

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Sledování parametrů krevního obrazu při terapii pacientů
s myelodysplastickým syndromem**

Bakalářská práce

2016

Lenka Sochorová

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“

Datum:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Iloně Fátorové. Zároveň bych také ráda poděkovala své konzultantce paní Mgr. Ivaně Malíkové. Velké poděkování také patří vážené paní MUDr. Anně Jonášové a vážené paní Doc. MUDr. Radaně Neuwirtové, které celý život věnovali výzkumu a léčbě MDS. Dále také děkuji svým kolegům a kolegyním. Největší poděkování si zaslouží můj manžel a rodiče, kteří mi pomáhali a podporovali mě po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Krevní obraz patří mezi základní vyšetření v hematologické laboratoři. Slouží ke zjištění základních parametrů leukocytů, erytrocytů, hemoglobinu, hematokritu a trombocytů.

Cílem práce bylo zjistit, které hodnoty krevního obrazu se změnilo při léčbě pacientů s myelodysplastickým syndromem při imunomodulační terapii Lenalidomidem.

Stanovení krevních obrazů bylo provedeno na přístroji Sysmex XE-5000. U pacientů jsme posuzovali parametry krevního obrazu v určitém časovém úseku před podáním léčby a následně v pravidelných intervalech po podání léčby. Z naměřených hodnot jsme zjistili, že po podání léku výrazně stoupají hodnoty hemoglobinu a klesají hodnoty trombocytů, ostatní parametry krevního obrazu se výrazně nemění. Tyto změny v krevním obrazu by se mohly u pacientů využívat k posouzení účinnosti podávané léčby a mohly by vést k ukončení terapie transfúzí.

Abstract

Blood counts belongs among basic examination methods in hematology laboratory. It is used to determine the basic parameters of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and platelets.

The goal of study was to determine which blood counts have changed during the treatment of patients with myelodysplastic syndrome using immunomodulatory drug lenalidomide.

Analysis of blood samples were performed on the Sysmex XE-5000. The selected blood counts parameters were evaluated in two periods – before the beginning of the treatment and during the treatment. The final blood counts showed increasing concentrations of hemoglobin and decreasing platelet values; other blood count parameters have not changed significantly. The evaluated blood counts changes could be used to determine the efficiency of the treatment and the transfusion therapy could be stopped based on these results.

Zkratky

Zkratka	Význam
AML	Akutní myeloidní leukémie
CMML	Chronická myelomonocytární leukémie
CRBN	Cereblon – Protein
EPO	Erytropoetin
FAB	French-American-British
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
HCT	Hematokrit
HGB	Hemoglobin
IPSS	International prognostic scoring systém
K ₂ EDTA	Draselná sůl EDTA
K ₃ EDTA	Draselná sůl EDTA
KD	Kostní dřev
MCV	Mean Cell Volume – Střední objem erytrocytu
MDS	Myelodysplastický syndrom
MDS-U	Myelodysplastický syndrom – neklasifikovaný
MCH	Střední množství Hb v erytrocytu
MCHC	Střední koncentrace Hb v erytrocytech
MLL gen	Mixed Lineage Leukemia gen
PK	Periferní krev
PLT	Platelets - Trombocyty
RA	Refrakterní anemie
RAEB	Refrakterní anemie s excesem blastů
RAEB-T	Refrakterní anemie s excesem blastů v transformaci
RARS	Refrakterní anemie s prstenčitými sideroblasty (ring sideroblast)
RBC	Red Blood Cells – Červené krvinky
RCMD	Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách
RCMD-RS	Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách s prstenčitými sideroblasty
ÚLBDL	Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
VFN Praha	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
WBC	White Blood Cells – Bílé krvinky
WHO	The World Health Organization - Světová zdravotnická organizace

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Zadání bakalářské práce - Cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1 Rozdělení MDS podle FAB.....	10
3.1.1 Refrakterní anemie (RA).....	10
3.1.2 Refrakterní anemie se sideroblasty (RAS).....	10
3.1.3 Refrakterní anemie s excesem blastů (RAEB).....	10
3.1.4 Refrakterní anemie s excesem blastů v transformaci (RAEB-T).....	10
3.1.5 Chronická myelomonocytární leukémie (CMML).....	10
3.2 Rozdělení podle WHO klasifikace.....	11
3.2.1 Refrakterní anemie (RA).....	11
3.2.2 Refrakterní anemie s prstenčitými sideroblasty (RARS).....	11
3.2.3 Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách (RCMD).....	11
3.2.4 Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách s prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS).....	11
3.2.5 Refrakterní anemie s excesem blastů-1 (RAEB-1).....	11
3.2.6 Refrakterní anemie excesem blastů-2 (RAEB-2).....	12
3.2.7 MDS neklasifikovatelný (MDS-U).....	12
3.2.8 MDS s izolovanou delecí 5q- (5q- syndrom).....	12
3.3 Rozdělení MDS podle etiologie.....	12
3.3.1 Primární MDS.....	12
3.3.2 Sekundární MDS.....	12
3.4 Diagnostika MDS.....	13
3.4.1 Klinická diagnostika.....	13
3.4.2 Laboratorní diagnostika.....	13
3.4.3 Určení prognózy podle International prognostic scoring systém (IPSS).....	14
3.5 Terapie MDS.....	14
3.5.1 Terapie nemocných s nízkým a středním rizikem.....	14
3.5.2 Terapie nemocných s vysokým rizikem MDS/AML.....	14
3.5.3 Imunomodulační terapie.....	14
4. Praktická část.....	16
4.1 Definice souboru.....	16
4.2 Odběr a zpracování vzorků.....	17

4.3 Metodika.....	17
4.3.1 Stanovení krevního obrazu.....	17
4.3.2 Normální hodnoty krevního obrazu.....	18
4.4 Zpracování dat.....	19
4.4.1 Statistické porovnání léčebné odezvy lenalidomidem u sledovaných parametrů.....	19
4.4.2 Grafické znázornění hodnot PLT a HGB u pacientů užívajících lenalidomid.....	20
5. Diskuse.....	33
6. Závěr.....	34
7. Použitá literatura.....	35

1. Úvod

Krevní obraz patří mezi základní vyšetření v hematologické laboratoři a díky moderním analyzátorům je možné získat výsledek ve velmi krátké době od odběru. Pacienti, kteří docházejí do hematologických ambulancí, mívají řadu problémů a doprovodných nežádoucích účinků po agresivní léčbě a snahou laboratoře je rychle a kvalitně vydat výsledky, které následně slouží lékaři k posouzení stavu pacienta. Jednotlivé parametry krevního obrazu mohou být různě ovlivněny a je potřeba se na tyto změny zaměřit.

2. Zadání bakalářské práce - Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat hodnoty krevního obrazu u pacientů s myelodysplastickým syndromem před podáním léčby a v průběhu imunomodulační léčby Lenalidomidem. Na základě naměřených hodnot s časovým odstupem zjistit změnu určitého parametru krevního obrazu po terapii u skupiny pacientů.

3. Teoretická část

Myelodysplastický syndrom (MDS) je velmi závažné hematologické klonální onemocnění. Jde o poruchu krvetvorby, která vzniká na základě poruchy genomu pluripotentní hematopoetické buňky. Mezi základní znaky onemocnění patří dysplastická inefektivní krvetvorba a periferní cytopenie. MDS je preleukemickým onemocněním, které v mnoha případech přechází do akutní leukémie (AML). (Hochová a spol. 2006, Pecka 2006, Čermák a spol. 2004)

3.1 Rozdělení MDS podle FAB

Rozdělení podle FAB (French-American-British) klasifikace. V roce 1982 navrhla FAB skupina hematologů klasifikaci MDS do 5 základních subtypů podle nálezu v kostní dřeni. (Bennett a spol. 1982)

3.1.1 Refrakterní anemie (RA)

U tohoto typu MDS je dřeh normocelulární až hypercelulární s hyperplázií erytroidní řady a dyserythropoezou. Myeloblastů je v kostní dřeni (KD) méně než 5 %, v periferní krvi (PK) méně než 1 %. Věnečkovité sideroblasty jsou v kostní dřeni zastoupeny méně než 15 %. (Hochová a spol. 2006)

3.1.2 Refrakterní anemie se sideroblasty (RAS)

Tato anemie je dnes označována jako RARS (refractory anemia with ring sideroblasts). Dřeh je hypocelulární s hyperplázií červené řady. Počet myeloblastů v KD je menší než 5 % v PK je menší než 1 %. Věnečkovité sideroblasty více nebo rovny 15 %. (Hochová a spol. 2006)

3.1.3 Refrakterní anemie s excesem blastů (RAEB)

Dřeh je hypercelulární s dysplázií ve všech hematopoetických řadách. Počet myeloblastů v kostní dřeni je 5 - 20 % a v PK méně nebo roven 5 %. Věnečkovité sideroblasty mohou být přítomny. (Hochová a spol. 2006)

3.1.4 Refrakterní anemie s excesem blastů v transformaci (RAEB-T)

Nález je stejný jako u RAEB, ale počet myeloblastů v KD je 21 - 30 % a v periferní krvi je více než 5 %. (Hochová a spol. 2006)

3.1.5 Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)

Ve dřeni je dysgranulopoeza a zmnožení myelomonocytární populace. Počet blastů v KD je

do 20 %, v PK nepřesahují blasty 5 %. V PK je absolutní monocytóza vyšší než $1 \times 10^9/l$. (Hochová a spol. 2006)

3.2 Rozdělení podle WHO klasifikace

V roce 2002 publikoval WHO klasifikaci MDS J.W. Vardiman. WHO klasifikace doporučila změnu počtu podskupin MDS. Poprvé byl definován subtyp podle cytogenetického nálezu a přechodné či smíšené formy MDS. (Vardiman a spol. 2002, Jonášová 2003)

3.2.1 Refrakterní anemie (RA)

V KD je pouze dysplazie v červené řadě. Počet myeloblastů v KD je menší než 5 %. Počet prstenčitých sideroblastů je menší než 15 %. V periferní krvi je přítomna anemie a počet myeloblastů je menší než 1 %. (Hochová a spol. 2006)

3.2.2 Refrakterní anemie s prstenčitými sideroblasty (RARS)

V KD pouze dysplazie v červené řadě. Počet myeloblastů v KD je méně než 5 %. Počet prstenčitých sideroblastů v KD je větší nebo roven 15 %. V PK je anemie a počet myeloblastů je menší než 1 %. (Hochová a spol. 2006)

3.2.3 Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách (RCMD)

V KD je dysplazie ve 2 či více vývojových řadách minimálně v 10 % buněk z každé vývojové řady. Počet myeloblastů v KD je méně než 5 % a nález prstenčitých sideroblastů je menší než 15 % z celkového počtu erytroblastů. V PK je přítomna cytopenie a to buď bicytopenie nebo pancytopenie. Počet myeloblastů v PK je menší než 1 % a absolutní počet monocytů se pohybuje pod hodnotou $1 \times 10^9/l$. (Hochová a spol. 2006)

3.2.4 Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách s prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS)

V KD je dysplazie ve 2 či více vývojových řadách minimálně v 10 % buněk z každé vývojové řady. Počet myeloblastů v KD méně je než 5 %. Počet prstenčitých sideroblastů v KD je 15 % a více. V PK je přítomna cytopenie, počet myeloblastů je nižší než 1 % a absolutní počet monocytů je méně než $1 \times 10^9/l$. (Hochová a spol. 2006)

3.2.5 Refrakterní anemie s excesem blastů-1 (RAEB-1)

V KD je dysplazie v jedné nebo více řadách minimálně v 10 % buněk z každé vývojové řady. Počet myeloblastů v je KD 5 - 9 %. V PK je přítomna cytopenie a méně než 5 % myeloblastů. (Hochová a spol. 2006)

3.2.6 Refrakterní anemie excesem blastů-2 (RAEB-2)

V KD je dysplazie v jedné nebo více řadách minimálně v 10 % buněk z každé vývojové řady. Počet myeloblastů v KD je 10 - 19 %. V PK je cytopenie a 5 - 19 % myeloblastů. U tohoto typu MDS mohou být přítomny v blastech Auerovy tyče. (Hochová a spol. 2006)

3.2.7 MDS neklasifikovatelný (MDS-U)

V KD je přítomna dysplazie v jedné řadě, a to v granulocytární nebo megakaryocytární. V KD je méně než 5 % myeloblastů. V PK je přítomna cytopenie a méně než 1 % blastů. (Hochová a spol. 2006)

3.2.8 MDS s izolovanou delecí 5q- (5q- syndrom)

V KD bývá normální či zvýšený počet megakaryocytů s hypolobulárními jádry. Počet myeloblastů v KD je menší než 5 %. V PK je přítomna anemie, počet myeloblastů je menší než 5 % a počet trombocytů bývá normální nebo zvýšený. (Hochová a spol. 2006)

3.3 Rozdělení MDS podle etiologie

3.3.1 Primární MDS

U primární MDS je patogeneze onemocnění komplikovanější. Asi u 80 % nemocných nebyla dosud etiologie objasněna, přestože je intenzivně zapojena do výzkumu. (Pecka 2006)

3.3.2 Sekundární MDS

Sekundární MDS vzniká většinou po předchozí léčbě jiné primární malignity chemoterapií nebo radioterapií nebo po styku s toxickými látkami z pracovního prostředí jako jsou například organická rozpouštědla (benzen). Sekundární MDS, které se vyvinuly po léčbě inhibitory topoizomerázy II nebo antracykliny, mají většinou rychlý nástup a zahrnují aberace v místě 11q23 s mutací MLL genu (mixed lineage leukemia gene). Sekundární MDS vzniklé po podávání alkylačních látek a po předchozí radioterapii mají spíše pomalou progresi (5 - 10 let) a typická je aberace chromozomů 5 a 7. Většinou jde tedy o následek poškození DNA po chemoterapii nebo radioterapii, dochází potom k vysokému nárůstu prognosticky nepříznivých genetických aberací. (Pecka 2006)

3.4 Diagnostika MDS

3.4.1 Klinická diagnostika

Klinické příznaky mají souvislost se sníženou a neefektivní produkcí myeloidní vývojové krevní řady. U pacientů se v důsledku snížení červené krevní řady může projevit anemický syndrom (únava, bledost a dušnost). Při těžké anemii může docházet až ke známkám srdečního selhávání. V důsledku leukopenie mívají pacienti s MDS zvýšený sklon k infekčním onemocněním. U pacientů s trombocytopenií dochází ke krvácivým projevům kožním či slizničním (epistaxi, menorrhagii a metrorrhagii u žen). (Čermák 2002)

3.4.2 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika je především založena na morfologickém vyšetření početních a dysplastických změn v periferní krvi a kostní dřeni.

