

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA JAVORAC

## DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

LJUBLJANA, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA JAVORAC

**UPORABA EKSPERIMENTALNIH PARAMETROV HEMATOLOŠKEGA  
ANALIZATORJA PRI SPREMLJANJU BOLNIKOV Z MIELODISPLASTIČNIM  
SINDROMOM**

**USE OF EXPERIMENTAL PARAMETERS FROM HEMATOLOGY ANALYZER  
FOR MONITORING PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME**

LJUBLJANA, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC v Ljubljani pod mentorstvom doc.dr.Uroša Mlakarja, dr.med., in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. kem. inž.

Zahvaljujem se doc. dr. Urošu Mlakarju, dr. med., in doc. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., za vso pomoč, usmerjanje in potrpljenje ter vsem zaposlenim v Specializiranem hematološkem laboratoriju, ki so mi pomagali pri delu s hematološkim analizatorjem in pri mikroskopskem pregledu krvnega razmaza.

Zahvaljujem se tudi mami in očetu, ki sta edina vedno verjela vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Uroša Mlakarja, dr.med., in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž.

Saša Javorac

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Ljubljana, 2012

**UPORABA EKSPERIMENTALNIH PARAMETROV HEMATOLOŠKEGA  
ANALIZATORJA PRI SPREMLJANJU BOLNIKOV Z MIELODISPLASTIČNIM  
SINDROMOM**

**USE OF EXPERIMENTAL PARAMETERS FROM HEMATOLOGY ANALYZER  
FOR MONITORING PATIENTS WITH MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME**

## VSEBINA

VSEBINA.....	4
POVZETEK .....	6
SEZNAM OKRAJŠAV .....	10
1.UVOD.....	12
1.1. KRVNA SLIKA.....	12
1.1.1. Eritrocitna krvna slika.....	12
1.1.1.1. Eritrocitni indeksi .....	12
1.1.1.2. Volumen stisnjenih eritrocitov (VSE).....	13
1.1.1.3. Masna koncentracija hemoglobina .....	13
1.1.2. Levkocitna krvna slika.....	13
1.1.3. Trombocitna krvna slika .....	14
1.2. HEMATOLOŠKI ANALIZATOR .....	14
1.2.1. Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750.....	15
1.2.2. Uporaba parametrov hematološkega analizatorja.....	19
1.3. HEMATOPOEZA.....	20
1.4. BOLEZNI KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC.....	22
1.5. MIELODISPLASTIČNI SINDROMI (MDS) .....	23
1.5.1. Definicija MDS.....	23
1.5.2. Epidemiologija MDS .....	23
1.5.3. Razvrstitev in značilnosti MDS .....	24
1.5.4. Klinična slika MDS .....	26
1.5.5. Diagnoza MDS .....	26
1.5.6. Laboratorijske preiskave pri sumu na MDS .....	29
1.5.7. Prognoza MDS.....	30
1.5.8. Zdravljenje MDS .....	31
1.5.8.1. Zdravljenje MDS z majhnim tveganjem .....	32
1.5.8.2. Zdravljenje MDS z velikim tveganjem .....	32
2.NAMEN DELA.....	34
3.PREISKOVANCI IN METODE DE LA .....	35
3.1. PREISKOVANCI .....	35

---

3.2. LABORATORIJSKE PREISKAVE .....	35
3.2.1. Določitev eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja .....	35
3.2.2. Krvni razmazi .....	37
3.2.2.1. Priprava krvnih razmazov .....	37
3.2.2.2. Fiksacija in barvanje krvnih razmazov .....	37
3.2.3. Barvanje alkalne fosfataze granulocitov .....	38
3.2.3.1. Reagenti .....	38
3.2.3.2. Postopek .....	40
3.2.3.3. Princip reakcije .....	40
3.2.3.4. Ocena obarvanih krvnih razmazov .....	40
3.2.3.5. Referenčno območje .....	41
3.2.4. Barvanje mieloperoksidaze .....	41
3.2.4.1. Reagenti .....	41
3.2.4.2. Postopek .....	42
3.2.4.3. Ocena obarvanih krvnih razmazov .....	42
3.2.5. Pregled in ocena krvnega razmaza-mikroskopiranje .....	42
3.3. STATISTIČNA ANALIZA .....	44
4. REZULTATI .....	45
5. RAZPRAVA .....	55
6. SKLEP .....	57
7. LITERATURA .....	58

## POVZETEK

**Izhodišča.** Mielodisplastični sindromi (MDS) so skupina klonskih bolezni krvotvorne matične celice. Skupne značilnosti so displazije v eni ali več mieločnih celičnih vrstah, neučinkovita hematopoeza s posledičnimi citopenijami in povečano tveganje za akutno mieloično levkemijo. Diagnoza temelji na izključitvi drugih vzrokov za citopenijo, ugotovitvi displastičnih sprememb in deleža blastnih celic v kostnem mozgu ali krvi ter citogenetski preiskavi kostnega mozga (ugotovitvi ponavljajočih kromosomskih nenormalnosti). V večini primerov diagnoza temelji na subjektivni oceni deleža displastičnih celic v granulocitni, eritrocitni in megakariocitni celični vrsti. Glavni morfološki spremembi, značilni za displazijo granulocitne vrste (disgranulopoeza), ki jo lahko ugotovimo s pregledom krvnega razmaza, sta pelgeroidna anomalija jeder (hipolobacija) in hipogranuliranost nevtrofilcev. Ker se ocena hipogranuliranosti znatno razlikuje celo pri odčitkih izkušenih citologov, poskušajo to oceno objektivizirati s pomočjo različnih parametrov iz hematoloških analizatorjev. V zadnjih letih različne skupine raziskovalcev proučujejo vrednost nekaterih parametrov hematološkega analizatorja (eksperimentalni parametri) za oceno disgranulopoeze. V okviru diplomske naloge smo želeli oceniti uporabnost ugotavljanja displazije nevtrofilcev z meritvijo povprečnega volumna, prevodnosti in sipanja svetlobe nevtrofilcev za presejalno testiranje v diagnostiki MDS.

**Bolniki in metode.** V raziskavo smo vključili 46 bolnikov z MDS (28 bolnikov z refraktarno anemijo, 5 bolnikov z refraktarno anemijo s prebitkom blastov, 3 bolnike z del(5q) in 10 bolnikov z neklasificiranim MDS), ki niso bili predhodno zdravljeni. Bolniki so bili stari od 49 do 85 let (mediana 74 let). V kontrolno skupino je bilo vključenih 33 zdravih oseb (mediana starosti 35 let, razpon 17-55 let). Vsem preiskovancem smo na hematološkem analizatorju Beckman Coulter LH 750 določili naslednje eksperimentalne parametre: povprečno sipanje svetlobe nevtroficcev (PSN), povprečno prevodnost nevtroficcev (PPN), povprečni volumen nevtrofilcev (PNV) in njihove standardne odklone (standardni odklon sipanja svetlobe (SOSN), prevodnosti (SOPN) in volumna nevtrofilcev (SOVN)). Od ostalih preiskav smo poleg celotne krvne slike določili tudi indeksa aktivnosti mieloperoksidaze in alkalne fosfataze nevtrofilcev. Za primerjavo med

posameznimi skupinami smo uporabili Mann-Whitneyev test. Medsebojno povezanost spremenljivk smo ugotavljali s Spearmanovim koeficientom korelacije ( $\rho$ ). Celotno diagnostično točnost nekaterih eksperimentalnih parametrov za ugotavljanje MDS smo ocenili s površino pod krivuljo ROC (ang. Receiver Operating Characteristic).

**Rezultati.** Povprečno sipanje svetlobe nevtroficcev (PSN) je bilo pri bolnikih z MDS manjše kot pri zdravih ( $p=0,01$ ). Bolniki so se od zdravih preiskovancev razlikovali tudi po večji variaciji volumna (SOVN) ( $p=0,05$ ) in sipanja svetlobe nevtrofilcev (SOSN) ( $p=0,01$ ). Pri bolnikih z MDS smo ugotovili pozitivno korelacijo med PSN in indeksom mieloperoksidaze (I MPO) ter negativno korelacijo PSN s SOSN in SOVN. Največjo celotno diagnostično točnost smo ugotovili za indeks sipanja svetlobe nevtrofilcev (količnik PSN/POSN) (površina pod krivuljo ROC = 0,67,  $p= 0,01$ ).

**Zaključki.** S pomočjo indeksa sipanja svetlobe nevtrofilcev smo najbolje razlikovali bolnike z MDS od zdravih preiskovancev, vendar je njegova diagnostična točnost premajhna, da bi se v vsakdanjem delu lahko uporabljal kot presejalni test za ugotavljanje hipogranuliranosti nevtrofilcev.



## ABSTRACT

**Background.** Myelodysplastic syndromes are a group of clonal disorders of the hematopoietic stem cell. They are characterized by the dysplasia of one or more myeloid cell lines, inefficient hematopoiesis with consequent cytopenias and an increased risk of acute myeloid leukemia. The diagnosis is based on the exclusion of other causes of cytopenia, determining the dysplastic changes and the percent of blast cells in bone marrow or blood and a cytogenetic analysis of the bone marrow (recurrent chromosomal abnormalities). In most cases, the diagnosis is based on a subjective assessment of the percentage of dysplastic cells in the granulocyte, erythroid and megakaryocytic cell line. The two main morphological changes characteristic of granulocytic dysplasia (dysgranulopoiesis), which can be determined by blood smear analysis, are pelgeroid anomaly of nuclei (hypolobation) and hypogranularity of neutrophils. Because the assessment of hypogranularity varies considerably even when evaluated by experienced cytologists, efforts are being made to objectivize the assessment with the help of different hematology analyzer parameters. In the recent years, several groups of researchers have been studying the value of several parameters of the hematology analyzer (experimental parameters) to evaluate dysgranulopoiesis. The objective of this diploma thesis was to evaluate whether the determination of neutrophil dysplasia by measuring the mean neutrophil volume, conductivity and light scatter can be used as a screening test for MDS.

**Patients and methods.** A total of 46 patients diagnosed with MDS (28 patients with refractory anemia, 5 patients with refractory anemia with excess blasts, 3 patients with del(5q) and 10 patients with unclassified MDS) that have not been previously treated were included in the study. The median age of the patients was 74 years, with a range of 49 to 85. 33 healthy individuals were included in the control group (median age 35 years, range 17-55 years). All blood samples were analyzed using the Beckman Coulter LH 750 hematology analyzer for the following experimental parameters: neutrophil mean cell scatter (MNES), mean cell conductivity (MNEC), mean cell volume (MNEV) and their standard deviations (neutrophil cell scatter (NESSD), conduction (NECSD) and volume standard deviation (NEVSD)). In addition to a complete blood count, an assessment of myeloperoxidase activity and the neutrophil alkaline phosphatase activity score was

evaluated. We used the Mann-Whitney test for comparison between the individual groups. Correlations were determined using Spearman's correlation coefficient ( $\rho$ ). The total diagnostic accuracy of certain experimental parameters for MDS detection was evaluated using the area under the ROC curve (ang. Receiver Operating Characteristic).

**Results.** The neutrophil mean cell scatter (MNES) was lower in the group of patients with MSD compared to the group of healthy individuals ( $p=0.01$ ). In the affected patients, a higher cell volume (NEVSD) ( $p=0.05$ ) and cell scatter variation (NESSD) ( $p=0.01$ ) were also noticed. In patients with MDS, a positive correlation between MNES and myeloperoxidase activity (MPO) and negative correlations between MNES and NESSD and between MNES and NEVSD were confirmed. The highest diagnostic accuracy was found for the neutrophil cell scatter index (ratio MNES/NESSD) (area under the ROC curve = 0.67,  $p=0.01$ ).

**Conclusions.** The neutrophil cell scatter index was the best parameter to distinguish healthy individuals from the patients with MDS, however its diagnostic accuracy is not sufficient to be used routinely as a screening test to determine neutrophil hypogranularity.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AFG	alkalna fosfataza granulocitov
AML	akutna mieloična levkemija
DAB	3, 3', 4, 4' Tetraamino diphenyl (3,3'-diaminobenzidin)
DKS	diferencialna krvna slika
G-CSF	granulocitni rastni dejavnik
Hgb	koncentracija hemoglobina
I AFG	indeks aktivnosti alkalne fosfataze granulocitov
I MPO	indeks aktivnosti mieloperoksidaze
IPSS	mednarodni seštevek prognostičnih kazalcev (ang. International Prognostic Scoring System)
ISN	indeks sipanja svetlobe nevtrofilcev
KML	kronična mieloična levkemija
M	mediana
MDS	mielodisplastični sindromi
MDSdel5q	MDS z izolirano delecijo dolgega kraka kromosoma 5
MDS-NK	neklasificirani MDS
MMC - L	multipotentna matična celica limfatične vrste
MMC – M	multipotentna matična celica mieloične vrste
MPO	mieloperoksidaza
Ng	število nevtrofilcev
Q <sub>1</sub>	prvi kvartil
Q <sub>3</sub>	tretji kvartil
PHE	povprečna količina hemoglobina v eritrocitu
PLT	število trombocitov
PKHE	povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu
PKMC	alogenična presaditev matičnih krvotvornih celic
PMC	pluripotentna matična celica
PRV	prava policitemija
PPN	povprečna prevodnost nevtrofilcev

PSN	povprečno sipanje svetlobe nevtrofilcev
PVE	povprečni volumen eritrocitov
PVN	povprečen volumen nevtrofilcev
RA	refraktarna anemija
RAPB	refraktarna anemija s prebitkom blastov
RAPB-1	refraktarna anemija s prebitkom blastov vrste 1
RAPB-2	refraktarna anemija s prebitkom blastov vrste 2
RAPS	refraktarna anemija s prstanastimi sideroblasti
RBC	rdeča krvna slika (ang. Red Blood Cell)
RCED	refraktarna citopenija z enovrstno displazijo
RCVD	refraktarna citopenija z večvrstno displazijo
RN	refraktarna nevtropenija
ROC	krivulja ROC (ang. Receiver Operating Characteristic)
RT	refraktarna trombocitopenija
SOPN	standardni odklon prevodnosti nevtrofilcev
SOSN	standardni odklon sipanja svetlobe nevtrofilcev
SOVN	standardni odklon volumna nevtrofilcev
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
UMC	usmerjena matična celica
VCS	Volume, Conductivity, Light Scatter
VSE	volumen stisnjenih eritrocitov

## 1. UVOD

### 1.1. KRVNA SLIKA

Bolezni se velikokrat pokažejo s spremembami v krvi. Izsledke kvantitativnih in kvalitativnih preiskav celic v periferni krvi imenujemo krvna slika ali hemogram.

