

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana M. Šefer

***Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija
za nastanak tromboembolijskih komplikacija
kod bolesnika sa Filadelfija-negativnim
mijeloproliferativnim neoplazmama***

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Dijana M. Šefer

***The significance of platelet-leukocyte
interactions for the development of
thromboembolic complications in patients
with Philadelphia-negative myeloproliferative
neoplasms***

doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

MENTORI

Prof dr Predrag Miljić, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladan Čokić, naučni savetnik
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

Prof dr Mirjana Gotić, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof dr Andrija Bogdanović, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof dr Ivana Urošević, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je urađena na Klinici za hematologiju, Kliničkog centra Srbije, pod rukovodstvom Prof dr Predraga Miljića.

Istraživanje u ovoj disertaciji izvedeno je u okviru naučnoistraživačkog projekta pod nazivom „Ispitivanje patogeneze hematoloških maligniteta“ (OI 175053, 2011-2016), kojim rukovodi Dr Vladan Čokić, naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, pod pokroviteljstvom Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (oblast Biomedicina, projektni period 2011-2016).

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje leukocitno-trombocitnih agregata u Filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama, urađen je u Laboratoriji za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju Polikliničko-dijagnostičkog odeljenja Klinike za hematologiju KCS, pod neposrednim rukovodstvom mentora Prof. dr Predraga Miljića.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje molekularno-genetskih karakteristika Filadelfija negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi, urađen je u genetskoj laboratoriji, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije i Department of Biomedicine, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje in vitro proliferativne aktivnosti u Filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama, urađen je u Laboratoriji za in vitro ćelijsku kulturu Polikliničko-dijagnostičkog odeljenja Klinike za hematologiju KCS.

Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama

SAŽETAK

UVOD: Tromboza često komplikuje klinički tok Filadelfija negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi (Ph⁻MPN) i predstavlja glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u ovim bolestima. Patofiziologija tromboze u Ph⁻MPN je složena i još uvek nije potpuno razjašnjena. Iako su poremećaji broja i funkcije trombocita dugo smatrani glavnim uzročnicima trombofilnog stanja u Ph⁻MPN, sada se sve veća pažnja posvećuje ispitivanju dinamičkih interakcija između aktiviranih trombocita, leukocita i endotela. Značaj određivanja broja leukocitno-trombocitnih (Le-Tr) agregata, kao pokazatelja intravaskularne aktivacije leukocita i trombocita, za procenu rizika od pojave trombotičnih komplikacija kod bolesnika sa Ph⁻MPN do sada je ispitivan samo u retrospektivnim studijama.

CILJ ove prospektivne studije je bio da ispita prediktivnu vrednost cirkulišućih neutrofilno-trombocitnih (Neu-Tr) i monocitno-trombocitnih (Mo-Tr) agregata i solubilnih E-, L- i P- selektina za nastanak tromboembolijskih (TE) događaja kod bolesnika sa Ph⁻MPN.

MATERIJAL I METODE: U studiju je uključeno 95 konsekutivnih bolesnika sa *de novo* Ph⁻MPN: 39 sa policitemijom verom (PV), 27 sa esencijalnom trombocitemijom (ET) i 29 sa primarnom mijelofibrozmom (PMF), kod kojih je dijagnoza bolesti postavljena prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije. Kontrolnu grupu su činila 33 zdrava volontera. Sve analize su rađene nakon dijagnoze, a pre početka antiagregatorne ili citoreduktivne terapije. Prisustvo Le-Tr agregata je ispitivano u uzorcima periferne krvi metodom multiparametarske protočne citometrije (BD FACSCalibur 4FC). Nivo Le-Tr agregata je izražavan kao procenat CD42b⁺CD61⁺ neutrofila, odnosno monocita. Koncentracija solubilnih selektina u plazmi je određivana enzimskim imunoesejem. Sve arterijske i venske tromboze, izuzev mikrocirkulatornih poremećaja, su evidentirane tokom perioda praćenja od 3.25 godina nakon dijagnoze.

REZULTATI: Tokom perioda praćenja TE komplikacije je dobilo 12.6% bolesnika sa Ph⁻MPN (arterijske 9.4%, venske 3.2%), sa prosečnim vremenom do događaja od 39

meseci. Incidenca trombotičnih događaja u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN tokom perioda praćenja je iznosila 4.36 na 100 bolesničkih godina. Nivoi Neu-Tr (26.7% vs 22.4%) i Mo-Tr (12.3% vs 17.8%) agregata se nisu značajno razlikovali između grupa bolesnika sa i bez tromboze. Posredstvom multiparametarske COX analize je dokazano da Mo-Tr predstavljaju nezavisni prediktivni faktor za nastanak tromboze (HR=1.561, 95%CI:1.007-2.420, p=0.046). Učestalost arterijske hipertenzije (HTA) je bila značajno veća u grupi bolesnika sa Ph^hMPN i trombozom, u odnosu na grupu bez tromboza (p<0.05) i dokazano je da je interakcija između Mo-Tr agregata i HTA aditivna (HR=1.975,95%CI:1.215-3.212, p=0.006). Prosečan nivo solubilnog P-selektina je bio značajno viši u grupi bolesnika sa Ph^hMPN i trombozom, nego u grupi bolesnika bez tromboze (346.89 ng/ml vs 286.39 ng/ml, p=0.034), ali on nije potvrđen kao prediktivni faktor za nastanak tromboze u COX analizi. Prosečni nivoi E- i L-selektina se nisu značajno razlikovali između grupa bolesnika sa Ph^hMPN u odnosu na prisustvo tromboze.

ZAKLJUČAK: Ovo je prva prospektivna studija koja je ispitivala ulogu Le-Tr interakcija za nastanak TE komplikacija u Ph^hMPN. Utvrđeno je da su celularni i humoralni markeri aktiviranih leukocita, trombocita i endotelnih ćelija povećani kod nelečenih bolesnika sa Ph^hMPN. Prema rezultatima ove studije samo povećani nivoi Mo-Tr agregata predstavljaju nezavistan prediktivni faktor za nastanak TE komplikacija. Konkomitantno prisustvo HTA dodatno učvršćuje prediktivnu ulogu povećane koncentracije Mo-Tr agregata. S obzirom na to da je redukcija rizika za trombozu primarni cilj terapije u Ph^hMPN, posebnu pažnju bi trebalo posvetiti lečenju HTA. Prediktivni značaj Mo-Tr agregata bi trebao biti analiziran i u modelima za procenu rizika od tromboze kod bolesnika sa Ph-MPN.

Ključne reči: Ph^hMPN, tromboze, leukocitno-trombocitni agregati, selektini, JAK2V617F, TET-2, CALR, MPL, CFC, EC, markeri koagulacije

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: hematologija

UDK broj:

The significance of platelet-leukocyte interactions for the development of thromboembolic complications in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms

ABSTRACT

BACKGROUND: Thrombosis often complicates the clinical course of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (Ph⁻MPN) and is a major cause of morbidity and mortality in these diseases. The pathophysiology of thrombosis in patients (pts) with Ph⁻MPN is complex and still not fully understood. Inappropriate activation of leukocytes, platelets and endothelial cells, with their mutual interaction represents an important mechanism of thrombosis tendency in these diseases. The importance of determining the number of leukocyte-platelet (Le-Plt) aggregates as indicators of intravascular activation of leukocytes and platelets, for assessing the risk of thrombotic complications in pts with Ph⁻MPN has so far tested only in retrospective studies.

The AIM of our prospective study was to investigate the predictive value of circulating neutrophil-platelet (Neu-Plt) and monocyte-platelet (Mo-Plt) aggregates as well as soluble selectins for occurrence of thromboembolic (TE) events in pts with Ph⁻MPN.

METHODS: The study included 95 consecutive pts with *de novo* Ph⁻MPN (39 polycythemia vera, 27 essential thrombocythemia, and 29 primary myelofibrosis), diagnosed according to WHO criteria. Control group consisted of 33 healthy volunteers. All analysis were performed after diagnosis, and before the start of antiplatelet or cytoreductive therapy. Flow cytometric analysis of Le-Plt aggregates was performed on whole blood samples anticoagulated with EDTA/CTAD. Le-plt aggregates were estimated as a fraction (%) of CD42b⁺CD61⁺ neutrophils and monocytes. The plasma levels of E-, L-, and P-selectins were determined by enzyme immunoassay. All arterial and venous thrombotic events, except microcirculatory disturbances, were recorded during mean follow-up period of about 3.25 years after diagnosis.

RESULTS: During the follow-up TE complications occurred in 12.6% Ph⁻MPN pts (arterial in 9.4%, venous in 3.2%), with mean time to TE event of 39 months. The overall incidence rate of main thrombotic events in whole group of Ph⁻MPN during the

follow-up was 4.36 per 100 pts-years. The levels of Neu-Plt (22.4% vs 26.7%) and Mo-Plt (12.3% vs 17.8%) aggregates did not differ significantly between groups of pts with and without thrombosis. Using multivariate COX proportional hazard regression model, it was proved that Mo-Plt aggregates represent independent predictive factor for thrombosis development (HR=1.561, 95%CI:1.007-2.420, p=0.046). Frequency of HTA was significantly higher in group of Ph⁺MPN pts with thrombosis compared to those without thrombosis (p<0.05), and multivariate COX proportional hazard regression model confirmed that interaction between Mo-Plt aggregates and HTA may be additive (HR=1.975, 95%CI:1.215-3.212, p=0.006). The level of soluble P-selectin was significantly higher in group of Ph⁺MPN pts with thrombosis than in group of pts without thrombosis (346.89 ng/ml vs 286.39 ng/ml, p=0.034), but has not been proved as a predictive risk factor for occurrence of thrombosis (COX proportional hazard regression model). The levels of E- and L-selectin did not differ significantly between Ph⁺MPN groups, according to the presence of thrombosis.

CONCLUSIONS: This is first prospective study investigating predictive role of Le-Plt interactions on occurrence of TE complication in Ph⁺MPN. We found that both cellular and soluble markers of activated leukocytes, platelets and endothelium are elevated in previously untreated Ph⁺MPN pts. However, only increased level Mo-Plt aggregates was shown as independent predictive risk factor for development of TE complications. Concomitant presence of HTA further strengthens predictive role of Mo-Plt aggregates. Since the reduction of thrombotic risk is a primary goal of therapy in Ph⁺MPN, special attention should be paid to the treatment of HTA. Predictive significance of Mo-Plt aggregates should be analyzed in models to assess the risk of thrombosis in pts with Ph⁺MPN.

Key words: Ph⁺MPN, thrombosis, leucocyte-platelet aggregates, selectins, JAK2V617F, TET-2, CALR, MPL, CFC, EC, coagulation markers

Research area: medicine

Area of special interest: hematology

UDC number:

Skraćenice	
MPN	Mijeloproliferativne neoplazme
Ph	Filadelfija-hromozom
Ph⁺MPN	Filadelfija-hromozom negativne mijeloproliferativne neoplazme
PV	Policitemija vera
ET	Esencijalna trombocitemija
PMF	Primarna mijelofibroza
HML	Hronična mijeloidna leukemija
HNL	Hronična neutrofilna leukemija
HEL	Hronična eozinofilna leukemija
HES	Hipereozinofilni sindrom
SM	Sistemska mastocitoza
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
EPO	Eritropoetin
TPO	Trombopoetin
IL-3	Interleukin-3
SCF	Stem ćelijski faktor
EEC	Endogene eritroidne kolonije
EC	Endogene kolonije
CFC	Ukupan broj kolonija (Colony Forming Cells)
JAK2	Janus kinaza 2
JAK2V617F	Mutacija gena za janus kinazu 2 u region 14
GM-CSF	Faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita
CALR	Myeloproliferative Leukemia Virus–MPL Kalretikulin
TE	Tromboembolije
CVI	Cerebrovaskularni insult
AIM	Akutni infarkt miokarda
TIA	Tranzitorni ishemični atak
MP	Mikropartikule
PC	Protein C
PS	Protein S
APC	Aktivirani protein C
APCR	Rezistencija na aktivirani protein C
GP	Glikoprotein
TF	Tkivni faktor
PSGL-1	P-selektin glikoprotein ligand-1
TREM-1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TNF-α	Faktor nekroze tumora- α
IL-8	Interleukin-8
VWF	Von Willebrand faktor

NO	Azot monoksid
ADP	Adenozin difosfat
MPL	(<i>Myeloproliferative leukemia virus</i>), Gen za trombopoetin
TET-2	(<i>Ten-eleven translocation-2</i>), Gen
Hk	Hematokrit
Le	Leukociti
Tr	Trombociti
Neu	Neutrofilni leukociti
Mo	Monociti
Le-Tr	Leukocitno-trombocitni
Neu-Tr	Neutrofilno-Trombocitni
Mo-Tr	Monocitno-Trombocitni
APL	Alkalna fosfataza leukocita
IPSET	Internacionalni prognostički skor za trombozu
CFU-GM	(<i>engl. Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage</i>) Matična ćelija određena za granulocitnu i makrofagnu lozu
BFU-E	(<i>engl. Burst Forming Unit-Erythroid</i>) Matična ćelija određena za eritrocitnu lozu
CFU-Mk	(<i>engl. Colony Forming Unit-Megakaryocyte</i>) Matična ćelija određena za megakariocitnu lozu
ACLA	Antikardiolipinska antitela
F1+2	Fibrin degradacioni produkti 1+2
PT	Protrombinsko vreme
aPTT	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme
AT	antitrombin
PCG	ProGlobal C
FII 20210A	Mutacija u genu za protrombin

