Uloga adhezijskih molekula i izvanstanične potke u mijelodisplastičnom sindromu

Ljubić, Nives

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:543049

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Ljubić, Nives (2010) ***Uloga adhezijskih molekula i izvanstanične potke u mijelodisplastičnom sindromu [Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix in the Myelodysplastic Syndromes].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/865

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nives Ljubić

ULOGA ADHEZIJSKIH MOLEKULA I IZVANSTANIČNE POTKE U MIJELODISPLASTIČNOM SINDROMU

DISERTACIJA

Zagreb, 2010

Rad je izrađen na Zavodu za patologiju i citologiju KB „Merkur“u Zagrebu

Voditelj rada: prof.dr.sc. Rajko Kušec

ZAHVALA

Prof.dr.sc. Rajku Kušecu, mom mentoru, i prof.dr.sc. Mari Dominis na nesebičnoj potpori, strpljivosti i stručnoj pomoći.

Prof. dr.sc Mladenu Petrovečkom na trudu u obradi podataka i rezultata.

Dr.sc. Petri Korać, dipl. ing. mol.biologije kod izrade FISH-a i Aniti Škrtić, dr.med. na potpori koju mi je pružala.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Mirni Sučić na savjetima i prijateljskoj podršci koju mi je pružala.

Zahvaljujem Tatjani Gudelj univ.bacc., Susani Hančić univ. Bacc., Biserki Pleško med.teh. i Blaženki Kordić med.teh.na pomoći u laboratorijskoj obradi materijala korištenog u ovom radu, te svim ostalim članovima Zavoda za patologiju i citologiju KB „Merkur“.

1. UVOD 8
1.1. Obilježja mijelodisplastičnog sindroma (MDS) 8
1.1.1. Definicija i klasifikacija 8
1.1.2. Kliničke karakteristike 11
1.1.3. Laboratorijski nalazi 13
1.1.4. Klinički pristup i terapija MDS-a 13
1.1.5. Morfološke karakteristike 14
1.1.6. Biološke karakteristike MDS-a 17
1.1.7. Citogenetski poremećaji u MDS-u 21
1.1.8. Prognoza 26
1.2. Hematopoeza i mikrookoliš 28
1.2.1. Utjecaj mikrookoliša na matičnu hematopoetsku stanicu 28
2.2.1. Molekularne interakcije (*cross talk*) u endostealnoj niši 33
1.2.3. Mikrookoliš koštane srži i MDS 34
1.3. Ekstracelularni matriks 35
1.3.1. Kolagen 37
1.3.2. Fibronektin 37
1.3.3. Laminin 38
1.3.4. Tenascin 39
1.3.5. Hemonektin 39
1.3.6. Trombospondin 40
1.4. CD 44 40
1.5. Trombocitna adhezijska endotelna molekula 42
(engl. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) (PECAM) (CD31) 42
1.6. APC (Adenomatosis Polyposis Colli) 43
2. Ciljevi rada 45
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE 46
3.1. ISPITANICI 46
3.2. METODE 46
3.2.1. Morfološka analiza 46
3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje 47
3.2.3. Metode molekularne citogenetike 49
3.2.4. Kliničko-laboratorijske povezanosti 52
3.2.5. Korelacija rezultata dobivenih imunohistokemijskom analizom i laboratorijskih i hematoloških nalaza 53
3.2.6. Statističke metode 53
4. REZULTATI 54
4.1. Definiranje bolesnika prema klasifikaciji FAB-a i SZO-a 54
4.2. Imunohistokemijska ocjena izražaja CD 44, PECAM-a (CD 31), fibronektina, APC-a i laminina 56
4.3. Molekularno-citogenetska (FISH) analiza delecije 5q31-33 64
4.4. Citomorfološka zastupljenost diseritropoeze, disgranulopoeze i distrombocitopoeze 66
4.5. Histološka ocjena zastupljenosti ALIP-a, limfnih folikula i mastocita 67
4.6. Ocjena celularnosti, fibroze i skleroze kosti te zastupljenost blasta, osteoblasta i osteoklasta 68

4.7. Laboratorijski nalazi 71
4.8. Terapija i klinički pokazatelji 74
4.9. Korelacija rezultata dobivenih imunohistokemijskom analizom i laboratorijskih i hematoloških nalaza 75
5. RASPRAVA 76
6. ZAKLJUČCI 85
7. SAŽETAK 87
8. SUMMARY 89
9. POPIS LITERATURE 91
10. ŽIVOTOPIS 107

Popis kratica

AF	alkalna fosfataza
ALIP	poremećeno lokalizirani nezreli prekursori (engl. *Abnormal Localised Immature Precursors*)
AML	akutna mijeloična leukemija (engl. *Acute Myeloid Leukemia*)
APC	*Adenomatosis Polyposis Colli*
CDK	kinaza ovisna o ciklinu (engl. *Cycline Dependent Kinase*)
CDR	najčešće izostavljena regija (engl. *Commonly Deleted Region*)
CML	kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic Myelogenous Leukemia*)
CMML	kronična mijelomonocitna leukemija (engl. *Chronic Myelomonocitic Leukemia*)
CXCL	ligand kemokina
CXCR	receptor kemokina
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EGF	čimbenik rasta epiderme (engl. *Epidermal Growth Factor*)
FAB	French American British
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*)
FISH	fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *Fluorescent In Situ Hibridisation*)
G-CSF	čimbenik rasta kolonije granulocita (engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)
IL	interleukin
INF γ	interferon gama
IPSS	internacionalni prognostički zbrojni sustav (engl. *International Prognostic Score System*)
LDH	laktat dehidrogenaza
MAPK	mitogen aktivirajuća proteinska kinaza
MDS	mijelodisplastični sindrom (engl. *Myelodysplastic Syndrome*)
MDS-t	mijelodisplastični sindrom uzrokovan terapijom
MDS/MPS	mijelodisplastični sindrom/mijeloproliferativni sindrom (engl. *Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Syndrome*)

MDS-U	mijelodisplastični sindrom-neklasificirani *(engl. Myelodysplastic Syndrome-Unclassified)*
M-FISH	viešestruka fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization*)
MMP	matriks metaloproteinaza
MMR	unakrsni popravljački geni (engl. *Mismach Repair Genes*)
MVD	gustoća mikrovaskulature (engl. *Mycrovascular Density*)
OPN	osteopontin
PECAM	trombocitna/endotelna adhezijska molekula (engl. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*)
PI3K	fosfatidil inozitol 3-kinaza
RA	refraktorna anemija (engl. *Refractory Anemia*)
RA-RS	refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (engl. *Refractory Anemia with Ring Syderoblasts*)
RAEB	refraktorna anemija sa suviškom blasta (engl. *Refractory Anemia with Excess Blasts*)
RAEB-t	refraktorna anemija sa suviškom blasta u transformaciji (engl. *Refractory Anemia with Excess Blasts in Transformation*)
RARS	refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (engl. *Refractory Anemia with Ring Syderoblasts*)
RCMD	refraktorna anemija s višelinijskom displazijom (engl. *Refractory Anemia with Multilineage Dysplasia*)
RCUD	refraktorna citopenija s displazijom jedne loze *(engl. Refractory Cytopenias with Unilineage Dysplasia)*
RN	refraktorna neutropenija *(engl. Refractory Neutropenia)*
RNK	ribonukleinska kiselina
RT	refraktorna trombocitopenia *(engl. Refractory Thrombocytopenia)*
SCF	čimbenik matičnih stanica (engl. *Stem Cell Factor*)
SNP	bialelni genski biljezi (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija

TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transformig Growth Factor beta*)
TIE	receptor tirozin-kinaze (engl. *Tyrosine Kinase Receptor*)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor alfa*)
TRAD	čimbenik nekroze tumora alfa receptor vezani protein s domenom smrti (engl. *Tumor Necrosis Factor alfa Receptor Associated Protein with Death Domain*)
TRAF	čimbenik nekroze tumora alfa vezani čimbenik (engl. *Tumor Necrosis Factor alfa Associated Factor*)
VCAM	vaskularna adhezijska molekula (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule*)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endotel Growth Factor*)
VLA-4	vrlo kasni antigen 4 (engl. *Very Late Antigen 4*)
VLA-5	vrlo kasni antigen 5 (engl. *Very Late Antigen 5*)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)
WPSS	zbrojni prognostički sustav temeljen na klasifikaciji SZO-a (engl. *WHO Classification Based Prognostic Scoring System*)

1. UVOD

1.1. Obilježja mijelodisplastičnog sindroma (MDS)

1.1.1. Definicija i klasifikacija

Mijelodisplastični sindrom (MDS) skupina je poremećaja hematopoeze koji se očituju u neučinkovitosti hematopoeze, odnosno u različitim poremećajima citopenije: anemiji, leukopeniji te trombocitopeniji. Riječ je o klonalnoj bolesti matične stanice koja zadržava određenu sposobnost diferencijacije (1). MDS se javlja kao primarna bolest (*de novo*) ili MDS vezan uz terapiju, kada se bolest javlja kao posljedica izlaganja kemoterapiji i/ili radioterapiji (t-MDS).

Izraz MDS prvi je put upotrijebljen 1982. godine kada je međunarodna radna skupina FAB (French-American-British) predložila i razradila klasifikaciju MDS-a koja razlikuje pet kliničko-hematoloških entiteta: refraktornu anemiju (RA), refraktornu anemiju s prstenastim (engl. *ring*) sideroblastima (RARS), refraktornu anemiju sa suviškom blasta (RAEB), refraktornu anemiju sa suviškom blasta u transformaciji (RAEB-t) i kroničnu mijelomonocitnu leukemiju (CMML) (2).

Za razliku od FAB-ove klasifikacije koja se temeljila na morfološkim kriterijima, 2008. godine postavljena je nova klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO klasifikacija), vođena idejom da se podjela hematoloških neoplazmi, uz morfološke kriterije, treba zasnivati i na kliničkim, genetskim, imunofenotipskim i biološkim karakteristkama (4).

Tablica 1. Klasifikacija MDS-a po FAB-ovim kriterijima (3)

Dijagnoza	periferna krv	koštana srž	Komentar
RA	<1% blasta, abnormalnost eritrocita, abnormalnost granulocita, trombocitopenija, retikulocitopenija	<5% blasta, diseritropeza, često disgranulopeza i dismegakariocitopoeza	anemija, refraktorna citopenija
RARS	<1% blasta, abnormalnost eritrocita, dimorfni eritrociti	hipercelularna, <5% blasta, slabije izražena disgranulo i distrombocitopeza, ≥5% ring sideroblasta	prisutnost Fe unutar mitohondrija
RAEB	>5% blasta, abnormalnost eritrocita, abnormalnost granulocita, abnormalnost trombocita	5 – 20% blasta, displazija dviju ili više loza	Češća progresija u AML
RAEB-t	≥5% blasta, disgranulopeza	21 – 30% blasta	
CMML	<5% blasta, monocitoza $>10^9$L, povišen broj zrelih granulocita	varijabilna trilinijska displazija	

Po toj se klasifikaciji MDS sastoji od devet entiteta: refraktorne citopenije s monolinijskom displazijom koja uključuje refraktornu anemiju (RA), refraktornu neutropeniju (RN) i refraktornu trombocitopeniju (RT); zatim refraktorne anemije s prstenastim sideroblastima (RARS), refraktorne citopenije s multilinijskom displazijom (RCMD), refraktorne anemije sa suviškom blasta 1 (RAEB-1), refraktorne anemije sa

suviškom blasta 2 (RAEB-2), MDS-a neklasificiranog (engl. *MDS unclassified –MDS-U*) i MDS-a povezanog s izoliranom delecijom 5q, dok je RAEB-t uvršten u akutne mijeloične leukemije (AML). CMML izdvojen je u posebnu skupinu mijeloproliferativnih bolesti MDS/MPS koju sačinjavaju :CMML, atipična kronična mijeloična leukemija BCR-ABL negativna, juvenilna mijelomonocitna leukemija i mijelodisplastična/mijeloproliferativna neoplazma, neklasificirana (4).
S obzirom na heterogenost MDS-a, i dalje se nastavlja usavršavanje klasifikacija koje bi što preciznije omogućile prognoziranje i odabir odgovarajuće terapije za liječenje ove bolesti (5, 6, 7).

Promatrajući klinički tijek bolesti prema FAB-ovoj klasifikaciji, primjenjivana je podjela određenih skupina MDS-a u one niskog i visokog rizika prelaska u AML. Tako skupini niskoga rizika pripadaju RA i RARS, a skupini visokoga rizika RAEB i RAEB-t. Bez obzira na nove klasifikacije, i do danas je podjela u ove dvije skupine zadržana u svakodnevnoj primjeni.

Tablica 2. Klasifikacija MDS-a po SZO-u (WHO) (4)

Dijagnoza	nalaz periferne krvi	nalaz koštane srži
RCUD RA, RN, RT	mono- ili bicitopenija, nema blasta ili su rijetki	displazija jedne mijelo- loze, <5% blasta, <15% ring sideroblasta
RARS	anemija, blasta nema	≥15% ring sidroblasta, Diseritropeza, < 5% blasta
RCMD	Citopenija (bi- ili pancitopenija), blasta nema ili su rijetki, nema Auerovih štapića	displazija 10% stanica, dvije ili više loza hematopoeze, <5% blasta, <15% ring sideroblasta, nema Aureovih štapića
RAEB-1	citopenija, <5% blasta displazija, nema Auerovih štapića, <1X10^9/L monocita	mono- ili multilinijska displazija, 5 – 9% blasta, nema Auerovih štapića
RAEB-2	citopenija, 5 – 19% blasta, Auerovi štapići, <1X10^9/L monocita	mono- ili multilinijska displazija, 10 – 19% blasta, Auerovi štapići
MDS-U	citopenija, blasta nema ili su rijetki, nema Auerovih štapića	monolinijska displaziija, <5% blasta, nema Auerovih štapića
MDS-5q	anemija, normalan ili povišen broj trombocita, <5% blasta	normalni ili umnoženi megakariociti s hipolobuliranom jezgrom, izolirana delecija (5q), nema Auerovih štapića

1.1.2. Kliničke karakteristike

Od MDS-a najčešće oboljevaju starije osobe, iako se bolest može javiti u bilo kojoj dobi. Medijan godina iznosi 70, a incidencija 3/100 000, ali raste na 20/100 000 kod starijih od 70 godina (8). Svega 6,7% bolesnika mlađe je od 50 godina. Nedavni porast incidencije javlja se zbog produžene prosječne životne dobi. Kako se očekuje produljenje

ljudskog vijeka u razvijenom svijetu, pretpostavlja se da će se broj oboljelih povećavati u sljedećim dekadama. Žene oboljevaju 1,5 puta češće od muškaraca. Rastući broj bolesnika sa sekundarnim AML-om nastalim iz MDS-a prepoznaje se kao rezultat povećanoga broja bolesnika koji su liječeni kemo- i radioterapijom zbog drugih malignih bolesti.

Simptomi bolesti većinom su nespecifični. Bolest se kod manjeg dijela bolesnika dijagnosticira u fazi bolesti bez simptoma, prilikom određivanja laboratorijskih nalaza. Oko 90% bolesnika ima razvijene simptome u fazi postavljanja dijagnoze bolesti. Većina bolesnika ima simptome vezane uz anemiju i nešto rjeđe uz neutropeniju i trombocitopeniju. Simptomi su slabost, umor, gubitak težine, sklonost krvarenju i infekcijama, pokazatelji karaktristični za pancitopeniju. Bolesnici s RA-om i RARS-om obično ne pokazuju ozbiljnije kliničke probleme, a bolesnici s ostalim tipovima MDS-a, osobito nakon transformacije u AML, pokazuju simptome i znakove koji se opisuju u akutnoj leukemiji.

Gubitak težine češće se javlja u bolesnika s CMML-om, a krvarenje i povišena temperatura u bolesnika s RAEB-om. Kod manjeg broja bolesnika zamjećuju se splenomegalija i hepatomegalija.

Vodeći su uzrok smrt u bolesnika s MDS-om transformacija u AML (20 – 40%), komplikacije zbog citopenije i funkcionalnih nedostataka cirkulirajućih stanica u perifernoj krvi te infekcija i krvarenja (9).

1.1.3. Laboratorijski nalazi

Osnovne su laboratorijske osobine kod MDS-a pokazatelji citopenije, kod RAEB-a povećan broj blasta te kod CMML-a broj monocita u krvi. Također su značajni biokemijski i funkcionalni poremećaji neutrofila, eritrocita i trombocita. Granulociti mogu pokazivati nedostatak mijeloperoksidaze, a u 20% slučajeva nedostatak alkalne fosfataze. Granulociti pokazuju i poremećaj kemotaksije, adhezije i fagocitoze. U eritrocitima se nalazi smanjenje glikolitičkih enzima, najčešće piruvat kinaze. Oko 80% bolesnika ima povećanu sintezu fetalnoga hemoglobina. Također postoje kvalitativne promjene eritrocitnih antigena. Trombociti pokazuju smanjenu adheziju za kolagen, a prisutan je i poremećaj agregacije. Čak i u slučajevima normalnoga broja trombocita vrijeme krvarenja obično je produženo.

Kod 32% bolesnika prisutna je hipergamaglobulinemija, a često se nalaze i brojna autoprotutijela (3).

1.1.4. Klinički pristup i terapija MDS-a

Do sada je najčešći terapijski pristup bolesnicima s MDS-om bila najbolja suportivna terapija, podrazumijevajući transfuzije eritrocita i trombocita, te antibiotska terapija. Kemoterapija se davala samo u slučajevima progresije u AML. U novije vrijeme terapijski se pristup mijenja i on postaje individualan ovisno o dobi bolesnika, kliničkom statusu, prisutnosti drugih bolesti i stadiju bolesti u vrijeme njezina dijagnosticiranja.

Jedini oblik terapije kojom se može postići izlječenje ove bolesti jest transplantacija koštane srži, ali zbog česte kombinacije poodmakle dobi i nedostatka donora za većinu bolesnika ova terapija nije moguća.

Moguća je također terapija imunomodulatorima (posebice Lenalidomidom za 5q sindrom), a koriste se i antitimocitni globulin (ATG) i ciklosporina A. Najnoviji su lijekovi bazirani na hipometilacijskom učinku, a najpoznatiji je od njih 5-azacytidin (10).

1.1.5. Morfološke karakteristike

Osnovne morfološke karakteristike MDS-a, na kojima se i zasniva morfološka klasifikacija, jesu: postotak blasta u razmazu periferne krvi i koštane srži, tip i stupanj displazije te prisutnost prstenastih sideroblasta.

Znaci mijelodisplazije javljaju se i kod drugih neklonalnih poremećaja (nutritivni i toksični faktori te kod nekih kroničnih bolesti), kao i kod kongenitalnih bolesti, što može predstavljati diferencijalno-dijagnostičke poteškoće.

Histološka slika biopsija kosti pokazuje poremećaj arhitekture i celularnost koštane srži. Ona je najčešće hipercelularana, nešto rjeđe normocelularna, iako ima slučajeva s hipocelularnom koštanom srži. Katkada, kada je koštana srž hipocelularna, preostale nakupine limfocita u početnim fazama bolesti mogu stvoriti diferencijalno-dijagnostičke poteškoće prema početnim oblicima limfoproliferativne bolesti.

Kao i u citološkim razmazima, tako i u histološkim rezovima koštane srži u MDS-u, nalaze se morfološke promjene dishematopoeze opisane uz specifične promjene diseritropoeze, disgranulopoeze i disistrombocitopoeze.

Displazija može zahvatiti jednu ili više loza. Kod displazije jedne loze (u slučaju RA-a i RARS-a) obično je zahvaćena samo eritropoeza, dok se znatno rjeđe može javiti displazija samo granulopeze ili trombocitopoeze. Kod RCMD-a javlja se displazija dviju ili više loza. Da bismo mogli reći kako postoji displazija neke loze, potrebno je da ona obuhvaća najmanje 10% stanica te loze.

Diseritropoeza se može naći kod svih tipova MDS-a, ali je osobito izražena u RA-u i RARS-u. Diseritropeza je karakterizirana promjenama u jezgri eritroblasta, poput pupanja, kariorekse, multinukleacije i megaloblastoidnih promjena. Promjene u citoplazmi eritroblasta obuhvaćaju vakuolizaciju, prstenaste sideroblaste i PAS pozitivnost. Citokemijskim bojenjem nehemoglobinskoga željeza berlinskim modrilom nalaze se brojni prstenasti sideroblasti, pri čemu se nakupljanje željeza nalazi u feri-obliku, u mitohondrijima, u obliku prstena. Potrebno je naći najmanje pet granula koje obuhvaćaju najmanje dvije trećine kruga oko jezgre eritroblasta da bismo taj eritroblast mogli proglasiti prstenastim sideroblastom. Postotak od 15% i više prstenastih sideroblasta nalaz je koji se smatra specifičnim pokazateljem diseritropoeze u MDS-u i nalazi se kod RARS-a.

Također se citokemijskim bojenjem PAS (*Periodic Acid Shift*) nalazi PAS pozitivnost u citoplazmi eritroblasta, koja može biti difuzna i granularna.

Morfološke promjene eritrocita u perifernoj krvi najčešće su: makrocitoza i anizocitoza (međutim, eritrociti mogu biti normocitni i mikrocitni). Ponekad se nalaze i bazofilne punktacije u eritrocitima, koje su odraz ostataka RNK i neefektivne eritropoze. U perifernoj krvi također se mogu naći i eritroblasti te eritrociti s ostacima jezgra (Hauell Jolly tjelešca).