Pri sumu na bolezen krvotvornih organov je za pravilno vrednotenje vedno potrebno napraviti celotno krvno sliko (eritrocitno, levkocitno in trombocitno krvno sliko) (1).

#### 1.1.1. Eritrocitna krvna slika

Eritrocitna krvna slika zajema:

1. število eritrocitov (M 4,5-5,9 x 10<sup>12</sup>/l in Ž 4,1-5,1x10<sup>12</sup>/l),
2. volumen stisnjenih eritrocitov (VSE) ali hematokrit (Ht) (M 0,42-0,50 in Ž 0,36-0,45),
3. koncentracija hemoglobina (M 140-175 g/l in Ž 123-153 g/l),
4. eritrocitni indeksi ali absolutne vrednosti eritrocitov ( PVE, PHE, PKHE),
5. število retikulocitov (50-100x 10<sup>9</sup>/l) in
6. opis kvalitativnih sprememb eritrocitov v krvnem razmazu (1).

Referenčne vrednosti za moške (M) in ženske (Ž) so podane v oklepajih.

##### 1.1.1.1. Eritrocitni indeksi

Eritrocitni indeksi pokažejo morfološko stanje eritrocitov in so pomembni za opredelitev posameznih oblik anemij (1):

*Povprečni volumen eritrocitov (PVE) ( 81-94 fl)*

$$\text{PVE} = \text{VSE} / (\text{število eritrocitov} \times 10^{12} / \text{l})$$

*Povprečna količina hemoglobina v eritrocitih (PHE) (26-32 pg)*

$$\text{PHE} = \text{koncentracija hemoglobina(g/l)} / (\text{število eritrocitov} \times 10^{12} / \text{l})$$

*Povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih (PKHE) ( 310-360 g/l)*

$$\text{PKHE} = \text{koncentracija hemoglobina(g/l)} / \text{VSE}$$

### 1.1.1.2. Volumen stisnjenih eritrocitov (VSE)

Volumen stisnjenih eritrocitov ali hematokrit predstavlja volumski del eritrocitov v enoti polne krvi. Lahko se določi s centrifugiranjem ali ga izračuna elektronski števec kot število eritrocitov x PVE.

Vzorec krvi z dodatkom antikoagulantna centrifugiramo v posebni hematokritni centrifugi z veliko centrifugalno močjo tako dolgo, da se eritrociti ne sesedajo več.

VSE je razmerje med dolžino stolpca eritrocitov in dolžino stolpca eritrocitov in plazme (1).

### 1.1.1.3. Koncentracija hemoglobina

Koncentracijo hemoglobina določamo spektrofotometrično s hemiglobincianidnim postopkom. Hipotonična raztopina reagenta zaradi osmotske hemolize sprosti hemoglobin iz eritrocitov. Tetrakalijev heksacianoferrat oksidira hemoglobin v hemiglobin, ki tvori s cianidnimi ioni rdeče obarvano stabilno spojino hemiglobincianid, katere absorbanco merimo spektrometrično (1).

### 1.1.2. Levkocitna krvna slika

Levkocitna krvna slika obsega številčno koncentracijo levkocitov ( $4,0-11,0 \times 10^9/l$ ) in diferencialno belo krvno sliko (DKS), ki predstavlja delež posameznih vrst levkocitov. Levkocite lahko prešteje hematološki števec. V preglednici I so navedene posamezne vrste levkocitov in njihovo število (1).

Preglednica I: Normalne vrednosti levkocitov (1).

<i>Vrsta levkocitov</i>	<i>%</i>	<i>Absolutno število <math>\times 10^9/l</math></i>
Nevtrofilci	40-70	1,6-7
Eozinofilci	0-4	0,04-0,06
Bazofilci	0-2	0-01
Limfociti	22-44	0,80-5,00
Monociti	0-7	0,08-1,00

### 1.1.3. Trombocitna krvna slika

Trombocitna krvna slika predstavlja številčno koncentracijo trombocitov ( $150-440 \times 10^9/l$ ).

Štetje trombocitov z elektronskim števcem je lahko nezanesljivo (preveliki trombociti, agregati trombocitov,..), zato je včasih potrebno število trombocitov oceniti tudi v krvnem razmazu (1).

## 1.2. HEMATOLOŠKI ANALIZATOR

Laboratoriji danes uporabljajo avtomatizirano analizo krvnih celic. Avtomatski hematološki analizatorji rutinsko v manj kot minuti izmerijo osem in več hematoloških parametrov, pri tem pa potrebujejo le majhno količino periferne krvi (0,1-1,0 ml) (1).

Krvne celice so morfološko zelo različne. Če niso normalne, jih analizator ne more oceniti.

Priporoča se, da se pregledajo razmazi periferne krvi kadar:

- gre za sum na krvno bolezen,
- je število levkocitov  $> 20 \times 10^9/l$  in  $< 3 \times 10^9/l$ ,
- je število trombocitov  $< 100 \times 10^9/l$ ,
- je zvečana številčna koncentracija posameznih vrst levkocitov (limfocitov  $> 5 \times 10^9/l$ , monocitov  $> 1,5 \times 10^9/l$ , eozinofilcev  $> 2 \times 10^9/l$ , bazofilcev  $> 5 \times 10^9/l$ ),
- je v izpisu opozorilo na morfološke nepravilnosti ali
- so spremembe v grafični predstavitvi levkocitov (slaba ločitev celičnih populacij, nepravilna lega, dodatna populacija celic) (1).

Hematološki analizatorji štejejo in ocenjujejo lastnosti krvnih celic s pomočjo električnih, optičnih meritev ali kombinacije obeh načinov.

*Električne meritve* so zasnovane na spoznanju, da celice slabo prevajajo električni tok. Pretok suspenzije celic v raztopini elektrolita povzroči povečanje električnega upora. Število sprememb električnega upora v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe električnega upora je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celice (1).

*Optične meritve* so zasnovane na merjenju sipanja svetlobe. Vzorec krvi potuje v enakomernem toku skozi polje zaznave, v katerega je usmerjen laserski žarek ali žarek

vidne svetlobe. Ko celica prečka polje zaznave, jo žarek zadene in se pri tem sipa. Sipano svetlobo lovijo fotodetektorji in jo pretvarjajo v električne impulze. Jakost sipane svetlobe pod velikimi koti poda značilnosti notranje zgradbe celice, pod malimi koti pa velikost celice. Pri obdelavi podatkov z ustrezno programsko opremo, te lastnosti omogočajo določanje števila, velikosti in podvrste levkocitov (1).

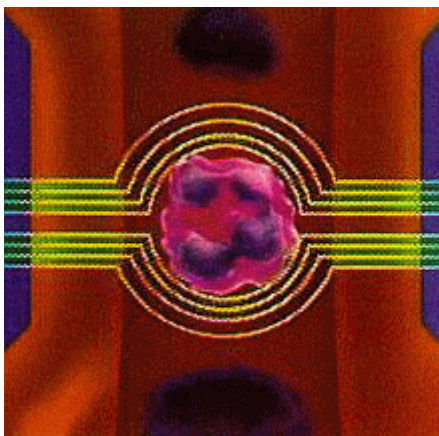
## **1.2.1. Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750**

Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750 uporablja za merjenje hematoloških parametrov kombinacijo različnih meritev:

1. Z merjenjem upornosti meri volumen celic in šteje eritrocite, levkocite in trombocite.
2. Tehnologijo VCS (V: Volume, C: Conductivity, S: Light Scatter), ki je kombinacija meritev volumna celic, prevodnosti celic ter sipanja svetlobe na celicah, uporablja za določanje diferencialne bele krvne slike in retikulocitov (2, 3).

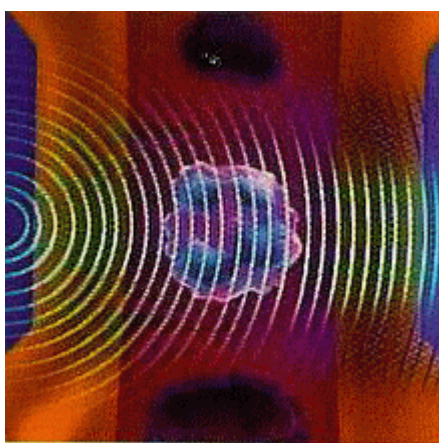
Tehnologija VCS uporablja nizkofrekvenčni tok za ugotavljanje volumna celic in visokofrekvenčni tok za opredelitev notranje zgradbe celic z merjenjem spremembe električne prevodnosti. Z lasersko svetlobo, ki sipa na površini celice in v citoplazmi, analizator prepozna obliko in površinsko zgradbo celice in granuliranost citoplazme (slike 1a-d) (2, 3).





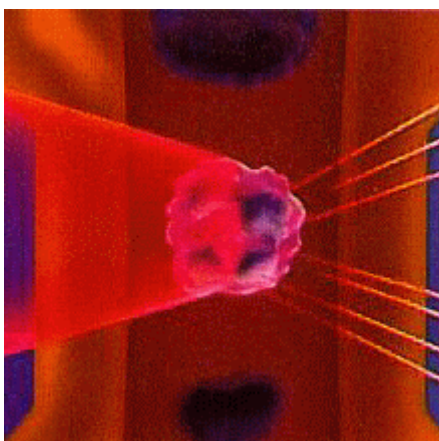
Slika 1a (2,3): **Merjenje volumna**

Volumen celice analizator meri z nizekofrekvenčnim tokom. Krvne celice so suspendirane v prevodnem mediju in se obnašajo kot izolatorji ter tako nudijo upor nizekofrekvenčnemu toku. Celica potuje preko odprtine in nadomesti volumen prevodnega medija z lastnim volumenom. Upornost se poveča in napetost pade. Sprememba upora je sorazmerna velikosti celice.



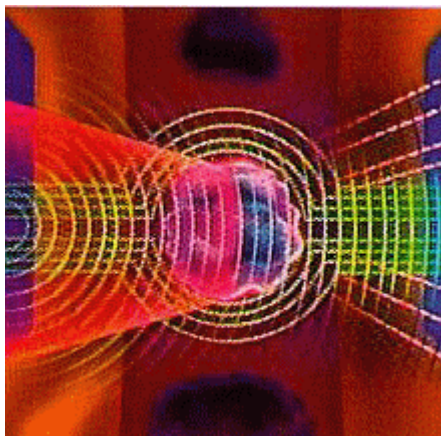
Slika 1b (2,3): **Merjenje prevodnosti**

Membrana krvne celice deluje kot prevodnik za visokofrekvenčni tok. Tok ovirajo notranje strukture celice. Z merjenjem prevodnosti hematološki analizator določa notranjo zgradbo celice (granuliranost).



Slika 1c (2,3): **Merjenje sipane svetlobe**

Ko se laserski žarek usmeri v celico, se na njej svetloba sipa v vseh smereh. Sipana svetloba pada na dva detektorja, ki jo pretvarjata v električne impulze. En detektor zbira žarke pod kotom  $20^{\circ}$ - $70^{\circ}$ , iz česar analizator določi notranjo zgradbo celice, drugi zbira žarke pod kotom  $10^{\circ}$ - $20^{\circ}$ , iz česar analizator določi velikost celice.

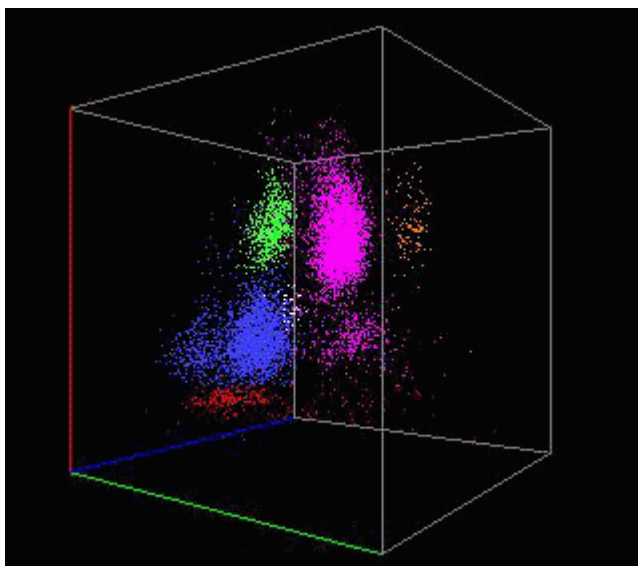


Slika 1d (2, 3): **Merjenje volumna, prevodnosti in sipane svetlobe**

Tehnologija VCS uporablja hkrati 3 neodvisne vire energije in omogoča direktno merjenje vseh petih vrst levkocitov.

Krvne celice s podobnimi lastnostmi imajo podoben volumen, prevodnost in sipanje svetlobe ter tvorijo skupine na diagramu (slika 2). Temperatura, čas in koncentracija reagentov vplivajo na nabrekanje in krčenje krvnih celic, kar vpliva na lego populacij.

Računalniška programska oprema omogoča natančno analizo populacij: odstotek posameznih populacij oziroma vrst celic, lego populacij, kar je indikator za morfološke lastnosti, in gostoto populacij, kar uporabljamo za določitev posameznih podvrst krvnih celic (2, 3).