SADRŽAJ

UVOD	1
FILADELFIJA NEGATIVNE MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZME - DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA	1
MOLEKULARNA PATOGENEZA Ph ⁺ MPN	2
TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE U Ph ⁺ MP	6
Arterijske tromboze	7
Venske tromboze	8
Mikrocirkulatorni poremećaji	9
PATOGENEZA TROMBOZE U Ph ⁺ MPN	9
PROTROMBOGENA ULOGA KVANTITATIVNIH I KVALITATIVNIH POREMEĆAJA U KRVNIM I VASKULARNIM ĆELIJAMA	10
Trombociti	10
Eritrociti	14
Leukociti	15
Mehanizmi stvaranja leukocitno-trombocitnih agregata	17
Bolesti i stanja u kojima se povećavaju leukocitno-trombocitni agregati	18
Endotelne ćelije	19
Protrombogenska uloga JAK2V617F mutacije	21
POVEZANOST DRUGIH MUTACIJA SA TROMBOFILNIM STANJEM	23
Protrombozne osobine plazme	23
FAKTORI RIZIKA ZA TROMBOZU U Ph ⁺ MPN	24
Uzrast i istorija tromboza	24
Broj ćelija krvi	25
Ostali faktori rizika	25
STRATIFIKACIJA BOLESNIKA SA Ph ⁺ MPN NA OSNOVU RIZIKA ZA TROMBOZU	27
CILJEVI	30

HIPOTEZA	31
BOLESNICI, MATERIJAL I METODE	32
Izbor bolesnika	32
Tromboembolijske komplikacije	35
Kontrolni ispitanici	36
METODE	37
Uzorkovanje krvi za laboratorijske analize	37
Analiza krvne slike	37
Rutinski testovi hemostaze	38
Enzimski imunoesej (ELISA) za kvantitativno određivanje koncentracije proteina	38
Određivanje antikardiolipinskih antitela (IgG i IgM)	39
Određivanje nivoa solubilnih selektina	40
Ispitivanje leukocitno-trombocitnih agregata	41
Bolesnici i kontrolni uzorci	41
Uzorkovanje periferne krvi i protokol za obeležavanje ćelija	41
Protočna citofluorimetrija	42
Molekularno-genetička ispitivanja	44
Izolacija granulocita iz periferne krvi	44
Izolacija DNK iz granulocita periferne krvi	45
Detekcija JAK2V617F mutacije	45
Detekcija mutacija u genu MPL	46
Detekcija mutacija u genu TET2	48
Detekcija mutacija u genu CALR	48
Sekvenciranje PCR produkata	49
Ispitivanje prisustva mutacije u genu za protrombin FII 20210A	50
In vitro ćelijska kultura	52
Uzorkovanje i priprema mononukleara za analizu	52
In vitro ćelijska kultura BFU-E i CFU-GM na podlozi od metilceluloze	53
In vitro ćelijska kultura CFU-Mk na podlozi od kolagena	54
Statistička analiza	57
REZULTATI	58
DEMOGRAFSKO-KLINIČKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA	58
KARDIOVASKULARNI FAKTORI RIZIKA ZA TROMBOZU	59

PARAMETRI KRVNE SLIKE	60
BIOHEMIJSKI PARAMETRI	62
PARAMETRI HEMOSTAZE	63
IN VITRO ĆELIJSKA KULTURA PRETHODNIKA HEMATOPOEZE IZ KOŠTANE SRŽI	64
MUTACIJE U GENIMA JAK2, TET2, MPL i CALR	66
Korelacije između prisustva genskih mutacija i markera aktivirane koagulacije	69
MARKERI AKTIVACIJE ĆELIJA KRVI	69
Leukocitno-trombocitni agregati	69
Nivoi leukocitno-trombocitnih agregata u vreme dijagnoze Ph ⁺ MPN	69
Praćenje nivoa leukocitno-trombocitnih agregata	72
Komparativni prikaz nivoa leukocitno-trombocitnih agregata na dijagnozi i na kontroli	75
Ispitivanje nivoa solubilnih selektina kod bolesnika sa Ph-MPN	81
Praćenje nivoa solubilnih selektina	85
Komparativni prikaz nivoa solubilnih selektina pre i posle terapije	85
TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE KOD BOLESNIKA SA Ph ⁺ MPN TOKOM PERIODA PRAĆENJA	88
Ispitivanje uticaja faktora vezanih za karakteristike bolesnika i faktora vezanih za odlike bolesti na nastanak tromboza nakon postavljanja dijagnoze MPN	90
Utvrdjivanje prognostičkog značaja ispitivanih parametara za pojavu tromboembolijskih komplikacija	93
DISKUSIJA	96
ZAKLJUČCI	116
LITERATURA	117

Uvod

FILADELFIJA NEGATIVNE MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZME - DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) su heterogena grupa hematoloških bolesti, koje se karakterišu abnormalnom klonskom proliferacijom matičnih ćelija hematopoze i povećanjem broja zrelih ćelija u krvi. Termin “mijeloproliferativne bolesti” je prvi upotrebio William Dameshek 1951 godine, kada je u istu grupu svrstao policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET), primarnu mijelofibrozu (PMF) i hroničnu mijeloidnu leukemiju (HML) (Dameshek 1951). Dameshek je pretpostavio da međusobna sličnost u kliničkom ispoljavanju ovih bolesti može biti rezultat povećane proliferativne aktivnosti matičnih ćelija mijeloidne loze koja nastaje, ili kao posledica “još uvek neotkrivenog stimulusa”, ili nedostatka inhibitora koji bi kontrolisao tu aktivnost.

Za razliku od HML koja se odlikuje postojanjem specifičnog molekuskog markera- Filadelfija hromozoma, ostale mijeloproliferativne neoplazme: PV, ET i PMF su se izdvojile kao “klasične”, ili Ph⁺MPN i pod tim nazivom su se zadržale i u najnovijoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) (Tefferi A, 2007a; Spivak, 2008) (Tabela 1.). Pored ovih obolenja, u grupi mijeloproliferativnih neoplazmi prema najnovijoj klasifikaciji SZO (Tefferi A, 2007a; Spivak, 2008) nalaze se i hronična neutrofilna leukemija (HNL), hronična eozinofilna leukemija (HEL), hipereozinofilni sindrom - HES, sistemska mastocitoza - SM, i neklasifikovane forme MPN-a (Swerdlow, 2008). Klasifikacija SZO je revidirana 2008 godine u odnosu na prethodnu verziju iz 2001, najviše zbog otkrića specifičnih molekularnih poremećaja, povezanih sa ovim bolestima.

Ph⁺MPN su retke bolesti, sa godišnjom incidencom koja u evropskoj populaciji iznosi 30/100.000 za PV, 24/100.000 za ET i 3/100.000 za PMF (www.orpha.net). Međutim, pretpostavlja se da zbog svog relativno indolentnog kliničkog toka mnogi slučajevi PV i ET ostanu nedijagnostikovani ili neregistrovani, pa bi stvarna incidenca ovih bolesti verovatno mogla biti znatno veća od prikazane.

Tabela 1. Klasifikacija mijeloproliferativnih neoplazmi (SZO, Swerdlow, 2008)

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN)
<ul style="list-style-type: none"> • Hronična mijeloidna leukemija (HML) • Policitemija vera (PV) • Esencijalna trombocitemija (ET) • Primarna mijelofibroza (PMF) • Hronična neutrofilna leukemija (HNL) • Hronična eozinofilna leukemija (HEL) • Bolest mast ćelija (BMĆ) • Neklasifikovane MPN (MPN-n)

Od Ph⁺MPN najčešće oboljevaju osobe starosti 50-60 godina, mada se mogu javiti i u ostalim životnim dobima. Očekivano trajanje života kod bolesnika sa PV i ET je slično kao i u normalnoj populaciji, mada može biti skraćeno usled težih komplikacija bolesti (Cervantes F, 2008), u prvom redu tromboze, ili krvarenja (Tefferi A, 2007b; Falanga A, 2012). Osim toga, smrtni ishod kod bolesnika sa Ph⁺MPN može nastati i zbog posledica fibroze koštane srži i leukemijske transformacije bolesti (Tefferi A, 2007b). Prognoza bolesti je najlošija u PMF, zbog čega je u ovoj bolesti prosečno preživljavanje znatno kraće, a 90-ih godina prošlog veka se kretalo u opsegu od 3.5 do 5 godina (Cervantes F, 2008). Ipak, primenom savremenih terapijskih principa, prosečno preživljavanje bolesnika sa PMF je znatno produženo, sa izuzetkom visokorizične kategorije bolesnika (Cervantes F, 2012).

MOLEKULARNA PATOGENEZA Ph⁺MPN

Mijeloproliferativne neoplazme su klonalna (neoplastična obolenja) što je još pokazao Dameshek 1951 na osnovu prisustva specifičnih enzimskih i genskih markera u hematopoeznim matičnim ćelijama. Iako dugo vremena molekularna patogeneza Ph⁺MPN nije bila jasna, uočeno je da ove bolesti imaju mnogo zajedničkih osobina, u prvom redu preosetljivost hematopoeznih prethodnika na citokine, kao što su eritropoetin (EPO), trombopoetin (TPO), interleukin-3 (IL-3) i stem ćelijski faktor

(SCF). Matične ćelije eritrocitne loze, koje su preosetljive na Epo, sposobne su da se umnožavaju i sazrevaju u *in vitro* uslovima u odsustvu egzogeno dodatog EPO i na polučvrstoj hranljivoj podlozi stvaraju takozvane “endogene eritroidne kolonije” (EEC). Prisustvo EEC predstavlja jedan od pomoćnih SZO kriterijuma u dijagnozi PV (Tabela 2.), ali se EEC mogu detektovati i u ET i PMF (Weinberg RS, 1997; Oppliger Leibundgut E, 2006; Goertler PS, 2005).

Takođe, Ph⁺MPN karakteriše povećano stvaranje zrelih ćelija krvi; fibroza koštane srži različitog stepena, koja može doprineti transformaciji u post-PV, ili post-ET mijelofibrozu (Barosi, 2008); ekstramedularna hematopoeza, naročito u slezini i jetri, tipična za PMF i uznapredovale faze bolesti PV i ET (post-PV i post-ET MF); sklonost ka transformaciji u akutnu mijeloidnu leukemiju; a naročito neobično visoka stopa pojave tromboza, a nešto ređe i krvarenja.

I pored ovih zapažanja, do pre 10 godina, o molekularnoj patogenezi Ph⁺MPN se znalo veoma malo. Somatska mutacija gena za janus kinazu 2 (JAK2) u regionu 14 hromozoma 9, koja je opisana 2005 godine (James, 2005; Kralovics, 2005; Levine, 2005; Baxter, 2005), bila je prva značajna molekularna abnormalnost koja je otkrivena u ovim bolestima. Janus kinaza 2 je tirozin kinaza koja reguliše aktivnost mnogih citokinskih receptora (EPO, TPO, IL-3, GM-CSF), posredstvom JAK-STAT, PI3K/Akt i ERK1/2 MAPK signalnih puteva. Mutacijom u autoinhibitornom regionu JAK2 gena, na proteinskom nivou dolazi do zamene aminokiseline valina fenilalaninom na poziciji 617 (JAK2-V617F), što za posledicu ima sintezu janus kinaze 2 koja je stalno aktivna i uzrokuje povećanu osetljivost ćelija na faktore rasta (Levine, 2007). Prisustvo mutacije donosi proliferativnu prednost ćelijama koje je poseduju, izazivajući klonalnu ekspanziju hematopoeznih prethodnika. JAK2 V617F i druge mutacije koje utiču na proliferativnu aktivnost krvnih ćelija u Ph⁺MPN, nazivaju se “fenotipskim drajver mutacijama”, jer se smatra da predstavljaju glavne okidače u patogenezi bolesti.

Tabela 2. Dijagnostički kriterijumi za PV i ET (SZO, 2008.)