Osnovne promjene koje nalazimo u **disgranulopoezi** odnose se na veličinu stanica, lobuliranost jezgra i granuliranost citoplazme. Važan poremećaj disgranulopoeze jest poremećaj sazrijevanja koji se očituje kod svih tipova MDS-a, a može se naći povećan broj blasta koji je osobito specifičan za RAEB. Stanice granulopoeze obično su manje ili veće od normalnih. Najčešća i jedna od najtipičnijih promjena za MDS jest hipolobuliranost jezga. Tako i u koštanoj srži, a posebice u perifernoj krvi, nalazimo hiposegmentirane oblike granulocita (pseudo Pelger Huët anomalija). Znatno se rjeđe mogu naći i hipersegmentirani oblici, a nalaze se i prstenasti oblici stanica granulopoeze. Citoplazma je obično hipogranulirana, a mogu biti prisutne i pseudo Chediak-Higashi granule.

Kod nekih bolesnika s MDS-om također se nalaze male skupine mijeloblasta i promijelocita (5 – 8 stanica) u biopsiji koštane srži, koje su lokalizirane u njezinu centralnom dijelu i zovu se poremećeno lokalizirani nezreli prekursori (ALIP, engl. *Abnormal Localised Immature Precursors*). Prisutnost triju ili više takvih žarišta smatra se pozitivnim nalazom, a najčešće se nalazi kod bolesnika s RAEB-om. Prisutnost ALIP-a kod RAEB-a i kod drugih podskupina MDS-a povezana je s bržim prelaskom u akutnu leukemiju.

Distrombocitopoeza se manifestira hipolobuliranim mikromegakariocitima, nelobuliranim jezgrama megakariocita svih veličina, kao i multiplim, široko razdvojenim jezgrama. Trombociti su bilo veći, bilo manji od normalnih, a broj im je smanjen.

Mijelofibroza, karakterizirana fokalnim ili generaliziranim porastom broja i debljine retikulinskih vlakana u koštanoj srži, nalazi se u biopsijama kod polovice

bolesnika s MDS-om. Najčešće je to slaba do umjerena mijelofibroza, dok se značajnija fibroza nalazi znatno rjeđe.

1.1.6. Biološke karakteristike MDS-a

Razvoj MDS-a posljedica je višestupanjskoga procesa kojem je polazište u najranijoj progenitorskoj stanici, pluripotentnoj matičnoj stanici (11). Početni poticaj ili mutacija događa se u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) matičnih stanica, što utječe na njihovu diferencijaciju i sazrijevanje. Oštećene stanice postižu proliferaciju, no ona rezultira neproduktivnom hematopoezom. Klonalna priroda MDS-a potvrđena je raznim tehnikama, uključujući kariotipizaciju, istraživanje inaktivacije X kromosoma s glukoza-6-fosfat dehidrogenazom izoenzimom, fluorescentnom *in situ* hibridizacijom, restrikcijski vezanim polimorfizmom i X vezanim DNK polimorfizmom androgenih receptora (HUMARA) (12). Do sada još nije istraženo potječu li iz klonalne stanice, pored mijeloidnih stanica, i stromalne stanice koštane srži, kao i limfoidne stanice. Iako je transformacija u akutnu limfatičnu leukemiju izuzetno rijetka, neka od istraživanja klonalnosti zrelih stanica (13, 14) i nezrelih progenitorskih stanica (15, 16) govore u prilog tomu da je mijeloidno-limfoidna matična stanica glavna meta klonalne transformacije.

Knudsonov model „dva udarca“ omogućuje bazu za koncept višestupanjskoga procesa patogeneze u razvoju MDS-a. Gubitak ili inaktivacija jednog alela rijetko je dovoljna za ekspanziju tumorskoga klona. Gubitak odgovarajućeg alela ili dodatna promjena na njemu neophodna je za razvoj klonalne stanice (17, 18). Ove promjene mogu

utjecati na gene staničnoga ciklusa, čimbenike prepisivanja ili tumor-supresorske gene. Osobito MDS u ranim stadijima bolesti, s relativno sporom progresijom u AML, može predstavljati prototip višestupanjskoga procesa leukemogeneze, s akumulacijom staničnih i molekularnih poremećaja tijekom nastanka i progresije bolesti.

U MDS-u nalazi se širok raspon različitih patoloških promjena, primjerice, strukturne promjene i multiplikacija genetskoga materijala. Treba naglasiti da se standardnim citogenetskim metodama može otkriti svega 50% poremećaja. Epigenetske promjene kao što su metilacija i deacetilizacija histona smatraju se potencijalnim mehanizmima nastanka i razvoja bolesti. Početni genetski poremećaj može nastati pod utjecajem citotoksičnih lijekova, radijacije ili slučajnim endogenim mutacijama. Akumulacija različitih promjena, koje mogu utjecati na kontrolu staničnoga ciklusa i prepisivanje tumor-supresorskih gena, rezultiraju proliferacijom malignog MDS klona, gdje zahvaćene stanice pokazuju povećanu apoptozu u ranim stadijima bolesti. Razvoj bolesti i progresija u AML vjerojatno ne ovise o redoslijedu genetskih promjena, već o promijenjenim genima. Do konačnog koraka leukemijske transformacije može doći promjenom dodatnih gena, uključujući tumor-supresorske gene, i/ili hipermetilacijom kritičnih područja (12).

Treba naglasiti kako sve ove gore navedene promjene dovode do daljnje genomske nestabilnosti, a ona vodi do kliničke progresije, daljnje citogenetske nestabilnosti i transformacije u AML.

Kako se MDS najčešće javlja u starijoj dobi, među početnim su poremećajima endogene promjene vezane uz starenje. Telomere, regije stabilizacije koje se nalaze na kraju eukariotskoga kromosoma, očuvane su enzimom telomerazom koji dodaje tandem

DNK ponavljanja (19, 20). Telomere se skraćuju svakom diobom stanice, ali skraćivanje može biti povećano s brzim bujanjem stanica, kao odgovor na izraženu apoptozu, što se javlja u MDS-u (12, 20). Pojačano djelovanje telomeraze i očuvana dužina telomera nalazi se kod većine karcinoma i hematoloških neoplazmi. Međutim, ubrzano skraćivanje telomera u ranim stadijima MDS-a, nakon kojega slijedi povećana dužina telomera, uzrokovana djelovanjem telomeraze, iziskuje daljnja istraživanja (21).

Mutirani klon podvrgnut je ubrzanoj proliferaciji. Lučenje apoptotskih faktora kao što su TNF-alfa, Fas/Fas ligand te relativni nedostatak hematopoetskih faktora rasta, rezultiraju preranom smrću stanica koštane srži, a razvoj bolesti također je povezan i s oslabljenim imunološkim reakcijama te gubitkom tumor-supresorske aktivnosti.

Iako dolazi do proliferacije klona, poremećena je diferencijacija stanica. Također je dokazano da stanice koštane srži pokazuju poremećaj diferencijacije i u staničnim kulturama (22). Klonalne stanice ne sazrijevaju i diferenciraju se pa većina njih ostaje u koštanoj srži. Kao rezultat toga, bez obzira na njihovu izrazitu proliferaciju, nalazi se citopenija u perifernoj krvi.

Jedan od uzroka tome jest i pojačana **apoptoza** koja doprinosi neučinkovitoj hematopoezi (23). Postoji nekoliko mehanizama vezanih uz apoptozu. Apoptotski signalni put sastoji se od vanjskoga i unutarnjega, pri čemu oba vode do zajedničkog izvršnog puta koji aktivira kaspaze 3, 6 i 7. Početak i izvšenje apoptoze odvija se kaskadnim djelovanjem kaspaza, a kontroliraju ga geni bcl 2 i bcl x, kao i djelovanje citokina. Pojačana apoptoza odvija se u koštanoj srži kod ranih stadija MDS-a, a u kasnijim stadijima (RAEB 2) i kod AML-a, ona je smanjena. Lučenje citokina daje jedno od objašnjenja za ovakvo stajalište o tijeku apoptoze unutar stanica malignoga klona. Unutar

mikrookoliša koštane srži nalazi se povišena razina TNF-alfa i INF-gama. TNF-alfa potiče apoptozu vežući se za TNF receptor I i II (TNFR I i TNFR II) i putem izravnoga vezanja TNFR-a I za TNF receptor vezani protein s domenom smrti (TRADD, engl. *TNF Receptor Associated Protein with Death Domain*), nakon čega slijedi neizravno vezanje s Fas vezanim proteinom s domenom smrti (FADD, engl. *Fas Associated Death Domain*) te dolazi do posljedične aktivacije kaspaza. TNF-alfa može se također vezati s TNFR-om II kojem nedostaje domena smrt, ali se izravno veže s TNF receptor vezanim čimbenikom 2 (TRAF 2, engl. *TNF Associated Factor 2*) aktivirajući NK-kapa B i JNK te na taj način potičući antiapoptotsko djelovanje (24, 25). Omjer ovih receptora određuje stupanj apoptoze, s povišenim TNFR-om I u ranim stadijima bolesti i TNFR-om II u kasnim stadijima bolesti (10). Poremećaji Fas antigena (CD 95) i bcl 2 također igraju ulogu u obimu apoptoze u MDS-u. Fas je transmembranski receptor koji pripada istoj obitelji kao i TNF-alfa receptor i čija stimulacija, nakon vezanja za Fas ligand, slijedi sličan put u apoptotskom djelovanju koji završava aktivacijom kaspaza (26). Fas izražaj pojačan je u ranim stadijima MDS-a, a smanjen u kasnijim stadijima (27). Dok TNF-alfa i Fas potiču apoptozu, bcl 2 i bcl x reguliraju smrt stanica djelujući antiapoptotski (25).

Svi ovi podaci ukazuju da apoptotski signali slabe kako se bolest razvija, dok se antiapoptotski signali pojačavaju. Svakako treba naglasiti ulogu mikrookoliša jer je dokazano da u kulturama stromalnih stanice iz koštane srži bolesnika s MDS-om RA ne dolazi do rasta CD34+ stanica, uzetih iz normalne koštane srži te da one podliježu apoptozi (27).

1.1.7. Citogenetski poremećaji u MDS-u

Iako ne postoji jedinstveni kromosomski poremećaj kod bolesnika s MDS-om, citogenetske studije zauzimaju ključno mjesto pri potvrđivanju dijagnoze MDS-a, kao i predviđanju razvoja bolesti. Najčešće primjenjivana analiza jest konvencionalna kariotipizacija metafaza, dok je FISH metoda osobito korisna kod određivanja -5q sindroma i evaluacije pacijenata nakon transplantacije koštane srži.

Klonalni kromosomski poremećaji dobiveni rutinskim tehnikama kariotipizacije potvrđeni su kod 40 – 70% bolesnika s primarnim MDS-om i 95% bolesnika s MDS-om povezanim s terapijom (t-MDS) (28). Kromosomski poremećaji grupirani prema tipu MDS-a prema klasifikaciji SZO-a iznose 24% u slučaju RA-a, 29% kod RARS-a, 37% kod RCMD-a, 35% kod RAEB-1 te 38%kod RAEB-2. Kod t-MDS-a delecija dijela ili cijeloga kromosoma 5 i/ili 7 iznosi 90% kompletnih kariotipskih poremećaja (29).

Također je dokazano da se kod određene skupine bolesnika, kod kojih se sumnja na MDS, ali nema morfološke displazije, nalaze određene kromosomske abnormalnosti, gdje se nakon određenog perioda praćenja bolesnika dijagnoza bolesti potvrđuje (30).

Kromosomski poremećaji variraju od pojedinačne promjene ili strukturne promjene gena do kompleksnih lezija uključujući tri ili više različitih kromosoma. Pojedinačni kromosomski poremećaji češće se javljaju kod primarnog MDS-a ili u ranim stadijima bolesti, dok se kompleksni poremećaji javljaju nakon progresije bolesti ili MDS-a vezanoga uz terapiju.

Tipičan citogenetski poremećaj delecija je dijela kromosoma ili gubitak kromosoma u cjelini. Kromosomske delecije najčešće uključuju kromosome 5 (del5q-,

-5), 7 (del7q-, -7), 20 (del20q), 11 (del11q) i 17 (del17p). Ostale su kromosomske promjene trisomija 8 te druge nespecifične recipročne translokacije (31, 32).

Delecije kromosoma najčešće uzrokuju gubitak tumor-supresorskih gena. Djelomična ili kompletna delecija kromosoma 5 najčešći je citogenetski poremećaj. Od osobitoga je interesa gubitak regije 5q31-5q33 koja uključuje nekoliko gena koji kodiraju citokine (GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9), FMS gen koji kodira M-CSF receptor i dva gena (IRF1, EGR1) koji su uključeni u prijenos signala i regulaciju transkripcije (33, 34).

Treba naglasiti da je jedino za 5q- sindrom identificiran gen RPS14 za kojeg je dokazano da uzrokuje ovaj tip MDS-a (35).

Delecija kromosoma 7 povezana je s nepovoljnom prognozom, a od posebne je važnosti delecija regije 7q22 koja je važna za popravak DNK. Na kromosomu 7 nalazi se skupina homebox gena koji kodiraju faktore prepisivanja DNK, koji utječu na diferencijaciju i očuvanje funkcije matične hematopoetske stanice (MHS).

Delecija dugog kraka kromosoma 20 predstavlja oko 7% kromosomskih poremećaja u bolesnika s MDS-om i povezana je s dobrom prognozom. Osobito treba naglasiti deleciju gena E2F1 koji se nalazi na kromosomu 20 i ima utjecaj na regulaciju staničnoga ciklusa i proliferaciju stanica. Također treba spomenuti i gen MLL na 11q23, nukleoporin 98kD na 11p15 i AML1 na 21q22 koji igraju važnu ulogu u leukemijskoj transformaciji (36, 37).

Brojni kromosomski poremećaji nalaze se s umjerenom učestalosti javljanja (1 – 10%) u MDS-u, pa zbog njihove niske zastupljenosti njihov utjecaj na prognozu nije dokazan. Tako se pretpostavlja da trisomija 8 povećava rizik od preobrazbe u AML, a da bolesnici s poremećajem kromosoma 1q i 3q21 kraće preživljavaju.

Smatra se da je učestalost kromosomskih poremećaja u MDS-u povezana s genomskom nestabilnošću uzrokovanom nakupljanjem genetskih poremećaja i/ili neuspješnim popravkom genetskih oštećenja (38, 39). Također postoje dokazi da citogenetske promjene ne predstavljaju primarni poremećaj, već su stečene tijekom razvoja bolesti (40).

Iako postoje karakteristčne delecije i numerički poremećaji za MDS, translokacije specifične za MDS rijetke su. Neke su od njih t(3;21) i t(5;12). Kod translokacija t(3;21) dolazi do preuredbe gena AML 1 i MDS 1-EVI-1, gdje se ujedinjuje N terminalni dio AML 1 s malim dijelom MDS1 i dijelom EVI-1. Obje komponente imaju aktivnu ulogu u regulaciji hematopoeze (41). Translokacija t(5;12) dovodi do oblika TEL-PDGFR, ujedinjene tirozin-kinaze i karakteristična je za CMML s eozinofilijom (42).

Standardne citogenetske metode otkrivaju veće promjene na kromosomima, međutim izolirane promjene parova baza, tzv. točkaste mutacije, također utječu na funkciju gena, bilo deaktivacijom ili pojačanjem njihovih funkcija. Otkriće ovih mutacija predstavlja jedno od glavnih područja molekularne patologije MDS-a, s posebnim interesom za tumor-supresorske gene. Do sada su otkrivene točkaste mutacije: p53, N RAS, FLT 3, RUNX1/AML1 i ATRX. Tumor-supresorski gen p53 jedan je od glavnih regulatora staničnoga ciklusa. U bolesnika s primarnim MDS-om nalazi se kod 15% bolesnika, a u bolesnika s t-MDS-om znatno češće (43).

Obitelj Ras protoonkogena kodira gvanozin trifosfat hidrolaze (GTP-aze) koje predstavljaju ključni regulator rasta stanica. U bolesnika s malignim bolestima mijeloidne loze dominira mutacija N-RAS oblika u kodonu 12. U bolesnika s MDS-om učestalost

ove mutacije iznosi 10 – 15%, ali u bolesnika s CMML-om RAS mutacije nalaze se kod 40 – 60% slučajeva (44).

Mutacije receptora FLT3 nalaze se u bolesnika s AML-om, ali rjeđe u onih s MDS-om. Nastajanje N-RAS i FLT3 mutacija povezano je s razvojem bolesti u AML (45). Najčešća točkasta mutacija otkrivena u MDS-u jest RUNX 1. Ona se javlja u 25% bolesnika s ovom bolešću (46).

Također treba spomenuti mutacije u mitohondrijskom genomu, osobito mutacije gena za citokrom-c oksidazu. S obzirom na nalaz prstenastih sideroblasta, kao posljedicu nakupljanja željeza u mitohondrijima, što upućuje na moguće metaboličke poremećaje mitohondrijskih enzima, mitohondriji predstavljaju važno područje za analizu mutacija (47).

Pored strukturnih promjena DNK, i drugi mehanizmi utječu na izražaj gena koji dovode do pojačanja ili gubitka funkcije, uključujući stišavanje gena putem **epigenetskih promjena**. Dvije su najviše istražene promjene DNK metilacija i acetilizacija histona. Oba ova procesa utječu na pakiranje kromatina i stvaranja kompleksa DNK-histon s kojega nije moguće prepisivanje. Rezutat je toga stišavanje gena, bez obzira na nepostojanje mutacije. Iako svaki gen može biti zahvaćen epigenetskim promjenama, kod malignih bolesti to su najčešće: tumor-supresorski geni, geni koji kontroliraju stanični ciklus, smrt, rast i diferencijaciju stanica, kao što su: Fas/Fas ligand, bcl 2, p 53, kaspaze, Bax, p21 WAF1/Cp1 (48).

Metilacija DNK provodi se pomoću metiltransferaza i normalno suprimira ekspresiju prekomjernih genomskih regija. Rep nukleosoma histona je deacitilan kada su geni stišani, što se postiže pomoću histon deacitilaze. One su privučene genomskim

regijama pomoću DNMTs-a i tako dolazi do sjedinjenja između metilacije i deacetilacije u mehanizmima stišavanja gena. Smatra se da poremećeni obrasci metilacije koji uzrokuju gensku nestabilnost mogu biti jedan od uzroka razvoja MDS-a (49). Najbolje je istražen primjer hipermetilacija p15INK4B, tumor-supresorskoga gena i regulatora staničnoga ciklusa koji je vezan s progresijom bolesti u AML. CDK 4 i CDK 6 omogućuju prijelaz stanice iz G1 u S fazu staničnoga ciklusa, dok p15INK4B sprječava progresiju staničnoga ciklusa i inhibira CDK 4 i CDK 6. Hipermetilacija ovoga gena onemogućuje ovu funkciju i vodi do nekontrolirane proliferacije klona. Hipermetilacija p15INK4B nalazi se kod 50% bolesnika s MDS-om. Također se nalazi i hipermetilacija gena za kalcitonin i E-kadherin (50, 51).

Metilacija promotorske regije MMR (engl. *mismach repair genes*) dovodi do poremećene obnove DNK. Prisutna je i demetilacija koja se viđa kod svih tipova karcinoma, koja dovodi do slabljenja prepisivačke represije uobičajeno stišanih (inaktivnih) regija genoma što dovodi do ekspresije umetnutih virusnih gena. Zatim metilacija može zahvatiti i druge strukture osim gena, poput pericentromeričke regije (52).

Mikroskopske genetske promjene koje su otkrivene u novije vrijme metodom izoliranja polimorfnih nukleotida (SNP, engl. *Singl Nucleotide Polimorfism*) doprinijele su objašnjenju heterogenosti MDS-a. Ovom metodom dokazani su poremećaji u DNK unakrsnih gena (DNK *mismatch repair gens*), kao i mitohondrijske genetske nestabilnosti i mikrosatelitne nestabilnosti (41).

Kao i kod ostalih malignih bolesti, i kod razvoja MDS-a prisutan je poremećaj imunološkoga sustava. Najbolji dokaz tomu uspješna je terapija imunosupresivnim i

imunomodulirajućim lijekovima. Epidemiološke studije pokazuju čestu povezanost s autoimunim bolestima. Nalazi potvrđuju da 10 – 20% bolesnika s MDS-om boluje i od autoimunih bolesti. Promjene se nalaze i na T- i na B-limfocitima (53).

1.1.8. Prognoza

MDS maligna je bolest sporoga tijeka. Bolesnici s ranijim stadijima bolesti preživljavaju šest godina, no u slučaju da je bolest otkrivena u kasnijem stadiju bolesti, preživljenje je znatno kraće i iznosi približno šest mjeseci. MDS vezan uz terapiju najčešće se javlja kao bolest visokoga rizika koja se najčešće razvije u AML i povezana je s lošom prognozom, neovisno o terapiji.

Kako bi se odredio numerički sustav koji pouzdano određuje preživljenje i rizik od transformacije u AML, za bolesnike oboljele od MDS-a osmišljen je 1997. godine internacionalni prognostički numerički sustav IPSS (engl. *International Prognostic Scoring System*) (54). On se temelji na prethodno publiciranim analizama rezultata sedam velikih skupina, a kombinira morfološke i kliničke podatke te rezultate dobivene citogenetskim analizama. IPSS skor (zbroj) zasniva se na postotku blasta u koštanoj srži, kromosomskom poremećaju u vrijeme dijagnosticiranja bolesti i broju citopenijom zahvaćenih loza.

