

Univerza v Ljubljani



FAKULTETA ZA FARMACIJO

Klementina Berce

**SPREMLJANJE UČINKOVITOSTI KELACIJE  
NAKOPIČENEGA ŽELEZA IZ TELESA  
Z DOLOČITVIJO KONCENTRACIJE FERITINA**

MONITORING THE EFFECTIVENESS OF CHELATION OF IRON OVERLOAD  
FROM THE BODY BY MEASURING THE FERRITIN CONCENTRATION

UNIVERZITETNI ZNANSTVENI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA  
MAGISTERIJ ZNANOSTI

Ljubljana, 2016

Mentor:

Prof. dr. Peter Černelč, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm., predsednik

Prof. dr. Peter Černelč, dr. med., član

Izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm., članica

Laboratorijski del magistrske naloge je bil izveden v Splošni bolnišnici Izola in na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Klinični del magistrskega dela pa je potekal v Splošni bolnišnici Izola in na Hematološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo z naslovom *Spremljanje učinkovitosti kelacije nakopičenega železa iz telesa z določitvijo koncentracije feritina* izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med..

Klementina Berce, univ. dipl. kem.

## ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Černelču, dr. med., se zahvaljujem za strokovno pomoč, usmeritve, napotke in nasvete pri nastajanju ter izvajanju tega dela.

Zahvaljujem se spoštovani gospe Saški Lozar, dr. med., za nesebično pomoč pri zbiranju podatkov, prijazne spodbude, potrpežljivost in čas, ki sva ga zaradi raziskave prebili skupaj.

Iskrena zahvala vsem, ki so bili pripravljeni podpreti klinično in laboratorijsko izvedbo te magistrske naloge.

*Andrej, Helena, Kaja..... hvala.*

## KAZALO

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD                                                                                        | 13 |
| 1.1. ANEMIJE                                                                                   | 13 |
| 1.1.1. Mielodisplastični sindrom (MDS)                                                         | 14 |
| 1.1.2. Diamond-Blackfanova anemija (DBA)                                                       | 16 |
| 1.2. HOMEOSTAZA ŽELEZA                                                                         | 16 |
| 1.2.1. Eritrofagocitoza in recikliranje hemskega železa z makrofagi                            | 18 |
| 1.2.2. Feritin                                                                                 | 19 |
| 1.3. PATOFIZIOLOŠKO PREKOMERNO KOPIČENJE ŽELEZA IN TRANSFUZIJSKA OBREMENITEV                   | 20 |
| 1.4. VREDNOTENJE PREOBREMENJENOSTI Z ŽELEZOM                                                   | 22 |
| 1.4.1. Laboratorijska diagnostika pri MDS                                                      | 24 |
| 1.5. ZDRAVLJENJE TRANSFUZIJSKE HEMOKROMATOZE S KELACIJO                                        | 25 |
| 1.5.1. Deferasiroks                                                                            | 26 |
| 2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE                                                                      | 29 |
| 3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE                                                           | 31 |
| 3.1. PREISKOVANCI                                                                              | 31 |
| 3.2. BIOLOŠKI VZORCI                                                                           | 31 |
| 3.3. ANALIZNE METODE                                                                           | 32 |
| 3.3.1. Določitev serumskih koncentracij feritina (S-feritin)                                   | 32 |
| 3.3.1.1. Določanje koncentracij S-feritina na analizatorju Abbot Architect i2000SR             | 32 |
| 3.3.1.2. Določanje koncentracij S-feritina na analizatorju ADVIA Centaur XP Immunoassay System | 33 |
| 3.3.2. Določanje koncentracij CRP v serumskih vzorcih bolnikov                                 | 34 |
| 3.3.3. Določanje koncentracij kreatinina v serumskih vzorcih bolnikov                          | 34 |
| 3.3.4. Določanje katalitičnih aktivnosti AST v serumskih vzorcih bolnikov                      | 35 |
| 3.3.5. Določanje katalitičnih aktivnosti ALT v serumskih vzorcih bolnikov                      | 36 |
| 3.3.6. Določanje katalitičnih aktivnosti $\gamma$ GT v serumskih vzorcih bolnikov              | 37 |
| 3.3.7. Določanje koncentracij hemoglobina v vzorcih venske krvi bolnikov                       | 37 |
| 3.4. STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV                                                        | 38 |
| 4. REZULTATI                                                                                   | 39 |
| 4.1. ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO                                       | 39 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. RAZDELITEV PREISKOVANCEV                                             | 41 |
| 4.3. SPREMLJANJE PREOBREMENJENOSTI Z ŽELEZOM Z RAZLIČNIMI<br>PARAMETRI    | 44 |
| 4.3.1. Količina vnesenega železa s transfuzijo koncentriranih eritrocitov | 44 |
| 4.3.2. Odmerjanje kelatorja                                               | 45 |
| 4.3.3. Kelacijski indeksi in koncentracije S-feritina                     | 47 |
| 4.3.4. Biokemični parametri za oceno funkcije jeter in ledvic             | 51 |
| 5. RAZPRAVA                                                               | 54 |
| 6. SKLEPI                                                                 | 62 |
| 7. LITERATURA                                                             | 63 |

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                     |                                                                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AML                 | akutna mieloična anemija                                                                              |
| ALT                 | alaninska aminotransferaza                                                                            |
| AST                 | aspartatna aminotransferaza                                                                           |
| CRP                 | C-reaktivni protein                                                                                   |
| CYP450              | encim citokrom P450                                                                                   |
| DBA                 | Daimond-Blackfanova anemija                                                                           |
| DFO                 | Desferal                                                                                              |
| DFP                 | Deferipron                                                                                            |
| DMT1                | divalentni kovinski transporter ( <i>ang.</i> divalent metal transporter 1)                           |
| DNA                 | dezoksiribonukleinska kislina                                                                         |
| ELISA               | encimska imunoabsorpcijska preiskava ( <i>ang.</i> Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)                 |
| ESD                 | statistični test za izločanje ubežnih vrednosti ( <i>ang.</i> Extreme Studentized Deviate)            |
| FAB                 | <i>ang.</i> French-American-British Classification                                                    |
| Fe                  | železo                                                                                                |
| G6PD                | glukoza-6-fosfat dehidrogenaza                                                                        |
| H                   | težka feritinska podenota                                                                             |
| HA                  | hemolitična anemija                                                                                   |
| Hb                  | hemoglobin                                                                                            |
| IFCC                | Mednarodno združenje za klinično kemijo ( <i>ang.</i> International Federation of Clinical Chemistry) |
| IL                  | interlevkin                                                                                           |
| IPSS                | mednarodni prognostični ocenjevalni sistem ( <i>ang.</i> International Prognostic Score System)       |
| KE                  | koncentrirani eritrociti                                                                              |
| K <sub>3</sub> EDTA | trikalijeva etilendiamintetraocetna kislina                                                           |
| L                   | lahka feritinska podenota                                                                             |
| LDH                 | laktatna dehidrogenaza                                                                                |
| LIC                 | koncentracija železa v jetrih ( <i>ang.</i> liver iron concentration)                                 |
| LPI                 | labilno plazemsko železo ( <i>ang.</i> labile plasma iron)                                            |

|              |                                                                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MB           | mieloproliferativna bolezen                                                                                                        |
| MDS          | mielodisplastični sindrom                                                                                                          |
| Mr           | molekulska masa                                                                                                                    |
| MRI          | slikanje z magnetno resonanco ( <i>ang.</i> Magnetic Resonance Imaging)                                                            |
| NAD          | nikotinamid adenin dinukleotid                                                                                                     |
| NADH         | reducirana oblika NAD                                                                                                              |
| Ng           | nevtrofilni granulociti                                                                                                            |
| NTBI         | železo nevezano na transferin ( <i>ang.</i> Not Transferin Binding Iron)                                                           |
| PM           | primarna mielofibroza                                                                                                              |
| RA           | refraktarna anemija                                                                                                                |
| ROS          | reaktivne kisikove spojine                                                                                                         |
| RES          | retikuloendotelni sistem                                                                                                           |
| SA           | sideroblastna anemija                                                                                                              |
| TF           | transferin                                                                                                                         |
| TFR1         | transferinski receptor                                                                                                             |
| TIBC         | celokupna vezavna kapaciteta za železo ( <i>ang.</i> Total Iron Binding Capacity)                                                  |
| TM           | telesna masa                                                                                                                       |
| TNF $\alpha$ | dejavnik tumorske nekroze alfa                                                                                                     |
| Tr           | trombociti                                                                                                                         |
| WPSS         | prognostični ocenjevalni sistem, ki temelji na klasifikaciji SZO ( <i>ang.</i> WHO classification-based Prognostic Scoring System) |
| $\gamma$ GT  | gama-glutamil transferaza                                                                                                          |



## POVZETEK

Podporno zdravljenje hudih anemij, nastalih zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov, poteka s transfuzijami koncentriranih eritrocitov. Posledica te terapije je transfuzijska hemokromatoza oziroma kronično kopičenje železa zaradi rednih transfuzij pri bolnikih s hudimi anemijami. To je resen zaplet, saj telo nima ustreznega mehanizma, s katerim bi nakopičeno železo lahko odstranilo. Brez kelacijskega zdravljenja lahko presežno železo povzroči odpoved raznih organov, npr. jeter, srca in endokrinih žlez. Cilj kelacijskega zdravljenja je torej zaščita pred zapleti, ki jih lahko povzroči transfuzijsko nakopičeno železo. Med novejšje kelatorje sodi deferasiroks, bolnikom prijazno zdravilo, ki se ga uživa enkrat dnevno.

V okviru magistrske naloge smo ugotavljali uspešnost odstranjevanja nakopičenega železa iz telesa z uporabo omenjenega kelatorja. To smo določali s koncentracijami serumskega feritina, ki korelirajo s količinami transfuzijsko nakopičenega železa. Namen naše raziskave je bil ugotoviti povezavo med koncentracijo serumskega feritina in prejetim odmerkom zdravilne učinkovine deferasiroks.

V raziskavo smo vključili 29 bolnikov z različnimi oblikami hudih anemij, ki so potrebovali podporno zdravljenje z rednimi transfuzijami koncentriranih eritrocitov. Vsi so prejeli deferasiroks. Sedem jih je obiskovalo hematološko ambulantno Splošne bolnišnice Izola, preostalih 22 pa hematološko ambulantno Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Bolnikom smo z rutinskimi kemiluminiscenčnimi analizami redno merili serumske koncentracije feritina. Glede na serumske koncentracije feritina, določene ob zaporednih obiskih ambulate in s tem povezano uspešnost kelacije transfuzijsko nakopičenega železa, smo jih razdelili v tri skupine. V prvo smo uvrstili bolnike s padajočo koncentracijo serumskega feritina in uspešno kelacijo, v drugo tiste s stabilno koncentracijo serumskega feritina in zadovoljivo kelacijo, v tretjo pa tiste z naraščajočo koncentracijo serumskega feritina in neuspešno kelacijo. Pri večini ambulantnih obravnav bolnikov smo merili tudi serumske aktivnosti jetrnih encimov AST, ALT in  $\gamma$ GT ter koncentracije kreatinina v serumu.

Razmerje med enkratno, s transfuzijo vneseno količino železa ter količino prejetega kelatorja do naslednje transfuzije KE, smo označili kot kelacijski indeks, in sicer pri vsakem ambulantnem obisku. Statistično značilno povezavo med količinami serumskega feritina in kelacijskimi indeksi smo ugotovili samo pri bolnikih z dinamiko upadanja

serumskega feritina. S primerjanjem kelacijskih indeksov določenih v vseh treh skupinah bolnikov smo s Kruskal-Wallisovim testom potrdili, da se kelacijski indeksi v skupini bolnikov z naraščajočim trendom koncentracije serumskega feritina statistično razlikujejo od tistih določenih v ostalih dveh skupinah ( $p = 0,003$  in  $p = 0,001$ ). Kot statistično značilno smo opredelili tudi povezanost začetnih in končnih nivojev serumskega feritina pri vseh preiskovancih ( $p = 0,0021$ ). Prav tako je med našimi podatki obstajala statistično značilna korelacija med koncentracijami serumskega feritina in prejetimi odmerki deferasiroksa ( $p < 0,0001$ ). Ker nismo zaznali znatnejših tendenc naraščanja ostalih biokemičnih parametrov, zaključujemo, da deferasiroks pri naših preiskovancih ni imel statistično značilnega vpliva na njihovo jetrno in ledvično funkcijo.

Kljub omejitvi, da sodi med reaktante akutne faze, ostaja serumski feritin uporaben diagnostičen parameter za spremljanje nakopičenega železa pri bolnikih s sekundarno hemokromatozo, in sicer zaradi cenovno ugodnih in dobro standardiziranih laboratorijskih meritev.

## ABSTRACT

Transfusion of packed red blood cells represents a supportive treatment of severe anemias due to lack of formation of red blood cells. Secondary hemochromatosis is a chronic iron overload due to regular transfusions in patients with severe anemia. It represents a serious complication, because the body does not have an effective mechanism to remove accumulated iron. Without appropriate chelating treatment iron overload can cause failure of several organs: liver, heart and endocrine glands. The purpose of the chelation treatment is protection against complications that can be caused by iron overload. Newest chelator deferasirox is a patient-friendly medicine that is taken orally once a day.

In our work, we determined the success of removal of accumulated iron from the body using deferasirox. The effectiveness of the chelating treatment was determined by the concentration of serum ferritin, which is a marker of transfusion accumulated iron. The aim of our study was to find a correlation between serum ferritin concentrations and doses of the chelator deferasirox.

Twenty-nine patients with various forms of severe anemia were included in the study. They needed a supportive therapy with regular transfusions of packed red blood cells and all of them received chelator deferasirox. Seven patients were treated in General Hospital Izola, while the remaining twenty-two patients were treated in University Medical Centre Ljubljana. We measured serum ferritin by routine chemiluminescence analysis. Patients were divided into three groups according the dynamics of serum ferritin in consecutive visits, and consequently, the chelation effectiveness of transfusion accumulated iron. The first group represents patients with decreasing concentration of serum ferritin and effective chelation; the second group patients with stable serum ferritin concentration and satisfactory chelation and the third group patients with increasing concentrations of serum ferritin and unsuccessfully chelation. Serum activities of liver enzymes AST, ALT and  $\gamma$ GT and serum creatinine were also monitored to determine the liver and renal function modifications.

An index that represents the ratio between the amount of iron entered by single transfusion and quantity of taken chelator between two sequential transfusions was calculated for each outpatient visit. We found a statistically significant correlation between the serum ferritin and indexes only in patients of the first group with the dynamics of falling concentrations of serum ferritin. By comparing the indexes of all three groups with Kruskal Wallis Test,

we found that indexes of the third group were statistically different from those of the other two groups ( $p = 0,003$  in  $p = 0,001$ ). Statistically, we confirmed the relationship between the initial and final concentrations of serum ferritin ( $p = 0,0021$ ) in all subjects. There was also a statistically significant correlation between the concentration of serum ferritin and the dose of deferasirox ( $p < 0,0001$ ). We did not detect significant changes in liver and renal functions.

Despite the fact that serum ferritin is the acute phase marker, it remains a useful diagnostic parameter for monitoring iron overload in patients with secondary hemochromatosis, due to its affordable and well standardized laboratory measurements.

# 1. UVOD

## 1.1. ANEMIJE

Anemija je pogosto bolezensko stanje, pri katerem sta zmanjšani koncentracija eritrocitov in/ali koncentracija hemoglobina v krvi. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je anemijo definirala kot klinično stanje, pri katerem je koncentracija hemoglobina manjša od 120 g/L pri ženskah in manjša od 130 g/L pri moških (1).

Anemije so posledica krvavitev, pomanjkljivega nastajanja ali povečane razgradnje eritrocitov oziroma kombinacije teh pojavov. Lahko jih ločimo glede na številne značilnosti eritrocitov, npr. njihovo morfologijo in glede na osnovno etiologijo bolezni. Pogosto jih delimo na anemije z nezadostno eritropoezo in na anemije, nastale zaradi prevelike izgube eritrocitov (2).

V Preglednici 1 so predstavljene kronične anemije s pomanjkljivim nastajanjem eritrocitov. Številne med njimi so redke. Hude kronične anemije zahtevajo pri številnih bolnikih zdravljenje z rednimi transfuzijami eritrocitov, velikokrat tudi doživljenjsko (2, 3). V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na tiste vrste hudih anemij, pri katerih kronično nadomestno zdravljenje s transfuzijami koncentriranih eritrocitov (KE) povzroča prekomerno kopičenje železa in je za to potrebno tudi zdravljenje s kelatorji železa.

**Preglednica 1:** Anemije, ki so posledica pomanjkljivega nastajanja eritrocitov (3).

| Anemija                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aplazija kostnega mozga: <ul style="list-style-type: none"><li>• vključuje eno celično vrsto (Diamond-Blackfanova anemija ali čista aplastična anemija),</li><li>• vključuje vse tri vrste krvnih celic.</li></ul> |
| Hipoplastična anemija (Fanconijeva anemija)                                                                                                                                                                        |
| Mielodisplastični sindromi (MDS)                                                                                                                                                                                   |
| Presaditev krvotvornih matičnih celic: <ul style="list-style-type: none"><li>• levkemija,</li><li>• tumorji z razsevky v kosteh,</li><li>• mielofibroza z mieloidno metaplazijo.</li></ul>                         |
| Oslabljeno nastajanje eritropoetina (kronična ledvična bolezen)                                                                                                                                                    |
| Zdravljenje s citotoksičnimi učinkovinami (supresija sinteze DNA)                                                                                                                                                  |
| Displastična eritropoeza (kongenitalna diseritropoetična anemija tipa I, II in III)                                                                                                                                |

### 1.1.1. Mielodisplastični sindromi (MDS)

Mielodisplastični sindrom je posledica klonске napake, ki vpliva na krvotvorne matične celice kostnega mozga. Nastali displastični klon celic poveča lastno proliferacijo. Gre za heterogeno skupino bolezni s končno odpovedjo delovanja kostnega mozga (Preglednica 2). Za MDS so značilni: neučinkovita hematopoeza (povečana apoptoza vodi v periferno citopenijo), citopenija in tveganje za prehod v akutno mieloično levkemijo (AML) (1, 2, 4 20, 21).

Razlikujemo primarne ali idiopatske (neznan vzrok) in sekundarne MDS (posledica izpostavljenosti toksičnim vplivom, npr. pri zdravljenju druge novotvorbe s kemoterapijo ali z obsevanjem z ionizirajočimi žarki) (4).

**Preglednica 2.** Vrste MDS (4).

| Mielodisplastični sindromi (MDS)                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Oznaka       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Refraktarna citopenija z enovrstno displazijo: <ul style="list-style-type: none"><li>• refraktarna anemija (<math>Hb &lt; 110 \text{ g/L}</math>),</li><li>• refraktarna nevtropenija (<math>Ng &lt; 1,5 \times 10^9/L</math>),</li><li>• refraktarna trombocitopenija (<math>Tr &lt; 100 \times 10^9/L</math>).</li></ul> | RCED<br>RA   |
| Refraktarna anemija s prstanastimi sideroblasti                                                                                                                                                                                                                                                                            | RAPS         |
| Refraktarna citopenija z večvrstno displazijo                                                                                                                                                                                                                                                                              | RCVD         |
| Refraktarna anemija s presežkom blastov                                                                                                                                                                                                                                                                                    | RAPB         |
| MDS z delecijo daljšega kraka kromosoma 5                                                                                                                                                                                                                                                                                  | MDS-del (5q) |
| Neklasificirani MDS                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | MDS-NK       |

Legenda: Hb – hemoglobin; Ng – nevtrofilni granulociti; Tr – trombociti.

Za MDS je značilno predvsem nenormalno dozorevanje (displazija) vseh treh krvnih celičnih vrst. Klinična slika MDS vključuje pancitopenijo, in sicer anemijo, nevtropenijo in trombocitopenijo. Kostni mozeg je običajno hipercelularen (do 20 % blastov), povečana pa je tudi intramedularna apoptoza. V obarvanem razmazu venske krvi najdemo značilno makrocitozo, anizocitozo (različne velikosti eritrocitov) in poikilocitozo (različne eritrocitne oblike), hiposegmentirane in hipogranulirane nevtrofilne granulocite ter hipogranulirane trombocite. Anemija je najpogostejša oblika citopenije pri MDS (21).