Policitemija vera	Esencijalna trombocitemija
<p>Major kriterijumi</p> <ol style="list-style-type: none"> Hb > 18.5 g/dL (muškarci), ili > 16.5 g/dL (žene) <i>ili</i> Hb ili Hk > 99% referentnog opsega za uzrast, pol, ili apsolutnu visinu <i>ili</i> Hb > 17 g/dL (muškarci ili > 15 g/dL (žene) udružen sa stalnim povećanjem za ≥ 2 g/dL u odnosu na normalu, koje se ne može pripisati nadoknadi deficita gvožđa <i>ili</i> Povećana masa eritrocita > 25% iznad prosečne normalne vrednosti Prisustvo JAK2V617F ili slične mutacije <p>Minor kriterijumi</p> <ol style="list-style-type: none"> Trilinijska mijeloproliferacija u koštanoj stži Snižena koncentracija Epo Rast EEC <p>Dijagnostičke kombinacije Oba major kriterijuma + 1 minor kriterijum <i>ili</i> Prvi major kriterijum + 2 minor kriterijuma</p>	<ol style="list-style-type: none"> Broj trombocita $\geq 450 \times 10^9/L$ Proliferacija krupnih, morfološki zrelih megakariocita Isključenje prema SZO kriterijumima HML, PV, PMF, MDS, ili drugih mijeloidnih neoplazmi Potvrda JAK2V617F ili drugog markera klonalnosti <p><i>ili</i> isključenje sekundarne trombocitoze</p> <p>Svi kriterijumi moraju biti ispunjeni</p>

Epo- eritropoetin, EEC- endogene eritroidne kolonije

Jak2V617F mutacija je detektovana kod 95% bolesnika sa PV i kod 50%-60% bolesnika sa ET i PMF. Pronađena je u manjem procentu i kod nekih drugih oboljenja (hronična mijelomonocitna leukemija, mijelodisplastični sindrom, BCR/ABL negativna HML, akutna mijeloidna leukemija) (Jelinek, 2005; Vicente, 2007), ali nikad kod zdravih osoba (Lippert, 2006). Imajući u vidu činjenicu da su kod većine PV i malog broja ET i PMF bolesnika, samo mutirani aleli detektovani u hematopoeznim ćelijama, pretpostavljeno je da odnos mutiranih i nemutiranih alela utiče na fenotipske karakteristike Ph⁺MPN (Larsen, 2007).

Uzrok bolesti kod bolesnika sa Ph⁺MPN koji nemaju JAK2 V617F mutaciju, postao je predmet istraživanja. Pokazano je da i u drugim genima mogu da se jave drajver mutacije, koje ili koegzistiraju sa JAK2 V617F mutacijom, ili samostalno utiču na patogenezu ovih bolesti. Ove mutacije su pronađene u signalnim putevima koji su u interakciji sa JAK/STAT, ili su deo drugih signalnih puteva.

Kod JAK2V617F negativnih bolesnika sa PV otkrivene su mutacije JAK2 gena u egzonu 12, koje indukuju još veću aktivaciju JAK-STAT puta nego V617F alel (Scott, 2007). Zbog toga se abnormalnosti u egzonu 12 funkcionalno preklapaju sa V617F alelom, ali su tipično povezane sa “čistim” PV fenotipom (Scott, 2007).

Somatska mutacija gena za trombopoetinski receptor (MPL - *Myeloproliferative Leukemia Virus*) je prisutna kod 3-8% JAK2V617F negativnih bolesnika sa ET i PMF, ali nikada nije detektovana u PV (Pikman Y, 2006; Pardanani AD, 2006). Ova mutacija uzrokuje stvaranje aberantnog receptora za TPO, zbog zamene aminokiseline triptofan leucinom u kodonu 515 (MPLW515L). MPL receptor postaje konstitutivno aktivan, nezavisno od stimulacije TPO, čime se gube efekti fiziološke inhibicije (Staerk J, 2011). Nivoi ekspresije JAK2 i MPL proteina se tokom megakariocitopoeze sukcesivno povećavaju, čime se uspostavlja viši nivo kontrole i fina regulacija sazrevanja megakariocitnih prethodnika (Besancenot R, 2014). Na osnovu iznetih podataka se može zaključiti da su Ph⁺MPN često uzrokovane mutacijama JAK2, ili citokinskih receptora, koji zavise od JAK2, ili njihovih signala.

Velika praznina u mutacionom profilu ET i PMF je nedavno popunjena otkrićem somatskih mutacija u kalretikulinu (CALR), koje se mogu detektovati kod 20-35% bolesnika sa ET, ili PMF (Klampfi T, 2013; Nangalia J, 2013). CALR i JAK2 mutacije se međusobno isključuju kod bolesnika sa Ph⁺MPN, uz retke izuzetke (Lundberg P, 2014). Iako mehanizmi kojim mutacije CALR uzrokuju nastanak Ph⁺MPN još uvek nisu sasvim objašnjeni (Cazzola M, 2014), one takođe dovode do hiperaktivnosti JAK2/STAT signalnog puta u megakariocitnim i granulocitnim prethodnicima (Klampfi T, 2013; Rampal R, 2014).

Pored “fenotipskih drajver mutacija“ koje su direktno povezane sa sa hiperproliferacijom hematopoeznih ćelija, postoji čitav niz somatskih mutacija koje su

detektovane kod bolesnika sa Ph⁺MPN, a koje ne deluju primarno na proliferaciju, ali mogu da modifikuju i pojačaju efekte fenotipskih drajver mutacija (Vainchenker W, 2011). Zajednička osobina svih ovih genskih mutacija je da one samostalno ne mogu prouzrokovati fenotip Ph⁺MPN, pa su zbog toga nazvane „nefenotipskim drajver mutacijama“ (Skoda RC, 2015). Ove mutacije se mogu često videti i u drugim hematološkim malignitetima (mijelodisplastični sindrom, akutne leukemije) (Skoda RC, 2015). Somatske mutacije ponekad mogu prethoditi nastanku fenotipskih drajver mutacija i tada predstavljaju potencijalno predisponirajući mutacioni događaj (Schaub FX, 2009). Naime, ove mutacije mogu nastati pre, ili posle JAK2 V617F mutacije (Schaub FX, 2010). Zbog toga redosled događaja nije uvek na isti način povezan sa funkcijom gena. Kada je u pitanju TET2 mutacija, redosled događaja ima uticaj na razlike u fenotipskom ispoljavanju Ph⁺MPN, kao i na komplikacije (tromboze na primer) (Ortmann CA, 2015).

Oko 10% bolesnika sa Ph⁺MPN se nazivaju „triple negativnim“, jer kod njih drajver mutacija još nije otkrivena. Međutim, čak i „triple negativni“ bolesnici takođe pokazuju hiperaktivnost JAK2 signala (Rampal R, 2014), zbog čega se opravdano pretpostavlja da ove bolesti nastaju kao manifestacija hiperaktivnog JAK2/STAT signalnog puta. „Triple-negativni“ bolesnici sa PMF imaju lošiju prognozu od onih sa prisutnim mutacijama JAK2, MPL, ili CALR (Tefferi A, 2014), dok bolesnici sa CALR mutacijama imaju bolju prognozu od onih sa JAK2 i MPL mutacijama (Klampfi T, 2013; Rumi E, 2014; Rotunno G, 2014). Tumačenje mutacionih profila u Ph⁺MPN postaje sve interesantnije u potencijalnoj klasifikaciju podtipova i određivanju prognoze ovih bolesti.

TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE U Ph⁺MPN

Tromboza je vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa Ph⁺MPN, a naročito u PV i ET (Falanga A, 2012). Prema podacima iz velikih Evropskih studija, učestalost tromboza na dijagnozi se u PV kreće između 34 i 39%, a u ET od 10% do 29% (Tefferi A, 2007). Kumulativna godišnja stopa tromboza u PV iznosi 3-8% (Marchioli A, 2005), u ET 2-4% (Harrison CN, 2005; Gisslinger H, 2013; Carobbio A,

2011), a u PMF 2,23% (Barbui, 2010). Razlog za relativno malu incidencu tromboza u PMF verovatno leži u činjenici da mnogi drugi događaji češće komplikuju klinički tok ove bolesti (akutna leukemija, rana smrt, drugi nekardiovaskularni događaji) (Barbui, 2010). Vaskularne komplikacije kod bolesnika sa PV i ET se najčešće manifestuju u obliku arterijskih i venskih tromboza i mikrocirkulatornih poremećaja (Falanga A, 2012) (Tabela 3.). Kod bolesnika sa PV i PMF arterijske i venske tromboze se javljaju sa podjednakom učestalošću (Marchioli A, 2005, Barbui T, 2010), dok je u ET incidenca arterijskih tromboza 2-3 puta veća u odnosu na venske (Harrison CN, 2005; Gisslinger H, 2013; Carobbio A, 2011). Tromboembolijske komplikacije skraćuju očekivano trajanje života i to više u PV, nego u ET (Tefferi A, 2007; Passamonti F, 2004).

Tabela 3. Spektar trombotičnih manifestacija u policitemiji veri i esencijalnoj trombocitemiji (Preuzeto iz: Falanga A, Marchetti M. *Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:571-581)

<i>Arterijske tromboze</i>	<i>Venske tromboze</i>	<i>Mikrocirkulatorni poremećaji</i>
Infarkt miokarda	Duboke venske tromboze	Eritromelalgija
Nestabilna angina pect.	Tromboembolija pluća	Seizures
Cerebrovaskularni insult	Venske tromboze neuobičajene lokalizacije (splanhnična venska tromboza, tromboza centralnog sinusa i vena)	Migrena
Tranzitorni ishemični atak		Vrtoglavica
Akutne periferne i visceralne tromboembolije	Površinske venske tromboze (tromboflebitis)	Zujanje u ušima (tinnitus)
		Scintillating scotoma
		Amaurosis fugax

Arterijske tromboze

Arterijske tromboze čine 60-70% svih trombotičnih događaja u Ph^hMPN i najčešće se manifestuju u vidu cerebrovaskularnog insulta (CVI), akutnog infarkta miokarda (AIM) i okluzije perifernih arterija (Falanga A, 2012). U PV i ET arterijske tromboze su često prva manifestacija, koja ukaže na postojanje MPN. Rizik za pojavu arterijske tromboze u PV i ET je najveći u vreme postavljanja dijagnoze, a zatim se

tokom perioda praćenja smanjuje (Landolfi R, 2008). Prema rezultatima velikih retrospektivnih studija, trombofilno stanje se može otkriti i 5-6 godina pre dijagnoze PV (Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995). Kod bolesnika sa PV, CVI čini oko 30-40% svih trombotičnih događaja (Falanga A, 2012). Tranzitorni ishemični atak (TIA) se u PV javlja sa sličnom učestalošću kao i CVI, ali se rizik za pojavu TIA ne smanjuje pod uticajem terapije, koja značajno redukuje rizik za pojavu CVI (Marchioli R, 2005). Akutni koronarni sindrom se u PV javlja ređe i uglavnom se dijagnostikuje tokom perioda praćenja kod lečenih bolesnika. Akutne vaskularne okluzije na drugim lokalizacijama su u PV i ET češće nego u običnoj populaciji (Falanga A, 2012).

Venske tromboze

Venski TE događaji se mogu manifestovati u vidu dubokih venskih tromboza donjih ekstremiteta, tromboembolije pluća i intraabdominalnih (hepatičke, portne i mezenterične), ili cerebralnih venskih tromboza, kao i površinskog tromboflebitisa donjih ekstremiteta (Falanga A, 2012).

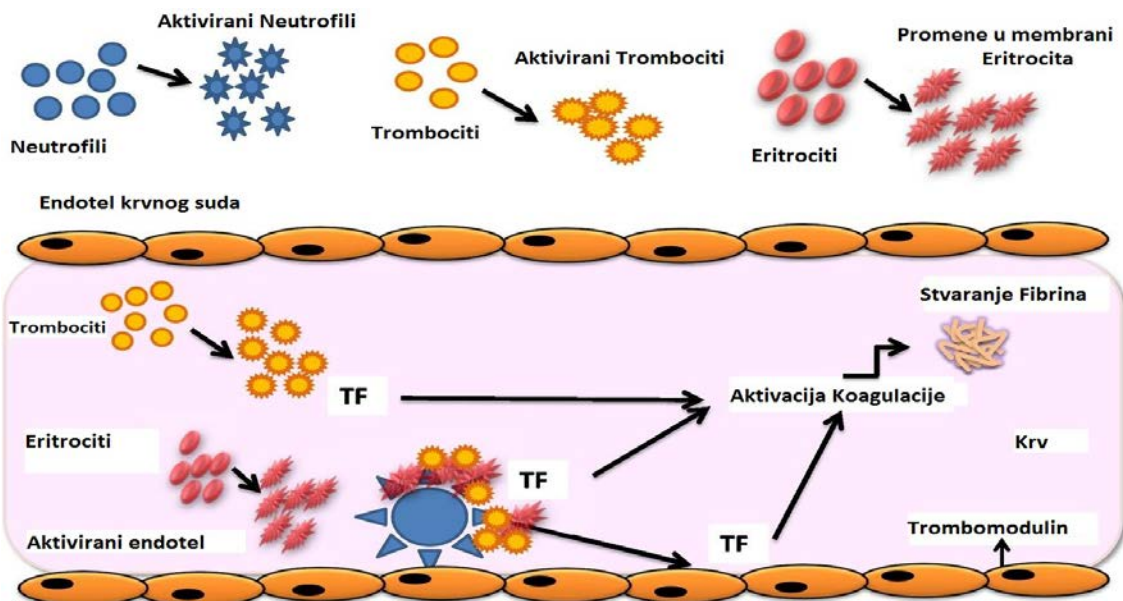
Tromboze cerebralnih sinusa i splahnhičnih (portne i hepatične) vena se češće javljaju u PV i ET, nego u PMF. Tromboze splahnhičnih vena često predstavljaju prvu manifestaciju prethodno nedijagnostikovane, ili tzv “latentne” Ph^hMPN. U studijama u koje su bili uključeni bolesnici sa splahnhičnom venskom trombozom, Ph^hMPN je dijagnostikovana kod 53% bolesnika sa Budd-Chiari sindromom i kod 40% bolesnika sa trombozom vena porte (Kiladijan JJ, 2008). Ova studija je takođe potvrdila da su bolesnici sa “latentnom” Ph^hMPN kod kojih se razvio Budd-Chiari sindrom, ili tromboza portnih vena u poređenju sa bolesnicima koji imaju “klasični” oblik Ph^hMPN, mlađi, imaju normalne parametre krvne slike i preovlađuju žene u podtipu PV (Kiladijan JJ, 2008). Pretpostavlja se da povećan protok krvi u portnom sistemu, kongestivna splenomegalija i hepatična ekstramedularna hematopoeza predstavljaju glavne uzroke nastanka tromboza splahnhičnih vena kod bolesnika sa Ph^hMPN (Kiladijan JJ, 2008).