Kariotip se obilježava kao „dobar“ ako je: uredan, -Y, del(5q) i del (20); „srednjim“ kariotipom smatra se onaj s ostalim citogenetskim poremećajima, dok se kompleksni kromosomski poremećaji (tri ili više poremećaja te poremećaj kromosoma 7) označava kao „loš“ kariotip.

Tako su prema riziku rezultati podijeljeni u četiri skupine: skupinu niskoga rizika (skor 0), prvu skupinu srednjega rizika Int-1 (od engl. *intermediet*) (skor 0,5 do 1,0), drugu skupinu srednjega rizika Int-2 (skor 1,5 do 2,0) i skupinu visokoga rizika (skor 2,5 ili više). Medijan preživljenja zasnovan na ovom numeričkom sustavu kreće se u rasponu od 6 godina, za bolesnike s IPSS-om niskoga rizika, do manje od 5 mjeseci za bolesnike s IPSS-om visokoga rizika.

U studiji koja je prvi put upotrijebila IPSS za određivanje prognoze 70% bolesnika ubrajalo se u skupine niskoga i prvu skupinu srednjega rizika, a 30% bolesnika ubrajalo se u drugu skupinu srednjega rizika i skupinu viskoga rizika. Bolesnici u skupini niskoga rizika većinom su imali dijagnosticiran RA i RARS, bolesnici s Int-1 prvom skupinom srednjega rizika bili su podjednako zastupljeni u svim tipovima MDS-a, a bolesnici u drugoj skupini srednjega i visokoga rizika imali su većinom RAEB i CMML (55).

Pokazalo se da je za optimalan terapijski pristup potrebno unaprijediti IPSS. Tako je u postupku stvaranja WPSS-a (engl. *WHO Classification Based Prognostic Scoring System*), koji promatra zbroj loza zahvaćenih citopenijom i jačinu izraženosti citopenije (granična je vrijednost trombocita 100 000/μL i apsolutna vrijednost neutrofila 1800/μL).

Analizirajući podatke bolesnika s RA-om i RARS-om, boljima su se pokazale prognostičke mogućnosti u kombinaciji s podacima o displaziji loza (jesu li one pojedinačne ili multiple, kao što klasificira SZO), u odnosu samo na IPSS. Pokazano je da je veći poremećaj kariotipa kombiniran s multilinijskom displazijom i lošijom prognozom. WPSS također obuhvaća ovisnost o transfuzijama, za koje se pokazalo da imaju prognostičko značenje (56).

Za razliku od podataka dobivenih prema klasifikaciji SZO-a, dob u trenutku postavljanja dijagnoze smatra se važnom za prognozu preživljenja kod bolesnika niskoga rizika i prve skupine srednjega rizika Int1, ali ne i kod bolesnika druge skupine srednjega rizika Int-2 i visokoga rizika. Preživljenje je kraće kod bolesnika starijih od 60 godina u skupini niskoga rizika od mlađih bolesnika iz iste skupine. U svakom slučaju dob ne utječe na razdoblje do transformacije u AML (56).

1.2. Hematopoeza i mikrookoliš

1.2.1. Utjecaj mikrookoliša na matičnu hematopoetsku stanicu

Hematopoeza se odvija kod odraslih osoba, pod normalnim uvjetima, unutar mikrookoliša koštane srži. Rijetka populacija pluripotentnih matičnih hematopoetskih stanica programirana je za samoobnovu i proliferaciju ili diferencijaciju u progenitorske stanice mijelo- i limfo- loze.

Preživljenje, mirovanje, proliferacija, diferencijacija, migracija, specifičan izražaj gena, reprogramiranje i smrt hematopoetskih stanica i njihovih progenitora, kontrolirano je vanjskim djelovanjem, koje omogućuju mikrookolišni odjeljci (niše) u kojima se te stanice nalaze (57).

Važnu ulogu u otkrivanju utjecaja mikrookoliša na matičnu hematopoetsku stanicu (MHS) otkrila je identifikacija gena koji kodira faktor matičnih hematopoetskih stanica (engl. *stem cell faktor*, SCF), također poznat i kao KIT ligand. On dovodi do promjena u matičnim hematopoetskim nišama i tako vodi do manjkavosti MHS-a (58).

Niše MHS-a definiraju se prostornim strukturama u kojima matične stanice prebivaju i održavaju se omogućujući njihovo samoobnavljanje u nedostatku njihove diferencijacije. Brojne studije ukazuju da se matične stanice, uključujući i MHS, rijetko dijele i mogu mirovati tjednima ili mjesecima (59, 60). Mirujuće MHS obično ne doprinose normalnoj homeostazi hematopetskoga sustava, već vjerojatno služe kao rezervno spremište stanica koje se mogu aktivirati ovisno o stresu ili povredi. Nakon djelovanja mijeloidnih reagensa dolazi do njihove aktivacije, ulaska u stanični ciklus, kako bi uspostavile normalnu hematopoezu, ali nakon njene normalizacije ponovo se vraćaju u svoje niše gdje prelaze u mirujuće stanje (61). Do sada se ne zna je li funkcija niša matičnih stanica (spremanje mirujućih stanica MHS, njihovo samoobnavljanje i inhibicija diferencijacije) omogućena samo u jednoj vrsti niša ili postoji više tipova niša. Osnovna funkcija samoobnavljajućih niša bila bi mogućnost da bilo okolišnom, bilo diobenom asimetrijom, omoguće da jedna od dviju stanica kćeri MHS-a održava sudbinu matične stanice, a druga proizvodi diferencirane progenitorske stanice (62). Pretpostavlja se da se mirujuće MHS nalaze u središtu niša, dok se samoobnavljajuće matične stanice nalaze periferno uz granicu niša, odvajajući ih od ostalog okoliša, koji signalima može dovesti do diferencijacije ili dijeljenja stanica. Pojam niša specifičnih za okoliš koštane srži MHS-a prvi je opisao Schofield koji je prepostavio da je MHS u bliskom kontaktu s kosti i da je međustanični kontakt odgovoran za neograničenu proliferativnu aktivnost i inhibiciju maturacije MHS-a (63). Nedavne su studije dokazale da osteoblasti i osteoklasti sudjeluju u formiranju mikrookoliša i niša koštane srži (64). Lokalizacija MHS-a u blizini kosti prvi je put dokazana 1975. godine (65). Morfološke studije dokazale su da se MHS i hematopoetske progenitorske stanice nalaze u blizini endostealne linije, dok se

diferenciranije stanice hematopoeze više nalaze u centralnom dijelu koštane srži (66). Tako se može reći da se MHS nalaze u blizini koštane površine, podržavajući koncept o endostealnim nišama. Potvrda su toga i citokini koje luče osteoblast, a potiču proliferaciju MHS-a (67). Specijalizirani vretenasti N-kadherin izražavajući osteoblasti locirani u endosteumu čine osnovnu komponentu odjeljka MHS-a. Također bitnu ulogu imaju i osteoklasti, stromalni fibroblasti i endotelne stanice koje doprinose formiranju odjeljaka te njihovoj arhitekturi i aktivnosti.

Stromu koštane srži čine mreže sinusa sačinjavajući trilaminarni zid koji se sastoji od endotelnih stanica, nerazvijene bazalne membrane i adventicijskih retikularnih stanica, koje čine fibroblasti. Nedavno su dokazane specijalizirane vaskulare niše koštane srži, mjesta gdje se veliki postotak CD150+ MHS nalazi vezan za fenestrirani endotel sinusoida koštane srži (66).

Pokazalo se da stanične linije pročišćenih primarnih endotelnih stanica potiču očuvanje i klonalnu ekspresiju MHS-a.

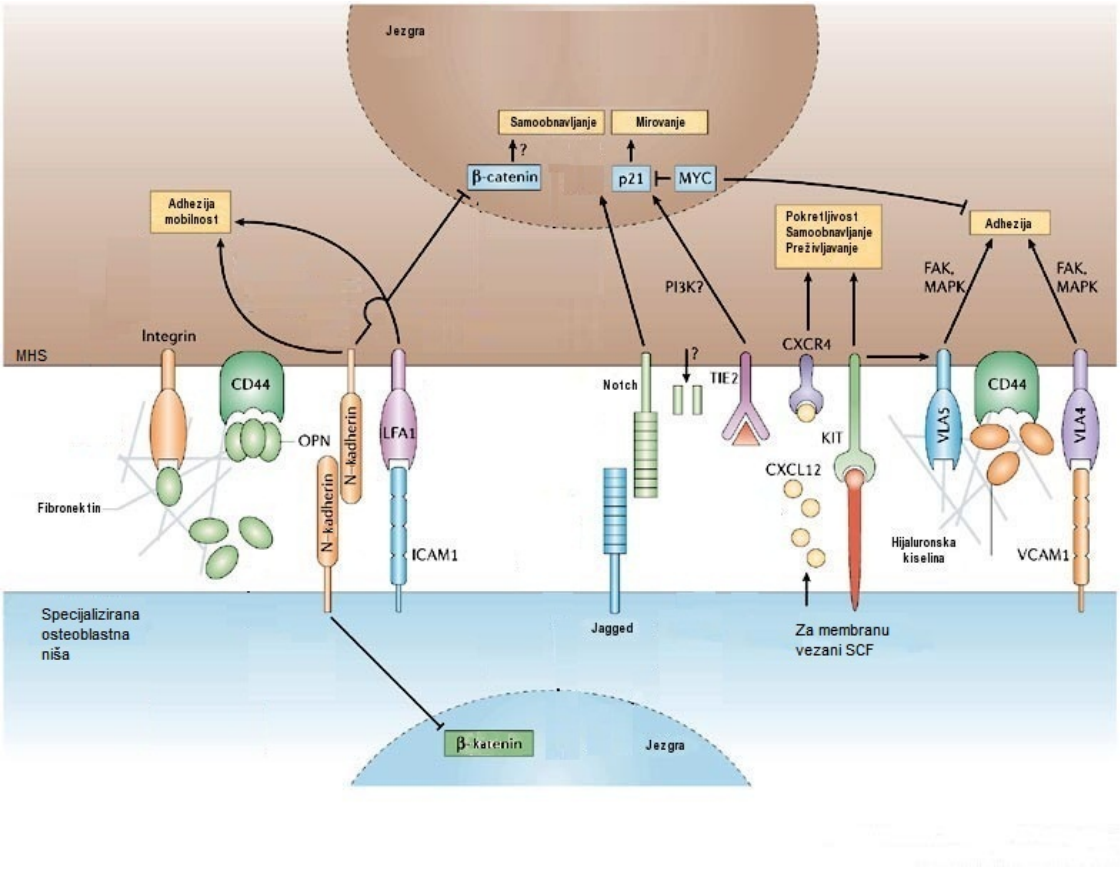
Mezenhimalne stanice koje formiraju stromu u koštanoj srži imaju aktivnu ulogu u stvaranju podloge za proteine ekstracelularnog matriksa kao što su: proteoglikani ili glikozaminoglikani, fibronektin, laminin, tenascin, kolagen, hemonektin i trombospondin. Odnos MHS-a i mezenhimalnih stanica ekstracelularnog matriksa omogućen je adhezivnim reakcijama koje se odvijaju lokalnim signalima malih molekula kemokina i citokina. Tako se stvaraju niše u kojima je omogućeno mirovanje, razvoj i diferencijacija MHS-a.

Iako je MHS lociran u koštanoj srži, pokazuje značajnu pokretljivost. Može napustiti ili vratiti se u mikrookolišne niše koštane srži procesima koji se nazivaju

mobilizacija i udomljenje. Masivna mobilizacija događa se u slučajevima povrede koštane srži, tretmanima ciklofosfamidom i granulocitnim faktorima rasta (G-CSF, engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Do toga dolazi oslobađanjem proteaza neutrofila što dovodi do razgradnje adhezivnih veza, kao što su veze za membranu vezanih molekula: SCF, VCAM1 i CXCL12 (68).

Udomljenje *(homing)* se događa ponovnim sakupljanjem cirkulirajućih MHS-a u mikrovaskulaturu i posljedično u ekstravaskularne dijelove koštane srži. Adhezivne molekule, posebice selektini i integrini ključni su za udomljenje MHS-a u koštane odjeljke (69, 70). Iako je udomljenje neselektivan proces, smještaj u niše koštane srži visokospecifična je odlika MHS-a.

Glavni čimbenik uključen u migraciju, zadržavanje i mobilizaciju jest CXCL12 koji se nalazi na više tipova stromalnih stanica uključujući osteoblaste i vaskularne endotelne stanice (71, 72). Biološki efekt CXCL12 karakteriziran je sposobnošću da potiče mobilnost, kemotaksiju i adheziju, kao i sekreciju matriks metaloproteinaza (MMP) i angiogenih faktora, kao što su vaskularni faktor rasta i CX kemokin-receptor 4 (CXCR4). Genetske i funkcionalne studije pokazuju da je put CXCL12-CXCR 4 među glavnima za održavanje MHS-a.



Slika 1. Model veze MHS-a i endostealne niše
CXCL12 – ligand kemokina 12 (engl. *Chemokine Ligand* 12); CXCR4 – receptor kemokina 4, FAK – fokalna adhezijska kinaza (engl. *Focal Adhesion Kinase*); ICAM1 – međustanična adhezijska molekula 1 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1*); MAPK – mitogen aktivirajuća proteinska kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*); MHS – matična hematopoetska stanica; OPN – osteopontin; PI3K – fosfatidil inozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatydil Inositol-3 Kinase*); SCF – čimbenik matičnih stanica (engl. *Stem Cell Factor*); TIE2 – receptor tirozin-kinaze 2 (engl. *Tirosin Kinase Receptor* 2); VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula (engl. *Vascular Cell-Adhesion Molecule*); VLA4 –vrlo kasni antigen (engl. *Very Late Antigen*)

.

2.2.1. Molekularne interakcije (*cross talk*) u endostealnoj niši

Iako je malo toga poznato o izmjeni signala između MHS-a i osteoblasta u endostealnom odjeljku, dokazano je nekoliko receptora, proteina vezanih za membranu i topivih faktora, koji se nalaze na oba tipa stanica. Dokazano je da različiti interleukini, onkostatin M, cilijarni neutrofilni faktor i membranski protein mKirre imaju ulogu u ovoj interakciji. Međutim, najpoznatije molekule koje utječu na regulaciju fukcije MHS-a i endosteuma jesu Notch receptor i Notch receptor ligand (73), koji reguliraju i samoobnavljanje i klonalnu proliferaciju MHS-a. Smatra se da Notch 1 i ligand Jagged 1 imaju stimulirajuće djelovanje na MHS jer postoji njihova hiperregulacija na osteoblastima, stoga se smatra da je porast MHS-a uzrokovan Notch signalima (74).

Osteoblasti također mogu regulirati broj MHS-a putem djelovanja osteopontina, kiseloga glikoproteina u matriksu kosti. On ima negativan učniak na broj MHS-a zbog apoptoze do koje dovodi.

Za membranu vezani SCF veže i aktivira Kit ligand koji se nalazi na MHS-u. Put između SCF-a i Kita utječe na aktivnost matičnih hematopoetskih stanica smještenih u endostealnim odjeljcima. SCF vezan za memebranu ima važnu ulogu u adheziji MHS-a i progenitorskih hematopoetskih stanica za stromalne stanice (75).

Aktivirani VLA 4 i VLA 5 mogu utjecati na adhezijske osobine u endostealnim nišama modificirajući funkcionalno stanje specifičnih integrina (76). VLA 5 uključen je u regulaciju adhezije stanica kao i migracije između stromalnih stanica, dok je VLA 4 potreban za brzinu migracije. Interakcija VLA 4/VCAM-1 pokazala se kao jedna od glavnih u *homingu* i mobilizaciji stanica hematopoeze. Još je nepoznato djeluje li SCF vezan za membranu izravno (održavajući izražaj Kit liganda na MHS) ili neizravno

(održavajući stanje u endostealnim odjeljcima). Također je važna uloga N-kadherina koji utječe na vezivanje MHS-a i SNO-a u endostealnom odjeljku. N-kadherin nalazi se i na osteoblastima i na MHS-u, na kojem se nalazi asimetrično, na onoj strani na kojoj se MHS veže za osteoblast. MYC i receptor tirozin-kinaze 2 (TIE 2) daju inhibitornu potporu kontrolirajući izražaj N-kadherina na MHS utičući na zaustavljanje MHS-a u odjeljku. Mirovanje MHS-a putem TIE 2 potencijalno je uzrokovano pozitivnom regulacijom inhibitora ciklina ovisne kinaze p21. MHS pokazuje jak izražaj p21. Pojačana aktivnost MYC-a u MHS-u smanjuje izražaj N-kadherina. Smatra se da omjer između samoobnavljanja i diferencijacije MHS-a može biti ovisan o aktivnosti MYC-a koji omogućuje zadržavanje ili izlazak MHS-a (77).

1.2.3. Mikrookoliš koštane srži i MDS

Poremećaji u mikrookolišu koštane srži dominiraju u ranim stadijima MDS-a, ali također imaju ulogu i u kasnim stadijima i u AML-u. Jedno je od neistraženih područja i odgovor na pitanje imaju li mezenhimalne stromalne stanice (MSS) iste citogenetske poremećaje kao i stanice neoplastičnoga klona, gdje su dobiveni kontradiktorni rezultati (78). Dokazano je da fibroblasti i makrofagi, dobiveni iz koštane srži bolesnika s MDS-om, pokazuju poremećenu ekspresiju interleukina 1-beta, kao i povećan apoptotski indeks. Također se nalazi povećana proizvodnja IL-6 i tumorskog čimbenika nekroze alfa (TNF-alfa) (79). Najnovija istraživanja pokazuju da u ranim stadijima MDS-a TNF-alfa može utjecati na displastični klon izravnim kontaktom s TNF-receptorima na stromalnim

stanicama (80). Također TNF potiče ekspresiju IL 32 glasničke RNK koja pojačava izražaj različitih proupalnih gena.

Promatrajući stromalne niše, pokazalo se da postoje značajni, ali različiti nedostaci u njihovoj unutrašnjosti (81). Također treba naglasiti i specifičnost MDS-a, gdje se u koštanoj srži ne nalaze samo stanice neoplastičnog klona, već i normalne MHS. Postoji određena kompeticija između ovih stanica za njihov smještaj u funkcionalne niše. U slučaju da je klonalna matična hematopoetska stanica bolje prilagođena za boravak u nišama, to direktno može utjecati na broj normalnih MHS-a. Na njihov broj može utjecati i promjena u ravnoteži između simetrične i asimetrične diobe.

Kod MDS-a, kao i kod AML-a, na mikrookoliš značajno utječu angiogeni faktori i matriks metaliproteinaze (MMP), koje uspostavljaju mikrovaskularnu gustoću. Vaskularni faktor rasta (VEGF, engl. *Vascular Edothelial Growth Factor*) može utjecati na odvajanje TNF-alfe vezanog za membranu i Fas liganda od stanica putem metaloproteinaza, što posljedično uzrokuje porast upalnih citokina (82). Nedavne su studije također pokazale da stromalne stanice potiču ekspresiju MMP-9 u monocitima. Ekspresija MMP-9 značajno se razlikuje unutar skupina MDS-a, ovisno o celularnosti koštane srži i citogenetskim poremećajima (83).

1.3. Ekstracelularni matriks

Stanice rastu, kreću se i diferenciraju u bliskom kontaktu s izvanstaničnom potkom. Postoje mnogi dokazi kako izvanstanična potka značajno utječe na ove stanične funkcije. Molekule izvanstanične potke luče se lokalno i sakupljaju u mrežu u prostoru

koji okružuje stanice. Ona čini značajan postotak volumena svakoga tkiva i sastoji se od makromolekula izvan stanica. Izvanstanična potka ima mnoge uloge. Ona čini tonus mekih tkiva i čvrstoću koštanoga tkiva te osigurava rezervoar čimbenika rasta koji utječu na proliferaciju stanica. Izvanstanična potka osigurava podlogu za stanice i mogućnost da se one vežu, kreću i rastu, kao što i izravno utječe na oblik i funkciju stanica (84). Razaranje izvanstanične potke prati morfogenezu i obnavljanje tkiva, kao i tumorsku invaziju i metastaziranje.

Tri osnovne skupine makromolekula čine izvanstaničnu potku:

1. fibrozno strukturirani proteini kao što su kolagen i elastin
2. različite skupine adhezivnih glikoproteina, uključujući fibronektin i laminin
3. gel od proteoglikana i hijaluronata.

Ove skupine makromolekula sakupljaju se u dvije glavne organizirane jedinice: intersticijski matriks i bazalne membrane. Intersticijski matriks prisutan je među epitelnim, endotelnim stanicama te stanicama mišićnoga i vezivnoga tkiva. Sastoji se od vlaknastoga (tip I, III i V) i nefibrilarnoga kolagena, elastina, proteoglikana hijaluronata, tenascina, trombospondina, hemonektina i ostalih komponenata. Bazalna se membrana proizvodi iz epitelnih i mezenhimalnih stanica i usko je povezana sa staničnom površinom. Sastoji se od mreže nefibrilarnoga kolagena (tip IV), laminina, proteoglikana, heparan-sulfata i drugih glikoproteina.

1.3.1. Kolagen

U mikrookolišu koštane srži nalazi se kolagen tipa I i tipa III koji čine zidove mikrovaskulature, dok je kolagen tipa IV sastavni dio bazalne membrane ispod endotelnih stanica (85). U *in vitro* studijama dokazano je da inhibicija kolagena smanjuje hematopoezu, što govori u prilog važnosti neoštećene podloge unutar izvanstanične potke u hematopoetskom mikrookolišu..