Ob postavitvi diagnoze je anemičnih vsaj 80 % bolnikov, približno 50 % pa ima koncentracijo hemoglobina  $< 100$  g/L (37). Stopnja anemije pri bolnikih z MDS napoveduje prognozo. Vedno moramo izključiti druge vzroke anemij, kot so npr. krvavitve iz prebavil, hemoliza, ledvično popuščanje in pomanjkljiva absorpcija železa iz hrane.

MDS se pogosto razvije v akutno levkemijo. V preteklosti je bil delež blastov v kostnem mozgu edini napovedovalec levkemične transformacije. Novejše prognostično orodje je IPSS (*ang.* International Prognostic Score System), ki je bilo izdelano na osnovi retrospektivnih raziskav. Vsebuje tri učinkovite, neodvisne prognostične kriterije, in sicer delež blastov v kostnem mozgu, kariotip in število citopenij v venski krvi, s katerimi lahko napovemo celokupno preživetje in tveganje za levkemično transformacijo MDS (prehod v AML). V uporabi je tudi točkovnik WPSS (*ang.* WHO classification-based Prognostic Scoring System), ki dopolnjuje IPSS še z upoštevanjem odvisnosti bolnikov od transfuzij KE (1, 4, 53).

Bolniki z MDS imajo težave zaradi simptomatske anemije, okužb in krvavitev, kot tudi zaradi prehoda v AML. Več tovrstnih bolnikov umre zaradi posledic odpovedi kostnega mozga kot pa zaradi transformacije bolezni v AML. Razlikovanje med MDS in AML je odvisno od posameznega zdravnika, saj bolniki z 20 do 30 % blastov sodijo po kriterijih FAB (*ang.* French-American-British) v skupino z MDS, po klasifikaciji SZO pa v skupino AML (37, 53).

Osnovno zdravljenje anemije pri bolnikih z MDS poteka s transfuzijami KE ali z rekombinantnim eritropoetinom. Koncentracija hemoglobina, ki terja transfuzije KE, je odvisna od starosti bolnika, simptomov in drugih prisotnih obolenj. Dajanje transfuzije KE se priporoča asimptomatskim bolnikom s koncentracijo hemoglobina  $< 80$  g/L (37).

Večina bolnikov z MDS je doživljenjsko odvisnih od transfuzij, kar predstavlja neodvisni negativni napovedni dejavnik. Stalna transfuzijska podpora namreč vodi v prekomerno kopičenje železa v telesu, posledica česar je sekundarna ali transfuzijska hemokromatoza z možnimi dolgoročnimi okvarami jeter, srca, trebušne slinavke in endokrinih žlez (4, 20, 37).

Preživetje bolnikov z MDS, ki ne potrebujejo transfuzij KE, je znatno daljše od preživetja tistih, ki jih potrebujejo (13).

Retrospektivne študije bolnikov z MDS z majhnim tveganjem nakazujejo na možno izboljšanje preživetja transfuzijsko odvisnih bolnikov, ki sočasno prejemajo kelacijsko zdravljenje za odstranjevanje viška železa (20).

### 1.1.2. Daimond-Blackfanova anemija (DBA)

Je zelo redka vrsta prirojene aplazije rdečih krvnih celic. Izhaja iz ribosomske okvare, pri kateri so eritrocitni predhodniki zelo občutljivi na apoptozo, zato je eritropoeza neuspešna. Posledica je anemija z normalno trombocitno in mieloično celično vrsto (24).

Bolezen srečamo pri otrocih v 8. oziroma 12. tednu starosti. Za klasično obliko DBA je značilna makrocitna ali normocitna anemija, s pomanjkanjem eritrocitnih predhodnikov, retikulocitopenija ter normalno število nevtrofilcev in trombocitov (2).

Sedemdeset odstotkov bolnikov se sprva odzove na steroidno terapijo, pri čemer pa 40 % teh sčasoma potrebuje dolgoročno redno zdravljenje s transfuzijo KE, v kolikor zanje ne najdejo ustreznega darovalca krvotvornih matičnih celic za presaditev (25).

## 1.2. HOMEOSTAZA ŽELEZA

Železo je hkrati nujno za življenje in potencialno smrtno v prevelikih količinah. Nujno je potrebno za zagotavljanje prenosa kisika in za katalizo reakcij, ki sodelujejo pri prenosu elektronov, fiksacije dušika in sinteze DNA. Toksično lahko deluje zaradi svoje sposobnosti reagiranja s kisikom in kataliziranja nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS, *ang.* Reactive Oxygen Species). V raztopinah lahko obstaja v dveh oksidacijskih stanjih kot  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$ . Je zelo slabo topno pri fiziološki vrednosti pH.

Normalna vsebnost železa v telesu je med 3 in 4 g. Nahaja se (1, 37):

- v hemoglobinu v eritrocitih (približno 2,5 g),
- v drugih železo vsebujočih proteinih, kot so: mioglobin, citokromi, katalaza (400 mg),
- vezano na transferin v plazmi (3 do 7 mg),
- kot zaloga v obliki feritina ali hemosiderina; odrasli moški ga skladiščijo približno 1 g v jetrih, vranici in kostnem mozgu, pri ženskah pa je uskladiščeno v manjši količini, odvisno od menstrualnih ciklov, nosečnosti, porodov, laktacije in vnosa železa s prehrano.

Dnevno naše telo proizvede 200 bilijonov eritrocitov, za kar potrebuje približno 20 do 25 mg železa (16). Večino ga priskrbi z recikliranjem, to je s fagocitozo in katabolizmom odsluženih eritrocitov v tkivnih makrofagih. Ta proces zagotavlja, da se reciklira približno 25 do 30 mg železa na dan, kar torej ustreza dnevnim potrebam eritropoeze. Manjši delež železa pa telo priskrbi s črevesno absorpcijo iz hrane. Ta je omejena na dvanajsternik in poteka preko zrelih enterocitov, prisotnih na črevesnih resicah. Železo se namreč absorbira



The diagram illustrates the systemic iron metabolism cycle. At the top, the **ENTEROCIT** (intestinal cell) is shown with **Fe-reduktaza** (ferroportin) and **DMT1** transporters.  $Fe^{3+}$  is reduced to  $Fe^{2+}$  and absorbed into the cell.  $Fe^{2+}$  is then oxidized back to  $Fe^{3+}$  by **Fe-oksidaaza** (hepcidin) and exported via **feroportin**. The **jetra** (liver) stores iron and releases **hepcidin** to regulate iron export from macrophages and the bone marrow. The **MAKROFAG** (macrophage) stores iron in **shranjen feroportin** and releases  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  into the circulation. The **ERITROBLAST** (erythroblast) in the **kostni mozeg** (bone marrow) takes up iron via **TFR1** and **DMT1** for hemoglobin synthesis. The **Fe-TF** (transferrin) complex is shown circulating between the liver, bone marrow, and erythrocytes. The **ERITROBLAST** also shows **Fe-oksidaaza** and **DMT1** transporters.

Osrednji del slike prikazuje pot železa v telesu. Po absorpciji v tankem črevesu prehaja železo v kostni mozeg, kjer se tvorijo eritrociti, ter v jetra, kjer se skladišči. Ostarele eritrocite fagocitirajo tkivni makrofagi, predvsem v vranici. Pri tem se železo reciklira. Po potrebi se lahko železo iz jeter ponovno sprošča v kri. V krvi se do ustreznih tkiv prenaša vezano na transferin (TF). (A) Prenos nehemskega železa preko črevesnega enterocita. (B) V tkivnem makrofagu se vrši eritrofagocitoza ter recikliranje železa. (C) V hepatocitu se železo skladišči. Iz jeter se izloča tudi hepcidin. (D) Uporaba železa za izgradnjo hemoglobina v eritroblastu.

Celokupna vsebnost železa pri odraslih predstavlja ravnovesje med njegovo izgubo in njegovo absorpcijo iz hrane. Železo izgubljammo z znojem, odluščenimi celicami kože ter preko gastrointestinalnega trakta z blatom (približno 1 mg / dan). Dodatnega 0,5 do 1 mg železa na dan izgubi ženska med menstrualnim ciklom. Dnevna izguba železa se pri človeku uravnava z absorpcijo iz hrane (približno 1 do 2 mg) (37).

Človekovo telo vsebuje številne beljakovine za prenos železa v krvi, za njegov transport skozi celične membrane, za njegovo shranjevanje v netoksični obliki in stanju, ki omogoča njegovo hitro mobilizacijo.

Železo je v plazmi vezano na transferin (TF), prenašalni protein, ki nastaja v jetrih in se izloča iz njih. Vsebuje dve visoko afinitetni vezavni mesti, specifični za  $\text{Fe}^{3+}$ . Za vezavo železa na transferin so potrebni karbonatni ali bikarbonatni ioni (1). Večina železa, ki se absorbira v črevesju, se s transferinom prenese v kostni mozeg, kjer se vgrajuje v novo nastale, razvijajoče se eritrocite.

Transferin posreduje tudi vnos železa v celice, in sicer preko celičnih površinskih transferinskih receptorjev (TFR). Transferinski receptor (TFR) je dimer iz dveh enakih podenot, molekulske mase 95 kDa. Ko se kompleks transferin –  $\text{Fe}^{3+}$  veže na TFR, vstopi v celico z endocitozo. Tu se nato železo sprostí iz transferina zaradi nižje vrednosti endosomskega pH. Encim ferireduktaza reducira  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ , ki ga iz endosomov v citosol prenese kotransporter  $\text{Fe}^{2+}$  DMT1 (*ang.* divalent metal transporter 1, dvovalentni kovinski transporter 1). Ta obstaja v več izooblikah. Ena od teh se pretežno izraža na apikalni strani enterocitov v dvanajsterniku in omogoča nadaljevanje zelo specifične poti prehranskega  $\text{Fe}^{2+}$ . Druga oblika pa je prisotna v skoraj vseh tkivih in je klasični endosomski prenašalec železa (1, 16).

### **1.2.1. Eritrofagocitoza in recikliranje hemskega železa z makrofagi**

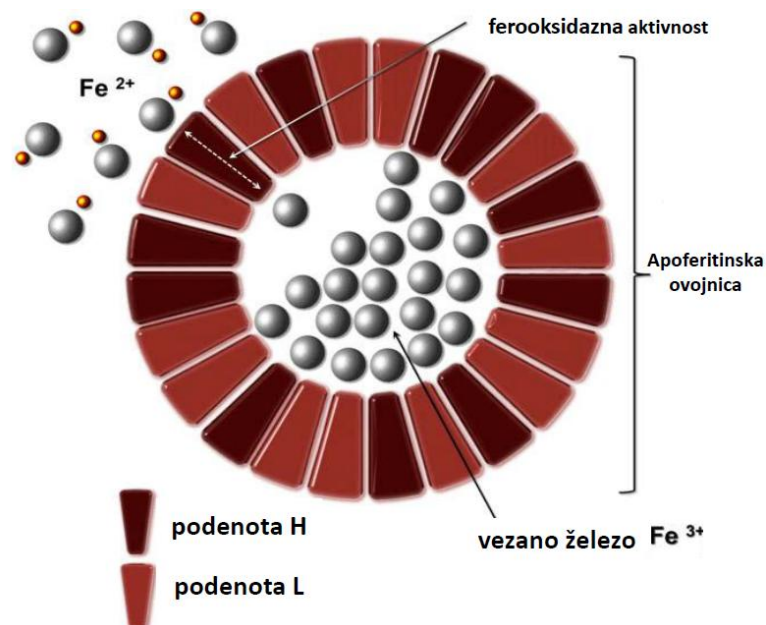
Ko eritrociti odmro, celotne rdeče krvničke zajamejo in razgradijo makrofagi v vranici (Slika 1) ali kostnem mozgu, v retikuloendotelnem sistemu (RES), v manjši meri pa tudi Kupferjeve celice v jetrih. Tkivni makrofagi izražajo zelo malo TFR, zato pridobivajo železo pretežno v obliki hemoglobina z eritrofagocitozo ostarelih eritrocitov. Železo se ekstrahira iz hema in se, vezano na transferin, vrača v kostni mozeg za ponovno uporabo. Tisti njegov del, ki se ne uporabi takoj (manjše količine), shrani v različnih tkivih v obliki feritina (1, 23). Kot smo že omenili je dnevna količina z makrofagi recikliranega železa okrog 20 do 25 mg in zadostuje za potrebno eritropoezo (1, 16).

### 1.2.2. Feritin

Feritin je protein, sestavljen iz 24 podenot. Feritinska molekula je zgrajena iz različnih deležev podenot oziroma verig, in sicer podenote L (lahke ali *ang.* liver, jetra) z Mr 19.500 in H podenote (težke ali *ang.* heart, srce) z Mr 21.000 (Slika 2). Razmerje med podenotami je odvisno od vrste tkiva. Srce in ledvice vsebujejo feritin z največ podenotami H, medtem ko v jetrih in vranici najdemo pretežno feritin bogat s podenotami L (6). Pod vplivom citokinov akutne faze (IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ ) nastane molekula feritina z več podenotami H (18).

Podenote so razporejene v obliki votle krogle, v katero se lahko uskladišči 4.000 do 4.500 atomov železa (26, 33). Shranjevanje železa v feritinu ima dve pomembni vlogi:

- shranjeno železo je v feri obliki Fe<sup>3+</sup>, kar zmanjšuje njegovo toksičnost (34),
- ko je v citosolu veliko železa, se poveča sinteza feritina, v katerem se lahko njegov višek uskladišči; tako shranjeno železo pa se nato lahko mobilizira in uporabi pri presnovi vsakokrat, ko se v celicah pojavi potreba po njem (35).



**Slika 2: Struktura feritina;** povzeto po (6).

Železo Fe<sup>3+</sup> je shranjeno kot mineral ferihidrit v okroglem vsebniku, ki ga tvori apoferitin. Protein, ki ne vsebuje železa, imenujemo apoferitin, proteinsko strukturo z vezanim železom pa feritin. Apoferitinska ovojnica je sestavljena iz 24 podenot, tipov H in L, katerih razmerje je odvisno od vrste tkiva in morebitno prisotnega vnetja.

Feritin nastaja v številnih telesnih celicah in se iz njih izloča v plazmo, pri čemer njegova plazemska količina predstavlja le del celokupnega feritina v telesu. Njegovo izločanje v plazmo lahko posredujejo številni dejavniki, zato je določanje serumskega feritina v številnih pomembnih kliničnih okoliščinah nespecifično. Tako npr. pomanjkanje askorbata in hipotiroidizem zmanjšujeta količino serumskega feritina, njegove povečane koncentracije pa najdemo pri kroničnih in akutnih vnetjih, hematoloških malignih obolenjih, poškodbah jeter in raku trebušne slinavke. Feritin deluje kot reaktant akutne faze (18).

V feritinski molekuli shranjeno železo se ne more preprosto odcepiti in povzročati oksidativnih poškodb. Kadar pa je feritin nasičen, se presežek železa pretvori v hemosiderin, ki je ostanek feritinske molekule, razgrajene z lizosomi. Gre za patološki kompleks železa, razgrajenih proteinov in lipidov. Hemosiderin se v primeru hemokromatoze nalaga v številnih organih (jetrih, pankreasu, miokardu, hipofizi, nadledvični žlezi, ščitnici, nadščitnični žlezi, sklepih in koži) (28).

### **1.3. PATOFIZIOLOŠKO PREKOMERNO KOPIČENJE ŽELEZA IN TRANSFUZIJSKA OBREMENITEV**

Ker človeško telo nima učinkovitega naravnega sistema za izločanje železa, se lahko pojavijo s tem povezane težave, predvsem pri dveh skupinah bolnikov:

- tistih, ki imajo povečano črevesno absorpcijo železa iz prehrane - pri maksimalno stimulirani absorpciji se ga lahko absorbira največ 3 do 5 mg na dan, kar bi na letnem nivoju zneslo približno 1 do 2 g (30), in
- tistih, ki imajo povečan vnos železa zaradi transfuzij eritrocitov.

Na molekularni ravni obstajata dve fiziološki poti, ki sta povezani s prekomernim kopičenjem železa, in sicer:

- kadar del plazemskega železa preseže transportno kapaciteto transferina (npr. pri dedni hemokromatozi), se nalaga neposredno v parenhimske celice jeter, srca in endokrinih tkiv;
- kadar pride do povečanega razpada eritrocitov (npr. v primeru ponavljajočih se transfuzij), se višek železa akumulira v retikuloendotelijskih makrofagih, kasneje pa v parenhimskih celicah.

Prenasičenost z železom je stanje v telesu, ki poveča nastajanje feritina in s tem skladiščenje železa, ob sočasnem zmanjšanju proizvodnje transferinskih receptorjev

(zmanjšan obseg vstopa železa v celice). V normalnih pogojih je nasičenost transferina z železom okrog 30 %. Če se železo kopiči in ga ne uravnavamo z zdravljenjem, se plazemski transferin lahko popolnoma nasiti, pri čemer se pojavi toksična frakcija plazemskega železa, imenovana prosto železo ali železo, ki ni vezano na transferin (NTBI, *ang.* Not Transferin Binding Iron). To zlahka prodre v celice vitalnih organov, predvsem jeter in srca, in sicer z olajšano pasivno difuzijo, in tako lahko prispeva k signifikantni poškodbi celice v zgodnjem razvoju prenasíčenosti tkiva z železom (1). Količina NTBI ni zaznavna v plazmi zdravega človeka (3). Del NTBI z najšibkejšo vezavo na plazemske biomolekule imenujemo labilno plazemsko železo (LPI, *ang.* Labile Plasma Iron). Pri nasičenosti transferina nad 75% pojav NTBI vodi v tvorbo LPI in ROS, kar ima za posledico poškodbe celičnih sestavin (1, 2, 21, 37).

Sekundarna preobremenitev z železom je značilna za heterogeno skupino kroničnih stanj, ki so lahko podedovana ali pridobljena in pri katerih nakopičenje železa ni posledica napak v regulacijskih mehanizmihi. Med dedne motnje prištevamo talasemije, pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), piruvatne dehidrogenaze, prirojene diseritropoetske anemije, hude hemolitične anemije (dedna sferocitoza), sideroblastne anemije, porfirije in aplazijo. Pridobljene motnje pa zajemajo aplazijo, sideroblastno anemijo, diseritropoetične anemije, mielodisplastične sindrome, bolezni jeter, preobremenitev telesa z železom iz hrane, nepravilno zdravljenje z železom (pomanjkanje železa, dializni bolniki, športniki, ...), nezdravljene levkemije ter zaplete pri bolnikih s presajenimi krvotvornimi matičnimi celicami (kostnim mozgom) (1).

Najpogostejši vzrok za sekundarne preobremenitve z železom so pogoste transfuzije krvi, nujno potrebne za bolnike s talasemijo, srpastocelično anemijo, MDS in drugimi redkimi anemijami. V teh primerih gre za kombinacijo morebitne presežne absorpcije železa iz hrane, ki poskuša popraviti anemijo, in transfuzij KE. Najboljši način za odstranitev železa je v teh primerih flebotomija, vendar pa to ni izvedljivo pri anemijah, ko moramo eritrocite vnašati v telo. Zato pri teh bolnikih izvajamo odstranjevanje železa s kelatorji (36). Kronično kopičenje železa je resen zaplet ponavljajočih se transfuzij pri anemičnih bolnikih z MDS, pri katerih bi brez kelacijskega zdravljenja lahko nakopičeno železo povzročilo odpoved organov, kot so jetra, srce in endokrine žleze (44).

Transfuzija krvi vsebuje približno 200 do 250 mg železa (30, 21). Bolniki, ki prejemajo 2 do 4 enote krvi na mesec, bodo imeli tako na letnem nivoju 5 do 10 g nakopičenega železa (30).

Vsaka enota transfundiranih KE vsebuje približno šestmesečno zalogo železa zdravega posameznika, ki je telo seveda ne more odstraniti (31). Odvečno železo se najprej shranjuje v retikuloendotelijskem sistemu (RES), predvsem v jetrih, vse dokler zaloge niso zapolnjene, nato pa se lahko pojavijo vlaknaste brazgotine, t.j. jetrne fibroze. Temu sledi nalaganje železa v drugih organih, pri čemer pride do izraza njegova toksičnost (2, 15, 28). RES lahko uskladišči okrog 10 do 15 g železa, kar ustreza približno 50 enotam KE. Pri preseženi kapaciteti RES pa se prične odlaganje železa v parenhim in pojavijo se poškodbe tkiv. Pri bolniku, ki prejema 2 enoti KE mesečno, se bodo tovrstne poškodbe pojavile v dveh letih (21).