Mikrocirkulatorni poremećaji

Mikrocirkulatorni poremećaji predstavljaju tipične trombozne manifestacije u PV i ET i rezultat su stvaranja trombocitnih tromba u distalnim arterijskim krvnim sudovima u mozgu, srcu, trbuhu i koži (Falanga, 2012). Klinički se mogu manifestovati različitim tranzitornim simptomima, kao što su eritromelalgije, tranzitorni ishemični ataci, poremećaji vida, ili sluha, Raynaud fenomen, rekurentne glavobolje, ili periferne parestezije. Disartrijska, tranzitorna monokularna slepilo, ili tranzitorna mono, ili hemipareza i drugi fokalni simptomi se ređe javljaju. Bolesnici takođe mogu doživeti tranzitornu diplopiju i iznenadne reverzibilne atake zamućenog vida (Falanga, 2012). Eritromelalgija se najčešće javlja u PV i ET, ali nikad u sekundarnoj trombocitozi, čime je potvrđeno da glavnu ulogu u nastanku ovog fenomena imaju funkcionalno poremećeni trombociti (Zucker S, 1972).

PATOGENEZA TROMBOZE U Ph^vMPN

Smatra se da sklonost tromboziranju kod bolesnika sa Ph^vMPN nastaje kao rezultat hiperrkoagulabilnog stanja u krvi čija patogeneza još uvek nije potpuno razjašnjena. Danas prevladava mišljenje da su za pojavu stečenog trombofilnog stanja u Ph^vMPN odgovorna dva mehanizma koji uključuju ulogu aktiviranih ćelija krvi i endotela (Slika 1.). Prvi mehanizam se zasniva na kvantitativnim i funkcionalnim poremećajima zrelih ćelija krvi, nastalih tumorskom proliferacijom Ph^vMPN klona (eritrociti, leukociti, trombociti), koje ispoljavaju trombofilna svojstva. Drugi mehanizam odgovoran za trombofilno stanje u Ph^vMPN prouzrokovan je inflamatornim odgovorom organizma na povećanu produkciju citokina i drugih medijatora od strane tumorskih Ph^vMPN ćelija i manifestuje se ekspresijom prokoagulantnih svojstava u normalnim vaskularnim ćelijama. U složenom procesu patogeneze tromboze, krvne i vaskularne ćelije ispoljavaju prokoagulantne, proteolitičke i adhezione osobine i sekretuju inflamatorne citokine.



Slika 1. Patogeneza trombofilije u PhMPN. (preuzeto iz: Barbui T, Finazzi G, and Falanga A. *Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. Blood, 2013; 122(13):2176-2184.*) U patogenezu stečenog trombofilnog stanja u okviru PhMPN uključene su funkcionalno poremećene ćelije tumorskog PhMPN klona (eritrociti, leukociti, trombociti), koje ispoljavaju trombofilna svojstva i normalne vaskularne ćelije, koje postaju prokoagulantne u odgovoru na inflamatorne stimulse. Inflamatorni stimulusi nastaju u odgovoru organizma na prisustvo tumorskog PhMPN klona. Aktivirani neutrofili aktiviraju hemostazni sistem različitim mehanizmima. Povećano oslobađanje proteolitičkih enzima i reaktivnih kiseoničnih grupa u cirkulaciju može aktivirati trombocite, endotelne ćelije i proteine koagulacije. Aktivirani trombociti ekspimiraju P-selektin i tkivni faktor (TF) i oslobađaju mikročestice (microparticules – MP). Povećana ekspresija CD11b na površini neutrofila omogućava adheziju sa endotelnim ćelijama i nagomilavanje koagulacionih proteaza na površini neutrofila. Biohemijske promene u ćelijskoj membrani eritrocita mogu nezavisno narušiti protok krvi posredstvom stvaranja eritrocitnih agregata. Agregiranje eritrocita olakšava interakcije između leukocita i trombocita sa zidom krvnog suda.

PROTROMBOGENA ULOGA KVANTITATIVNIH I KVALITATIVNIH POREMEĆAJA U KRVNIM I VASKULARNIM ĆELIJAMA

Trombociti

Uloga trombocitoze u patogenezi tromboza nije dokazana. Iako je u nekim studijama potvrđeno da se redukcijom broja trombocita kod bolesnika sa ET smanjuje učestalost mikrocirkulatornih poremećaja i poboljšava funkcionalnost trombocita, veza

između trombocitoze i velikih kardiovaskularnih događaja nije definitivno ustanovljena. (Elliott MA, 2005; Harrison CN, 2005a). Prediktivni značaj broja trombocita za nastanak tromboze nije potvrđen rezultatima dobijenim iz dve velike prospektivne studije (Polycythemia Vera Study Group – PVSG; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera – ECLAP) (Berk PD, 1986; Landolfi R, 2004).

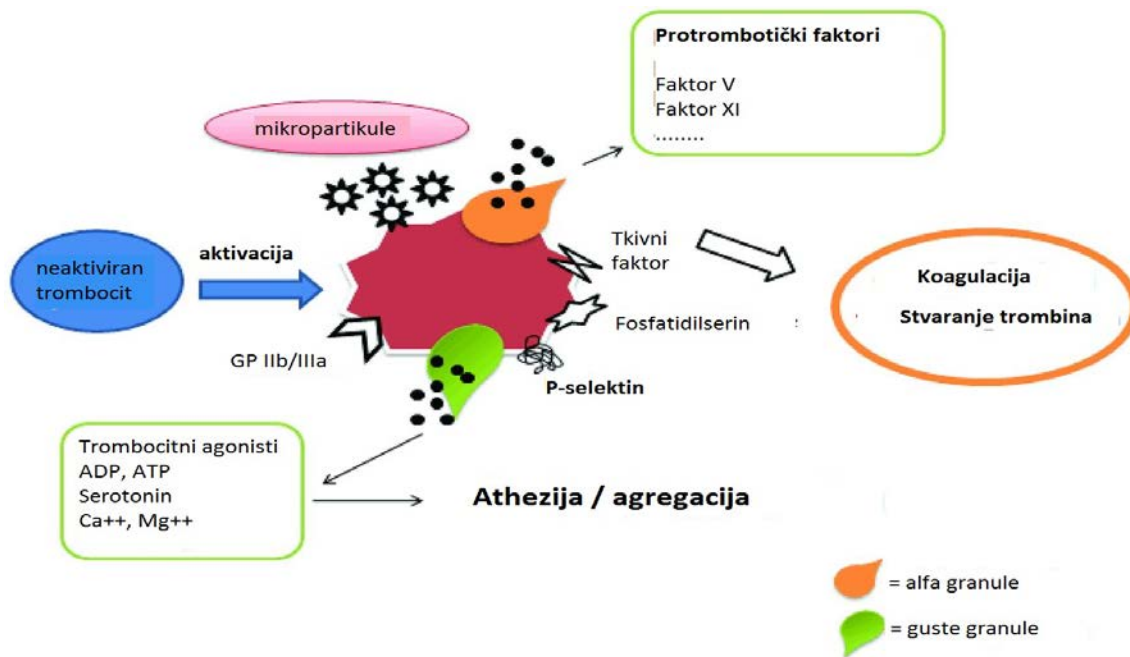
U studiji pod nazivom Primary Thrombocythemia 1 (PT1) ispitivani su bolesnici sa ET i visokim rizikom za pojavu tromboze, koji su randomizovani u dve terapijske grupe: grupu koja je primala hidroksiureu (globalni mijelosupresivni agens) i grupu koja je primala anagrelid (agens koji redukuje samo broj trombocita) (Harrison CN, 2005b). Uprkos tome što su oba leka u sličnoj meri redukovala broj trombocita, vaskularne komplikacije (arterijske i venske tromboze, ozbiljne hemoragije, smrt zbog vaskularnih događaja) su se češće događale u grupi bolesnika koja je primala anagrelid + aspirin, nego u grupi koja je primala hidroksiureu + aspirin (Landolfi R, 2004). Jedan od zaključaka iz ove studije je bio taj da je smanjenje učestalosti tromboza rezultat globalnog citoreduktivnog efekta, kakav ima hidroksiurea, a ne izolovane redukcije broja trombocita pod uticajem anagrelida. Ovakav efekat hidroksiuree je zapažen prethodno u još jednoj prospektivnoj studiji, sprovedenoj u grupi visokorizičnih bolesnika sa ET (Cortelazzo S, 1995). Naprotiv, u PMF, bolesti koju karakteriše manja učestalost kardiovaskularnih događaja nego PV i ET, dokazano je da postoji korelacija između trombocitoze i pojave tromboza (Cervantes F, 2006).

Pojava ekstremne trombocitoze ($>1500 \times 10^9/L$) je udružena sa povećanim rizikom za paradoksalnu pojavu stečenog Von Willebrand-ovog sindroma koji stvara predispoziciju ka krvarenju (Cortelazzo S, 1995). Smatra se da ovaj poremećaj nastaje zbog povećanog klirensa velikih cirkulišućih multimeri Von Willebrand faktora od strane trombocita (Landolfi R, 2006). Pokazano je da se smanjenjem broja trombocita citoreduktivnom terapijom u ovom poremećaju smanjuje i sklonost ka krvarenju (Elliott MA, 2005; Harrison CN, 2005a).

Uloga kvalitativnih promena u trombocitima u patogenezi tromboza je dokazana u PV i ET. Tako na primer, brzo povlačenje mikrovaskularnih simptoma i normalizacija testova aktivacije trombocita tokom sprovođenja terapije aspirinom u ET, sugerišu značajnu ulogu trombocita u nastanku mikrovaskularnih okluzija (eritromelalgija)

(Michiels JJ, 2006). Nasuprot neefikasnosti oralne antikoagulantne terapije, kontrola trombocitne funkcije malim dozama aspirina i normalizacija broja trombocita prevenira ponovnu pojavu mikrovaskularnih poremećaja u end-arterijalnoj i mikrovaskularnoj mreži cerebralnih, koronarnih i perifernih krvnih sudova. Rezultati ECLAP studije su potvrdili da terapija malim dozama aspirina značajno redukuje rizik od nastanka kardiovaskularnih događaja u PV (Landolfi R, 2004). Veliki broj studija je pokazao poremećaje različitih funkcija trombocita kod bolesnika sa Ph⁺MPN, ali je generalno loša korelacija između nalaza poremećene trombocitne funkcije i sklonosti trombozama, ili krvarenju.

Već duže vreme je poznato da je metabolizam arahidonske kiseline u trombocitima bolesnika sa Ph⁺MPN relativno često poremećen, da je poremećena agregabilnost i da su nivoi membranskih atezivnih molekula u njima sniženi (glikoprotein (GP) Ib, GPIIb-IIIa, GPIV i GPVI) (Landolfi R, 1995). Ipak, novija ispitivanja su dokazala da trombociti bolesnika sa Ph⁺MPN cirkulišu u aktiviranom stanju, što je potvrđeno nalazom povećane ekspresije P-selektina i tkivnog faktora (TF) (Arellano-Rodrigo E, 2006; Falanga A, 2005a, 2007) i povećane frakcije fagocitovanih trombocita u cirkulišućim neutrofilima i monocitima (Maugeri N, 2011). Smatra se da permanentna aktivacija trombocita u Ph⁺MPN dovodi do iscrpljivanja njihove funkcije i smanjenog odgovora na *in vitro* stimuluse. *In vivo*, povećana aktivnost trombocita je potvrđena na osnovu povećanja koncentracije produkata metabolizma aktiviranih trombocita u plazmi (β -tromboglobulin i trombocitni faktor-4) i u urinu (metaboliti trombosana A₂ 11-dehidro-TxB₂ i 2,3-dinor-TxB₂) (Jensen MK, 2000). Nakon aktivacije, na površini trombocita se eksprimira anjon fosfatidilserin, koji predstavlja katalitičku površinu za stvaranje trombina, što doprinosi aktiviranju koagulacionog sistema (Slika 2.).