Při čerstvém záchytu nemoci bývá v periferní krvi izolovaná cytopenie (anemie, trombocytopenie nebo neutropenie), bicytopenie nebo pancytopenie, často se známkami dysplazie, která je způsobena krvetvorbou bez efektu. Mezi morfologické změny v erytrocytární řadě patří nálezy makroovalocytů, polychromazie, bazofilní tečkování, přítomnost erytroblastů. V leukocytní řadě bývá nejčastěji posun doleva, přítomnost hyposegmentace a/nebo hypogranulace segmentů. (Pecka 2006)

Kostní dřeň bývá většinou normocelulární, k morfologickým změnám patří hyperplazie červené řady, přítomnost velkých erytroblastů s nehomogenní cytoplazmou a s tvarovými odchylkami či vícejaderné erytroblasty, Howell-Jollyho tělíka, prstenčité sideroblasty. V granulocytární řadě bývá většinou přítomna hypogranulace, hyposegmentace a vakuolizace. V megakaryocytární řadě jsou přítomny mikromegakaryocyty (při delecii 5q-), či megakaryocyty s hyper- nebo hypolobulizovanými jádry. (Pecka 2006)

Pro zařazení MDS je důležitý počet myeloblastů v PK a KD, počet sideroblastů a vyjádření dysplastických změn v jednotlivých řadách v KD. (Pecka 2006)

K upřesnění diagnózy MDS a k odhadu prognózy patří i imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření kostní dřene. (Hochová a spol. 2006) I přesto, že dochází k rozvoji těchto metod, je morfologická diagnostika u MDS jedním z nejdůležitějších vyšetření. (Pecka 2006)

3.4.3 Určení prognózy podle International prognostic scoring systém (IPSS)

Skórovací systém se používá k určení prognózy a k volbě terapie. Rizika onemocnění podle skórovacího systému dělíme na nízké riziko (low risk), střední a vysoké riziko (high risk). Nově se používá R-IPSS (revised IPSS) který využívá analýzu cytogenetických aberací a jejich prognostického významu. (Greenberg a spol. 2012)

3.5 Terapie MDS

Rychlé a správné určení diagnózy a stanovení prognózy je základním předpokladem k určení správného léčebného postupu. Mezi obecná pravidla pro zahájení terapie patří určení typu MDS (zařazení onemocnění do příslušného rizika), věk nemocného, závažnost dalších chorob u polymorbidních pacientů, stabilita nemoci a také přání pacienta. (Šišková a spol. 2002)

3.5.1 Terapie nemocných s nízkým a středním rizikem

Pacienti s nízkým rizikem a se stabilním KO se pouze pravidelně sledují.

Dále se využívá podpůrná léčba, podávají se, často dlouhodobě, krevní převody spolu s chelatační léčbou (desferal) nebo převody krevních destiček. Tam, kde je to možné, je vhodné podávat i růstové faktory – cytokiny. Jedná se nejčastěji o léčbu erythropoetinem (EPO) neboli růstovým faktorem pro červenou řadu nebo o léčbu granulocytární kolonie stimulujícím faktorem (G-CSF - granulocyte colony stimulating factor) většinou v kombinaci s EPO. (Hellstrom a spol. 1997, Neuwirtová 1998, Jonasova a spol. 2012)

Imunosupresivní terapie se podává u pacientů s cytopenií, kteří nejsou vhodní k transplantaci KD nebo k podávání růstových faktorů. Vhodní pacienti bývají indikováni k alogenní transplantaci krvetvorných buněk. (Neuwirtová a spol. 2004)

3.5.2 Terapie nemocných s vysokým rizikem MDS/AML

Pacienti s vysokým rizikem v dobrém klinickém stavu jsou směřováni k alogenní transplantaci krvetvorných buněk. U pacientů, kteří nejsou vhodní k alogenní transplantaci, se podávají novější hypometylační preparáty (např. azacytidin), jako paliativní léčba slouží nízkodávkovaná chemoterapie (citosinarabinosid). (Silverman a spol. 2002)

3.5.3 Imunomodulační terapie

Mnohé studie prokazují, že dysregulace různých apoptotických, zánětlivých a angiogenních cytokinů hraje důležitou roli v etiopatogenezi MDS. Imunomodulační terapie ovlivňuje hladiny těchto cytokinů a působí na průběh a patogenezi onemocnění. Prvním imunomodulačním lékem použitým u pacientů s MDS byl thalidomid. (Raza a spol. 2001; Broyl a spol. 2013) Asi u poloviny

nemocných byla léčba přerušena pro nežádoucí účinky. U ostatních nemocných však došlo ke zlepšení stavu a nebylo potřeba podání transfuzí. Lepší výsledky měla studie s nižšími dávkami thalidomidu nebo v kombinaci s erytropoetinem. (Musto a spol. 2006)

Mezi nejčastější cytogenetickou abnormalitu u MDS patří delece dlouhého raménka 5. chromozomu (5q-). Do této skupiny patří asi 20 % pacientů s MDS. (Germing a spol. 2012) Nově se používá u 5q- syndromu imunomodulační terapie lenalidomidem. Jedná se o nový analog thalidomidu, který má výrazně lepší efekt. Cílem terapie je odstranění transfuzní závislosti a dosažení normalizace krevního obrazu. (List a spol. 2005)

Lenalidomid má antiangiogenní, antiapoptotické účinky, inhibuje TNF-alfa, stimuluje T a NK buňky. Skutečný mechanismus účinku a důvod vysoké citlivosti pacientů s 5q- syndromem na léčbu není zatím objasněn. Lenalidomid je již několik let povolen v USA k léčbě pacientů s 5q- syndromem a u těžkých anemií. U nás je lenalidomid používán od roku 2008 a povolen je od roku 2015. (Jonasova a spol. 2014, Jonášová a spol. 2015) U pacientů s 5q- syndromem je dosahováno u 60 - 70 % pacientů stimulace erytrocytární vývojové řady a není potřeba transfúzní terapie. Z této skupiny asi 40 % pacientů dosáhne i kompletní cytogenetické remise, to znamená, že dojde k vymizení 5q- aberace. (List a spol. 2005, Hellstrom a spol. 2012) Dokazují to velké studie MDS 003 a MDS 004. (Fenaux a spol. 2011)

Lenalidomid je většinou dobře snášen. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří neutropenie a trombocytopenie. U MDS nezvyšuje v malých dávkách výrazně riziko trombózy, proto není zatím antitrombotická terapie doporučena. Lenalidomid je podáván perorálně v jedné denní dávce. Optimální doba terapie nebyla dosud stanovena. (Jonášová a spol. 2015)

4. Praktická část

4.1 Definice souboru

Soubor zahrnuje pacienty hematologické ambulance 1. interní kliniky VFN Praha. Jedná se o 23 jedinců s věkovým průměrem 73 let, mediánem 74 let, nejnižší věk je 53 let a nejvyšší 85 let. V souboru je 20 žen a 3 muži. Soubor je omezen izolovanou pozitivitou 5q- aberace, která se u pacientů s MDS vyskytuje jen asi v 20 %.

Iniciály	Pohlaví	Věk	Datum dg.	Typ MDS	Datum 1.dávky	Dávka léku
IA	M	74	15.06.2010	RAEB 1 5q-	11.05.2015	10 mg
HA	Ž	78	15.07.2009	5q- RA	25.05.2010	5 mg
VB	Ž	78	07.12.2001	5q - RA	07.11.2012	5 mg
JB	Ž	72	15.06.2012	5q-	18.07.2013	5 mg
JH	Ž	63	07.01.2014	5q-	21.09.2015	5 mg
AJ	Ž	60	15.04.2010	5q-	08.04.2014	10 mg
JK	M	85	15.10.2014	5q-	21.01.2015	10 mg
MK	Ž	61	16.03.2010	5q-	17.05.2015	5 mg
RK	Ž	53	08.09.2011	5q- RAEB	16.03.2015	10 mg
EM	Ž	74	15.10.2010	5q-	24.10.2012	10 mg
JM	Ž	69	18.12.2008	5q-	15.03.2010	5 mg
LM	Ž	73	01.08.2012	RAEB 1 5q-	02.07.2014	5 mg
AP	Ž	74	15.06.2011	RAEB 1 5q-	17.04.2014	10 mg
JP	Ž	72	19.05.2010	5q-	18.04.2013	5 mg
MP	Ž	74	15.11.2014	5q-	26.05.2015	5 mg
JS	Ž	72	15.02.2013	5q-	27.08.2014	10 mg
LŠ	Ž	73	26.05.2015	RAEB 1 5q-	01.08.2015	5 mg
MŠ	Ž	82	29.06.2005	5q-	01.08.2011	10 mg
RŠ	Ž	85	30.06.2015	5q-	01.10.2015	5 mg
MV	Ž	84	30.10.2014	RAEB 1 5q-	31.08.2015	10 mg
EV	Ž	79	17.06.2010	5q-	01.09.2010	5 mg
VV	Ž	76	15.05.2011	RAEB 1 5q-	14.05.2014	5 mg
VŽ	M	79	15.02.2009	5q-	03.02.2010	10 mg

4.2 Odběr a zpracování vzorků

Odběry byly provedeny v odběrovém centru ÚLBLD, VFN Praha. Odběr krevního obrazu byl proveden do odběrové zkumavky s K_3EDTA nebo K_2EDTA . Vzorek bylo nutné změřit až za 15 - 20 minut po odběru, aby došlo k vyrovnání koncentračních gradientů mezi krvinkami a antikoagulačním přípravkem. Stabilita krve na vyšetření krevního obrazu je 5 hodin od odběru při teplotě 15 – 25 °C.

V průběhu léčby bylo u každého pacienta v určitém časovém období provedeno 11 – 86 kontrolních odběrů s kontrolou parametrů KO a kontrolou i dalších laboratorních parametrů, které by mohl preparát lenalidomid ovlivnit. V naší práci jsme podrobně sledovali pouze koncentraci hemoglobinu a počty trombocytů.

4.3 Metodika

4.3.1 Stanovení krevního obrazu

Krevní obraz byl vyšetřován na analyzátoru Sysmex XE-5000. Krevní obraz patří mezi základní vyšetřovací metody v hematologické laboratoři. Využívá se k určení či upřesnění celé škály diagnóz a často i ke sledování účinnosti léčby. Jde o stanovení počtu krevních buněk a jejich parametrů. Mezi základní hodnoty krevního obrazu patří počet leukocytů (WBC), erytrocytů (RBC) a trombocytů (PLT), stanovení koncentrace hemoglobinu (HGB), hematokrit (HCT), střední objem erytrocytů (MCV), střední množství Hb v erytrocytu (MCH), střední koncentrace Hb v erytrocytech (MCHC). (Pecka a spol. 2010)

Přístroj Sysmex XE-5000 změří až 150 vzorků KO za hodinu. Aspirace cca 150 μ l vzorku probíhá buď v otevřeném, nebo uzavřeném aspiračním režimu. Krev se po aspiraci rozdělí a putuje do dvou oddělených měřicích částí. V jedné se stanovují počty erytrocytů a trombocytů, ve druhé počty leukocytů a koncentrace hemoglobinu. Před vlastním měřením dochází k lýze buněk, které by mohly v dané měřicí části interferovat a k naředění vzorku diluentem.

Počty krevních destiček lze stanovit impedanční nebo alternativní optickou metodou. Impedanční metoda využívá hydrodynamické fokusace, kdy jsou buňky unášeny vodivou kapalinou pod tlakem do měřicí štěrby mezi dvě elektrody, na kterých je stejnosměrný proud. Při průchodu buňky mezi elektrodami vzniká napěťový (impedanční) impuls, který je přístrojem zaznamenán. Přístroj vydává kvantitativní (množství impulsů) a kvalitativní informace (velikost impulsů) o buňkách. Optická metoda využívá princip průtokové fluorescenční cytometrie. Trombocyty jsou obarveny fluorescenční barvou a v nosném roztoku pomocí hydrodynamické fokusace procházejí jednotlivě za sebou paprskem laserového světla. Snímá se rozptýl přímého laserového paprsku

a míra fluorescence. (Pecka 2010, Sysmex XE 5000)

Po lýze erytrocytů se uvolní hemoglobin a stanovuje se koncentrace hemoglobinu. Stanovení je prováděno metodou absorpční spektrofotometrie. Hemoglobin je převeden na stálobarevný methemoglobinový komplex. Jako oxidační činidla se v dnešní době používají bezkyanidové sloučeniny. Naměřené hodnoty absorbance jsou přímo úměrné koncentraci hemoglobinu. (Pecka 2010, Sysmex XE 5000)

4.3.2 Normální hodnoty krevního obrazu

Tab. č. 1: Fyziologické hodnoty KO u mužů a u žen

Hodnota KO	Zkratka	Ženy	Muži
Bílé krvinky	WBC	3,9 - 9,4 x 10 ⁹ /l	
Červené krvinky	RBC	3,8 - 4,9 x 10 ¹² /l	4,3 - 5,7 x 10 ¹² /l
Krevní destičky	PLT	137 - 413.10 x 10 ⁹ /l	130 – 380 x 10 ⁹ /l
Hemoglobin	HGB	120 – 160 g/l	135 – 175 g/l
Hematokrit	HCT	0,35 - 0,47	0,40 - 050
Střední objem erytrocytu	MCV	82 - 98 fl	
Střední množství hemoglobinu v erytrocytu	MCH	28 - 34 pg	
Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech	MCHC	320 - 360 g/l	

Zdroj: www.hematology.cz

4.4 Zpracování dat

Naměřená data byla graficky zpracována systémem Microsoft Office Excel 2010 a statisticky vyhodnocena v programu Statistica 12 pomocí neparametrického Wilcoxonova testu, protože data v jednotlivých souborech neměla normální rozložení.

4.4.1 Statistické porovnání léčebné odezvy lenalidomidem u sledovaných parametrů

Tab. č. 2: Porovnání léčebné odezvy u parametru HGB po podání 1. dávky léčiva a po dlouhodobějším užívání

Iniciály	Hodnoty HGB [g/l]		
	Odběr před podáním léku	Odběr po 1. podání léku	Odběr po dlouhodobém podávání léku
IA	75	95	154
HA	81	79	128
VB	73	86	107
JB	79	76	143
JH	89	71	101
AJ	76	90	141
JK	90	97	115
MK	64	82	128
RK	96	90	148
EM	87	85	97
JM	66	50	101
LM	74	76	103
AP	88	103	112
JP	73	61	121
MP	73	102	128
JS	75	65	101
LS	110	98	104
MS	102	103	103
RS	87	84	116
MV	80	78	99
EV	79	95	119
VV	136	134	128
VZ	94	92	139
Průměrná hodnota	84,6	86,6	119
Neparametrický Wilcoxonův test	p = 0,459618	p < 0,0001	

Zdroj: autor

Na základě vyhodnocení neparametrického Wilcoxonova testu lze odvodit, že ihned po podání léku byla změna HGB nevýznamná. Na konci vyhodnocovaného období došlo k prokazatelnému zvýšení hodnot HGB.