Bolniki z MDS, ki redno prejemajo transfuzije, imajo večjo pojavnost pridruženih motenj delovanja različnih organov (bolezni srca, diabetes, dispnea, bolezni jeter, okužbe).

Celo blagi presežki železa v vitalnih organih lahko povečajo tveganje za pojav bolezni jeter (ciroza, rak), srčnega infarkta ali odpovedi srca, sladkorne bolezni, osteoartritisa, osteoporoze, metabolnega sindroma, hipotiroidizma in hipogonadizma (31).

#### **1.4. VREDNOTENJE PREOBREMENJENOSTI TELES Z ŽELEZOM**

Natančna ocena statusa železa je potrebna za potrebe po morebitnem zdravljenju in za ovrednotenje časa ter načina zdravljenja. Zaloge železa v telesu moramo ocenjevati tako pri postavitvi diagnoze, kot tudi ob spremljanju poteka bolezni. V ta namen uporabljamo različne diagnostične metode, s katerimi določamo (1):

- *Klinične značilnosti:*

Pojav znakov ali simptomov je odvisen od stopnje nakopičenosti železa. Pri talasemiji se ti pojavijo že v otroštvu, pri dedni hemokromatozi pa lahko tudi pozneje. Če obremenitev z železom napreduje in ni zdravljena, se pokažejo klinične značilnosti v obliki srčnih bolezni, diabetesa, hipotiroidizma, hipoparatiroidizma, hipogonadizma in jetrne ciroze.

- *Serumske označevalce:*

*S-železo*, *S-transferin* in *S-transferinski receptorji* niso specifični označevalci, potrebni za oceno nakopičenega železa, so pa nujni za izračun *nasičenja transferina*. *S-feritin* je uporaben parameter za oceno statusa železa, saj njegove

koncentracije dobro korelirajo z zalogami železa. Zanesljiv je predvsem pri nizkih in normalnih vrednostih železa. Njegova natančnost pa se zmanjša pri povečanem vnosu železa, ko ima slabo napovedno vrednost. Koncentracije S-ferritina so lahko nezanesljive pri bolnikih z vnetji, lahko pa tudi variirajo, predvsem zaradi nepravilne funkcije jeter (okužba, hepatitis, hemoliza) in pri presnovnih deficitih (npr. pomanjkanje vitamina C povzroča zmanjšanje ferritina v celicah in zvečanje koncentracije hemosiderina (71), ker askorbinska kislina deluje kot reducirajoči agens ter z mobilizacijo železa iz ferritina ter RES poveča razpoložljivost železa v telesu (72)).

- *Razporeditev ali koncentracijo železa v tkivih:*

Jetra vsebujejo največje zaloge železa (70 - 80 %), v njih pa poteka največ procesov povezanih z železom (zaloga železa absorbiranega iz črevesja in iz katabolizma eritrocitov, kelacija s kelatorji, izločanje preko žolča). Biopsija jeter in histologija lahko zagotovita semi-kvantitativno vrednotenje obsega vnosa železa, njegovo razporeditev, učinek poškodb zaradi njegovih prevelikih količin ter potrditev možnih neodvisnih dejavnikov, kot so virusni hepatitis, alkoholizem in steatoza. Referenčna metoda za določitev železa v jetrnem tkivu, pridobljenem z biopsijo, ali LIC (*ang.* liver iron concentration) je atomska absorpcijska spektrometrija (70). Za detekcijo in kvantifikacijo nasičenosti z železom se v zadnjem času veliko uporablja neinvazivna tehnika slikanja z magnetno resonanco MRI (*ang.* Magnetic Resonance Imaging) jeter, srca in drugih organov ali tkiv.

- *Označevalce toksičnosti železa:*

Mednje sodijo prosto železo (nevezano na transferin) in označevalci oksidativnih poškodb.

- *Izračune ravnovesja železa:*

- *železo vneseno s transfuzijami:* vsak gram hemoglobina vsebuje 3,4 mg železa. Tako z ustrezno enačbo lahko natančno izračunamo vneseno količino železa s transfuzijo, če poznamo težo, prostornino, hematokrit ali celokupni hemoglobin v posamezni enoti KE. Pri spremljanju bolnikov odvisnih od transfuzije moramo natančno zabeležiti količino vsakokrat prejetega železa. To nam omogoča lažje vodenje kelacije in zgodnjo zaznavo povečane vranice.

- *železo odstranjeno s flebotomijo:* pomembno je, da ga določimo pri bolnikih

z dedno hemokromatozo, kjer postopek flebotomije izvršimo, pri bolnikih s sekundarnim nakopičenjem železa pa ne pride v poštev.

- *železo izločeno s kelatorji*: predstavlja vsoto urinsko in fekalno izločenega železa. V primeru uporabe deferasiroksa je izločanje keliranega železa z urinom manj kot 5 %, torej se ga pretežni del izloči iz telesa z blatom.

#### 1.4.1. Laboratorijska diagnostika pri MDS

Laboratorijska ocena homeostaze železa oziroma njegovega nakopičenja temelji na določitvi serumskega feritina in nasičenja transferina ali TIBC (*ang.* Total Iron Binding Capacity). Uporabna sta tudi transferinsko nasičenje (%) in LPI. Pri bolnikih z MDS rutinsko izvajamo tudi pregled kostnega mozga in citogenetiko.

Preobremenitev z železom je lahko blaga, zmerna ali huda, njena diagnostika pa vključuje različne pristope (Preglednica 3).

**Preglednica 3.** Mejne vrednosti laboratorijski parametrov za opredelitev stopnje nakopičenja železa (7).

| Preobremenitev z železom    | Blaga   | Zmerna             | Huda    |
|-----------------------------|---------|--------------------|---------|
| S-feritin (µg/L)            | < 300   | > 1.000<br>< 2.500 | > 2.500 |
| Transferinsko nasičenje (%) | 20 - 50 | > 50               |         |

Za spremljanje dinamičnega statusa železa je uporabna koncentracija serumskega feritina. Uporabljati pa jo moramo smiselno, skupaj z drugimi parametri, saj se feritin kot reaktant akutne faze poveča pri vnetjih in jetrnih boleznih (11). Čeprav na količino serumskega feritina vpliva veliko dejavnikov, nam njegov trend poda pomembno informacijo o kopičenju železa, saj feritin zelo dobro korelira s transfuzijsko obremenitvijo (21).

Večina priporočil predlaga S-feritin za indikator prekomernega kopičenja železa, z mejno vrednostjo 1.000 µg/L. Večina smernic priporoča merjenje njegovih koncentracij na 1 do 3 mesece za ugotavljanje učinkovitosti zdravljenja od transfuzij odvisnih bolnikov (9, 22).

Pri bolnikih z MDS so serumske vrednosti feritina nad 1.000 µg/L povezane s krajšim preživetjem, z večjo umrljivostjo in povečanim tveganjem za levkemično transformacijo (6, 22, 64).



### 1.5. ZDRAVLJENJE TRANSFUZIJSKE HEMOKROMATOZE S KELACIJO

Bolniki, ki prejemajo pogoste transfuzije KE in se ne zdravijo s kelacijo železa, razvijejo transfuzijsko hemokromatozo, ki lahko poškoduje glavne organe in skrajša življenjsko dobo (31). Cilj kelacijskega zdravljenja je vzdrževanje za tkiva še varnih koncentracij železa. Na ta način se zmanjša obolevnost ter podaljša preživetje (1, 37).

Za tovrstno zdravljenje uporabljamo farmakološke snovi, imenovane kelatorji, ki vežejo železo v telesu, ga tako razstrupljajo in spodbudijo njegovo izločanje. Tako kelacija zmanjša tudi proizvodnjo ROS, s tem pa omeji oksidativno poškodbo celic in organov (8).

Izdelava idealnega kelatorja je težek izziv, njegove lastnosti pa naj bi bile naslednje (69, 36):

- visoka specifičnost in vezavna afiniteta za železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ),
- spodobnost keliranja velikih količin železa z majhno količino zdravilne učinkovine,
- sposobnost dostopanja v vsako celico in tkivo, da se lahko železo odstrani od plovila, kjer je nakopičeno,
- oralna uporaba, v izogib dragi in neprijetni parenteralni aplikaciji,
- počasna presnova ali izločanje, tako da ga ne bi bilo potrebno jemati v pogostih intervalih,
- relativna nestrupenost, da zdravljenje ni omejeno s toksičnostjo.

Pri izdelavi kelatorja železa morajo torej določiti mejo med njegovo farmakološko varnostjo in toksičnostjo.

Bolniki, primerni za zdravljenje s kelatorji, so predvsem tisti z diseritropoezo (RA ali RAPS) in s povprečno dobo preživetja pet let (9).

Zdravljenje s kelacijo železa je potrebno predvsem za ublažitev posledic njegovega nakopičenja v telesu in je namenjeno predvsem:

- za ohranjanje ravnovesja železa pri bolnikih, ki še nimajo nakopičenega njegovega presežka, ga pa nenehno vnašajo v telo,
- za zniževanje količine železa do varnih koncentracij pri bolnikih s klinično pomembno preobremenitvijo z njim (30).

Zdravljenje s kelacijo železa pride v poštev pri bolnikih, ki prejemajo redne transfuzije KE in sicer takoj, ko te povzročijo tolikšno nakopičenje železa, ki bi lahko povzročilo poškodbe tkiv. Trenutno priporočajo, da je potrebno pričeti s kelacijskim zdravljenjem pri bolnikih, ki so prejeli približno 20 transfuzij KE ali pa imajo serumsko koncentracijo feritina nad  $1.000 \mu\text{g/L}$  (9, 13, 30).

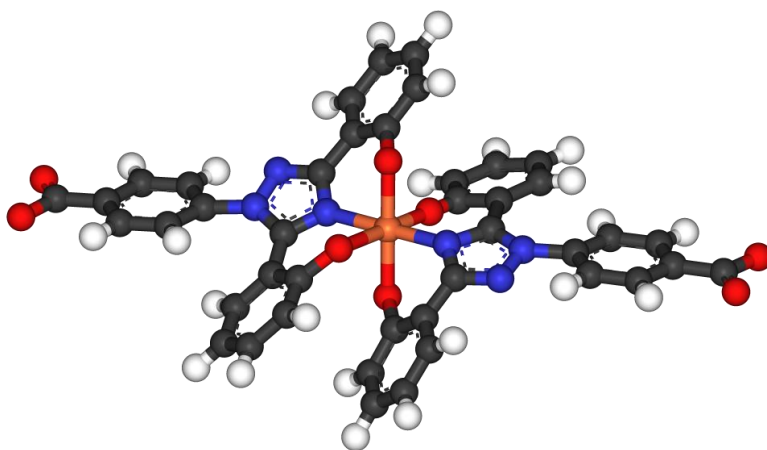
Odločitev za zdravljenje s kelatorji zahteva temeljito klinično presoj, pri kateri upoštevajo prognozo bolezni in potencialno korist tovrstne terapije. Za bolnike z MDS, ki prejemajo redne transfuzije KE, takšno zdravljenje izboljšuje funkcionalnost organov, zmanjšuje njihovo obolevnost in jim podaljša preživetje (37).

Med kelatorje železa sodijo: deferoksamín mesilat (DFO, Desferal<sup>®</sup>), deferipron (DFP, Ferriprox<sup>®</sup>) in deferasiroks (Exjade<sup>®</sup>). Deferoksamín ima zelo kratko razpolovno dobo (5 do 10 minut), zato ga aplicirajo subkutano v obliki 8 do 24 urne infuzije s prenosno črpalko. Izloča se z urinom in blatom (3, 21). Leta 1982 so sintetizirali prvi oralni kelator deferipron, katerega razpolovna doba je 47 do 134 minut, jemlje pa se ga trikrat dnevno. Izloča se z urinom (3, 21).

### 1.5.1. Deferasiroks

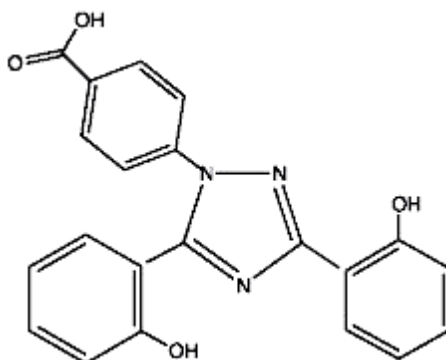
Deferasiroks (Exjade<sup>®</sup>, Novartis Pharma AG, Basel, Švica) je oralno kelacijsko zdravilo v obliki tablet, ki vsebujejo 125, 250 ali 500 mg učinkovine. Namenjeno je zdravljenju transfuzijske hemokromatoze (kronično kopičenje železa zaradi rednih transfuzij KE ali sekundarne preobremenitve z železom pri anemijah, odvisnih od transfuzij) pri ljudeh nad dve leti starosti (29, 31).

Deferasiroks je bel do rahlo rumen prašek. Je trivalentni kelator, selektiven za ione  $\text{Fe}^{3+}$ . Železo veže v razmerju 2:1 z zelo visoko afiniteto (Slika 3), pri čemer ima bistveno manjšo afiniteto za vezavo bakra in cinka. Kljub nizki afiniteti do omenjenih dveh elementov v sledovih, se po zaužitju deferasiroksa njuni koncentraciji v plazmi rahlo znižata, vendar pa ne pride do njunega povečanega izločanja iz telesa (29, 37).



**Slika 3. Shematski prikaz vezave železovega iona  $\text{Fe}^{3+}$  z dvema molekulama deferasiroksa; povzeto po (29).**

Molekulska formula deferasiroksa je  $C_{21}H_{15}N_3O_4$  (Mr 373.4). Kemijsko pa je to 4-[3,5-bis(2hidroksifenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il]-benzojska kislina (Slika 4) (29).



**Slika 4. Kemijska struktura deferasiroksa; povzeto po (29).**

Farmakodinamske učinke deferasiroksa so proučevali v študiji presnove železa in ugotovili, da je v odmerkih 10, 20 in 40 mg/kg na dan izločil povprečno 0,119; 0,329 in 0,445 mg Fe/kg telesne teže na dan, in sicer znotraj klinično pomembnega območja (0,1 – 0,5 mg/kg na dan). Izločanje je potekalo pretežno z blatom (29, 37).

Največjo plazemsko koncentracijo je zdravilna učinkovina dosegla 1,5 do 4 ure po zaužitju. V plazmi je deferasiroks močno vezan (99 %) izključno na serumski albumin, pri odraslih bolnikih pa je pritrjen tudi na krvne celice, do 5 % (29).

Odmerek deferasiroksa je odvisen od telesne mase posameznika. Priporočeni začetni odmerek, tako za otroke, odrasle in starostnike, je 20 mg / kg na dan, najvišji dovoljeni pa 40 mg / kg na dan. Njegova razpolovna doba je 8 do 16 ur. Vezan z železom se najprej izloči v žolč, od tu pa se iz telesa odstrani z blatom. Njegovi neželeni učinki so renalna insuficienca, ki je običajno reverzibilna in neprogresivna, ter gastrointestinalne motnje (29, 37, 21).

Uporablja se ga oralno, enkrat dnevno. Zaužiti ga moramo pol ure pred obrokom, na tešče ali na prazen želodec. Zdravilo raztopimo v 100 do 200 mL vode oziroma jabolčnega ali pomarančnega soka. Smiselno ga je jemati vsak dan ob istem času (29).

Delovanje zdravilne učinkovine deferasiroks:

- po hitri absorpciji njegova plazemska koncentracija doseže vrh približno 2 uri po zaužitju, v zaznavnih količinah pa ostane v plazmi še 24 ur;
- njegova plazemska koncentracija je premosorazmerna zaužitemu odmerku;

- spodbuja izločanje železa pretežno z blatom (29).

Glavna presnovna pot deferasiroksa je glukuronizacija, ki ji sledi izločanje v žolč. V črevesju poteče dekonjugacija glukuronatov in nato reabsorpcija učinkovine (enterohepatično recikliranje). Glukuronizacija deferasiroksa pretvori majhne lipofilne molekule v vodotopne metabolite za izločanje. Njegova presnova, ki jo katalizira CYP450 (encim citokrom P450), poteka pri človeku le v manjšem obsegu, približno 8 % (29, 47).

Tako deferasiroks kot njegovi presnovki se iz telesa izločajo predvsem z blatom (84 % celotnega odmerka), izločanje preko ledvic z urinom pa je le minimalno (do 8 % celotnega odmerka). Povprečni razpolovni čas izločanja je 8 do 16 ur po zaužitju (29).

Vodilo odmerjanja deferasiroksa mora biti terapevtski cilj, v katerega sta vključena tako zmanjšanje obstoječe zaloge železa v telesu kot tudi njegovo pričakovano kopičenje z dodatnimi transfuzijami KE. Uporabnost enkrat dnevno oralno zaužitega kelatorja, s predvidljivimi učinki na ravnotežje železa ter z določenimi, klinično obvladljivimi profili, pri različnih, od transfuzij odvisnih anemijah, omogoča učinkovito kelacijsko odstranjevanje nakopičenega železa pri tovrstnih boleznih (40). Po uvedbi terapije z deferasiroksom priporočajo spremljanje zdravljenja oziroma uspešnost kelacije železa z meritvami serumskih koncentracij feritina enkrat mesečno. Odmerek kelatorja naj bi uravnavali glede na gibanje koncentracij feritina, in sicer če je to potrebno, individualno, v korakih po 5 ali 10 mg/kg za vzdrževalno terapijo ali za zmanjševanje obremenitve z železom. Odmerek deferasiroksa naj ne bi presegel 30 mg/ kg. V kolikor se koncentracija serumskega feritina zmanjša pod 500 µg/L, je smiselno začasno prenehati s terapijo.

Rezultati kliničnih študij navajajo nizke korelacijske koeficiente med serumskim feritinom in LIC [ $r = 0,63$  (29);  $r = 0,59$  (40)]. Zato lahko sklepamo, da spremembe koncentracij serumskega feritina ne odražajo vedno zanesljivo sprememb v koncentracijah železa v jetrih. Z laboratorijskimi testi je zato smiselno in potrebno spremljati še ledvične in jetrne funkcije (29). Proizvajalec zdravila navaja blago zvečane koncentracije kreatinina v serumu ter občasno zvečane vrednosti serumskih transaminaz. Pri uporabi deferasiroksa lahko pride do blagih gastrointestinalnih težav (driske), zato priporočajo njegovo jemanje zvečer. Proizvajalec poleg tega navaja še možnost pojava blagih kožnih izpuščajev, glavobola, kratkotrajnih motenj sluha in zgodnje katarakte (29).

## 2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Pri bolnikih, ki redno prejemajo transfuzije koncentriranih eritrocitov (KE), sta serumski koncentraciji feritina in železa odvisni od števila prejetih enot KE ter od uspešnosti odstranjevanja železa iz telesa s pomočjo kelatorja. Večje koncentracije serumskega feritina med terapijo kažejo na slabše odstranjevanje železa iz telesa.

Namen naše raziskave je bil, da z določevanjem koncentracij serumskega feritina (S-feritin) ugotovimo učinkovitost zdravilne učinkovine deferasiroks pri bolnikih, ki so redno prejemali transfuzije KE.

Hipoteze v naši raziskavi so:

### **Hipoteza 1:**

**Deferasiroks je zdravilna učinkovina, ki uspešno kelira in odstranjuje nakopičeno železo iz telesa, ki je posledica številnih transfuzij KE, s katerimi zdravimo bolnike s hudimi vrstami anemij.**

Za dokazovanje te hipoteze smo uporabili koncentracijo S-feritina kot osnovni laboratorijski parameter. Preveriti smo želeli, če bo zdravljenje z deferasiroksom v daljšem časovnem obdobju zmanjšalo koncentracije S-feritina, kar bi potrdilo uspešnost kelacije. Ugotavljali smo dinamiko sprememb koncentracij S-feritina (trend upadanja ali naraščanja) med posameznimi prejetimi transfuzijami KE pri posameznem bolniku. Glede na to gibanje koncentracij smo nato razvrstili bolnike v različne skupine. Zanimala nas je tudi povezava med začetnimi in končnimi vrednostmi S-feritina ter njena statistična pomembnost.

Povečane koncentracije S-feritina smo pričakovali pri bolnikih na kelacijskem zdravljenju ob vnetju.

