povećava površinu ispod krivulje. Prva krivulja (step 1) odraz je dodavanja MCV-a u model, druga krivulja (step 2) dodavanja ANC-a, treća krivulja (step 3) dodavanja MPN-a, a četvrta krivulja prikazuje konačni model (slika 6.).



Slika 5. Prikaz ROC-krivulje za model



Slika 6. Prikaz Roc-krivulje prema *stepwise* protokolu

Iako varijabla RDW ne doprinosi dodatno dijagnostičkom modelu, ostavljena je kao prediktorska varijabla iz razloga kojeg navodim u raspravi ovog rada. Od 4 navedene varijable, MCV i ANC pokazale su se kao najbolje prediktorske varijable s najnižim p vrijednostima ( $p < .0001$  za obje varijable).

Provedena je grafička analiza distribucije vjerojatnosti (P) za svakog pojedinog pacijenta (N=174) čije su nezavisne varijable sudjelovale u stvaranju priloženog logističkog modela (slika 7.). Temeljem izračunatih vjerojatnosti (P) za svakog pojedinog pacijenta ispitano je nekoliko graničnih vrijednosti P (0,3 0,35 0,65 0,7) u svrhu kategorizacije pacijenata u dvije skupine: pacijenti s visokom vjerojatnošću postojanja MDS-a te pacijenti s niskom vjerojatnošću postojanja MDS-a. Pokazalo se da od ispitanih graničnih vrijednosti, vrijednost 0,3 ima najbolju osjetljivost i specifičnost, odnosno PPV i NPV (tablica 5.), u usporedbi s ostalim ispitanim vrijednostima i zbog toga je odabrana kao granična. Izrađeni dijagnostički model ima približno jednaku osjetljivost i specifičnost, međutim pokazuje značajnu razliku u pogledu PPV-a i NPV-a. Upravo zbog većeg NPV-a ovim testom može se s relativno velikom sigurnošću isključiti dijagnozu MDS-a u pacijenata s negativnim rezultatom testa. Pacijenti s P vrijednošću iznad definirane granične

( $P=0,3$ ) kategorizirani su kao „vjerojatni MDS“, a pacijenti s  $P$  vrijednošću ispod granične kategorizirani su kao „vjerojatno nije MDS“.

Tablica 5. Kontingencijska tablica za graničnu vrijednost 0,3

|                       | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>Ukupno</b> |
|-----------------------|----------|----------|---------------|
| <b>Pozitivan test</b> | 46       | 16       | 62            |
| <b>Negativan test</b> | 7        | 105      | 112           |
| <b>Ukupno</b>         | 53       | 121      | 174           |

0=nema MDS, 1=ima MDS

$P > 0,3$  osjetljivost=86,79%, specifičnost=86,78%, PPV=74,19%, NPV=93,75%

Od ukupno 53 pacijenata, njih 46 testom je ispravno svrstano u kategoriju „vjerojatni MDS“, dok je njih 7 pogrešno svrstano u kategoriju „vjerojatno nije MDS“. Temeljem izračunatih vjerojatnosti ( $P$ ) za svakog pacijenta, 8 visokorizičnih MDS pacijenata svrstano je u kategoriju „vjerojatni MDS“, a 1 pogrešno u kategoriju „vjerojatno nije MDS“. Svi pacijenti s intermedijarnim-2 rizikom ispravno su kategorizirani, a u skupini pacijenata s intermedijarnim-1 rizikom pogrešno je svrstano 2 pacijenata (8%). Najviše pogrešno svrstanih pacijenata bilo je u skupini niskog rizika, njih 4 (30,8%).

