

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tamara Vasilj**

**Mutacije gena za hereditarnu hemokromatozu  
u mijelodisplastičnom sindromu**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2014.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

## POPIS KRATICA

AML – akutna mijelogeno leukemija

AMP – adenozin monofosfat

ATP – adenozin trifosfat

C282Y – mutacija u genu za hereditarnu hemokromatozu

Dcytb – duodenalni citokrom b, prema engl. duodenal cytochrome b

DMT1 – divalentni metalni transporter, prema engl. divalent metal transporter

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, prema engl. deoxyribonucleic acid

Fe(2+) – reducirani oblik željeza

Fe(3+) – oksidirani oblik željeza

FLVCR – eksporter hema iz stanica

GCSF – stimulirajući čimbenik granulocitnih kolonija, prema engl. granulocyte colony stimulating factor

GDF15 – diferencijacijski faktor rasta 15, prema engl. growth differentiation factor 15

H63D – mutacija u genu za hereditarnu hemokromatozu

HAMP – gen koji kodira za hepcidin

HFE – gen mutiran u hereditarnoj hemokromatozi

HH – hereditarna hemokromatoza

HJV – protein hemojuvelin

HMP-1 – protein nosač hema 1

HO-1 – hem oksigenaza 1, prema engl. heme oxygenase 1

IL-6 – interleukin 6

IPSS-R – revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja, prema engl. international prognostic scoring system revised

KS – koštana srž

LFS – preživljenje bez progresije bolesti u leukemiju, prema engl. leukemia free survival

LIP – citosolna zaliha labilnog željeza, prema engl. labile iron pool

LPI – labilno plazmatsko željezo, prema engl. labile plasma iron

Mbol – restrikcijska endonukleaza

MDS – mijelodisplastični sindrom

MDS-U – neklasificirani MDS, prema engl. myelodysplastic syndroma unclassifiable

NTBI – serumsko željezo nevezano za transferin, prema engl. non-transferrin-bound serum iron

OMIM – baza podataka projekta Mendelovo nasljeđivanje kod čovjeka, prema engl. Online Mendelian Inheritance in Man

OS – ukupno preživljenje, prema engl. overall survival

pb – parovi baza

PCR – lančana reakcija polimeraze, prema engl. polymerase chain reaction

PK – periferna krv

RA – refraktorna anemija, prema engl. refractory anemia

RAEB – refraktorna anemija s viškom blasta, prema engl. refractory anemia with excess blasts

RARS – refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima, prema engl. refractory anemia with ring sideroblasts

RCMD – refraktorna citopenija s displazijom više loza, prema engl. refractory cytopenia with multilineage dysplasia

RCUD – refraktorna citopenija s displazijom jedne loze, prema engl. refractory cytopenia with unilineage dysplasia

RES – retikuloendotelni sustav

RN – refraktorna neutropenija, prema engl. refractory neutropenia

RNA – ribonukleinska kiselina, prema engl. ribonucleic acid

ROS – reaktivni kisikovi radikali, prema engl. reactive oxygen species

RsaI – restrikcijska endonukleaza

RT – refraktorna trombocitopenija, prema engl. refractory thrombocytopenia

SLC40A1 – gen koji kodira za ferroportin

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

Tf – transferin

TfR – receptor transferina, prema engl. transferrin receptor

TTL – vrijeme do leukemije, prema engl. time to leukemia

## Sadržaj

Sažetak .....	I
Summary .....	III
1. Uvod.....	5
1.1. Mijelodisplastični sindrom .....	5
1.2. Metabolizam željeza .....	9
1.3. Hereditarna hemokromatoza .....	11
1.4. MDS i mutacije HFE gena.....	14
2. Hipoteza.....	16
3. Ciljevi rada .....	17
4. Ispitanici i metode rada .....	18
5. Rezultati .....	19
6. Rasprava.....	23
7. Zaključci .....	25
8. Zahvale .....	26
9. Literatura .....	27
10. Životopis.....	35

## Sažetak

### MUTACIJE GENA ZA HEREDITARNU HEMOKROMATOZU U MIJELODISPLASTIČNOM SINDROMU

Tamara Vasilj

Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet

**UVOD:** Mijelodisplastični sindrom (MDS) je klonalna bolest hematopoetske matične stanice. Zbog potrebe za liječenjem transfuzijama krvi te intrinzičnih karakteristika patogeneze same bolesti, u sklopu MDS-a razvija se preopterećenje željezom i sekundarna hemokromatoza. Poznato je da točkaste mutacije HFE gena (C282Y i H63D) dovode do gomilanja željeza u organizmu i uzrok su hereditarne hemokromatoze (HH). Mutacije HFE gena moguće utječu i na tijek i prognozu MDS-a.

**ISPITANICI I METODE:** Istraživanje je provedeno na 37 pacijenata dijagnosticiranih u KB Dubrava, Zagreb od 2008. godine nadalje. Pacijenti su genetski testirani na mutacije u HFE genu te su im analizirani parametri željeza i utjecaj mutacija na preživljenje i progresiju bolesti u leukemiju.

**REZULTATI:** Dokazali smo da C282Y mutacija ima značajno nepovoljan učinak na preživljenje pacijenata s MDS-om, dok je učinak H63D mutacije na preživljenje granično nepovoljan. Dokazano je da H63D mutacija ima nepovoljan učinak u pogledu učestalosti progresije bolesti u akutnu mijelogenu leukemiju (AML). Nije dokazana statistički značajno učestalija mutiranost HFE gena u oboljelih od MDS-a u usporedbi sa zdravom hrvatskom populacijom. Analiza parametara metabolizma željeza pokazala je da pacijenti s H63D mutacijom imaju značajno niži TIBC, a podgrupa netransfudiranih s tom mutacijom značajno višu razinu feritina. Ostali parametri se nisu statistički značajno razlikovali između mutirane i nemutirane grupe pacijenata.

**RASPRAVA:** U skladu s prijašnjim radovima, nismo dokazali povećanu učestalost HFE mutacija u oboljelih od MDS-a, ali smo također u skladu s već objavljenim rezultatima drugih autora dokazali da status mutiranosti HFE gena utječe na metabolizam željeza. Vjerojatno najvažniji rezultat ovog rada je nalaz nepovoljnog učinka HFE mutacija na ukupno preživljenje (OS, prema engl. overall survival) pacijenata što motivira pitanje treba li svakog oboljelog od MDS-a genetski testirati na HFE mutacije i je li racionalno u tih pacijenata ranije razmatrati terapiju kelatorima željeza.

**ZAKLJUČAK:** Broj mutiranih pojedinaca u grupi oboljelih od MDS-a viši je nego u grupi zdravih pojedinaca, no nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku. HFE mutacije nepovoljno utječu na preživljenje pacijenata s MDS-om i progresiju bolesti u leukemiju. Također je primjećen utjecaj HFE mutacija na parametre željeza što vodi u opterećenje organizma željezom.

**Ključne riječi:** mijelodisplastični sindrom, hemokromatoza, mutacije HFE gena, parametri metabolizma željeza, ukupno preživljenje, progresija u leukemiju

## Summary

### HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS GENE MUTATIONS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROME

Tamara Vasilj

University of Zagreb  
School of Medicine

**INTRODUCTION:** Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal bone marrow disorder characterized by abnormalities in hematopoietic stem cell. Many patients with MDS become transfusion therapy dependent and are prone to iron overload. The latter is caused by frequent transfusions and intrinsic characteristics of the disease. It is well known that HFE gene mutations (C282Y and H63D) lead to iron accumulation and cause hereditary hemochromatosis (HH). HFE gene mutations possibly affect disease course and prognosis of MDS.

**SUBJECTS AND METHODS:** This research included 37 patients diagnosed with MDS in Clinical Hospital Dubrava, Zagreb, from 2008 to 2014. Patients were genetically tested for HFE gene mutations and effect of these mutations on iron metabolism parameters, overall survival (OS) and progression to leukemia were assessed.

**RESULTS:** We have proved that C282Y mutation has significantly unfavourable effect on overall survival in patients with MDS. H63D mutation shows trend toward significance in OS when compared to wild type (wt) patients. We observed unfavourable effect of H63D mutation on MDS progression to leukemia frequency. HFE gene mutations incidence in healthy Croatian blood donors and in our patients does not differ significantly. Iron metabolism parameters analysis reveals that patients with H63D mutation have significantly lower TIBC levels and among them the transfusion naive patients have significantly higher ferritin levels. We did not observe statistically significant difference in other iron metabolism parameters.

**DISCUSSION:** Our study found statistically insignificant difference in HFE mutations frequencies between healthy population and patients diagnosed with MDS. This observation is accordant with foreign authors' views and studies, as is our data that confirm evident effect of HFE mutations on iron metabolism. Probably the most notable finding of this study is the



effect of HFE mutations on OS which is significantly worse in patients with mutated gene. These findings arouse dilemmas whether every MDS patient should be genetically tested for HFE mutations and whether earlier iron chelators therapy consideration in mutated patients is rational.