Iskali smo povezavo med koncentracijami S-feritina in odmerki deferasiroksa, s katero bi potrdili uporabnost meritev koncentracij S-feritina za odmerjanje tega zdravila. Ugotavljali smo uravnavanje količine deferasiroksa glede na začetni odmerek. Pričakovali smo, da bodo koncentracije S-feritina zvečane pri tistih bolnikih, ki niso jemali ustreznih odmerkov zdravila.

Učinkovitost deferasiroksa smo ugotavljali tudi s kelacijskimi indeksi, ki smo jih izračunali kot razmerje med količinami prejetega železa ob transfuzijah KE ter količinami prejetega kelatorja v časovnem obdobju do naslednje transfuzije KE.

### **Hipoteza 2:**

#### **Kelator deferasiroks nima vpliva na funkcijo jeter in ledvic.**

Hipotezo smo ugotavljali s spremljanjem osnovnih biokemičnih parametrov za oceno funkcije jeter (serumske transaminaze: AST, ALT,  $\gamma$ GT) in ledvic (serumski kreatinin), ki smo jih statistično ovrednotili.

### **3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. PREISKOVANCI**

Za izvedbo raziskave smo pri Ministrstvu za zdravje pridobili dovoljenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko.

V raziskavo smo vključili bolnike, ki so uživali kelator deferasiroks. Dodatno vodilo za vključitev je bilo redno prejemanje transfuzij KE. Nakopičenje železa pri preiskovancih smo v raziskavi definirali s koncentracijo serumskega feritina nad 1.000 µg/L, po prejemu najmanj 10 enot KE.

Osnovni kriterij za vključitev posameznega bolnika z MDS ali drugo hudo obliko anemije v raziskavo je bila prej omenjena serumska koncentracija feritina. V raziskavi so sodelovali bolniki, ki so pričeli z jemanjem kelatorja po predhodno prejetih vsaj desetih zaporednih transfuzijah KE. Transfuzijo KE je posamezen bolnik prejel pri koncentraciji hemoglobina < 90 g/L. Število prejetih enot KE je bilo tako odvisno od izmerjenih koncentracij hemoglobina ob vsakokratnih ambulantnih obiskih. Vključitveni kriterij je bila tudi starost, in sicer nad 15 let. Po priporočilih so za kelacijsko zdravljenje prišli v poštev le tisti, za katere je bila pričakovana življenjska doba še najmanj eno leto.

Leta 2008 smo v raziskavo postopoma vključili 7 bolnikov, ki so obiskovali hematološko ambulantno v Splošni bolnišnici Izola. Ker pa se je število teh bolnikov zmanjševalo zaradi smrti v razmeroma kratkem časovnem obdobju, smo raziskavo razširili še z 22 bolniki, ki so obiskovali hematološko ambulantno na Hematološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana, in sicer v obdobju od leta 2007 do vključno 2012.

Vsi bolniki so opravili laboratorijske preiskave v skladu z zahtevami njihovega običajnega hematološkega pregleda.

#### **3.2. BIOLOŠKI VZORCI**

Vzorcev krvi bolnikov nismo odvzeli v raziskovalne namene, saj smo koncentracijo S-feritina določali rutinsko skupno z ostalimi zahtevanimi biokemičnimi in hematološkimi preiskavami, ki so običajne za obravnavo bolnikov z anemijo, ki jo zdravijo s transfuzijami KE in so sočasno na kelacijskem zdravljenju. Naročilo laboratorijskih preiskav je izvedel hematolog ob rednem obisku bolnika v hematološki ambulanti.

Odvzem venske krvi za določitev laboratorijskih parametrov je bil enak v obeh zdravstvenih ustanovah. Vzorci so bili bolnikom odvzeti ob obisku hematološke

ambulance, vsakokrat med 8 in 14 uro, skladno s predpisanim postopkom za odvzem venske krvi. Pred odvzemom venske krvi so bolniki sede počivali vsaj 20 minut.

Za določitev koncentracije S-feritina in drugih biokemičnih parametrov smo uporabili vzorce venske krvi, odvzete v epruvete za biokemične preiskave z aktivatorjem strjevanja (Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija). Najprej smo počakali 30 minut, da je v odvzetih vzorcih samostojno potekel proces koagulacije, nato pa kri centrifugirali 10 minut pri 1.500 g (3.000 vrtljajev/ minuto). Serum smo odpipetirali v alikvotirno epruveto, jo ustrezno označili ter do analize hranili na sobni temperaturi. Vzorce seruma smo analizirali isti dan, najkasneje dve uri po odvzemu.

Vzorci krvi za hematološke preiskave so bili odvzeti sočasno s tistimi za biokemične preiskave, in sicer v epruvete z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA (Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija). Meritve hemograma oziroma številčne koncentracije hemoglobina smo izvedli 30 minut po odvzemu vzorcev venske krvi.

### **3.3. ANALIZNE METODE**

Laboratorijske meritve smo opravili v Laboratoriju za klinično kemijo in hematologijo Splošne bolnišnice Izola ter na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana.

#### **3.3.1. Določanje serumskih koncentracij feritina (S-feritin)**

Koncentracije S-feritina smo določali z avtomatizirano kemiluminiscenčno metodo.

V Splošni bolnišnici Izola smo analize izvajali z avtomatiziranim analizatorjem Abbott Architect i2000SR, v UKC Ljubljana pa so v ta namen uporabljali avtomatizirani analizator ADVIA Centaur XP Immunoassay System.

Na obeh analizatorjih smo uporabljali kvantitativni imunski test (princip sendvič ELISA) s kemiluminiscentno detekcijo.

##### **3.3.1.1. Določanje koncentracij S-feritina na analizatorju Abbott Architect i2000SR**

Določanje S-feritina se prične z njegovo vezavo v vzorcu s primarnimi feritinskimi protitelesi, ki prekrivajo površino paramagnetnih delcev v reagentu. S spiranjem odstranimo vse nevezane snovi, nato pa kompleksom feritin – protitelo dodamo z akridinijem označeno sekundarno protitelo, ki se veže na omenjene komplekse. Nato z dodatkom dveh raztopin, ki vsebujeta vodikov peroksid in natrijev hidroksid, povzročimo



kemiluminiscentno reakcijo, pri kateri se energija sprosti v obliki svetlobe. Količina sproščene svetlobe pa je neposredno proporcionalna količini feritina v vzorcu.

**Reagenti:**

- Feritinski mikrodelci, *ang.* Architect Feritin Microparticles (kat. št. 7K59-20), Abbott;
- Feritinski konjugat, *ang.* Architect Feritin Conjugate (kat. št. 7K59-20), Abbott;
- Predsprožilna raztopina, *ang.* Architect Pre-Trigger Solution (kat. št. 6E23-65), Abbott;
- Sprožilna raztopina, *ang.* Architect Trigger Solution (kat. št. 6C55-60), Abbott;
- Feritinski kalibrator 1, 2, *ang.* Architect Feritin Calibrators 1,2 (kat. št. 7K59-01), Abbott.

**Postopek**

Meritve koncentracij S-feritina smo izvedli po navodilih proizvajalca. Linearno območje meritve je 0 - 2000 µg/L, rezultate pa smo izražali v µg/L. Referenčna vrednost za S-feritin je 8 – 200 µg/L.

**3.3.1.2. Določanje koncentracij S-feritina na analizatorju ADVIA Centaur XP Immunoassay System**

**Princip meritve**

Analiza temelji na vezavi dveh protiteles proti feritinu kot antigenu. Prvo je poliklonsko kozje protitelo, označeno z akridinijevim estrom. Vsebuje ga primarni reagent. Drugo pa je monoklonsko mišje protitelo, ki je kovalentno vezano na paramagnetne delce in predstavlja trdno fazo analizne metode.

V prvi fazi pride do vezave feritina, prisotnega v vzorcu, s protitelesi v primarnem reagentu in tistimi vezanimi na paramagnetne delce. Vse nevezane snovi odstranimo s spiranjem, nato pa z dodatkom kislega in bazičnega reagenta sprožimo kemiluminiscenčno reakcijo. Pri tem dodani vodikov peroksid oksidira akridinjev ester, vezan na protitelesa, kar povzroči emitiranje svetlobe. Nato analizator izmeri intenziteto oddane svetlobe, ki je neposredno sorazmerna s koncentracijo feritina v vzorcu.

**Reagenti:**

- 5 ReadyPack<sup>®</sup>, ADVIA Centaur<sup>®</sup> FER (kat. št. 110746), Siemens;
- Calibrator C (kat. št. 672182), Siemens;
- ADVIA Centaur Multi Diluent 1 (kat. št. 110313), Siemens;

**Postopek:**

Meritve koncentracij S-ferritina v serumu smo izvedli skladno z navodili proizvajalca. Linearno območje meritve je bilo 0,5 - 1650 µg/L. Rezultate smo podali v µg/L. Referenčna vrednost za S-ferritin je 10 - 120 µg/L za ženske in 20 - 300 µg/L za moške.

**3.3.2. Določanje koncentracij CRP v serumskih vzorcih bolnikov****Princip meritve:**

V reagentu se nahajajo na delce lateks vezana protitelesa anti-CRP, ki se ob dodatku serumskega vzorca vežejo s prisotnim C-reaktivnim proteinom. Nastane netopen kompleks antigen-protitelo. Po aglutinaciji turbidimetrično izmerimo količino prepuščene svetlobe.

**Reagenti:**

- CRP latex (kat. št. OSR6199), Olympus;
- Sistemski kalibrator, *ang.* System Calibrator (kat. št. 66300), Olympus;
- Kontrolni serum ITA 1, *ang.* ITA Control serum 1 (kat. št. ODC0014), Olympus;
- Kontrolni serum ITA 2, *ang.* ITA Control serum 2 (kat. št. ODC0015), Olympus;
- Kontrolni serum ITA 3, *ang.* ITA Control serum 3 (kat. št. ODC0016), Olympus.

**Postopek:**

Koncentracijo CRP v serumskih vzorcih smo določali z avtomatizirano metodo z biokemičnim analizatorjem Olympus AU 400 (Beckman Coulter, ZDA), in sicer skladno z ustaljenim postopkom in navodili proizvajalca. Linearno območje meritve je bilo 0,2 - 480 mg/L. Rezultate smo izražali v mg/L. Referenčna vrednost za CRP v serumu je do 8 mg/L.

**3.3.3. Določanje koncentracij kreatinina v serumskih vzorcih bolnikov****Princip meritve:**

Kinetična Jaffejeva reakcija: kreatinin tvori v alkalnem mediju s pikrinsko kislino rumeno-oranžno obarvan kompleks. Omenjeni kompleks v določenem časovnem intervalu spreminja intenzivnost barve. Sprememba absorbance je proporcionalna koncentraciji kreatinina v vzorcu.

**Reagenti:**

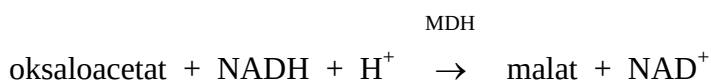
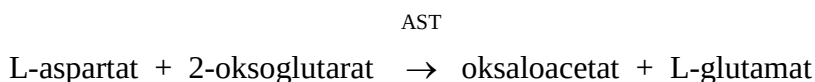
- Kreatinin, *ang.* Creatinine (kat. št. OSR6178), Olympus;
- Sistemski kalibrator, *ang.* System Calibrator (kat. št. 66300), Olympus;
- Kontrolni serum 1, *ang.* Control Serum 1 (kat. št. ODC0003), Olympus;
- Kontrolni serum 2, *ang.* Control Serum 2 (kat. št. ODC0004), Olympus.

**Postopek:**

Koncentracije kreatinina v serumskih vzorcih smo določali z avtomatizirano metodo z biokemičnim analizatorjem Olympus AU 400 (Beckman Coulter, ZDA), in sicer po ustaljenem postopku in skladno z navodili proizvajalca. Linearno območje meritve je bilo 18 – 2200  $\mu\text{mol/L}$ . Rezultate smo izrazili v  $\mu\text{mol/L}$ . Referenčna vrednost za S-kreatinin je 44 – 97  $\mu\text{mol/L}$ .

**3.3.4. Določanje katalitične aktivnosti AST v serumskih vzorcih bolnikov****Princip meritve:**

Aspartatna aminotransferaza (AST) katalizira prenos aminske-skupine iz aspartata na oksoglutarat, v prisotnosti piridoksalfosfata. Pri tem nastaneta oksaloacetat in glutamat. Indikatorsko reakcijo predstavlja redukcija oksaloacetata v malat, ki jo katalizira malatna dehidrogenaza (MDH). Redukcija poteče v prisotnosti NADH, ki se pri tem oksidira v  $\text{NAD}^+$ . Upad izmerjene absorbance pri  $\lambda = 340 \text{ nm}$  je soracionalen aktivnosti AST v serumskem vzorcu. Po priporočilu IFCC (*ang.* International Federation of Clinical Chemistry) je za določitev AST (E.C. 2.6.1.1.) pri  $37^\circ\text{C}$  obvezen dodatek piridoksalfosfata, ki aktivira apoencim:

**Reagenti:**

- AST (kat. št. OSR6109), Olympus;
- Raztopina piridoksalfosfata, *ang.* Pyridoxal phosphate liquid (kat. št. 60106), Olympus;
- Sistemski kalibrator, *ang.* System Calibrator (kat. št. 66300), Olympus;
- Kontrolni serum 1, *ang.* Control Serum 1 (kat. št. ODC0003), Olympus;
- Kontrolni serum 2, *ang.* Control Serum 2 (kat. št. ODC0004), Olympus.

**Postopek:**

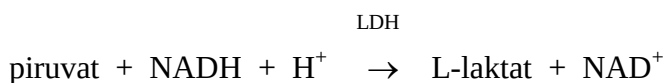
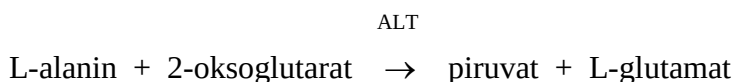
Določitev katalitične aktivnosti AST smo izvedli z avtomatizirano metodo z biokemičnim analizatorjem Olympus AU 400 (Beckman Coulter, ZDA), in sicer po ustaljenem postopku

in skladno z navodili proizvajalca. Linearno območje testa je bilo 0,05 - 16,7  $\mu\text{kat/L}$ . Rezultate meritev smo podajali v  $\mu\text{kat/L}$ . Pri odraslih so referenčne vrednosti: do 0,52  $\mu\text{kat/L}$  pri ženskah in do 0,58  $\mu\text{kat/L}$  pri moških.

### 3.3.5. Določanje katalitične aktivnosti ALT v serumskih vzorcih bolnikov

#### Princip meritve:

Alaninska aminotransferaza (ALT) katalizira prenos aminske-skupine iz L-alanina na oksoglutarat, v prisotnosti piridoksal fosfata. Pri tem nastaneta piruvat in glutamat. Indikatorska reakcija je redukcija piruvata do laktata, ki jo katalizira laktatna dehidrogenaza (LDH). Redukcija poteče v prisotnosti NADH, ki se oksidira v  $\text{NAD}^+$ . Upad izmerjene absorbance pri  $\lambda = 340 \text{ nm}$  je proporcionalen aktivnosti ALT v serumskem vzorcu. Po priporočilu IFCC je za določitev AST (E.C. 2.6.1.1.) pri  $37^\circ\text{C}$  obvezen dodatek piridoksalfosfata, ki aktivira apoencim:



#### Reagenti:

- ALT (kat.št. OSR6107), Olympus;
- Raztopina piridoksalfosfata, *ang.* Pyridoxal phosphate liquid (kat.št. 60106), Olympus;
- Sistemski kalibrator, *ang.* System Calibrator (kat. št. 66300), Olympus;
- Kontrolni serum 1, *ang.* Control Serum 1 (kat. št. ODC0003), Olympus;
- Kontrolni serum 2, *ang.* Control Serum 2 (kat. št. ODC0004), Olympus.

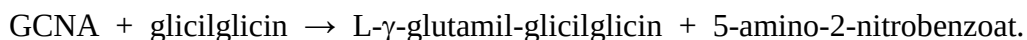
#### Postopek:

Meritve smo izvedli z analizatorjem Olympus AU 400 (Beckman Coulter), skladno z rutinskim postopkom. Linearno območje testa je bilo 0,05 - 8,33  $\mu\text{kat/L}$ . Rezultate meritev smo podali v  $\mu\text{kat/L}$ . Pri odraslih so referenčne vrednosti: do 0,56  $\mu\text{kat/L}$  pri ženskah in do 0,74  $\mu\text{kat/L}$  pri moških.

### 3.3.6. Določanje katalitične aktivnosti $\gamma$ GT v serumskih vzorcih bolnikov

#### Princip meritve:

$\gamma$ -glutamil transferaza ( $\gamma$ GT) katalizira prenos gama-glutamilne skupine substrata L- $\gamma$ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid (GCNA) na glicilglicin. Pri tem nastane obarvana spojina, 5-amino-2-nitrobenzoat. Sprememba absorbance, izmerjene pri  $\lambda = 410/480$  nm, je proporcionalna aktivnosti  $\gamma$ GT v serumskem vzorcu. Po IFCC priporočen princip reakcije za določanje  $\gamma$ GT (E.C. 2.3.2.2.) pri 37°C je:



#### Reagenti:

- GGT (kat.št. OSR6120), Olympus;
- Sistemski kalibrator, *ang.* System Calibrator (kat. št. 66300), Olympus;
- Kontrolni serum 1, *ang.* Control Serum 1 (kat. št. ODC0003), Olympus;
- Kontrolni serum 2, *ang.* Control Serum 2 (kat. št. ODC0004), Olympus.

#### Postopek:

Meritve smo izvedli z analizatorjem Olympus AU 400 (Beckman Coulter), skladno z rutinskim postopkom. Linearno območje testa je bilo 0,08 – 20,0  $\mu$ kat/L. Rezultate meritev smo podali v  $\mu$ kat/L. Pri odraslih so referenčne vrednosti do 0,63  $\mu$ kat/L za ženske in do 0,92  $\mu$ kat/L za moške.

### 3.3.7. Določanje koncentracij hemoglobina v vzorcih venske krvi bolnikov

#### Postopek:

Koncentracije hemoglobina v vzorcih venske krvi smo določali skladno z navodili proizvajalca, s hematološkim analizatorjem LH 780 (Beckman Coulter, ZDA).

#### Reagenti:

- Raztopina Lyse S III (kat. št. 844155), Beckman Coulter;
- Raztopina LH Diluent (kat. št. 8547194), Beckman Coulter;
- Reagenčni komplet LH Pak Kit (kat. št. 8547195), Beckman Coulter;
- Reagent Coulter Clenz (kat. št. 844222), Beckman Coulter;
- Reagent Coulter Latron Primer (kat. št. 7546915), Beckman Coulter;
- Kontrola Coulter Latron Control (kat. št. 7546914), Beckman Coulter.

**Princip meritve:**

Z dodatkom hemoliznega reagenta (Lyse III DIFF) hemoliziramo eritrocite, sproščeni fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ioni hemoglobina pa se s kalijevim fericianidom oksidirajo v feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) obliko, pri čemer nastane hemiglobin. Hemiglobin reagira s cianidnimi ioni iz dodanega kalijevega cianida in nastane hemiglobincianid. Ta ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 540 nm, zato ga merimo fotometrično. S Coulterjevim analizatorjem določamo koncentracijo hemoglobina pri valovni dolžini 525 nm. Meritev izvršimo v merilni komori za štetje levkocitov, v kateri je nameščena hemoglobinska kiveta. Svetlobni tok, ki potuje skozi do fotocelice, je proporcionalen transmittanci v njej.

Tako izmerjeno koncentracijo hemoglobina podamo z mersko enoto g/L. Referenčna vrednost koncentracije za ženske je 120 - 140 g/L, za moške pa 140 - 180 g/L.

**3.4. STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV**

Za statistično obdelavo naših rezultatov smo uporabili statistična programa IBM SPSS Statistica 21.0 (SPSS, Inc. Chicago, USA) in MedCalc<sup>®</sup> v14.8.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Najprej smo na podlagi splošnega testa ESD (*ang.* Extreme Studentized Deviate) izločili vse ubežne vrednosti.

V vsaki posamezni skupini bolnikov smo za vsak izmerjeni parameter izračunali njegovo povprečno vrednost, standardi odklon, mediano in razpon. Vse koncentracije  $\text{CRP} < 3$  mg/L smo za statistično obdelavo privzeli kot 3 mg/L. Normalnost porazdelitev posameznih parametrov smo ugotavljali s Kolmogorov-Smirnovim testom. Za večino parametrov smo določili nenormalno porazdelitev, zato smo zanje podajali mediane ter razpone izmerjenih vrednosti.