Slika 2. Uloga trombocitnih poremećaja u nastanku hiperkoagulabilnosti krvi u Ph-MPN. (preuzeto iz: Falanga A, Marchetti M. *Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. Hematology Am Soc Hematol Edu Program. 2012:571-581.* Uloga trombocita u nastanku trombofilnog stanja u MPN je bila predmet istraživanja u mnogim studijama. Sada je međutim jasno da glavni element u riziku od tromboze nije broj trombocita, već njihovi funkcionalni poremećaji. Dokazano je da povećana ekspresija P-selektina, trombospondina i aktiviranog receptora za fibrinogen pozitivno koreliraju sa nastankom tromboze. Formiranje leukocitno-trombocitnih agregata, aktivacija trombocita i oslobađanja mikropartikula u cirkulaciju takođe učestvuju u patogenezi tromboze kod ovih bolesnika. Mikropartikule izložene dejstvu anjonskom fosfatidilserinu, obezbeđuju katalitičku površinu za stvaranje trombina, što dodatno pojačava aktivaciju trombocita.

U skladu sa ovim nalazima, kod bolesnika sa PV i ET je dokazano da je povećano stvaranje trombina povezano sa povećanom aktivacijom trombocita i povećanom frakcijom novoformiranih, nezrelih trombocita (Panova-Noeva M, 2011a). Kod zdravih osoba, do 2% cirkulišućih trombocita čine nezreli, ili retikularni trombociti. Njihov broj odražava intenzitet trombocitopoeze i u direktnoj je korelaciji sa proliferativnom aktivnošću megakariocita. In vitro studije su pokazale da novoformirani trombociti imaju viši nivo hemostatske aktivnosti u poređenju sa zrelim, što je dokumentovano većim odgovorom na trombin i većom ekspresijom P-selektina (Harrison P, 1997).

Dokazano je takođe da citoreduktivna terapija hidroksiureom značajno smanjuje učestalost trombotičnih događaja u PV i ET (Panova-Noeva M, 2011b), što ukazuje na

važnost potiskivanja patološkog klona prekomerno aktiviranih trombocita u redukciji trombotičnih komplikacija.

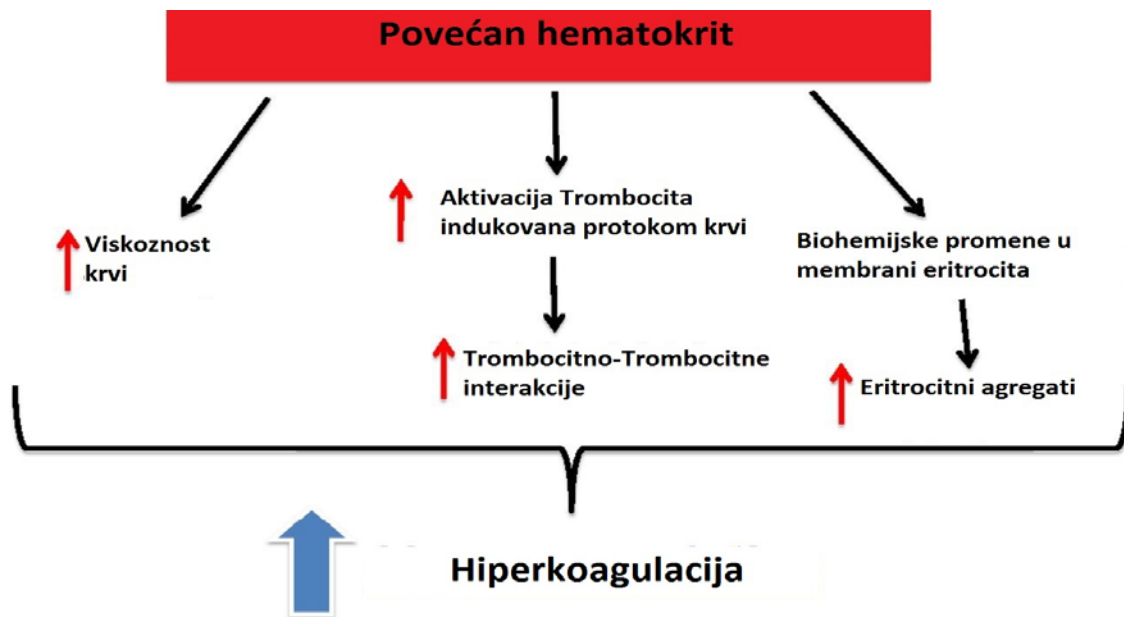
Uticao trombopoetina (TPO) i njegovog receptora (c-MPL) na funkciju trombocita u Ph⁺MPN je takođe ispitivan u mnogim studijama. Snižena ekspresija c-MPL na površini trombocita i megakariocita je dokazana u PV i PMF, ali ne i u ET (Falanga A, 2012). Pored toga je pokazano da kod bolesnika sa Ph⁺MPN TPO indukuje agregaciju trombocita i sekreciju gustih granula u odgovoru na standardne stimulse (kolagen, adenzin difosfat – ADP, epinefrin) (Pecquet C, 2012). Postoji mogućnost da konstitutivna aktivacija c-MPL u JAK2 V617F pozitivnim trombocitima čini ove ćelije reaktivnijim na stimulse i da na njihovoj membrani dovodi do povećane ekspresije P-selektina.

Eritrociti

Povećane vrednosti hematokrita su kod bolesnika sa PV udružene sa povećanim rizikom od pojave tromboembolijskih događaja, mada mehanizam ove veze nije potpuno jasan (Adams BD, 2010) (Shema 1.). Čak i blago povećane vrednosti hematokrita mogu biti važan faktor koji uzrokuje okluzivnu vaskularnu bolest, naročito u cerebralnoj cirkulaciji, što je posledica povećane viskoznosti krvi.

Pri visokim vrednostima Hk (47%-53%) protok krvi kroz cerebralne krvne sudove je značajno usporeniji nego što je pri nižim vrednostima Hk (36%-46%). Kod nelečenih bolesnika sa PV, većina trombotičnih događaja se dešava u cerebralnoj cirkulaciji, koja je naročito osetljiva na hiperviskoznost krvi. U arterijskom delu vaskularnog korita, povećana masa eritrocita potiskuje trombocite prema zidu krvnog suda, što dovodi do njihove aktivacije i povećanja trombotičnih interakcija. U venskom delu vaskularnog korita, protrombogeni efekat se pripisuje hiperviskoznosti, koja usporava protok krvi. Ključni cilj u terapiji PV jeste smanjenje hiperviskoznosti krvi, ali je pokazano da izolovano smanjivanje hematokrita venepunkcijom nije dovoljno za eliminaciju rizika od tromboze. Ovo je posledica činjenice da je mehanizam tromboze u Ph⁺MPN kompleksan i da pored povećane viskoznosti krvi u njemu učestvuju i drugi faktori kao što je abnormalna aktivacija trombocita (Landolfi R, 1992).

Osim toga, u eritrocitima bolesnika sa ET i PV opisane su i biohemijske promene u ćelijskoj membrani i citoplazmi, koje uzrokuju stvaranje eritrocitnih agregata i dovode do dodatnog usporavanja toka krvi (Turitto VT, 1980). Agregiranje eritrocita olakšava interakcije leukocita i trombocita sa zidom krvnog suda.



Shema 1. Protrombotični efekat povećanog hematokrita kod bolesnika sa PV i ET.

(preuzeto iz: Barbui T, Finazzi G, and Falanga A. *Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. Blood*, 2013; 122(13):2176-2184.) Povećan hematocrit može povećati rizik za trombozu različitim mehanizmima: (1) povećanjem viskoznosti krvi; (2) na mestima velikog protoka krvi, povećana masa eritrocita potiskuje trombocite prema zidu krvnog suda, olakšavajući njihovu aktivaciju i trombocitno-trombocitne interakcije; (3) pri sporijem protoku krvi u venskom koritu, hiperviskoznost povećava trombotični rizik smanjujući dodatno brzinu protoka krvi; (4) biohemijske promene u ćelijskoj membrani i intracelularnom sadržaju eritrocita.

Leukociti

Na značaj povećanog broja leukocitaza nastanak arterijskih i venskih tromboza u PV i ET ukazali su rezultati većeg broja retrospektivnih studija (Landolfi R, 2007; Carobbio A, 2007, 2008; Palandri F, 2011). Takođe, leukocitoza je potvrđena kao faktor rizika za rekurentne arterijske tromboze kod PV i ET bolesnika mlađih od 60 godina (De Stefano V, 2010). Naprotiv, leukocitoza prisutna u vreme postavljanja dijagnoze PhMPN nije potvrđena kao faktor rizika za pojavu tromboza kod niskorizičnih bolesnika sa PV i ET u retrospektivnim studijama (Gangat N, 2009).

Prediktivni značaj leukocitoze za nastanak tromboze u Ph⁺MPN još uvek nije potvrđen u prospektivnim studijama sa stratifikacijom bolesnika u odnosu na broj leukocita u vreme dijagnoze. Najnovija otkrića ukazuju na to da leukociti učestvuju u patogenezi tromboze u PV i ET posredstvom aktivacije i interakcije sa trombocitima, endotelnim ćelijama i koagulacionim sistemom (Falanga A i sar, 2012.).

Osim toga, leukociti učestvuju i u inflamatornom procesu u ateroskleroznim plakovima i na taj način doprinose pojavi vaskularnih događaja. Neutrofili, koji predstavljaju najzastupljeniju frakciju leukocita, imaju centralnu ulogu u inflamatornom odgovoru i u aktivaciji koagulacionog sistema u krvi bolesnika sa Ph⁺MPN (Falanga Ab, 2005). Aktivirani neutrofili aktiviraju hemostazni sistem različitim mehanizmima: proizvode reaktivne kiseonične grupe, oslobađaju u cirkulaciju proteolitičke enzyme iz azurofilnih granula (elastaza, mijeloperoksidaza, katepsin G) i povećano ekspimiraju β -integrin Mac 1 (ili CD11b) na svojoj membrani. Svi ovi molekuli mogu aktivirati koagulacioni sistem i indukovati trombofilno stanje (Afshar-Khargan V, 2006). CD11b antigen je konstitutivno ekspimiran na membrani leukocita, a nakon aktivacije, njegova ekspresija je povećana. Povećana ekspresija CD11b omogućava atheziju neutrofila sa endotelnim ćelijama i trombocitima i nagomilavanje koagulacionih proteaza na površini neutrofila (Afshar-Khargan V, 2006). Na osnovu povećane ekspresije CD11b i povećane koncentracije proteaza u cirkulaciji, povećana aktivnost neutrofila je dokazana kod bolesnika sa ET i PV (Falanga A, 2005a, blood 2000), kao i kod bolesnika sa PMF (Alvarez-Larran A, 2007). Ovi poremećaji su direktno korelirani sa povećanim koncentracijama biomarkera koagulacije i aktivacije endotela, na osnovu čega je donet zaključak da su aktivirani neutrofili uključeni u patogenezu hiperkoagulabilnog stanja u Ph⁺MPN.

Nekoliko studija je opisalo povećane nivoe cirkulišućih leukocitno-trombocitnih agregata u PV i ET, pripisujući taj fenomen aktivaciji leukocita i trombocita (Villmow T i sar, 2003; Falanga A i sar, 2005a; Alvarez-Larran A i sar, 2008.). Atezija trombocita za leukocite i formiranje mešovityh leukocitno-trombocitnyh agregata je rezultat interakcije između neutrofila, monocita i trombocita (Marchetti M, 2008). Postoje dokazi da aspirin inhibira interakcije između neutrofila i trombocita i smanjuje nivoe leukocitno-trombocitnyh agregata u cirkulaciji (Falanga A, 2005a).

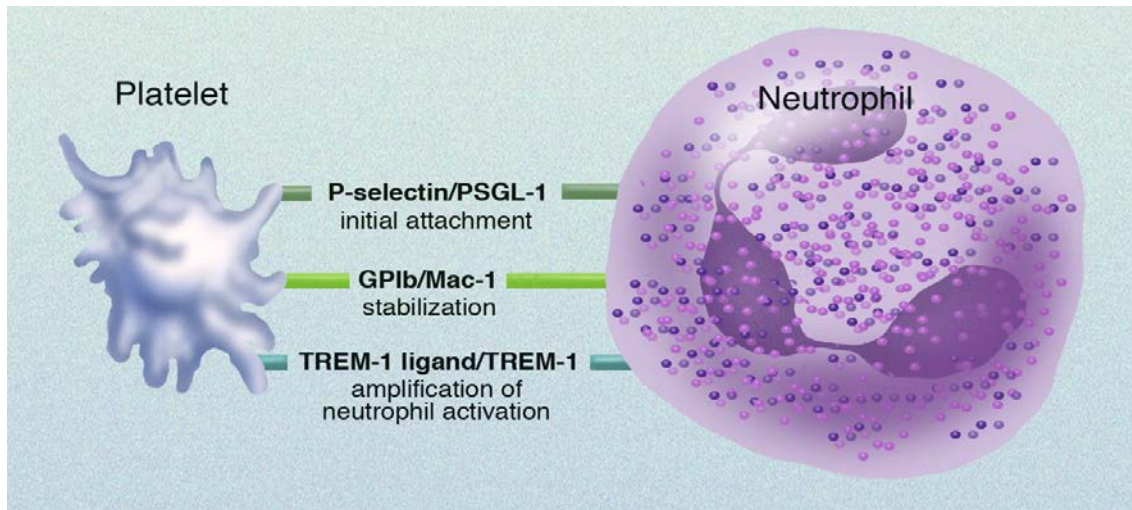
S obzirom na to da je G-CSF receptor povezan sa JAK2 putem, moguće je da konstitutivna aktivacija signala preko ovog receptora u prisustvu JAK2 V617F mutacije može biti delimično odgovorna za aktivirani fenotip neutrofila kod PV i ET bolesnika (Falanga A, 2012).