**CONCLUSION:** A relative number of mutated individuals among MDS patients is higher than among healthy individuals but we were not able to prove statistically significant difference. HFE mutations have a poor effect on survival and progression to leukemia in MDS patients. Furthermore, HFE mutations' effect on iron parameters resulting in iron overload was noted.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome, hemochromatosis, HFE gene mutations, iron metabolism parameters, overall survival, progression to leukemia

# 1. Uvod

## 1.1. Mijelodisplastični sindrom

### 1.1.1. Definicija i klasifikacija

Mijelodisplastični sindromi (MDS) predstavljaju heterogenu grupu klonalnih bolesti hematopoetske matične stanice, te su karakterizirani citopenijom, displazijom jedne ili više mijeloidnih staničnih loza i povišenim rizikom pretvorbe u akutnu mijelogenu leukemiju (AML). Displaziji može biti pridruženo povišenje broja mijeloblasta u perifernoj krvi (PK) i koštanoj srži (KS), ali je broj tih stanica ispod 20%, što razlikuje MDS od AML-a. (Brunner, R. D. et al. 2008)

Prema posljednjom klasifikaciji unutar mijelodisplastičnih sindroma razlikuju se refraktorna citopenija s displazijom jedne loze (RCUD), refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (RARS), refraktorna citopenija s displazijom više loza (RCMD), refraktorna anemija s viškom blasta 1 i 2 (RAEB- 1, RAEB- 2), neklasificirani MDS (MDS-U) i MDS povezan s izoliranom delecijom 5q kromosoma. RCUD obuhvaća refraktornu anemiju (RA), neutropeniju (RN) i trombocitopeniju (RT). (Vardiman, J. W. et al. 2009)

### 1.1.2. Patogeneza

Složenost patogeneze MDS-a pokušava se raspetljati mnogim znanstvenim radovima. Brojni od tih radova istražuju klonalne poremećaje matične hematopoetske stanice, ali i klonalnost mezenhimalnih matičnih stanica, cirkulirajućih endotelnih stanica te čak i stanica limfoidne loze, kao početne događaje u nastanku MDS-a (Janssen, J. W. G. et al. 1989; Mehrotra, B. et al. 1995; Della Porta, M. G. et al. 2008). Otprilike 90% pacijenata s MDS-om ima najmanje jednu onkogenu mutaciju. Pokretačke mutacije uključuju mutacije gena za RNA splicing (SF3B1, SRSF2, U2AF1 i ZRSR2), DNA metilaciju (TET2, DNMT3A i IDH1/2), regulaciju transkripcije (RUNX1), popravak DNA (TP53), modificiranje kromatina (ASXL1) te signalnu transdukciju (NRAS i KRAS). Prilikom dijagnoze većina pacijenata ima dvije do tri pokretačke mutacije i stotine pozadinskih mutacija. (Bacher, U. et al. 2007; Delhommeau, F. et al. 2009; Gelsi-Boyer, V. et al. 2009; Cazzola, M. et al. 2013) Uloga nabrojanih mutacija u patogenezi bolesti ostaje još uvijek nedovoljno razjašnjena.

Delecija 5q kromosoma se patogenetski dovodi u vezu s MDS-om te prema novijoj klasifikaciji Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) izdvaja MDS s del(5q) kao zasebni entitet unutar grupe mijelodisplastičnih sindroma. Smatra se da se uz deleciju 5q kromosoma

gubi funkcionalnost nekih gena, poput RPS14 i SPARC. Tako na primjer haploinsuficijencija RPS14 gena vodi u disregulaciju drugih gena važnih za proces translacije, a uslijed haploinsuficijencije gubi se i značaj SPARC gena kao tumor supresora. (Vandenbe.H et al. 1974; Pellagatti, A. et al. 2007; Ebert, B. L. et al. 2008)

Do neefektivne hematopoeze u MDS-u dolazi zbog abnormalne sklonosti progenitornih stanica apoptozi i ograničenog odgovora na stimulaciju faktorima rasta. Proapoptotični signali vjerojatno nastaju zbog poremećene signalizacije, povećane proizvodnje proupalnih citokina, promijenjenog imunskog odgovora T stanica i/ili promjena u mikrookolišu strome KS. (Sawada, K. et al. 1993; Claessens, Y. E. et al. 2002)

Također, epigenetske promjene igraju ulogu u patogenezi MDS-a, te svi bolesnici imaju abnormalnu metilaciju na mjestu promotora transkripcije, a broj zahvaćenih lokusa raste s progresijom bolesti (Jiang, Y. et al. 2009).

### **1.1.3. Dijagnostički izazovi**

Dijagnosticiranje MDS-a često može biti zahtjevno. Klinički i laboratorijski nalazi mogu ukazivati na MDS uz neuvjerljive morfološke nalaze. Također diferencijalnodijagnostički sekundarnu displaziju mogu uzrokovati malnutricija, lijekovi, toksini, terapija faktorima rasta, upale i infekcije. Ujedno, hipocelularnost KS ili mijelofibroza mogu otežavati dijagnozu podležećeg MDS-a. Stoga je određen minimum morfoloških kriterija koji moraju biti zadovoljeni za postavljanje dijagnoze MDS-a, te su donešene smjernice koje pomažu pri dijagnosticiranju manje jasnih slučajeva bolesti, na temelju saznanja o citogenetici MDS-a. Za dijagnozu MDS-a potrebno je da uz odgovarajuću kliničku prezentaciju pacijenta, najmanje 10% stanica barem jedne mijeloidne loze u KS nedvosmisleno pokazuje displaziju. Ipak, ukoliko je prisutna samo displazija jedne loze u KS bez u nastavku navedenih dodatnih dijagnostičkih kriterija, preporučuje se praćenje pacijenta tijekom 6 mjeseci prije postavljanja dijagnoze. U PK u sklopu RCUD-a nalazi se monocitopenija ili eventualno bicitopenija, a u sklopu RARS-a i MDS s del(5q) anemija, dok se u ostalim nozološkim entitetima u PK nađe citopenija uslijed zahvaćanja više loza. Za dijagnozu RARS-a potrebno je da više od 15% eritroidnih prekursora u KS čine prstenasti sideroblasti. Za dijagnozu RAEB- 1 potrebno je 5 do 9% blasta u KS i manje od 5% blasta u PK uz odsudstvo Auerovih štapića u KS ili PK, a za dijagnozu RAEB- 2 10 do 19% blasta u KS te 5 do 19% blasta u PK, i uz nalaz Auerovih štapića. Ako morfološki kriteriji nisu dosljedni, a klinički i laboratorijski nalazi upućuju na MDS, dijagnoza se može postaviti ukoliko postoje specifične kromosomske abnormalnosti. Od nebalansiranih abnormalnosti to su -7 ili del(7q), -5 ili del(5q), i(17q) ili t(17p), -13 ili del(13p),

del(11q), del(12p) ili t(12p), del(9q), te od balansiranih abnormalnosti t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), inv(3)(q21q26.2), t(6;9)(p23;q34). Tada možemo govoriti o MDS-U. (Vardiman, J. W. et al. 2009)

#### **1.1.4. Epidemiologija i etiologija**

Prema istraživanjima u Europi, incidencija MDS-a iznosi 1,8 na 100 000. Incidencija raste s dobi te je bolest rijetkost u osoba mlađih od 50 godina, a većina oboljelih je starija od 70. Stopa incidencije kod osoba starijih od 70 godina iznosi 20 na 100 000. Učestalost je najveća u bijele rase i nešto je veća u muškog spola. Preživljenje unutar pet godina iznosi 27% te je nešto bolje u žena, nego u muškaraca. (Rollison, D. E. et al. 2008; Visser, O. et al. 2012) Faktori rizika za obolijevanje od MDS-a, osim dobi, su kemoterapija i terapija zračenjem, pušenje te izloženost otapalima i poljoprivrednim kemikalijama (Nisse, C. et al. 1995).

Rizik za obolijevanje od MDS-a povišen je i u nekim nasljednim bolestima poput Diamond-Blackfan sindroma, Schwachman-Diamond sindroma, kongenitalne diskeratoze i Fanconijeve anemije.

#### **1.1.5. Klinička slika**

Pacijenti mogu biti bez simptoma bolesti, a najčešće se zbog anemije osjećaju umorno i razdražljivo, mogu se žaliti na dispneju u naporu, grčeve u mišićima, glavobolje i nesanicu. U fizikalnom se statusu nađe blijeda koža i slabije prokrvljene sluznice tetahikardija u sklopu anemije. Uz tešku trombocitopeniju mogu biti prisutni znakovi krvarenja u vidu petehija, ekhimoza, purpure, epistakse i sl. Pacijenti s niskim brojem neutrofila oboljevaju od infektivnih bolesti pa tada simptomi tih bolesti dominiraju. Katkad se pacijenti s MDS-om mogu prezentirati kao vrućica nepoznatog porijekla. Fizikalni nalaz hepatomegalije ili splenomegalije nađe se u 5 do 10% bolesnika. (Saarni, M. I. & Linman, J. W. 1973)

#### **1.1.6. Prognoza**

Revidirani IPSS (IPSS-R) sustav bodovanja svrstava bolesnike u jednu od pet kategorija rizika. Skoring uzima u obzir citogenetiku, postotak blasta u KS, razinu hemoglobina, broj trombocita i apsolutni broj neutrofila. Citogenetski, pacijenti se mogu svrstati u pet podgrupa pa vrlo dobar kariotip uključuje -Y i del(11q), dobrim kariotipom se smatra i normalan, del

(5q), del(12p), del(20q) kariotip, a intermedijarnim kariotipom se označava sve ostale citogenetske abnormalnosti. Tri i više kromosomskih poremećaja i poremećaj kromosoma 7, osim del(7q) spada u loš i vrlo loš kariotip. Na temelju navedenih promatranih parametra pribrajaju se bodovi od 0 do 4 ovisno o rezultatima pretraga te se na temelju zbroja bodova bolesnika može svrstati u skupinu vrlo niskog, niskog, intermedijarnog, visokog ili vrlo visokog rizika prema čemu se može predvidjeti očekivano preživljenje i rizik progresije MDS-a u AML. Medijan preživljenja iznosi od 8,8 godina u skupini vrlo niskog rizika do 9,6 mjeseci u skupini vrlo visokog rizika. (Greenberg, P. L. et al. 2012)

### **1.1.7. Liječenje**

Alogena transplantacija koštane srži je jedini danas raspoloživ način liječenja koji oboljele od MDS-a može uvesti u dugotrajnu remisiju (Chang, C. K. et al. 2007). Razumljivo, takva terapija nije primjenjiva u velikom broju slučajeva jer je većina bolesnika starija od 70 godina i usto se preporučuje samo za uznapredovale stadije bolesti.