Fibroblasti iz koštane srži i stromalne stanice sintetiziraju kolagen tipa I, III, IV, V i VI. Kolagen tipa VI djeluje kao jaka adhezivna komponenta u mikrookolišu. Kolagen tipa XIV potiče adheziju mijelo- i limfoidnih stanica. Također postoje dokazi da se kolagen tipa I i IV, zajedno s fibronektinom, lokalizira uz endosteum.

1.3.2. Fibronektin

Fibronektin je jedan od glavnih elemenata koštane srži, a nalazi se i u topivom obliku u plazmi. To je glikoprotein koji se sastoji od dviju sličnih podjedinica vezanih disulfidnim vezom. S obzirom na izrezivanje gena, nalazi se u brojnim izooblicima.

U koštanoj srži lokaliziran je na veznom mjestu hematopoetskih stanica i stromalnih stanica. Eritroidni progenitori vežu se za mjesto staničnoga vezivanja na fibronektinu. Adhezija progenitorskih stanica hematopoeze za stromu koštane srži dijelom je regulirana fibronektiom. To je vezivanje pojačano aktivatorima proteinske kinaze C, što govori u prilog uloge integrinskih receptora u ovome procesu.

Samo unutar mikrookoliša koštane srži nalazi se oblik fibronektina tip III, s vezujućim segmentom IIICS (engl. *connecting segment*) (86). On se veže integrinskim receptorom α4β1 na MHS.

Adhezija fibronektina za peptidne domene kao što su CS1 domena (koja aktivira α4 integrin) ili stomalne stanice ima dvostruku ulogu. Naime, to vezivanje može dovesti i do inhibicije i do stimulacije rasta progenitorskih hematopoetskih stanica. Integrin VLA-4 (engl. *Very Late Antigen 4*), VLA-5, kao i molekula CD44 također sudjeluju u promoviranju adhezijske reakcije putem fibronektina. Citokini kao što su IL-3 i KIT ligand, kao i troponin pojačavaju djelovanje fibronektina, osobito adheziju i migraciju stanica. Uloga fibronektina dokazana je djelovanjem na progenitorske stanice, ali i na zrele megakariocite, monocite, aktivirane T-limfocite, neutrofile i eozinofile. Također treba spomenuti da je potreban za aktivaciju želatinaza u makrofagima (87).

1.3.3. Laminin

Skupinu laminina čine glikoproteini koji se sastoje od triju disulfidno povezanih jedinica – alfe, bete i game – i predstavljaju jedan od glavnih sastavnih dijelova bazalne membrane i izvanstaničnoga matriksa. Do sada je izolirano pet α, tri β i tri γ lanca koji u kombinaciji čine najmanje dvanaest oblika laminina (88). Oblici laminina specifični su za tkiva i razvojne stadije što govori u prilog njihovoj funkcionalnoj različitosti.

Laminini su uključeni u mnoge biološke funkcije uključujući staničnu adheziju i migraciju, kao i kontrolu proliferacije. Vežu se za stanične receptore, osobito za obitelj integrina α1β1, α2β1, α3 β1, α6β1, α6β4 i α7β1 (89).

Uloga laminina u hematopoezi vezana je za međudjelovanje s kolagenom tipa IV i sastavnim dijelovima bazalne membrane, što utječe na kemotaksijsku sposobnost leukocita. Također CD 34+ granulocitni progenitori, zreli monociti i neutrofili vežu se za laminin. Njegova je uloga pojačavanje adhezijskih reakcija s integrinskim receptorima α5β1(VLA-5) i α6β1 (VLA-6) na hematopoetskim stanicama. VLA-6 pomaže kod adhezije monocita, a glikoprotein krvne grupe Lutheran služi kao receptor za laminin na stanicama eritro- loze (90).

U koštanoj srži nije prisutan laminin 1(α1 β1 γ1), već laminin 2 (α2 β1 γ1), laminin 8 (α4 β1 γ1) i laminin 10 (α5 β1 γ1). Stromalne stanice i CD34+ stanice pokazuju izraženiji β2 laminin (87)

1.3.4. Tenascin

Tenascin je član obitelji glikoproteina izvanstanične potke koji čine tenascin C, tenascin R i tenascin X. Tenascin C nalazi se na površini stromalnih stanica koštane srži te se poput fibronektina i kolagena tipa i nalazi u mikrookolišu koji djeluje na sazrijevanje matičnih hematopoetskih stanica (87).

1.3.5. Hemonektin

Hemonektin je 60 kDa dug glikoprotein koji utječe na vezivanje granulocita za koštanu srž, ali njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena (87).

1.3.6. Trombospondin

Trombospondin je 450 kDa dug multifunkcionalni protein izvanstaničnoga matriksa, koji je prvotno otkriven u alfa-granulama trombocita. Trombospondin sadrži domene koje međusobno djeluju s fibronektinom i kolagenom (87).

1.4. CD 44

Obitelj CD 44 adhezivnih molekula čini skupina visoko glikoliziranih proteina koji su kodirani genom na 11p13 kromosomu (91). Različiti oblici ovih glikoproteina nalaze se na mnogim staničnim tipovima gdje su uključeni u brojne biološke procese.

Gen koji kodira CD44 ima deset standardnih eksona koji se nalaze u svim oblicima CD44. Kod deset ostalih eksona došlo je do različitog izrezivanja. Ova druga skupina eksona ubraja se u skupinu v1 do v10 koja odgovara lokalizaciji između 6. i 15. eksona. Ekson v1 (ekson 6) sadržava stop-kodon. U stanicama 12 od 20 eksona podliježu alternativnom izrezivanju za proizvodnju najmanje 18 transkripata (92).

Standardna molekula (CD44H) koja ne sadrži varijabilne regije sastoji se od 341 aminokiseline (AK) transmembranskih proteina molekularne dužine 37-38 kDa. Ona se sastoji od izvanstanične domene od 248 AK, transmembranske domene od 21 AK i citoplazmatske domene od 72 AK (93). Oblici s većom molekularnom težinom imaju dužu izvanstaničnu domenu.

Najvažniji je ligand molekule CD44 hijaluronat, a 90 relativno hidrofobnih rezidua sadrže aminoterminalni dio koji služi kao vezivno mjesto za glikozaminoglikane odnosno

hijaluronat. Proksimalni dio membranskoga dijela CD44 sadrži serin i treonin koji mogu služiti za O-glikozilaciju i imati funkciju vezanja za hondroitin-sulfat i heparan-sulfat (94).

Varijacije u posttranslacijskim oblicima CD44 mogu dovesti do specifičnih oblika za pojedine stanice i obično imaju veću molekularnu težinu (95). Citoplazmatski dio CD 44 sadrži šest serin rezidua koje podliježu fosforilaciji.

U plazmi zdravih osoba također se nalazi i topivi oblik CD44 .Glavni je ligand CD 44 hijaluronat, ali ova se molekula može vezati i s kolagenom tipa I i VI, fibronektinom, lamininom, adresinom, hondroitin-sulfatom, heparan-sulfatom, osteopontinom te sama za sebe.

U hematopoezi CD 44 nalazimo na svim zrelim oblicima u krvi. U koštanoj se srži također nalazi na hematopoetskim progenitorskim stanicama. Dokazano je kako se njegov izražaj smanjuje s diferencijacijom stanica (95). Iako je glavni put vezanja progenitorskih stanica za CD 44 putem hijaluronata, postoje i drugi vezivni putevi koji također igraju ulogu u adheziji stanica.

Dokazan je promijenjen izražaj molekule CD 44 i u akutnoj i u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji. Osobito je važan tip CD44v6 koji se smatra lošim prognostičkim znakom, a pojačan je i izražaj varijanti v3 i v9.

1.5. Trombocitna adhezijska endotelna molekula (engl. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) (PECAM) (CD31)

PECAM 1 član je imunoglobulinske (Ig) obitelji koji ima osobine imunoreceptora i sadrži unutarnji imunoreceptorski tirozinski inhibicijski motiv (ITIM), stoga pripada podskupini Ig-ITIM obitelji imunoglobulina. Dug je 115-140 kDa, tipa integralnog membranskog proteina koji sadrži 711 aminokiselinu od kojih 574 formiraju izvanstaničnu regiju koja se sastoji od šest disulfidno vezanih IgC2 domena i 118 citoplazmatskih domena koje sadrže ITIM motiv (96). Nalazi se u ljudskim trombocitoma, leukocitima, na mjestu lateralnih veza endotelnih stanica, makrofagima i na CD34+ hematopoetskim progenitorskim stanicama u svim stadijima razvoja (96). Ne nalazi se na fibroblastima, epitelnim stanicama i eritrocitima. Gen za molekulu CD31 nalazi se na 17q23 kromosomu i sadrži 16 eksona koji čine 75 kb DNK, kao i eksone koji su odvojeni intronima od 86 do 12 kb dužine. Postoji nekoliko izooblika ljudske molekule CD31 koji su nastali izrezivanjem eksona 9, 13 i 14, od kojih jedan kodira topivi oblik kojemu nedostaje transmembranska domena.

Biološko djelovanje PECAM 1 molekule brojno je i uključuje: regulaciju adhezije putem integrina, transendotelne migracije, angiogenezu, apoptozu, staničnu migraciju, autoimune rekcije, ulogu u fagocitozi makrofaga i IgE posredovanoj anafilaksiji te u trombozi.

Njegova ekspresija na površini stanica regulirana je mehanizmima ovisnima o matriks metaloproteinazama i dijeljenjem receptora pomoću kaspaza (96).

Kao član Ig-ITIM obitelji, PECAM 1 djeluje kao inhibicijski receptor. Za međustanični kontakt bitna je mogućnost homofilnog vezanja PECAM 1 molekule koje se odvija putem C1 domene. U tkivima hematopoeze ova molekula može biti uključena u formiranje stromalnoga odjeljka omogućujući interakciju s matičnim hematopoetskim stanicama.

Istaživanja također pokazuju njegovu ulogu kod adhezije matičnih progenitorskih stanica pomoću svojstva poticanja adhezije preko beta-1 integrina (97).

1.6. APC (*Adenomatosis Polyposis Colli*)

Mutacije u APC (engl. *Adenomatosis Polyposis Colli*) genu smatraju se odgovornima za nastanak obiteljske polipoze i sporadičnoga kolorektalnog karcinoma. APC gen nalazi se na 5q 21-22 lokusu. Dokazano je da većini intersinalnih tumora nedostaje izražaj pune dužine APC proteina.

APC protein uključen je u brojne stanične procese, u prilog čemu govore i brojna vezivna mjesta za različite molekule na tome proteinu. Dio je Wnt signalnoga puta. Izravno je vezan za citoskelet i igra ulogu u migraciji epitelnih stanica, a također se smatra da ima ulogu u progresiji staničnoga ciklusa.

APC protein u direktnoj je interakciji s beta-kateninom (98), potrebnoj za razgradnju beta-katenina putem proteosoma. APC omogućuje vezu između beta-katenina i enzima potrebnih za vezivanje beta-katenina i proteosoma. Nedostatak APC proteina može poremetiti njegovu razgradnju pa koncentracija slobodnog beta-katenina može porasti i dovesti do neodgovarajućeg prepisivanja gena kao što je c-myc.

Također se smatra da APC ima ulogu u staničnoj migraciji i adheziji molekula. APC protein uključen je u stabilizaciju mikrotubula u posebnim dijelovima stanica, stvarajući tako stabilne stanične protruzije koje dovode do migracije stanica. S druge strane, njegova veza s beta-kateninom ovoga gena dovodi do pojačane adhezije i porasta E-kadherina. Prekomjerna ekspresija E-kadherina u stanici ne utječe samo na migraciju, već i na proliferaciju i apoptozu stanica (99).

APC protein ima i izravnu ulogu u proliferaciji i apoptozi stanica jer ima vezno mjesto za kinazu ovisnu o ciklinu (CDK, engl. *Cyclin Dependent Kinase*) kojoj predstavlja supstrat. Prekomjerna ekspresija APC gena dovodi do smanjene aktivnosti kompleksa ciklin-CDK (100).

Uloga u migraciji stanica smatra se važnom u ranoj fazi nastanka karcinoma, dok se djelovanje na regulaciju beta-katenina smatra važnim za kasniji razvoj kolorektalnoga karcinoma.

2. Ciljevi rada

Ciljevi rada bili su:

1. Određivanje međusobne povezanosti hematopoetskih stanica i izvanstanične potke (matriksa) odnosno mikrookoliša kod MDS-a. U tu je svrhu studirano sljedeće:

- CD44, glikoprotein važan za međustanični odnos te odnos stanica prema ekstracelularnomu matriksu
- CD31 (PECAM-1) koji je važan u adheziji i prijenosu signala
- fibronektin i laminin, proteini važni u strukturi i funkciji ekstracelularnoga matriksa
- APC, protein čiji se gen smatra tumor-supresorskim genom i lokaliziran je na kromosomu 5, koji ima kompleksnu ulogu u prijenosu signala.

2. Uspoređivanje uočenih promjena s karakterističnim morfološkim promjenama hematopeze kod MDS-a:

a) dishematopoezom

b) ALIP-om

c) osteoblastima, osteoklastima, limfatičkim nodulima i mastocitima

d) karakterističnim laboratorijskim promjenama kod MDS-a (sedimentacija, broj leukocita, eritrocita i trombocita, hemoglobin, vrijednosti LDH, alkalne fosfataze i ukupnih proteina te prisutnosti blasta u razmazima periferne krvi).

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 50 bolesnika s postavljenom dijagnozom MDS-a koji su dijagnosticirani u KB „Merkuru“ i KB „Dubravi“. Dijagnoza MDS-a postavljena je prema kriterijima FAB-ove klasifikacije (1). Također je postavljena dijagnoza prema kriterijima klasifikacije SZO-a (4).

3.2. METODE

3.2.1. Morfološka analiza

Izvršena je analiza morfoloških karakteristika u histološkim rezovima obrađenim Hemalaun & eozin (H&E), Giemsa, PAS, Mallory i Gomorii metodom. Također je izvršena analiza na citološkim razmazima punktata koštane srži obojenim po May Grünvald Giemsa (MGG) metodi. U razmazima punktata koštane srži određeno je nehemoglobinsko željezo berlinskim modrilom. Prema kriterijima FAB-ove klasifikacije uzorci su klasificirani kao MDS, s podskupinama RA, RARS, RAEB, RAEB- t i CMML, odnosno RA, RCMD, RARS, RAEB-1, RAEB-2, MDS/MPS i AML prema klasifikaciji SZO-a.

U histološkim rezovima promatrana je prisutnost/odsutnost dieritrocitopoeze, disgranulocitopoeze i distrombocitopoeze.

Također je promatrana prisutnost/odsutnost ALIP-a, mastocita i fibroze.

Analizirana je prisutnost/odsutnost sklerozacije kosti, kao i osteoblasta i osteoklasta.

Određivana je celularnost koštane srži sa sljedećom podjelom:

- normocelularna
- hipercelularna
- hipocelularna.

3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje

Određivanje proteinske izraženosti fibronektina, laminina, PECAM (CD 31), CD 44 i molekule APC učinjeno je imunohistokemijskom metodom primarnim protutijelima za:

- fibronektin (DAKO, zečji A 245) uz razrjeđenje 1 : 6, blokirajući protein DAKO i HRP metodu
- laminin (DAKO, M0638) uz razrjeđenje 1 : 20, blokirajuće protutijelo (DAKO) i HRP metodu
- CD31 (PECAM) (DAKO M 0823) uz razrjeđenje 1 : 40, blokirajuće protutijelo (DAKO) i HRP metodu
- CD 44 (NOVOCASTRA DF 1485) uz razrjeđenje 1 : 25, blokirajuće protutijelo (DAKO) i HRP metodu
- APC (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC sc-896) uz razrjeđenje 1 : 100 i blokirajuće protutijelo (DAKO) i HRP metodu.

Preparate su kontrastirni hemtoksilinom, najdulje 1 minutu. Kao pozitivnu kontrolu korišteno je za CD 44 tkivo tonzile, za APC tkivo debelog crijeva s adenokarcinomom, a za fibronektin, laminin i CD 31 koštana srž uzeta kod bolesnika bez MDS-a.

Kontrolna skupina za sve analizirane biljege sastojala se pet biopsija koštane srži uzete od zdravih osoba.

Izražaj **fibronektina** analiziran je podjelom u četiri skupine:

1. citoplazmatski pozitivitet megakariocita
2. membranski pozitivitet megakariocita
3. citoplazmatski i membranski pozitivitet megakariocita
4. citoplazmatski pozitivitet megakariocita uz jaki pozitivitet u području ALIP-a.

Izražaj **laminina** analiziran je ukupnim brojem pozitivnih krvnih žila. Također je analizirano grananje kod pozitivnih krvnih žila podijelivši ih u dvije skupine:

1. bez grananja
2. s prisutnim grananjem.

Izražaj molekula **PECAM (CD 31) i CD 44** određen je semikvantitativno:

0 = negativan

+ = slabo pozitivan

++ = jako pozitivan.

Izražaj molekule **APC** analiziran je podjelom u dvije skupine:

0 = negativan

+ = pozitivan.

3.2.3. Metode molekularne citogenetike

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima

FISH (engl. *Fluorescent in situ hibridization*) citogenetska je metoda kojom se fluoroscencijski označenom oligonukleotidnom probom istražuju željene DNA sekvencije. Postupak se temelji na svojstvima denaturacije i hibridizacije DNA. Boja kojom je označena proba apsorbira jedan, a propušta drugi dio spektra pa se specifične sekvencije DNA pod mikroskopom mogu vidjeti kao jasni signali crvene/zelene/žute boje. Kako bi slika pod mikroskopom bila jasnija, za jači je kontrast korišteno bojenje jezgara DAPI-em (4', 6 – diamidino-2-fenil-indol). Tako se mogu vidjeti oštro ograničene plave jezgre unutar kojih se nalazi signal boje koji ovisi o dizajnu probe.

U ovom je istraživanju korištena proba za detekciju centromere dugog kraka petog kromosoma (LSI EGR (5Q31) Spectrum Orange//D5S723,/D5S21 Spectrum Green, Dual Color Probe, VysIs Inc, USA).

POSTUPAK

Ispitivanje je izvršeno na rezovima biopsija koštane srži uklopljene u parafin.

DEPARAFINIZACIJA

- ispiranje parafinskih rezova debljine 4 μm Histoclearom 3X5 min
- rehidracija apsolutnim 85%-tnim i 70%-tnim etanolom po 2 min

- destilirana voda 2 min

PREDTRETMAN

- dodati retrival (Dako Cytomatation Target Retrival Solution, Dakocytomatation, Denmark) razrijeđen 10 x (180 ml destilirane vode i 20 ml retrivala)
- 15 min zagrijavati u mikrovalnoj pećnici
- u otopinu za pepsin (Roche) (200 µl pepsina + 1ml 1M HCl + 50 ml destilirane vode) inkubirati uzorke 20 min na 37 ºC

DENATURACIJA

- dehidrirati u 70%-tnom, 85%-tnom i apsolutnom etanolu po 2 min
- sušiti na zraku 15 min
- razrijediti probu prema uputama proizvođača (7 µl pufera + 2 µl destilirane vode + 1 µl probe)
- staviti 1 µl otopine s probom po uzorku
- prekriti pokrovnicom 18 x 18 mm, zaljepiti pokrovnicu i staviti u aparat za denaturaciju i hibridizaciju preko noći (Hybridizer, DakoCytomatation, Denmark)

POSTHIBRIDIZACIJA

- napraviti pufere
- otopina 1: 50 ml destilirane vode + 1 ml 20X SSC + 1,5 ml 10%-tnog Tweena 20
- otopina 2: 50 ml destilirane vode + 5 ml 20X SSC + 0,5 ml 10%-tnog Tweena 20
- otopina 3: 45 ml destilirane vode + 5 ml 20X SSC

- otopine 1 i 2 zagrijavati na 72 ºC u termostatu 1 sat prije uranjanja stakala
- uroniti u otopinu 1 na 2 min
- uroniti u otopinu 2 na 1 min

Otopinu 3 ostaviti na sobnoj temperaturi. Uzorke u njoj ostaviti da se temperiraju prije poklapanja.

Obrisati staklo oko analiziranog materijala, nakapati 10µl DAPI VEKTASHILD (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, USA) po uzorku i pokriti pokrovnicom.

Analiza je izvršena na 200 stanica u uzorku. Kontrolni uzorak sadržavao je dva narančasta signala i dva zelena signala. Promatrao se nedostatak jednog narančastog signala ili jednog narančastog i jednog zelenog signala, odnosno delecija kraka ili delecija cijelog petog kromosoma. Pozitivan se rezultat smatrao prisutnim karakterističnim promjenama signala u više od 10% stanica.

3.2.4. Kliničko-laboratorijske povezanosti

Izvršena je klasifikacija kliničkog stanja bolesnika prema klasifikaciji Karnofsky.