Zaradi majhnega števila obravnavanih bolnikov in nenormalno porazdeljenih parametrov smo rezultate v nadaljevanju analizirali z neparametričnimi statističnimi metodami. Tako smo z uporabo Kruskal-Wallisovega testa za statistične razlike medsebojno primerjali skupine bolnikov in ugotavljali, v katerih parametrih se razlikujejo. Medsebojno povezanost oziroma soodvisnost parametrov smo opisovali s Spearmanovim koeficientom korelacije ( $\rho$ ).

Primerjavo po dveh neodvisnih skupin za vsak posamezen parameter smo izvedli z Mann-Whitneyevim U testom (primerjava parov). Vrednosti  $p$ , ki so bile manjše od 0,05, smo vzeli kot statistično značilne.

## 4. REZULTATI

### 4.1. ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO

Podatke za raziskavo smo pridobili v obdobju od septembra 2007 do aprila 2012. Raziskava je v Splošni bolnišnici Izola potekala prospektivno, nato pa smo jo, zaradi majhnega števila vključenih preiskovancev, razširili in retrogradno pridobili podatke bolnikov Hematološke klinike UKC Ljubljana.

V raziskavo smo vključili 29 bolnikov, 18 žensk in 11 moških, starih od 19 do 85 let. Njihova povprečna starost je bila 69 let. Sedemnajst bolnikov (17/29) pa je bilo starejših od 70 let (Preglednica 4).

#### **Preglednica 4 :** Demografske in klinične značilnosti bolnikov.

Diagnoza: MDS= mielodisplastični sindrom; RA= refraktarna anemija; SA= sideroblastna anemija; del 5q= delecija dolgega kraka kromosoma 5; AA= aplastična anemija; DBA= Diamond-Blackfanova anemija; PM= primarna mielofibroza; MB= mieloproliferativna bolezen; HA= hemolitična anemija.

Spol: Ž= ženska, M= moški.

| <b>Bolnik<br/>(št.)</b> | <b>Diagnoza</b> | <b>Spol</b> | <b>Starost</b> | <b>Začetna<br/>koncentracija<br/>feritina (µg/L)</b> | <b>Končna<br/>koncentracija<br/>feritina (µg/L)</b> | <b>Število enot<br/>KE na<br/>mesec</b> |
|-------------------------|-----------------|-------------|----------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                       | MDS, RA         | M           | 60             | 1569,65                                              | 3074,53                                             | 4                                       |
| 2                       | MDS, RA         | Ž           | 65             | 2503,00                                              | 5083,00                                             | 6 – 8                                   |
| 3                       | MDS, RA         | Ž           | 60             | 1219,00                                              | 645,00                                              | 4 – 8                                   |
| 4                       | MDS, RA         | Ž           | 79             | 1315,00                                              | 2022,00                                             | 4                                       |
| 5                       | MDS, RA         | Ž           | 84             | 1158,00                                              | 3657,00                                             | 6 – 8                                   |
| 6                       | MDS, RA         | Ž           | 76             | 1793,13                                              | 2982,30                                             | 2                                       |
| 7                       | MDS, RA         | Ž           | 76             | 2632,77                                              | 1471,23                                             | 3                                       |
| 8                       | MDS, RA         | M           | 85             | 1569,65                                              | 3074,53                                             | 4 – 6                                   |
| 9                       | MDS, RA         | M           | 80             | 1593,20                                              | 3089,20                                             | 2                                       |
| 10                      | MDS, RA         | Ž           | 71             | 5845,90                                              | 5777,80                                             | 2 – 3                                   |
| 11                      | MDS, SA         | Ž           | 80             | 12196,00                                             | 5539,00                                             | 2 – 3                                   |
| 12                      | MDS, SA         | M           | 85             | 1756,00                                              | 2461,00                                             | 2 – 4                                   |
| 13                      | MDS, del 5q     | Ž           | 70             | 1310,00                                              | 1472,00                                             | 2                                       |
| 14                      | MDS, del 5q     | Ž           | 85             | 1510,00                                              | 2496,00                                             | 4                                       |
| 15                      | MDS, del 5q     | M           | 72             | 2225,70                                              | 3858,10                                             | 4 – 6                                   |

| Bolnik<br>(št.) | Diagnoza    | Spol | Starost | Začetna<br>koncentracija<br>feritina (µg/L) | Končna<br>koncentracija<br>feritina (µg/L) | Število enot<br>KE na<br>mesec |
|-----------------|-------------|------|---------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|
| 16              | MDS, del 5q | Ž    | 64      | 2399,00                                     | 2248,00                                    | 2                              |
| 17              | MDS         | M    | 62      | 3234,00                                     | 2014,00                                    | /                              |
| 18              | MDS         | M    | 83      | 1310,00                                     | 925,00                                     | 2                              |
| 19              | AA, DBA     | M    | 28      | 643,00                                      | 598,00                                     | 4                              |
| 20              | AA, DBA     | M    | 19      | 1278,00                                     | 638,00                                     | 4                              |
| 21              | PM          | Ž    | 67      | 1231,00                                     | 680,00                                     | 2                              |
| 22              | PM          | Ž    | 62      | 1074,00                                     | 1249,00                                    | 4 – 6                          |
| 23              | PM          | Ž    | 65      | 933,00                                      | 471,00                                     | /                              |
| 24              | PM          | Ž    | 59      | 1497,00                                     | 2302,00                                    | 4 – 6                          |
| 25              | PM          | M    | 72      | 1045,00                                     | 1861,00                                    | 4 – 6                          |
| 26              | MB          | Ž    | 54      | 3460,00                                     | 3271,00                                    | 4                              |
| 27              | MB          | M    | 79      | 1579,00                                     | 2761,00                                    | 4                              |
| 28              | HA          | Ž    | 82      | 3103,00                                     | 273,00                                     | /                              |
| 29              | HA          | Ž    | 74      | 1487,00                                     | 371,00                                     | /                              |

Bolezenska stanja, ki smo jih zajeli v raziskavo, so bila različna. Vključili smo 18 bolnikov z MDS, 2 z Diamond-Blackfanovo anemijo (DBA), 5 s primarno mielofibrozo (PM), 2 z mieloproliferativno boleznijo (MB) in 2 bolnici s hemolitično anemijo (HA). Bolnike z MDS smo razvrščali po kriterijih FAB (*ang.* French-American-British criteria). Med njimi jih je bilo 10 bolnikov z refraktarno anemijo (RA), 2 z idiopatsko sideroblastno anemijo (SA), 4 s sindromom 5q (MDS del 5q) in 2 bolnika z neklasificiranim MDS (MDS-NK) (Preglednica 5).

**Preglednica 5:** Značilnosti preiskovancev glede na njihove hematološke bolezni.

| Značilnost                      | MDS<br>n = 18 | DBA<br>n = 2 | PM<br>n = 5 | MB<br>n = 2 | HA<br>n = 2 | Vsi bolniki<br>n = 29 |
|---------------------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| Starost<br>( $\bar{x} \pm SD$ ) | 74 ± 9        | 24 ± 6       | 65 ± 5      | 67 ± 18     | 78 ± 6      | 69 ± 16               |
| Spol (Ž:M)                      | 11 : 7        | 0 : 2        | 4 : 1       | 1 : 1       | 2 : 0       | 18 : 11               |



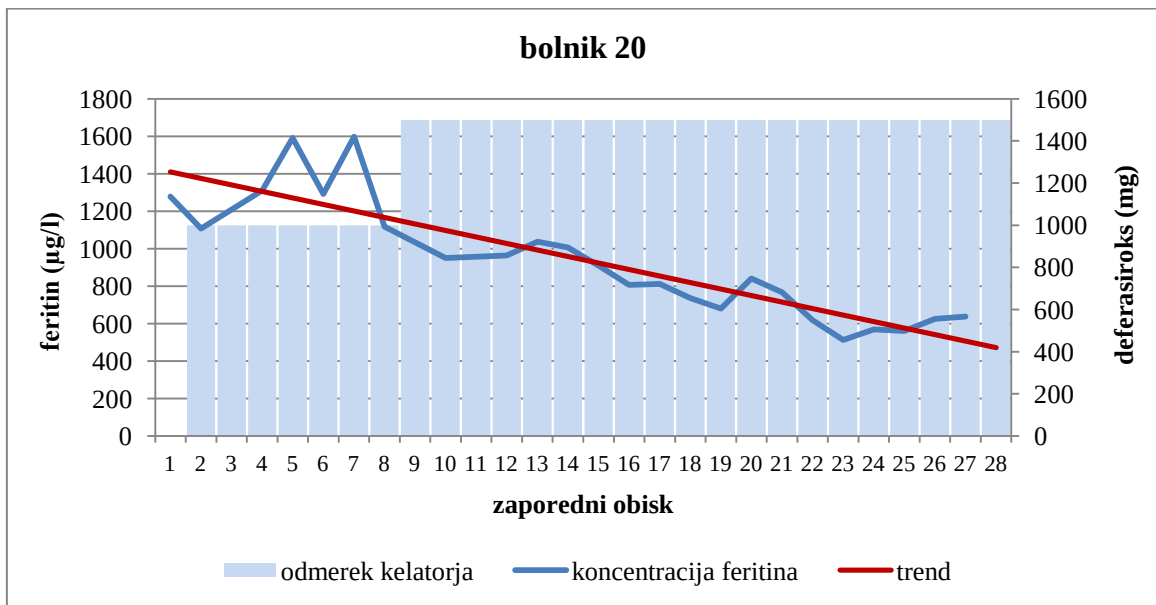
## **4.2. RAZDELITEV PREISKOVANCEV**

Raziskavo smo izvedli na treh skupinah bolnikov zdravljenih z deferasiromsom (Preglednica 6). Preiskovance smo razdelili v tri skupine, in sicer glede na dinamiko sprememb oziroma trende izmerjenih koncentracij S-ferritina pri posameznem bolniku (Graf 1, 2, 3), s čimer smo opredelili učinkovitost kelacije pri vsakem posamezniku.

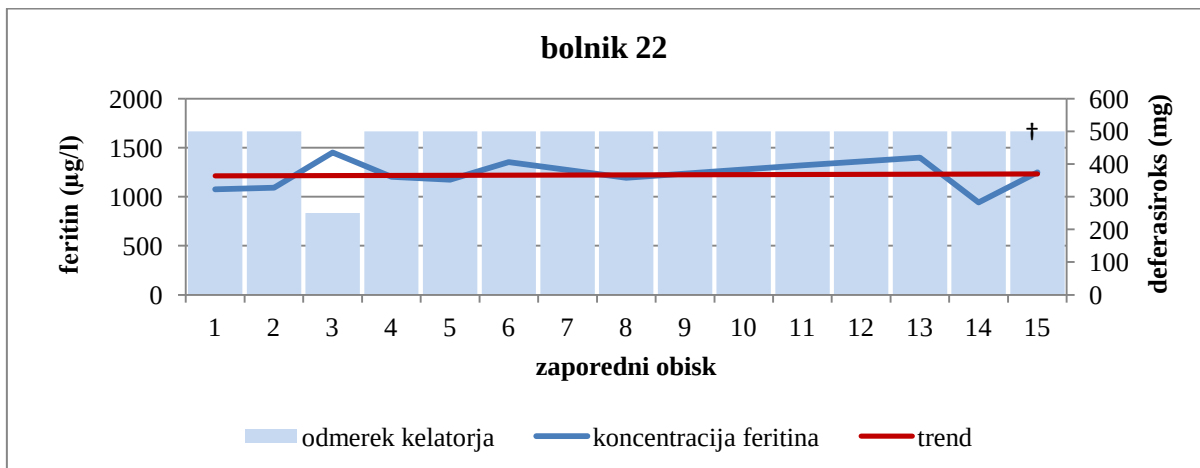
V prvi skupini so bili bolniki, ki so prejeli redne transfuzije KE in pri katerih je začetna zvečana koncentracija S-ferritina zaradi zdravljenja s kelatorjem padala (primer Graf 1). To je bila torej skupina preiskovancev, pri katerih je bila kelacija uspešna. V tej skupini je bilo 9 bolnikov, 5 žensk in 4 moški, s povprečno starostjo 61 let. V raziskavo smo vključili tudi 4 bolnike (3 ženske in 1 moški), ki v času poteka raziskave niso prejeli transfuzij KE, so pa bili zaradi tega, ker so jih dobivali predhodno in posledično nakopičenega železa, zdravljeni s kelatorjem deferasiromsom. Ker so se njihove koncentracije S-ferritina s kelacijsko terapijo znižale, smo jih vključili med preiskovance v prvi skupini.

V drugo skupino smo vključili tiste bolnike, ki so redno prejeli transfuzije KE in deferasiroms in so imeli stabilne koncentracije S-ferritina (primer Graf 2). V njej je bilo 5 bolnic, s povprečno starostjo 68 let.

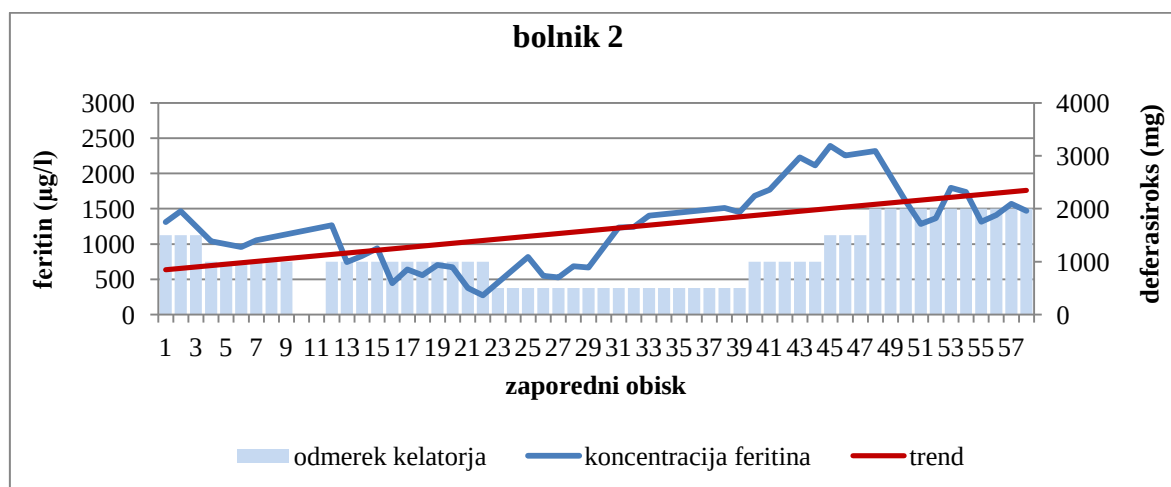
Tretja skupina preiskovancev je bila sestavljena iz bolnikov, pri katerih so se ob rednih transfuzijah KE in jemanju deferasiromsa koncentracije S-ferritina povečevale (primer Graf 3). To skupino smo opredelili kot skupino, v kateri zdravljenje s kelacijo ni bilo uspešno. Štela je 15 bolnikov, 8 žensk in 7 moških, povprečno starih 74 let. Podatek, da je v tretji skupini največ bolnikov, seveda ni bil obetaven.



**Graf 1:** Primer bolnika prve skupine s padajočim trendom koncentracije S-feritina.



**Graf 2:** Primer bolnika druge skupine z stabilnim trendom koncentracije S-feritina.



**Graf 3:** Primer bolnika tretje skupine z naraščajočim trendom koncentracije S-ferritina.

**Preglednica 6:** Demografske in klinične lastnosti bolnikov iz vseh treh skupin.

| <b>Značilnost</b>                                                                 | <b>Skupina 1<br/>n = 9</b>                | <b>Skupina 2<br/>n = 5</b>                 | <b>Skupina 3<br/>n = 15</b>                | <b>Vsi bolniki<br/>n = 29</b>              |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Starost<br>( $\bar{x} \pm SD$ )                                                   | 61 ± 21                                   | 68 ± 6                                     | 74 ± 10                                    | 69 ± 16                                    |
| Spol<br>(ženske : moški)                                                          | 5 : 4                                     | 5 : 0                                      | 8 : 7                                      | 18 : 11                                    |
| Skupno število aplikacij<br>transfuzij (n)                                        | 86                                        | 86                                         | 355                                        | 527                                        |
| Vnos Fe ob transfuziji (mg)<br>(mediana, rang)<br><i>p</i>                        | 500<br>(250-1500)<br><i>p</i> < 0,0001    | 875<br>(250-1500)<br><i>p</i> < 0,0001     | 750<br>(250-1500)<br><i>p</i> < 0,0001     | 500<br>(250-1500)<br><i>p</i> < 0,0001     |
| Število dni med dvema<br>zaporednima transfuzijama<br>(mediana, rang)<br><i>p</i> | n = 82<br>26 (7-237)<br><i>p</i> < 0,0001 | n = 80<br>28,5 (5-63)<br><i>p</i> = 0,0006 | n = 337<br>21 (2-168)<br><i>p</i> < 0,0001 | n = 499<br>21 (2-237)<br><i>p</i> < 0,0001 |

### **4.3. SPREMLJENJE PREOBREMENJENOSTI Z ŽELEZOM Z RAZLIČNIMI PARAMETRI**

Obisk bolnika v hematološki ambulanti, med katerim so mu prvič predpisali deferasiroks, smo označili kot začetni obisk, ne glede na morebitne predhodne obiske in/ali jemanje katerega koli drugega kelatorja. Bolniki so hematološko ambulanto v povprečju obiskovali enkrat do dvakrat mesečno. Skupno smo zabeležili 656 ambulantnih obiskov, ti pa si niso sledili v enakih časovnih intervalih.

Ob vsakem obisku so poleg splošnega počutja bolnika in morebitnih nenavadnih kliničnih znakov zabeležili tudi število enot KE, ki naj bi jih posamezen bolnik prejel glede na izmerjeno koncentracijo hemoglobina, dnevni odmerek deferasiroksa, morebitno spremembo odmerka glede na koncentracijo S-feritina ter vsa druga zdravila, ki jih je prejemal.

#### **4.3.1. Količina vnesenega železa s transfuzijami koncentriranih eritrocitov**

Malcovati priporoča vzdrževanje koncentracije hemoglobina odraslih bolnikov z MDS nad 90 g/L za moške in nad 80 g/L za ženske. Nižje vrednosti hemoglobina so namreč neodvisno povezane s krajšim časom preživetja bolnikov (13). V naši raziskavi smo posameznemu bolniku ustrezno število enot KE predpisali vedno, ko je imel koncentracijo hemoglobina < 90 g/L, in to ne glede na spol. Zahteve za zdravljenje tovrstnih anemij so namreč bile, da se je s transfuzijami KE koncentracija hemoglobina vzdrževala nad vrednostjo 80 g/L. V času raziskave so bolniki prejeli do največ sedem enot KE na transfuzijo. Ena do tri enote KE so bolniki prejeli v enem dnevu, štiri in več enot KE pa so bolniki prejeli v dveh zaporednih dneh. Število enot KE, ki jih je posamezen bolnik prejel na mesec, je bilo statistično normalno porazdeljeno ( $3 \pm 2$ ;  $p > 0,10$ ). S posamezno enoto KE vnesemo v telo od 200 do 250 mg železa (13, 40, 44, 45). Na osnovi poročil več raziskav (13, 21, 30) smo preračunali, da z vsako enoto KE v človekovo telo vnesemo približno 250 mg železa, saj ga 1 ml tovrstne transfuzije vsebuje približno 1,16 mg (46). Volumen enote KE je med 200 in 290 ml, zelo redko 300 ml ali več. Mediana vrednost količin tako prejetega železa je bila pri naših bolnikih 500 mg (250 – 1.500 mg;  $p < 0,0001$ ) na transfuzijo. V Preglednici 6 so podane vrednosti median prejete količine železa za vsako od teh skupin bolnikov.

#### 4.3.2. Odmerjanje kelatorja

Različni avtorji navajajo različne začetne odmerke zdravilne učinkovine deferasiroks, in sicer od 10, 20 ali največ 30 mg/kg/dan (38, 48). V Preglednici 7 je prikazano število tablet, ki vsebujejo dnevne odmerke zdravilne učinkovine na kilogram telesne mase bolnika.