Mehanizmi stvaranja leukocitno-trombocitnih agregata

Leukocitno-trombocitne interakcije u Ph⁺MPN započinju aktivacijom kvalitativno izmenjenih trombocita (Falanga A, 2012). Interakcija aktiviranih trombocita sa leukocitima je koordinisana atezionom kaskadom događaja, čiji je krajnji ishod aktivacija leukocita. Ova kaskada se odvija posredstvom međusobnog vezivanja receptor-ligand parova sa trombocita i leukocita (Slika 3.). Aktivacija trombocita uzrokuje degranulaciju alfa granula, iz kojih se oslobađa P-selektin, koji se zatim povećano eksprimira na spoljašnjoj strani membrane trombocita. (površinski P-selektin). Aktivirani trombociti inicijalno atheriraju za leukocyte tako što se P-selektin vezuje za svoj ligand, P-selektin glikoprotein ligand-1(PSGL-1). Posle inicijalne adhezije, sledeći korak je stabilizacija agregata, koja se ostvaruje vezivanjem Mac-1 molekula (CD11b) sa površine leukocita za glikoprotein Ib (GPIb) na trombocitima. Treći receptor-ligand par, koji stabilizuje agregate i dodatno aktivira leukocyte čine „triggering receptor expressed on myeloid cells 1“ TREM-1 i TREM-1 ligand. Trombociti mogu agregirati za neutrofilne leukocyte i za monocite, formirajući dva tipa leukocitno-trombocitnih agregata: neutrofilno-trombocitne i monocitno-trombocitne.

Aktivirani trombociti indukuju aktivaciju leukocita najpre direktno, stvarajući agregate sa njima, a zatim i naknadnim delovanjem solubilnog P-selektina koji se oslobađa sa površine aktiviranih trombocita u cirkulaciju. Tako aktivirani leukociti počinju da oslobađaju reaktivne kiseonične (O₂) grupe, zapaljenske citokine (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8)) i intracelularne proteaze, koje oštećuju endotel krvnih sudova i dovode do njegove aktivacije. Iz subendotelnih ćelija počinju pojačano da se oslobađaju različiti aktivni molekuli (Von Willebrand faktor – VWF, tkivni faktor – TF) u cirkulaciju, koji se zatim vezuju za trombocite i dalje pojačavaju njihovu atezivnost. Istovremeno se iz subendotelnih ćelija smanjuje oslobađanje azot

monoksida (NO), koji je jedan od glavnih inhibitora aktivacije trombocita i leukocita. Glavna posledica svih ovih događaja je pojava hiperkoagulabilnosti krvi.



Slika 3. Receptor / ligand parovi uključeni u trombocitno-neutrofilne interakcije. (preuzeto iz: Michelson A D , and Newburger P E *Blood* 2007;110:794-795)

Bolesti i stanja u kojima se povećavaju leukocitno-trombocitni agregati

Agregati se mogu detektovati i u krvi zdravih osoba. Prema literaturnim podacima, ovi nivoi su niski i oni se kreću u opsegu od 1 do 10% na populaciji neutrofila, odnosno monocita (Macey M, i sar, 2011.). Povećanje nivoa agregata iznad fizioloških vrednosti najčešće se vezuje za bolesti i stanja u čijoj osnovi leži inflamacija, ili tromboza (Tabela 4.). Eksperimentalno je dokazano da se povećan nivo agregata često nalazi i u Ph⁺MPN i ovaj fenomen se sve više ispituje kao potencijalni marker za rano otkrivanje sklonosti ka trombozi kod ovih bolesnika.

Tabela 4. Bolesti i stanja u kojima se javljaju povećani leukocitno-trombocitni agregati

Zdrave osobe	<ul style="list-style-type: none"> • Emotivni stres • Konzumiranje cigareta • Sportski treninzi
Bolesti u trudnoći	<ul style="list-style-type: none"> • Preeklampsija • Insuficijencija placente
Bolesti vezivnog tkiva i zapaljenski sindromi	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemski lupus eritematodes • Antifosfolipidni sindrom • Reumatoidni artritis • Behcet-ova bolest
Bolesti metabolizma	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Hiperlipoproteinemije
Bolesti bubrega	<ul style="list-style-type: none"> • Hemodijaliza u HBI • Nefrotski sindrom
Neurološke i neurovaskularne bolesti	<ul style="list-style-type: none"> • Cerebrovaskularni insult • Migrena • Alzheimer-ova bolest
Bolesti krvi	<ul style="list-style-type: none"> • Mijeloproliferativne neoplazme • Transfuzije trombocitnih koncentrata
Urođena stanja i bolesti	<ul style="list-style-type: none"> • Cistična fibroza • Srpasta anemija
Bolesti respiratornog sistema	<ul style="list-style-type: none"> • Respiratorni distres sindrom odraslih • Bronhijalna astma
Bolesti kardiovaskularnog sistema	<ul style="list-style-type: none"> • Bolest koronarnih arterija (akutni infarkt miokarda, angina pectoris) • Kardiopulmonalni bajpas • Angioplastika • Duboke venske tromboze • Ishemične promene u hroničnoj venskoj insuficijenciji

Endotelne ćelije

U fiziološkim uslovima endotel krvnih sudova omogućava normalan protok krvi obezbeđujući antitrombotičnu površinu, koja inhibira ateziju trombocita i aktivaciju

koagulacije. Fiziološka ravnoteža endotela krvnih sudova kod bolesnika sa Ph^hMPN može biti narušena različitim uzrocima, a površina endotela transformisana u proathezivnu i prokoagulantnu površinu. Endotelne ćelije mogu biti oštećene dejstvom inflamatornih citokina, povećane viskoznosti krvi, reaktivnih kiseoničnih grupa i proteaza poreklom iz leukocita (elastaza, katepsin-G i mijeloperoksidaza), čime se remete funkcije endotela uključene u tromboregulaciju (Marchetti M, 2008). Povećanje broja athezionih receptora na površini aktiviranih endotelnih ćelija stimuliše lepljenje trombocita, eritrocita i leukocita za zid krvnog suda, gde se zatim aktivira proces koagulacije i taloži fibrin.

U cirkulaciji bolesnikasa Ph^hMPN dokazano je prisustvo markera aktiviranih endotelnih ćelija (trombomodulin, selektini, VWF) u visokim koncentracijama, (Falanga A, 2007, Friedenbergr WR, 2002, Cella G, 2010), za koje se zna da stimulišu stvaranje ćelijskih agregata. Poseban značaj u patogenezi tromboze u Ph^hMPN ima povećano oslobađanje VWF u cirkulaciju, jer kada se trombociti vežu za njega, postaju aktivni i sposobni da agregiraju i konsoliduju koagulum (Freidenbergr WR, 1992). Selektini predstavljaju familiju adhezionih molekula koji su eksprimirani na endotelnim ćelijama (P- i E-selektin), trombocita (P-selektin) i leukocita (L-selektin) (Carlos T, 1994). Zbog toga što se oslobađaju u cirkulaciju, njihovo prisustvo je korišćeno kao indeks endotelne, trombocitne i leukocitne aktivacije. Povećane koncentracije E-, L- i P-selektina i trombomodulina su dokazane kod ET bolesnika sa trombozom, na osnovu čega je izveden zaključak da oštećen endotel i aktivirani trombociti učestvuju u patogenezi tromboze u ovoj bolesti (Karakantza M, 2004).

Pored toga što oslobađaju supstance koje stimulišu formiranje tromba nakon oštećenja, endotelne ćelije oslobađaju i trombocitni inhibitor NO, koji je u negativnoj povratnoj sprezi sa propagacijom tromba (Freedman JE, 2003). Azot monoksid je slobodni radikal koji se stvara tokom oksidacije L-arginina u L-citrulin pod uticajem NO-sintetaze. Azot monoksid koji se oslobađa iz endotelnih ćelija je jedan od glavnih medijatora koji utiče na vaskularnu hemodinamiku i interakcije leukocita i trombocita sa endotelnim ćelijama. Ustvari, NO posreduje u vaskularnoj relaksaciji u odgovoru na vazoaktivne supstance: inhibira trombocitnu atheziju, aktivaciju, agregaciju i ubrzava trombocitnu disagregaciju. Štaviše, NO inhibira ekspresiju P-selektina na trombocitima

i sprečava ateziju leukocita za endotel. Smanjena produkcija endogenog NO može doprineti nastanku trombotičnih događaja u nekim kliničkim stanjima.

Endogeni NO je proučavan u Ph⁺MPN, a smanjena sinteza je dokazana u ET, što dodatno pojačava prokoagulantnu aktivnost (CellaG, 2010). U istoj studiji je po prvi put primećeno da bolesnici sa ET lečeni hidroksiureom imaju veće koncentracije NO u cirkulaciji, što podržava stav da hidroksiurea ima sposobnost da prevenira tromboembolijske komplikacije kod ET bolesnika (Cortelazzo S, 1995). U istoj studiji međutim, PV bolesnici su pokazali visoke koncentracije endogenog NO u poređenju sa kontrolama, koje se nisu smanjivale čak ni pod uticajem hidroksiuree. Ovakav rezultat je bio očekivan, jer je visok nivo hematokrita povezan sa povećanjem NO u krvi, što se može shvatiti kao kompenzatorni mehanizam u situacijama sa visokim rizikom za trombozu (Cella, 2010).

Novije studije su pokazale da angiogeneza igra važnu ulogu u biologiji hematoloških maligniteta, uključujući i Ph⁺MPN (Di Raimondo F, 2001). Nivoi cirkulišućih endotelih ćelija, koncentracije VEGF i drugih proangiogenih citokina, ispitivani su u Ph⁺MPN kao markeri angiogene aktivnosti. Dokazano je da je broj cirkulišućih endotelih ćelija različitog aktivacionog statusa i stepena zrelosti (u stanju mirovanja, aktiviranih, apoptotičnih, nezrelih) povećan kod bolesnika sa Ph⁺MPN (Telinski J, 2010, Belotti A, 2012, Alonci A, 2008). Svi ovi dokazi ukazuju na to da je endotel u Ph⁺MPN aktiviran i da ima važnu ulogu u nastanku hiperkoagulabilnog stanja.

Protrombogenska uloga JAK2V617F mutacije

Nekoliko studija je pokušalo da odgovori na pitanje da li JAK2V617F mutacija može specifično da aktivira hemostazni sistem (Arellano-Rodrigo E, 2006; Falanga A, 2007; Robertson B, 2007; Alvarez-Larran A, 2008). Ove studije su ukazale na to da su istovremeno celularni (trombociti i leukociti) i plazmatski odeljak hemostaznog sistema više aktivirani kod nosilaca JAK2V617F mutacije. JAK2V617F pozitivni bolesnici sa ET su imali veću ekspresiju P-selektina na trombocitima (Arellano-Rodrigo E, 2006) i veću ekspresiju CD14 i alkalne fosfataze leukocita (APL) na leukocitima (Falanga A, 2007). Kod JAK2V617F pozitivnih bolesnika sa ET je dokazana i veća ekspresija TF na

trombocitima i povećani nivoi cirkulišućih neutrofilno-trombocitnih agregata (Falanga A, 2007). JAK2V617F pozitivni bolesnici sa PMF su imali veću ekspresiju CD11b na neutrofilima i monocitima (Alvarez-Larran A, 2008).

Činjenica da trombociti i leukociti JAK2V617F pozitivnih bolesnika pokazuju osobine povećane aktivnosti, je u saglasnosti sa nalazom povećanih mešovitić ćelijskih agregata kod JAK2V617F pozitivnih bolesnika sa ET. Među parametrima hiperkoagulacije nivoi solubilnog trombomodulina su bili povećani kod ET nosilaca JAK2 mutacije (Falanga A, 2007), kao i nivoi solubilnog P-selektina u PV, ET i PMF JAK2 pozitivnih bolesnika (Robertson B, 2007). U studiji Marchetti i saradnika, u prisustvu JAK2V617F mutacije je detektovan fenotip stećene APC rezistencije (Marchetti M, 2008).