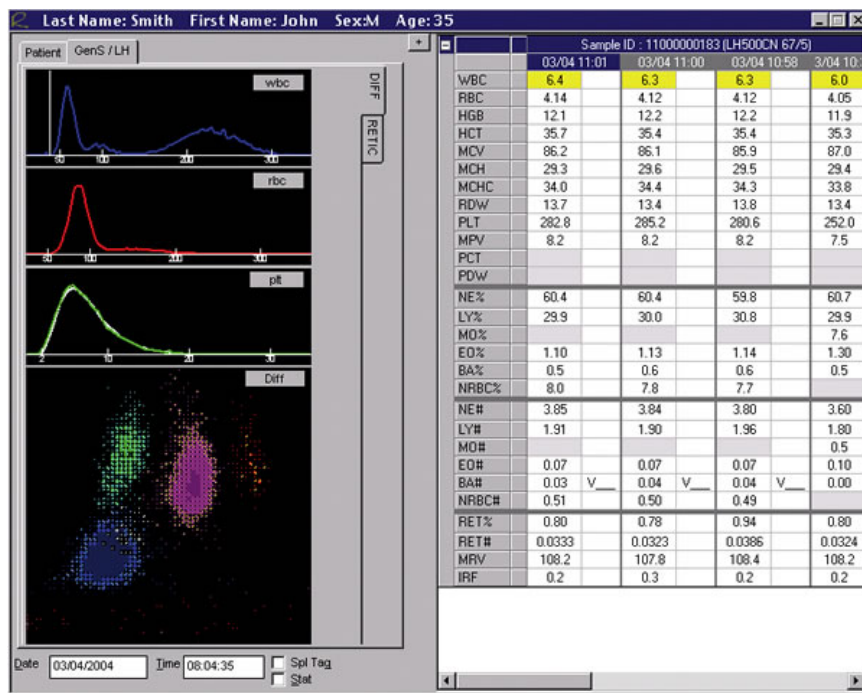
Slika 2: Tridimenzionalni diagram populacij krvnih celic (na osi X je sipana svetloba, na osi Y je volumen in na osi Z prevodnost) (2, 3).

Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750 (slika 3) deluje po naslednjih korakih:

1. vsrkavanje vzorca, mešanje in redčenje,
2. elektro-optične meritve z uporabo tehnologije VCS,
3. zbiranje, shranjevanje, obdelava podatkov in
4. analiza in prikaz podatkov (slika 4) (2, 3)



Slika 3: Hematološki analizator Beckman Coulter LH 750 (2).



Slika 4: Prikaz rezultatov na hematološkem analizatorju (2, 3).

### **1.2.2. Uporaba parametrov hematološkega analizatorja**

Diagnosticiranje številnih bolezni je zapleteno in dolgotrajno. Potrebno je mnogo laboratorijskih testov, veliko znanja in izkušenj strokovnega osebja. Z uporabo eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja pri diagnosticiranju bolezni tako lahko prihranimo dragocen čas do postavitve diagnoze in začetka zdravljenja. Pri zapletenih bolezenskih stanjih, kot so, MDS, malarija, akutna infekcija (sepsa), skušajo znanstveniki potrditi uporabo nekaterih eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja pri diagnosticiranju bolezni (4-7).

Spremembe pri bolezni se lahko kažejo v eritrocitni, levkocitni in trombocitni krvni sliki. Izkoriščamo razlike v granuliranosti, segmentiranosti nevtrofilcev, volumnu nevtrofilcev, velikosti monocitov in limfocitov, spremembah retikulocitov in drugih hematoloških značilnostih, kar se kaže v nekaterih parametrih hematološkega analizatorja. Danes poteka mnogo raziskav, da bi uporabo eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja pri diagnosticiranju različnih bolezni uvedli v rutinsko delo. Največjo potencialno uporabnost kažejo naslednji parametri: povprečen volumen, povprečno sipanje in povprečna prevodnost nevtrofilcev, limfocitov in monocitov ter njihova porazdelitev (4-7).

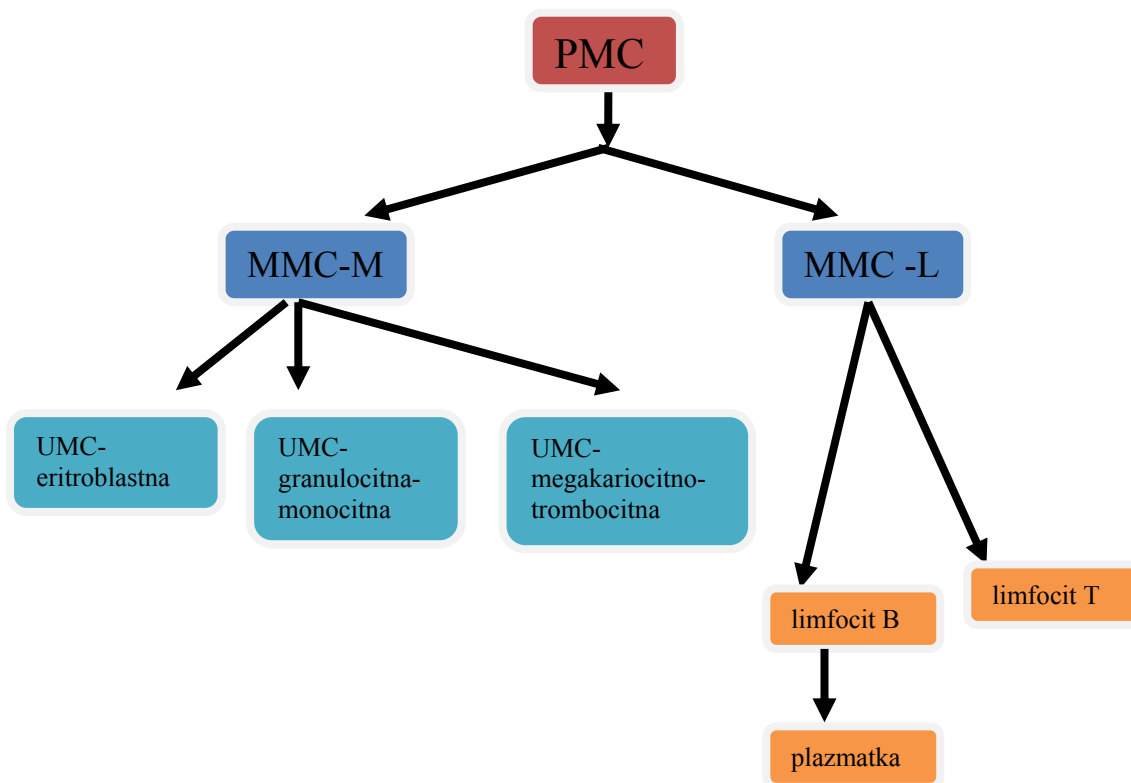
### **1.3. HEMATOPOEZA**

Hematopoeza je proces razvoja krvnih celic. Krvne celice nastajajo v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu, ki ga pri odraslem človeku predstavlja rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo (timus ali priželjc, bezgavke, vranica, limfni vozli). Rdeči kostni mozeg je do četrtega leta starosti v vseh kosteh, nato pa ga začne nadomeščati rumeni kostni mozeg, ki je iz maščobnih celic in ni sposoben proizvodnje krvnih celic. Pri odraslem človeku je rdeči kostni mozeg še v vretencih, rebrih, lobanji, medenici, epifizah stegenic in nadlahtnic. Krvotvorne celice ležijo v mrežju opornega tkiva (retikulinska vlakna in retikulinske celice) in žil. Kapilarno mrežje v kostnem mozgu tvori sinusoide, prek katerih prestopajo dozorele krvne celice v kri. Te strukture tvorijo hematopoetsko mikrookolje, ki omogoča proliferacijo in diferenciacijo matičnih krvotvornih celic (1, 8).

Vse krvne celice nastanejo iz matičnih krvnih celic v kostnem mozgu. Morfološko matičnih krvnih celic ne moremo prepoznati, njihove glavne lastnosti pa so sposobnost samoobnove, velik delitveni potencial in zmožnost razvoja v različne vrste krvnih celic. Osnovna matična celica je pluripotentna matična celica, ki se z delitvijo obnavlja, po drugi strani pa dozoreva v multipotentne matične celice, ki so dveh vrst:

1. multipotentne matične celice mieloične vrste in
2. multipotentne matične celice limfatične vrste (1, 8).

Obe vrsti sta sposobni samoobnove in dozorevanja v usmerjene matične celice. Multipotentna matična celica mieloične vrste dozoreva v usmerjene matične celice rdeče vrste, nevtrofilno-monocitne, eozinofilne in bazofilne vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz njih se po več zaporednih delitvah in z dozorevanjem razvijejo zrele krvne celice, ki se izplavijo v kri. Iz multipotentne matične celice limfatične vrste se med posebnim procesom transformacije, ki poteka v limfatičnem tkivu, razvijejo limfociti vrste B, limfociti vrste T in plazmatke (slika 5) (1).



Slika 5 : Prikaz razvoja krvnih celic iz pluripotentne matične celice (PMC) do zrelih celic.

**Legenda:**

PMC - pluripotentna matična celica

MMC - M: multipotentna matična celica mieloične vrste

MMC - L: multipotentna matična celica limfatične vrste

UMC - eritroblastna: usmerjena matična celica eritroblastne vrste

UMC - granulocitna-monocitna: usmerjena matična celica granulocitno-monocitne vrste

UMC – megakariocitno-trombocitna: usmerjena matična celica megakariocitno-trombocitne vrste

Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano in omogoča stalno in enakomerno nadomeščanje propadlih krvnih celic. Pri odraslem človeku nastane 450 milijard zrelih krvnih celic na dan, po potrebi lahko tudi več.

Normalno so v krvi prisotne le zrele krvne celice. Če se v krvi pojavijo nezrele krvne celice, lahko posumimo na bolezen (1).

#### ***1.4. BOLEZNI KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC***

Bolezni matične krvne celice so bolezni, ki so posledica okvare matične celice, lahko pluripotentne, multipotentne ali usmerjene matične celice. Glede na osnovni patogenetski mehanizem lahko razdelimo vse bolezni matičnih celic na:

1. poliklonske in
2. klonske (1, 8).

Poliklonske bolezni so posledica okvare krvotvornih matičnih celic iz različnih vzrokov (aplastična anemija, čista aplastična anemija). Klonske bolezni so posledica proliferacije klona bolezensko spremenjenih celic, ki so vse potomke ene matične celice (akutne in kronične levkemije, kronične mieloproliferativne bolezni, mielodisplastični sindromi, paroksizmalna nočna hemoglobinurija). Klinična slika je odvisna od sposobnosti rasti in stopnje dozorelosti, na kateri je matična celica prizadeta (1, 8).

Novotvorbe hematopoetskega in limfatičnega tkiva razvrščamo po skupinah, ki se razlikujejo po mikroskopski podobi, imunofenotipu, kliničnih značilnostih in tudi po značilnih genetskih spremembah. Klasifikacija odseva današnjo stopnjo razvoja na tem področju in diagnostične možnosti, ki jih zagotavljajo sodobne morfološke, imunološke in genetske metode (1, 8).

V okviru Svetovne zdravstvene organizacije – SZO (ang. World Health Organization – WHO) je nastala klasifikacija novotvorb hematopoetskega in limfatičnega tkiva, ki vključuje:

1. *mieloične novotvorbe*,
2. limfatične novotvorbe,
3. novotvorbe mastocitov in
4. novotvorbe histiocitov (1, 8).

Med mieloične novotvorbe uvrščamo:

1. akutno mieloično levkemijo (AML),
2. *mielodisplastični sindromi (MDS)*,
3. kronične mieloproliferativne bolezni in
4. mielodisplastične - mieloproliferativne bolezni (1, 8).

## ***1.5. MIELODISPLASTIČNI SINDROMI (MDS)***

### **1.5.1. Definicija MDS**

Mielodisplastični sindromi (MDS) so heterogena skupina bolezni krvotvorne matične celice. Njihova skupna značilnost je displazija v eni ali več mieloičnih celičnih vrstah, neučinkovita hematopoeza, ki povzroči citopenije, in različno tveganje za prehod v akutno mieloično levkemijo (AML). MDS je klonska bolezen, ker iz ene spremenjene krvotvorne matične celice nastane klon mieloičnih celic, ki zaradi rastnih prednosti izpodrine normalne (poliklonske) mieloične celice v kostnem mozgu. Osnovna biološka značilnost MDS je povečana proliferacija displastičnega klona in neuravnoteženost med proliferacijo in apoptozo. Morfološko se zaradi povečane proliferacije mielodisplastičnega klona poveča gostota celic v kostnem mozgu. Čezmerna apoptoza ima za posledico neučinkovito hematopoezo, večina celic ne dozori in ne zapusti kostnega mozga (9, 10).

### **1.5.2. Epidemiologija MDS**

MDS so bolezni predvsem starejših ljudi, čeprav se lahko v zelo redkih primerih pokažejo tudi pri otrocih, še manj verjetno pri mladostnikih. Povprečna starost ob diagnozi je med 65 in 75 let. Incidenca MDS neodvisno od starosti je 3/100.000 ljudi, v starosti nad 70 let pa je 20/100.000 ljudi. Moški obolevajo pogosteje kot ženske, kar pa ne velja za dve vrsti MDS: refraktarno anemijo s prstanastimi sideroblasti in 5q-sindrom (9, 10).



### 1.5.3. Razvrstitev in značilnosti MDS

Posamezne vrste MDS se medsebojno razlikujejo po celični vrsti, ki jo prizadene displazija in ali je displazija samo v eni ali več celičnih vrstah. Prisotne so tudi razlike v deležu blastov v kostnem mozgu in citogenetskih spremembah.

Zadnje desetletje za razvrščanje MDS uporabljamo klasifikacijo Svetovne zdravstvene organizacije (SZO), ki je zasnovana na morfoloških, citogenetskih in kliničnih značilnostih. Klasifikacija razlikuje pri odraslem šest vrst MDS:

1. refraktarna citopenija z enovrstno displazijo (RCED)
  - refraktarna anemija (RA),
  - refraktarna trombocitopenija (RT),
  - refraktarna nevtropenija (RN),
2. refraktarna anemija s prstanastimi sideroplasti (RAPS),
3. refraktarna citopenija z večvrstno displazijo (RCVD),
4. refraktarna anemija s prebitkom blastov (RAPB)
  - RAPB-1 (5 do 9% blastov),
  - RAPB-2 (10 do 19% blastov),
5. MDS z izolirano delecijo dolgega kraka kromosoma 5 (MDSdel5q),
6. neklasificirani MDS (MDS-NK),
7. MDS v otroštvu (9, 10).