Začetni odmerki, uporabljeni v naši raziskavi, so bili: 1.500 mg/dan (20 do 25 mg/kg/dan; 5 bolnikov), 1.000 mg/dan (15 do 20 mg/kg/dan; 13 bolnikov), 500 mg/dan (10 mg/kg/dan; 4 bolniki) in 250 mg/dan (5 mg/kg/dan; 3 bolniki). Velikost začetnega odmerka je bila odvisna od koncentracije S-feritina, števila že prejetih enot KE in njihovega pričakovanega povprečnega števila na mesec. Upoštevati pa bi morali tudi telesno maso posameznega bolnika.

**Preglednica 7:** Odmerki deferasiroksa in njegovi dnevni vnosi glede na telesno maso bolnikov.

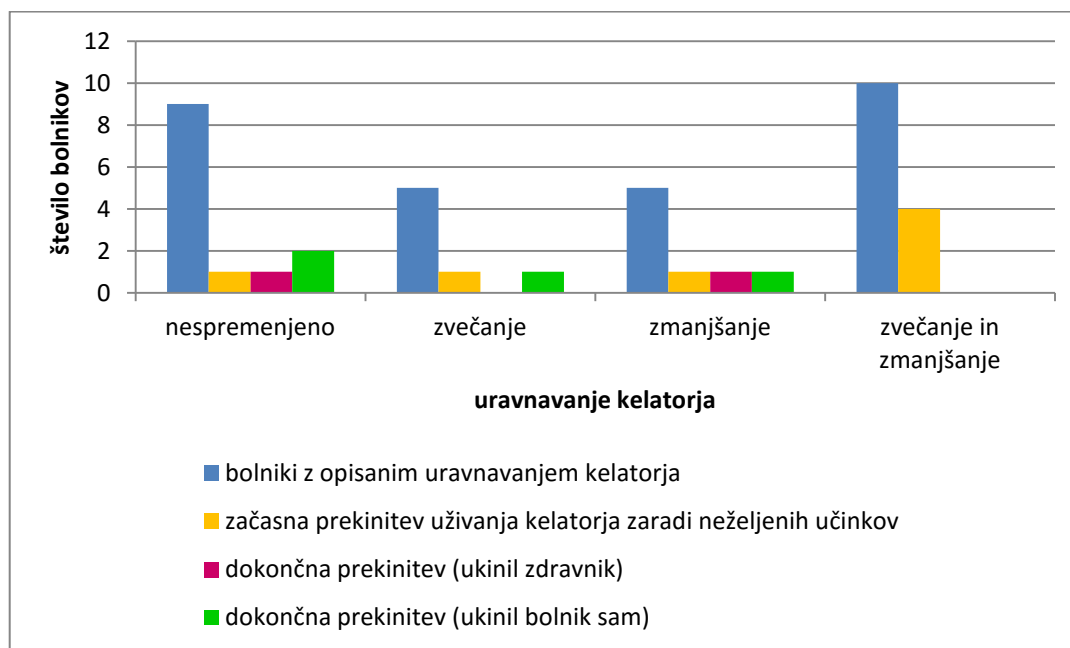
| Količina<br>deferasiroksa<br>(mg /kg TM/dan) | Odmerek tablete<br>(mg) |
|----------------------------------------------|-------------------------|
| 10                                           | 500                     |
| 15                                           | 1.000                   |
| 20                                           | 1.500                   |
| 25                                           | 2.000                   |
| 30                                           | 2.500                   |

TM = telesna masa

Med raziskavo smo spreminjali oziroma uravnavali odmerke zdravila glede na počutje bolnikov ali neželene učinke (Preglednica 8). Začetni odmerek se pri devetih (9/29) bolnikih med raziskavo ni spreminjal, ostalim dvajsetim pa smo ga prilagajali glede na koncentracije njihovega serumskega feritina. Petim (5/29) smo ga tekom raziskave povečali, petim (5/29) pa zmanjšali. Deset (10/29) bolnikov je med raziskavo prejelo različne odmerke, in sicer bodisi nižje ali višje, glede na začetnega. Dve bolnici sta po navodilu hematologa prenehali jemati kelator, ker se jima je koncentracija S-feritina ustrezno zmanjšala (pod 1.000 µg/L; 318 in 338 µg/L).

**Preglednica 8:** Odmerki deferasiroksa v času raziskave.

| Uravnavanje količine deferasiroksa glede na začetni odmerek | Število bolnikov<br>n = 29 |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Nespremenjeno                                               | 9                          |
| Zvečanje                                                    | 5                          |
| Zmanjšanje                                                  | 5                          |
| Zvečanje in zmanjšanje                                      | 10                         |
| Začasna prekinitve zaradi neželenih učinkov                 | 7                          |
| Dokončna prekinitve uživanja                                | 2                          |
|                                                             | 4 (samovoljno)             |



**Graf 4:** Uravnavanje deferasiroksa glede na začetni odmerek v času raziskave.

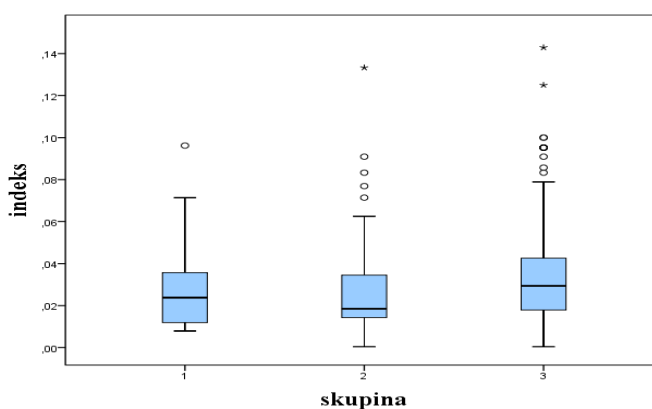
Sprva smo bolnikom svetovali, naj zdravilo zaužijejo zjutraj, vsaj 30 minut pred zajtrkom, raztopljeno v vodi, jabolčnem ali pomarančnem soku. Ker pa so nekatere bolnike ob uvajanju zdravila spremljali neželeni učinki (slabost, utrujenost, prebavne motnje, driske, zaprtje, izguba apetita, vrtoglavica), smo vsem svetovali, naj zdravilo jemljejo zvečer, pred spanjem. Zaradi nevzdržnih in ponavljajočih se neželenih učinkov so štirje (4/29) samovoljno opustili njegovo jemanje. Neželeni učinki so botrovali tudi začasnim

prekinitvam njegovega jemanja pri 7 bolnikih (7/29), vendar so ti nato po krajšem času nadaljevali z enakim ali manjšim odmerkom.

Analizirali smo vse bolnike, ki so pričeli jemati kelator, ne glede na dolžino njegovega jemanja. Časovna mediana spremljanja zdravljenja z deferasiroksom je bila 447 dni (36-1351;  $p = 0,0446$ ). Mediana vrednost trajanja sodelovanja v raziskavi za bolnike iz 1. skupine je bila 565 dni (225-958,  $p > 0,10$ ), iz 2. skupine 485 (63-1265,  $p > 0,10$ ) in iz 3. skupine 338 dni (36-1651,  $p > 0,10$ ). Med potekom raziskave sta 2 bolnika prešla iz osnovne bolezni v akutno mieloično levkemijo (AML), pri čemer je bilo jemanje kelatorja ukinjeno. Pri dveh bolnicah je bil deferasiroks dokončno ukinjen zaradi znižanja koncentracije S-feritina pod 400  $\mu\text{g/L}$ . Zaradi ponavljajočih se neželenih učinkov pa so 4 bolniki samovoljno dokončno prenehali jemati zdravilo.

#### 4.3.3. Kelacijski indeksi in koncentracije S-feritina

Preglednica 4 prikazuje povprečno število enot KE, ki jih je posamezen bolnik prejel v enem mesecu. Na osnovi teh podatkov smo izračunali kelacijske indekse, ki predstavljajo razmerje med količino prejetega železa s transfuzijo KE ter količino zaužitega deferasiroksa znotraj časovnega intervala do naslednje aplikacije KE. Ugotovili smo, da med medianami indeksov posameznih skupin bolnikov obstajajo statistično značilne razlike,  $p = 0,001$  (Graf 5, Preglednica 11).



**Graf 5:** Primerjalni grafični prikaz medianih vrednosti kelacijskih indeksov pri skupinah bolnikov s padajočo [1], stabilno [2] in naraščajočo [3] koncentracijo feritina.

Kot začetno smo upoštevali tisto koncentracijo S-feritina, ki jo je bolnik imel ob začetnem obisku pri hematologu, ko mu je ta predpisal deferasiroks. Končna koncentracija S-feritina

pa je bila tista, ki jo je imel bolnik ob zaključku raziskave ali ob zadnjem obisku pri hematologu, ko je še jemal deferasiroks (Preglednica 4). Pred statističnim vrednotenjem podatkov smo s pomočjo splošnega testa ESD (*ang.* Extreme Studentized Deviate) izločili sedem ubežnih vrednosti za S-feritin (Preglednica 9). Pri večini teh vrednosti so bile sočasno izmerjene tudi koncentracije CRP nad referenčno vrednostjo ( $> 8$  mg/L), zato lahko sklepamo, da je bil S-feritin v teh primerih zvišan zaradi vnetja.

**Preglednica 9:** Izločitev ubežnih vrednosti S-feritina v posameznih skupinah in skupno.

| Parameter                | Podatek           | Skupina 1 | Skupina 2 | Skupina 3 | Skupno    |
|--------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>S-feritin</b>         | n                 | 117       | 76        | 347       | 540       |
|                          | število ubežnikov | <b>1</b>  | <b>0</b>  | <b>6</b>  | <b>7</b>  |
| <b>kelacijski indeks</b> | n                 | 80        | 80        | 332       | 492       |
|                          | število ubežnikov | <b>0</b>  | <b>6</b>  | <b>4</b>  | <b>10</b> |

V raziskavi so sodelovali bolniki z začetnimi vrednostmi S-feritina med 643,00 in 12.196,00  $\mu\text{g/L}$ . Ker pa smo izločili ubežne vrednosti S-feritina, je bila njihova mediana 1.569,65  $\mu\text{g/L}$  (643,00 – 5.845,90;  $p < 0,0001$ ). V Preglednici 10 smo zbrali vrednosti S-feritina in kelacijskih indeksov glede na skupine bolnikov.

Končna vrednost S-feritina je bila v 1. skupini statistično različna od tistih v 2. in 3. skupini, kar smo potrdili s Kruskal-Wallisovim testom ( $p = 0,004$ ) (Preglednica 11). Mediane kelacijskih indeksov so se med skupinami prav tako razlikovale, kar smo ugotovili s statističnim testom ANOVA ( $p = 0,001$ ). Kelacijski indeksi 3. skupine so bili statistično različni od tistih v 1. in 2. skupini, kar smo potrdili s Kruskal-Wallisovim testom. Posamezne  $p$ -vrednosti statističnih analiz so podane v Preglednici 11.

Zanimala nas je tudi povezava med začetnimi in končnimi vrednostmi S-feritina v posamezni skupini bolnikov. Vrednosti Spearmanovih koeficientov so podane v Preglednici 12. Korelacijo med končnimi in začetnimi koncentracijami S-feritina smo za vse bolnike opisali s Spearmanovim koeficientom,  $\rho = 0,548$  (95% CI 0,227 – 0,762;  $p = 0,0021$ ), ki je pokazal statistično značilno povezanost primerjanih parametrov. Statistično značilno korelacijo med koncentracijami S-feritina in odmerki deferasiroksa,  $\rho = 0,288$  (95% CI 0,206 - 0,366;  $p < 0,0001$ ), smo potrdili pri vseh bolnikih.



Povezava med koncentracijami S-ferritina in kelacijskim indeksom pa je bila statistično pomembna le v 1. skupini bolnikov ( $p = 0,01499$ ), kar potrjuje statistično značilno povezanost med zniževanjem S-ferritina in kelacijskim indeksom. V skupini bolnikov s stabilnimi vrednostmi S-ferritina in v skupini bolnikov z njegovimi naraščajočimi vrednostmi pa te povezave ni bilo.

**Preglednica 10:** Statistični podatki za primerjanje vrednosti S-ferritina in kelacijskih indeksov za vse tri skupine bolnikov.

| Parameter                                                                                        | Skupina 1<br>n = 9                                       | Skupina 2<br>n = 5                                      | Skupina 3<br>n = 15                                      | Vsi bolniki<br>n = 29                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>S-ferritin</b> [ $\mu\text{g/L}$ ]<br>(mediana, rang)<br>$p$                                  | n = 115<br>1310,00<br>(273,00-8951,00)<br>$p < 0,0001^1$ | n = 76<br>1831,50<br>(475,00-6251,00)<br>$p = 0,0003^1$ | n = 342<br>2335,50<br>(274,00-7487,00)<br>$p < 0,0001^1$ | n = 533<br>2181,00<br>(273,00 -8951,00)<br>$p < 0,0001^1$ |
| <b>Začetni S-ferritin</b> [ $\mu\text{g/L}$ ]<br>(mediana, rang)/ $\bar{x} \pm \text{SD}$<br>$p$ | 1310,00<br>(643,00-5635,00)<br>$p = 0,0003^1$            | 2711,73 $\pm$ 1851,46<br>$p > 0,10$                     | 1569,65<br>(1045,00-3460,00)<br>$p = 0,0092^1$           | 1569,65<br>(643,00-5845,90)<br>$p < 0,0001^1$             |
| <b>Končni S-ferritin</b> [ $\mu\text{g/L}$ ]<br>(mediana, rang)<br>$p$                           | 638,00<br>(273,00-5539,00)<br>$p = 0,0013^1$             | 2285,21 $\pm$ 2031,78<br>$p > 0,10^2$                   | 2897,64 $\pm$ 891,23<br>$p > 0,10^2$                     | 2288,44 $\pm$ 1523,91<br>$p > 0,10^2$                     |
| <b>Kelacijski indeks</b><br>(n, mediana, rang)<br>$p$                                            | n = 80<br>0,0238<br>(0,0079-0,0962)<br>$p < 0,0001^1$    | n = 74<br>0,0185<br>(0,0004-0,1429)<br>$p < 0,0001^1$   | n = 328<br>0,0294<br>0,004-0,1429<br>$p < 0,0001^1$      | n = 482<br>0,0250<br>(0,004-0,1429)<br>$p < 0,0001^1$     |

<sup>1</sup> Vrednosti  $p$  so statistično značilne.

<sup>2</sup> Vrednosti  $p$  testa Kolmogorov-Smirnov za pregled porazdelitve podatkov (normalna porazdelitev je prisotna, če so vrednosti  $p > 0,10$ )

**Preglednica 11:** Statistične razlike v merjenih parametrih med posameznimi skupinami bolnikov.

| parameter         | Skupina 1/ skupina 2 | Skupina 1/ skupina 3 | Skupina 2/ skupina 3 |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                   | $p$                  | $p$                  | $p$                  |
| S-ferritin        | 0,1769               | 0,0013 <sup>1</sup>  | 0,0102 <sup>1</sup>  |
| končni S-ferritin | 0,0532               | 0,0026 <sup>1</sup>  | 0,0887               |
| kelacijski indeks | 0,503                | 0,003 <sup>1</sup>   | 0,0001 <sup>1</sup>  |

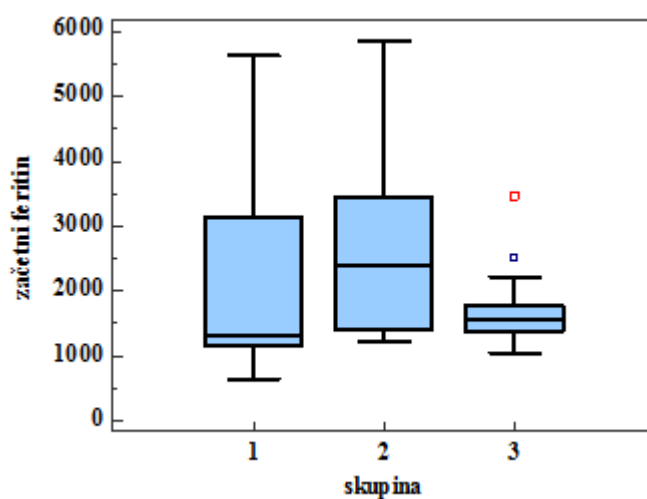
<sup>1</sup> Vrednosti  $p$  so statistično značilne.

**Preglednica 12:** Statistična povezanost med primerjanimi parametri v vseh treh skupinah bolnikov.

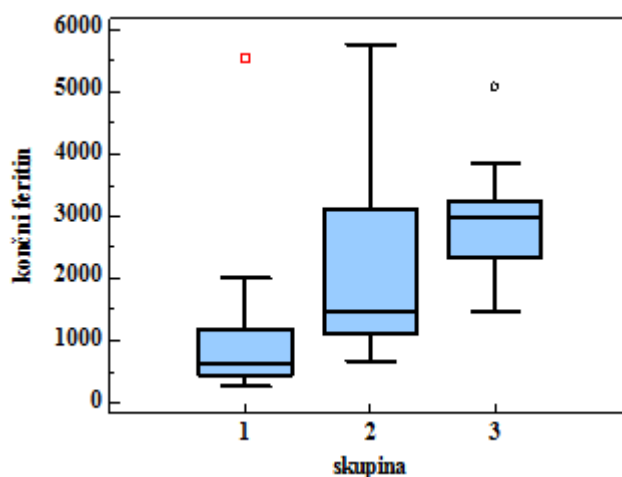
| Parameter                                                      | Skupina 1                                              | Skupina 2                                         | Skupina 3                                          | Vsi bolniki                                        |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Končni /začetni<br>S-ferritin<br>(n, $\rho$ , 95%CI, $p$ )     | 9<br>0,367<br>-0,393 do 0,829<br>$p = 0,3317$          | 5<br>0,900<br>0,0861 do 0,993<br>$p = 0,0374^1$   | 15<br>0,635<br>0,182 do 0,866<br>$p = 0,0110^1$    | 29<br>0,548<br>0,227 do 0,762<br>$p = 0,0021^1$    |
| S-ferritin /<br>deferasiroks<br>(n, $\rho$ , 95%CI, $p$ )      | 104<br>-0,280<br>(-0,448 do -0,0924)<br>$p = 0,0040^1$ | 73<br>0,0968<br>(-0,136 do 0,320)<br>$p = 0,4154$ | 332<br>0,538<br>(0,457 do 0,610)<br>$p < 0,0001^1$ | 509<br>0,288<br>(0,206 do 0,366)<br>$p < 0,0001^1$ |
| S-ferritin /<br>kelacijski indeks<br>(n, $\rho$ , 95%CI, $p$ ) | 69<br>0,292<br>0,0593 do 0,494<br>$p = 0,0149^1$       | 64<br>0,010<br>-0,036 do 0,255<br>$p = 0,9373$    | 268<br>-0,117<br>-0,233 do 0,00328<br>$p = 0,0566$ | 401<br>-0,005<br>-0,103 do 0,0926<br>$p = 0,9152$  |

CI = interval zaupanja (*ang.* Confidence Interval)

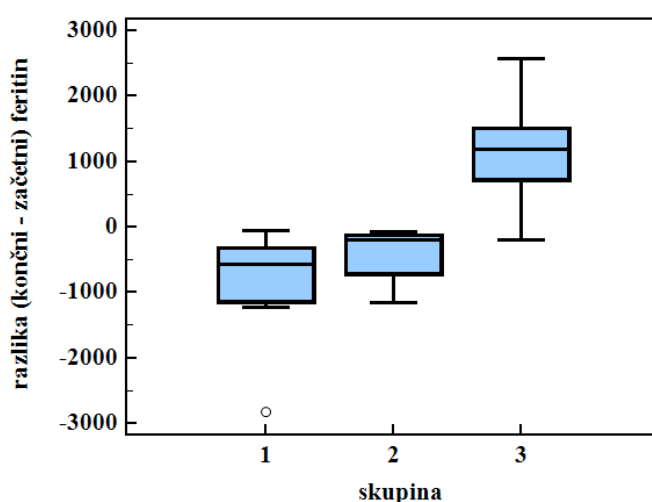
<sup>1</sup> Vrednosti  $p$  so statistično značilne.



**Graf 6:** Prikaz median začetnih vrednosti S-ferritina med skupinami bolnikov s padajočo, stabilno in naraščajočo koncentracijo S-ferritina.



**Graf 7:** Prikaz median končnih vrednosti S-feritina med skupinami bolnikov s padajočo, stabilno in naraščajočo koncentracijo S-feritina.