Tab. č. 3: Porovnání léčebné odezvy u parametru PLT po podání 1. dávky léčiva a po dlouhodobějším užívání

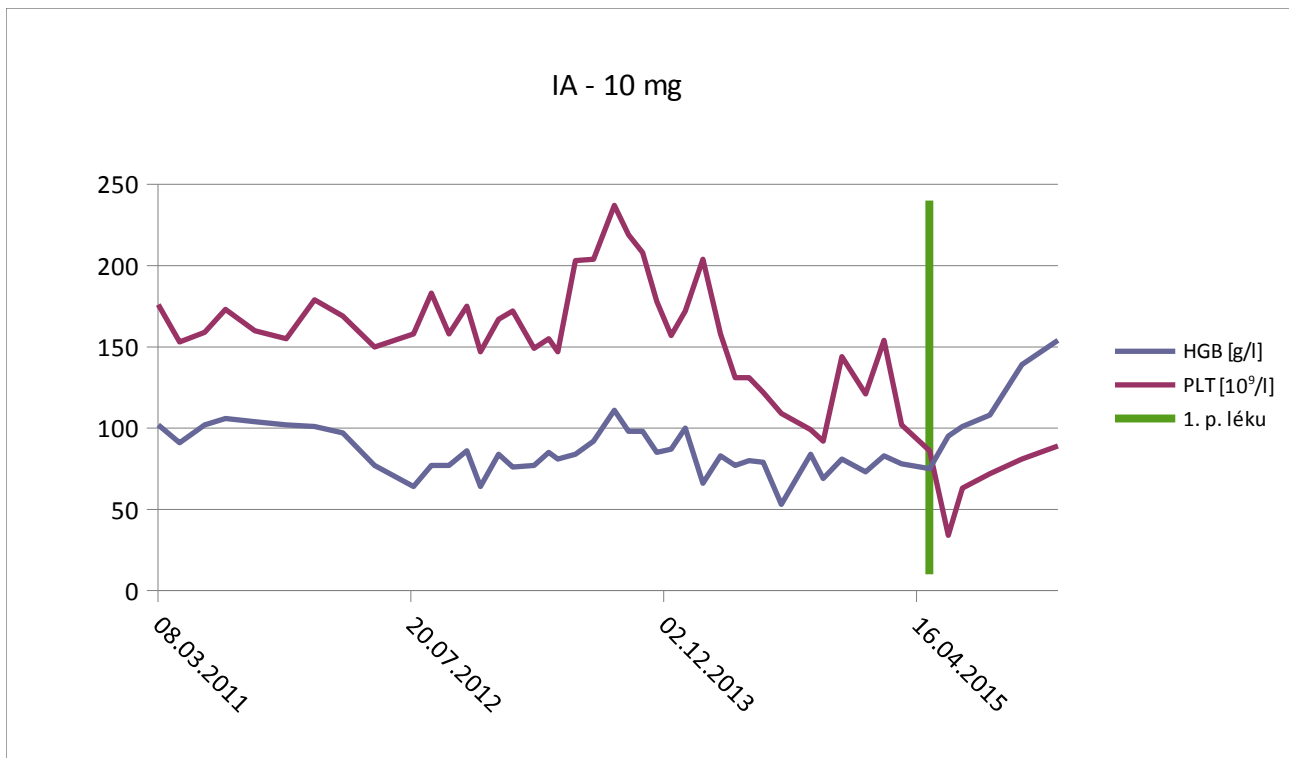
Iniciály	Hodnoty PLT [$10^9/l$]		
	Odběr před podáním léku	Odběr po 1. podání léku	Odběr po dlouhodobém podávání léku
IA	86	95	89
HA	218	79	107
VB	899	86	188
JB	294	318	173
JH	120	71	20
AJ	330	90	206
JK	240	97	137
MK	635	82	154
RK	445	90	197
EM	271	85	216
JM	177	50	35
LM	293	76	95
AP	260	103	95
JP	232	61	153
MP	574	102	115
JS	126	65	48
LS	637	98	321
MS	61	103	347
RS	170	84	131
MV	285	78	142
EV	497	95	171
VV	163	134	247
VZ	510	92	168
Průměrná hodnota	327	97	119
Neparametrický Wilcoxonův test		p < 0,0001	p < 0,0001

Zdroj: autor

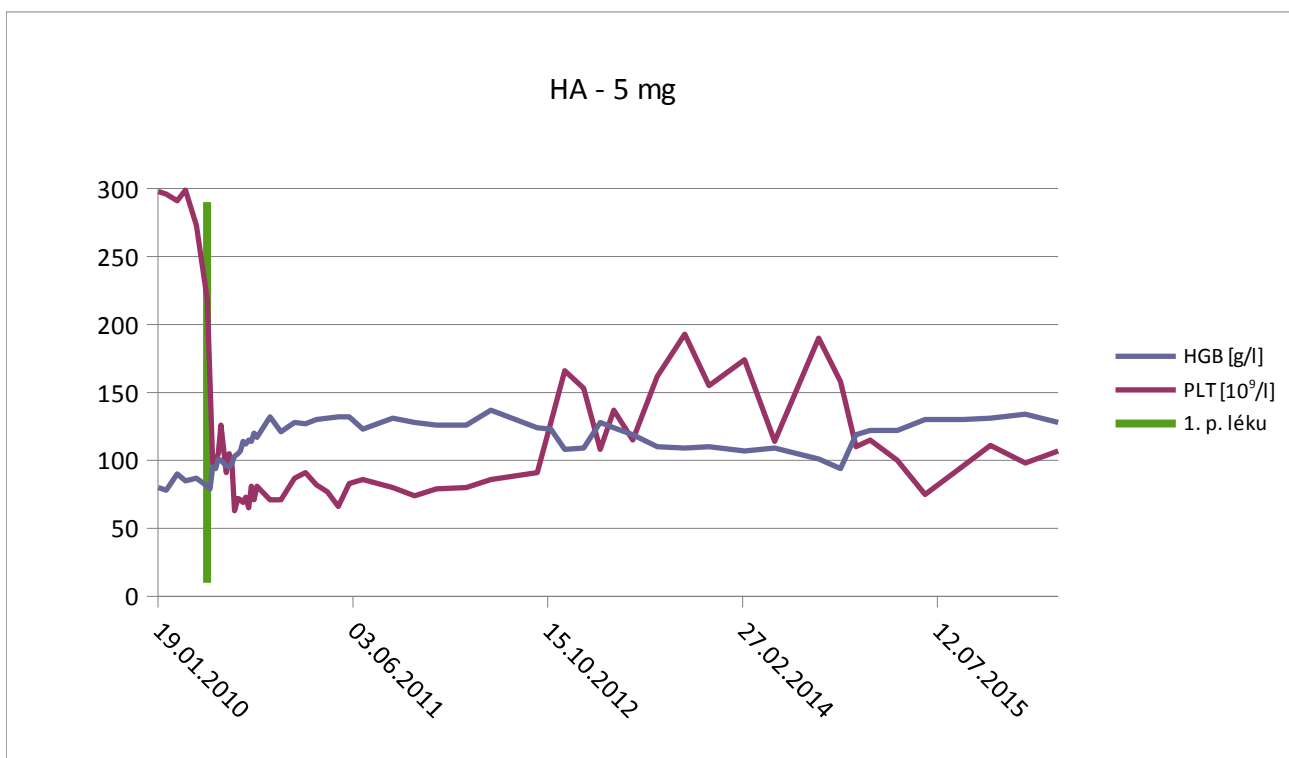
Na základě vyhodnocení neparametrického Wilcoxonova testu lze odvodit, že ihned po podání léku a zároveň na konci vyhodnocovaného období došlo k prokazatelnému snížení hodnot PLT.

4.4.2 Grafické znázornění hodnot PLT a HGB u pacientů užívajících lenalidomid

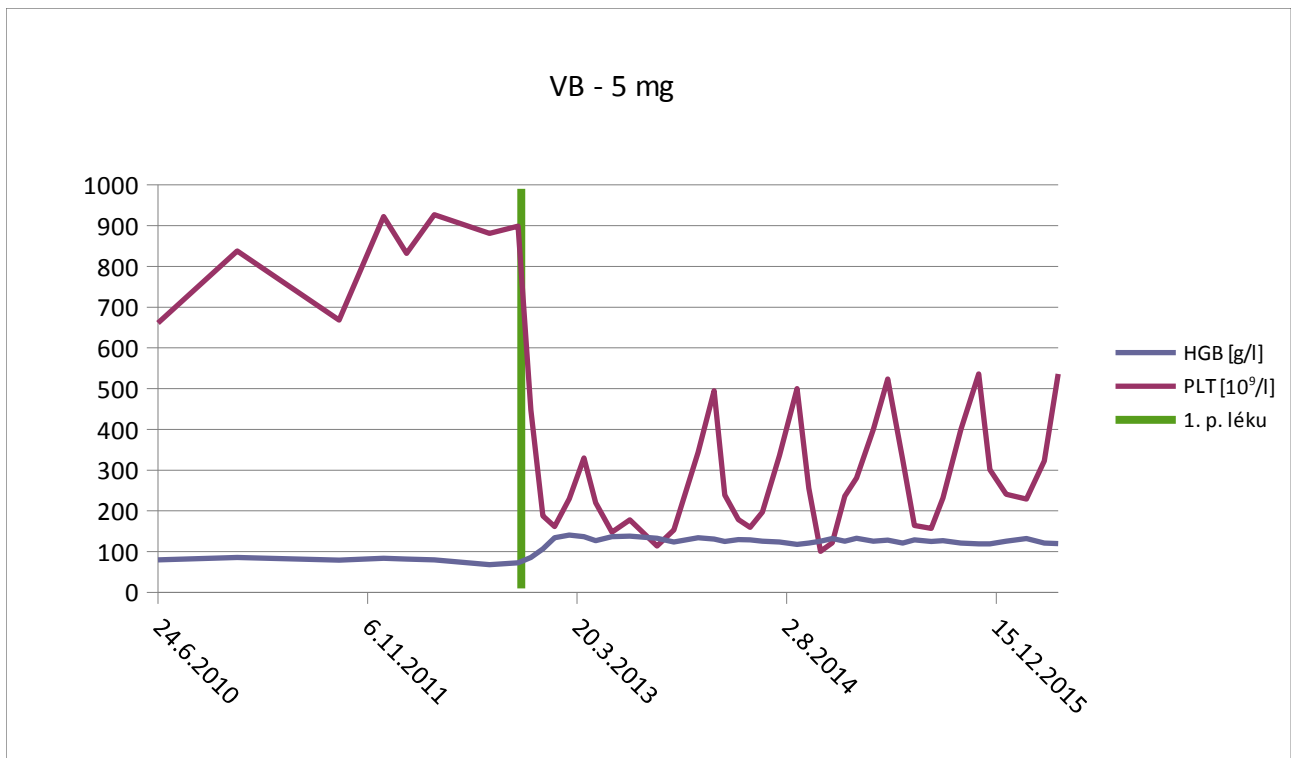
Sledování adekvátní odpovědi na podanou léčebnou dávku ve vymezeném časovém období u jednotlivých pacientů.



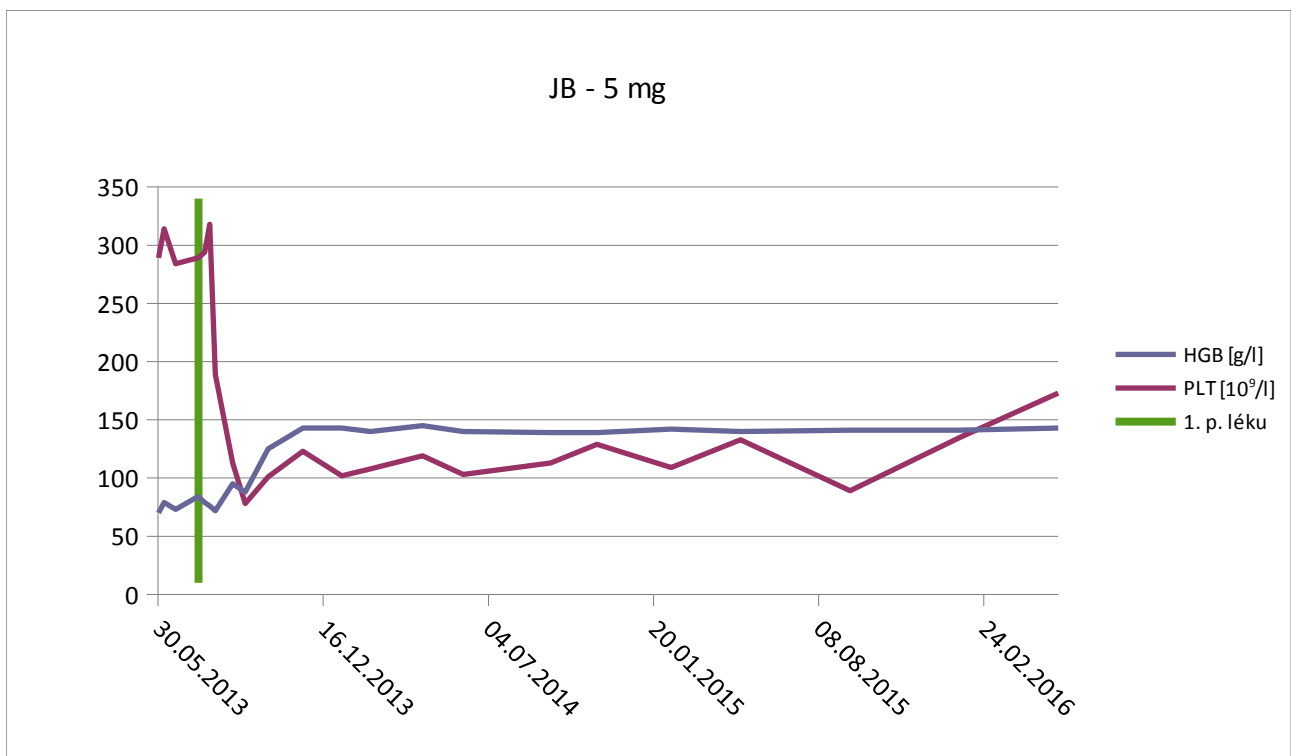
Graf 1: Pacient IA 74 let před léčbou HGB 75g/l PLT $86 \cdot 10^9/l$ a po podání vzestup HGB na 154g/l a PLT pokles na $89 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