Glede na vzrok nastanka razlikujemo primarne in sekundarne MDS. Pri večjem številu bolnikov z MDS (6-7 od 10 ) vzrok nastanka bolezni ni znan in v takih primerih gre za primarni MDS (idiopatski MDS). V redkih primerih se bolezen razvije iz predhodne krvne bolezni (npr. paroksizmalne nočne hemoglobinurije, aplastične anemije).

Kadar je MDS posledica izpostavljenosti toksičnim vplivom (najpomembnejši vzrok je zdravljenje druge novotvorbe s kemoterapijo ali radioterapijo) pred razvojem MDS, gre za sekundarni MDS. Sekundarni MDS zaradi zdravljenja se od primarnega razlikuje po kliničnih in citogenetičnih značilnostih. Potek bolezni je neugoden s hitrim prehodom v AML. Obe sekundarni novotvorbi (MDS in AML), ki se razvijeta zaradi zdravljenja,

## Uporaba eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja pri spremljanju bolnikov z MDS

Saša Javorac

obravnavamo ločeno kot enoten klinični sindrom (mieloična novotvorba v zvezi z zdravljenjem) (9, 10).

Ločnica med RAPB in AML je 20% blastov v kostnem mozgu ali krvi (9, 10).

Značilnosti posameznih vrst MDS so razvidne v preglednici II.

Preglednica II: Klasifikacija po SZO in značilnosti posameznih vrst MDS s spremembami v krvi in kostnem mozgu (9, 10).

BOLEZEN	KRI	KOSTNI MOZEG
<b>RCED</b>	uni/bicitopenija, blastov < 1 %	displazija ene vrste ( $\geq 10$ %), blastov < 5 %, prstanastih sideroblastov > 15 %
<b>RAPS</b>	anemija, ni blastov	prstanastih sideroblastov $\geq 15$ %, samo diseritropoeza, blastov < 5 %
<b>RCVD</b>	citopenija/e, blastov < 1 %, monocitov < $1 \times 10^9/l$	displazija $\geq 10$ % celic v dveh ali več celičnih vrstah, blastov < 5 %, $\pm 15$ % prstanastih sideroblastov, ni Auerjevih palčk
<b>RAPB-1</b>	citopenija/e, blastov < 5 %, ni Auerjevih palčk, monocitov < $1 \times 10^9/l$	displazija ene/več celičnih vrst, blastov 5 - 9 %, ni Auerjevih palčk
<b>RAPB-2</b>	citopenija/e, blastov 5 - 19 %, $\pm$ Auerjeve palčke, monocitov < $1 \times 10^9/l$	displazija ene/več celičnih vrst, blastov 10 - 19 %, $\pm$ Auerjeve palčke
<b>MDS-NK</b>	citopenije, blastov < 1 %	displazija < 10 % celic ene/več vrst, značilne citog. spr., blastov < 5 %
<b>MDSdel(5q)</b>	anemija, normalno/zvečano število trombocitov, blastov < 1 %	normalno ali zvečano število megakariocitov s hipolobiranimi jedri, blastov < 5 %, del 5q, ni Auerjevih palčk

#### 1.5.4. Klinična slika MDS

Klinična slika MDS je posledica odpovedi delovanja kostnega mozga. Znaki in simptomi MDS so nespecifični in v splošnem vezani na citopenijo v krvi. Najpogosteje so v ospredju znaki anemije (utrujenost, šibkost, dispnea, bledica), trombocitopenije (krvavitve, modrice) ali nevtropenije (ponavljajoče se bakterijske okužbe).

Pogosto bolniki nimajo težav in jim šele med rutinskim pregledom krvi slučajno ugotovijo eno ali več pomembnih citopenij, najpogosteje anemijo (9, 10).

#### 1.5.5. Postavitev diagnoze pri MDS

Na MDS posumimo, kadar je koncentracija hemoglobina v krvi pod 110 g/l, številčna koncentracija nevtrofilcev pod  $1,5 \times 10^9/l$  ali številčna koncentracija trombocitov pod  $100 \times 10^9/l$ . Pri tem je pomembna tudi stabilnost citopenije v obdobju vsaj 6 mesecev; če so prisotne značilne citogenetske spremembe ali displazija dveh ali več celičnih vrst, pa vsaj 2 meseca.

Naslednji korak v diagnostiki MDS je izključitev drugih vzrokov za citopenijo in displazijo, kamor sodijo megaloblastna anemija, toksične motnje (alkohol, nekatera zdravila, zastrupitev s težkimi kovinami, pomanjkanje bakra), virusne okužbe (HIV, parvovirus B19) in druge primarne krvne bolezni (idiopatska aplastična anemija, paroksizmalna nočna hemoglobinurija, mielodisplastična/mieloproliferativna novotvorba, AML, primarna mielofibroza, levkemija velikih granuliranih limfocitov) (9, 10).

Če izključimo omenjene pogostnejše vzroke za citopenijo, sledi napotitev bolnika k specialistu hematologu, ki na osnovi analize krvnega razmaza in citološke ter citogenetske preiskave punktata kostnega mozga potrdi ali zavrže sum na MDS.

Pogoj za postavitev diagnoze MDS je prisotnost enega od treh meril:

1. Displazija v najmanj 10 % celic v eni ali več vrstah mieloičnih celic ali najmanj 15 % prstanastih sideroblastov.
2. 5 do 19 % mieloblastov v kostnem mozgu.
3. Kromosomske spremembe značilne za MDS (9, 10).

V preglednici III so navedeni predpogoji in odločilna merila za diagnosticiranje MDS. Za diagnozo MDS morajo torej biti izpolnjeni vsi predpogoji in eno od odločilnih meril.

Po diagnosticiranju MDS sledi razvrstitev bolezni v eno od podvrst MDS in ocena prognoze (9, 10).

Preglednica III: Diagnostična merila za MDS (9, 10).

<b>PREDPOGOJI ZA DIAGNOZO MDS:</b>
1. Pomembna citopenija.
2. Izključitev drugih vzrokov za citopenije.
<b>ODLOČILNA MERILA</b>
1. Displazija v najmanj 10 % celic v eni ali več vrstah mieloičnih celic ali najmanj 15 % prstanastih sideroblastov.
2. 5 do 19 % mieloblastov v kostnem mozgu.
3. Za MDS odločilne citogenetske spremembe.

### 1.5.6. Laboratorijske preiskave pri sumu na MDS

Za opredelitev MDS je potrebno narediti:

1. krvno sliko,
2. citološko in histološko preiskavo kostnega mozga in
3. citogenetsko preiskavo.

#### *Krvna slika*

Najpogostejši izsledek je anemija, ki jo pogosto spremlja trombocitopenija ali nevtropenija. V približno 30 % primerov je anemija edina citopenija, ki jo ugotovijo, 50 % bolnikov ima pancitopenijo, manj kot 5 % bolnikov ima izolirano trombocitopenijo ali nevtropenijo.

Anemija je običajno normocitna ali makrocitna. V krvnem razmazu lahko najdemo eritrocite različnih oblik (poikilocitoza) in različnih velikosti (anizocitoza) ter bazofilno punktirane eritrocite.

Nevtropenija je prisotna pri dveh tretjinah bolnikov. Za MDS značilni displastični spremembi granulocitov (disgranulopoeza) sta hipogranulacija citoplazme in hiposegmentacija jeder nevtrofilcev. Kadar imajo jedra nevtrofilcev samo dva segmenta ali če jedro ni segmentirano, govorimo o psevdo-Pelgerjeva anomaliji. (9, 10).

Dve tretjini bolnikov ima trombocitopenijo različnih stopenj.

### *Kostni mozeg*

S preiskavo punktata ali biopsije kostnega mozga običajno ugotovijo povečano gostoto celic, vendar je včasih ta lahko tudi normalna, pri hipoplastičnem MDS pa celo zmanjšana. Displastične spremembe ugotavljajo s citološkim pregledom kostnega mozga. Ocenjujejo spremembe v eritrocitni (diseritropoeza), granulocitni (disgranulopoeza) in megakariocitni vrsti (dismegakariopoeza).

Spremembe značilne za diseritropoezo so: mostiči kromatina med jedroma, megaloblastoidne spremembe, vakuole v citoplazmi in prstanasti sideroblasti. Prstanasti sideroblasti so eritroblasti, v katerih najdemo zrnca hemosiderina, ki se nahajajo na obodu jedra. Ugotavljamo jih s citokemično reakcijo na železo.

Za dismegakariopoezo so značilni mikromegakariociti, enojedrni megakariociti in megakariociti s številnimi majhnimi jedri.

Pri disgranulopoezi so lahko prisotne Auerjeve palčke, ki potrjujejo rakavo poreklo celic.

Citoplazma je pogosto hipogranulirana.

Histološka preiskava biopsije kostnega mozga dopolnjuje citološko preiskavo punktata kostnega mozga. Z njo bolje ocenimo gostoto celic kostnega mozga in displazijo megakariocitov (9, 10).

### *Citogenetska preiskava kostnega mozga*

Citogenetska preiskava kostnega mozga pokaže morebitne kromosomske nepravilnosti. Pri polovici bolnikov s primarnim MDS so prisotne kromosomske nenormalnosti. Najdemo jih pri približno polovici bolnikov s primarnim MDS. Običajno gre za izgubo ali pomnožitev kromosomov ali njihovih delov. Prisotnost citogenetskih nenormalnosti potrjuje klonsko bolezen in s tem omogoča razlikovanje med MDS in reaktivnimi vzroki displazije (9, 10).

### 1.5.7. Prognoza MDS

Umrljivost bolnikov z MDS je večja kot v populaciji ustrezne starosti, kar je posledica citopenije (okužbe, krvavitve) in prehoda v AML.

Za grobo oceno prognoze zadošča že klasifikacija SZO. Med oblike z velikim tveganjem sodi RAPB, med tiste z majhnim tveganjem pa preostale vrste MDS.

Najbolj uveljavljen način ocene poteka MDS je razvrščanje bolnikov v napovedne skupine z uporabo točkovanja IPSS (International Prognostic Scoring System – mednarodni seštevek prognostičnih kazalcev). Točkovanje IPSS temelji na oceni treh neodvisnih napovednih dejavnikov: delež blastov v kostnem mozgu, prisotne kromosomske spremembe v kariotipu in število citopenij. Glede preživetja in tveganja za AML točkovanje IPSS razlikuje skupino z majhnim, srednjim-1, srednjim-2 in velikim tveganjem, kar je razvidno iz preglednic IV (9, 10).

V zadnjih letih so poskušali izboljšati oceno napovedi poteka MDS s točkovanjem WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System), ki upošteva še odvisnost od transfuzij, ki je neodvisen negativni napovedni dejavnik. WPSS temelji na klasifikaciji po SZO in omogoča oceno preživetja in tveganja za AML kadarkoli med potekom bolezni (preglednica V) (9, 10).

Preglednica IV: Mednarodni sistem točkovanja za napovedovanje izida bolezní (IPSS) za MDS.

<b>TOČKOVNIK</b>					
<b>Spremenljivka/ Število točk</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>2</b>
<b>% blastov</b>	<5	5-10	-	11-20	21-30
<b>Kariotip</b>	dober (normalen, -Y, del(5q), del(20q))	vmesen (druge spremembe)	slab (≥3 nenormalnosti ali -7/del7q, iso(17q))	-	-
<b>Št. citopenij</b>	0-1	2-3	-	-	-
<b>OCENA NAPOVEDI IZIDA</b>					
<b>Število točk</b>	<b>Tveganje</b>		<b>Mediana preživetja (leta)</b>		
<b>0</b>	majhno		5,7		
<b>0,5-1</b>	srednje-1		3,5		
<b>1,5-2</b>	srednje-2		1,2		
<b>≥2,5</b>	veliko		0,4		

Preglednica V: Sistem točkovanja WHO za napovedovanje izida bolezni (WPSS) za MDS.

<b>TOČKOVNIK</b>				
<b>Spremenljivka/ Število točk</b>	0	1	2	3
<b>Klasifikacija WHO</b>	RA,RAPS,del(5q)	RCVD	RAPB-1	RAPB-2
<b>Kariotip</b>	dober	srednji	slab	-
<b>Transfuzije</b>	ne	redne	-	-
<b>OCENA NAPOVEDI IZIDA</b>				
<b>Število točk</b>	<b>Tveganje</b>		<b>Mediana preživetja (leta)</b>	
<b>0</b>	zelo majhno		8,6	
<b>1</b>	majhno		6	
<b>2</b>	srednje		3,3	
<b>3-4</b>	veliko		1,8	
<b>5-6</b>	zelo veliko		1	

V vsakdanji klinični praksi uporabljajo poenostavljeno razlikovanje dveh prognostičnih skupin: MDS z velikim tveganjem in MDS z majhnim tveganjem. Pri napovedovanju poteka je potrebno upoštevati tudi pridružene bolezni.

### 1.5.8. Zdravljenje MDS

Zdravljenje MDS je zapleteno, saj gre za predvsem starejše bolnike, ki slabo prenašajo intenzivno zdravljenje in jih v tem starostnem obdobju spremljajo še druge bolezni.

Pri načrtovanju zdravljenja upoštevajo poleg skupine tveganja (MDS z velikim tveganjem in MDS z majhnim tveganjem) tudi bolnikovo starost, telesno zmogljivost in pridružene bolezni (9, 10).

Pomemben namen zdravljenja je lajšanje težav povezanih z boleznijo in izboljšanje kakovosti življenja, kar dosežejo s *podpornim zdravljenjem* in z *zdravljenjem, ki izboljša*



*hematopoezo* (npr. zdravljenje citopenije z ravnimi dejavniki). Za razliko od podpornega zdravljenja in zdravljenja za izboljšanje hematopoeze želijo s **proti MDS usmerjenim zdravljenjem** spremeniti naravni potek bolezni, to je doseči popolno ali delno remisijo in s tem podaljšati preživetje. Razlikujemo intenzivno in neintenzivno zdravljenje usmerjeno proti MDS (9, 10).