Potporna terapija podrazumijeva transfuzije eritrocita i trombocita u pacijenata sa simptomatskom anemijom i trombocitopenijom. Kelatori željeza daju se bolesnicima u kojih se razvije sekundarna hemokromatoza. U liječenju se mogu koristiti demetilirajući agensi, azacitidin i decitabin, ili niske doze citarabina te se ovim lijekovima uspijeva postići remisija bolesti i u nekim slučajevima odgoditi progresija u AML (Silverman, L. R. et al. 2002; Kantarjian, H. et al. 2006). Imunomodulator lenalidomid smanjuje potrebu za transfuzijama kao potpornim liječenjem u otprilike dvije trećine oboljelih od MDS del(5q) i u gotovo polovice inducira potpuni citogenetski odgovor, ali ostaje nepoznato produljuje li ovaj lijek preživljenje (Pellagatti, A. et al. 2007). Terapija eritropoetinom indicirana je u niskorizičnih pacijenata kojima je serumski eritropoetin niži od 200 mIU/ml (Greenberg, P. L. et al. 2009). Terapija faktorima rasta granulocita (GCSF) isplativa je samo u pacijenata s neutropenijom uz vrućicu ili očitu infekciju (Negrin, R. S. et al. 1989).

### **1.1.8. MDS i preopterećenje željezom**

Većina pacijenata koji boluju od MDS-a u tijeku bolesti postane ovisna o transfuzijama eritrocita zbog poremećene eritropoeze i velikog pada u koncentraciji hemoglobina. Uslijed čestih transfuzija eritrocita razvija se preopterećenje željezom i sekundarna hemokromatoza. Preopterećenju željezom u MDS-u pridonosi i patogeneza same bolesti s obzirom da neučinkovita eritropoeza proizvodi signale koji stimuliraju intestinalnu apsorpciju željeza.

Dokazano je da se uslijed neučinkovite eritropoeze pojačano luči diferencijacijski faktor rasta 15 (GDF15) što suprimira proizvodnju hepcidina u jetri (Tanno, T. et al. 2010). Ovaj mehanizam doprinosi nakupljanju željeza u organizmu, ali rijetko vodi u veliko povišenje koncentracije serumskog feritina te se smatra da je ipak glavni uzrok preopterećenju željezom u MDS-u ovisnost pacijenata o transfuzijama.

Ovisnost o transfuzijama jasno smanjuje preživljenje pacijenata s MDS-om. Nije do kraja jasno je li to tako zbog komplikacija uzrokovanih preopterećenjem željezom ili zato što potreba za učestalom terapijom transfuzijama ukazuje na teži poremećaj koštane srži. Ipak, utvrđeno je da je potreba za transfuzijama rizični faktor neovisan o citogenetici pacijenta s MDS-om što govori u prilog tome da preopterećenje željezom skraćuje očekivano preživljenje zbog utjecaja koje ima na organizam. Zbog toga je preopterećenje željezom uz serumski feritin viši od 1000 ng/ml ostao nezavisni prognostički faktor za preživljenje i progresiju u AML. (Malcovati, L. 2007; Valent, P. et al. 2008; Gattermann, N. & Rachmilewitz, E. A. 2011)

## **1.2. Metabolizam željeza**

U ljudskom organizmu željezo je jedan od esencijalnih elemenata u tragovima i važno je za mnogobrojne vitalne biološke procese poput transporta kisika, oksidativne fosforilacije, biosinteze DNK i ksenobiotskih reakcija. Sudjelovanjem u redoks reakcijama željezo mijenja oksidativno stanje iz  $Fe(2+)$  oblika u  $Fe(3+)$  oblik i obrnuto. Kroz takav prijenos elektrona ono omogućuje brojne fiziološke procese, ali može biti uzrokom toksičnih oštećenja u organizmu uslijed viška tzv. labilnog željeza i posljedičnog stvaranja slobodnih radikala.

Sisavci gube željezo odumiranjem stanica mukoze i kože ili krvarenjem, ali evolucijom nisu razvili nikakav mehanizam za ekskreciju željeza iz tijela. Zato je ravnoteža količine željeza u tijelu sisavaca regulirana kontrolom unosa željeza prehranom i apsorpcije u probavilu.

Proces apsorpcije željeza može se didaktički podijeliti u tri faze: 1) unos željeza, 2) transport u enterocitima i 3) pohrana i ekstraenterocitni transfer. Apsorpcija se odvija u duodenumu i gornjem jejunumu i željezo se apsorbira u enterocite u reduciranom obliku ( $Fe(2+)$ ) ili u sastavu hema. (Schumann, K. et al. 1990) Unos željeza uključuje redukciju  $Fe(3+)$  oblika u lumen crijeva pomoću željezove reduktaze poput duodenalnog citokroma b (Dcytb) i kasniji transport  $Fe(2+)$  oblika preko apikalne membrane enterocita pomoću divalentnog metalnog transportera (DMT1) (Fleming, M. D. et al. 1997; Ohgami, R. S. et al. 2005).

Hem iz hrane se također može transportirati kroz apikalnu membranu enterocita te se zatim metabolizira u  $Fe(2+)$  oblik u enterocitima pomoću hem oksigenaze 1 (HO-1). Prije desetak

godina je otkriven transportni protein za hem u enterocitima - protein nosač hema -1 (HMP-1) (Shayeghi, M. et al. 2005).  $Fe(2+)$  oblik željeza naposljetku kroz bazolateralnu membranu enterocita dopijeva u krvotok vezan uz nosač feroportin te se reoksidira u  $Fe(3+)$  oblik uz djelovanje feroksidaze hefestina kao katalizatora reakcije (Yeh, K. Y. et al. 2009). Analogno reakcijama prilikom prijenosa željeza iz enterocita u krv, željezo se i iz makrofaga retikuloendotelnog sustava (RES) prenosi u krvotok vezano uz feroportin i prolazeći kroz redoks reakciju kataliziranu hefestinom.

Efluks  $Fe(2+)$  iz enterocita i makrofaga posredovan feroportinom je kritični događaj u kontekstu homeostaze željeza. Ovaj proces inhibira hepcidin, jetreni protein koji se veže za feroportin i potiče njegovu fosforilaciju, internalizaciju i razgradnju u lizosomima. Hepcidin se akumulira nakon unosa željeza i tijekom upalnih zbivanja što rezultira smanjenom apsorpcijom željeza unesenog hranom i retencijom željeza u makrofagima. Suprotno tome, koncentracija hepcidina opada tijekom hipoksije ili anemije inducirane krvarenjem što potiče apsorpciju i oslobađanje željeza iz makrofaga. Poremećaj u djelovanju hepcidina povezan je s preopterećenjem željezom u hereditarnoj hemokromatozi (HH), dok patološkom porastu razine hepcidina pridonosi razvoj anemije kronične bolesti, smatra se zbog povećanih razina interleukina 6 (IL-6). (Nemeth, E. et al. 2003; Hentze, M. W. et al. 2010)

Budući da pri fiziološkom pH željezo nije topivo u plazmi, ono se prenosi u obliku transferina (normalna zasićenost je oko 30 %). Željezo eksportirano iz enterocita ili makrofaga u krvotok veže se za transferin (Tf) koji ga održava u  $Fe(3+)$  obliku. Željezo vezano za Tf čini manje od 0,1% ukupnog željeza, ali je kao takvo vrlo dinamično. Eritroidni prekursori trebaju željezo za sazrijevanje. Te stanice prikupljaju željezo putem plazmatskog Tf koji se visokim afinitetom veže za Tf receptor (TfR1) na površini stanica. Kiseli okoliš u endosomu potiče otpuštanje  $Fe(3+)$  od transferina koji ostaje vezan za svoj receptor. Ferireduktaza reducira  $Fe(3+)$  u divalentni oblik koji se putem DMT1 transportira kroz membranu endosoma u citosol ili direktno u mitohondrij eritroidnih stanica. Istovremeno afinitet TfR1 za Tf opada i dolazi do disocijacije Tf od receptora te apo-Tf secerniran u krvotok može ponovno vezati  $Fe(3+)$ .

Mnoge druge stanice također dolaze do potrebnog željeza preko transferina. (Ponka, P. et al. 1998; Levy, J. E. et al. 1999) Stanice uglavnom koriste željezo za proizvodnju hema i željezo-sumpornih proteina.

Kada se premaši kapacitet vezivanja željeza za transferin, ono se nađe u slobodnom obliku u plazmi (NTBI). Proporcija NTBI-a koji je najslabije vezan za biomolekule plazme naziva se labilnim plazmatskim željezom (LPI) koje može ulaziti u redoks reakcije i prouzročiti štetu na raznim tkivima produkcijom reaktivnih kisikovih radikala (ROS).

Stanice se mogu riješiti viška intracelularnog željeza sekrecijom  $Fe(2+)$  preko feroportina ili sekrecijom hema preko eksportera FLVCR (Keel, S. B. et al. 2008). Stanice mogu i pohraniti

željezo u citosolu u obliku proteina feritina (Arosio, P. et al. 2009). Takvo se željezo smatra biološki dostupnim i može biti mobilizirano u metaboličke svrhe. Različite stanice pak sadrže prijelaznu zalihu citosolnog željeza vezanog za niskomolekularne kelate poput citrata, peptida, ATP-a, AMP-a ili pirofosfata, tzv. *labile iron pool* (LIP) (Kakhlon, O. & Cabantchik, Z. I. 2002). LIP može izazvati oksidativnu štetu na staničnim proteinima, lipidima ili nukleinskim kiselinama. Nadalje, čak se i kronično povišene razine feritina dovode u vezu s prooksidativnim učinkom željeza sekvstriranog u feritinu, iako se dosad smatralo da feritin sprječava oksidativno oštećenje reducirajući citosolni LIP (Petrat, F. et al. 2002; Kaur, D. et al. 2009).