## 5. RASPRAVA

Laboratorijski parametri korišteni u ovom dijagnostičkom modelu odraz su same patofiziologije bolesti. Makrocitoza ( $MCV > 97fL$  prema našem laboratoriju) posljedica je poremećaja sazrijevanja crvene krvne loze, karakteriziranog narušenim odnosom citoplazme i jezgre, u korist citoplazme. S obzirom na to kako je makrocitoza bitno obilježje kako MDS-a, tako i brojnih benignih stanja (hipovitaminoze, hipotireoza lijekovi...), smatram kako bi korisno bilo osmisliti regresijski model te odrediti koje su varijable ključne za razlikovanje makrocitoze u MDS-u od makrocitoze u drugim, benignim stanjima. Disgranulopoeza bitna je odrednica MDS-a, koja se očituje u smanjenom ANC-u, a također su prisutne i kvalitativne promjene neutrofila poput porasta heterogenosti pojedinih subpopulacija i poremećaja granuliranosti. Iz navedenog proizlazi kako bi noviji laboratorijski parametri, usmjereni na kvalitativna obilježja granulocita, bili vrijedna dopuna u razvoju neinvazivne dijagnostike. Porast MPV-a posljedica je poremećene

megakariopoeze, pri čemu se u perifernu krv otpuštaju trombociti povećanog volumena. RDW, kao mjera anizocitoze, u sklopu konačne multivarijatne regresijske analize, pokazao se granično statistički značajnim ( $p=0,0740$ ). Usprkos tome, odlučeno je zadržati ga u modelu, jer smatramo da je potrebna veća skupina pacijenata kako bi se njegov pravi značaj utvrdio. Dva najveća ograničenja ovog rada bila su relativno mali broj pacijenata i problematika osmišljavanja prikladne kontrolne skupine. Pokušali smo napraviti što heterogeniju kontrolnu skupinu temeljem predefiniраниh kriterija uključenja i isključenja kako bi što više dijagnoza oponirali MDS-u i kako bi ovaj model bio što primjenjiviji u praksi. Test je najčešće bio lažno negativan u skupini niskorizičnog MDS-a, dok je s porastom rizika i točnost postavljanja ispravne dijagnoze bila u porastu. Smatramo da u daljnjem razvoju ovog modela nedostaje vanjska validacija, kojom bi se učvrstili dobiveni rezultati. Motivacija za izradu ovog rada bio je već prije spomenuti rad (13) izraelskih autora koji su se prvi okušali u postavljanju dijagnoze MDS-a temeljem lako dostupnih kliničkih i laboratorijskih parametara. Naglasio bih 3 ključna nedostatka u metodologiji i statističkoj analizi podataka: nedovoljno dobro definirana kontrolna skupina što otežava reproducibilnost rada, korištenje statistički neznajčajnih varijabli (dob, spol, Hb i Trc) u konačnom dijagnostičkom modelu te korištenje dviju graničnih vrijednosti testa, pri čemu se stvara „siva zona“ unutar koje tumačenje rezultata nije moguće. U nešto novije objavljenom radu (citirati) Ne-WX se pokazao kao ključan parametar za otkrivanje MDS-a/diferenciranje MDS-grupe od kontrolne skupine, i bio značajno većih vrijednosti u sve 4 podskupine MDS-pacijenata nego u kontrolnoj skupini ( $p<0,0001$ ). Korištenjem spomenutog parametra u kombinaciji s MCV-om i ANC-om, autori su osmislili MDS score s osjetljivošću od 86% i specifičnošću od 88%. U vidu razvoja neinvazivne dijagnostike, osim laboratorijskih parametara, započeto je eksperimentalno korištenje metoda molekularne analize genskog materijala iz periferne krvi koji se pokazao kao jednakovrijedna zamjena analizi koštane srži (16,17). Iz svega navedenog proizlazi kako bi kombinacija jednostavnih laboratorijskih parametara u preliminarnoj te molekularnih metoda u konačnoj dijagnozi mogla biti budućnost neinvazivne dijagnostike MDS-a. Dok se ne dokaže suprotno, aspiracija koštane srži i dalje ostaje zlatni standard.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata potvrđeno je da postoji mogućnost razlikovanje MDS pacijenata od kontrolne skupine temeljem lako dostupnih laboratorijskih parametara. Uz dobro osmišljenu kontrolnu skupinu moguće je postići visoku osjetljivost i specifičnost korištenjem samo jedne granične vrijednosti testa. Postoji razlika u predviđenoj vjerojatnosti između pojedinih skupina rizika MDS pacijenata.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujem prof. dr. sc. Slobodanki Ostojić-Kolonić koja je bila moja mentorica, u svakom trenutku spremna dati dobar savjet i potporu. Također zahvaljujem dr. Ingi Mandac-Rogulj na motivaciji i potpori te prof. dr. sc. Anamariji Jazbec na pomoći u statističkoj obradi podataka.