Kod JAK2 pozitivnih PV i ET bolesnika je dokazano prisustvo povećanih nivoo nezrelih trombocita (Panova-Noeva M, 2011). Takoće je dokazano da su nezreli trombociti osetljiviji na dejstvo mijelosupresivne terapije, ćime se moće objasniti povoljan efekat hidroksiuree na ishod bolesti u Ph⁺MPN, kao i na smanjenje rizika od tromboze.

U nekoliko studija su evaluirani molekularni mehanizmi kojima JAK2V617F mutacija moće uticati na protrombotićki fenotip ćelija. Ova mutacija je aktivaciona i moće povećati athezivnost eritrocita, modifikovanjem adhezionih molekula na njihovoj površini i na taj naćin olakšati nastanak tromboze, kao i izazvati povećanje odgovora trombocita promenom ekspresije c-MPL signalne transdukcije za TPO-indukovani prajming trombocita (Kubota Y, 2004). Aktivacija JAK2 je takoće ukljućena u ekspresiju TF na neutrofilima i monocitima, kroz MAPK i PI3K puteve (Rafail S, 2008).

Konaćno, prisustvo JAK2V617F mutacije je dokazano u endotelnim i hematopoeznim ćelijama bolesnika sa PV, što ukazuje na to da su endotelne ćelije ovih bolesnika ukljućene u maligni process i da kod ove subpopulacije bolesnika u osnovi bolesti leći poremećaj zajednićkog prethodnika hematopoeznih i endotelnih ćelija (Sozer S, 2011).

POVEZANOST DRUGIH MUTACIJA SA TROMBOFILNIM STANJEM

Protrombozne osobine plazme

Povećan broj i/ili aktivnost krvnih i vaskularnih ćelija je najverovatnije osnova hiperkoagulabilnog stanja kod bolesnika sa Ph^hMPN i praćen je povećanjem koncentracije markera aktivirane koagulacije u plazmi (trombin-antitrombin kompleks, protrombin fragment 1+2 i D-dimer) i markera aktivacije endotelnih ćelija (trombomodulin i VWF/faktor VIII) (Marchetti M, 2008). U nekim slučajevima, ovi poremećaji u plazmi koreliraju sa markerima aktivacije ćelija krvi (Falanga A, blood 2000). Povećanje cirkulišućih mikropartikula (MP) poreklom od ćelija krvi i prisustvo stečene rezistencije na aktivirani protein C (APC) predstavljaju važne parametre za detekciju protrombotičnog stanja kod bolesnika sa Ph^hMPN, iako prognostička uloga ovih i drugih protrombotičnih markera još uvek nije potvrđena.

Mikropartikule su fragmenti membrane aktiviranih ćelija krvi (uglavnom trombocita) i endotelnih ćelija i pretpostavlja se da imaju važnu ulogu u formiranju tromba *in vivo*. Njihova koncentracija je povećana u trombozama i malignitetima (Zwicker JJ, 2009), uključujući i bolesnike sa Ph^hMPN (Trappenburg MC, 2009). Kod bolesnika sa ET, MP imaju visok potencijal za stvaranje trombina. Osim toga, cirkulišuće MP dovode do nastanka fenotipa “stečene rezistencije na trombomodulin” kod bolesnika sa ET i PV (Duchemin J, 2010).

Protein C (PC) je serin proteaza, koja se aktivira vezivanjem trombina za endotelni receptor trombomodulin i predstavlja jedan od najsnažnijih fizioloških antikoagulanata kod ljudi. Kompleks APC i njegovog kofaktora, proteina S (PS) inhibira koagulaciju proteolitičkom inaktivacijom faktora Va i faktora VIIa. Rezistencija na inaktivaciju posredstvom APC može biti urođena, ili stečena i povezana je sa povećanim rizikom za trombozu u mnogim stanjima (trudnoća, terapija oralnim kontraceptivima, hormonska supstitucija, maligne bolesti). Pokazano je da se stečena APC rezistencija može javiti i u Ph^hMPN i da se može dokazati smanjenjem koncentracije proteina C i proteina S (Bucalossi A, 1996). Uz pomoć eseja stvaranja trombina, “fenotip APC rezistencije” je dokazan kod bolesnika sa ET i PV, a naročito

kod nosioca mutacije JAK2V617F, pogotovo ukoliko je prisutna u homozigotnom obliku (JAK2V617F alelna opterećenje > 50%) (Marchetti M, blood 2008). JAK2V617F pozitivni bolesnici imaju značajno snižene nivoe protrombina, faktora V, PS i inhibitora TF. Stečena APC rezistencija je češće zastupljena kod bolesnika sa ET koji imaju pozitivnu istoriju tromboza (Arrelano-Rodrigo E, 2009). Čini se da je sniženje koncentracije slobodnog PS u cirkulaciji glavni uzrok stečene APC rezistencije kod bolesnika sa Ph⁺MPN i ona može biti posledica proteolize PS pod uticajem proteaza iz trombocita (Brinkman HJ, 2005). Ustanovljeno je da je proteoliza PS zaista značajno povećana u ET i da se vraća se na normalne vrednosti kod onih bolesnika koji su primili hidroksiureu (HU) i normalizovali broj trombocita (Dienava-Verdoold I, 2012). Rezultati nekoliko studija (Bellucci S i sar, 2006; De Stefano V i sar, 2010; Pardanani A i sar, 2008; Etheridge SL i sar, 2014.) podržavaju činjenicu da su svi hemostatski poremećaji izraženiji kod nosilaca mutacije JAK2V617F, nego kod JAK2 negativnih bolesnika sa Ph⁺MPN. Pa ipak, uloga ovih biomarkera u identifikovanju Ph⁺MPN bolesnika sa većim rizikom za trombozu još uvek nije potvrđena u prospektivnim studijama.

FAKTORI RIZIKA ZA TROMBOZU U Ph⁺MPN

Uzrast i istorija tromboza

Rizik za nastanak tromboze je veći kod bolesnika sa Ph⁺MPN koji su imali tromboze u prošlosti i/ili su stariji od 60 godina (Falanga A, 2012) i ove dve karakteristike predstavljaju potvrđene faktore visokog rizika za trombozu u Ph⁺MPN. Značaj starosti preko 60 godina kao faktora povećanog rizika za trombozu kod bolesnika sa PV, ET i PMF je nedvosmisleno dokazan u velikom broju epidemioloških studija (Landolfi R, 2007; Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995; Marchioli R, 2005; Wolanskyj AP, 2006; Carobbio A, 2007; Alvarez-Larran A, 2007; Cortelazzo S, 1990). Takođe je dokazano da tromboembolijski događaji, koji su prethodili postavljanju dijagnoze Ph⁺MPN predstavljaju značajan nezavistan faktor rizika za nastanak

rekurentnih tromboza. Stariji uzrast i istorija prethodnih tromboza kao faktori rizika za pojavu tromboze u Ph^hMPN u interakciji pokazuju aditivan učinak (Landolfi R, 2007; Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995; Marchioli R, 2005; Wolanskyj AP, 2006; Carobbio A, 2007; Alvarez-Larran A, 2007; Cortelazzo S, 1990). Pokazano je da se tip i lokalizacija novih tromboembolijskih događaja u PV (Landolfi R, 2007; Gruppo Italiano Studio Policitemia, 1995) i ET (De Stefano V, 2006) najčešće poklapaju sa prethodnim tromboembolijskim događajima. Bolesnici sa Ph^hMPN, koji nisu imali ova dva faktora rizika, smatrani su niskorizičnim. Primećeno je međutim, da čak i mlađi bolesnici sa Ph^hMPN, koji nemaju prateće simptome bolesti, takođe imaju veći rizik za dobijanje tromboza u odnosu na opštu populaciju. U toku su istraživanja koja pokušavaju da utvrde da li postoji veza između nastanka tromboze i prisustva leukocitoze, mutacije JAK2V617F, kao i drugih genskih mutacija u okviru Ph^hMPN (Falanga A, 2012).

Broj ćelija krvi

U studiji praćenja 657 bolesnika sa ET tokom 4.5 godine (medijana praćenja) primećeno je da stepen leukocitoze ima prognostički značaj za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod mladih asimptomatskih bolesnika, iako je ova kategorija bolesnika tradicionalno smatrana grupom niskog rizika za dobijanje tromboze (Carobbio A, 2008). Značaj leukocitoze kao faktora rizika za nastanak tromboze u Ph^hMPN je ispitivan i u nekoliko drugih studija, ali sa različitim rezultatima (Tefferi A, 2012).

Ostali faktori rizika

Konvencionalni faktori rizika za aterosklerozu, uključujući hipertenziju, hiperlipidemiju, dijabetes i pušenje ispitivani su u multivarijantnoj analizi u Ph^hMPN sa različitim rezultatima (Cortelazzo S, 1995; Barbui T, 2012). Neki autori su pretpostavljali da prisustvo ovih stanja predstavlja dodatne faktore rizika koji mogu da objasne zašto neki bolesnici koji su inicijalno procenjeni da imaju nizak rizik od

tromboze ipak u toku bolesti razvijaju kardiovaskularne događaje. (Harrison CN, 2005b; Barbui T, 2012). U nedavno formiranom “IPSET-tromboza” skoru (Tabela br. 4) (Barbui T, 2012), kardiovaskularni faktori rizika su se našli među parametrima koji su značajno i nezavisno povezani sa povećanom stopom ukupnih tromboza kod bolesnika sa ET.

U nekoliko studija i tri nedavno publikovane nezavisne meta-analize ustanovljena je veza JAK2V617F mutacije sa pojavom arterijskih i venskih tromboza kod bolesnika sa ET (Ziakas PD, 2008; Dahabreh IJ, 2009; Lussana F, 2009), ali je ostala nejasna kod bolesnika sa PMF (Lussana F, 2009). JAK2V617F mutacija je dovedena u vezu sa pozitivnom istorijom tromboza u ET u retrospektivnoj studiji, koja je pratila 10-godišnju kumulativnu incidencu trombohemoragijskih događaja (Lee HS, 2012). U prospektivnoj studiji koja je uključila 173 bolesnika sa PV, Vannucchi i sar su dokazali da se relativni rizik za pojavu ukupnih tromboza povećava sa JAK2V617F alelnim opterećenjem većim od 75% (Vannucchi AM, 2007).

U retrospektivnoj studiji koja je analizirala PV i ET bolesnike je dokazano da JAK2V617F alelno opterećenje veće od 50% progresivno povećava rizik za nastanak tromboza (Carobbio A, 2009). U najnovijoj prospektivnoj studiji na bolesnicima sa PV nije dokazana značajna povezanost između JAK2V617F alelnog opterećenja i rizika za pojavu tromboza (Passamonti F, 2010).

U prisustvu MPL mutacije, veća stopa arterijskih tromboza je nađena u italijanskoj studiji (Vannucchi AM, 2008), ali ne i u PT 1 studiji (Beer PA, 2008).

Prisustvo retikulinske fibroze u koštanoj srži se pokazalo kao nezavistan prediktor tromboznih i hemoragijskih komplikacija u PT 1 studiji (Campbell PJ, 2009). Ovo otkriće je potvrđeno i u drugim studijama, koje su pokazale povećan rizik za trombozu (Finazzi G, 2012) i krvarenje (Barbui T, 2012) kod bolesnika sa PMF u ranoj fazi, u odnosu na bolesnike sa ET, definisane prema SZO klasifikaciji.

Učestalost genetskih trombofilnih faktora, kao što je faktor V Leiden, ili mutacija protrombina je bila veća kod Ph^hMPN bolesnika sa venskim trombozama, što ukazuje na to da bi ove testove trebalo raditi kod mlađih bolesnika sa porodičnom, ili ličnom istorijom tromboza (Ruggeri M, 2002; Gisslinger H, 2005; De Stefano V, 2009). Naprotiv, podaci u pogledu uloge antifosfolipidnih antitela (Jensen MK, 2002; Harrison CN, 2002) i hiperhomocisteinemije (Faurischou M, 2000; Gisslinger H, 1999) su dobijeni odavno, što onemogućava njihovu evaluaciju kod Ph^hMPN bolesnika.

STRATIFIKACIJA BOLESNIKA SA Ph^hMPN NA OSNOVU RIZIKA ZA TROMBOZU

S obzirom na to da je tromboza značajan i potencijalno izlečiv uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa Ph^hMPN, procena rizika ima velik značaj (Barbui T, 2011). Tradicionalno, stratifikacija rizika u PV i ET je koristila dva parametra da predvidi verovatnoću trombotičnih komplikacija: uzrast (<60 vs ≥60 godina) i istoriju prethodnih tromboza (pozitivna, ili negativna). Bolesnici su prema ovim kriterijumima smatrani niskorizičnim, ukoliko su bili mlađi od 60 godina i nisu imali prethodnih tromboza, a visokorizičnim, ukoliko su bili stariji od 60 godina i/ili su imali prethodne tromboze.