Tablica 3. Određivanje Karnofsky indeksa (101)

Osnovne kategorije	%	Specifični kriteriji
	100%	Normalan opći status
Sposoban za normalnu aktivnost	90%	Sposoban za normalnu aktivnost
Nije potrebna posebna njega	80%	Normalna aktivnost uz napor
Nesposoban za rad	70%	Sposoban za brigu o sebi, ali ne i za rad
Sposoban za život kući i većinu brige o sebi	60%	Potrebna pomoć sa strane
Potrebna različita vrsta pomoći sa strane	50%	Potrebna značajna pomoć sa strane, potrebna česta medicinska njega
Nesposoban za brigu o sebi	40%	Nesposoban, potrebna posebna pomoć i njega
Potrebna bolnička njega	30%	Značajno nesposoban, potrebno bolničko liječenje
Moguća brza progresija bolesti	20%	Ozbiljno bolestan, neophodno bolničko liječenje i aktivan tretman
Terminalni status	10%	Na samrti
	0%	Mrtav

Analizirni su laboratorijski parametri: sedimentacija eritrocita, broj leukocita, broj eritrocita, broj trombocita, LDH, AP, ukupni proteini i retikulociti.

Također je analizirano dobivanje suportivne i terapije citostaticima, kao i prisutnost infekata.

Analizirani su i podci o statusu zadnjeg pregleda s podjelom na:

- živ
- mrtav.

3.2.5. Korelacija rezultata dobivenih imunohistokemijskom analizom i laboratorijskih i hematoloških nalaza

Također je promatrana povezanost dobivenih rezultata imunohistokemijskom analizom (fibronektina, CD44, CD31, laminina i APC-a) s laboratorijskim vrijednostima (sedimentacija, ukupan broj leukocita, eritrocita i trombocita, vrijednosti LDH, alkalne fosfataze i ukupnih proteina u serumu), kao i prisutnosti blasta u razmazima periferne krvi.

3.2.6. Statističke metode

Za statističku obradu numeričkih podataka korišten je Kruskal Wallis test. Ostali su podaci analizirani statističkom neparametrijskom metodom. Kvalitativni podaci između skupina uspoređivali su se $\chi 2$ testom s razinom značajnosti $p < 0,05$. Odnos između parova varijabli određen je Spearmanovom rang-korelacijom. Korišten je informatički program Med Cale Softwer, Mariakerke, Belgium.

4. REZULTATI

4.1. Definiranje bolesnika prema klasifikaciji FAB-a i SZO-a

Analiza dobivenih podataka temeljila se na usporedbi dobivenih rezultata triju skupina bolesnika s MDS-om, pri čemu su:

- u prvu skupinu uvršteni bolesnici s MDS-om niskoga rizika prelaska u AML: RA i RARS prema FAB-ovoj klasifikaciji, odnosno RA, RCMD i RARS prema SZO-ovoj klasifikaciji
- u drugu skupinu uvršteni su bolesnici visokoga rizika prelaska u AML: RAEB i RAEB-t prema FAB-ovoj klasifikaciji, odnosno RAEB 1, RAEB 2 i AML prema SZO-ovoj klasifikaciji
- u treću skupinu uvršteni su bolesnici s CMML prema FAB-ovoj klasifikaciji , odnosno MDS/MPS prema SZO-ovoj klasifikaciji.

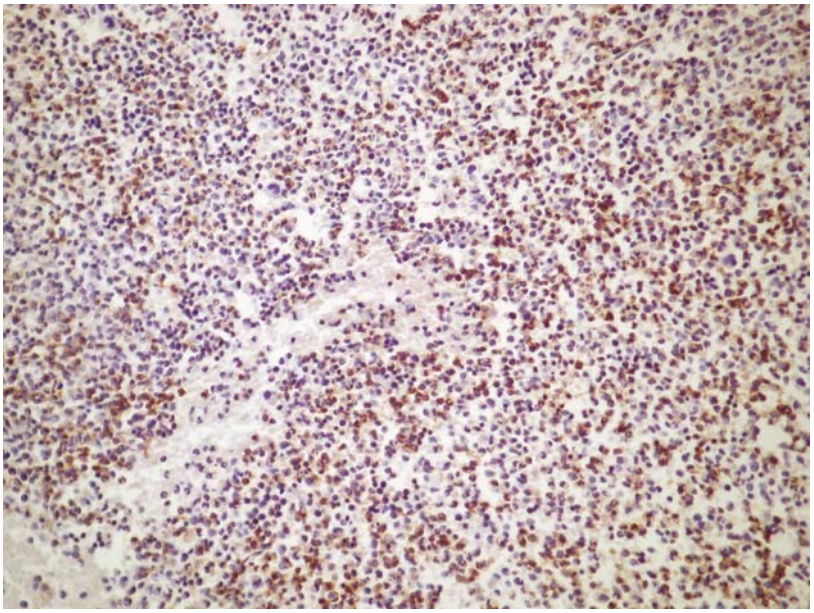
Tablica 4. Pregled bolesnika prema klasifikaciji FAB-a i SZO-a, uključujući spol, dob i vrijeme praćenja bolesti

Skupina	Klasifikacija		Broj	spol		Prosječna dob (god. – sd)	Prosječno vrijeme praćenja (mj. – sd)
I	FAB	SZO	Ukupno (n-%)	M (n-%)	Ž (n-%)	65,6 (8,8)	3,6 (4,2)
	RA i RARS	RA, RARS i RCMD	27 (54%)	16 (32)	11 (22)		
II	RAEB i RAEB-t	RAEB-1 RAEB-2 i AL	13 (26%)	9 (18)	4 (8)	70 (11,6)	6,5 (6,0)
III	CMML	MDS/ MPS	10 (20%)	6 (12)	4 (8)	68 (8,2)	6,3 (6,1)
UKUPNO/(n-%)			50 (100%)	31 (62)	19 (38%)		

Legenda: sd – standardna devijacija, mj. – mjesec, god. – godina, n – broj

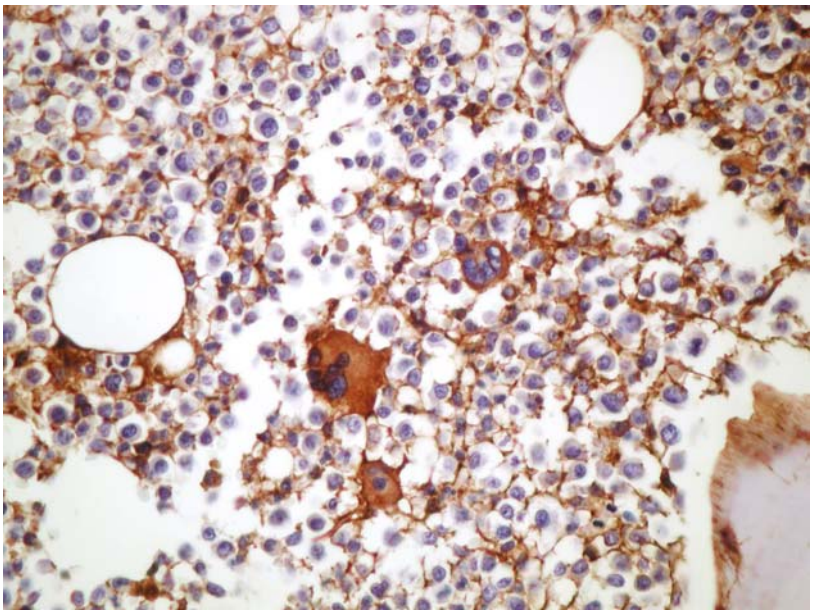
4.2. Imunohistokemijska ocjena izražaja CD 44, PECAM-a (CD 31), fibronektina, APC-a i laminina

U kontrolnoj skupini nađen je slabo pozitivan imunohistokemijski izražaj molekule CD44 na eritroblastima, svim razvojnim stadijima granulo- loze i monocitima. Promatrano je je li postojao izražaj molekule CD 44, odnosno je li on bio negativan, slabo ili jako izražen. Dobiveni rezultati pokazali su da je jak izražaj, sa statistički značajnom razlikom (p = 0,001), nađen kod druge skupine bolesnika, s prisutnim većim brojem mijeloblasta koji su pokazivali najjači izražaj molekule CD44 (tablica 5). Od ostalih dobivenih rezultata navela bih da nije nađen pozitivitet u većini biopsija – 36 (74%) od ukupnoga broja biopsija svih analiziranih bolesnika (tablica 5).

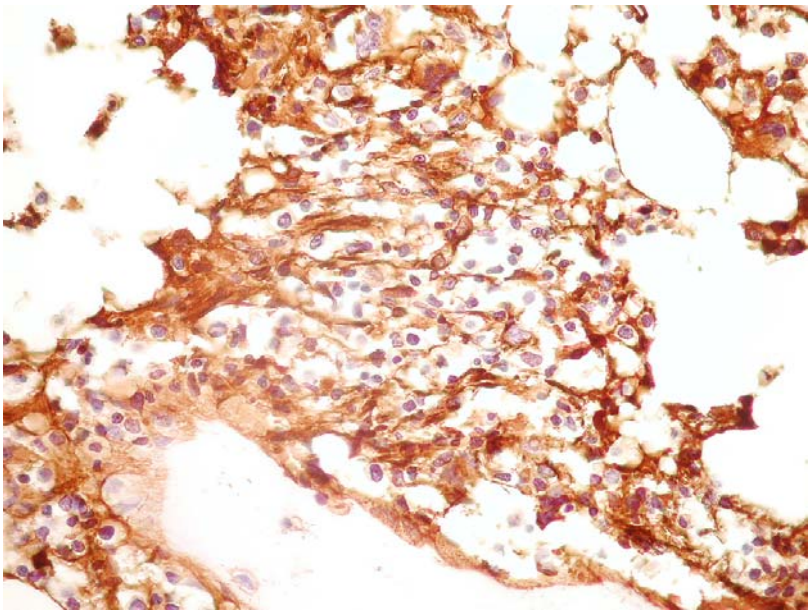


Slika 2. Pozitivan citoplazmatski izražaj CD44 na mijeloblastima, MDS-RAEB, CD44-PAP, X400

Promatrajući imunohistokemijski izražaj molekula fibronektina u kontrolnim biopsijama koštane srži, nađen je pozitivan izražaj na megakariocitima (citoplazmatski i membranski) te pozitivitet fibrilarnih vlakana u međustaničnom prostoru. Pokazalo se da je kod svih analiziranih biopsija koštanih srži kod bolesnika s MDS-om nađen pozitivan izražaj na megakariocitima. U izražaju su nađeni sljedeće razlike: citoplazmatski pozitivitet, membranski pozitivitet, membranski i citoplazmatski pozitivitet te membranski pozitivitet zajedno s pozitivitetom ALIP-a. Kod ukupnoga broja bolesnika najveći je broj nađen s membranskim pozitivitetom megakariocita 24 (48%) (tablica 5).



Slika 3. Pozitivan citoplazmatski i membranski izražaj fibronektina u megakariocitima, MDS-RAEB, fibronektin-PAP, X400

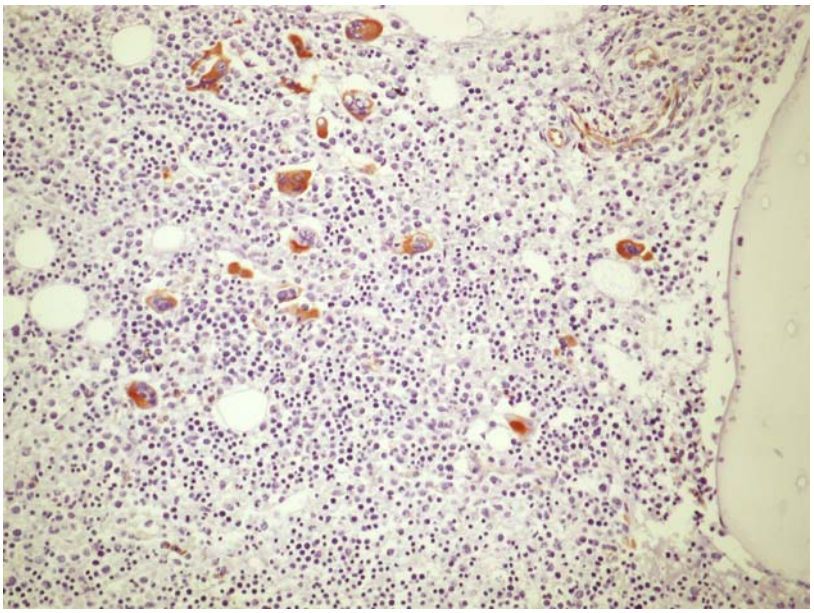


Slika 4. Pozitivan izražaj fibronektina u području ALIP-a, MDS-RAEB, fibronektin-PAP, X400

Nije nađena statistički značajna razlika između pojedinih bolesnika u izražaju molekule fibronektina (tablica 5), bilo u membranskom ili citoplazmatskom pozitivitetu megakariocita. U biopsijama kod 2 (4%) bolesnika iz prve i iz druge skupine bolesnika nađen je pozitivan izražaj molekule fibronektina kod prisutnosti ALIP-a.

U kontrolnoj skupini nađen je pozitivan izražaj molekule PECAM (CD31) na megakariocitima i stijenkama krvnih žila. Pozitivan imunohistokemijski izražaj molekule PECAM (CD 31) kod bolesnika s MDS-om nađen je također na megakariocitima i stijenkama krvnih žila. Analiza je izvršena semikvantitativno, odnosno promatrano je je li izražaj bio negativan, a u slučaju pozitiviteta je li bio slab ili jak. Nije nađena statistički značajna razlika u izražaju molekule CD31 između pojedinih skupina bolesnika. Kod 29 (58%) bolesnika od ukupnoga broja analiziranih bolesnika izražaj je bio slab, kod 19 (38%) bolesnika on je bio

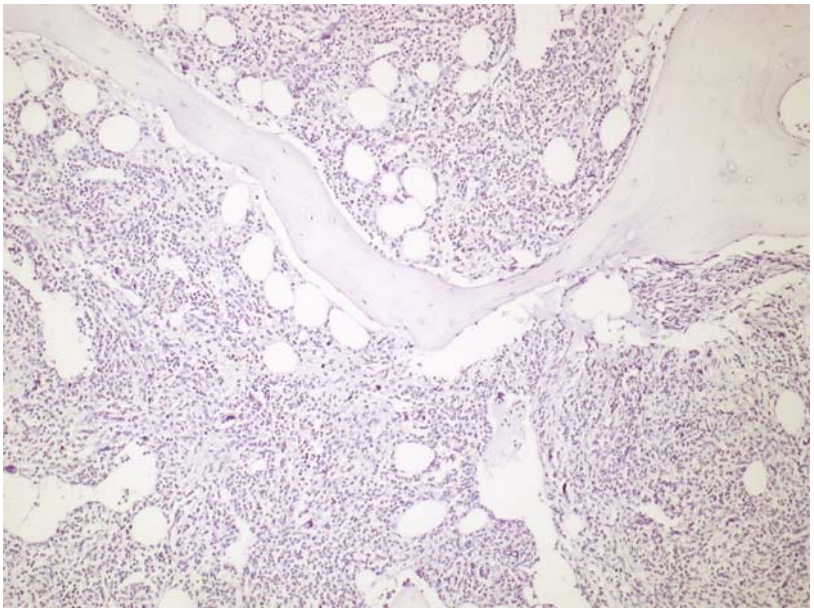
negativan, dok je jak pozitivitet nađen kod 2 (4%) bolesnika iz prve skupine (tablica 5).



Slika 5. Pozitivan izražaj CD31 u citoplazmi megakariocita i na krvnim žilama, MDS-RA, CD31-PAP, X100

Imunohistokemijski izražaj molekule APC bio je negativan kod svih bolesnika, osim kod jednoga bolesnika iz treće skupine, gdje je nađen pozitivan izražaj ove molekule na megakariocitima (tablica 5). U slučaju kontrolne skupine niti u jednoj biopsiji koštane srži nije nađen pozitivan izražaj molekule APC.

Slika 6. Negativan izražaj molekule APC na stanicama hematopoeze, MDS-RA,
APC-PAP, X100

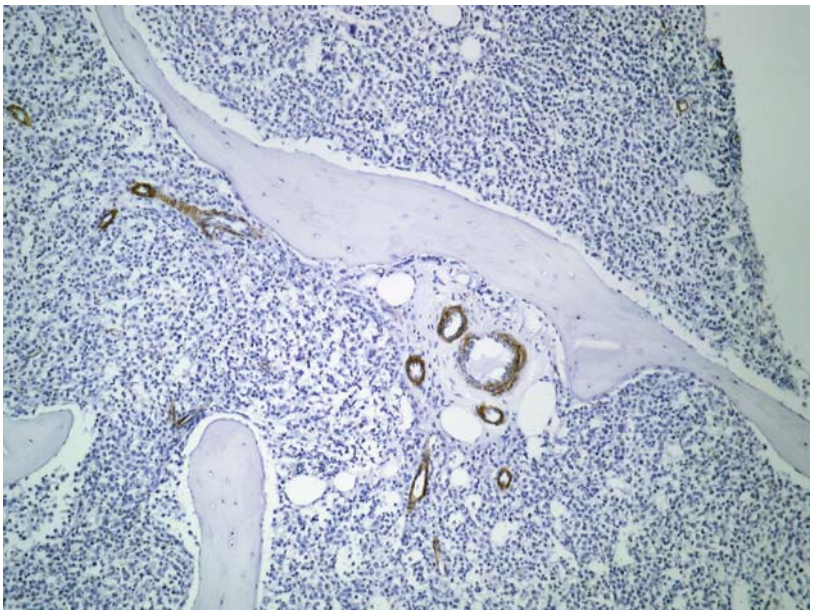


Tablica 5. Imunohistokemijska ocjena izražaja CD 44, fibronektina, PECAM-a (CD 31) i APC-a u biopsijama koštane srži u trima podskupinama bolesnika s MDS-om (N = 50)

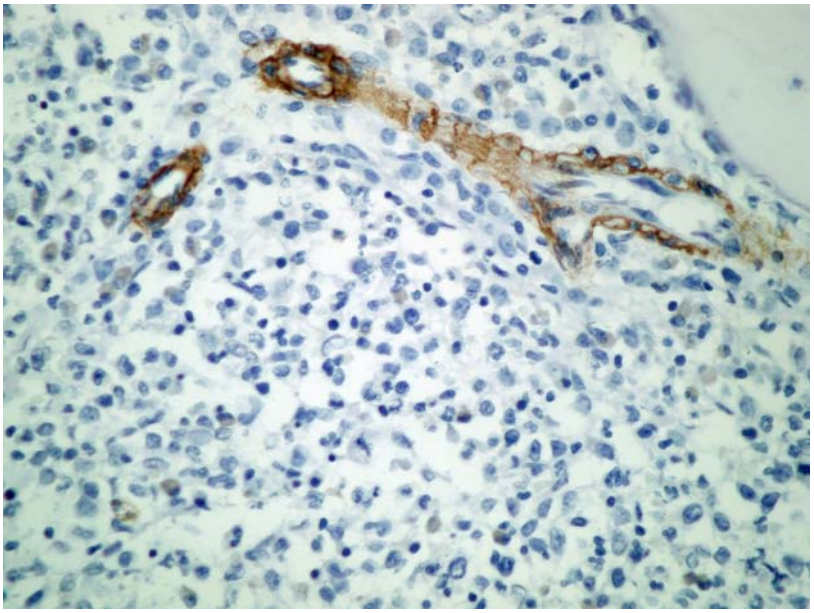
SKUPINA		I	II	III	p
CD44	0	24 (49%)	9 (19%)	3 (6%)	0,001
	1	3 (6%)	2 (4%)	6 (12%)	
	2	0 (0%)	2 (4%)	0 (0%)	
Fibronektin	1	14 (28%)	5 (10%)	5 (10%)	0,682
	2	8 (16%)	2 (4%)	2 (4%)	
	3	3 (6%)	2 (4%)	3 (6%)	
	4	2 (4%)	2 (4%)	0 (0%)	
PECAM (CD31)	0	9 (18%)	4 (8%)	6 (12%)	0,385
	1	16 (32%)	9 (18%)	4 88%)	
	2	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	
APC	0	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0,130
	1	27 (54%)	13 (26%)	10 (20%)	

Legenda: CD44: 0 – negativno, 1 – slabo pozitivno, 2 – jako pozitivno; Fibronektin: 1 – citoplazmatski pozitivitet megakariocita, 2 – membranski pozitivitet megakariocita, 3 – citoplazmatski i membranski pozitivitet megakariocita, 4 – citoplazmatski pozitivitet megakariocita i pozitivitet ALIP-a. PECAM (CD31): 0 – negativan, 1 – slabo pozitivan, 2 – jako pozitivan. APC (*Adenomatosis Polyposis Colli*): 0 – negativan, 1 – pozitivan.

Pozitivan imunohistokemijski izražaj molekule laminina nađen je na endotelu krvnih žila u biopsijama koštane srži. Uspoređivan je ukupan broj krvnih žila s pozitivnim izražajem laminina. Nađena je granična statistički značajna razlika (p = 0,056) između triju promatranih skupina bolesnika (tablica 6).



Slika 7. Pozitivan izražaj laminina na endotelu krvnih žila, MDS-RAEB, laminin-PAP, X100



Slika 8. Fenomen grananja laminin pozitivnih krvnih žila, MDS-RAEB, laminin-PAP, X400

Tablica 6. Imunohistokemijska ocjena izražaja laminina u biopsijama koštane srži u trima podskupinama bolesnika s MDS-om (N = 50)

SKUPINA		I	II	III	p
Laminin	N	44 (28-60)	38 (29-45)	49 (30-60)	0,056

Legenda: N – ukupan broj pozitivnih krvih žila

Također je u imunohistokemijskom izražaju molekule laminina promatrano postoji li razlika između triju skupina bolesnika u prisutnosti grananja krvnih žila. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika (p=0,049) u grananju krvnih žila (tablica 7).