### **1.3. Hereditarna hemokromatoza**

#### **1.3.1. Definicija i klasifikacija**

Hereditarna hemokromatoza je autosomno-recesivna nasljedna bolest obilježena poremećenom regulacijom apsorpcije željeza koja može voditi u oštećenje organa zbog preopterećenja organizma željezom.

Baza podataka projekta Mendelovo nasljeđivanje kod čovjeka (OMIM, prema engl. Online Mendelian Inheritance in Man) trenutno navodi četiri tipa bolesti od kojih je svaka uzrokovana mutacijom različitih gena.

Klasična HH (tip I) povezana je s mutacijom HFE gena na šestom kromosomu. U najvećem broju slučajeva radi se o zamjeni aminokiseline (AK) tirozin za cistein na položaju 282 HFE proteina (C282Y), a u manjem broju dolazi do zamjene AK histidin za aspartnu kiselinu na položaju 63 (H63D) (Feder, J. N. et al. 1996; Gochee, P. A. et al. 2002).

U juvenilnoj HH (tip II) mutiran je gen za hemojuvelin (HJV) u podtipu A, a gen HAMP koji kodira za hepcidin u podtipu B, na prvom odnosno devetnaestom kromosomu, te je potencijal za razvoj teške kliničke slike viši nego u tipu I bolesti, a početak bolesti raniji (Cazzola, M. et al. 1998).

Uz TfR2 povezan oblik bolesti (tip III) karakterizira mutacija gena za transferinski receptor (TfR2) (Camaschella, C. et al. 2000).



Uz feroportin povezano preopterećenje željezom (tip IV) karakterizira mutacija gena SLC40A1 na drugom kromosomu koji kodira za protein feroportin.

### 1.3.2. Epidemiologija i etiologija

Neki autori smatraju HH najčešćom genskom bolešću u bjelačkoj populaciji. Mutacija C282Y čini se potiče od jednog Keltskog ili Vikinškog pretka sa sjeverozapada europskog kontinenta i stara je oko dvije tisuće godina te se do danas zadržala u populaciji.

Prevalencija bolesti iznosi oko 1:250 (Tavill, A. S. 2001). Učestalost homozigota za mutaciju C282Y među oboljelima iznosi od 52 do 100% u različitim studijama. Složenih heterozigota (C282Y/H63D) je u velikoj revijalnoj studiji učestalosti HFE mutacija među oboljelima bilo 5%, a 1,5% oboljelih bili su homozigoti za H63D mutaciju. U općoj populaciji učestalost C282Y/C282Y iznosi 0,4%. Heterozigotnost za C282Y mutaciju iznosi od 9,2% u Europljana do nule u Azijata, Indijaca i Afrikanaca dok je učestalost nositelja H63D mutacije u Europljana čak 2%. Procjenjuje se da će 40 do 70% osoba s C282Y/C282Y genotipom razviti klinički manifestnu bolest. (Hanson E.H. et al. 2001)

U istraživanju provedenom u Rijeci među oboljelima od HH bilo je 7,4% homozigota za C282Y mutaciju, 6,3% složenih heterozigota i 5,7% homozigota za H63D mutaciju. U samo 20% oboljelih bolest se mogla pripisati mutacijama gena što upućuje na složenost patogeneze preopterećenja željezom. (Milic, S. et al. 2011)

### 1.3.3. Patogeneza

U HH potrebe eritropoeze za željezom su u potpunosti zadovoljene, ali enterociti unatoč tome apsorbiraju nepotrebno željezo. Dva su modela koja objašnjavaju moguću patogenezu preopterećenja željezom u HH. Prvi model pripisuje povećanu intestinalnu apsorpciju željeza abnormalnoj interakciji TfR1 i mutiranog HFE u stanicama crijevnih kripti. Nije razjašnjeno je li povećanoj apsorpciji uzrok izmjenjen luminalni transport željeza ili alteracija u transportu kroz bazolateralne membrane stanica u krvotok. (Parkkila, S. et al. 1997) Genski profil metabolizma željeza u makrofagima se također čini važnim za patogenetsko shvaćanje bolesti. Ekspresija gena u makrofagima sukladna je stanjima manjka željeza u organizmu. (Cairo, G. et al. 1997) To navodi na zaključak da preopterećenje željezom nastaje ne samo zbog prekomjernog otpuštanja željeza iz enterocita, nego i iz makrofaga. Ovu tvrdnju još bolje objašnjava drugi predloženi patogenetski model bolesti, koji se temelji na ulozi hepcidina u metabolizmu željeza, a koji je doveo u sumnju prethodnu hipotezu (Ganz, T.

2003). Hipoteza o važnosti hepcidina u patogenetskom slijedu bolesti potvrđena je u tipu I i tipu II HH. Smatra se da točkasto mutirani HFE mijenja još nepoznate signale ili faktore za primjerenu sintezu i up-regulaciju hepcidina u hepatocitima što vodi nekontroliranom oslobađanju željeza iz duodenalnih enterocita i makrofaga (Bridle, K. R. et al. 2003). U juvenilnom tipu bolesti nema cirkulirajućeg hepcidina .

#### **1.3.4. Klinička slika i dijagnostika**

Povećane vrijednosti TIBC su najraniji biokemijski znak klasične HH, a odražava progredijentnu ekspanziju plazmatskog odjeljka željeza. Vrijednosti feritina su također povišene te vrijednosti iznad 1000 ng/ml mogu upućivati na cirozu jetre. Danas je trijas HH koji uključuje cirozu, dijabetes i brončano obojenje kože rijetkost zbog relativno ranog postavljanja dijagnoze. Pacijentima koji se jave liječniku zbog umora, artralgijske, hepatomegalije i povišenih jetrenih enzima trebalo bi napraviti biokemijske testove radi utvrđivanja saturacije transferina. Ukoliko testovi pokažu vrijednosti iznad 45% indicirana je prva linija genskog testiranja na C282Y i H63D mutacije. Ukoliko je riječ o homozigotu ili složenom heterozigotu postavlja se dijagnoza HH. Ukoliko je riječ o wt jedinki ili nosiocu mutacije potrebno je izmjeriti serumski feritin te se ovisno o vrijednostima feritina odlučuje hoće li se pacijentu jednom godišnje pratiti vrijednosti feritina ili će ga se uputiti na daljnje gensko testiranje u svrhu otkrivanja rijetkih mutacija gena TfR2, HAMP i HJV i eventualno, ovisno o rezultatima, na biopsiju jetre. Dijagnoza HH se može postaviti na temelju indikativnog nalaza biopsije jetre ili otkrivenih mutacija gena testiranih drugom linijom genskog testiranja. (Pietrangelo, A. 2000; Pietrangelo, A. 2004)

#### **1.3.5. Liječenje**

Simptomatskim pacijentima uglavnom je potrebna terapija flebotomijom. Flebotomija je mandatna kad serumski feritin premašuje 1000 ng/ml zbog rizika od ciroze jetre. To je najsigurnija, najefektnija i najekonomičnija terapija HH. Inicijalno se pacijentu uzima jedna do dvije jedinice krvi tjedno dok se vrijednost serumskog feritina ne spusti na ispod 50 ng/ml, a saturacija transferina na ispod 30%. Postizanje tih terapijskih ciljeva katkad traje nekoliko godina. Kasnije u tijeku bolesti obvezna je doživotna terapija održavanja kojom se razina feritina treba održavati na ispod 100 ng/ml, a saturacija transferina ispod 40%. Citroza, destruktivni artritis i inzulin-ovisni dijabetes nisu reverzibilni, ali se terapijom progresija tih komplikacija bolesti usporava. (Tavill, A. S. 2001)