## 8. POPIS LITERATURE

1. 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. *Blood*. 2013 Oct 24;122(17):2943–64.
2. Group on behalf of the EGW, Group on behalf of the EGW, Group on behalf of the EGW, Group on behalf of the EGW, Group on behalf of the EGW, Fenaux P, et al. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014 Jul 25;25(suppl\_3):iii57-iii69.
3. Visconte V, Tiu R V, Rogers HJ. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res*. 2014/12/23. 2014 Dec;49(4):216–27.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391 LP-2405.
5. Sekeres MA, Cutler C. How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):829 LP-836.
6. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014/08/04. 2014 Sep 1;32(25):2691–8.
7. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2015 Jan 1;39(1):6–17.
8. 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 Mar 15;89(6):2079 LP-2088.
9. Kelaidi C, Stamatoullas A, Beyne-Rauzy O, Raffoux E, Quesnel B, Guerci A, et al. Daily practice management of myelodysplastic syndromes in France: data from 907 patients in a one-week cross-sectional study by the Groupe Francophone des Myelodysplasies. *Haematologica*. 2009/12/16. 2010 Jun;95(6):892–9.

10. de Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Mar 30;129(13):1753–62.
11. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, Maris MB, Baron F, Maloney DG, et al. Comorbidity and Disease Status–Based Risk Stratification of Outcomes Among Patients With Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplasia Receiving Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 20;25(27):4246–54.
12. Hjortholm N, Jaddini E, Hałaburda K, Snarski E. Strategies of pain reduction during the bone marrow biopsy. *Ann Hematol*. 2012/12/06. 2013 Feb;92(2):145–9.
13. Oster HS, Carmi G, Kolomansky A, Joffe E, Kaye I, Kirgner I, et al. Is bone marrow examination always necessary to establish the diagnosis of myelodysplastic syndromes? A proposed non-invasive diagnostic model. *Leuk Lymphoma*. 2018 Sep 2;59(9):2227–32.
14. Boutault R, Peterlin P, Boubaya M, Sockel K, Chevallier P, Garnier A, et al. A novel complete blood count-based score to screen for myelodysplastic syndrome in cytopenic patients. *Br J Haematol*. 2018 Dec 1;183(5):736–46.
15. Buoro S, Seghezzi M, Vavassori M, Dominoni P, Apassiti Esposito S, Manenti B, et al. Clinical significance of cell population data (CPD) on Sysmex XN-9000 in septic patients with or without liver impairment. *Ann Transl Med*. 2016 Nov;4(21):418.
16. Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, Hunter T, Sinha D, Wong SQ, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1685 LP-1690.
17. Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, Iriyama C, Shirahata-Adachi M, Shimada K, et al. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci*. 2016/08/25. 2016 Sep;107(9):1329–37.

## **9. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 24.03.1995. u Koprivnici gdje sam završio Osnovnu školu Đuro Ester i opću gimnaziju. 2013. upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U okviru katedre za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radio sam dvije godine kao demonstrator na predmetu Klinička propedeutika pod vodstvom prof. dr. sc. Mladena Knoteka, prof. dr. sc. Leje Smirčić-Duvnjak i doc. dr. sc. Tomislava Letilovića u Kliničkoj bolnici Merkur na odjelima nefrologije, endokrinologije i kardiologije. Također, dvije sam godine radio kao demonstrator na predmetu Anatomija na istoimenom zavodu. 2017. sam prisustvovao na 7. Hrvatskom kongresu hematologa u Šibeniku. Na Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Merkur sudjelovao sam u pisanju nekoliko radova te sažetaka za kongrese.