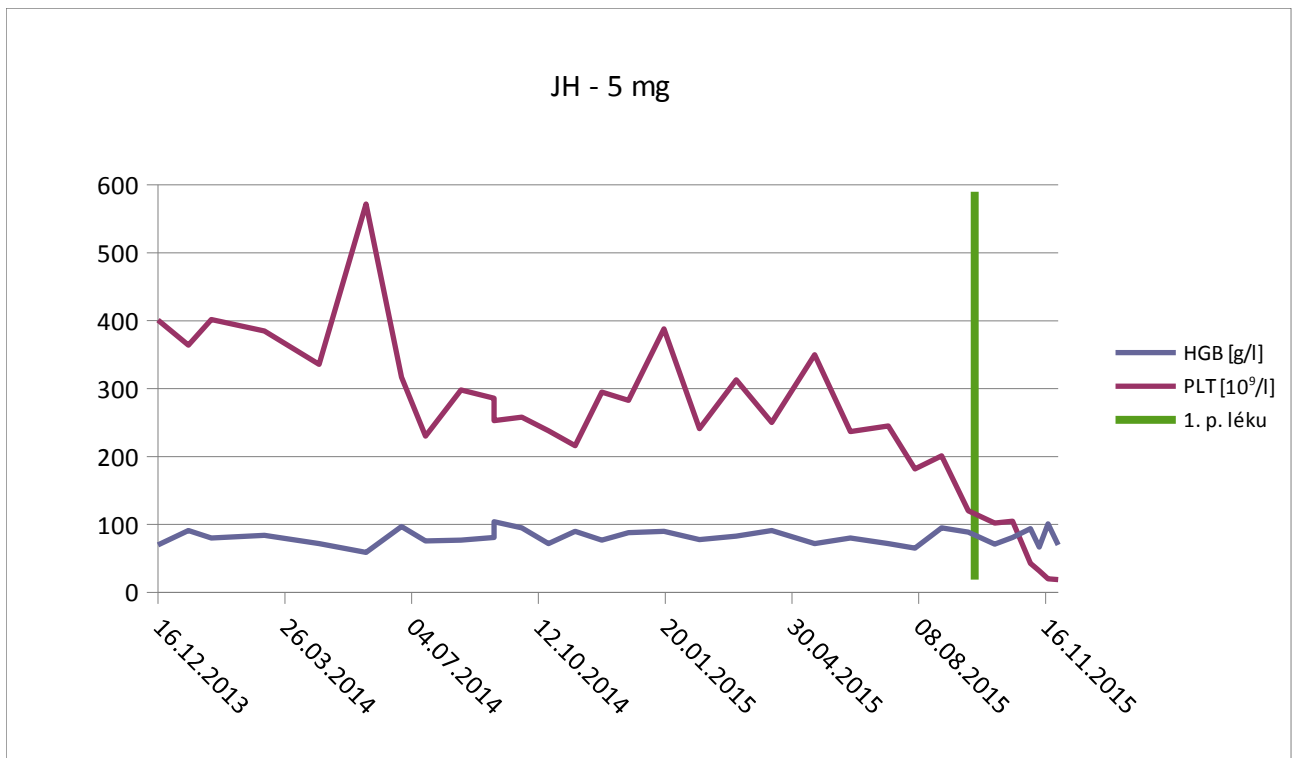
Graf 2: Pacientka HA 78 let před léčbou HGB 81g/l PLT $218 \cdot 10^9/l$ po podání vzestup HGB na 128g/l a PLT pokles na $107 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



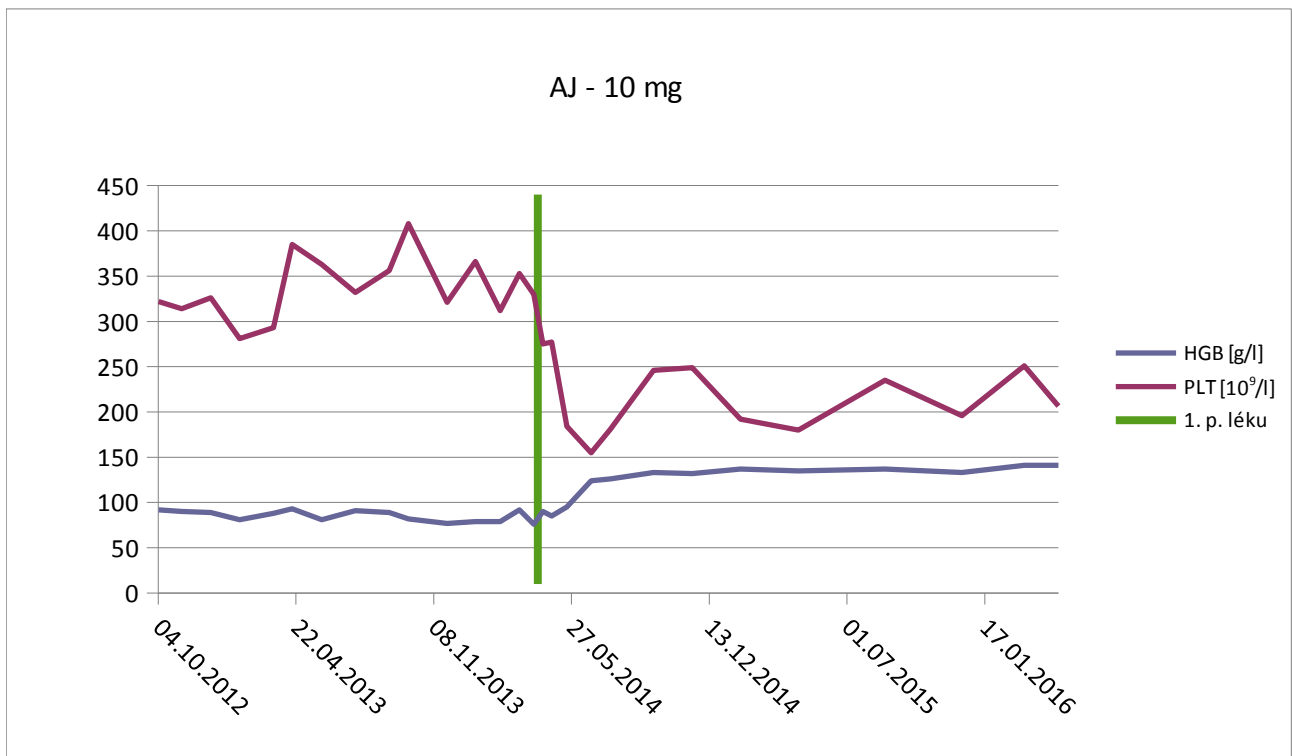
Graf 3: Pacientka VB 78 let, před léčbou HGB 73g/l PLT 899*10⁹/l. Po léčbě HGB 120g/l, PLT 536*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



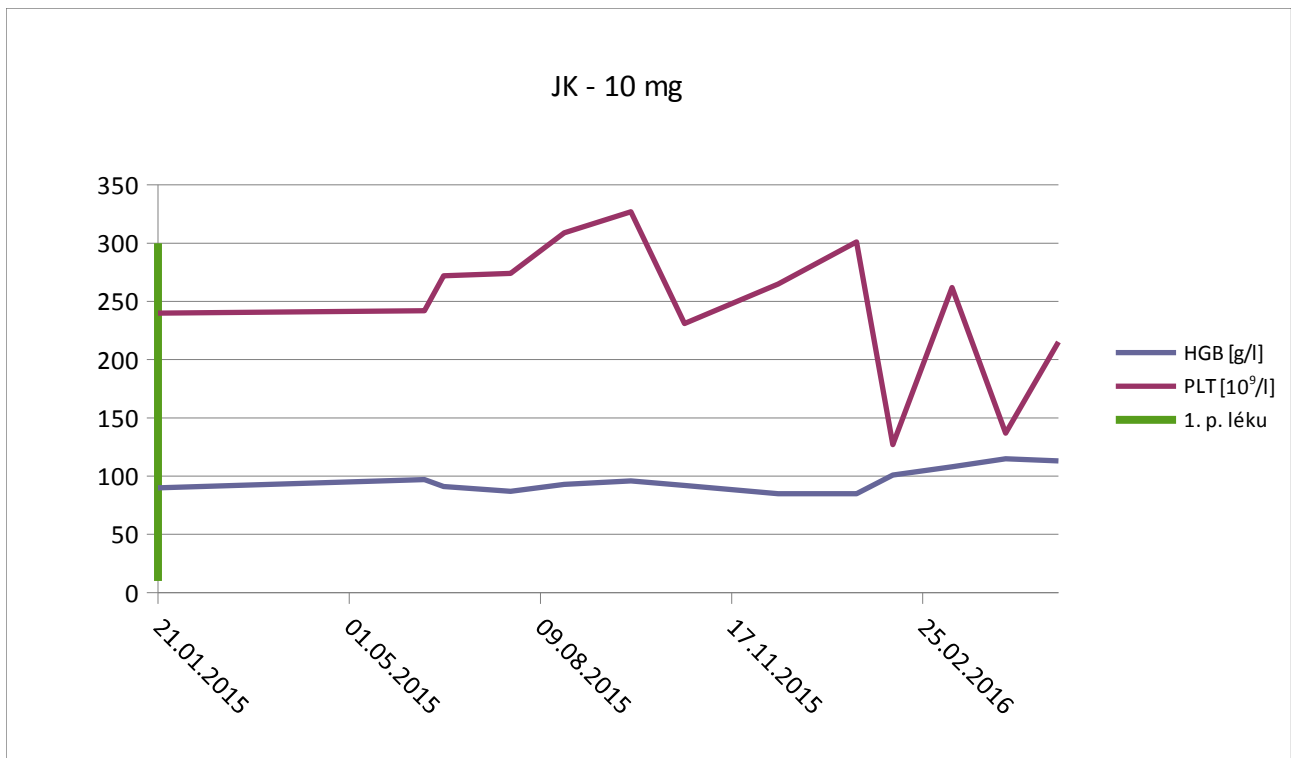
Graf 4: Pacientka JB 72 let, před léčbou HGB 79g/l, PLT 294*10⁹/l. Po léčbě HGB 143g/l, PLT 173*10⁹/l po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



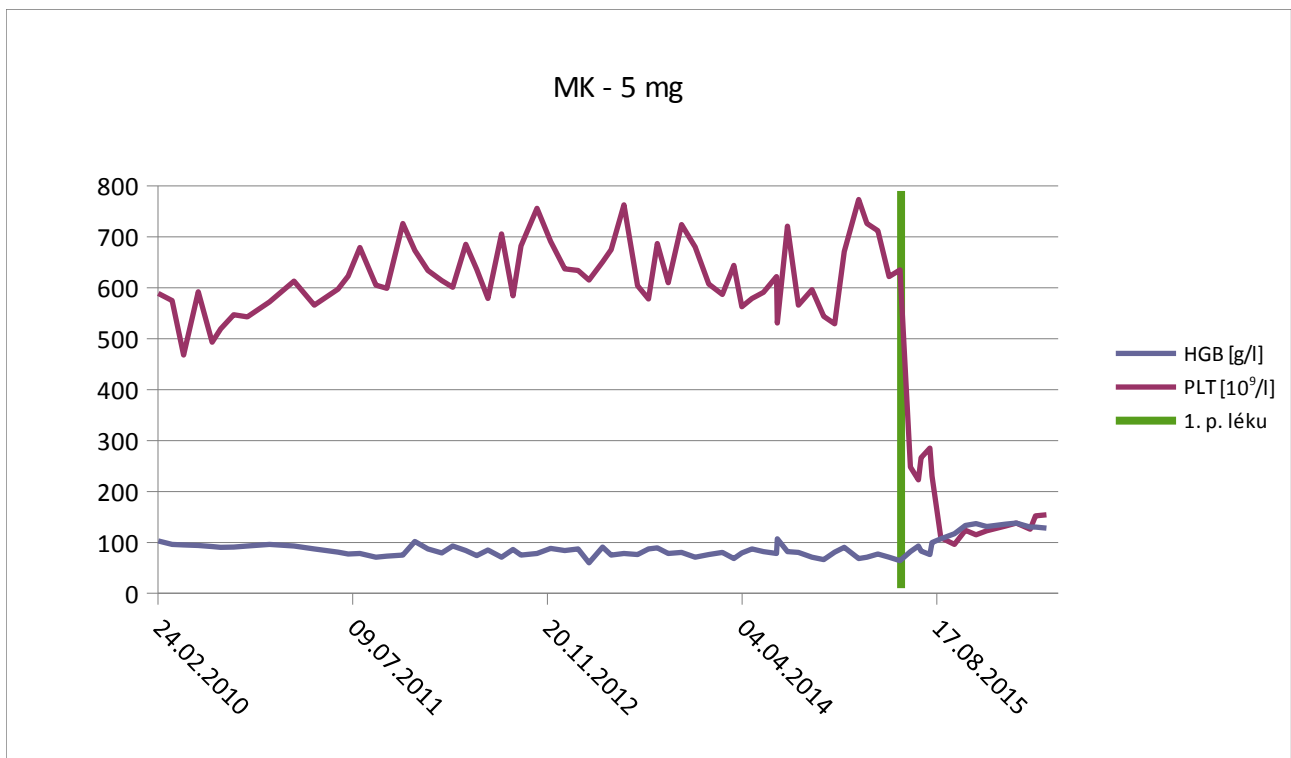
Graf 5: Pacientka JH, 63let, před léčbou HGB 89g/l, PLT $120 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 101g/l PLT $20 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



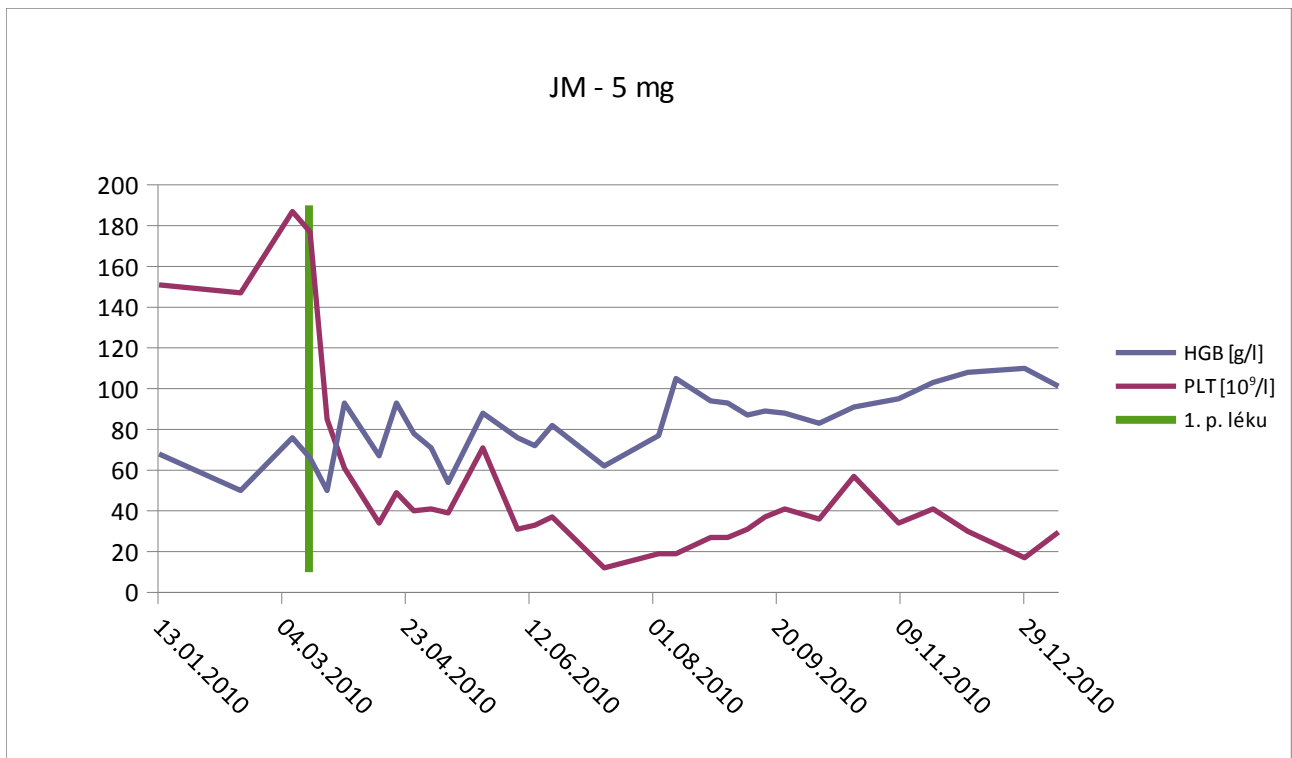
Graf 6: Pacientka AJ 60 let, před léčbou HGB 76g/l, PLT $330 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 141g/l PLT $206 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