#### 1.4. MDS i mutacije HFE gena

Provedeno je više istraživanja s ciljem utvrđivanja učestalosti mutacija u HFE genu u pacijenata koji boluju od MDS-a. Istraživanja su bila motivirana pretpostavkom da mutacije HFE gena pridonose patofiziologiji MDS-a, pogotovo preopterećenju željezom u sklopu bolesti. U studiji provedenoj u Budimpešti utvrđena statistički značajno povećana učestalost C282Y mutacija, kao i H63D mutacija u oboljelih od MDS-a. Ipak, učestalost nosioca neke od mutacija alela bila je 52%, u usporedbi s 31% u kontrolnoj skupini donora krvi, što je statistički signifikantna razlika.. (Varkonyi, J. et al. 2003) Druge grupe autora dokazale su povećanu učestalost mutacija HFE gena u podskupini oboljelih od RARS-a, ali ne i od MDS-a kao patološkog entiteta općenito. U Kanadi je provedena studija na oboljelima od RARS-a i dokazano je da su 21% bolesnika s dijagnozom heterozigoti za C282Y mutaciju što je signifikantno veća učestalost mutacija nego u kontrolnoj grupi u kojoj iznosi 10%. H63D genotip nije bio značajno učestaliji u pacijenata nego u kontroli. (Nearman, Z. P. et al. 2007) U znanstvenom radu provedenom na grčkim pacijentima s MDS-om nije nađena signifikantna povezanost između MDS-a i učestalosti mutacija u HFE genu, što je u skladu s epidemiološkim podacima koji govore kako se učestalost tih mutacija smanjuje geografski od sjevera prema jugu (Speletas, M. et al. 2003). Nadalje, u Kineza također nije nađena povećana učestalost navedenih mutacija u pacijenata koji boluju od MDS-a (Nie, L. et al. 2010). Razlika između HFE pozitivnih i HFE negativnih MDS pacijenata u razinama serumskog željeza i saturacije transferina nije bila statistički značajna u spomenutim radovima. Inicijalna razina serumskog željeza u grupi mađarskih pacijenata s mutacijom u HFE genu iznosila je 26,8  $\mu\text{mol/l}$ , odnosno 19,77  $\mu\text{mol/l}$  u pacijenata bez mutacija. Saturacija transferina u pacijenata s mutiranim genom iznosila je 50,93%, a u pacijenata s divljim tipom gena 39,99%. Preopterećenje željezom, koje je u navedenom radu definirano kao razina serumskog željeza iznad 26,9  $\mu\text{mol/l}$ , se u pacijenata s mutiranim HFE genom javlja nakon manjeg broja primljenih transfuzija (11,67) u terapiji bolesti, nego kod pacijenata bez mutacija (31,57) i ovaj rezultat bio je statistički značajan. (Varkonyi, J. et al. 2003) Niti u kanadskoj populaciji pacijenata s MDS-om nije nađena signifikantna razlika u razinama serumskog feritina, željeza i saturacije transferina između pacijenata s mutacijom i divljim tipom gena (Nearman, Z. P. et al. 2007). Nadalje, niti studija provedena u Kini, niti ona provedena u Grčkoj nisu pokazale statistički signifikantnu povezanost između spomenutih parametara željeza uspoređujući dvije grupe pacijenata s MDS-om (Speletas, M. et al. 2003; Nie, L. et al. 2010). Sindrom preopterećenja željezom se neizbježno razvija u pacijenata s MDS-om zbog intrinzičkih karakteristika bolesti i rastuće potrebe za terapijom transfuzijama krvi. Tom začaranom krugu bi mogle doprinositi i istraživane mutacije. (Varkonyi, J. et al.

2003) Do sada nije istraženo kako mutacije u HFE genu utječu na preživljenje i prognozu oboljelih od MDS-a.

## **2. Hipoteza**

Ovaj rad počiva na dvije hipoteze.

Prva hipoteza je da oboljeli od MDS-a u populaciji hrvatskih pacijenata, imaju višu učestalost HFE mutacija u usporedbi s dobrovoljnim darivateljima krvi.

Druga hipoteza je da oboljeli od MDS-a koji nose mutaciju u HFE genu imaju lošije ukupno preživljenje u odnosu na oboljele bez mutacija u HFE genu.

### 3. Ciljevi rada

Opći cilj rada bio je analizirati populaciju oboljelih od MDS dijagnosticiranih u KB Dubrava na mutacije u HFE genu i utvrditi kako mutacijski status gena utječe na metabolizam željeza i preživljenje oboljelih.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. utvrditi ukupno preživljenje (OS) među pacijentima s divljim tipom (wt) gena i onima s mutacijom u HFE genu
2. utvrditi imaju li mutacije u HFE genu nepovoljan učinak na vrijeme preživljenja bez progresije u AML (LFS, prema engl. leukemia free survival i TTL, prema engl. time to leukemia)
3. istražiti postoji li razlika u parametrima željeza (serumsko željezo, TIBC, saturacija transferina i feritin) između mutirane i wt grupe bolesnika

## 4. Ispitanici i metode rada

U ovo istraživanje bila je uključena kohorta od 37 bolesnika s dijagnozom MDS-a u razdoblju od 2008. do 2014. godine, od kojih je 57% bilo muškog spola, a 43% ženskog spola. Medijan dobi pri dijagnozi iznosio je 74 godine. Kriterij za uključivanje u istraživanje bila je postavljena dijagnoza MDS-a prema smjernicama SZO-a iz 2008. godine (Vardiman, J. W. et al. 2009). Svi bolesnici bili su liječeni u Kliničkoj bolnici Dubrava, u Zagrebu.

Od molekularnih metoda korištene su izolacija DNA i lančana reakcija polimeraze (PCR) na uzorcima periferne krvi bolesnika.

Genomska DNA izolirana je koristeći QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) prema uputama koje je priložio proizvođač.

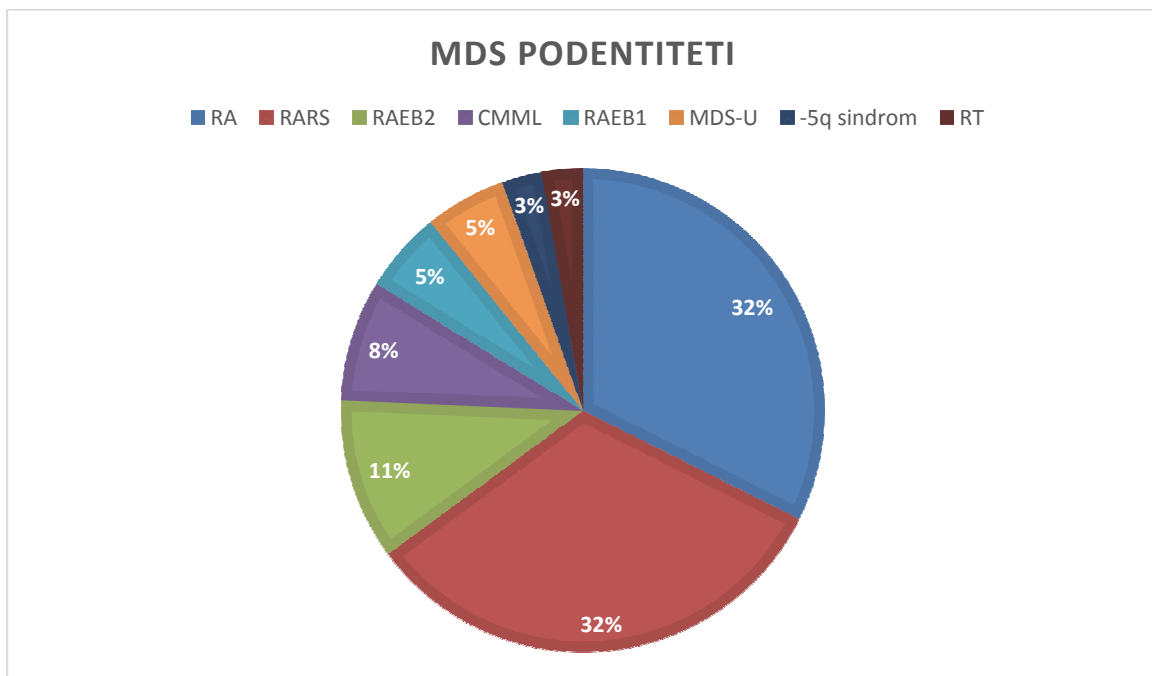
Za detekciju C282Y i H63A mutacija na uzorcima DNA ispitanika koristili smo RFLP-PCR. Ta metoda koristi oligonukleotide za umnažanje mutiranog dijela gena HFE. Restriksijske endonukleaze Rsa1 i Mbo1 cijepaju DNA u fragmente određene molekularne mase, ovisno koja mutacija je prisutna ili se pak radi o divljem tipu gena, s obzirom da zamjenom nukleotida u sklopu točkastih mutacija dolazi do promjene reznog mjesta za te enzime. Razdvajanje fragmenata vrši se elektroforezom na 3,5 %-tnom agaroznom gelu kroz 30 minuta, na naponu od 120V.

Nalaz dobiven RFLP-PCR-om tumačimo uzevši u obzir broj fragmenata i genotip. Pri testiranju na C282Y mutaciju, divlji tip gena ima dva fragmenta (248 pb (parova baza) i 142 pb), mutirani homozigot tri fragmenta (248 pb, 113 pb i 29 pb), a mutirani heterozigot četiri fragmenta ( 248 pb, 142 pb, 113 pb, 29 pb).

Pri testiranju na H63D mutaciju, nalaz upućuje na divlji tip ukoliko postoje tri fragmenta (138 pb, 99 pb i 57 pb), dok mutirani homozigot ima dva fragmenta (237 pb i 57 pb), a mutirani heterozigot četiri fragmenta (237 pb, 138 pb, 99 pb i 57 pb).

## 5. Rezultati

Od ukupno 37 bolesnika s MDS-om, dijagnosticiranih putem hematološke dnevne bolnice KB Dubrava od 2008. godine nadalje, prema podentitetima MDS-a njih 12 (32%) je imalo dijagnozu RA, 12 (32%) RARS, 6 (16%) RAEB; od kojih su 2 pacijenta imala dijagnozu RAEB1, a 4 RAEB2; te 3 (8%) CMML koja unutar novije klasifikacije hematoloških neoplazmi pripada u skupinu s obilježjima mijelodisplazije i mijeloproliferacije. MDS-U je bio dijagnosticiran u 2 (5%) pacijenta te u jednog pacijenta -5q sindrom i u jednog pacijenta RT. Bolesnici koji su se pri dijagnozi prezentirali kao akutna leukemija sa znakovima displazije (ukupno 6 bolesnika) isključeni su iz analize jer ovaj entitet ne predstavlja nužno evoluciju MDS-a.



Slika 1. Zastupljenost MDS podentiteta u grupi ispitanika

Analizom oboljelih od MDS-a utvrdili smo kako u 4 od 37 bolesnika, odnosno 10,81%, postoji točkasta mutacija C282Y HFE gena. Jedan je pacijent bio homozigot za C282Y mutaciju, a ostali heterozigotni nosioci. Također smo utvrdili kako su 11 od 37 oboljelih, odnosno 29,37%, heterozigotni nosioci za točkastu mutaciju H63D HFE gena. Jedna bolesnica bila je složeni heterozigot i nositeljica obje mutacije.