**Graf 8:** Razlike med medianimi vrednostmi končnih in začetnih koncentracij S-feritina pri skupinah bolnikov s padajočo, stabilno in naraščajočo koncentracijo feritina.

#### 4.3.4. Biokemični parametri za oceno funkcije jeter in ledvic

Ob posameznih obiskih je hematolog za vsakega bolnika naročil laboratorijske preiskave, hemogram in določitev S-feritina, večkrat pa je naročil tudi ostale biokemične preiskave: serumski AST in ALT (za oceno jetrne funkcije), serumski kreatinin (za oceno ledvične funkcije) in CRP (pokazatelj vnetja). Rezultati meritev vseh teh analitov se niso porazdeljevali normalno (Preglednica 13).

**Preglednica 13:** Vrednosti ostalih biokemičnih serumskih analitov določenih v vseh treh skupinah bolnikov.

| S-analit         | Podatek  | Skupina 1    | Skupina 2    | Skupina 3    |
|------------------|----------|--------------|--------------|--------------|
| <b>ALT</b>       | n        | 106          | 62           | 291          |
|                  | mediana  | 0,560        | 0,315        | 0,550        |
|                  | (razpon) | 0,200-3,100  | 0,080-4,62   | 0,160-4,980  |
|                  | <i>p</i> | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |
| <b>AST</b>       | n        | 106          | 61           | 291          |
|                  | mediana  | 0,470        | 0,400        | 0,420        |
|                  | (razpon) | 0,22-2,190   | 0,080-3,450  | 0,150-4,03   |
|                  | <i>p</i> | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |
| <b>γ-GT</b>      | n        | 106          | 62           | 291          |
|                  | mediana  | 0,470        | 0,765        | 0,500        |
|                  | (razpon) | 0,140-2,140  | 0,160-3,520  | 0,180-14,120 |
|                  | <i>p</i> | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |
| <b>Kreatinin</b> | n        | 111          | 62           | 309          |
|                  | mediana  | 97,0         | 78,5         | 86,0         |
|                  | (razpon) | 48,0-230,0   | 41,0-160,0   | 40,0-276,0   |
|                  | <i>p</i> | $p < 0,0001$ | $p = 0,0753$ | $p < 0,0001$ |
| <b>CRP</b>       | n        | 104          | 45           | 254          |
|                  | mediana  | 3,0          | 11,0         | 3,0          |
|                  | (razpon) | 3,0-81,0     | 3,0-99,0     | 2,6-110,0    |
|                  | <i>p</i> | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |

Vrednost  $p > 0,10$  pomeni normalno porazdelitev.

Pri spremljanju dinamike aktivnosti jetrnih transaminaz smo ugotovili, da je 5 bolnikov, pri katerih so bile te ob pričetku spremljanja njihovega zdravljenja z deferasiroksom nad referenčnim območjem, te vrednosti tekom raziskave tudi obdržalo. Trije od teh so bili iz 1. skupine, 1 iz 2. skupine in 1 bolnik iz 3. skupine. Aktivnosti encimov, ki smo jih bolnikom določili ob pričetku jemanja kelatorja, niso kazale znatne tendence naraščanja, saj je večina preiskovancev njihove vrednosti ohranila znotraj referenčnega območja tekom celotnega spremljanja.

V raziskavo smo vključili 3 bolnike s povečano koncentracijo serumskega kreatinina. Pri dveh bolnikih je tekom raziskave ostala povečana, pri tretjem bolniku pa se je povečala. Pri

ostalnih preiskovancih je bila začetna koncentracija S-kreatinina znotraj referenčnih vrednosti (44 – 97  $\mu\text{mol/L}$ ). Do porasta vrednosti S-kreatinina nad referenčno vrednost je prišlo med jemanjem deferasiroksa pri 6 preiskovancih (6/29), pri čemer se je to zgodilo tekom in proti koncu naše raziskave. Pri 8 bolnikih (8/29) beležimo zvečanje in nato padec koncentracije S-kreatinina med samo raziskavo, kar je obdržalo končni S-kreatinin v referenčnem območju. Mediane vrednosti koncentracij S-kreatinina pri vseh treh skupinah bolnikov so znotraj referenčnih vrednosti.

Večina meritev S-CRP je bila pri naših bolnikih znotraj referenčnega intervala. Ker je S-ferritin reaktant akutne faze, se pri vnetjih zveča tudi njegova koncentracija. Tako smo z uporabo S-CRP lahko izključili možnost povečanja koncentracije S-ferritina zaradi vnetja. Za statistično vrednotenje izmerjenih koncentracij S-CRP smo privzeli številčno vrednost 3 pri vseh tistih meritvah, ki so bile  $< 3 \text{ mg/L}$ . Mediane vrednosti koncentracij S-CRP so bile v 1. in 3. skupini znotraj referenčnega območja. V 2. skupini pa je bila mediana nad referenčno vrednostjo 8  $\text{mg/L}$ , vendar je bilo število meritev razmeroma majhno. V primerih, ko smo istočasno izmerili zvečane koncentracije S-CRP in ekstremno povečane koncentracije S-ferritina, smo slednje izločili kot ubežne vrednosti (Preglednica 9).

## 5. RAZPRAVA

Bolnike s hudimi anemijami, ki zaradi nadomestnega zdravljenja, t.j. prejemanja rednih in pogostih transfuzij KE, kopičijo železo v telesu, zdravstveno ogrožajo toksični vplivi tega elementa, saj poškoduje organe. Sekundarni hemokromatozi se v teh primerih ne moremo izogniti. Ta predstavlja resen klinični problem, vendar pa obstaja možnost podpornega kelacijskega zdravljenja, ki ta pojav omili oziroma ga zmanjša do te mere, da nakopičeno železo za bolnika ni več ogrožujoče.

Bolniki, ki zaradi kontinuiranega vnosa eritrocitov kopičijo železo v telesu, pogosto prejemajo kelator deferasiroks. Ta je predmet različnih kliničnih raziskav po svetu. Njihov skupni cilj je dokazati njegovo učinkovitost pri zniževanju koncentracije S-feritina ali vsaj vzdrževanju njegovega ustreznega nivoja. V okviru več raziskav so tako preučevali učinke deferasiroksa na odstranjevanje nakopičenega železa s pomočjo spremljanja dinamike zmanjševanja koncentracij S-feritina (13, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 49, 52, 56). Večino teh raziskav so izvedli v okviru kliničnih testiranj zdravila in pozitiven učinek deferasiroksa tudi dokazali. Poročil o praktičnih izkušnjah pri običajnem rutinskem delu pa je na tem področju malo (56). Zato smo našo raziskavo umestili v rutinsko vsakodnevno delo. Pridobivanje rezultatov smo tako izvedli na dva načina, prospektivno in retrogradno. Rezultati naše raziskave se ne ujemajo z večino objavljenih prospektivnih raziskav. Učinkovanje deferasiroksa smo dokazali pri slabi polovici bolnikov, zajetih v raziskavo. Pri drugi polovici preiskovancev pa želenega učinka deferasiroksa nismo potrdili. Morebiten vzrok lahko iščemo tudi v časovnem obdobju, ki je bil za naše bolnike različen. V raziskavi je sodeloval vsak bolnik, ki je pričel z uživanjem deferasiroksa, ne glede na časovni termin skoraj petletnega obdobja, v katerem se je v raziskavo vključil. Večina objavljenih kliničnih študij je trajala 1 do 3 leta, vse pa so istočasno vključile celotno število bolnikov, ki se je pri nekaterih med potekom raziskave spremljalo.

Porter in sodelavci so izvedli raziskavo učinkovitosti deferasiroksa na bolnikih z MDS, Diamond-Blackfanovo anemijo, drugimi redkimi oblikami od transfuzij KE odvisnih anemij in  $\beta$ -talasemijo. Spremljali so odzive na zdravljenje v odvisnosti od odmerkov in ugotovili, da je bila kelacija nakopičenega železa podobno učinkovita pri vseh vrstah bolnikov (40). V našo raziskavo nismo vključili bolnikov z dednimi hemoglobinopatijami, kot so  $\beta$ -talasemija, anemija srpastih celic, dedna hemolitična anemija ali hemokromatoza,

saj so veliko število raziskav opravili prav z bolniki z  $\beta$ -talasemijo, s katerimi je tudi največ praktičnih izkušenj s kelacijskim zdravljenjem nakopičenega železa v telesu.

V svetovnem merilu so izvedli več ciljanih raziskav in retrospektivnih analiz bolnikov z MDS, ki so prejeli redne transfuzije KE, z deferasiroksom. Ugotovili so, da sočasno kelacijsko zdravljenje preprečuje razvoj dodatnih bolezni zaradi akumulacije železa in včasih tudi zmanjša pogostost transfuzij KE (59). Tudi mi smo v raziskavo vključili največ bolnikov z MDS, in sicer 18 od skupno 29.

Dokazano je, da imajo prednost v preživetju tisti bolniki, ki prejmejo kelacijsko zdravljenje, v primerjavi z ostalimi, ki se ne zdravijo na ta način. Z retrospektivnimi raziskavami so dokazali (51, 13, 40), da zvečane vrednosti S-ferritina statistično značilno poslabšajo preživetje od transfuzij KE odvisnih bolnikov z MDS.

Zelo pomembno je, da spremljamo število enot KE, ki jih bolnik prejme. Vzporejanje tega podatka z izmerjenimi koncentracijami S-ferritina nam poda pomembno informacijo o zalogi železa v posameznem bolniku, ki nima vnetja ( $\text{CRP} < 8 \text{ mg/L}$ ). Tveganje za čezmerno kopičenje železa se pri bolniku, ki prejema 2 do 4 enote KE mesečno, razvije šele po približno 4 letih (54). Za raziskave, v okviru katerih so spremljali učinkovanje deferasiroksa na zniževanje koncentracij S-ferritina, navajajo različne vključitvene kriterije:

- koncentracija S-ferritina nad  $1.000 \text{ } \mu\text{g/L}$  in 20 ali več že prejetih enot KE (38, 48, 52);
- koncentracija S-ferritina nad  $1.000 \text{ } \mu\text{g/L}$ , 20 ali več že prejetih enot KE,  $\text{LIC} \geq 2 \text{ mg Fe/ g suhe mase}$  in pričakovana doba preživetja vsaj eno leto (55);
- vsaj 8 enot KE na leto,  $\text{LIC} \geq 2 \text{ mg Fe/ g suhe mase}$  in pričakovana doba preživetja najmanj eno leto (40);
- koncentracija S-ferritina nad  $500 \text{ } \mu\text{g/L}$  in vsaj 20 že prejetih enot KE (47);
- najmanj enoletna odvisnost od transfuzij KE, koncentracija S-ferritina nad  $2.000 \text{ } \mu\text{g/L}$  in več kot 1 enota KE mesečno za vzdrževanje vrednosti hemoglobina nad  $80 \text{ g/L}$  (56).

Različni viri tako navajajo, da so indikacija za pričetek zdravljenja s kelatorjem število že prejetih enot KE, in sicer med 20 in 50, mesečna obremenitev s transfuzijami (število enot/mesec) ali mejne vrednosti S-ferritina od  $1.000$  do  $> 2.500 \text{ } \mu\text{g/L}$ . Priporočajo integriran pristop, z upoštevanjem vseh treh navedenih kriterijev. Osnovna vključitvena kriterija za vključitev hematoloških bolnikov v našo raziskavo sta bila koncentracija S-ferritina nad

1.000 µg/L in več kot 10 že prejetih enot KE, s katerimi smo vzdrževali koncentracijo hemoglobina > 80 g/L. Apliciranje enot KE bolnikom z MDS in drugimi od transfuzij odvisnih anemij za vzdrževanje koncentracije hemoglobina v krvi nad omenjeno vrednostjo opisujejo tudi v drugih raziskavah (40).

Priporočeni začetni odmerek deferasiroksa za bolnike, ki mesečno prejmejo od 2 do 4 enote KE, je 20 mg/kg/dan (1.500 mg dnevno). Za tiste bolnike, ki prejemajo transfuzije KE pogosteje, priporočajo odmerek 30 mg/kg/dan (2.500 mg dnevno), za tiste z manj pogostimi transfuzijami pa 10 mg/kg/dan (500 mg dnevno) (48, 55). Proizvajalec zdravila navaja možnost zaužitja do 40 mg deferasiroksa /kg/dan. Odmerki kelatorja v naši raziskavi so bili majhni. Njegovi začetni dnevni odmerki so bili od 5 do 30 mg/kg TM. Menimo, da bi bili lahko učinki deferasiroksa veliko boljši, če bi njegove odmerke določali glede na telesno maso posameznega bolnika skladno z navodili proizvajalca. Odmerek deferasiroksa lahko spreminjamo glede na trend naraščanja ali padanja koncentracije S-ferritina. Sprememba odmerka mora seveda biti v skladu z zdravljenjem posameznega bolnika, in sicer glede na gibanje zalog železa v njegovem telesu. Devet (9/29) naših preiskovancev je tekom raziskave ohranilo začetni odmerek kelatorja, ostalim dvajsetim (20/29) pa smo ga vsaj enkrat spremenili.

O prilagajanju odmerkov deferasiroksa med potekom raziskave poročajo tudi drugi viri. Tako Porter navaja, da so bila prilagajanja odmerkov ter prekinitve uživanja zdravila predvsem posledica neželenih učinkov, pri čemer pa to ni imelo večjega vpliva na celotno obdobje njegovega jemanja (40). Z enakimi vzroki, zaradi katerih smo prilagajali odmerke kelatorja, smo se srečevali tudi v naši raziskavi. Te spremembe pa prav tako niso pomembno vplivale na potek naše študije.

Zmanjševanje nakopičenega železa s kelacijsko terapijo je dolgotrajen proces. Toliko bolj, če aplikacija transfuzij tekom zdravljenja še vedno poteka. Smiselno je, da kelacijsko zdravljenje traja enako dolgo kot prejemanje transfuzij KE oz. tako dolgo kot ostaja nakopičeno železo klinično pomembno. Varnost kelacije pa moramo spremljati z meritvami koncentracij S-ferritina.

Priporočajo zaporedna merjenja koncentracij S-ferritina, ob tem pa tudi spremljanje funkcij, kardialne, hepatične in endokrine, ter specifične renalne toksičnosti kelatorja.

Cilj kelacijskega zdravljenja bolnikov na rednih transfuzijah KE je vzdrževanje koncentracije S-ferritina < 1.000 µg/L. S študijami so potrdili vpliv deferasiroksa na zmanjševanje koncentracije S-ferritina. Številni avtorji označujejo S-ferritin kot ustrezen



parameter za oceno uspešnosti kelacij transfuzijsko nakopičenega železa z deferasiroksom, in sicer tako pri odraslih kot tudi pediatričnih bolnikih (38, 40, 47, 48, 49).

Gatterman in sodelavci navajajo statistično značilno zmanjšanje mediane vrednosti koncentracij S-feritina pri bolnikih z MDS, ki so prejeli kelator deferasiroks. Upad mediane vrednosti S-feritina pri predhodno 123 nekeliranih bolnikih je bil z 2.679 na 2.000  $\mu\text{g/L}$  ( $p = 0,0002$ ), pri predhodno keliranih 44 pa z 2.442 na 2.077  $\mu\text{g/L}$  ( $p = 0,06$ ); povprečna starost preiskovancev je bila 70 let (38). Enoletna prospektivna raziskava kelacijskega zdravljenja z deferasiroksom, ki jo je izvedel isti avtor na 341 bolnikih z MDS (približno 50 % jih je predhodno jemalo druge kelatorje), je prav tako pokazala padec mediane vrednosti koncentracij S-feritina z 2.716 na 1.754  $\mu\text{g/L}$  ( $p = 0,002$ ), in sicer ne glede na to ali so bili pred kelacijo z deferasiroksom bolniki zdravljeni z drugimi kelatorji ali pa ne (39).

Izsledki Porterjeve enoletne prospektivne študije podpirajo nujnost izvajanja rednih meritev koncentracij S-feritina za spremljanje zdravljenja z deferasiroksom. Vanjo so vključili 184 bolnikov, ki so redno prejeli transfuzije KE, starih od 3 do 81 let, z MDS ( $n=47$ ), DBA ( $n=30$ ), drugimi redkimi anemijami ( $n=22$ ) in  $\beta$ -talasemijo ( $n=85$ ). Učinke deferasiroksa so spremljali z določanjem koncentracij železa v jetrih (LIC s pomočjo MRI) in koncentracij S-feritina. Pri tem so potrdili njegov učinek na zmanjšanje zaloga železa v telesu, ki je odvisen od prejetih odmerkov kelatorja. Učinkovitost deferasiroksa in izločanje železa se med različnimi bolezenskimi skupinami nista statistično značilno razlikovala (40).

Raziskava, ki je bila po številu bolnikov podobna naši, je od leta 2004 do 2006 potekala v Nemčiji. Avtorica Mertzeroth s sodelavci poroča o učinkovitosti deferasiroksa pri znižanju S-feritinske mediane. V študijo so vključili 12 bolnikov z MDS različnih podtipov, starih od 53 do 91 let (mediana 76 let). Med drugimi vključitvenimi kriteriji je bila tudi koncentracija S-feritina,  $> 500 \mu\text{g/L}$ . Učinkovitost delovanja kelatorja so določali z merjenjem sprememb koncentracij S-feritina, količine železa v kostnem mozgu in LIC. Vsakega bolnika naj bi spremljali 12 mesecev, vendar pa je enoletno raziskavo zaključilo le 7 bolnikov, pri čemer se jim je za 67,5 % znižala mediana vrednost koncentracij S-feritina, in sicer z 1.575  $\mu\text{g/L}$  na 413  $\mu\text{g/L}$  (47).

Mediana vrednost začetnih koncentracij S-feritina se je pri 173 od 176 bolnikov z MDS v Listovi raziskavi znižala za 23 % po prvem letu uporabe deferasiroksa, za 36,7 % pri tistih, ki so uspešno prešli drugo leto zdravljenja, ter za 36,5 % pri tistih, ki so uspešno zaključili

tretje leto zdravljenja. Njihova mediana začetnih vrednosti S-ferritina je bila 2.771,5 µg/L (rang 863 do 9.993 µg/L ) (52). Improta pa navaja celo 70,2 % znižanje mediane vrednosti začetnih koncentracij S-ferritina pri bolnikih (n=55), ki so deferasiroks uživali dve leti. Njihova srednja vrednost S-ferritina je bila 2.362 µg/L ± 172 (56). Mediana vrednost koncentracij S-ferritinov v naši raziskavi je bila 1.569,7 µg/L (rang 643,0 – 12.196,0) in je v primerjavi s prej navedeno bistveno nižja. Mediana vrednost razlik začetnih in končnih koncentracij S-ferritina pri naših preiskovancih je 162 µg/L (-2.785 do 2.588). S statistično analizo smo potrdili povezanost med začetnimi in končnimi koncentracijami S-ferritina na celotnem številu preiskovancev ( $p = 0,0021$ ). Prav tako smo ugotovili tudi statistično značilno korelacijo med koncentracijami S-ferritina in odmerki deferasiroksa ( $p < 0,0001$ ). Uporabnost S-ferritina kot označevalca preobremenjenosti telesa z železom je omejena s tem, da je reaktant akutne faze in so zato njegove koncentracije lahko povišane pri vnetju, okužbah, mrzlici, jetrnih in ledvičnih boleznih ter karcinomih. Taher opisuje meritve koncentracij S-ferritina za spremljanje preobremenitve z železom pri bolnikih s srpasto celično anemijo kot manj zanesljive. To ni presenetljivo, saj je v patofiziologiji te bolezni zelo pomemben dejavnik vnetje (49). Skratka, visoka koncentracija S-ferritina je lahko tudi posledica vnetja. Tudi mi smo v nekaj primerih zabeležili visoke vrednosti S-ferritina ob sočasno zvišani koncentraciji CRP, zato smo sklepali, da so bile v teh okoliščinah koncentracije S-ferritina dodatno zvečane zaradi vnetja.

Opažena zvišanja koncentracij S-kreatinina so bila povezana z odmerki deferasiroksa in niso bila napredujoča, v večini primerov so se te vrednosti znižale po prekinitvi jemanja ali zmanjšanju njegovega odmerka (40). Pri bolnikih z MDS praktično ni povečanega tveganja za progresivno renalno disfunkcijo pri terapiji z deferasiroksom. Morebitno povečanje serumskega kreatinina pa sicer lahko odraža hemodinamski učinek tega kelatorja na ledvice (43).