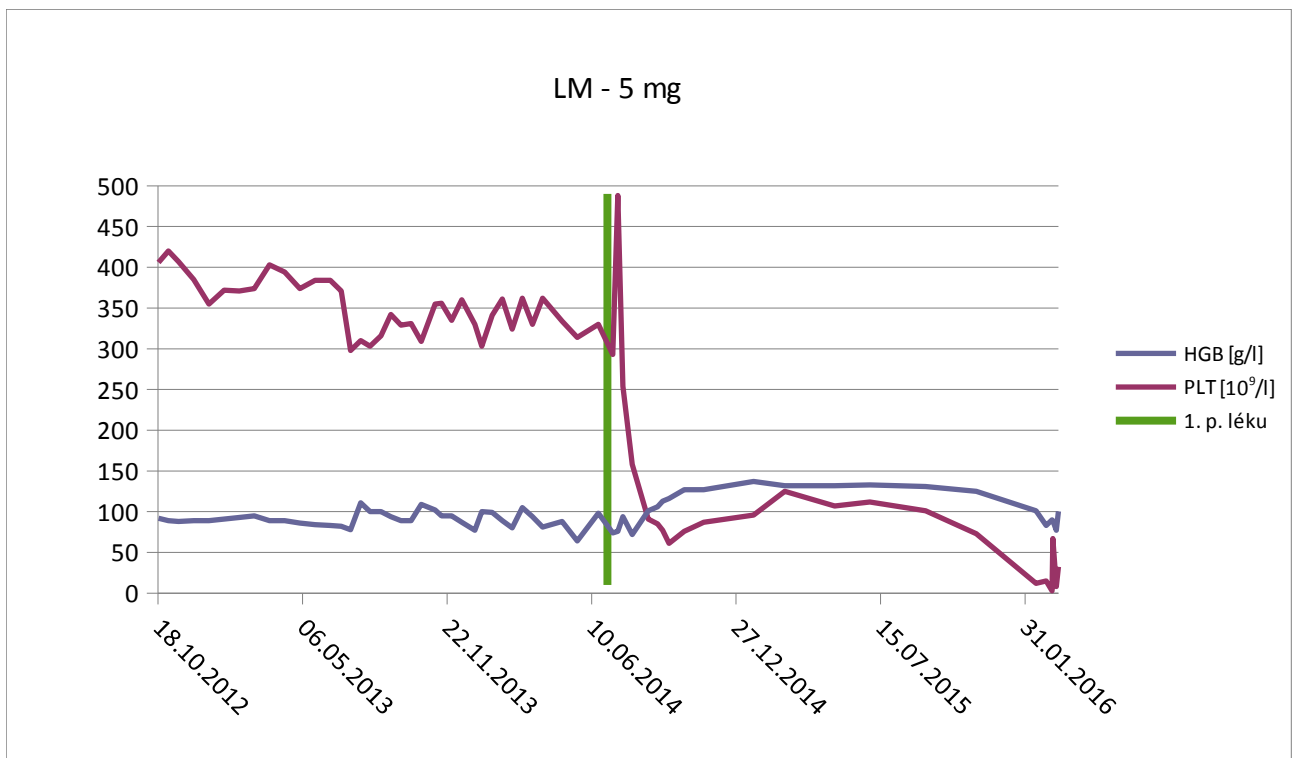
Graf 7: Pacient JK 85 let, data před léčbou nejsou k dispozici. Po podání dochází ke stabilizaci HGB a PLT a na konec k poklesu PLT a vzestupu HGB.



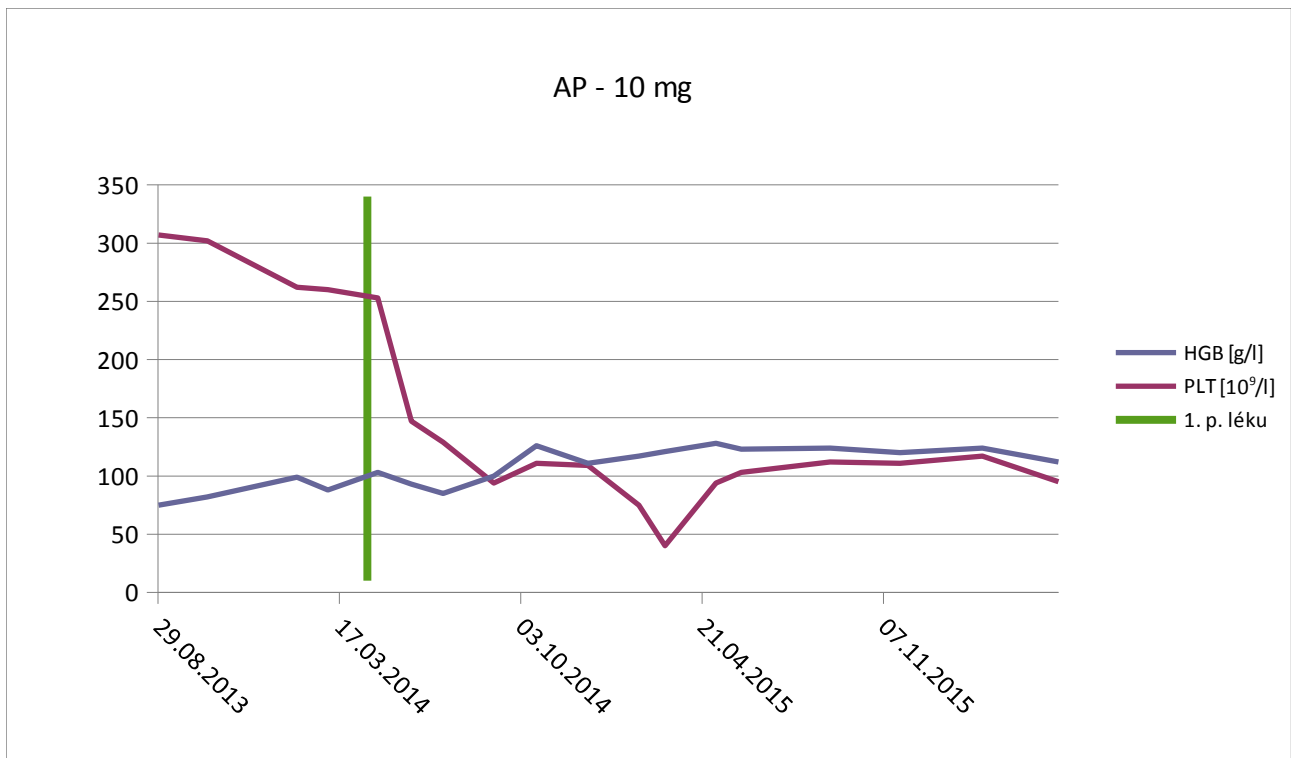
Graf 8: Pacientka MK 61 let, před léčbou HGB 64g/l PLT $635 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 128g/l PLT $154 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



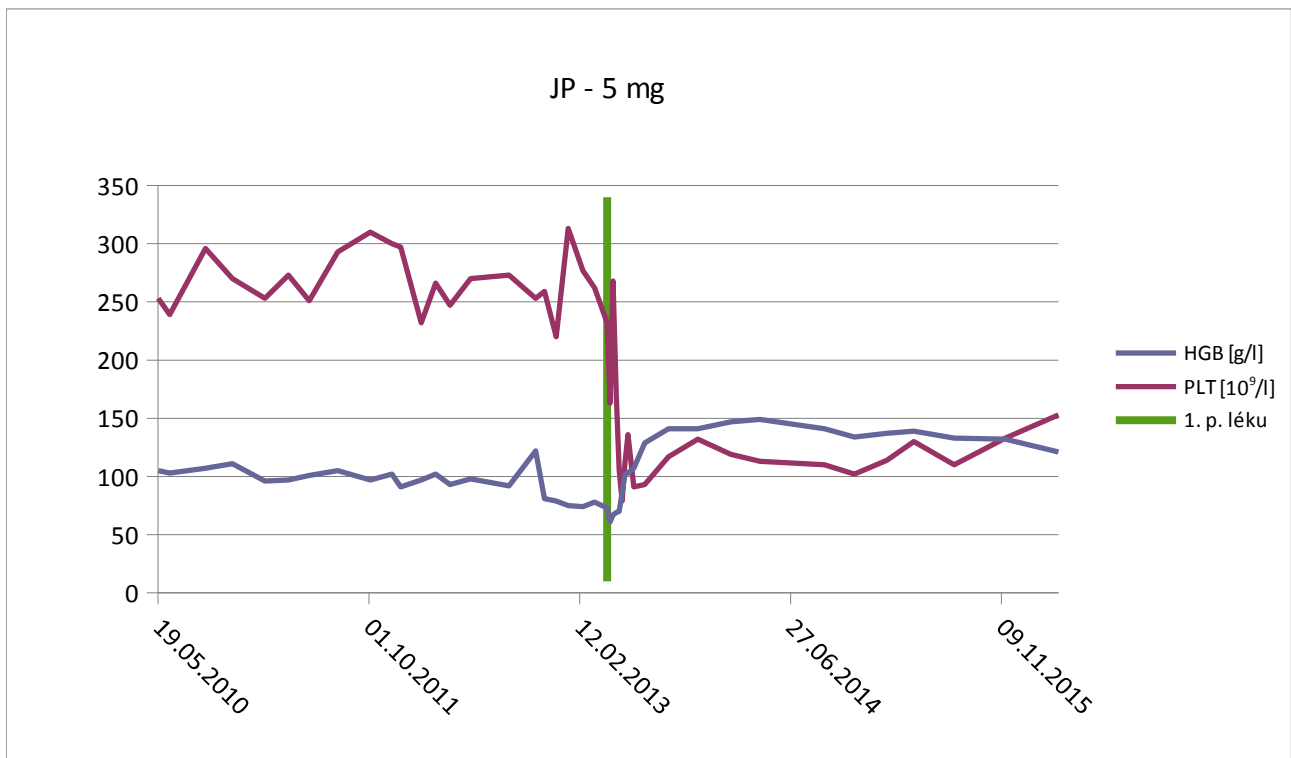
Graf 9: Pacientka JM 69 let, před léčbou HGB 66g/l, PLT 177*10⁹/l. Po léčbě HGB 101g/l, PLT 30*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



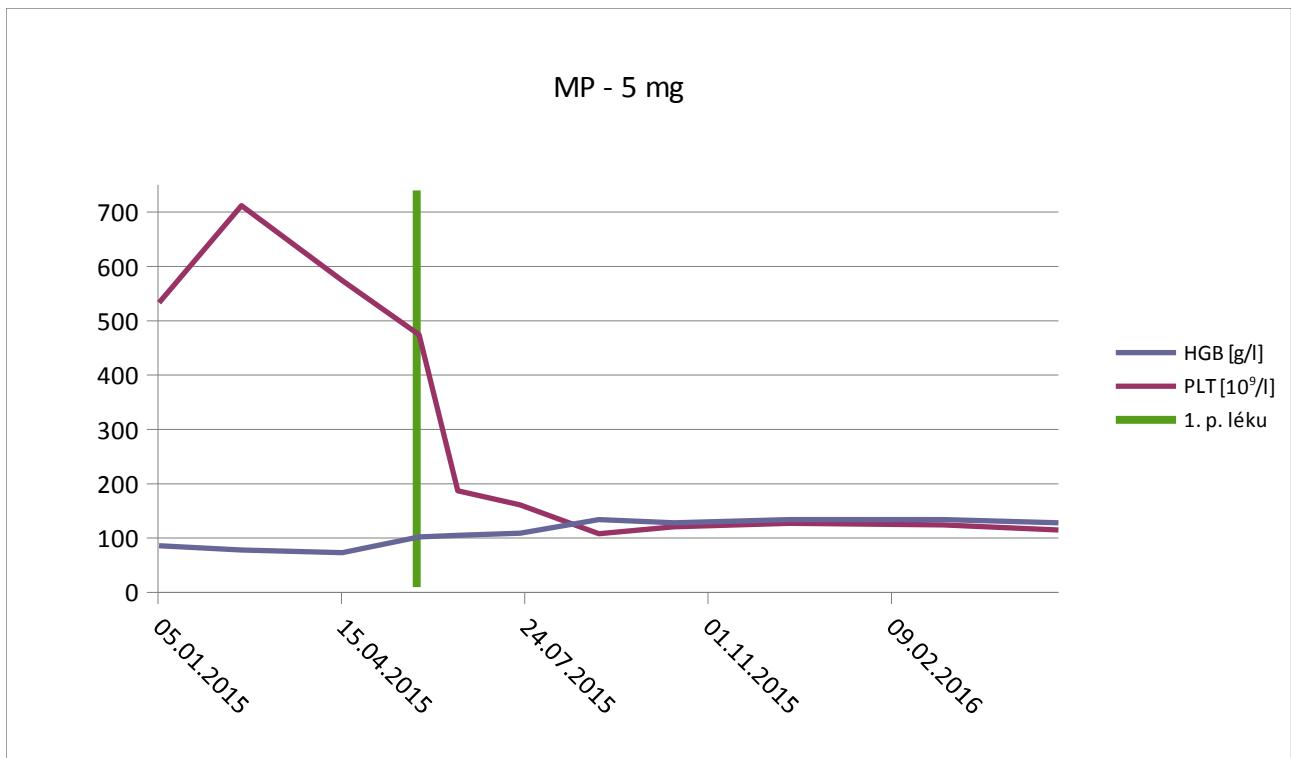
Graf 10: Pacient LM 73 let, před léčbou HGB 74g/l, PLT 293*10⁹/l. Po léčbě HGB 103g/l, PLT 35*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