### *Podporno zdravljenje*

Podporno zdravljenje je osnovni način zdravljenja vseh bolnikov z MDS ne glede na skupino tveganja. Sem sodi nadomestno zdravljenje s transfuzijami eritrocitov ali trombocitov. Dolgotrajno zdravljenje s transfuzijami eritrocitov vodi v kopičenje železa v telesu in možne okvare jeter, srca in endokrinih žlez. Za preprečevanje in zdravljenje škodljivih posledic čezmernega kopičenja železa v telesu uporabljamo kelatorje (npr. deferaziroks). Transfuzije trombocitov uporabljamo za zdravljenje krvavitev, ki so posledica trombocitopenije. Okužbe pri nevtropeničnih bolnikih zdravimo z intravenskim dajanjem antibiotikov (9, 10).

### **1.5.8.1. Zdravljenje MDS z majhnim tveganjem**

Cilj zdravljenja bolnikov z majhnim tveganjem je izboljšati hematopoezo. V ta namen uporabljamo rastne dejavnike (epoetine), imunosupresivna in imunomodulacijska zdravila (antitimocitni globulin s ciklosporinom ali brez njega). Pri nevtropeničnih bolnikih z bakterijskimi okužbami, ki se ne izboljšajo kljub zdravljenju z antibiotiki, priporočajo zdravljenje z ravnim dejavnikom granulocitne vrste G-CSF (filgrastim).

Namen zdravljenja z dejavniki, ki spodbujajo eritropoezo, je zmanjšanje potrebe po transfuzijah in povečanje kakovosti življenja (9, 10).

### **1.5.8.2. Zdravljenje MDS z velikim tveganjem**

Cilj zdravljenja bolnikov z velikim tveganjem je izboljšati njihovo preživetje.

Če bolnik ni kandidat za intenzivno zdravljenje, poleg podpornega zdravljenja uvedemo še zdravljenje s hipometilacijskimi zdravili (zaviralci DNA-metiltransferaze: 5-azacitidin). Tako zdravljenje zmanjša tveganje za prehod v AML in nekaterim bolnikom podaljša preživetje (9, 10).

Intenzivno zdravljenje je intenzivna kemoterapija in alogenična presaditev matičnih krvotvornih celic (PKMC). Alogenična PKMC je edini način zdravljenja, ki lahko pripelje

do ozdravitve, a je na žalost za to primerno le majhno število bolnikov. Za alogenično PKMC se odločijo za vsakega bolnika posebej, pri čemer upoštevajo starost, sočasne bolezni in druge dejavnike, ki vplivajo na izid zdravljenja. Kemoterapija je navadno most do alogenične PKMC. Uporabljamo iste kombinacije in odmerke citostatikov kot pri zdravljenju AML (9, 10).

## 2. NAMEN DELA

MDS so skupina klonskih bolezni krvotvorne matične celice. Skupne značilnosti so displazije v eni ali več mieločnih celičnih vrstah, neučinkovita hematopoeza s posledičnimi citopenijami in povečano tveganje za akutno mieloično levkemijo. Diagnoza temelji na izključitvi drugih vzrokov za citopenijo, ugotovitvi displastičnih sprememb in deleža blastnih celic v kostnem mozgu ali krvi ter citogenetični preiskavi kostnega mozga (ugotovitvi ponavljajočih kromosomskih nenormalnosti). V večini primerov diagnoza temelji na subjektivni oceni deleža displastičnih celic v granulocitni, rdeči in megakariocitni celični vrsti. Glavni morfološki spremembi značilni za displazijo granulocitne vrste (disgranulopoeza), ki jo lahko ugotovimo s pregledom krvnega razmaza, sta pelgeroidna anomalija jeder (hipolobacija) in hipogranuliranost nevtrofilcev. Ker ocena hipogranuliranosti znatno varira celo pri odčitkih izkušenih citologov, se poskuša to oceno objektivizirati s pomočjo različnih parametrov iz hematoloških analizatorjev. V zadnjih letih različne skupine raziskovalcev proučujejo vrednost nekaterih parametrov hematološkega analizatorja (eksperimentalni parametri) za oceno disgranulopoeze in njihovo uporabo za presejalno testiranje.

V okviru diplomske naloge želimo preveriti izsledke dveh skupin (4, 5), ki sta poročali o koristnosti ugotavljanja displazije nevtrofilcev z meritvijo povprečnega volumna, prevodnosti in sipanja svetlobe z avtomatskim hematološkim analizatorjem Beckman Coulter LH 750.

Delovni cilji so naslednji:

- Primerjati izsledke eksperimentalnih parametrov krvne slike pri zdravih osebah z izsledki pri bolnikih z MDS.
- Ugotoviti medsebojne povezave med standardnimi in eksperimentalnimi parametri krvne slike ter indeksoma za mieloperoksidazo ter alkalno fosfatazo granulocitov v skupini bolnikov z MDS.
- Oceniti, ali je kateri od eksperimentalnih parametrov primeren za presejalno preiskavo za ugotavljanje hipogranuliranosti nevtrofilcev pri bolnikih s sumom na MDS.

### **3. PREISKOVANCI IN METODE DE LA**

#### ***3.1. PREISKOVANCI***

V raziskavo smo vključili 46 bolnikov z MDS (28 bolnikov z RA, 5 bolnikov z RAPB, 3 bolnike z MDSdel5q in 10 bolnikov z MDS-NK) in 33 primerjalnih zdravih oseb.

Vsakemu bolniku in zdravi osebi smo naredili krvno sliko. Vzorci krvi so bili odvzeti ob postavitvi diagnoze ali med stanjem stabilne oziroma nespremenljive bolezni pri bolnikih, ki niso bili predhodno zdravljeni. Krvni vzorci tako skupine bolnikov kot kontrolne skupine zdravih so bili odvzeti iz vene, kot antikoagulant smo uporabili K<sub>3</sub>EDTA.

Vsi bolniki so imeli koncentracijo hemoglobina v krvi pod 110 g/l, 12 bolnikov je imelo število trombocitov pod  $100 \times 10^9/l$ , 11 bolnikov je imelo število nevtrofilcev pod  $1,5 \times 10^9/l$  in 8 bolnikov je imelo pancitopenijo.

Povprečna starost bolnikov je bila 74 let (49 do 85 let), žensk je bilo 28, kar predstavlja 60,9 % in moških 18, kar predstavlja 39,1 %.

Kot primerjalna skupina so bili zdravi ljudje, predvsem prostovoljci in bolnišnični delavci. Povprečna starost zdravih oseb iz primerjalne skupine je bila 35 let (17 do 55 let), od tega je bilo 24 žensk, kar predstavlja 72,7 % in 9 moških, kar predstavlja 27,3 %.

#### ***3.2. LABORATORIJSKE PREISKAVE***

##### **3.2.1. Določitev eksperimentalnih parametrov hematološkega analizatorja**

Analizo hemograma smo izvedli z avtomatskim hematološkim analizatorjem Beckman Coulter LH 750. Uporabili smo vensko kri z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA.

##### ***3.2.1.1. Reagenti in kontrolni vzorci za hematološki analizator Beckman Coulter LH 750***

Reagenti:

1.DILUENT: razredči vzorec, stabilizira celične membrane, izpira instrument med analizo, usmerja tok vzorca v pretočno celico.

2.COULTER LYSE S III: lizira eritrocite, sprošča hemoglobin, zmanjša velikost delcev, da ne motijo štetja levkocitov.

3.REAGENČNI SISTEM:

COULTER LH Series Pak je bazičen, hipertoničen reagent, ki normalizira mešanico reagentov in izenači osmotski tlak. Levkocite povrne v normalno stanje. Voda gre iz celic, ki se zato skrčijo. Ob doseženem ionskem ravnovesju se krčenje ustavi in celice so pripravljene za citometrično analizo.

COULTER LH Series Retic Pak je kisel, hipotoničen reagent, ki povzroči, da celice nabrekajo. Eritrociti v njem hitreje lizirajo, saj vsebujejo več holesterola kot levkociti in so zato bolj dovzetni za reagent.

4.COULTER CLENZ<sup>R</sup>: čisti in izpira notranje površine instrumenta (11).

Kontrolni vzorci:

1.COULTER LATRON PRIMER: pripravi cevke in ostale dele za kontrolni postopek.

2.COULTER LATRON CONTROL: služi za preverjanje uravnanosti pretočne celice.

3.5C<sup>R</sup> Series: kontrolni reagent za določanje številčne koncentracije celic in DKS (11).

### **3.2.1.2. Način merjenja hematološkega analizatorja Beckman Coulter LH 750**

Avtomatski hematološki analizator celic Beckman Coulter LH 750 uporablja za identifikacijo celic kombinacijo treh meritev (tehnologija VCS): volumna (Volume), prevodnosti (Conductivity) in sipanja svetlobe (Scatter).

Analizator vsrka vzorec in ga razdeli v dva dela, en del gre v komoro WBC in drugi v komoro RBC. Suspenziji vzorca, ki potuje v komoro WBC, je dodan reagent za liziranje, ki povzroči lizo eritrocitov. Suspenzija vzorca potuje iz komore skozi odprtino pretočne celice, preko katere potuje električni tok. Ko celica preide odprtino, sproži impulz. Število impulzov pomeni število celic, velikost impulza je sorazmerna z volumnom celice.

Del vzorca potuje tudi v komoro za diferencialno analizo krvnih celic in merjenje retikulocitov. Za diferencialno analizo aparat vzorec redči, mu doda reagent za liziranje in reagent, ki ohranja levkocitne populacije. Tako pripravljen vzorec aparat injicira v pretočno celico, kjer vsaki celici izmeri volumen, prevodnost in razpršenost svetlobe.

Merjenje celičnega volumna omogoči natančno določitev velikosti vseh celičnih vrst, laserski žarek za merjenje sipanja svetlobe pa citoplazemske in jedrne strukture (11).

### 3.2.2. Krvni razmazi

Za oceno diferencialne levkocitne krvne slike smo pripravili krvne razmaze, jih posušili in barvali ter pregledali pod mikroskopom.

#### 3.2.2.1. Priprava krvnih razmazov

Delovni pribor: krovna in objektna stekelca, nastavki za izdelavo razmaza

Dobra priprava krvnega razmaza je pomembna za pravilne rezultate. Uporabljali smo čista, nemastna objektna stekla, na katera smo na sredino, približno 1 cm od matirnega zgornjega roba, kanili majhno kapljico krvi. Razmazno steklo smo postavili pod kotom približno 30 stopinj na objektno steklo, tik pred kapljico krvi. Kapljico krvi smo zajeli in z enakomernim pritiskom na površino potegnili po objektnem steklu. Krvni razmaz naj bi bil dolg tri cm, končal naj bi se 1 cm pred robom z zaokroženim »repom«. Debelina razmaza je odvisna od pritiska na površino objektnega stekla, od kota in hitrosti potega.

Krvne razmaze smo ustrezno označili in sušili na zraku (1).

#### 3.2.2.2. Fiksacija in barvanje krvnih razmazov

Krvne razmaze smo barvali po Pappenheimu (May-Grunwald-Giemsa).

Reagenti:

1. raztopina po May-Grunwaldu (eozin-metilensko modrilo v metanolu),
2. raztopina po Giemsi (azur I in azur II v metanolu),
3. fosfatni pufer,
4. destilirana voda (1).

*Priprava raztopin:*

*Sörensenov fosfatni pufer za pripravo Giemse*

Matična raztopina (pH=6,6):

raztopina A: 9,1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

raztopina B: 9,5 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ali 11,9 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Vzeli smo 630 ml raztopine A in 370 ml raztopine B, uravnali pH vrednost na 6,6.

*Delovna raztopina*

V 1000 ml bučki smo razredčili 50 ml matične raztopine in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Končna pH vrednost mora biti 6,8.

#### *Delovna raztopina Giemse v fosfatnem pufru (1:10)*

V merilnem valju smo odmerili 10 ml Giemse in s fosfatnim pufrom dopolnili do 100 ml. Za ohranitev morfologije celic je potrebno krvne razmaze fiksirati. Fiksirali smo jih z raztopino po May-Grunwaldu 5 minut. Nato smo preparate barvali, najprej 1 minuto v raztopini po May-Grunwaldu s fosfatnim pufrom v razmerju 1:1 in 20 minut v raztopini Giemsa v fosfatnem pufru. Po končanem barvanju smo krvne razmaze 2-3x izpirali s fosfatnim pufrom in posušili na zraku.

Krvni razmazi se barvajo s kombinacijo kislih in bazičnih barvil. Bazična barvila (metilensko modrilo, azur) obarvajo nukleinske kisline v jedru in citoplazmi, kislila barvila (eozin) obarvajo beljakovine celične citoplazme in hemoglobin.

V pravilno obarvanih razmazih so celična jedra obarvana vijolično, celična citoplazma rožnato do modro, nevtrofilne granulacije sivovijolično, eozinofilne granulacije oranžno in bazofilne granulacije temnovijolično (1).

### **3.2.3. Barvanje alkalne fosfataze granulocitov**

Za vsak vzorec smo pripravili dva krvna razmaza, ki smo ju fiksirali in zamrznili. Za barvanje smo uporabimo le en razmaz, drugi je bil rezervni, če reakcija s kontrolnim vzorcem ne bi bila zadovoljiva.

#### **3.2.3.1. Reagenti**

FIKSATIV: 1 del 40 % formaldehida in 9 delov metanola. Fiksativ hranimo pri  $-20^{\circ}\text{C}$  2-3 tedne.

BARBITURATNI PUFER (pH=9,2): v 200 ml bučki smo raztopili 2,06 g natrijeve soli dietilbarbiturata v destilirani vodi, ki smo jo dolili do nekaj cm pod oznako. Dodali smo 3,75 ml 0,2 M HCl. pH vrednost smo preverili s pH metrom in jo po potrebi uravnali z 0,2 M HCl ali 0,1 M NaOH na vrednost 9,2. Dopolnili smo do oznake.