Tablica 7. Prisutnost grananja krvnih žila kod ocjene imunohistokemijskoga izražaja laminina u biopsijama koštane srži u trima podskupinama bolesnika s MDS-om

SKUPINA		I	II	III	p
Laminin Grananje	0	20 (40%)	8 (16%)	3 (6%)	0,049
	1	7 (14%)	5 (10%)	7 (20%)	

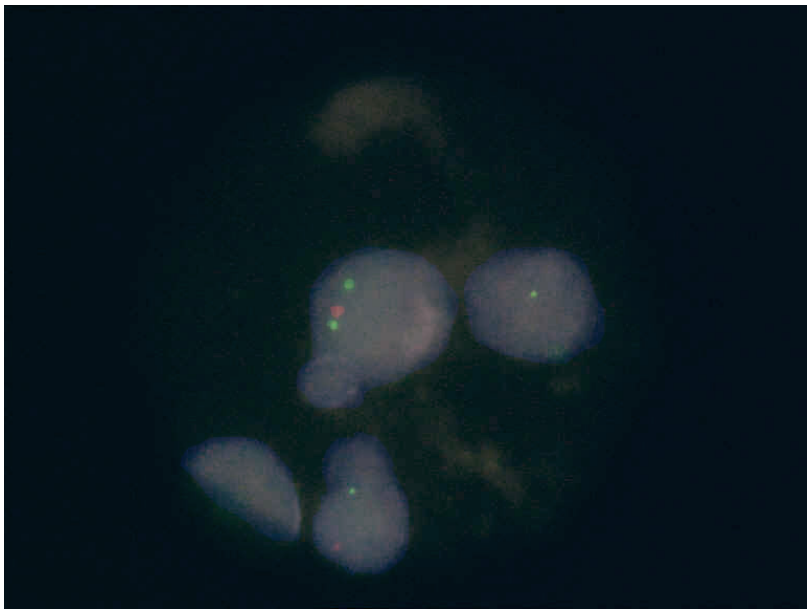
Legenda: 0 – nema grananja krvnih žila, 1 – prisutno grananje krvnih žila

4.3. Molekularno-citogenetska (FISH) analiza delecije 5q31-33

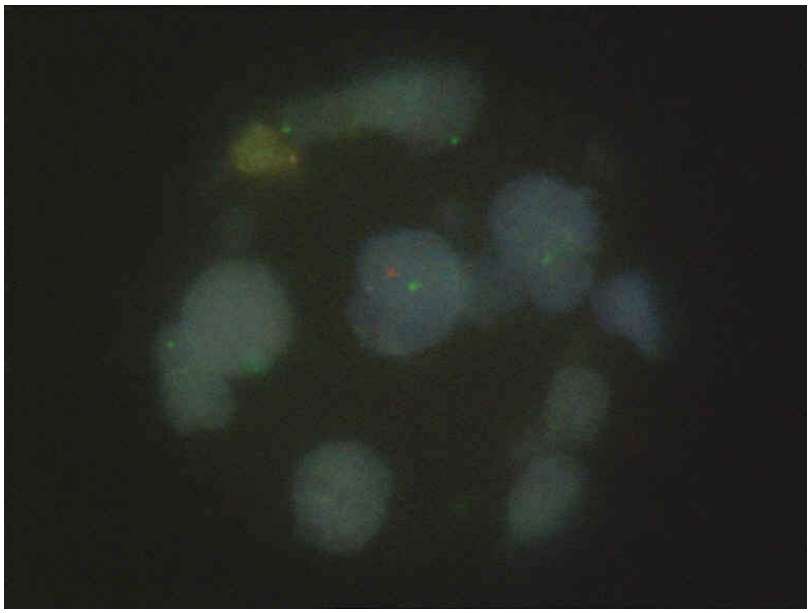
Analizirani su rezultati dobiveni FISH analizom pri čemu je korištena proba koja obilježava 5q31-31 na dugom kraku petog kromosoma. Dobiveni rezultati podijeljeni su u tri podskupine: prvu u kojoj nema promjena i u kojoj su prisutna sva četiri signala (dva zelena i dva narančasta), drugu u kojoj nedostaje jedan narančasti signal, što je znak nedostatka dugog kraka petog kromosoma (-5q) i treću u kojoj nedostaje jedan zeleni i jedan narančasti signal, što ukazuje na nedostatak cijelog petog kromosoma (-5).

Nije dokazana značajna razlika kod ovih citogenetskih poremećaja između promatranih triju skupina bolesnika (tablica 8).

Bez kromosomskog poremećaja unutar prve skupine bilo je 13 bolesnika, dok je kod po 6 bolesnika nađeno 5q- i -5. U drugoj skupini bez kromosomskih poremećaja bila su 3 bolesnika, dok je 6 bolesnika pokazivalo 5q-, a 4 bolesnika -5. U trećoj skupini po 3 su bolesnika bila bez kromosomskih poremećaja, s delecijom dugog kraka petog kromosoma i delecijom cijelog petog kromosoma (tablica 8, slike 9 i 10).



Slika 9. FISH, jedan signal 5q31-33, dva signala 5p15.2, MDS, del 5q-, X200



Slika 10. FISH, jedan signal 5q31-33, jedan signal 5p15.2, MDS, -5, X200

Tablica 8. Molekularno-citogenetska (FISH) analiza (N = 47)

SKUPINA		I	II	III	χ test
0 5q- -5	1	13 (28%)	3 (6%)	3 (6%)	0,478
	2	6 (13%)	6 (13%)	3 (6%)	
	3	6 (13%)	4 (9%)	3 (6%)	

Legenda: 0 – normalan citogenetski nalaz, 5q- – delecija dugog kraka petog kromosoma, -5 – delecija cijelog petog kromosoma

4.4. Citomorfološka zastupljenost diseritropoeze, disgranulopoeze i distrombocitopoeze

Analizirana je zastupljenost diseritro-, disgranulo- i distrombocitopoeze kod triju promatranih skupina bolesnika. Diseritropoeza nije bila zastupljena samo kod jednog bolesnika (2%) u prvoj skupini bolesnika, a distrombocitopoeza nije također nađena kod svega 2 (4%) bolesnika također iz prve skupine. Svi ostali bolesnici imali su i diseritro- i distrombocitopoezu. Disgranulopoeza je bila slabije zastupljena. 19 od 24 bolesnika iz prve skupine nisu imali zastupljenu disgranulopoezu, kao i 9 od 10 bolesnika iz treće skupine bolesnika. Kod druge skupine 5 od ukupno 13 bolesnika nije imalo disgranulopoezu, a statističke su analize pokazale da ne postoji statistički značajna razlika između pojedinih skupina bolesnika (tablica 9).

Tablica 9. Citomorfološka zastupljenost diseritro-, disgranulo- i distrombocitopoeze u koštanoj srži u trima podskupinama MDS-a (N = 50)

SKUPINA		I	II	III	p
Diseritropoeza	NE	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0,625
	DA	24 (50%)	13 (27%)	10 (21%)	
Disgranulopoeza	NE	19 (40%)	5 (11%)	9 (19%)	0,011
	DA	5 (11%)	8 (17%)	1 (2%)	
Distrombocitopoeza	NE	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0,323
	DA	23 (48%)	13 (27%)	10 (21%)	

4.5. Histološka ocjena zastupljenosti ALIP-a, limfnih folikula i mastocita

Analizirajući histološku zastupljenost ALIP-a, limfnih folikula i mastocita, dobiveni su rezultati prema kojima ne postoji statistički značajna razlika između pojedinih skupina bolesnika (tablica 10).

Prisutnost ALIP-a nađena je kod svega 2 (4%) bolesnika u prvoj skupini, kod 3 (6%) bolesnika u drugoj skupini, a niti kod jednog bolesnika u trećoj skupini bolesnika.

Limfni folikuli također nisu nađeni kod većine bolesnika. U prvoj i trećoj skupini bolesnika nađeneni su limfni folikuli kod 2 (4%) bolesnika, dok je kod svega jednoga (2%) bolesnika nađen u drugoj skupini (tablica 10).

Prisutnost mastocita nađena je kod svega jednog bolesnika (2%) iz prve skupine bolesnika (tablica 10).

Tablica 10. Histološka ocjena zastupljenosti (prisutnosti ALIP-a, limfnih folikula i **mastocita (N = 49)**

SKUPINA		I	II	III	P
ALIP	NE	24 (49%)	11 (21%)	10 (20%)	0,160
	DA	2 (4%)	3 (6%)	0 (0%)	
Limfni folikuli	NE	24 (49%)	12 (25%)	8 (16%)	0,518
	DA	2 (4%)	1 (2%)	2 (4%)	
Mastociti	NE	25 (51%)	13 (27%)	10 (20%)	0,637
	DA	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	

4.6. Ocjena celularnosti, fibroze i skleroze kosti te zastupljenost blasta, osteoblasta i osteoklasta

Promatrajući ocjenu celularnosti koštane srži, rezultati su pokazali da većina histoloških rezova kod analiziranih bolesnika s MDS-om pokazuje hipercelularnost koštane srži te da ne postoji statistički značajna razlika između triju promatranih skupina bolesnika (tablica 11).

Kod analize prisutnosti povećanog broja blasta u koštanoj srži pokazana je statistički značajna razlika ($p = 0,001$) između druge skupine, kod koje je prisutan veći broj blasta u odnosu na preostale dvije skupine bolesnika (tablica 11).

Također je promatrano postoji li veća zastupljenost osteoblasta u pojedinim skupinama. Primijćeno je da je kod većine bolesnika češća slabija zastupljenost

osteoblasta i da ne postoji statistički značajna razlika između triju analiziranih skupina bolesnika (tablica 11).

Kod analize zastupljenosti osteoklasta dobiveni su slični rezultati. Svega kod 2 bolesnika nađeni su brojniji osteoklasti, kod jednog bolesnika (2%) iz prve i kod jednog bolesnika (2%) iz druge skupine bolesnika, tako da promatrajući sve tri skupine nije nađena statistički značajna razlika (tablica 11).

Fibroza u rezovima koštane srži kod svih promatranih bolesnika nađena je kod svega 2 (4%) bolesnika u drugoj skupini i kod 3 (6%) bolesnika u trećoj skupini bolesnika, što ne pokazuje statistički značajnu razliku među promatranim skupinama bolesnika (tablica 11).

Analizirajući razlike u strukturi kosti, promatrajući je li ona normalna, sklerotična ili opsežna, nije nađena statistički značajna razlika između pojedinih skupina bolesnika, a kod većine se bolesnika zadržala normalna struktura kosti (tablica 11).

Tablica 11. Histološka ocjena celularnosti, fibroze i skleroze kosti te zastupljenost blasta, osteoblasta i osteoklasta (N = 50)

SKUPINA		I	II	III	P
Celularnost koštane srži	0	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0,076
	1	6 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	
	2	21 (42%)	12 (24%)	10 (20%)	
Blasti u koštanoj srži	NE	26 (52%)	1 (2%)	8 (6%)	0,000
	DA	1 (2%)	12 (24%)	2 (4%)	
Osteoblasti	NE	18 (37%)	10 (20%)	10 (20%)	0,140
	DA	8 (17%)	3 (6%)	0 (0%)	
Osteoklasti	NE	25 (51%)	12 (25%)	10 (20%)	0,650
	DA	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	
Fibroza	NE	26 (53%)	11 (22%)	7 (15%)	0,022
	DA	0 (0%)	2 (4%)	3 (6%)	
Kost	0	21 (43%)	12 (25%)	7 (14%)	0,182
	1	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)	
	2	3 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	

Legenda: Celularnost koštane srži: 0 – normocelularna, 1 – hipocelularana, 2 – hipercelularna;
Kost: 0 – normalna, 1 – sklerotična, 2 – opsežna

4.7. Laboratorijski nalazi

Analizirana je usporedba laboratorijskih nalaza između triju navedenih skupina.

Usporedbom broja leukocita između navedenih skupina nađena je statistički značajna razlika (p = 0,001) između prve i treće skupine, odnosno druge i treće skupine bolesnika, pri čemu je najveća vrijednost leukocita bila u trećoj skupini bolesnika s CMML-om 13,37 (s rasponom 2,3 – 77,1) u odnosu na prvu skupinu 3,6 (s rasponom 0,8 – 9,0) i drugu skupinu 3,2 (s rasponom 0,1 – 20,8) (tablica 12).

Također je nađena značajna razlika u dobivenim vrijednostima ukupnih proteina u serumu, gdje je srednja vrijednost kod svih bolesnika iznosila 68,5 (50 – 92), a gdje se pokazala statistički značajna razlika (p = 0,001) između prve i treće skupine bolesnika. U prvoj skupini bolesnika srednja je vrijednost iznosila 65 (50 – 83), dok je u trećoj skupini ona bila 78 (69 – 92) (tablica 12).

Usporedbom razine enzima laktat dehidrogenaze (LDH) nađena je granična statistički značajna razlika (p = 0,056), a vrijednosti su bile iznad granica normale u svim trima skupinama bolesnika (tablica 12).

Usporedbom ostalih laboratorijskih nalaza (sedimentacija eritrocita, broj eritrocita i trombocita, hemoglobina – Hb, hematokrita – Htc, alkalne fosftaze – AF) između triju navedenih skupina bolesnika nije nađena statistički značajna razlika (tablica 12).

Prosječna vrijednost sedimentacije eritrocita kod svih bolesnika iznosila je 32 (1 – 140), kod prve skupine bolesnika 28 (1 – 140), kod druge skupine 60 (4 – 120), a kod treće skupine 21 (8 – 100).

Srednja vrijednost broja eritrocita 10^{12}/L kod svih promatranih bolesnika bila je ispod normalnih vrijednosti i iznosila je 2,88 (1,3 – 4). Kod prve skupine bolesnika broj eritrocita iznosio je 2,87 (1,4 – 4,6), kod druge skupine bolesnika 2,87 (1,4 – 4,6), a kod treće skupine 3,62 (1,1 – 4,9)

Prosječna vrijednost trombocita iznosila je kod svih analiziranih bolesnika 125 (3 – 597). Kod prve skupine bolesnika srednja je vrijednost bila unutar granica normalnih vrijednosti 180 (140 – 423), dok je kod druge skupine iznosila 70 (3 – 260), a kod treće skupine 83 (21 – 597), što ukazuje na vrijednosti ispod granica normalnih, ali nije pokazana statistički značajna razlika između analiziranih triju skupina bolesnika.

Srednja vrijednost hemoglobina (g/L) kod svih analiziranih bolesnika također je bila ispod granica normalnih vrijednosti i iznosila je 100 (37 – 132), kod prve skupine bolesnika 99 (44 – 132), kod druge skupine 90 (42 – 113), a kod treće skupine 109 (37 – 122).

Hematokrit je također bio ispod granica normalnih vrijednosti u svim trima skupinama.

Vrijednosti alkalne fosfataze u svim trima skupinama bolesnika nalazile su se unutar granica normalnih vrijednosti i nije nađena statistički značajna razlika između pojedinih skupina.

Promatrajući prisutnost blasta u perifernoj krvi, nađena je statistički značajna razlika ($p = 0,002$) između druge skupine bolesnika, kod kojih su nađeni blasti u perifernoj krvi, te prve i treće skupine bolesnika kod kojih to nije bio slučaj (tablica 13).

Tablica 12. Laboratorijski nalazi u trima skupinama bolesnika s MDS-om (N 48)

SKUPINA	I	II	III	Svi bolesnici s MDS-om	p
SE (mm/h)	28 (1 – 140)	60 (4 – 120)	21 (8 – 100)	32 (1 – 140)	0,179
L (10^9/L)	3,6 (0,8 – 9,0)	3,2 (0,1 – 20,8)	13,37 (2,3 – 77,1)	3,9 (0,1 – 77,1)	0,001
E (10^{12}/L)	2,87 (1,4 – 4,6)	2,8 (1,3 – 4,0)	3,62 (1,1 – 4,9)	2,88 (1,1 – 4,9)	0,096
Hb (g/L)	99 (44 – 132)	90 (42 – 113)	109 (37 – 122)	100 (37 – 132)	0,363
Htc	0,300 (0,134 – 0,423)	0,254 (0,135 – 0,369)	0,287 (0,100 – 0,328)	0,287 (0,100 – 0,423)	0,462
T (10^9/L)	80 (16 – 423)	70 (3 – 260)	83 (21 – 597)	125 (3 – 597)	0,083
AF (U/L)	65 (42 – 101)	68 (55 – 135)	71,5 (36 – 532)	68 (36 – 532)	0,457
Ukupni proteini (g/L)	65 (50 – 83)	70 (55 – 83)	78 (69 – 92)	68,5 (50 – 92)	0,001
LDH (IU/L)	262 (98 – 600)	368 (215 – 528)	346,5 (197 – 758)	325,5 (98 – 758)	0,056

Legenda: SE – sedimentacija eritrocita, L – broj leukocita, E – broj eritrocita, Hb – hemoglobin, Htc – hematokrit, T – trombociti, AF – alkalna fosfataza, LDH – laktat dehidrogenatza

Tablica 13. Nalaz blasta u razmazu periferne krvi

SKUPINA	I	II	III	Svi bolesnici s MDS-om	p
Blasti u perifernoj krvi	0 (0 – 1)	1 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,002

Legenda: blasti u perifernoj krvi: 0 – nisu prisutni, 1 – prisutni

4.8. Terapija i klinički pokazatelji

Analizirajući dobivenu citostatsku terapiju, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između triju promatranih skupina bolesnika (tablica 14).

Također je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika između dobivene suportivne terapije (transfuzije eritrocita i trombocita) (tablica 14).

Promatrajući kliničke podatke, analizirani su opće stanje pacijenta, uspoređujući razlike u Karnofsky indeksu između pojedinih skupina, što također nije pokazalo statistički značajnu razliku. Promatrajući zastupljenost infekcija kod pojedinih bolesnika, pokazalo se da je postotak bolesnika kod kojih je došlo do razvoja infekta približno jednak onome kod kojih to nije bio slučaj (tablica 14). Analizirajući status zadnjega pregleda, podaci su ukazali da su od ukupnoga broja bolesnika dva preminula (iz druge skupine bolesnika), dok su svi ostali bili živi (tablica 14).

Tablica 14. Terapija i klinički pokazatelji (N = 49)

SKUPINA		I	II	III	P
Citostatska terapija	NE	24 (50%)	10 (21%)	8 (17%)	0,534
	DA	2 (4%)	2 (4%)	2 (4%)	
Suportivna terapija	NE	17 (36%)	3 (6%)	5 (10%)	0,068
	DA	9 (19%)	9 (19%)	5 (10%)	
Infekti	NE	16 (34%)	3 (6%)	6 (12%)	0,095
	DA	10 (21%)	9 (19%)	4 (8%)	
Status zadnjega pregleda	Mrtav	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	0,650
	Živ	25 (50%)	12 (25%)	10 (20%)	

4.9. Korelacija rezultata dobivenih imunohistokemijskom analizom i laboratorijskih i hematoloških nalaza

Spearmanovom rang-korelacijom analiziran je odnos između rezultata dobivenih imunohistokemijskom analizom te laboratorijskih i hematoloških nalaza. Proteini analizirani imunohistokemijskom analizom bili su: CD44, CD31, fibronektin, laminin i APC. Korelirani laboratorijski nalazi bili su: sedimentacija, broj leukocita, broj eritrocita, broj trombocita, alkalna fosfataza, LDH i ukupni proteini. Također smo promatrali i odnos s prisutnosti blasta u perifernoj krvi.

Dobiveni rezultati pokazali su značajnu vrijednost samo u korelaciji CD44 i broja leukocita ($r = 0,490$, $n = 47$, $p = 0,000$), CD44 i broja eritrocita ($r = 0,421$, $n = 47$, $p = 0,003$) te CD44 i vrijednosti ukupnih proteina ($r = 0,321$, $n = 41$, $p = 0,041$). Također je nađena značajna razlika u korelaci grananja laminina i vrijednosti alkalne fosfataze ($r = 0,300$, $n = 46$, $p = 0,043$).

Svi ostali odnosi nisu pokazali značajne vrijednosti.

5. RASPRAVA

MDS je klonalni poremećaj matične hematopoetske stanice (MHS). Smatra se da je sekvencija različitih događaja odgovorna za patogenezu nastanka bolesti. Međudjelovanje klonalnih citogenetskih poremećaja stanica koštane srži zajedno s poremećenim mikrookolišem omogućuje razvoj dominirajućega malignog klona.

Sudbina je MHS-a visokoorganizirana međudjelovanjem utjecaja na stanični ciklus i izražaja genskoga profila. Velikim dijelom to ovisi o tome što su matične hematopoetske stanice okružene u svim dimenzijama mikrookolišem koštane srži, gdje dolazi do međustaničnih odnosa, odnosa stanica s ekstracelularnim matriksom i izloženosti različitim kombinacijama i koncentracijama citokina i čimbenika rasta. Takva se okruženja nazivaju odjeljcima (nišama) MHS-a (60).

Promatrajući izražaj CD44 u biopsijama koštanih srži kod zdravih osoba on je bio slabo pozitivan, dok je usporedbom između triju skupina bolesnika s MDS-om nađena statistički značajna razlika u njegovom izražaju ($p = 0,001$). Najslabiji izražaj našli smo u prvoj skupini bolesnika s niskim rizikom MDS-a. Najjači izražaj CD44 bio je u drugoj skupini bolesnika, gdje je nađen jak pozitivitet na blastima.