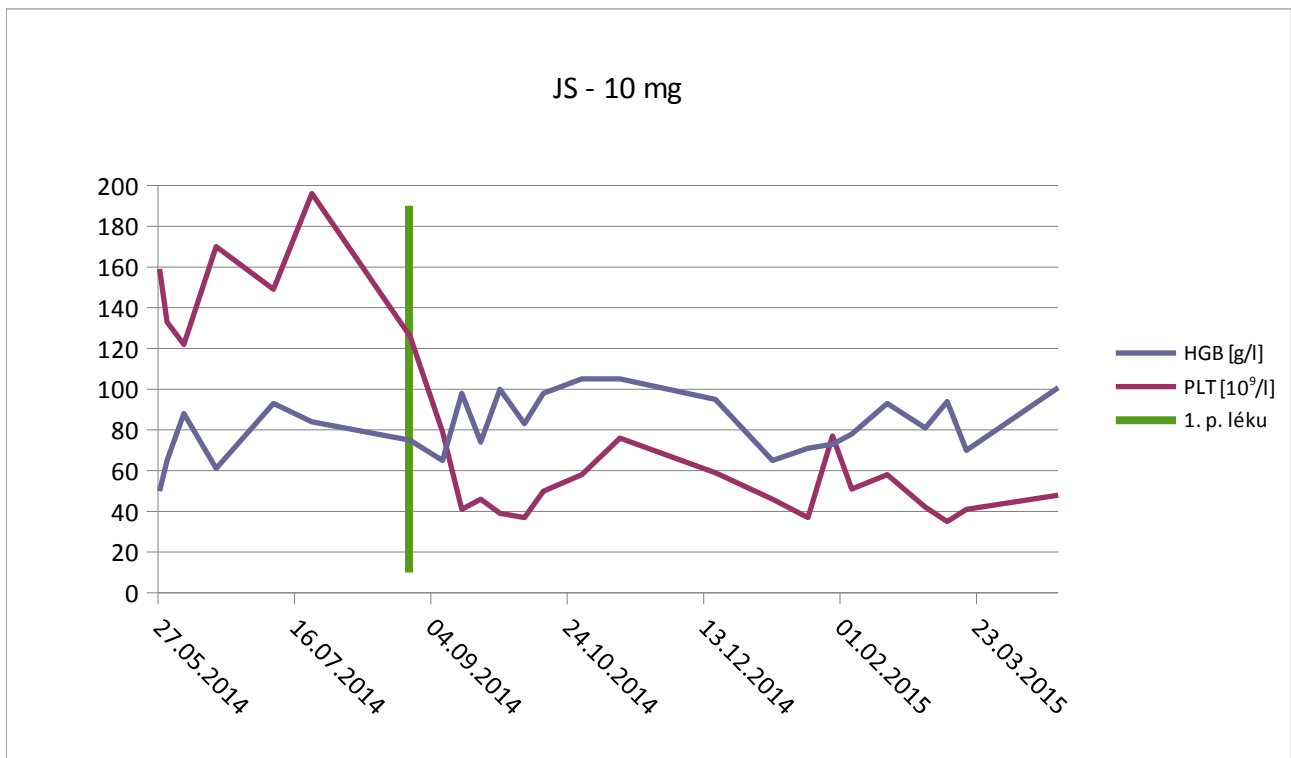
Graf 11: Pacientka AP 74 let, před léčbou HGB 88g/l PLT $260 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 112g/l PLT $95 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



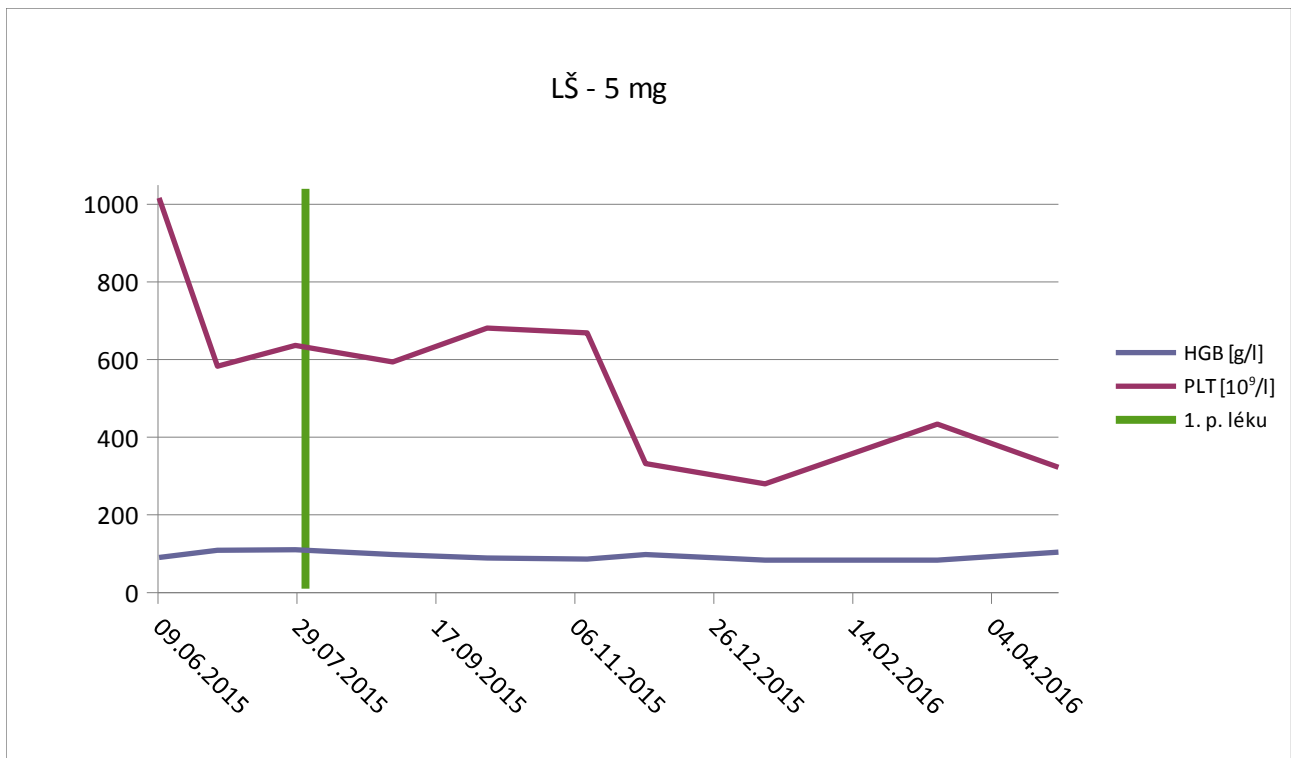
Graf 12: Pacientka JP, 72 let před léčbou HGB 73g/l PLT $232 \cdot 10^9/l$, po léčbě HGB 121g/l PLT $153 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



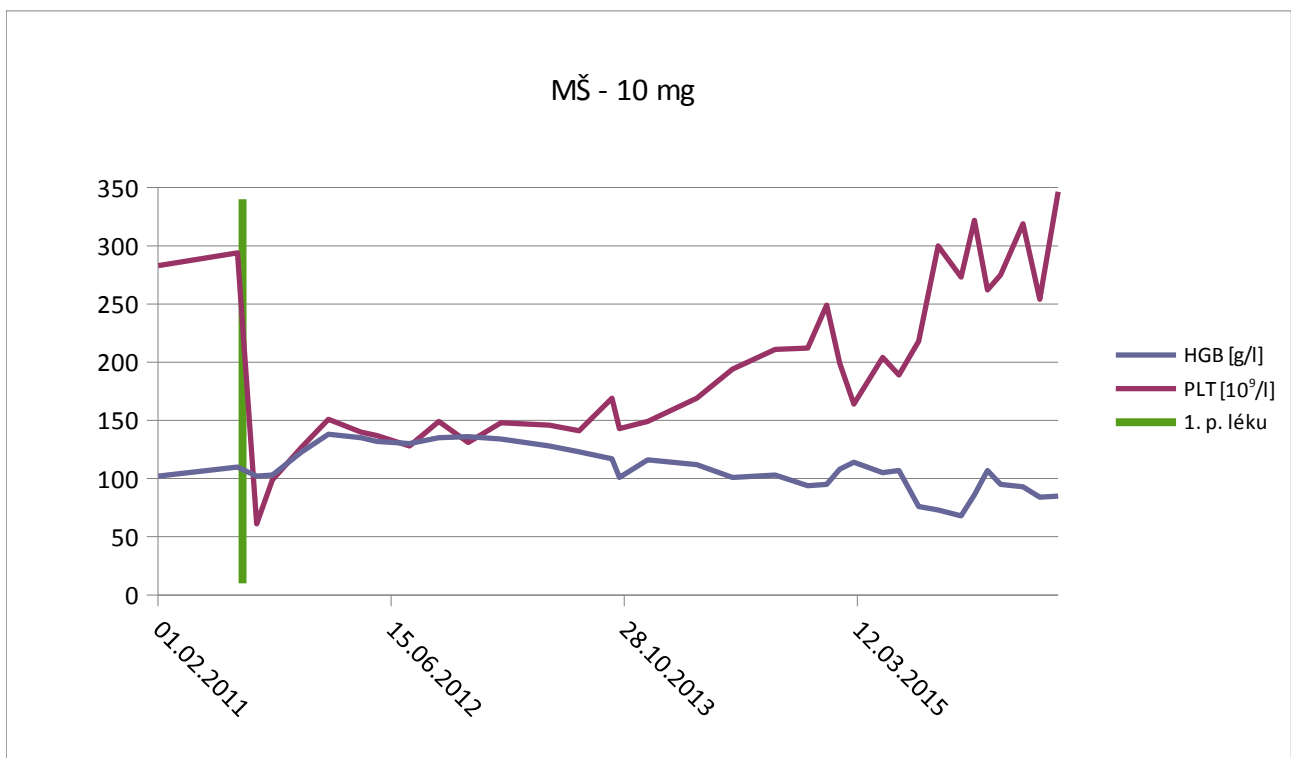
Graf 13: Pacientka MP, 74 let, před léčbou HGB 73g/l, PLT 574*10⁹/l. Po léčbě HGB 128g/l, PLT 115*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



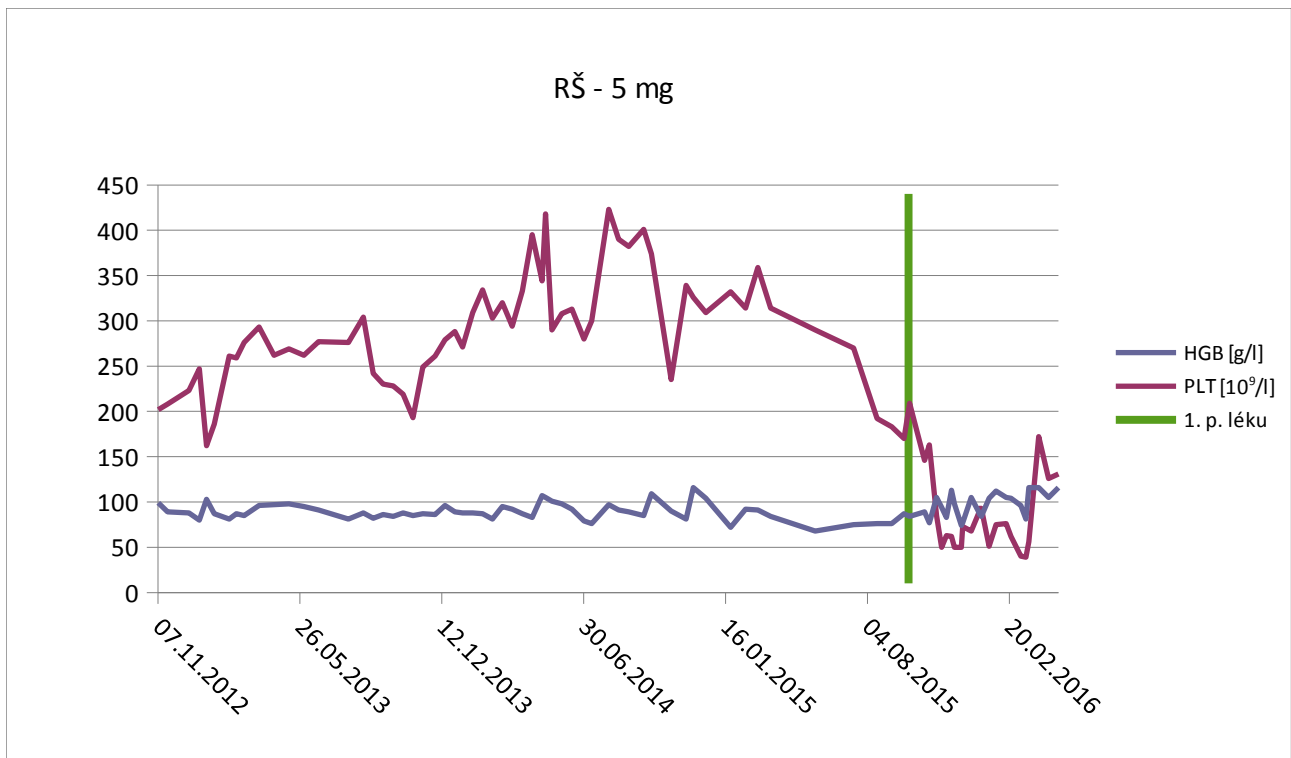
Graf 14: Pacientka JS 72 let, před léčbou HGB 75g/l PLT 126*10⁹/l. Po léčbě HGB 101g/l PLT 48*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



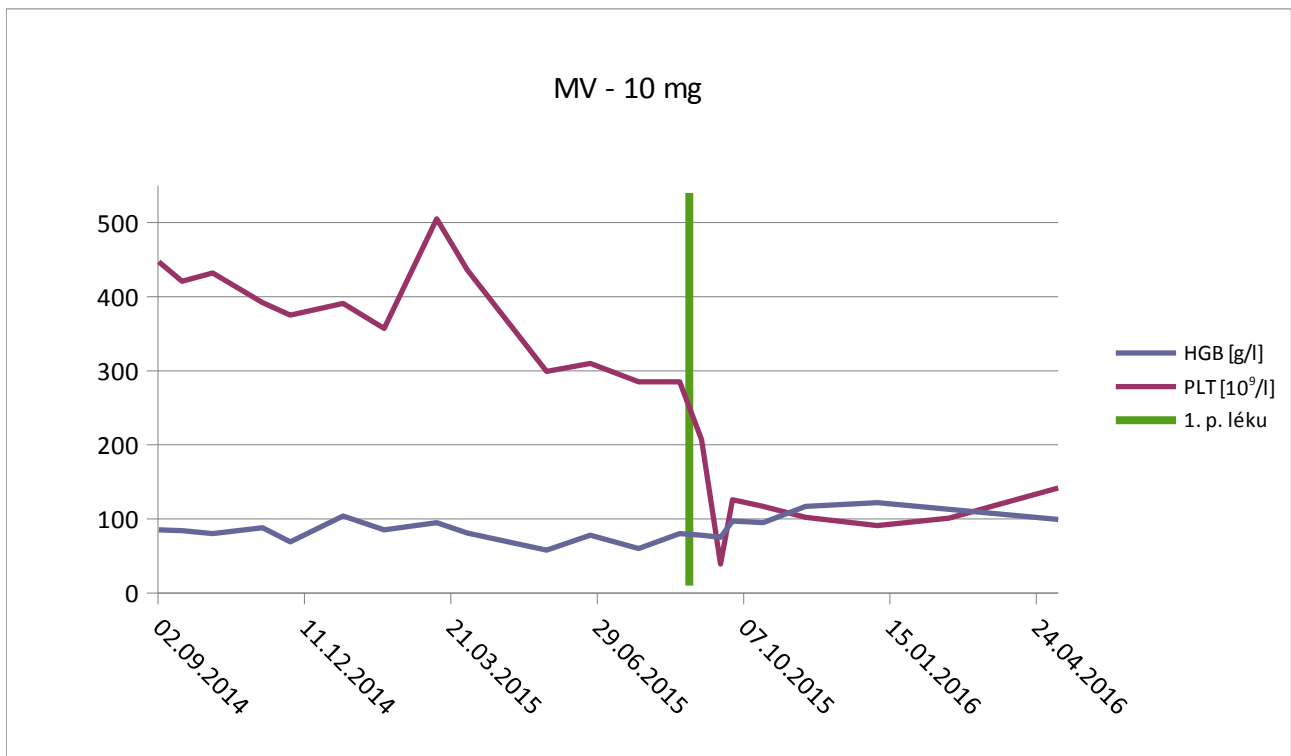
Graf 15: Pacientka LŠ 73 let, před léčbou HGB 110g/l PLT 637*10⁹/l. Po léčbě HGB 104g/l PLT 321*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu a poklesu HGB a poklesu PLT.