V poročilih različnih raziskav poročajo o zvišanih srednjih vrednostih S-kreatinina in aktivnostih jetrnih transaminaz, ki pa so jih učinkovito obvladali. S tem so potrdili varnost uporabe deferasiroksa, saj ta v različnih odmerkih nima vplivov na renalno in jetrno funkcijo bolnikov z različnimi vrstami anemije (48).

Nivoji serumskega kreatinina so v raziskavi, ki jo je izvedel Taher, ostali nespremenjeni, glede na njihove vrednosti pred začetkom kelacijskega zdravljenja z deferasiroksom.

Zaključek te študije je, da je tveganje za oslabitev ledvične funkcije nizko tudi takrat, ko se uporabljajo višji odmerki kelatorja, > 30 mg/kg/dan (49).

Metzgeroth in sodelavci so z raziskavo na majhnem številu bolnikov z MDS ugotovili zvečanje koncentracije S-kreatinina, ki pa je bilo prehodno in neodvisno od odmerka deferasiroksa. Zato niso bile potrebne spremembe njihovih odmerkov (47). Enak trend so imele tudi naše meritve S-kreatinina, saj zaradi njihovih morebitnih zvečanih koncentracij nismo spreminjali odmerkov oz. ukinjali jemanje kelatorja. Odločitev za spremembo odmerka deferasiroksa je tako temeljila samo na spremembah koncentracij S-feritina.

Ugotovili so, da deferasiroks statistično značilno pozitivno vpliva na znižanje koncentracij S-feritina in posledično izboljšanje jetrnih transaminaz. Znižanje nivojev S-feritina je bilo namreč pomembno povezano z izboljšanjem vrednosti ALT ( $p < 0,001$ ) (52). Z meritvami jetrnih transaminaz smo ugotovili, da se njihove vrednosti zaradi uporabe deferasiroksa niso bistveno zvišale. Prav tako pri nobenem bolniku nismo zaznali tendence naraščanja aktivnosti jetrnih encimov nad referenčno vrednostjo. Pet bolnikov (5/29) je v raziskavo vstopilo z zvečanimi aktivnostmi jetrnih encimov, a tudi pri njih nismo ugotovili tendence njihovega naraščanja. To potrjujejo podatki, predstavljeni v Preglednici 13, kjer vidimo, da so bile mediane vseh spremljanih transaminaz znotraj referenčnih vrednosti, zato lahko sklepamo, da deferasiroks ni vplival na jetrno funkcijo naših preiskovancev.

Ker prihaja pri starejših bolnikih pogosteje do neželenih učinkov kelacijskega zdravljenja kot pri mlajših, mora zdravnik skrbneje spremljati predvsem starejše. Glede na pogostost in resnost stranskih učinkov moramo odmerke kelatorja ustrezno prilagoditi, kar smo v naši raziskavi storili večkrat. Neželeni učinki so se pojavljali predvsem na začetku zdravljenja s kelatorjem.

Med neželenimi učinki deferasiroksa so naši preiskovanci navajali slabost, utrujenost, prebavne težave oz. driske. Vichinsky poroča, da se pri 5 % prejemnikov deferasiroksa pojavijo abdominalne bolečine, pri 5 % slabost in pri 9 % driske. Priporoča znižanje odmerka, v kolikor diareja ne izzveni v dveh dneh (51). Tudi drugi avtorji najpogosteje navajajo diarejo kot glavni neželeni učinek jemanja tega zdravila (38, 39, 40, 42, 45, 48, 49, 52, 56). Med triletno raziskavo, ki jo je izvedel List, je zaradi neželenih učinkov kar 24,8 % bolnikov prekinilo jemanje deferasiroksa (52). V naši skupini bolnikov jih je 7 (7/29) imelo prebavne težave (driske), 1 pa je dobil kožne izpuščaje.

Zaradi neželenih učinkov je 7 bolnikov (7/29) tekom raziskave začasno prenehalo z uživanjem deferasiroksa, vendar pa so ga ponovno pričeli jemati v razmeroma kratkem času. Ker so kelator običajno zaužili zjutraj na tešče, najmanj pol ure pred zajtrkom, smo jim svetovali, naj tablete vzamejo zvečer pred spanjem, s čimer so izzvenele slabosti in utrujenost, saj so jih običajno prespali. Tako so po kratkotrajni prekinitvi ponovno pričeli z jemanjem zdravila.

Štirje bolniki (4/29) so po nekaj tednih samovoljno opustili uživanje kelatorja zaradi neželenih učinkov, nato pa zdravljenja niso več nadaljevali.

O smrti bolnikov na kelacijski terapiji poročajo skoraj v vseh raziskavah, v okviru katerih so proučevali učinke deferasiroksa na nakopičeno železo. V nobenem primeru smrti niso bile posledice njegovega uživanja (38, 40, 47, 48, 52). Tudi tekom naše raziskave je umrlo 13 bolnikov (13/29), a nihče zaradi zdravljenja s kelatorjem. Pri 3 bolnikih se je najprej pojavila AML, tej pa je sledila smrt. Vzroki za ostale smrti pa so bile vzporedne bolezni, npr. progresivne maligne bolezni in pljučnice. Bolniki s slabo prognozo tako niso bili deležni vseh potencialnih koristi, ki jih omogoča deferasiroks.

V laboratorijih na sekundarnem zdravstvenem nivoju ostajajo meritve koncentracij S-ferritina najuporabnejša metoda za ocenitev zalog železa v telesu. Ta preiskava je priročna, enostavna in cenovno ugodna. Smernice za ocenjevanje zalog železa priporočajo merjenje koncentracij S-ferritina tudi za spremljanje učinkovitosti kelacijskega zdravljenja (49).

Podatkov o gibanju koncentracij S-ferritina pri slovenskih bolnikih, ki prejemajo deferasiroks, ter o uspešnosti tovrstnega zdravljenja je malo, saj je takih bolnikov malo.

Odstranjevanje nakopičenega železa s kelacijo je varno in učinkovito pri bolnikih z MDS in ga lahko spremljamo z merjenjem koncentracij S-ferritina. Kljub majhnemu številu bolnikov, ki so sodelovali v naši raziskavi, lahko na osnovi statističnih podatkov trdimo, da je bilo pri njih odstranjevanje železa z deferasiroksom zadovoljivo. Tako kot mi, so tudi avtorji drugih raziskav opazali veliko variabilnost v koncentracijah S-ferritina (40). Pri bolnikih, ki smo jih uvrstili v 3. skupino, se nivoji S-ferritina niso znižali in to kljub prejemanju deferasiroksa. Podobne rezultate je zabeležil tudi Porter (40). Ne glede na prej omenjeno variabilnost smo ugotovili, da trend gibanja koncentracij S-ferritina sčasoma lahko uporabimo za uravnavanje oz. spremembe odmerkov kelatorja.

Učinkovitost kelacije železa smo opredelili s kelacijskimi indeksi. Ti predstavljajo razmerja med količinami s transfuzijami KE vnesenega železa v telo in količinami

deferasiroksa, prejetimi z dnevnimi odmerki, znotraj časovnega intervala med dvema zaporednima obiskoma hematološke ambulante. S primerjanjem kelacijskih indeksov smo ugotovili, da je bila 3. skupina bolnikov, pri katerih kelacija ni bila učinkovita, statistično značilno različna od ostalih dveh. Vzroki za neuspešno kelacijo so lahko neustrezni odmerki kelatorja, prevelik vnos železa s transfuzijami KE in tudi možnost, da bolnik kelatorja ne jemlje redno.

## 6. SKLEPI

Podatki o učinkovitosti kelatorja železa deferasiroksa so za slovensko populacijo bolnikov s sekundarno hemokromatozo skopi. Tudi v našo raziskavo smo uspeli vključiti le majhno število bolnikov, ki so redno prejeli transfuzije KE, s katerimi so kronično kopičili železo v njihovih telesih.

Dobro *učinkovitost deferasiroksa* pri odstranjevanju nakopičenega železa smo ugotovili pri tistih bolnikih, pri katerih se je koncentracija S-feritina zaradi njegovega jemanja zmanjšala. Zadovoljiva je bila tudi pri tistih, pri katerih je kelator vzdrževal konstantno koncentracijo S-feritina kljub kontinuiranemu prejetju železa s transfuzijami KE. Ti dve skupini preiskovancev sta predstavljali slabo polovico vseh, vključenih v našo raziskavo. Drugo, najštevilčnejšo polovico bolnikov so predstavljali tisti z naraščajočim trendom koncentracije S-feritina. Pri njih kelacijsko zdravljenje v daljšem časovnem obdobju ni vplivalo na znižanje vrednosti tega parametra.

Ugotovili smo statistično pomembno povezanost med koncentracijami S-feritina in odmerki deferasiroksa. S tem smo potrdili *uporabnost meritev koncentracij S-feritina* za določitev odmerjanja tega zdravila.

Prav tako smo potrdili statistično značilno povezanost med začetnimi in končnimi koncentracijami S-feritina na celotnem številu preiskovancev.

Statistično značilno povezavo med koncentracijami S-feritina in kelacijskimi indeksi (razmerja med enkratno, s transfuzijo KE vneseno količino železa ter količino zaužitega kelatorja do naslednjega prejema enote KE) smo dokazali le v 1. skupini bolnikov (dinamika upadanja koncentracije S-feritina). To smo potrdili tudi z ugotovitvijo, da so bile končne koncentracije S-feritina v tej skupini bolnikov statistično značilno različne od tovrstnih koncentracij v ostalih dveh skupinah.

Z meritvami smo ugotovili, da deferasiroks ni imel vpliva na jetrno in ledvično funkcijo preiskovancev.

## 7. LITERATURA

1. Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C. Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. European school of Haematology, France, 2006; 73-101, 393-406, 479-493.
2. <http://www.ironhealthalliance.com/professionals/iron-overload/summary/>  
[Datum dostopa 19.2.2014]
3. Shander A, Cappellini MD, Goodnough LT. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. Vox Sanguinis, 2009; 97: 185-197.
4. Mlakar U. Smernice za odkrivanje in zdravljenje MDS pri odraslih. Zdravstveni Vestnik, 2010; 79: 455-464.
5. Pascal L, Beyne-Rauzy O, Brechignac S, et al. Cardiac iron overload assessed by T2\* magnetic resonance imaging and cardiac function in regularly transfused myelodysplastic syndrome patients. Br J Haematol. 2013; 162(3): 413-415.
6. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. Blood reviews. 2009; 23: 95-104.
7. Leitch HA. Optimizing therapy for iron overload in the myelodysplastic syndromes: recent developments. Drugs. 2011; 71(2): 155-177.
8. Temraz S, Santini V, Musallam K, et al. Iron overload and chelation therapy in myelodysplastic syndromes. Crit Rev Oncol Hematol. 2014; 91(1): 64-73.
9. Bennett JM, MDS Foundation's Working Group on Transfusional Iron Overload. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. Am J Hematol. 2008; 83(11): 858-861.
10. Mlakar U. Zaloge železa v telesu pri bolnikih, zdravljenih s transfuzijami eritrocitov. Zdrav Vestn 2007; 76: 449-53.
11. Santini V, Alessandrino PE, Angelucci E, et al. Clinical management of myelodysplastic syndromes: update of SIE, SIES, GITMO practice guidelines. Leuk Res. 2010; 34(12): 1576- 1588.
12. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Myelodysplastic Syndromes (Version 2.2015). 2015.
13. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. Blood. 2013; 122(17): 2943-2964.

14. Delforge M, Selleslag D, Beguin Y, et al. Adequate iron chelation therapy for at least six months improves survival in transfusion-dependent patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2014; 38(5): 557-563.
15. Beck O.N., *Diagnostic Hematology*, DOI10.1007/978-1-84800-295-1\_20, London, 2009.
16. Camaschella C., Pagani A. Iron and erythropoiesis: a dual relationship. *Int J Hematol* (2011) 93:21-26.
17. Britton SR. et al. Iron Toxicity and Chelation Therapy. *Inter J Hematol* 76 (2002) 219-228.
18. Kate J, Wolthuis A, Westerhuis B, Van Deursen C. The Iron Content of Serum Ferritin: Physiological Importance and Diagnostic Value. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35 (1): 53-56.
19. Pfeilstöcker M. Iron chelation therapy in myelodysplastic syndromes: evidence-based rationale and comparison of guidelines. *MEMO*, 2012, Vol.3:11-15.
20. Badawi MA, Vikars LM, Chase JM, Leitch HA. Red Blood Cell Transfusion Independence Following the Initiation of Iron Chelation Therapy in Myelodysplastic Syndrom. Hindawi Publishing Corporation *Advances in Hematology*, Volume 2010, article ID 164045.
21. Leitch HA, Vikars LM. Supportive care and chelation therapy in MDS: are we saving lives or just loosing iron? *ASH, Hematology* 2010.
22. Messa E, Cilloni D, Saglio G. Iron Chelation Therapy in Myelodysplastic Syndroms. Hindawi Publishing Corporation *Advances in Hematology*, Volume 2010, article ID 756289.
23. Tortora GJ, Grabowski SR. The cardiovascular system: the blood. In: *Principles of Anatomy and Physiology*. 9th ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 2000.
24. Lipton JM, Ellis SR. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(2): 261-282.
25. Ball S. Diamond Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011: 487-491.
26. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(7): 589-599.
27. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, et al. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, 2003; 102: 2670-2677.



28. Bridges KR, Seligam PA. Disorders of iron metabolism. In: Handin R, Lux S, Stossel T, eds. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Company; 1995: 1433-1472.
29. EXJADE NDA 21-882/S-002, Exjade (deferasirox) Prescribing information: Novartis Pharmaceutical Corporation, 2006. [Datum dostopa 9.5.2012] Dostopno na: [www.exjade.com](http://www.exjade.com).
30. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, et al. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassemia (TDT). 3rd Ed. Nicosia, Cyprus: Thalassemia International Federation; 2014.
31. Brittenham GM. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *N Engl J Med*. 2011; 364(2): 146-156.
32. Leitch HA. Improving clinical outcomes in patients with MDS and iron overload using iron chelation therapy. *Leuk Res.*, 2007; 31 (suppl 3): S7-S9.
33. Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol*. 1999; 126(3): 182-194.
34. Theil EC. Iron, ferritin, and nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2004; 24: 327-343.
35. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood*, 2009, Vol. 114, N°20.
36. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary Iron Overload. *Hematology*, 2001; 47-61.
37. Schrier SL., Bacon BR. Pathophysiology and diagnosis of iron overload syndromes. [Datum dostopa 23.6.2014] Dostopno na [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
38. Gattermann N, Jarisch A, Schallag R, et al. Deferasirox treatment of iron-overloaded chelation-naïve and prechelated patients with myelodysplastic syndromes in medical practice: results from the observational studies eXtend and eXjange. *Eur J Haematol* 2011; 88: 260-268.
39. Gattermann N, Finelli C, Della Porta M, et al. Deferasirox in iron-overload patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes: results from the large 1-year EPIC study. *Leuk Res* 2010; 34:1143-50.
40. Porter J, Galanello R, Saglio G et al. Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anemias of deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol* 2008; 80: 168-76.

41. List AF, Baer MR, Steensma DP, Raza A, Esposito J, Martinez-Lopez N, Paley C, Feigert J, Besa EC. Two-year analysis of efficacy and safety of deferasirox (Exjade) treatment in myelodysplastic syndrome patients enrolled in the US03 study. *Blood* 2009; 114: abst 3829.
42. Greenberg PL, Koller CA, Cabantchik ZI, Warsi G, Glynos T, Paley C, Schifer C. Prospective assessment of effects on iron-overload parameters of deferasirox therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2010; 34: 1560-5.
43. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, et al. A phase III study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Blood* 2006; 107: 3455-62.
44. Porter JB. Practical management of iron overload. *Br J Haematol*. 2001; 115: 239–52.
45. Cappellini MD. Exjade® (deferasirox, ICL670) in the treatment of chronic iron overload associated with blood transfusion. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2007; 3(2): 291-299.
46. Adams RLC, Bird RJ. Safety and efficacy of deferasirox in the management of transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome and aplastic anaemia: a perspective review. *Therapeutic Advances in Hematology* 2013; 4(2): 93-102.
47. Metzgeroth G, Dinter D, Schultheis B, et al. Deferasirox in MDS patients with transfusion-caused iron overload—a phase-II study. *Ann Hematol* (2009) 88:301–310.
48. Cappellini MD, Porter J, El-Beshlawy A, et al. Tailoring iron chelation by iron intake and serum ferritin: the prospective EPIC study of deferasirox in 1744 patients with transfusion-dependent anemias. *Haematologica* 2010; 95: 557-566.
49. Taher A, Cappellini DM. et al. Efficacy and safety of deferasirox doses of >30 mg/kg per d in patients with transfusion-dependent anaemia and iron overload. *British journal of Haematology* 2009; 147: 752-759.
50. Porter J.B., Cohen A.R., Ford J.M. & Cappellini. Impact of dose adjustments on serum ferritin (SF) levels during long-term treatment with once-daily, oral deferasirox (Exjade\_, ICL670). *Blood*, 2007; 110, abstract 2778.
51. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005; 23(30): 7594–7603.
52. List AF, Baer MR, Steensma DP, et al. Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2012; 30(17): 2134–2139.

53. Gattermann N. Overview of guideline on iron chelation therapy in patients with myelodysplastic syndromes and transfusional iron overload. *Int.J. Hematol*, 2008; 88: 24-29.
54. Hershko C, Gale RP. Is Iron-Chelation Therapy Useful in Persons with Myelodysplastic Syndrome? *Open Journal of Blood Disease*, 2011; 1: 3-7.
55. Gattermann N., Finell C., Della Porta M., et al. Hematologic responses to deferasirox therapy in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2012; 97(9): 1364-1371.
56. Improta S., Villa MR, Volpe A., Lombardi A., Stiuso P., Cantore N., Mastrullo L. Transfusion-dependent low-risk myelodysplastic patients receiving deferasirox: Long-term follow-up *Oncol Lett*. 2013 December; 6(6): 1774–1778.
57. Jabbour E., Garcia-Manero G., Taher A., Kantarjian HM. Managing Iron Overload in Patients with Myelodysplastic Syndromes with Oral Deferasirox Therapy. *The Oncologist*, 2009; 14: 489-496.
58. List FA. Iron Overload in Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Management. *Cancer Control*, 2010; 17 (suppl 1): 2-8.
59. Fuerst M. MDS: Iron chelation therapy induces erythroid responses. *Oncology Times*, 2012; 9 (No. 2): 9-10.
60. Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt, Germany, 1998; 268-283.
61. Deeg HJ, Bowen DT, et al. Myelodysplastic Syndromes. Springer Berlin Heidelberg, Germany, 2007; 95-98.
62. Valent P, Krieger O, et al. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) – diagnosis, management, and responses criteria: a proposal of the Austrian MDS platform. *Eur J Clin Invest*, 2008; 38 (3): 143-149.
63. Shenoy N., Vallumsetla N., Rachmilewitz E., Verma A., Ginzburg Y. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2014 124: 873-881.
64. Sanz G, Nomdedeu B, Such E, et al. Abstract 640: Independent impact of iron overload and transfusion dependency on survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008; 112: abstract 640.
65. Cappellini MD. ICL670: clinical outcome. *Haematologica reports*, 2005; 1(8): 11-13.

66. Hoffbrand AV., Taher A., Cappellini MD. How I treat transfusional overload. *Blood*, 2012; 120: 3657-3669.
67. Pullarkat V. Objectives of iron chelation therapy in myelodysplastic syndromes: more than meets the eye? *Blood*, 2009; 114: 5251-5255.
68. Kocjančič A., Mrevlje F. *Interna medicina. DZS*, Ljubljana, 2005; 1038-1078.
69. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. *Thalassemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;14-34.
70. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassaemia major. *N Engl J Med*, 2000; 343: 327–331.
71. Chapman RWG., Hussain MAM., Gorman A., et al. Effect of ascorbic acid deficiency on serum ferritin concentrations in patients with  $\beta$ -thalassaemia major and iron overload. *J Clin Pathol*, 1982; 35: 487-491.
72. Der-Cherng T., Tung-Po H., Yau-Huei W. Erythropoietin and iron: the role of ascorbic acid. *Nephrol Dial Transplant*, 2001,16 (Supplem 5): 35-39.
73. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 2008; 112 (2), 219-230.