Prema podacima iz literature izražaj molekule CD44 reguliran je s obzirom na loze hematopoeze i razvoj stanica. On je jak kod svih hematopoetskih progenitorskih stanica i raste u monopoezi. Nasuprot tome, smanjuje se diferencijacijom granulopoeze, eritropoeze i trobocitopoeze, dok se ponovo ne pojača kod zrelih granulocita (102). Ovi se podaci slažu s dobivenim rezultatima što može objasniti smanjen izražaj CD44 kod bolesnika iz prve skupine, s niskim rizikom MDS-a, gdje većinu mijeloičnih stanica čine

srednje zreli oblici. U agresivnijim oblicima MDS-a raste broj nezrelih mijeloičnih stanica i pojačava se izražaj CD44. Mogući je razlog tomu pojačana apoptoza u ranim stadijima bolesti, dok se u kasnijima ona smanjuje. Naime, kako je glavni ligand za CD44 hijaluronska kiselina, a heparin je privezani glikozaminoglikan koji potiče apoptozu granulocita, moguć je utjecaj na promjene izražaja molekule CD44 (103). Također vezivanje CD44 s hijaluronskom kiselinom potiče lučenje TNF-α koji potiče proliferaciju prekursora hematopoeze. Veća ekspresija CD44 molekule u drugoj skupini bolesnika koji imaju klinički agresivniji oblik bolesti mogla bi upućivati da je pojačana adhezija hematopoetskih stanica za mikrookoliš u koštanoj srži povezana s pojačanom proliferacijom nezrelih hematopoetskih stanica i/ili odgodom sazrijevanja hematopoetskih stanica. Ovome u prilog ide i primjena specifičnih protutijela za površinski antigen CD44 na blastima kod AML-a koji predstavljaju okidač za terminalnu diferencijaciju leukemijskih blasta, ali i inhibiciju proliferacije i apoptoze (104). U istraživanjima se navodi da su također korištena protutijela usmjerena i na nehematopoetske stanice ili stromalne stanice gdje su potaknula stromalne makrofage na lučenje citokina (105).

Pozitivan izražaj PECAM-a (CD31) u megakariocitima i endotelnim stanicama krvnih žila, kako u biopsijama koštane srži kod zdravih osoba, tako i u biopsijama bolesnika s MDS-om, slaže se s podacima iz literature (106). Nakon podjele i izražaja ove molekule u trima skupinama: negativan, slabo i jako pozitivan, nije nađena statistički značajnu razliku između triju analiziranih skupina bolesnika.

Međutim, CD31 protein pokazao se kao dobar biljeg u analizi promjena megakariocita te se u novije vrijeme preporuča uvesti to imunohistokemijsko bojenje u rutinsku analizu dismegakariocitopoeze (107,108,109).

Laminin je u biopsijama koštane srži kod svih ispitivanih bolesnika bio pozitivan na endotelu krvnih žila. Promatrajući broj pozitivnih krvnih žila, nađena je statistički granična razlika ($p = 0,056$) između triju skupina bolesnika. Najmanji broj krvnih žila s pozitivnim izražajem bio je u drugoj skupini bolesnika.

Zamijećen je morfološki fenomen grananja laminin pozitivnih krvnih žila, gdje je nađena statistički značajna razlika ($p = 0,049$) između pojedinih skupina, a on je jače izražen u drugoj i trećoj skupini bolesnika s MDS-om. Ovaj morfološki fenomen grananja laminin pozitivnih žila također bi mogao upućivati na angiogenezu povezanu s klonalnom proliferacijom hematopoetskih stanica. Takav morfološki aberantan izgled krvnih žila bio je izraženiji u bolesnika s RAEB-om i CMML-om što bi moglo biti povezano s izraženijom proliferacijom hematopoetskih stanica u tim tipovima MDS-a. Promjene u gustoći krvnih žila (mikrovaskulaturi) u koštanoj srži još su jedan od čimbenika kojim molekule ekstracelularnoga matriksa utječu na razvoj i održanje MDS klona (110). Novostvorene krvne žile potiču veću proizvodnju citokina, ali također mogu biti i posljedica pojačanoga lučenja citokina u koštanoj srži bolesnika s MDS-om. U koštanoj srži bolesnika s MDS-om luče se razni citokini koji imaju sposobnost utjecaja na rast krvnih žila, kao što su TNF-α, interferon-γ, VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF (engl. *Fibroblast Growth Factor*), EGF (engl. *Epidermal Growth Factor*) i TGF-β (engl. *Transforming Growth Factor beta*) čija je razina povišena u plazmi bolesnika s MDS-om. Povećana gustoća krvnih prostora – MVD (engl. *Microvascular Density*) potvrđuje da kod MDS-a dolazi do neovaskularizacije (110, 111, 112). Prema podacima iz literature razina VEGF-a u plazmi i povećan MVD koreliraju s MDS-om visokoga rizika prema FAB-u (113, 114, 115), što može utjecati na prelazak bolesti u

AML. MVD kod bolesnika s MDS-om viši je nego kod kontrolne skupine, ali niži nego kod primarnih AML-a. Međutim, registriran je značajan pad MVD-a kod bolesnika s MDS-om nakon prelaska u AML. To se može objasniti time da geni s proangiogenom ulogom imaju sličan izražaj (ekspresiju), dok je izražaj TGF β, koji je antiangiogeni faktor, jači kod AML-a nastalog iz MDS-a u odnosu na primarni AML (10).

Predominantno je nađen izražaj fibronektina izvanstanično u području ekstracelularnoga matriksa, u intersticiju vezivnoga tkiva, što se slaže s podacima iz literature (116). Također je nađen jak pozitivan izražaj fibronektina u području ALIP-a u biopsijama koštane srži u svim slučajevima gdje je bio utvrđen ALIP, što se može objasniti jačom adhezijom nezrelih hematopoetskih stanica za fibronektin (117)

Nađen je pozitivan izražaj fibronektina na površini megakariocita, u citoplazmi megakariocita, kao i na oba mjesta. Prema podacima iz literature zreli trombociti imaju površinski omotač koji sadrži fibronektin čime se može objasniti membranski pozitivitet megakariocita (118). U malignim tumorskim stanicama pozitivitet se nalazi samo na površini stanica (116), za razliku od dijela megakariocita kod kojih smo našli pozitivan citoplazmatski izražaj. Poznato je da je fibronektin uključen u proces adhezije i sazrijevanja megakariocita, kao i stanica eritropoeze, ali u ovom istraživanju nije nađen pozitivan izražaj fibronektina na eritroblastima (119, 120). Dijelom se to može objasniti djelovanjem fibronektina, koje se razlikuje ovisno o stadiju razvoja progenitorskih stanica. On potiče očuvanje primitivnih progenitorskih stanica, ali ne utječe na njihove zrelije oblike te sa sazrijevanjem ima sve manju ulogu (121).

Uspoređujući izražaj fibronektina kod triju analiziranih skupina, nije nađena statistički značajnu razliku između pojedinih skupina.

S obzirom da se gen za APC (engl. *Adenomatosis Polyposis Colli*) nalazi na dugom kraku petoga kromosoma, gdje dolazi do najčešćih promjena u bolesnika s MDS-om, po prvi je put promatrano postoji li razlika u imunohistokemijskom izražaju ove molekule u biopsijama koštane srži kod zdravih osoba i između triju analiziranih skupina bolesnika s MDS-om. U kontrolnoj skupini izražaj je bio negativan, a kod bolesnika s MDS-om svega kod jednoga bolesnika nađen je pozitivan izražaj na megakariocitima, dok je kod ostalih bio negativan.

Iz ovoga se može zaključiti da bez obzira na mjesto gena za APC, koje se nalazi u području 5q21-22, odmah do najčešće regije zahvaćene delecijom kod bolesnika s MDS-om (5q22-5q23), nije nađena povezanost ovoga proteina s MDS-om.

FISH metodom na parafinskim rezovima koštane srži analizirana je deleciju 5q31-33 regije. Korištena je dvostruko obilježenu proba koja se, osim za otkrivanje delecije 5q31-33, koristi i za određivanje razlike u gubitku cijeloga kromosoma 5 (-5) nasuprot delecije dugoga kraka kromosoma (5q-).

Uspoređujući dobivene rezultate, nije nađena statistički značajna razlika između triju analiziranih skupina bolesnika, bilo u slučaju gubitka cijeloga kromosoma 5, bilo u slučaju delecije njegova dugog kraka. Rezultati unutar pojedinih skupina slagali su se s podacima iz literature, gdje se navodi da prosječno 30% bolesnika s MDS-om ima deleciju 5q-, od toga 10% kao izoliranu anomaliju, a 20 % kao dio kompleksnoga citogenetskog poremećaja kariotipa (122). Nešto veći postotak (40%) nalazi se kod terapijom uzrokovanoga MDS-a (MDS-t).

Lokalizacija MHS-a unutar koštane srži kod odraslih osoba visoko je organizirana. Nediferencirane matične hematopoetske stanice lokalizirane su uz endostelane regije, dok

se progenitorske stanice nalaze u centralnoj regiji koštane srži (123). Odnos MHS-a i niša određuje ravnotežu između mirovanja i diferencijacije MHS-a: u endostelnim nišama odnos osteoblasta i MHS-a regulira odnos između mirovanja i migracije MHS-a kroz koštanu srž. Osteoblasti i ostale mezenhimalne stromalne stanice, kao što su stanice retikuluma, fibroblasti i adipociti, čine mikrookoliš za MHS unutar koštane srži (124). Smanjeni broj ili nedostatak osteoblasta rezultira smanjenjem broja MHS-a u koštanoj srži i brzim razvojem ekstramedularne hematopoeze (125).

Nije nađena razlika u broju osteoblasta usporedbom tri skupine bolesnika s MDS-om. Moguće je da je jedan od razloga tomu pretpostavka da samo vretenasti osteoblasti koji pokazuju izražaj E-kadherina lokalizirani uz endosteum čine glavnu komponentu endostelnih niša (126). Iako ovi osteoblasti imaju glavnu ulogu u funkciji niša, također se pretpostavlja da i ostale stanice strome, kao što su osteoklasti, stromalni fibroblasti te endotelne stanice, doprinose formiranju i aktivnosti endostealnih niša.

Analizirajući zastupljenost osteida i osteoklasta, nije nađena statistički značajna razlika.

Analizirajući prisutnost mastocita u biopsijama koštane srži, nađena je kod svega jednoga bolesnika, i to u prvoj skupini. Prema podacima iz literature kod bolesnika s MDS-om nađen je povećan broj mastocita i bazofila u koštanoj srži metodom protočne citometrije (107). Dobiveni negativan nalaz prisutnosti mastocita može se objasniti i slabijim prepoznavanjem mastocita Hemalaun&Eozin bojenjem koštane srži..

Smatra se da je dodatni prognostički faktor u MDS-u histološki nalaz abnormalno lokaliziranih nezrelih prekursora (ALIP) (127). Imunohistokemijski nalaz povećanoga broja CD34 + stanica, kao i prisutnost CD34+ agregata u biopsijama koštane srži povezan

je s povećanim rizikom prelaska u akutnu leukemiju, a smatra se osobito značajnim nalazom kod bolesnika s MDS-om niskoga stupnja rizika. Prisutnost ALIP-a i CD34+ stanica može u kombinaciji s IPSS-om značajno pomoći preciznijem određivanju skupina rizika prelaska u AML. Nije nađena značajna razlika prisutnosti ALIP-a u histološkim rezovima koštane srži između pojedinih analiziranih skupina, iako treba naglasiti da su svi slučajevi ALIP-a nađeni u drugoj skupini bolesnika (2%), koja ima veći rizik prelaska u AML.

Postavlja se pitanje kolika je prognostička vrijednost ALIP-a jer se nakupljanje nezrelih mijeloidnih stanica oko malih krvnih žila često nalazi i kod reaktivnih stanja i ne odražava abnormalnu lokalizaciju jer je prirodni smještaj ovih stanica i paratrabekularni i perivaskularni prostor. Zbog toga se smatra da je važno fokalno nakupljanje CD34+ stanica u MDS-u te da ono ima prognostičku važnost.

Približno 15% bolesnika s MDS-om pokazuje značajno umnažanje retikulinskih vlakana, pa čak i fibrozu koštane srži (128). U ovome istraživanju nismo našli statistički značajnu razliku između analiziranih skupina bolesnika s MDS-om. U novijim razmatranjima smatra se da bi se trebao izdvojiti poseban entitet – MDS s mijelofibrozom (MDS-F). Iako kriteriji za postavljanje ove dijagnoze još nisu u potpunosti definirani, većina se autora slaže da bi se dijagnoza MDS-F trebala postaviti samo u slučaju kvalitetne biopsije kosti koja se analizira, gdje se nalazi difuzna, gruba fibroza zajedno s displazijom najmanje dviju loza hematopoeze. U perifernim razmazima krvi nalazi se citopenija i ne postoji značajna organomegalija (129). Također treba naglasiti da se fibroza koštane srži znatno češće javlja kod bolesnika s MDS-om nakon terapije (MDS-t)

(130), što je donekle moglo utjecati na dobivene rezultate, gdje je većina bolesnika imala *de novo* oblik MDS-a.

Jedna od glavnih karakteristika MDS-a jest citopenija u perifernoj krvi usprkos hipercelularnosti koštane srži. Uzrok ovome poremećaj je diferencijacije MHS-a i pojačana apoptoza, ali i djelovanje mikrookoliša koji je također uključen u razvoj i progresiju bolesti, ponajprije zbog poremećaja citokinskog okruženja i razine apoptoze CD34+ progenitorskih stanica.

Morfološkom analizom također je dobivena izražena hipercelularnost koštane srži kod svih triju analiziranih skupina bolesnika. Kod 12% bolesnika nađena je hipocelularna koštana srž što odgovara podacima iz literature gdje je kod 15% bolesnika ustanovljena hipocelularna koštana srž (131).

Analizirajući citopenije, nađena je statistički značajna razlika promatranjem prisutnosti anemije i trombocitopenije. Značajna razlika ($p = 0,001$) nađena je i kod ukupnoga broja leukocita, gdje je u prvim dvjema skupinama bolesnika nađena leukopenija, dok su bolesnici iz treće skupine (s CMML-om) imali povišen broj leukocita.

Nalaz ukupnih proteina u serumu pokazao je statistički značajnu razliku ($p = 0,001$) između prve i druge te treće skupine bolesnika. Nalaz razine LDH u serumu bio je statistički graničan ($p = 0,056$) uspoređujući prvu i drugu te prvu i treću skupinu bolesnika s MDS-om. Veće vrijednosti LDH na granici statističke značajnosti u drugoj i trećoj skupini bolesnika u skladu su s većom klonalnom proliferacijom hematopoetskih stanica u tim skupinama MDS-a. Prema podacima iz literature predloženo je da se LDH uvrsti u prognostičke čimbenike razvoja bolesti, nadopunjujući IPSS (132). Pokazano je

da je povećana razina LDH povezana s povećanim rizikom prelaska u AML, kao i slabijim preživljenjem kod bolesnika unutar pojedinih skupina određenih prema IPSS-u.

Ovi bi se podaci mogli primijeniti i na rezultate koji su dobiveni i koji dokazuju da skupina bolesnika s niskim rizikom prelaska u AML ima i niže vrijednosti LDH te bolju prognozu i sporiji razvoj bolesti u odnosu na druge dvije skupine bolesnika s MDS-om. Prema podacima iz literature kod 31% bolesnika s MDS-om nađena je povišena razina LDH (132). U ovom istraživanju većina ispitivanih bolesnika s MDS-om imala je povišenu razinu ovoga enzima.

6. ZAKLJUČCI

1. Promatranjem izražaja CD44, utvrđeno je da je bio najjači u drugoj skupini bolesnika s visokim rizikom prelaska u AML ($p = 0,001$), dok je najslabiji izražaj bio u prvoj skupini bolesnika s niskim rizikom prelaska u AML, što bi moglo govoriti u prilog tomu da je pojačana adhezija hematopoetskih stanica za mikrookoliš u koštanoj srži povezana s pojačanom proliferacijom nezrelih hematopoetskih stanica i/ili odgodom sazrijevanja hematopoetskih stanica.
2. Nađen je pozitivan imunohistokemijski izražaj CD31 (PECAM) na megakariocitima i endotelu krvnih žila u biopsijama koštanih srži, kako kod zdravih osoba, tako i kod bolesnika s MDS-om, ali nije nađena značajna razlika u izražaju ove molekule usporedbom triju analiziranih skupina bolesnika.
3. Imunohistokemijskim određivanjem izražaja laminina u biopsijama koštane srži kod svih ispitanika nađen je pozitivan izražaj na endotelu krvnih žila.
4. Istraživan je fenomen grananja laminin pozitivnih krvnih žila, pri čemu je nađena značajna razlika ($p = 0,049$) između pojedinih skupina bolesnika. Ovaj morfološki aberantan izgled krvnih žila upućuje na angiogenezu povezanu s klonalnom proliferacijom hematopoetskih stanica.
5. Po prvi put istražen imunohistokemijski izražaj molekule Adenomatosis Polyposis Colli (APC) u hematopoetskim stanicama u bolesnika s MDS-om bio je negativan. Metodom FISH analize na parafinskim rezovima analizirana je delecija regije 5q 31-33 gdje se nalazi i gen za APC. Uspoređujući dobivene rezultate, nije nađena značajna

razlika između pojedinih skupina bolesnika, bilo u deleciji cijeloga petog kromosoma, bilo u deleciji njegova dugog kraka.

6. U zastupljenosti osteoida, osteoblasta i osteoklasta, zatim mastocita, limfnih folikula, ALIP-a, kao i retikulinske fibroze nije nađena značajna razlika između promatranih skupina bolesnika.

7. Razina ukupnih proteina u serumu bila je značajno viša u drugoj i trećoj skupini bolesnika. Razina LDH u serumu bila je granično povišena u drugoj i trećoj skupini bolesnika. Analizirajući prisutnost blasta u perifernoj krvi, nađen je njihov značajno povećan broj u drugoj skupini bolesnika. Broj leukocita bio je značajno povišen u trećoj skupini bolesnika.

7. SAŽETAK

Cilj rada bilo je istraživanje međusobne povezanosti hematopoetskih stanica i izvanstanične potke, odnosno mikrookoliša kod MDS-a. Analiziran je imunohistokemijski izražaj proteina (CD44, CD31, laminin, fibronektin i APC – Adenomatosis Polyposis Colli), molekularno-citogenetska FISH analiza delecije 5q31-33, zatim morfološki pokazatelji u koštanoj srži (broj i lokalizacija blasta, mastociti, osteoblasti, osteoklasti, osteoid, fibroza) te ukupni proteini i LDH u serumu i pokazatelji kompletne krvne slike.

U skupini ispitanika bilo je 50 bolesnika s MDS-om koji su prema FAB-ovim i SZO-ovim kriterijima svrstani u tri skupine. Prema podjeli u skupine po FAB-ovoj klasifikaciji u prvoj skupini bili su bolesnici s niskim rizikom prelaska u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML): bolesnici s RA-om i RARS-om, drugu su skupinu sačinjavali bolesnici s visokim rizikom prelaska u AML, bolesnici s RAEB-om i RAEB-t, a u trećoj skupini bili su bolesnici s CMML-om. Prema kriterijima SZO-a u prvoj su skupini bili bolesnici s RA-om, RCMD-om i RARS-om, u drugoj skupinu oni s RAEB-1, RAEB-2 i AML-om, dok su u trećoj skupini bili bolesnici s MDS-om/MPS-om.

Uspoređujući tri skupine bolesnika s MDS-om nađen je najjači izražaj CD44 u drugoj skupini bolesnika s klinički agresivnijim oblikom bolesti, što bi moglo upućivati da je pojačana adhezija hematopoetskih stanica za mikrookoliš u koštanoj srži povezana s pojačanom proliferacijom nezrelih hematopoetskih stanica i/ili odgodom sazrijevanja hematopoetskih stanica. Nađen je granično veći broj laminin pozitivnih žila u pojedinim skupinama bolesnika s MDS-om, a opažen morfološki fenomen grananja laminin pozitivnih žila, koji je najprisutniji bio u RAEB-u i CMML-u, također bi mogao upućivati

na angiogenezu povezanu s klonalnom proliferacijom hematopoetskih stanica. Izražaj CD31 (PECAM) i fibronektina nije bio značajno različit među svim trima skupinama bolesnika. Analizom APC, učinjenom po prvi put u hematopoetskim stanicama u bolesnika s MDS-om, nije nađen imunohistokemijski izražaj toga proteina. FISH analizom istraživala se delecija regije 5q31-33, gdje se nalazi gen za APC, i nije nađena razlika u pojavi ove citogenetske promjene između triju skupina bolesnika s MDS-om. Nalazi ALIP-a, broj mastocita, broj osteoblasta i osteoklasta, osteoid i fibroza nisu se značajno razlikovali među svim trima skupinama bolesnika. Razina ukupnih proteina u serumu bila je značajno viša u drugoj i trećoj skupini bolesnika u odnosu na prvu skupinu bolesnika, a vrijednosti LDH bile su na granici značajnosti, veće u drugoj i trećoj skupini bolesnika u odnosu na prvu skupinu bolesnika.