Zanimljivo je reći kako je u 4 od 6, odnosno u 66% isključenih bolesnika s novootkrivenom AML uz znakove displazije, pronađen mutirani status HFE gena (1 heterozigot za C282Y i 3 heterozigota za H63D).

Prevalencija HFE mutacija u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi u Hrvatskoj iznosi 6,5%



za C282Y mutaciju, 26,6% za H63D mutaciju te 32% za bilo koju od tih dviju mutacija (Milic, S. et al. 2011). Iako su postotci mutacija u našoj grupi oboljelih od MDS-a viši nego u zdravoj populaciji, nismo dokazali statistički značajnu razliku u udjelu mutacija niti u jednoj grupi.

Tablica 1. Učestalost mutacija HFE gena

	<b>MDS pacijenti</b>	<b>Darivatelji krvi</b>	<b>p (Chi Sq ili Fisher test)</b>
<b>C282Y</b>	4/37 (10,81%)	13/200 (6,5%)	0,314
<b>H63D</b>	11/37 (29,73%)	53/200 (26,5%)	0,684
<b>Kombinirano</b>	14/37 (37,84%)	64/200 (32%)	0,488

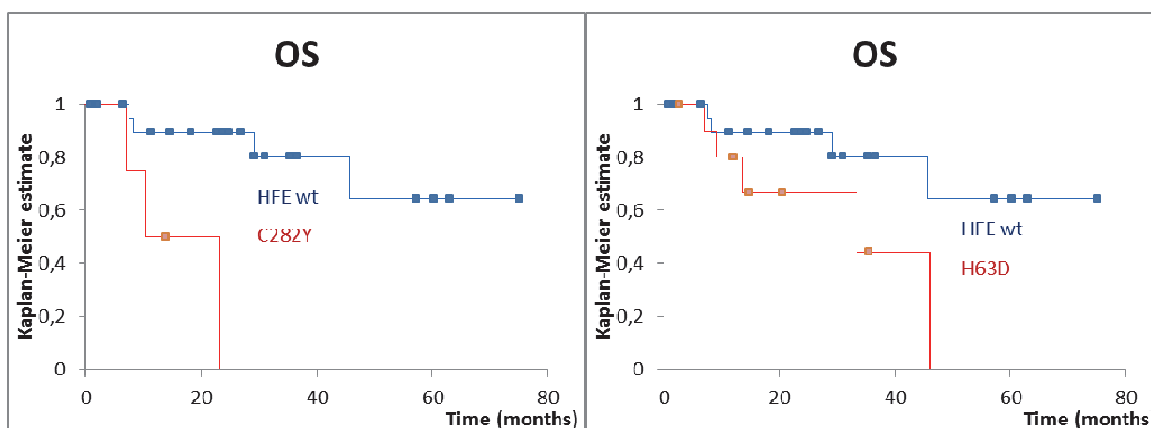
U usporedbi mutirane i nemutirane skupine oboljelih za svaku mutaciju pojedinačno, kao i kombinirano, nije nađeno statistički značajne razlike u dobi dijagnoze, spolu, učestalosti akutne leukemije, učestalosti druge maligne bolesti u anamnezi, učestalosti ovisnosti o transfuziji kao i učestalosti povišenih vrijednosti feritina iznad 1000 µg/l, što znači da su u obje uspoređivane grupe u sva tri slučaja analizirana i gore navedena svojstva bila podjednako zastupljena. Pokazalo se da pacijenti s H63D mutacijom imaju statistički veću učestalost progresije u AML (p=0,07).

Od parametara željeza, važnih u patogenezi MDS-a, analizirali smo feritin, serumsko željezo, TIBC i saturaciju transferina željezom između mutiranih i nemutiranih grupa bolesnika. Utvrdili smo povišene vrijednosti serumskog željeza, saturacije transferina željezom i feritina te smanjene vrijednosti TIBC-a u bolesnika s mutacijom u HFE genu u usporedbi s bolesnicima s divljim tipom gena. Ipak, statistički značajna razlika pronađena je jedino za vrijednosti TIBC-a u bolesnika s H63D mutacijom gena (medijan 39,45 vs. 50,25, p=0,028). Među pacijenatima koji u tijeku bolesti nisu razvili ovisnost o transfuzijskom liječenju, a nositelji su H63D mutacije u HFE genu, dokazali smo statistički značajnu razliku u vrijednostima feritina u usporedbi s grupom netransfudiranih pacijenata bez mutacije (medijan 947,5 vs. 378, p=0,021). U našoj kohorti samo jedan pacijent s C282Y mutacijom nije bio ovisan o transfuzijama pa stoga nismo mogli analizirati razine feritina u grupi netransfudiranih pacijenata s tom mutacijom. U grupi pacijenata ovisnih o transfuzijama nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku u parametrima metabolizma željeza uspoređujući pacijente mutiranog gena s onima bez mutacija. Ipak, primjećena je granično značajna razlika u saturaciji transferina željezom između pacijenata s C282Y mutacijom i pacijenata bez mutacije (medijan 89% vs. 54%, p=0,063). Medijani vrijednosti feritina su bili gotovo jednaki u sve tri grupe pacijenata.

Tablica 2. Parametri željeza u pacijenata s mutacijama i divljim tipom gena

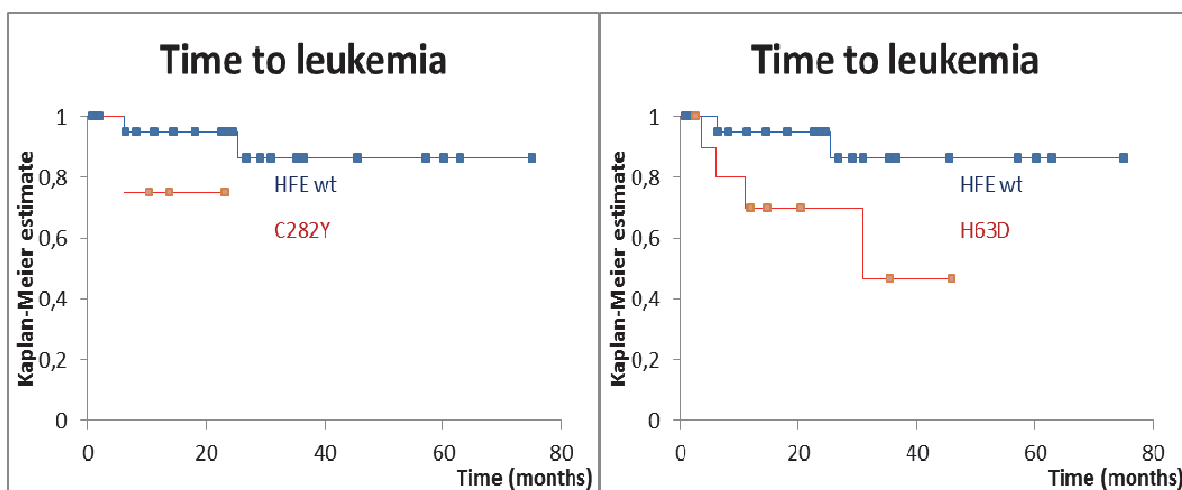
	<b>Divlji tip (23/37)</b>	<b>C282Y (4/37)</b>	<b>H63D (11/37)</b>
<b>Feritin</b>	561,5	963,5 (p=0,831)	1005 (p=0,128)
<b>Feritin u netransfudranih</b>	378	/	947,5 ( <b>p=0,021</b> )
<b>Feritin u ovisnih o transfuzijama</b>	1148,5	1120 (p=0,735)	1113 (p=0,713)
<b>TIBC</b>	50,25	40,3 (p=0,245)	39,45 ( <b>p=0,028</b> )
<b>Saturacija transferina u ovisnih o transfuzijama</b>	54%	89% ( <b>p=0,063</b> )	54% (p=0,806)

Analizirali smo učinak HFE mutacijskog statusa na ukupno preživljenje pacijenata (OS, prema engl. overall survival). Pronašli smo statistički značajnu razliku u ukupnom preživljenju uspoređujući pacijente s C282Y mutacijom i one bez mutacija (p=0,002, HR 7,03) i granično značajnu razliku u preživljenju u pacijenata s H63D mutacijom (p=0,06, HR 3,22). Medijan preživljenja iznosio je 46,07 mjeseci za cijelu grupu ispitivanih pacijenata, dok je u podgrupi s C282Y mutacijom u HFE genu iznosio 12,7 mjeseci, a u podgrupi s H63D mutacijom 33,43 mjeseca. Naši podaci podržavaju hipotezu kako je ukupno preživljenje lošije u grupi s mutiranim statusom HFE gena.