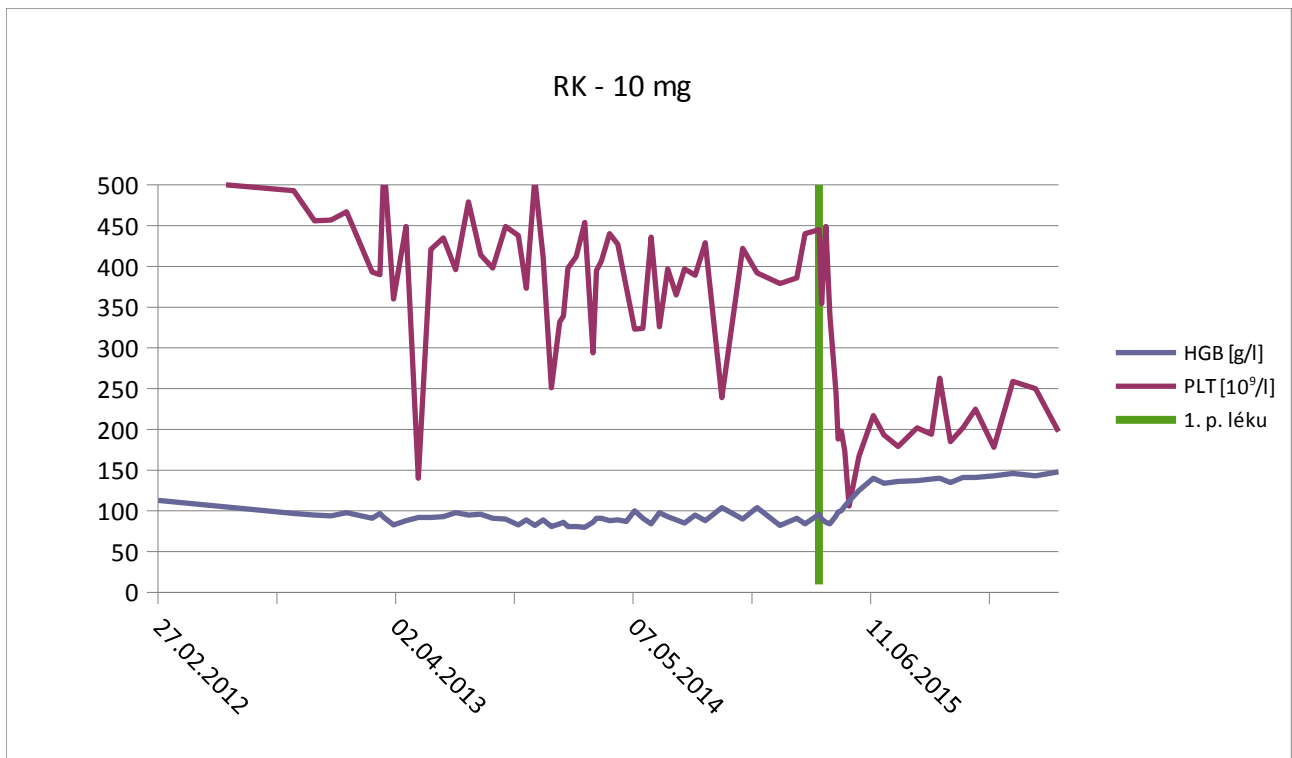
Graf 16: Pacientka MŠ 82 let, před léčbou HGB 110g/l PLT 294*10⁹/l. Po léčbě HGB 85g/l PLT 347*10⁹/l. Pacientka nereagovala na léčbu a lék byl vysazen.



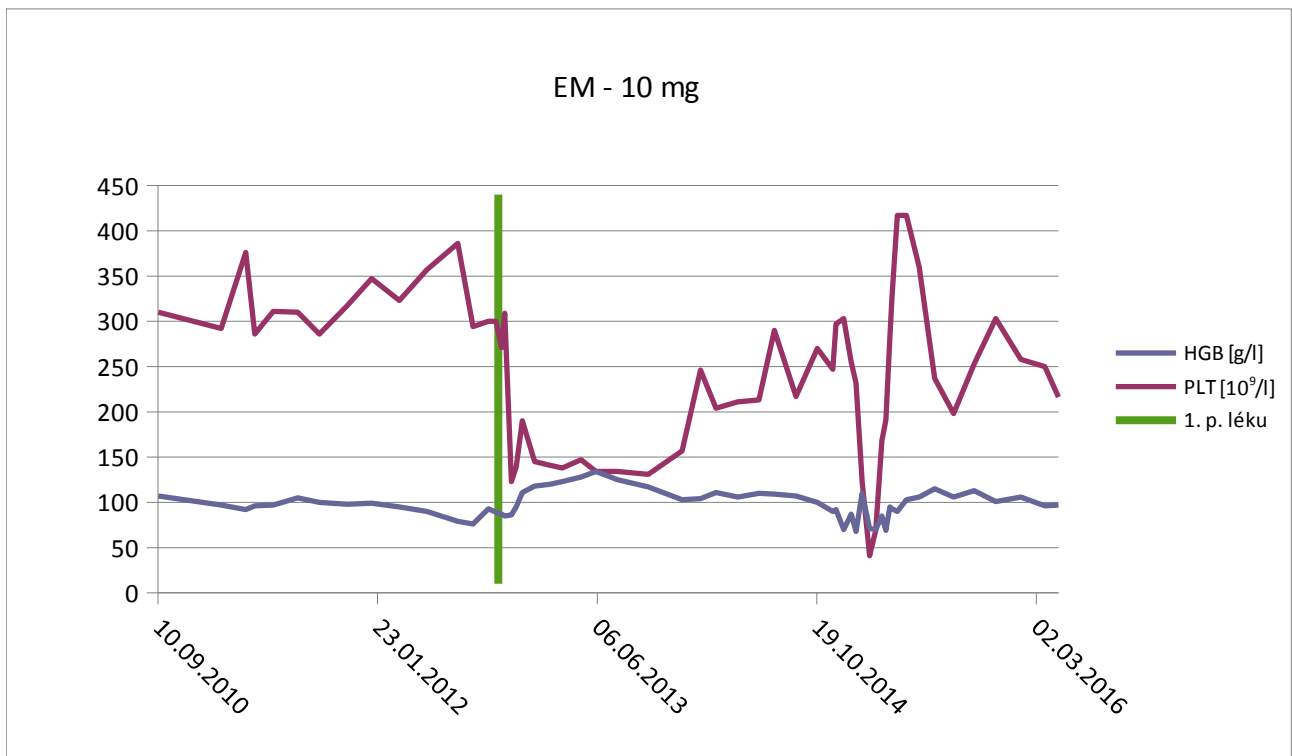
Graf 17: Pacientka RŠ, 85 let, HGB 87g/l PLT 170*10⁹/l. Po léčbě HGB 116g/l PLT 131*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



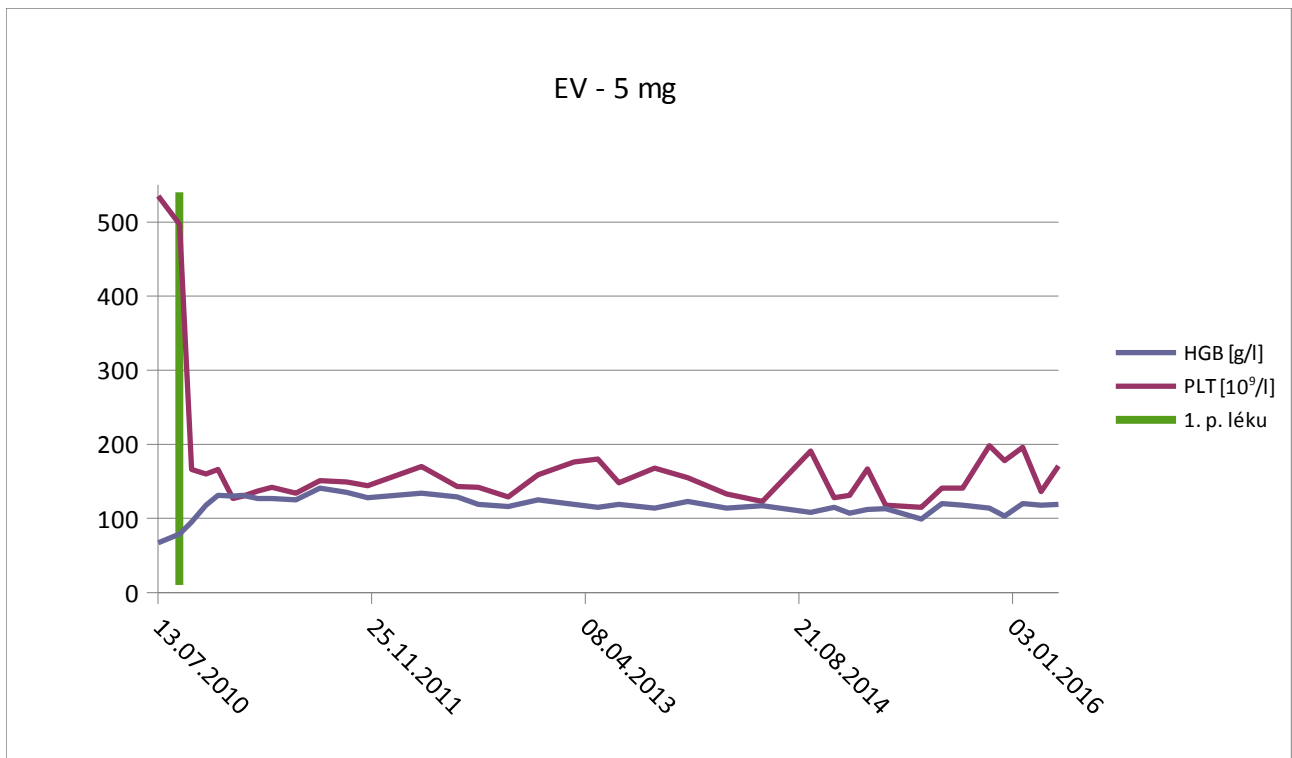
Graf 18: Pacientka MV 84 let, před léčbou HGB 80g/l PLT 285*10⁹/l. Po léčbě HGB 99g/l PLT 142*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



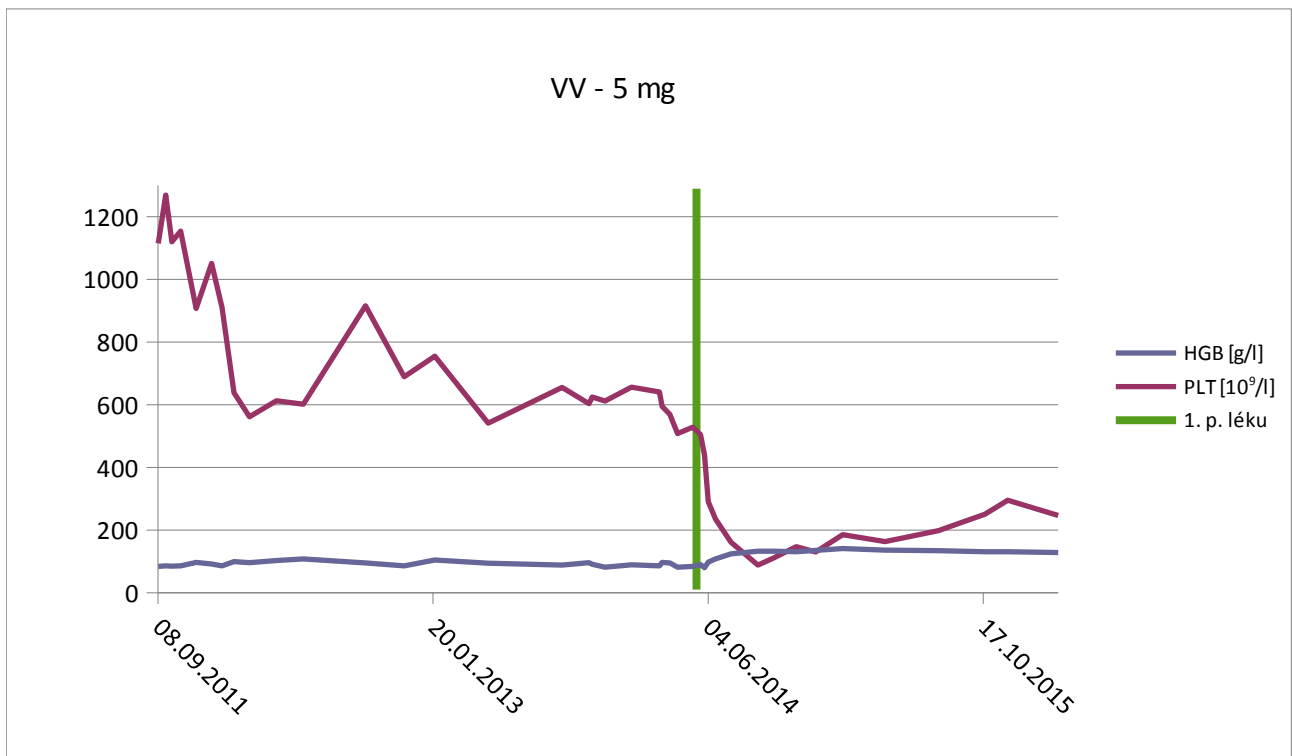
Graf 19: Pacientka RK 53 let, před léčbou HGB 96g/l PLT 445*10⁹/l. Po léčbě HGB 148g/l PLT 197*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