8. SUMMARY

Aim of the study was to clarify interactions between hematopoietic cells and extracellular matrix in patients with MDS. It was analysed immunoexpression of certain proteins (CD31, CD44, laminin, fibronectin and APC- Adenomatous Poliposis Colli), as well as cytogenetic fluorecence in situ hibridysation (FISH) analysis of 5q31-33 deletion. Also it was analyzed morphological characteristics of bone marrow (number and localization of blasts, mastocytes, osteoblasts, osteoclasts, osteoid, fybrosis) and certain biochemical and hematological indicators in serum and peripheral blood. According WHO and FAB criteria group of 50 patinets with MDS was divided in three subgroups. According FAB classification in first group were patients with low risk for transformation to AML, patients with RA and RARS. Second group consisted of patients with high risk for transformation to AML, patients with RAEB and RAEB-t. In third group were patients with CMML. According WHO classification in first group were patients with RA, RCMD and RARS. Second group of MDS patients consisted of patients with RAEB-1, RAEB-2 and AML, and in third group were patients with MDS/MPD. The highest CD44 immunoexpression was seen in second group of MDS. Higher CD44 immunoexpression in second MDS group with agressive clinical course of disease point to that higher adhesion of hematopoietic BM (bone marrow) cells to BM environment, which is probably connected to higher proliferation and/or deley of differentiation of BM hematopoetic cells. CD31 (PECAM) and fibronektin immunoexpression was not significantly different between all three groups of patients with MDS. The highest number of laminin positive blood vessels was observed in first and third groups of patients with

MDS. For the first time seen morphological phenomenon of blood vessels branching mostly observed in RAEB and CMML could be also linked to angiogenesis that is connected to higher clonal proliferation of hematopoietic cells in these MDS types. According literature search, APC molecule was analyzed for the first time in MDS patients, and was negative in BM hematopoietic cells. There was no difference between all three groups of MDS patients for FISH analysis of l5q31-33- locus near APC gene.

There was no statistical difference for atypical localization of immature percursors (ALIP), number of mastocytes, osteoblasts, osteoklasts, osteoid and fibrosis for all three groups of MDS patients. Levels of total serum proteins were significantly higher in second and third groups of MDS patients in comparison to the first group of patient. LDH was higher with bordeline statistical significance in second and third group of patients in comparison to first group of MDS patients.

Title: Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix in the Myelodysplastic Syndromes

9. POPIS LITERATURE

1. Labar B, Hauptman E. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga, 1998:75-9

2. Benett JM, Catovski D, Daniel MT, et al. Proposal for the classification of myelodisplasticsyndomes (FAB cooperative group). Br J Haematol 1982; 51:189-99

3. Schumaher HR, Nand S. Myelodysplastic Syndromes. New York ; Tokyo : Igaku-Shoin,1995: 24

4. Swerlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008:89

5. Multani P, Tobiani K, Kakizoe T, Armitage JO, Ohno T, Sugimira T. Report of the fifteenth international symposium of the foundation for promotion of cancer research: new horizons in diagnosis and treatment of hematological malignances based on molecular genetic features. Jnp J Clin Oncol 2002;32(9):371-85

6. Schiller GJ. Myelodisplasia-therapeutic response to novel therapy and the need for new diagnostic groups. Leukemia 2003;17:1183-5

7. Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome (s): a perspective and review highlighting current controversies. Leuk Res 2003;27:95-120

8. Aul C, Giagounidis U, Germing U. Epidemiological features of myelodysplastic syndrome: real or factitous? Int J Hematol 2001;73(4):405-10

9. Mufti GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. Best Pract& Research Clin Haematol 2004;17(4):543-57

10. Warlick ED, Smith BD. Myelodyspladic syndromes: review of pathophysiology and current novel treatment approaches. Curr Cancer Drug Targ 2007;7:541-58

11.Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. Leukemia 2000;14:2-8

12. Nolte F, Hoffmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. Ann Hematol 2008;87:777-95

13. White N, Nacheva E, Asimakopoulos F,Bloxham D, Paul B, Green A. Deletion of chromosome 20q in myelodysplasia can occur in multipotent precursor of both myeloid cells and B cells. Blood 1994;83:2809-916

14. Van Lom K, Hagemeijer A, Smit E, Hahlen K, Groenveld K, Lowenburg B. Cytogenetics clonality analysis in myelodysplastic syndrome: monosomy 7 can be demonstrated in the myeloid and lymphoid lineage. Leukemia 1995;9: 818-21

15. Saitoh K, Miura I, Takahashi N, Miura AB. Fluorescence *in situ* hybridization of progenitor cells obtained by fluorescence-activated cells sorting for detection of cells affected by chromosome abnormality trisomy 8 in patients with myelodysolastic syndromes. Blood 1998; 92:2886-92

16. Haase D, Feuring-Busce M, Schafer C, Schoch C, Troff C,Gahn B.Cytogenetic analysis of $CD34^{+}$ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD 38 an CD117. Leukemia 1997;11:674-9

17. Germing U, Strupp C, Kundgen. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. Haemalogica 2004;89:905-10

18. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 1996;122:135-40

19. Ahmed A, Tollesfbol To. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. J Anti-Aging Med 2003;6(4):315-25

20. Ohyashiki K, Iwama H, Yahata N. Telomere dynamic in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. Leuk Lymphoma 2001;42(3):291-9

21. Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L.Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. Genes Chromosome Cancer 2005;42(3):287-98

22. Pederson-Bjergaard J, Christansen DH, Andersen MK, Skovby F. Causallity of myelodisplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. Leukemia 2002;16: 2177-84

23. Parker JE, Mufti GJ. The role of apoptosis in the pathogenesis of the myelodysplastic symdromes. Int J Hematol 2001;73:416-28

24. Sawanobory M, Yamaguchi S, HasegavaM,Inoue M, Suzuki K, Kamiyama R, Hirokawa K, Kitagawa M. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic sindromes. Leuk Res 2003;27(7):583-91

25. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1998;101(2):220-30

26. Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguier F, Melle J, Picard F, Dreyfus F, Fontenay-Roupie M. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia 1997;11(6):839-45

27. Aizawa S, Nakano M, Iwase O. Bone marow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its abillity to support normal CD 34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. Leuk Res 1999;23:239-46

28. Benett JM. The Myelodysplastic Syndromes, Pathobiology and Clinical Management. New York: Marcel Decker, 2002:124

29. List AF, Vardiman J, Issa JJ, DeWitte T. Myelodysplastic syndromes.Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004;297-317

30. Mattijssen V, Schattenberg A, Schapp N, et al. Outcome of allogenic bone marrow transplantation with myelodysplastic syndromes. Bone Marrow Transplant 1997;19:791-4

31. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. N Engl J Med 1999;340:1649-60

32. Le Beau MM, Olney HJ. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. Best Pract Res Clin Haematol 2001;14:479-95

33. Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML. Deletion of IRF-1 mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. Science 1993;259:968-71

34. Le Beau MM, Espinosa R, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5484-8

35. Ebert BL, Poetz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. Identification of RPS14 as 5q- syndrome gene by RNA interference screen. Nature 2008,451(7176):335-9

36. Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. Jpn J Clin Oncol 2003; 3(4):153-60

37. Look AT, Molecular pathogenesis of MDS. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005;156-60

38. Meccuci C. Molecular features of primary MDS with cytogenetic changes. Leuk Res 1998;22:293-302

39. Willman CL. Molecular genetic features of myelodysplastic syndromes (MDS). Leukemia 1998;12:S1-S6.

40. Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Anderson K, Arvidsson I, Hokland P, Bryder D. Involvement and functional impairment of the $CD34^{+}CD38^{+}Thy\text{-}1^{+}$ hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. Blood 2002;100:259-67

41. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. Blood 2008;111:4841-51

42. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ast-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. Cell 1994;77:307-16

43. Pedersan-Bjergard J, Anderson MK, Christiansen DH, Nerolov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Blood 2002;99:1909-12

44. Aul C, Giagiunidis A, Germing U, Ganser A. Evaluating the prognosis of patients with myelodysplastic disorders. Ann Hematol 2002;81:485-97

45. Thiede C, Steudel C Mohr B. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002;99:4326-35

46. Osato M. Point mutations in RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. Oncogene 2004;23:230-8

47. Gatterman N, Wukfert M, Junge B. Ineffective hematopoiesis linked with mitochondrial tRNA mutation (G3242A) in patients with myelodisplastic syndrome. Blood 2004;103:1499-1502

48. Morgan MA, Reuter CW. Moleculary targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Ann Hematol 2006;85(3):139-63

49. Leone G, Voso MT, Teofili L, Lubbert M. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. Clin Immunol 2003;109:89-102

50. Teofili I, Martini M, Luongo M. Hypermetilation og CpG islands in the promoter region of $p15^{INK4b}$ in acute promyelocytic leukemia represses $p15^{INK4b}$ expression and correlates with prognosis. Leukemia 2003;17:919-24

51. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 2003;349(21):2042-5

52. Egger G, Liang G, Aparicio A, jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004;429:457-463

53. Molldrem JJ, Jiang YZ, Stetler-Stevenson M, Mavroudis D, Hensel N, Barett AJ. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with loss of lymphocyte-mediated inhibition CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. Br J Haematol 1998;102(5):1314-22

54. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyoma K, Aul C, Mufti G, Benett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 1997;89(6):2079-87

55. Maes B, Meeus P, Michaux L,. Bijnens L, Boogaerts M, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Verhoef G. Aplication of the international Prognostic Scoring System for myelodisplastic syndromes. Annals of Oncol 1999;10:825-9

56. Malcovati L,Germing U, Kuendgen A. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 2007;25: 3503-10

57. Curry JL, Trentin JJ, Wolf N. Hemopoietic spleen colony studies II. Erythropoiesis. J Exp Med 1967;125:703-20

58. Barker JE, Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of *Steel* hematopoietic stem cell defects. Exp Hematol 1997; 25:542-7

59. Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science 2004;303:359-63

60. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W, Ross J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003;425:836-41

61. Venezia TA, Moleculare signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PloS Biol 2004;2:341

62. Murphy MJ, Wilson A, Trumpp A. More than just proliferation: Myc function in stem cells. Trends Cell Biol 2005;15:128-37

63. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haempoietic stem cell. Blood Cells 1978;4:7-25

64. Deguchi K, Yagi H, Inada M, Yoshizaki *K*, Kishimoto T, Komori T. Exessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa 1-deficient mice with congenital lack of bone marrow. Biochem. Biophys. Res. Commun 1999;255:352-9

65. Lord BI, Trta NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUc in the normal mouse femur. Blood 1975;46:65-72

66. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhost C, Morrison DJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches from stem cells. Cell 2005;121:1109-21

67. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors 2004;22:233-41

68. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilisation: the roles of chemokins, proteolytic enzymes, adhezion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol 2002;30:973-81

69. Papayannopoulou T. Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. Curr Opin Hematol. 2003;10:214-9

70. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? Blood 2005;11:886-91

71. Ara T, Tokoyoda K, Sugijama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. Immunity 2003;19:257-67

72. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Martin Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest 2000;106:1331-9

73. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nature Immunol 2004;5:247-53

74.Visnjic D, Kalajzic I, Gronowicz G, Aguila HL, Clark SH, Lichtler AC, Rowe DW.Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3k transgenic mice: J Bone Miner Res 2001;16:2222-31

75. Lyman SD,Jacobsen SE. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factor with overlapping yet distinct activites. Blood 1998;91:1101-34

76. Kovach NL, Lin N, Yednock T, Harlan JM, Broudy VC. Stem cell factormodulates activity of α4β1 and α5β1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. Blood 1995;85:159-67

77. Willson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Immunology 2006;6:93-106

78. Soenen-Cornu V, Tourino C, Bonnet ML, Guiller M, Flamant S, Kotb R, Berheim A, Bourhis J-H, Predhome C, Fenaux P, Turhan AG. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short and long-term hematopoiesis in vitro. Oncogene 2005;24:2441-8

79. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, Aran-Trejo RM, Mayani H. *In vitro* characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Resear 2002;26:677-88

80. Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M, Progosova-Agadyanyan E, Abbasi N, Radich JP, eeg JH. Tumor necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: clues to the pathophysiology of MDS. Br J Haematol 2007;140:444-53

81. Soligo D, Campiglio S, Servida F, Bossolasco P, Romiti L, Cortelezzi A, Deliliers GL. Response of myelodysplasic syndrome marrow progenitor cells to stimulation with

cytokine combinations in stroma-free long-term culture system. Br J Haematol 1996;92:548-58

82. Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, Roxas C, Glinsmann-Gibson B, Frutiger Y, Grogan TM, List AF. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukaemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. Blood 2001;97:1427-34

83. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationship and distinctions-a review. Br J Haematol 2008;142:695-708

84. Cotran RS, Kumar VK, Collins T, editors. Robbins Pathologgic basis of disease. 6th edition. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1999:98

85. Penn PE,Jiang D-Z, Fei R-G et al. Dissecting the hematopoietic microenvironment: IX Futher characterisation of murine bone marrow stromal cells. Blood 1993;81:1205-11

86. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell 1992;69:11-21

87. Lichtman MA, Bentler E, Kipps TJ, Seligshon U, Kanshansky K, Prehal JT, editors. Williams Hematology, 7th edition. New York: McGraw-Hill Company, 2006:43-4

88. Timpl R.Laminin structure. Curr Opin Cell Biol 1996;8:618-24

89.Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Purification and characterisation of human laminin-8. J Biol Chem 2001;276(20):17550-8

90. Monturi N, Selleri C, Risitano AM. Expresion of the 67-kD laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. Clin Cancer Res 1999;5:1465-72

91. Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E, Dalchau R, Fabre JW. The gene, MIC4, wich controls expression of antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. Eur J Immunology 1982;12:659-63

92. Screaton Gr, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternative spliced exons. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:12160-4

93. Zhou DF, Ding JF, Picker LJ, Bargatze RF, Butcher EC, Goeddel DV. Molecular cloning and expretion of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homong receptor. J immunol 1989;143:3390-5

94. Stamenkovic I, Amiot M, Presando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell 1989;56:1057-62

95. Ghaffari S, Smadja-Joffe F, Oostendorp R, Levesque J-P, Dougherty G, Eaves A, Eaves C. CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis. Exp Haematol 1999;27:978-93

96. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. FEBS Letters 2003;540:7-14

97. Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW, Berndt MC, Haylock. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. J Immunol 1994;143:4673-83

98.Rubinfeld B, Souza B, Albert I. Association of APC gene product with β-catenin. Science 1993;262:1731-4

99.Hermiston ML, Wong MH,Gordon JI. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epitelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. Genes Dev 1992;10:985-6

100. Nathke IS. The adenomatous poliposis coli protein. J Clin Path: Mol Pathol 1999;52:169-73

101. Karnofsky DA, Burchnel JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: Mac Leod CM, editor. Eveluation of chemotherapeutic agents. New York: Columbia University Press, 1949:196

102. Gaffari S, Landsdorp PM, Eaves AC,Eaves CJ. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expressing ruding normal hematopoiesis and their alternation in chronic myeloid leukemia. Blood 1995;86:2976-85

103. Karmon Y, Manaster J, Chezar J. Immunophenotypic characterisation of myelopoiesis in early and late myelodysplastic syndromes: use of CD44 as an aid in early diagnosis. Cytometry 2002;50:225-30

104. Gadhoum Z, Delaunay J, Maquarre E, Durand L, Lancereaux V, Qi J, Lezenes JR, Chomienne C, Smadja-Joffe F. The effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and proliferation of human acute myeloid leukemia cells. Leuk Lymphoma 2004;45(8):1501-10

105. Khaldoyanidi S, Karakhanova S, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. CD44 variant-specific antibodies trigger hemopoiesis by selective release of cytokines from bone marrow macrophages. Blood 2002;99:3955-61

106. Ilan N, Madri JA. PECAM-1: old friend, new partners. Curr Opin Cell Biol 2003;15:515-24

107. Horny HP, Sotlar K, Valent P. Diagnostic value of histology and immunohistochemistry in myelodysplastic syndromes. Leuk Res 2007;31:1609-16

108. Thiele J, Quitmann H, Wagner S, Fisher R. Dysmegakariopoesis in myelodysplastic syndromes (MDS): an immunomorphometric study of bone marrow trephine biopsy specomens. J Clin Pathol 1991;44:298-302

109. Dhanjal TS, Penderies C, Ross EA, Larson MK, Protty MB, Buckley CD, Watson SP. A novel role of PECAM-1 in megakaryocytokinesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice. Blood 2007;109(10):4237-44

110. Estey EH. Modulation of agiogenesis in patients with myelodysplastic syndrome. Best Pract Res Clin Haematol 2004;17(4):623-39

111. Aguayo A, Kantarijan H, Manshouri T, Giddel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, Brian S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 2000;96(6):2240-5

112. Brunner B, Gunsilius E, Schumacher p, Zwierzina H, Gastl G, Stauder R. Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. J Haematother Stem Cell Res 2002;11(1):119-25

113. Wimazal F, Krauth MT, Vales A, Bohm A, Agis H, Sonneck K, Aichberger KJ, Mayerhofer M, Simonitsch-Kluppm I, Mullauer L, Sperr WR, Valent P. Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes: correlation between VEGF expression and the FAB category. Leuk Lymphoma 2006;47(3):451-60

114. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferucci PF, Buffa R, Lambertenghi-Deliliers G, Pezzela F. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. Br J Cancer 1999; 81(8):1398-1401

115. Korkolopoulo P, Apostolidou E, Pavlopoulos PM, Kavantzas N, Vyniou N, Thymara I, Tepos E, Patsouris E, Yataganas X, Davaris P. Prognostic evaluation of the nicrovascular network in myelodysplastic syndromes. Leukemia 2001;15(9):1369-76

116. Kirkpatrick P, Dardenne AJ Efects of fixation and enzymatic digestion on the immunohistochemical demonstration of laminin and fibronectin in paraffin embedded tissue. J Clin Pathol 1984;37:639-44

117. Winstein MA,Riordan K,Wenc S,Kreczko S, Zhou M, Dainik N. Dual role of fibronectin in in hematopietic differentiation.Blood 1989; 3(1):111-116

118. Sorell JM. Ultrastructural localisation of fibronectin in bone marrow of embryonic chick and its relationship to granulopoiesis. Cell Tissue Res 1988;252:565-71

119. Goltry KL, Patel VP. Specific domains of fibronectin mediate adhesion and migration of early murine erythroid progenitors. Blood 1997;90:138-47

120. Yoder MC, Williams DA. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. Exp Hematol 1995;23:961-7

121. Vogel W, Berndt A, Muller A, Dahse R, Haas KM, Borsi L, Zardi L, Kosmehl H. Differential in vivi and in vitro expression of ED-B+ fibronectin an adult human hematopoiesis. Int J Mol Med 2003;12:831-7

122. Steensma DP, List AF. Genetic testing in the myelodisplastic syndromes: molecular insights into hematologic diversity. Mayo Clin Proc 2005; 80(5):681-698

123. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. Thr relative spatial distibutions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. Blood 1975;46:65-72

124. Balduino A, Hurtado SP, Frazão P, Takiya CM, Alves LM, Nasciutti E, El-Cheikh MC, Borojevic B.Bone marrow subendosteal microenviroment harburs functionally distinct haemosupportive stromal cell population. Cell Tissue Res 2005;319:255-66

125. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL.Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. Blood 2004;103:3258-64

126. Zhang J, Niu , Ye L, Huang H, Tong H, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S,. Wiedemann LM, Yuji Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003;425:836-41

127. Soligo DA, Oriani A, Annaloro C. CD34 immunohistochemistry of bone marrow biopsies: prognostic significance in primary myelodysplastic syndromes. Am J Hematol 1994;46:9-17

128. Vardiman JW. Hematopathological concepts and cntroversies in the diagnosis and classification if myelodysplastic syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006;199-204

129. Steensma DP, Hanson CA, Letendre L, Tefferi A. Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity? Leuk Res 2001;25:829-38

130. Giles FJ, Koeffler HP. Secondary myelodysolastic syndromes and leukemia. Curr Opin Hematol 1994;I:256-60

131. Barett J, Sauntharajah Y, Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases lined by a common pathophysiology? Semin Hematol 2000;37:15-29

132. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Valent P, Fonatsch C, Lubert M, Haase D, Steidl D, Krieger O, Stauder R, Giagounidis AAN, Strupp C, Kundgen A, Mueller T, Haas R, Gattermann N, Aul C. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary nyelodysplastic syndromes (MDS). Leukemia 2005;19:2223-31

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Nives Ljubić

Datum i mjesto rođenja: 24. 11. 1963. god., Mostar, BiH

Školovanje i stručno usavršavanje:

1981. – 1986. god.:	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1988. god.:	Položen stručni ispit
1987. – 1989. god.:	Poslijediplomski studij iz alergologije i kliničke imunologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2000. – 2001. god.:	Poslijediplomski studij iz kliničke citologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2003. god.:	Položen specijalistički ispit

Akademski stupnjevi:

1986. god.:	doktor medicine
1988. god.:	odobrenje za samostalan rad
1992. god.:	magistar znanosti
2003. god.:	specijalist kliničke citologije

Zaposlenja:

1987. – 1988. god.:	liječnik na stažu, KB „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb
1988. – 1990.god.:	liječnik opće medicine, Dom zdravlja „Centar“, Zagreb
1990. – 1993.god.:	istraživač suradnik, Imunološki zavod, Zagreb
1994. – 1995. god.:	istraživač suradnik, National Cancer Institut, National Institutes of Health, Bethesda, USA
1996. – 1998. god:	voditelj Medicinskog odjela u Zagrebu, International Organisation for Migration (IOM), Zagreb
1998. – 2002. god.:	specijalizant kliničke citologije, OB „Sveti Duh“, Zagreb
2003. – 2010. god.:	specijalist citolog, KB „Sveti Duh“, Zagreb