HEMATOKSILIN: Pripravili smo dve raztopini, v prvi smo raztopili 1 g hematoksilina v destilirani vodi v 500 ml bučki. Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake. V drugi raztopini smo raztopili v destilirani vodi v 500 ml bučki 0,2 g  $\text{NaJO}_3$  (ali 0,22 g  $\text{KJO}_3$ ) in 50 g  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo rahlo

segrevali, dokler se vsi kristali reagentov niso raztopili. Pripravljeni raztopini smo zmešali, dodali smo še 50 g kloralhidrata in 1 g citronske kisline ter filtrirali preko filternega papirja.

NAFTOL-AS-MX-FOSFAT: 0,005 g naftol-AS-MX-fosfata smo raztopili v 40 ml barbituratnega pufra.

O-DIANIZIDIN/FAST BLUE(BB): 0,02 g diazonijeve soli smo dodali raztopini naftol-AS-MX-fosfata v barbituratnem pufri in filtrirali preko filternega papirja.

Raztopino smo pripravili svežo za vsako določanje.

### **3.2.3.2. Postopek**

Krvne razmaze smo sušili na zraku najmanj dve uri, jih fiksirali s fiksativom 30 sekund, sprali v destilirani vodi in najmanj eno uro sušili. Preparate smo hranili največ en teden v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}$  C do naslednjega barvanja. Sušenje in fiksacijo preparatov je potrebno nujno izvesti na dan priprave preparata.

Razmaze smo prenesli v inkubacijsko mešanico naftol-AS-MX-fosfata v barbituratnem pufri za 90 minut pri sobni temperaturi.

Po inkubaciji smo preparate sprali z destilirano vodo in jih kontrastno barvali s hematoksilinom 20 minut. Nato smo jih spirali pod tekočo vodo vsaj 5 minut in dobro posušili na zraku vsaj 30 minut.

### **3.2.3.3. Princip reakcije**

Encim cepi substrat, sprosti se naftol, ki z diazonijevo soljo daje obarvan netopni produkt.

### **3.2.3.4. Ocena obarvanih krvnih razmazov**

Reakcijski produkti so modra zrnca v citoplazmi paličastih in segmentiranih nevtrofilcev, ostale celice so negativne.

Pri vsakem barvanju smo vzporedno pobarvali pozitivno kontrolo za potrditev reakcije. Za pozitivno kontrolo lahko uporabimo razmaze krvi bolnikov, pri katerih je aktivnost alkalne fosfataze zvečana (bolniki s pravo policitemijo, z levkocitozo ob infektu ali nosečnice po šestem mesecu nosečnosti).

Prešteli smo 100 zrelih nevtrofilcev in aktivnost reakcije ovrednotili s stopnjami od 0 do 5:

0 - popolna negativna reakcija,



- 1 - reakcijski produkt je komaj viden,
- 2 - celica je obarvana difuzno,
- 3 - v celici so prisotne temne grudice na svetli osnovi,
- 4 - reakcijski produkt zavzema večji del citoplazme in
- 5 - reakcijski produkt prekriva celico, jedro je komaj vidno.

Indeks aktivnosti smo izračunali tako, da smo stopnjo aktivnosti pomnožili z dobljenim odstotkom celic.

### ***3.2.3.5. Referenčno območje***

Ker je ocena encimske aktivnosti odvisna od postopka barvanja in reagentov, morajo biti normalne vrednosti določene za vsak laboratorij posebej. Normalne vrednosti v Specializiranem hematološkem laboratoriju KO za hematologijo so:

10-40 % pozitivnih nevtrofilnih granulocitov, indeks aktivnosti 10-100.

Aktivnost encima alkalna fosfataza granulocitov je zmanjšana pri KML in zvečana pri PRV. Preiskava je pomembna pri opredelitvi mieloproliferativnih boleznih.

### **3.2.4. Barvanje mieloperoksidaze**

Krvne razmaze je potrebno narediti do 12 ur po odvzemu vzorca, pri sobni temperaturi jih lahko hranimo do enega tedna.

#### ***3.2.4.1. Reagenti***

1 M HCl: 4,24 ml 36 % HCl smo dodali v 50 ml bučko z nekaj destilirane vode in dopolnili do oznake.

FIKSATIV: 3 % glutaraldehid v 60 % acetonu; zmešali smo 60 ml acetona in 40 ml destilirane vode. Dodali smo 4,3 ml 70 % glutaraldehida (ali 12 ml 25 % ali 6 ml 50 %).

TRIS-PUFER (pH=7,6): 3,6 g tris pufra smo raztopili v 500 ml bučki in z destilirano vodo dopolnili 1cm pod oznako in uravnavali pH na vrednost 7,6 z 1 M HCl. Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake.

INKUBACIJSKA MEŠANICA: 15 mg DAB (3,3'-diaminobenzidin oz. 3, 3', 4, 4' Tetraamino diphenyl) smo raztopili v 60 ml pufru in dodali 0,13 ml 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Močno smo premešali (2-3 minute) in prefiltrirali. DAB je potrebno temeljito raztopiti v pufru.

HEMATOKSILIN: Pripravili smo dve raztopini, v prvi smo raztopili 1 g hematoksilina v destilirani vodi v 500 ml bučki. Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake. V drugi raztopini smo raztopili v destilirani vodi v 500 ml bučki 0,2 g NaJO<sub>3</sub> (ali 0,22 g KJO<sub>3</sub>) in 50 g KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 12 H<sub>2</sub>O in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo rahlo segrevali, dokler se vsi kristali reagentov niso raztopili. Pripravljeni raztopini smo zmešali, dodali 50 g kloralhidrata in 1 g citronske kisline ter filtrirali preko filternega papirja.

Raztopino se lahko hrani na sobni temperaturi največ 6 mesecev.

#### **3.2.4.2. Postopek**

Razmaze smo fiksirali eno minuto z ohlajenim fiksativom. Sprali smo pod tekočo vodo in posušili na zraku. Razmaze smo prenesli v inkubacijsko mešanico za 10 minut pri sobni temperaturi in nato spirali 2 minuti pod tekočo vodo.

Barvali smo v hematoksilinu 5 do 10 minut ter sprali pod tekočo vodo. Razmaze smo posušili na zraku.

#### **3.2.4.3. Ocena obarvanih krvnih razmazov**

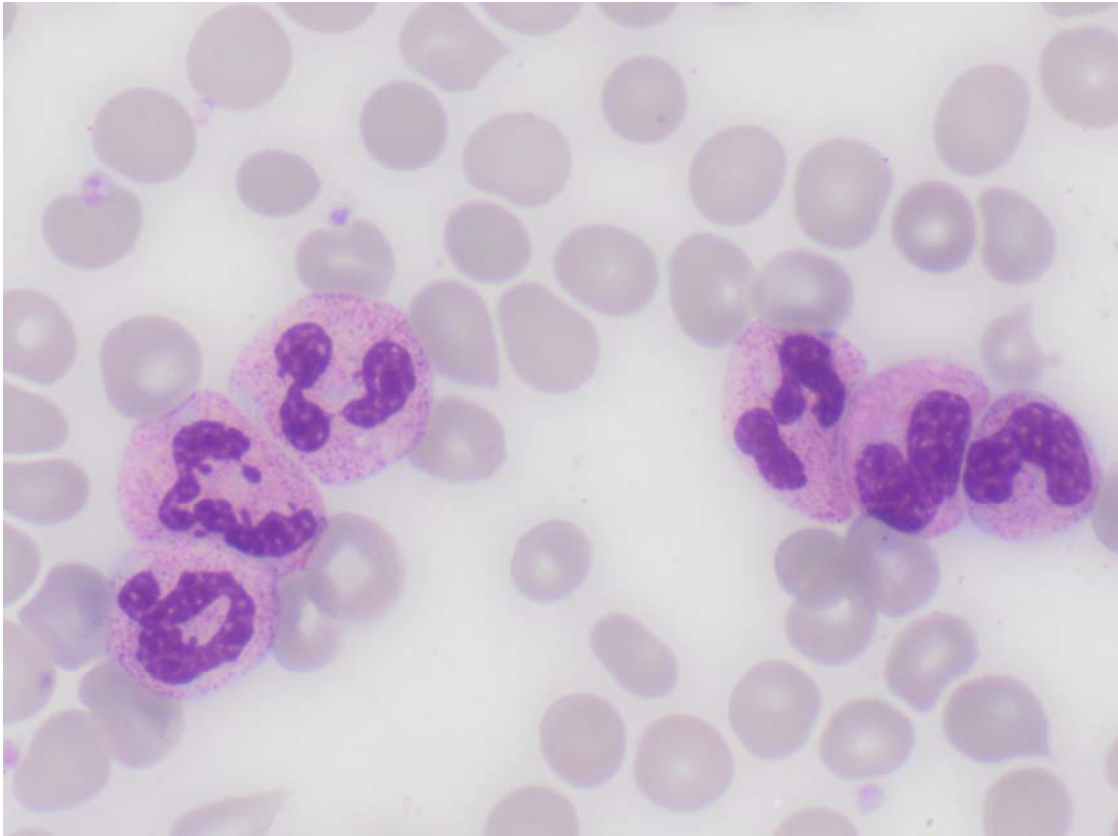
Reakcijski produkt je v obliki rjavih zrn. Eritrociti in njihovi prekurzorji so obarvani difuzno rjavo. Zgodnji mieloblasti so negativni, z dozorevanjem se pozitivna reakcija krepi in je najintenzivnejša pri promielocitu in mielocitu. Pozitivna reakcija je lahko omejena na področje Golgijevega aparata. Eozinofilne granule se obarvajo zelo intenzivno in jih lahko ločimo od nevtrofilcev. Monoblasti in monociti so lahko pozitivni ali negativni. Pri pozitivni reakciji so granule drobnejše in difuzno posute po citoplazmi.

#### **3.2.5. Pregled in ocena krvnega razmaza - mikroskopiranje**

DKS smo določili v obarvanih in posušeni krvnih razmazih s pomočjo mikroskopa Olympus BH-2. Najprej smo krvne razmaze pogledali pod majhno povečavo (stokratna povečava), s katero smo si naravnali jasno sliko vidnega polja in poiskali primerno gosto

mesto v razmazu, krvne celice pa smo diferencirali pod imerzijsko povečavo (tisočkratna povečava). Diferencirali smo najmanj 100 levkocitov po sistemu cik-cak. Pri mikroskopski DKS ocenimo tudi obliko in velikost levkocitov, razčlenjenost jedra, obarvanost citoplazme, granulacije citoplazme,... Hkrati ocenimo še velikost, obarvanost in obliko eritrocitov in velikost trombocitov. Zabeležimo vsako nenormalnost (1).

Oceno krvnih razmazov so naredili strokovno usposobljeni in izkušeni zdravstveni delavci v Specializiranem hematološkem laboratoriju KO za hematologijo, UKC v Ljubljani.



Slika 3: Razmaz periferne krvi s prikazom eritrocitov in segmentiranih ter paličastih nevtrofilcev.

### **3.3. STATISTIČNA ANALIZA**

Podatke smo analizirali s pomočjo statističnega paketa SPSS.

Medsebojno povezanost spremenljivk smo ugotavljali s Spearmanovim koeficientom korelacije ( $\rho$ ). Za primerjavo med posameznimi skupinami smo uporabili Mann-Whitneyev test.

Dobljenim rezultatom smo določili mediano in kvartile. Za grafični prikaz izsledkov smo uporabili kvantilne diagrame. Kvantilni diagram nazorno prikaže mediano in obliko porazdelitve spremenljivke. Območje v okviru (interkvartilni razpon, IQR) je razpeto med prvim ( $Q_1$ ) in tretjim ( $Q_3$ ) kvartilom. Vodoravna črta v okviru označuje mediano. Spodnji ročaj sega od  $Q_1$  do vrednosti  $X_1$  ( $X_1 \leq Q_1 - 1,5 \times \text{IQR}$ ), zgornji ročaj od  $Q_3$  do vrednosti  $X_2$  ( $X_2 \geq Q_3 + 1,5 \times \text{IQR}$ ).

Spodnji in zgornji osamelci ( $^{\circ}$ ) so vrednosti v območju med vrednostjo  $X_1$  in vrednostjo  $Y_1$  ( $Y_1 \leq Q_1 - 3 \times \text{IQR}$ ) oziroma  $X_2$  in  $Y_2$  ( $Y_2 \geq Q_3 + 3 \times \text{IQR}$ ). Spodnji in zgornji ekstremni osamelci ( $^*$ ) pa segajo v območje pod oziroma nad osamelci.. Številke poleg osamelca oziroma ekstrema so številke bolnika z MDS oziroma zdravega preiskovanca. (12, 13)

Celotno diagnostično točnost nekaterih eksperimentalnih parametrov za ugotavljanje MDS smo ocenili s površino pod krivuljo ROC (ang. Receiver Operating Characteristic). Površina predstavlja verjetnost, da bo izsledek testa pri slučajno izbranem bolniku z MDS presegel izsledek pri slučajno izbranem zdravem preiskovancu.

## 4. REZULTATI

Med skupino bolnikov z MDS in skupino zdravih preiskovancev smo primerjali naslednje parametre hematološkega analizatorja: Ng, Hgb, PVE, PLT, PVN, PSN, PPN, SOVN, SOSN, SOPN, ISN ter I-MPO in I-AFG.

### ZDRAVI PREISKOVANCI

Preglednica VI: Prvi kvartil, mediana in tretji kvartil osnovnih hematoloških parametrov in indeksa aktivnosti MPO in AFG v skupini zdravih preiskovancev.

ZDRAVI	Q <sub>1</sub>	M	Q <sub>3</sub>
Ng (10 <sup>9</sup> /l)	2,69	3,53	5,07
Hb (g/l)	131	137	144
PVE (fl)	85	87	90
Tr (10 <sup>9</sup> /l)	235	263	315
I-MPO (/)	283	292	296
I-AFG (/)	153	174	229

Preglednica VII: Prvi kvartil, mediana in tretji kvartil eksperimentalnih hematoloških parametrov v skupini zdravih preiskovancev.