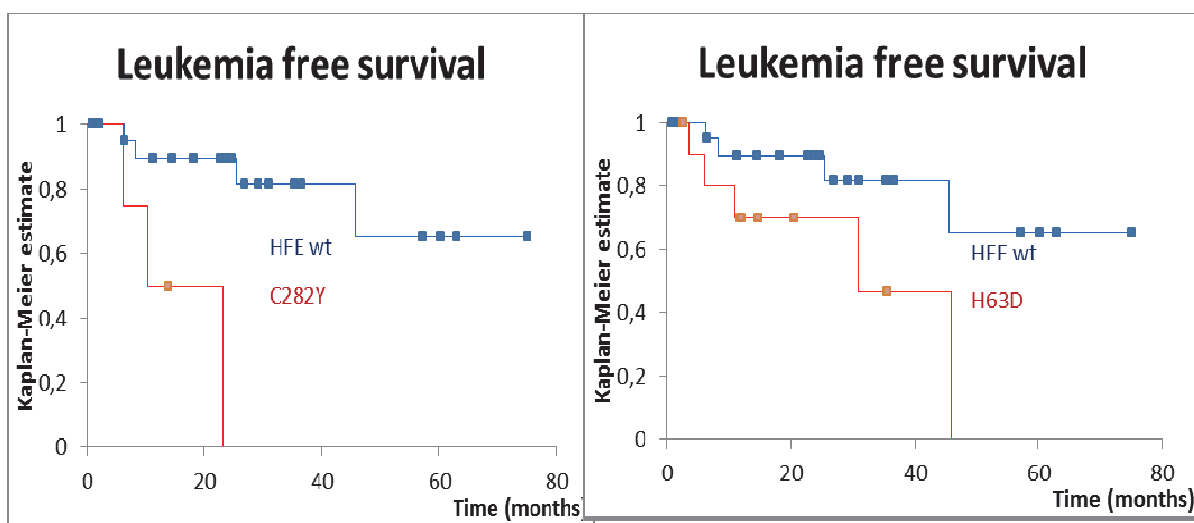
Slika 2. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog preživljenja u pacijenata s HFE mutacijama

Također smo istražili kako mutacije u HFE genu utječu na vrijeme do progresije bolesti u leukemiju (TTL, prema engl. time to leukemia) te na duljinu perioda bolesti bez leukemije (LFS, leukemia free survival). Efekt H63D mutacije na TTL bio je statistički značajan ( $p=0,041$ , HR 4,91), dok za C282Y mutacija nije utvrđen takav efekt.



Slika 3. Kaplan-Meierova krivulja time-to-leukemia u pacijenata s HFE mutacijama

Primjetili smo i statistički značajan utjecaj H63D mutacije ( $p=0,049$ , HR 3,41), kao i C282Y mutacije ( $p=0,002$  HR 7,18), na LFS.



Slika 4. Kaplan-Meierova krivulja leukemia-free-survival u pacijenata s HFE mutacijama

## 6. Rasprava

Rezultati rada pokazali su kako nema statistički značajne razlike u učestalosti mutacija u HFE genu između oboljelih od MDS-a i zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi koje smo koristili kao kontrolnu skupinu. Taj nalaz je u skladu s rezultatima radova stranih autora koji su također pokazali kako su mutacije HFE gena podjednako učestale u oboljelih od MDS-a i u zdravoj populaciji. Za razliku od autora iz Kanade (Nearman, Z. P. et al. 2007), nismo primijetili povećanu učestalost HFE mutacija u oboljelih od RARS podentiteta, ali smo primijetili da tri od triju pacijenata oboljelih od CMML-a nose mutaciju u HFE genu. Takvi nalazi mogu biti posljedica malog uzorka ispitanika. Različitost rezultata u proučavanju HFE mutacija u sklopu MDS-a mogla je proizaći iz različite geografske distribucije tih mutacija, ali ne treba zanemariti niti utjecaj razlika u kliničkoj obradi i/ili upućivanju pacijenata s MDS-om u veće i opremljenije bolničke centre. Kao što ovaj rad i pokazuje, pacijenti s mutacijama u proučavanom genu imaju više izgleda za lošiji ishod bolesti te se češće upućuju u veće zdravstvene institucije i nad njima se provodi više dijagnostičkih pretraga, pa im se češće i određuje status mutiranosti gena HFE. Referentne grupe autora (Speletas, M. et al. 2003; Varkonyi, J. et al. 2003; Nearman, Z. P. et al. 2007; Nie, L. et al. 2010) uključivale su pacijente s MDS-om u fazi transformacije u svoje analize, dok je u ovom radu šestero pacijenata s AML-om i znakovima mijelodisplazije isključeno iz istraživanja.

Status mutiranosti HFE gena dokazano utječe na metabolizam željeza. Učinak je najizraženiji uz visokorizične kombinacije mutacija (C282Y/C282Y i C282Y/H63D). Ovo istraživanje pokazalo je da, kao što se može pretpostaviti, i heterozigoti za neku od navedenih mutacija imaju poremećen metabolizam željeza u sklopu bolesti MDS-a; H63D mutacija signifikantno utječe na vrijednosti TIBC-a ( $p=0,028$ ), a u podgrupi netransfudiranih pacijenata čini se da utječe na povišenje razine feritina ( $p=0,021$ ). Mutacija H63D ili neki vezani gen pridonosi intrinzičnoj patofiziološkoj pojavi akumuliranja željeza u sklopu MDS-a, što se ne događa u zdravih pojedinaca (Jackson, H. A. et al. 2001; Raddatz, D. et al. 2003). Iako to u radu nismo dokazali, za pretpostaviti je da bi isti efekt mogla imati i C282Y mutacija. Većina pacijenata ovisnih o terapiji transfuzijama razvije preopterećenje željezom zbog same terapije te nismo primijetili signifikantnu razliku u razinama feritina između pacijenata s mutiranim, odnosno divljim tipom gena, što je u skladu s prethodnim istraživanjima.

Najistaknutiji rezultat ovog rada je učinak mutacije u HFE genu na OS, TTL i LFS. Mutacija C282Y ima izražen učinak na OS ( $p=0,002$ ), dok je učinak mutacije H63D granično signifikantan ( $p=0,062$ ), ali jasno uočljiv na krivulji preživljenja. Na skraćenje TTL-a utjecaj je prema našim podacima dokazan samo za mutaciju H63D ( $p=0,041$ ), a za obje mutacije

dokazan je učinak na LFS u pacijenata ( $p=0,002$  za C282Y,  $p=0,049$  za H63D). Posljednje je vjerojatno rezultat prije navedenih učinaka na ukupno preživljenje i vrijeme do leukemije. Uzevši u razmatranje prije istraživane i dokumentirane prognostičke faktore MDS-a, poput ovisnosti o transfuzijama i vrijednosti feritina iznad  $1000\mu\text{g/l}$ , obradili smo podatke istraživanja koristeći Coxovu regresiju i pritom testirali četiri varijable: postojanje C282Y i/ili H63D mutacije u HFE genu, ovinost o transfuzijskom liječenju te feritin iznad  $1000\mu\text{g/l}$ . Postojanje C282Y mutacije ( $p=0,01$ ) i feritin iznad  $1000\mu\text{g/l}$  ( $p=0,026$ ) prepoznali smo kao nezavisne prognostičke faktore.

Prepoznat je učinak mutacija HFE gena na preživljenje oboljelih od MDS-a, što je vjerojatno posredovano promjenom u metabolizmu željeza koji je u bolesti čija se terapija velikim dijelom temelji na transfuzijama krvi ionako poremećen, u smislu preopterećenja organizma željezom. Navedeno također može voditi povećanom stvaranju slobodnih radikala istoga oštećenju stanica i tkiva, a dovodi se i u vezu s onkogenim potencijalom (Andrikovics, H. et al. 2009). Postavlja se pitanje treba li svakog pacijenta oboljelog od MDS-a genetski testirati na mutacije HFE gena i treba li u pacijenata s mutiranim genom uvesti terapiju kelatorima željeza pri razinama feritina nižim nego navedenim u dosadašnjim smjernicama, odnosno prije razvoja preopterećenja željezom.

## 7. Zaključci

1. Postotci mutacija u našoj grupi oboljelih od MDS-a viši su nego u zdravoj kontrolnoj populaciji darivatelja krvi, no ipak nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku u udjelu mutacija.
2. Pacijenti s H63D mutacijom imaju niže vrijednosti TIBC-a.
3. Netransfudirani pacijenti s H63D mutacijom imaju značajno više vrijednosti feritina nego oni s divljim tipom gena.
4. Pacijenti s C282Y mutacijom imaju lošije ukupno preživljenje, a pacijenti s H63D mutacijom granično lošije ukupno preživljenje u usporedbi s pacijentima bez mutacija.
5. Obje istraživane mutacije HFE gena nepovoljno utječu na trajanje preživljenja bez leukemije, a mutacija H63D ima nepovoljan utjecaj i na vrijeme do leukemije.

## 8. Zahvale

Hvala mom mentoru prof.dr.sc. Rajku Kušecu, dr.med. na višegodišnjem poučavanju, otvorenosti i strpljenju. Zahvalna sam što sam od prvog susreta s klinikom do završetka fakulteta imala tako dobrog mentora i profesora.

Hvala Marku Lucijaniću, dr.med. na utrošenom vremenu, trudu i velikoj pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i članovima komisije za ocjenu diplomskog rada, prof.dr.sc. Jasenki Markeljević, dr.med. i prof.dr.sc. Vlatku Pejši, dr.med.

Hvala Zoranu na strpljenju i veselju.

Zahvaljujem Ivi na prijateljstvu, motivaciji, savjetima i zaigranosti dok smo pisali svoje znanstvene radove.

Hvala mojim roditeljima na iskrenoj podršci, usmjeravanju i odricanju.

## 9. Literatura

1. Andrikovics H, Meggyesi N, Szilvasi A, Tamaska J, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kalasz L, Masszi T, Tordai A (2009) HFE C282Y Mutation as a Genetic Modifier Influencing Disease Susceptibility for Chronic Myeloproliferative Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:929-934.
2. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P (2009) Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* 1790:589-599.
3. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S (2007) A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematol-Hematol J* 92:744-752.
4. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DHG, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, Ramm GA (2003) Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 361:669-673.
5. Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom-Lindberg E (2008) Myelodysplastic syndromes. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Ur.) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th edition. Lyon: IARC, str. 85-103.
6. Cairo G, Recalcati S, Montosi G, Castrusini E, Conte D, Pietrangelo A (1997) Inappropriately high iron regulatory protein activity in monocytes of patients with genetic hemochromatosis. *Blood* 89:2546-2553.
7. Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genet* 25:14-15.
8. Cazzola M, Cerani P, Rovati A, Iannone A, Claudiani G, Bergamaschi G (1998) Juvenile genetic hemochromatosis is clinically and genetically distinct from the classical HLA-r Related disorder. *Blood* 92:2979-2981.



9. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L (2013) The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* 122:4021-4034.
10. Chang CK, Storer BE, Scott BL, Bryant EM, Shulman HM, Flowers ME, Sandmaier BM, Witherspoon RP, Nash RA, Sanders JE, Bedalov A, Hansen JA, Clurman BE, Storb R, Appelbaum FR, Deeg HJ (2007) Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome: similar outcomes in patients with de novo disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic disorders. *Blood* 110:1379-1387.
11. Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, Lacombe C, Dreyfus F, Mayeux P, Fontenay-Roupie M (2002) In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood* 99:1594-1601.
12. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lecluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA (2009) Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N Engl J Med* 360:2289-2301.
13. Della Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, Rosti V, Bonetti E, Travaglino E, Boveri E, Galli A, Boggi S, Ciccone M, Pramparo T, Mazzini G, Invernizzi R, Lazzarino M, Cazzola M (2008) Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 22:530-537.
14. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR (2008) Identification of RPS14 as a 5q(-) syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451:335-U337.
15. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet* 13:399-408.
16. Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genet* 16:383-386.

17. Ganz T (2003) Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102:783-788.
18. Gattermann N, Rachmilewitz EA (2011) Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications. *Ann Hematol* 90:1-10.
19. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D (2009) Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 145:788-800.
20. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK (2002) A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 122:646-651.
21. Greenberg PL, Sun ZX, Miller KB, Bennett JM, Tallman MS, Dewald G, Paietta E, van der Jagt R, Houston J, Thomas ML, Cella D, Rowe JM (2009) Treatment of myelodysplastic syndrome patients with erythropoietin with or without granulocyte colony-stimulating factor: results of a prospective randomized phase 3 trial by the Eastern Cooperative Oncology Group (E1996). *Blood* 114:2393-2400.
22. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SMM, Miyazaki Y, Pfeilstocker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D (2012) Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 120:2454-2465.
23. Hanson E.H., Imperatore G., W. B (2001) HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 154:193-206.
24. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C (2010) Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 142:24-38.
25. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M (2001) HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *British journal of haematology* 114:474-484.

26. Janssen JWG, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, Vandenberghe H, Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, Mufti GJ, Bartram CR (1989) CLONAL ANALYSIS OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES - EVIDENCE OF MULTIPOTENT STEM-CELL ORIGIN. *Blood* 73:248-254.
27. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Sauntharajah Y, Maciejewski JP (2009) Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 113:1315-1325.
28. Kakhlon O, Cabantchik ZI (2002) The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 33:1037-1046.
29. Kantarjian H, Issa JPJ, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R, Shen LL, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes - Results of a Phase III randomized study. *Cancer* 106:1794-1803.
30. Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK (2009) Chronic expression of H-ferritin in dopaminergic midbrain neurons results in an age-related expansion of the labile iron pool and subsequent neurodegeneration: implications for Parkinson's disease. *Brain Res* 1297:17-22.
31. Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319:825-828.
32. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC (1999) Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature Genet* 21:396-399.
33. Malcovati L (2007) Impact of transfusion dependency and secondary iron overload on the survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 31:S2-S6.
34. Mehrotra B, George TI, Kavanau K, Avetloiseau H, Moore D, Willman CL, Slovak ML, Atwater S, Head DR, Pallavicini MG (1995) CYTOGENETICALLY ABERRANT CELLS IN THE STEM-CELL COMPARTMENT (CD34(+)/LIN(-)) IN ACUTE MYELOID-LEUKEMIA. *Blood* 86:1139-1147.

35. Milic S, Ristic S, Starcevic-Cizmarevic N, Brajenovic-Milic B, Crnic-Martinovic M, Kapovic M, Peterlin B, Stimac D (2011) Low frequency of HFE gene mutations in Croatian patients suspected of having hereditary hemochromatosis. *Med Sci Monitor* 17:CR552-CR556.
36. Nearman ZP, Szpurka H, Sub B, Warshawksy I, Theil K, Lichtin A, Sekeres MA, Maciejewski JP (2007) Hemochromatosis-associated gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes with refractory anemia with ringed sideroblasts. *Am J Hematol* 82:1076-1079.
37. Negrin RS, Haeuber DH, Nagler A, Olds LC, Donlon T, Souza LM, Greenberg PL (1989) TREATMENT OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES WITH RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR - A PHASE I-II TRIAL. *Ann Intern Med* 110:976-984.
38. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T (2003) Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101:2461-2463.
39. Nie L, Li L, Yang L, Zhang Y, Xiao ZJ (2010) HFE genotype and iron metabolism in Chinese patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia. *Ann Hematol* 89:1249-1253.
40. Nisse C, Lorthois C, Dorp V, Eloy E, Haguenoer JM, Fenaux P (1995) EXPOSURE TO OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL-FACTORS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES - PRELIMINARY-RESULTS OF A CASE-CONTROL STUDY. *Leukemia* 9:693-699.
41. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genet* 37:1264-1269.
42. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, Bacon BR, Sly WS (1997) Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2534-2539.
43. Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, Cattan H, Christensson B, Emanuelsson EK, Merup M, Nilsson L, Samuelsson J, Sander B, Wainscoat JS, Boulwood J, Helstrom-

Lindberg E (2007) Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q-syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11406-11411.

44. Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U (2002) The chelatable iron pool in living cells: A methodically defined quantity. *Biol Chem* 383:489-502.

45. Pietrangelo A (2000) EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 33:485-486.

46. Pietrangelo A (2004) Medical progress - Hereditary hemochromatosis - A new look at an old disease. *N Engl J Med* 350:2383-2397.

47. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR (1998) Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35:35-54.

48. Raddatz D, Legler T, Lynen R, Addicks N, Ramadori G (2003) HFE genotype and parameters of iron metabolism in German first-time blood donors - evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 41:1069-1076.

49. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF (2008) Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 112:45-52.

50. Saarni MI, Linman JW (1973) PRELEUKEMIA - HEMATOLOGIC SYNDROME PRECEDING ACUTE LEUKEMIA. *Am J Med* 55:38-48.

51. Sawada K, Sato N, Tarumi T, Sakai N, Koizumi K, Sakurama S, Ieko M, Yasukouchi T, Koyanagawa Y, Yamaguchi M, Ohmoto A, Kohno M, Koike T (1993) PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF MYELOYDYSPLASTIC CD34+ CELLS IN SERUM-FREE MEDIUM - RESPONSE TO INDIVIDUAL COLONY-STIMULATING FACTORS. *Br J Haematol* 83:349-358.

52. Schumann K, Elsenhans B, Ehtechami C, Forth W (1990) RAT INTESTINAL IRON TRANSFER CAPACITY AND THE LONGITUDINAL DISTRIBUTION OF ITS ADAPTATION TO IRON-DEFICIENCY. *Digestion* 46:35-45.

53. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122:789-801.
54. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20:2429-2440.
55. Speletas M, Kioumi A, Mandala E, Katodritou E, Papaioannou G, Ritis K, Korantzis I (2003) Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greek patients with myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol* 110:53-54.
56. Tanno T, Noel P, Miller JL (2010) Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 17:184-190.
57. Tavill AS (2001) Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology* 33:1321-1328.
58. Valent P, Krieger O, Stauder R, Wimazal F, Nosslinger T, Sperr WR, Sill H, Bettelheim P, Pfeilstocker M (2008) Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) - diagnosis, management, and response criteria: a proposal of the Austrian MDS platform. *Eur J Clin Invest* 38:143-149.
59. Vandenbe.H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G (1974) DISTINCT HEMATOLOGICAL DISORDER WITH DELETION OF LONG ARM OF NO 5 CHROMOSOME. *Nature* 251:437-438.
60. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937-951.
61. Varkonyi J, Tarkovacs G, Karadi I, Andrikovicsc H, Varga F, Varga F, Demeter J, Tordai A (2003) High incidence of hemochromatosis gene mutations in the myelodysplastic syndrome: The Budapest study on 50 patients. *Acta Haematol* 109:64-67.

62. Visser O, Trama A, Maynadie M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, Mallone S, Tereanu C, Allemani C, Ricardi U, Schouten HC, Grp RW (2012) Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer* 48:3257-3266.
63. Yeh KY, Yeh M, Mims L, Glass J (2009) Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *Am J Physiol-Gastroint Liver Physiol* 296:G55-G65.

## 10. Životopis

Rođena je u Sisku 1988. godine, gdje je završila opću gimnaziju. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala je na više državnih natjecanja iz kemije, biologije i hrvatskog jezika. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2007. godine. Studentskim znanstvenim radom bavila se na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i pri Jedinici za molekularnu dijagnostiku i genetiku Kliničke bolnice Dubrava. Autorica je više studentskih znanstvenih članaka te je prisustvovala kao aktivna sudionica ili organizatorica na više studentskih i biomedicinskih kongresa u Hrvatskoj i inozemstvu (ICUR Split 2008., CROSS Zagreb 2008.-2013., TDK Pečuh 2010., Štamparovi dani, Požega 2009.). Dvije akademske godine radi kao demonstratorica iz Kliničke propedeutike na Klinici za unutarnje bolesti, Zavod za pulmologiju i Zavod za hematologiju, Kliničke bolnice Dubrava. Pisala je za časopis studenata Medicinskog fakulteta u Zagrebu „Medicinar“. Polaznica je i kasnije suradnica Ljetne škole znanosti (Summer School of Science, S3), Višnjan, Hrvatska. Od stranih jezika koristi se engleskim (razina C) i njemačkim (razina B) jezikom.