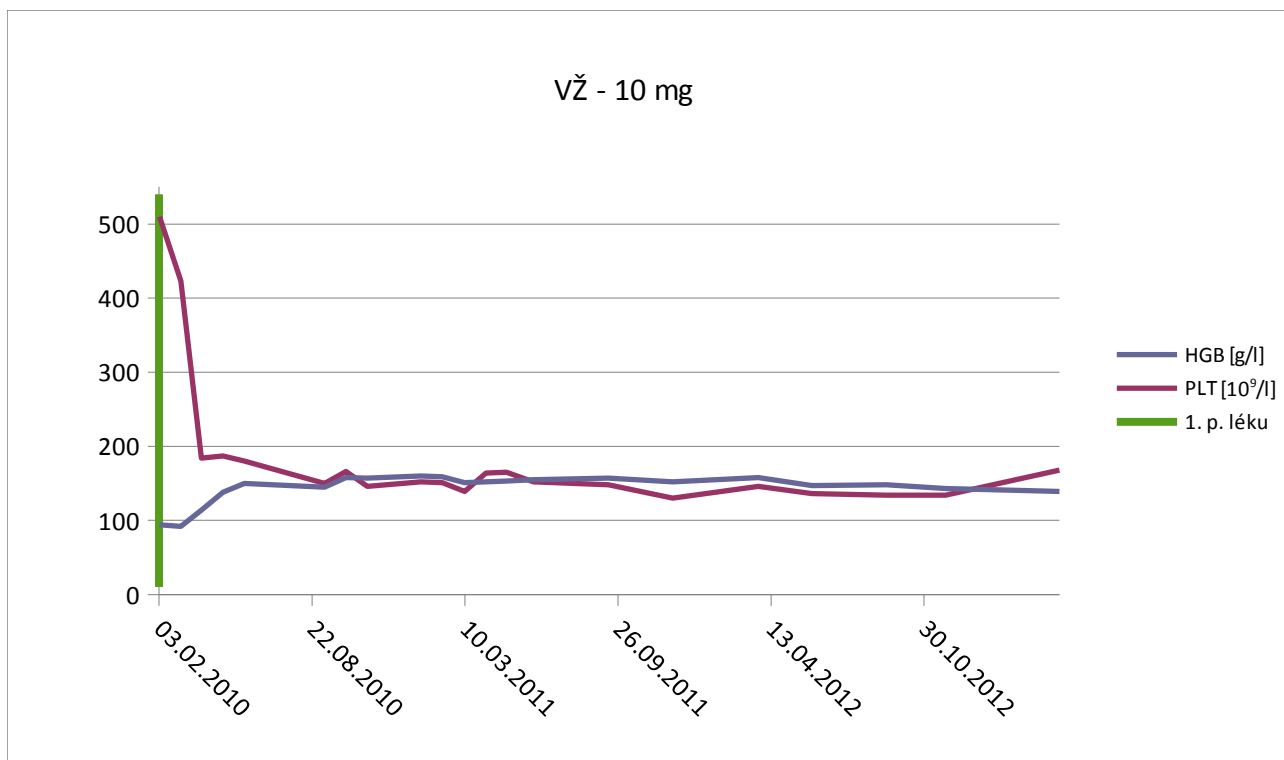
Graf 20: Pacientka EM, 74 let před léčbou HGB 87g/l, PLT 271*10⁹/l. Po léčbě HGB 97g/l, PLT 216*10⁹/l. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



Graf 21: Pacientka EV 79 let, před léčbou HGB 79g/l PLT $497 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 119g/l PLT $171 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



Graf 22: Pacientka VV 76 let, před léčbou HGB 84g/l PLT $528 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 128g/l PLT $247 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.



Graf 23: Pacient VŽ 79 let, před léčbou HGB 94g/l, PLT $510 \cdot 10^9/l$. Po léčbě HGB 139g/l, PLT $168 \cdot 10^9/l$. Po podání léku dochází k vzestupu HGB a poklesu PLT.

5. Diskuse

V naší práci jsme se zabývali vyhodnocením účinku léčby lenalidomidem na souboru 23 pacientů s MDS 5q- syndromem. K posouzení léčebné odezvy jsme využili sledování změn parametrů krevního obrazu. Nejprve jsme hodnotili všechny parametry KO, ale statisticky významné se jevily pouze hodnoty hemoglobinu a trombocytů, které vykazovaly výrazné změny již po prvním podání léku a poté i v průběhu další léčby.

V časovém období leden 2010 – květen 2016 byl těmto pacientům podáván lenalidomid ve dvou rozdílných dávkách, buď 5 mg nebo 10 mg. Preparát byl v průběhu léčení podáván, mimo ojedinělých případů, v dávkách stabilních. U všech 23 pacientů došlo po podání lenalidomidu ke zlepšení sledovaných parametrů, tzn. ke zvýšení koncentrace hemoglobinu a k poklesu počtu trombocytů. Vliv léku jsme statisticky vyhodnotili po první podané dávce lenalidomidu a pak po delším časovém období, kdy byl preparát pacientům podáván. Na základě vyhodnocení pomocí neparametrického Wilcoxonova testu lze odvodit, že ihned po podání léku byla změna HGB u sledovaného souboru pacientů nevýznamná ($p = 0,459618$). Hodnoty hemoglobinu začaly významně statisticky stoupat až po dlouhodobějším užívání lenalidomidu ($p < 0,0001$). Údaje jsou uvedeny v tab. č. 2. Naproti tomu hodnoty PLT začaly klesat již po první podané dávce léčiva a tento pokles PLT byl dlouhodobý ($p < 0,0001$ v obou případech, viz tab. č. 3).

Vliv lenalidomidu na hodnoty HGB a PLT u jednotlivých nemocných je podrobněji znázorněn v grafech 1 – 23. Z důvodů vedlejších účinků byla u několika pacientů dávka snížena, nicméně i nadále tito pacienti vykazovali zlepšení monitorovaných parametrů. Pouze u jedné pacientky (graf č. 16) byla dávka naopak zvýšena z důvodu nízké léčebné odezvy monitorovaných parametrů. Tato pacientka byla sledována v delším časovém horizontu. I přes počáteční zlepšení došlo postupně ke zhoršení sledovaných parametrů, proto byla léčba po 4 letech vysazena jako neúčinná.

Vzhledem k dobrému dlouhodobému léčebnému efektu lenalidomidu bude u zbylých 22 pacientů léčba pokračovat a k jejímu sledování budou i nadále využívány tyto parametry KO.

6. Závěr

U sledované skupiny 23 pacientů s MDS 5q- syndromem jsme zjistili výrazný přínos lenalidomidu při léčbě anemie a při redukci počtu trombocytů. Ve všech případech došlo k očekávané úpravě sledovaných parametrů KO, ve 22 případech dokonce k dlouhodobé úpravě těchto hodnot.

Nové možnosti léčby znamenají přínos pro pacienty, zlepšení kvality jejich života nebo i jejich vyléčení. Terapie lenalidomidem navíc nevede ke zvýšení rizika transformace do AML. (Kuendgen a spol. 2012) Domníváme se, že je potřeba věnovat větší pozornost pacientům s dalšími cytogenetickými aberacemi (např. s mutací p53) a se zvýšeným počtem myeloblastů. Tito pacienti mají vyšší riziko progresu choroby a je nutné u nich zvážit agresivnější terapii. (Mallo a spol. 2011)

V České republice je v rámci hematologické společnosti skupina odborníků na léčbu MDS. Každý pacient má tedy možnost konzultace a léčby ve fakultních nemocnicích v hematologických centrech, která mohou k léčbě MDS využít nejnovější terapeutické trendy. Pacienti pak nejsou závislí na transfúzích, nepodstupují riziko potransfúzní reakce a nejsou zatěžováni hromaděním toxického železa v organismu. Taktéž nedochází k oběhové zátěži. Tak jako farmaceutické firmy vyvíjely a vyvíjí nové léky, zdokonalují se i přístroje pro hematologická stanovení. I přesto nám základní parametry krevního obrazu stále podávají nejdůležitější informace a hematologická laboratoř zůstane v této oblasti pro lékaře spolehlivým pomocníkem a partnerem. Vyšetření krevního obrazu v moderně vybavené laboratoři umožňuje rychlou a dostupnou informaci o účinnosti sledované léčby pacientů s MDS, proto je spolupráce laboratoře s lékařem velmi důležitá.

7. Použitá literatura

- BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., et. al.: *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol 1982, 51(2), s.189-199. ISSN 0007-1048
- BROYL A., KUIPER R., VAN DUIN M., et al.: *High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance*. Blood, 2013, 121, s.624-627. ISSN 0006-4971
- ČERMÁK J.: *Myelodysplastický syndrom, Doporučené postupy pro praktické lékaře*. Reg. č. o/017/301, 2002. www.cls.cz/dokumenty2/os/t301.rtf [online]15.6.2016 [cit.2016-06-15]
- ČERMÁK J., KAČÍRKOVÁ P.: *Co je to myelodysplastický syndrom? Diagnostika, klasifikace a prognóza nemocných*. Časopis lékařů českých, 2004, 143(6), s.423-427. ISSN 0008-7335
- FENAUX P., GIAGOUNIDIS A., MUFTI G., et al.: *MDS-004 Lenalidomide del5q Study Group. A randomized phase 3 study of Lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del 5q*. Blood, 2011, 118(14), s.3765-3776. ISSN 0006-4971
- GERMING U., LAUSEKER M., HILDEBRANDT B., et al.: *Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): a multicenter study*. Leukemia, 2012, 26, s.1286-1292. ISSN 0887-6924
- GREENBERG P.L., TUECHLER H., SCHANZ J., et al.: *Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndrome*. Blood, 2012, 120(12), s.2454-2465. ISSN 0006-4971
- HELLSTROM-LINDBERG E., GIAGOUNIDIS A., FENAUX P., et al.: *Update on the safety and long-term outcomes in Lenalidomide-treated patients with red blood cell transfusion-dependent low-/int-1-risk myelodysplastic syndromes and del (5q)*. Haematologica, 2012, 97(Suppl 1), s.358-359. ISSN 0390-6078
- HELLSTROM-LINDBERG E., NEGRIN R., STEIN R., et al.: *Erythroid Response to Treatment with G-CSF plus Erythropoietin for the Anaemia of Patients with Myelodysplastic Syndromes: Proposal for a Predictive Model*. Br J Haematol., 1997, 99, s.344-351. ISSN 0007-1048
- HOCHOVÁ I., NEUWIRTOVÁ R., VODIČKOVÁ E., et al.: *Myelodysplastický syndrom. Diagnostický atlas*. Praha, Maxdorf, s.r.o., 2006, s.12-19. ISBN-80-7345-088-7
- http://hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/referencni_meze.php
[online]10.6.2016 [cit.2016-06-10]
- JONASOVA A., BOKOROVA R., POLAK J., et al.: *High level of full length cereblon mRNA in lower risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficiency of Lenalidomide*. European Journal of Hematology 2014, doi:10.1111/ejh.12457. ISSN 1600-0609
- JONASOVA A., CERMAK J., NEUWIRTOVA R., et al.: *Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q-MDS(IPSS low and intermediate-1)*. Leuk Res, 2012, 36(12), s.222-224. ISSN 0145-2126

- JONÁŠOVÁ A., ČERVINEK L., BĚLOHLÁVKOVÁ P., ČERMÁK J., BELIČKOVÁ M., ROHOŇ P., ČERNÁ O., HOCHOVÁ I., ŠÍŠKOVÁ M., KAČMÁŘOVÁ K., JANOUŠOVÁ E.: *První české zkušenosti s Lenalidomidem v terapii anemických nemocných s myelodysplastickým syndromem s delecí dlouhého ramene 5. chromozomu*. Vnitřní lékařství, 2015, 61(12), s.1028-1033. ISSN 0042-773X
- JONÁŠOVÁ A., NEUWIRTOVÁ R.: *MDS od FAB klasifikace k dnešku. Nové podjednotky či samostatné skupiny?* Transfuze a hematologie dnes, 2003, 9, s.5-12. ISSN 1213-5763
- KUENDGEN A., LAUSEKER, M., LIST A. et al.: *Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low-or intermediate-1-risk MDS with del(5q) a comparative analysis*. Leukemia, 2012, 27(5), s.1072-1079. ISSN 0887-6924
- LIST A., KURTIN S., ROE D.J., et al.: *Efficacy of Lenalidomide in myelodysplastic syndromes*. N Engl J Med., 2005, 352(6), s.549-57. ISSN 0028-4793
- MALLO M., CERVERA J., SCHANZ J., et al.: *Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q*. Leukemia 2011, 25, s.110-120. ISSN 0887-6924
- MUSTO P., FALCONE A., SANPAOLO G., BODENIZZA C.: *Combination of erythropoietin and thalidomide for the treatment of anemia in patients with myelodysplastic syndromes*. Leuk Res., 2006, 30(4), s.385-388. ISSN 2090-3219
- NEUWIRTOVÁ R.: *Erythropoetin v léčbě myelodysplastického syndromu*. Klin. Onkol., 1998, 11, s.9-21. ISSN 0862-495X
- NEUWIRTOVÁ R.: *Přehled konzervativní léčby myelodysplastického syndromu v průběhu dvaceti let a nové léky pro zítřek*. Transfuze a Hematologie dnes, 2004, 4, s.161-168. ISSN 1213-5763
- PECKA M.: *Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín, FINIDR, 2006, s.248-251. ISBN 80-86682-02-01
- PECKA M.: *Praktická hematologie. Laboratorní metody*. Český Těšín, FINIDR, 2010, s.67,73,75, 77,79. ISBN 978-80-9038-71-9-5
- RAZA A., MEYER P., DUTT D., et al.: *Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes*. Blood, 2001, 98(4), s.958-965. ISSN 0006-4971
- SILVERMAN L.R., DEMAKOS E.P., PETERSON B.L., et al.: *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B*. J Clin Oncol., 2002, 20, s.2429-2440. ISSN 0732-183X
- System XE 5000 - <http://www.systemx.com> [online]12.4.2016 [cit.2016-04-12]
- ŠÍŠKOVÁ M., DOHNALOVÁ A., NEUWIRTOVÁ R., et al.: *Mezinárodní prognostický bodovací systém u pacientů s primárním myelodysplastickým syndromem*. Sborník Lékařský, 2002, 103(3), s.333-338
- VARDIMAN JW, HARRIS NL, BRUNNING RD.: *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002, 100, s.2292-2302. ISSN 0006-4971