ZDRAVI	Q <sub>1</sub>	M	Q <sub>3</sub>
PSN (/)	143548	148750	151345
SOSN (/)	9767	10479	11256
ISN (/)	12,9	14,1	15,4
PPN (/)	147664	150762	153895
SOPN (/)	5169	5931	7161
PVN (/)	136929	140322	143634
SOVN (/)	18230	19723	20638

## BOLNIKI Z MDS

Preglednica VIII: Prvi kvartil, mediana in tretji kvartil osnovnih hematoloških parametrov in indeksa aktivnosti MPO in AFG v skupini bolnikov z MDS.

BOLNI	Q <sub>1</sub>	M	Q <sub>3</sub>
Ng (10 <sup>9</sup> /l)	1,73	2,56	3,48
Hb (g/l)	93	106	118
PVE (fl)	89	94	100
Tr (10 <sup>9</sup> /l)	96	174	214
I MPO (/)	268	282	290
I AFG (/)	95	152	259

Preglednica IX: Prvi kvartil, mediana in tretji kvartil esperimentalnih hematoloških parametrov v skupini bolnikov z MDS.

BOLNI	Q <sub>1</sub>	M	Q <sub>3</sub>
PSN (/)	136709	143431	149102
SOSN (/)	10004	11690	12688
ISN (/)	10,6	12,2	14,9
PPN (/)	150134	152196	153500
SOPN (/)	5265	5523	6067
PVN (/)	135373	140988	146243
SOVN (/)	18331	20502	23242

### PRIMERJAVA MED SKUPINAMA

Za primerjavo med skupino zdravih in skupino bolnikov smo uporabili Mann-Whitneyev test. Parametri hematološkega analizatorja, ki smo jih primerjali med skupino bolnikov in skupino zdravih preiskovancev: Ng, Hb, PVE, Tr so statistično različni. Hgb, Ng in Tr so signifikantno manjši pri skupini bolnikov, PVE je signifikantno večji pri skupini bolnikov ( $p > 0,05$ , Mann-Whitneyev test). Skupini se tudi razlikujeta glede indeksa aktivnosti MPO.

Preglednica X: Primerjava starosti in osnovnih hematoloških parametrov (Mann-Whitneyev test) zdravih preiskovancev s skupino bolnikov z MDS.

	Starost	Ng	Hgb	PVE	Tr	I-MPO	I-AFG
Mann-Whitney U	30	432	79	320	246	429	613
Wilcoxon W	591	1513	1160	881	1327	1510	1603
Z	-7,25	-3,25	-6,76	-4,37	-5,10	-2,95	-1,17
p	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24

Preglednica XI: Primerjava eksperimentalnih hematoloških parametrov (Mann-Whitneyev test) zdravih preiskovancev s skupino bolnikov z MDS.

	PVN	SOVN	PSN	SOSN	ISN	PPN	SOPN
Mann-Whitney U	682	561	503	518	496	599	682
Wilcoxon W	1243	1122	1584	1079	1577	1160	1243
Z	-0,77	-1,97	-2,54	-2,40	-2,61	-1,59	-0,77
p	0,44	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	0,11	0,44

Ugotovili smo statistično pomembno razliko med zdravimi in bolnimi pri povprečnem sipanju svetlobe nevtrofilcev (PSN), ne pa pri povprečnem volumnu (PVN) in prevodnosti

nevtrofilcev (PPN) ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney-ev test). PSN je v naši raziskavi pri skupini bolnikov signifikantno nižje kot pri skupini zdravih preiskovancev. Ugotovili smo tudi statistično pomembno razliko med zdravimi in bolnimi pri povprečnem standardnem odklonu sipanja svetlobe nevtrofilcev (SOSN), povprečnem standardnem odklonu volumna nevtrofilcev (SOVN) in indeksu sipanja svetlobe nevtrofilcev ( $ISN = PSN/SOSN$ ), ki je signifikantno nižji pri bolnikih kot pri zdravih preiskovancih.

Pri bolnikih z MDS smo ugotovili korelacijo (Spearmanov korelacijski koeficient) med povprečnim sipanjem svetlobe nevtrofilcev (PSN) in indeksom aktivnosti MPO (I MPO) ter standardnim odklonom sipanja svetlobe nevtrofilcev (SOSN) in standardnim odklonom volumna nevtrofilcev (SOVN). Ugotovili smo tudi korelacijo med koncentracijo hemoglobina (Hgb) in povprečno prevodnostjo nevtrofilcev (PPN) in še korelacijo med številom nevtrofilcev (Ng) in številom trombocitov (Tr) ter indeksom aktivnosti MPO (I MPO) in indeksom aktivnosti AFG (I AFG). Korelacije prikazuje preglednica XII.

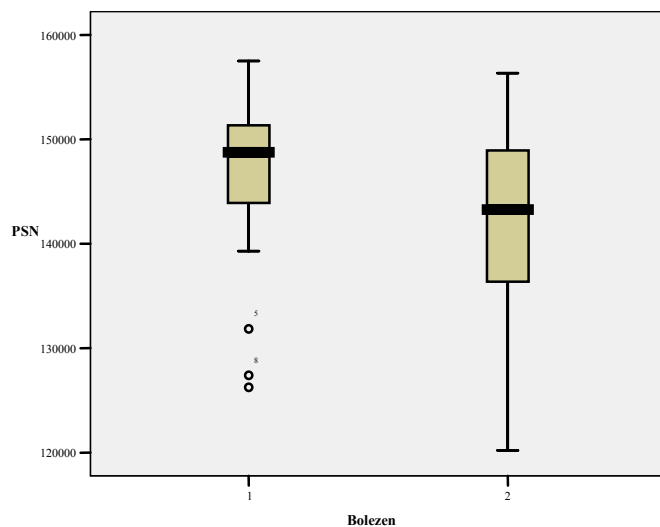


Preglednica XII: Medsebojna korelacija+ parametrov krvne slike pri bolnikih z MDS.

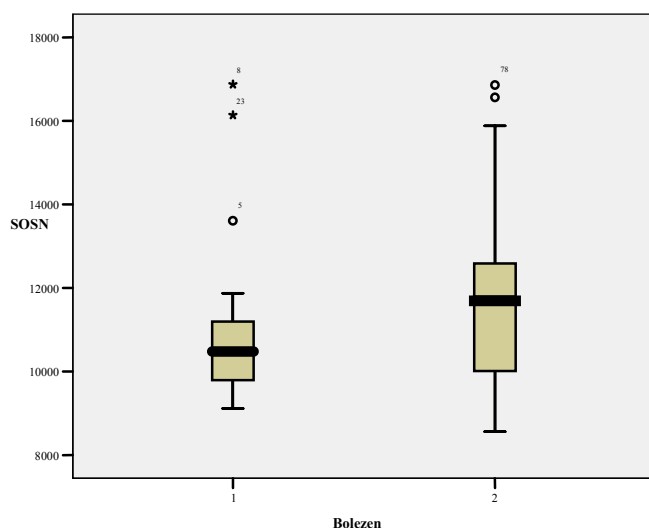
	Ng	Hb	PVE	Tr	MPO	AFG	PVN	SOVN	PSN	SOSN	ISN	PPN
Hb	NS											
PVE	NS	NS										
Tr	0,41**	NS	NS									
MPO	NS	NS	NS	NS								
AFG	0,48**	NS	SN	NS	NS							
PVN	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
SOVN	NS	-0,36**	NS	NS	NS	NS	0,49**					
PSN	NS	NS	NS	NS	0,32*	NS	NS	-0,62**				
SOSN	NS	NS	NS	NS	-0,35*	NS	NS	0,55**	-0,79**			
ISN	NS	NS	NS	NS	0,37*	NS	NS	-0,60**	0,8**	-0,98**		
PPN	-0,34*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
SOPN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

+Spearmanov korelacijski koeficient ( $\rho$ ); NS=  $\rho < 0,25$  ali  $\rho > 0,05$ ; \* $\rho \leq 0,05$ ; \*\* $\rho \leq 0,01$

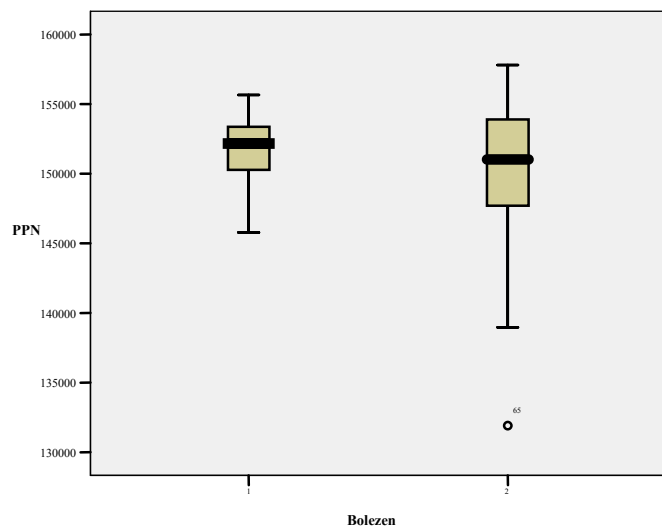
Razpon vrednosti nevtrofilcev za skupino zdravih preiskovancev (1) in skupino bolnikov (2) smo grafično prikazali v obliki kvantilnega diagrama, kar prikazujejo slike 4-10.



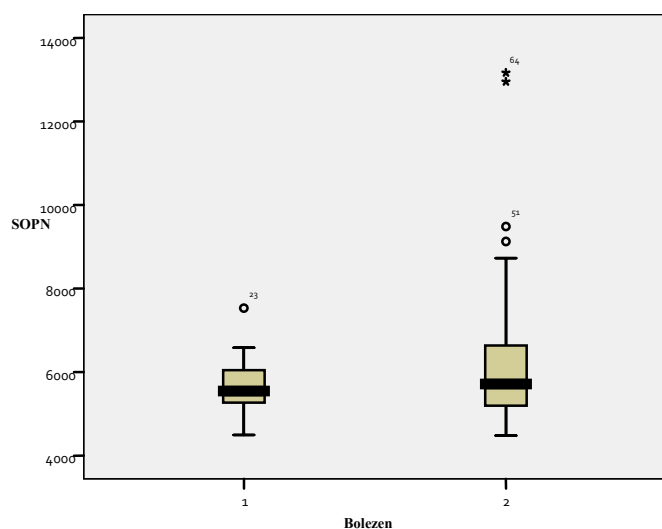
Slika 4: Kvantilni diagram povprečnih sipanj svetlobe nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.



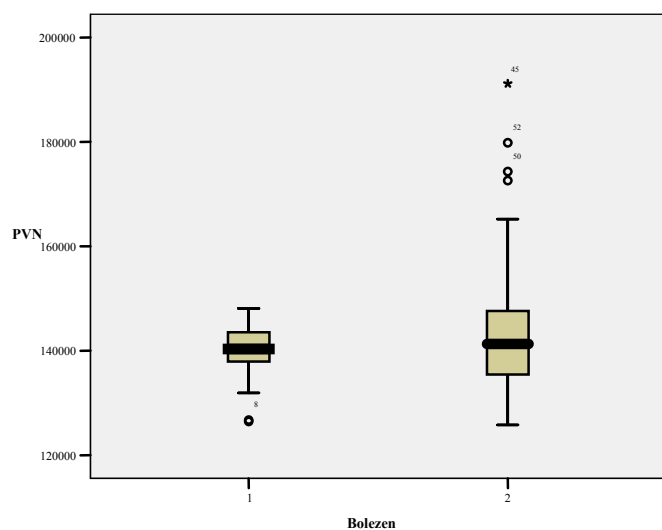
Slika 5: Kvantilni diagram standardnih odklonov povprečnega sipanja svetlobe nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.



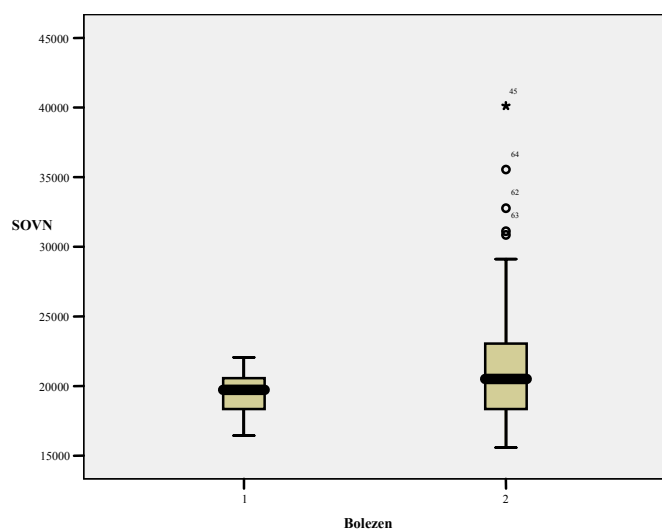
Slika 6: Kvartilni diagram povprečnih prevodnosti nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.



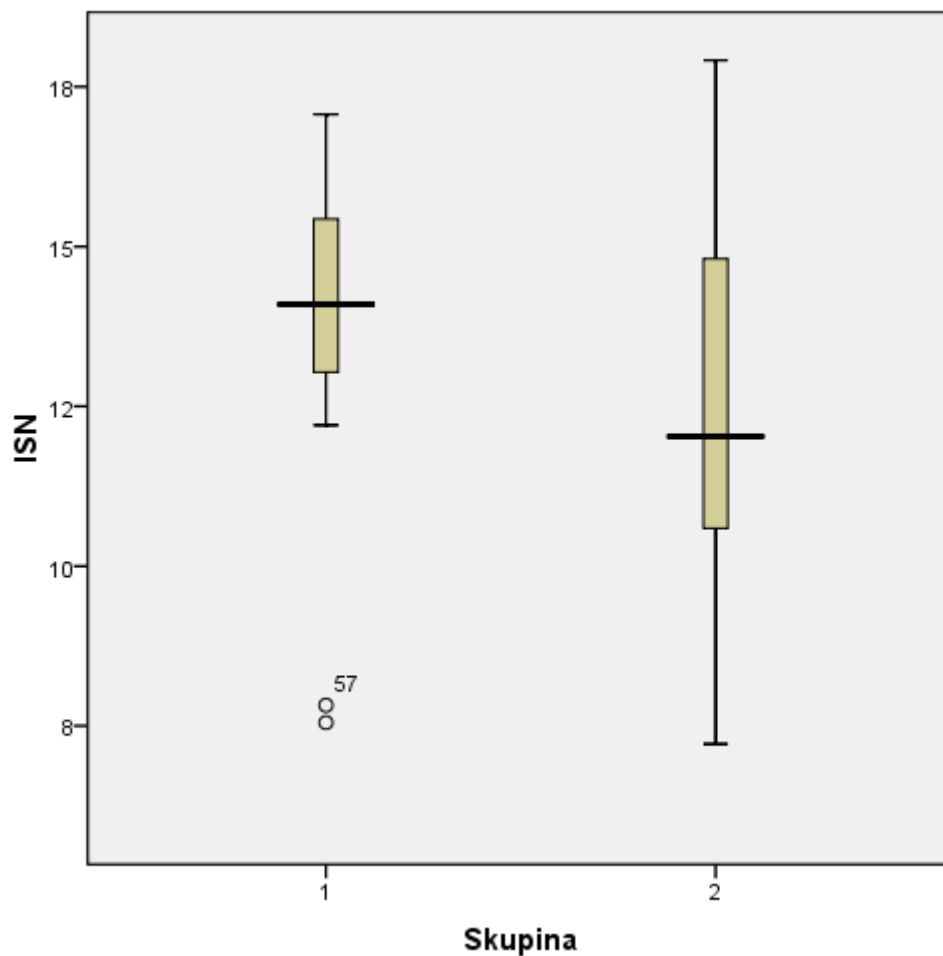
Slika 7: Kvartilni diagram standardnih odklonov prevodnosti nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.



Slika 8: Kvantilni diagram povprečnih volumnov nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.

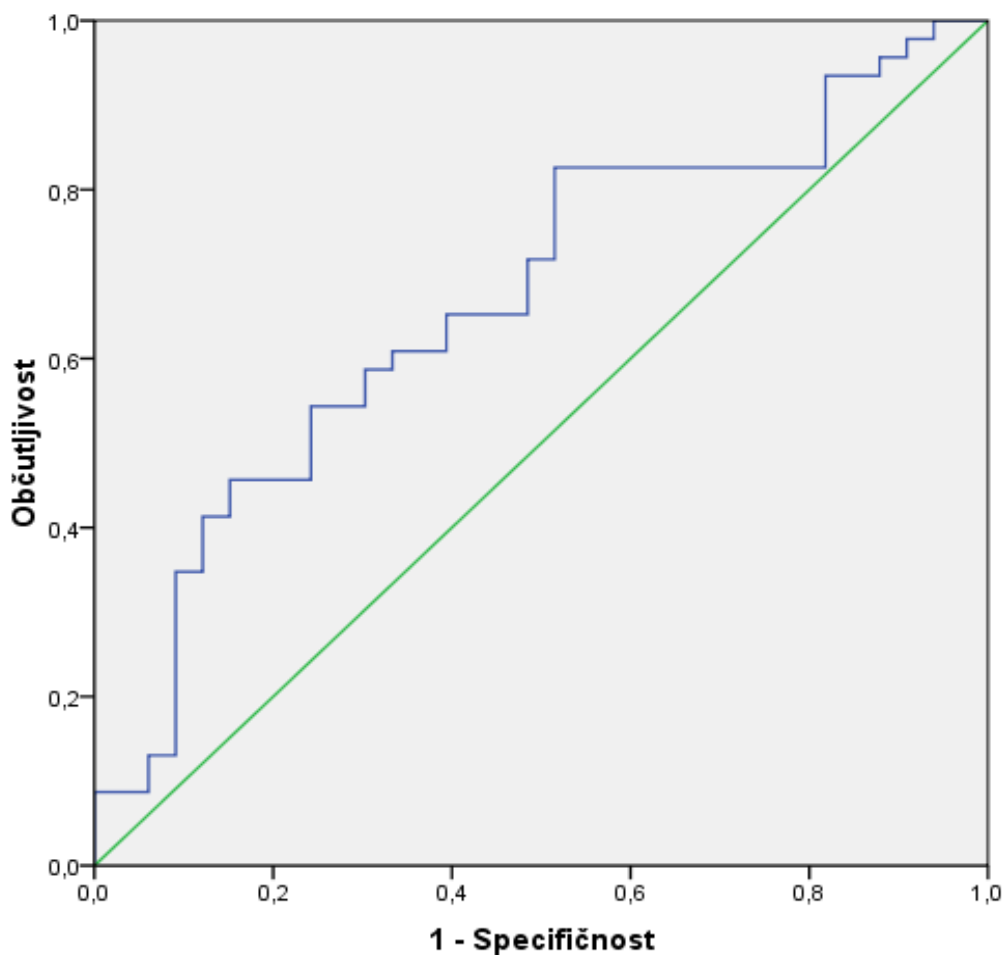


Slika 9: Kvantilni diagram standardnih odklonov volumna nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in v skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.



Slika 10: Kvantilni diagram indeksov sipanja svetlobe nevtrofilcev v skupini zdravih preiskovancev (1) in skupini bolnikov (2). Območje v okvirju označuje vrednosti med prvim in tretjim kvartilom. Poudarjena črta znotraj tega območja označuje mediano.

Celotno diagnostično točnost ISN za ugotavljanje MDS smo ocenili s površino pod krivuljo ROC.



Slika 11: Ocena celotne diagnostične točnosti indeksa sipanja svetlobe nevtrofilcev s krivuljo ROC (Receiver Operating Characteristic). Površina pod krivuljo = 0,67,  $p=0,01$ .

## 5. RAZPRAVA

Diagnoza MDS še vedno temelji na oceni deleža blastov in ugotovitvi displazije v kostnem mozgu in periferni krvi. Med MDS s številom blastov pod 5 % sodita RCED in RCVD. Za njihovo opredelitev je ključna ocena stopnje in vrste displazije. Pelgeroidna anomalija jeder in hipogranulacija citoplazme sta displastični spremembi v granulocitni vrsti (disgranulopoeza), ki ju lahko ugotovimo z mikroskopskim pregledom razmaza krvi. Ocena hipogranulacije je subjektivna in je odvisna od kvalitete priprave in barvanja krvnega razmaza, kot tudi od izkušenosti preiskovalca. Razlike med izsledki posameznih preiskovalcev so lahko velike. Da je ocena stopnje displazije podvržena veliki variabilnosti med posameznimi preiskovalci, kaže tudi raziskava Parmentierja in sodelavcev (14). V njihovi raziskavi so štirje izkušeni citologi analizirali iste vzorce kostnega mozga zdravih oseb in ocenjevali prisotnost disgranulopoeze (več kot 10 % celic z disgranulopoezo). Najpogostejša vrsta disgranulopoeze je bila hipogranulacija (93 %). Izsledki preiskovalcev so bili skladni glede ocene disgranulopoeze le v 41 %. To kaže na znatno variabilnost med posameznimi ocenjevalci in na neustreznost mejne vrednosti 10 %, ki se zahteva za ugotovitev disgranulopoeze. Pri rutinski analizi razmaza krvi je neskladje pri oceni hipogranulacije nevtrofilcev med posameznimi preiskovalci verjetno še večje, saj analizo opravi laboratorijski tehnik. Prav tako tudi kvaliteta obarvanih krvnih razmazov variira bolj kot je to v raziskavah. Da bi se izognili subjektivni oceni hipogranulacije, so le to poskušali ovrednotiti s pomočjo nekaterih parametrov, ki nam jih posredujejo elektronski analizatorji. Miguel in sodelavci so pri bolnikih z MDS ugotovili manjše PSN in PPN kot pri zdravih preiskovancih (5). Med PSN in z mikroskopom ugotovljeno hipogranuliranostjo citoplazme so ugotovili pozitivno povezavo (korelacija). Haschke-Becher in sodelavci so poročali, da imajo bolniki z MDS povečane standardne odklone sipanja svetlobe (SOSN), prevodnosti (SOPN) in volumna nevtrofilcev (SOVN) (4). V tej raziskavi so s SOPN najbolj razlikovali bolnike z MDS od zdravih oseb.

V naši raziskavi so imeli bolniki z MDS značilno manjši PSN kot zdravi preiskovanci. Manjšega PPN pri naših bolnikih nismo ugotovili. Da PSN odraža stopnjo granulacije citoplazme, potrjuje tudi naša ugotovitev o pozitivni povezavi med tem parametrom in indeksom mieloperoksidaze (I MPO). Peroksidaza se nahaja v primarnih (azurofilnih)

zrncih nevtrofilcev, zato ta indeks posredno meri količino primarnih zrnc v citoplazmi (15).

Zaradi nenormalne granulopoeze pri MDS nastajajo nevtrofilci, ki se glede nekaterih parametrov med seboj razlikujejo bolj, kot je to pri zdravih. Posledica te variabilnosti je povečana porazdelitvena širina nevtrofilcev glede sipanja svetlobe, volumna in prevodnosti. Tako kot Haschke-Becher in sodelavci (4) smo tudi mi ugotovili večji SOSN, SOVN, medtem ko povečanega SOPN pri nas ni bilo.

Uporabnosti omenjenih eksperimentalnih parametrov za presejalno preiskavo pri MDS smo ocenili s pomočjo krivulj ROC (ang. Receiver Operating Characteristic). Za razliko od zgoraj omenjenih avtorjev je bila diagnostična točnost omenjenih parametrov pri nas majhna. Še najbolje smo razlikovali bolnike z MDS od zdravih preiskovancev s pomočjo indeksa sipanja svetlobe nevtrofilcev (ISN). To je količnik med PSN in SOSN.

Na izsledke raziskav, kot so specifičnost in občutljivost preiskave, vplivajo homogenost populacije izbranih bolnikov glede podvrste MDS, velikost vzorca in različni predanalitični pogoji. Ti pogoji so v objavljenih poročilih (4, 5), različni kot naši, kar je verjetno vzrok za razlike med njimi. Zato bi odgovor o koristnosti eksperimentalnih podatkov za diagnostiko MDS dala le dovolj velika multicentrična raziskava.



## 6. SKLEP

1. Povprečno sipanje svetlobe nevtroficev (PSN) je manjše pri bolnikih z MDS ( $p=0,01$ ). Skupina bolnikov z MDS se razlikuje od zdravih preiskovancev tudi po večji variaciji volumna (SOVN) in sipanja svetlobe nevtrofilcev (SOSN).
2. Pri bolnikih z MDS smo ugotovili pozitivno korelacijo med PSN in indeksom mieloperoksidaze (MPO) ter negativno korelacijo PSN z SOSN in SOVN. Pozitivna korelacija je bila prisotna tudi med PVN in SOVN ter med Hgb in SOVN. Korelacija med PPN in Ng je bila negativna.
3. Količnik PSN/SOSN (indeks sipanja svetlobe nevtrofilcev, ISN) najboljše razlikuje bolnike z MDS od zdravih preiskovancev, vendar je njegova diagnostična točnost premajhna, da bi se koristil kot presejalni test za ugotavljanje hipogranuliranosti nevtrofilcev.

## 7. LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina. Ljubljana: Založba Littera Picta d.o.o., Slovensko medicinsko društvo; 2011; 1243-389
2. <http://www.scribd.com/doc/17640501/Beckman-Coulter-Cases> (10.5.2012)
3. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm> (10.5.2012)
4. Haschke-Becher E, Vockenhuber M, Niedetzky P, Totzke U, Gabriel C. A new high throughput screening method for the detection of chronic lymphatic leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin. Chem. Lab. Med. 2008; 46(1)
5. Miguel A, Orero M, Simon R, Collado R, Perez PR, Pacios A, et al. Automated Neutrophil Morphology and Its Utility in the Assessment of Neutrophil Dysplasia. Laboratory Hematology 2007; 13:98-102
6. Campuzana-Zuluaga G., Hanscheid T, Grobusch MP. Automated haematology analysis to diagnosis malaria. Universidad de Antioquia, Lab 610, Medellin, Colombia 2010; 62:52-9
7. Chaves F, Thierno B, Xu D. Neutrophil Volume Distribution Width: A New Automated Hematologic Parameter for Acute Infection. Pathology and Laboratory Medicine 2006; Vol. 130, No.3: 378-80
8. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008; 355-77, 479-713
9. Mlakar U. Mielodisplastični sindromi. Ljubljana: Celgene International; 2010
10. Mlakar U. Smernice za odkrivanje in zdravljenje mielodisplastičnih sindromov pri odraslih. Zdrav Vestn 2010; 79: 455-44
11. Accuflex<sup>TM</sup> Technology, Detailed principles of operation, Reference manual, Miami, 1999
12. Rován J, Turk T. Analiza podatkov s SPSS za Windows. Ljubljana: Ekonomska fakulteta; 1999
13. Košmelj K. Uporaba statistike. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2001; 43-9, 53-61

14. Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K, Kramer M, Ireland R, Schuler U, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: Lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica* 2012, 723-30
15. Bohinjec J. Temelji klinične hematologije. Ljubljana: Dopisna delavska univerza Univerzum; 1983; 46-8
16. Hoffbrand AV, Pettit JE. *Clinical Haematology*. London: Gower Medical Publishing; 1988; 153-72 (atlas)
17. Dacie, Lewis. *Practical Haematology*. London: Churchill Livingstone; 2001; 278-81
18. Koepke. *Practical Laboratory Haematology*. London: Churchill Livingstone 1991
19. Steensma DP, Bennett JM. The Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2006; 81(1): 104-30
20. Valespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P. Diagnosis, Classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998; 83: 258-75
21. <http://sl.wikipedia.org/wiki/levkociti> (12.3.2012)
22. [http://en.wikipedia.org/wiki/Myelodysplastic\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Myelodysplastic_syndrome) (12.3.2012)