Primarni cilj terapije u PV ET je prevencija tromboembolijskih komplikacija, a izbor vrste terapije prevashodno zavisi od procene faktora rizika za pojavu tromboze. Stratifikacija bolesnika u rizične kategorije za pojavu tromboze se do sad vršila na osnovu prisustva nespecifičnih obeležja, kao što su starost iznad 60 godina i pozitivna istorija tromboza. Osnovni nedostatak ovih prediktivnih faktora je bio taj, što njihovo prisustvo povećava rizik za pojavu tromboza i u opštoj populaciji i što ne predstavljaju karakteristike bolesti. Utvrđeno je međutim, da prediktivni faktori kao što su starost i prethodne tromboze ne omogućavaju preciznu identifikaciju visokorizičnih bolesnika, jer je primećeno da značajan broj bolesnika sa Ph^hMPN, inicijalno označenih kao niskorizični, tokom bolesti dobiju tromboembolijske komplikacije. Predmet novih istraživanja je usmeren na ispitivanje karakteristika bolesti, kao što je povećan stepen

aktivacije krvnih i endotelnih ćelija, kao i mogućnosti da budu razmatrane kao prediktivni faktori za pojavu tromboze u Ph⁺MPN.

Da bi se dobio dodatan uvid u procenu faktora rizika, sprovedena je internacionalna studija na 1104 bolesnika sa ET. Primenom multivarijantne analize, istraživači su identifikovali stariji uzrast (>60 godina), veći broj leukocita ($>11 \times 10^9/L$), prisustvo anemije (hemoglobin $<120g/L$) i pozitivnu istoriju tromboza kao nezavisne faktore rizika za preživljavanje bolesnika (Barbui T, 2011). Takođe, stariji uzrast, anemija, i odsustvo JAK2 V617F mutacije su identifikovani kao faktori rizika za fibrotičnu progresiju; naprotiv, istorija tromboza i ekstremna trombocitoza su identifikovane kao faktori rizika za leukemijsku transformaciju (Barbui T, 2011).

Na osnovu ovih saznanja, konstruisan je Internacionalni prognostički skor za trombozu kod bolesnika sa ET (IPSET-tromboza). Korišćenjem IPSET-tromboza skora, bodovi se dodeljuju na osnovu rezultata primene multivarijantne hazard analize uzrastu (1 bod), istoriji tromboza (2 boda), kardiovaskularnim faktorima rizika (1 bod), i JAK2 V617F mutacionom statusu (2 boda). Niskorizični ET bolesnici su definisani sa skorom 0 ili 1, srednje rizični sa skorom 2 i visokorizični sa skorom 3, ili više (Tabela 5.) (Barbui T, 2012). U poređenju sa prethodnim stratifikacionim shemama, IPSET-tromboza je uspela da definiše srednjerizičnu grupu ET bolesnika. Bolesnici sa ET koji su prema standardnim kriterijumima smatrani niskorizičnim, posebno mlađi i asimptomatični sa prisutnim kardiovaskularnim faktorima rizika (pušenje, HTA, DM), svrstani su u srednjerizičnu grupu za vaskularne komplikacije (Barbui T, 2012). Nakon šire evaluacije, ovako definisane rizične grupe mogu biti uključene u buduće prospektivne kliničke studije (Barbui T, 2012).

Prema najnovijim uvidima u faktore koji doprinose nastanku tromboza u Ph⁺MPN, a takođe na osnovu mogućnosti identifikacije mutacija u JAK2 i drugim genima (uključujući CALR i MPL), verovatno je da će buduća stratifikacija uključiti nove faktore rizika. Takođe je predloženo da novi prognostički indikatori budu uključeni i u modernu shemu klasifikacije Ph⁺MPN. Kao niskorizične osobine u PV će biti uključene odsustvo leukocitoze od dijagnoze PV i dalje i hematokrit manji od 0.45. Kao niskorizične osobine u ET će verovatno biti uključeni: odsustvo leukocitoze od

dijagnoze ET i dalje, odsustvo JAK2 mutacije, prisustvo CALR mutacije i odsustvo kardiovaskularnih faktora rizika (Passamonti F, 2014).

Tabela 5. Stratifikacija rizika bolesnika sa ET na osnovu Internacionalnog prognostičkog skora za trombozu (IPSET-tromboza). (Preuzeto iz: Barbui T, Finazzi G, Carobbio A. (2012) Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*.120;5128-5133.)

Faktori rizika	Uzrast > 60 godina	1 bod
	Kardiovaskularni faktori rizika: hipertenzija, hiperholesterolemija, dijabetes, pušenje	1 bod
	JAK2 V617F mutacija-pozitivni	2 boda
	Prethodne tromboze	2 boda
Stratifikacija rizika	Nizak	0 ili 1 bod
	Srednji	2 boda
	Visok	3-6 bodova

JAK2 predstavlja Janus kinazu 2.

S obzirom na to da je smanjenje rizika za trombozu primarni cilj terapije u PV i ET, nov pristup stratifikaciji rizika bi osim prognostičkih mogao imati terapijske implikacije. IPSET-tromboza kriterijumi (i budući dodaci) su više iskorišćeni za stratifikaciju bolesnika koji uključeni u kliničke studije, nego za procenu efekta terapije (Passamonti F, 2014). Još uvek nema dovoljno dokaza koji bi podržali promene u terapijskom pristupu bazirane na ovim novim prognostičkim indikatorima (Passamonti F, 2014).

Ciljevi

Imajući u vidu da su različiti molekularni markeri koji odražavaju interakcije ćelija krvi i endotela pokazali mogući protrombogeni uticaj kod bolesnika sa Ph⁻ MPN, postavljeni su sledeći ciljevi teze:

1. Ispitati učestalost genskih mutacija i markera aktivacije ćelija krvi i endotela u Ph⁻ MPN i korelirati ih sa vrednostima standardnih parametara hemostaze i markerima aktivirane koagulacije;
2. Ispitati da li prisustvo markera aktivacije ćelija krvi i endotela može ukazati na povećanu sklonost ka trombozi u Ph⁻ MPN;
3. Ispitati korelaciju između prisustva mutacija u genima JAK2, MPL i TET2 i tromboembolijskih događaja kod bolesnika sa Ph⁻ MPN;
4. Utvrditi karakteristike *in vitro* rasta prethodnika hematopoeze poreklom iz koštane srži ili periferne krvi i njihovu povezanost sa markerima aktivacije ćelija krvi i endotela;
5. Analizirati efekat mijelosupresivne terapije na markere aktivacije ćelija krvi i endotela.

Radna hipoteza

1. Hiperplazija ćelija hematopoeze, specifične somatske genske mutacije i aktivacija leukocita, trombocita i endotelnih ćelija su parametri od značaja u nastanku i razvijanju stanja hiperkoagulabilnosti u Ph⁻ MPN, praćenog povećanjem koncentracije molekularnih markera aktivacije koagulacije.
2. Mijelosupresivna terapija je u stanju da redukuje povećanu sklonost ka tromboembolijskim komplikacijama kod pacijenata sa Ph⁻ MPN posredstvom redukcije nekih od protrombogenih činilaca navedenih pod 1.
3. Ispitivanje učestalosti genskih mutacija specifičnih za Ph⁻ MPN i njihove povezanosti sa drugim parametrima hemostaznog sistema pruža mogućnost određivanja njihove uloge u nastanku i razvoju trombofilnog stanja i doprinosi upoznavanju signalnih puteva koji posreduju u aktivaciji hemostatskog sistema.

Bolesnici, materijal i metode

Sprovođenje ove studije u okviru doktorske disertacije odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ispitivanja su sprovedena u skladu sa preporukama Konvencije o biomedicinskim istraživanjima iz Helsinkija (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1996). Svi ispitanici uključeni u studiju su bili informisani o svrsi prikupljanja biološkog materijala (koštane srži i krvi) za eksperimentalni rad i od njih je dobijena saglasnost za učešće. Takođe, svi ispitanici su dali pisani pristanak za sprovođenje svih potrebnih dijagnostičkih procedura.

Izbor bolesnika

Studija je prospektivna kohortna, a sprovedena je na Klinici za hematologiju, Kliničkog centra Srbije. U studiju su uključeni konsekutivni bolesnici, koji su na Kliniku za hematologiju upućeni zbog sumnje na postojanje mijeloproliferativne neoplazme u periodu od jula 2012. do avgusta 2013. godine i kod kojih je nakon odgovarajućeg dijagnostičkog postupka potvrđeno postojanje Ph⁺MPN.

U okviru standardnog dijagnostičkog postupka za potvrdu dijagnoze Ph⁺MPN svim bolesnicima su urađene sledeće analize: kompletna krvna slika, biohumoralni status, volumen eritrocita (kod sumnje na PV), citomorfološka analiza mijelograma, citogenetska analiza kariotipa, *invitro* ćelijska kultura prethodnika hematopoeze i patohistološki nalaz biopata koštane srži, kao i ispitivanje prisustva JAK-V617F mutacije. U svim slučajevima Dg Ph⁺MPN je postavljana primenom standardnih kriterijuma na osnovu preporuka SZO (Swerdlow i sar., 2008). Bolesnici su na osnovu istih kriterijuma, a nakon sprovednog dijagnostičkog postupka svrstavani u podtipove Ph⁺MPN: PV, ET i PMF. U studiju je uključeno 95 bolesnika sa potvrđenom dijagnozom Ph⁺MPN: 39 sa PV, 27 sa ET i 29 sa PMF. Svi bolesnici su pripadali starosnoj grupi odraslih (≥ 18 godina), a u studiju su uključeni odmah po postavljanju Dg Ph⁺MPN, a pre započinjanja citoreduktivne, antiagregacione, ili antikoagulantne terapije.

Istraživanje je obuhvatalo prikupljanje podataka (u razgovoru sa bolesnikom i uvidom u njegovu medicinsku dokumentaciju) i laboratorijske analize, a sprovedeno je u dve faze.

U fazi 1 ovog istraživanja, pre početka lečenja, kod svih bolesnika uključenih u ispitivanje su prikupljeni sledeći podaci:

- A. Demografski podaci (pol, starost) uz analizu standardnih faktora rizika za trombozu (starost > 60 godina, istorija prethodnih tromboza);
- B. Kardiovaskularni faktori rizika za trombozu (arterijska hipertenzija, hiperlipoproteinemije, diabetes mellitus, pušenje);
- C. *In vitro* ćelijska kultura prethodnika hematopoeze izolovanih iz koštane srži, ili periferne krvi, u cilju analiziranja bazičnog rasta kolonija prethodnika hematopoeze, kako spontano formiranih, tako i indukovanih primenom faktora rasta;
- D. Krvna slika, parametri hemostaze i markeri aktivacije koagulacije (protrombinsko vreme-PT, parcijalno tromboplastinsko vreme-PTT, protrombin-fragment-F1+2, antifosfolipidna antitela);
- E. Prisustvo trombofilne mutacije FII 20210A i test rezistencije na aktivirani protein C
- F. Utvrđivanje mutacionog statusa gena JAK2, TET2, MPL i CALR;
- G. Merjenje nivoa cirkulišućih leukocitno-trombocitnih agregata;
- H. Merenje bioloških markera aktivacije leukocita, trombocita i endotelnih ćelija (E-, L- i P-selektini).

Nakon postavljanja dijagnoze Ph⁺MPN, odluku o lečenju je donosio nadležni lekar, pri čemu istraživači u studiji nisu imali uticaj na izbor terapije. Odgovor na terapiju hidroksiureom je procenjivan analizom kliničkih i hematoloških parametara, a na osnovu kriterijuma Barosi G i saradnika (Barosi G i sar, 2005.)(Tabela br.1).

Faza 2 istraživanja je sprovedena šest do devet meseci od početka primene terapije, a kod bolesnika koji su primali hidroksiureu nakon postizanja kompletnog, ili parcijalnog hematološkog odgovora (Tabela 6.). U fazi 2 istraživanja su ponovljene analize pod tačkama D, F i G.

Tabela 6. Odgovor na terapiju hidroksiureom u Ph⁺MPN (prema Barosi i sar, 2005.)

PV	Kompletan	<ul style="list-style-type: none"> • Hematokrit < 45% bez flebotomije i • Broj trombocita $\leq 400 \times 10^9/L$ i • Broj leukocita $\leq 10 \times 10^9/L$ i • Normalan veličina slezine na snimku i • Odsustvo simptoma bolesti*.
	Parcijalan	<ul style="list-style-type: none"> • Hematokrit < 45% bez flebotomije i • Odgovor u ≥ 3 preostala kriterijuma.
	Bez odgovora	<ul style="list-style-type: none"> • Bilo koji odgovor koji ne zadovoljava kriterijume za parcijalni odgovor.
ET	Kompletan	<ul style="list-style-type: none"> • Broj trombocita $\leq 400 \times 10^9/L$ i • Odsustvo simptoma bolesti* i • Normalan veličina slezine na snimku i • Broj leukocita $\leq 10 \times 10^9/L$.
	Parcijalan	<ul style="list-style-type: none"> • Broj trombocita $\leq 600 \times 10^9/L$, ili smanjenje broja trombocita za više od 50% od početnih vrednosti.
	Bez odgovora	<ul style="list-style-type: none"> • Bilo koji odgovor koji ne zadovoljava kriterijume za parcijalni odgovor.
PMF	Kompletan	<ul style="list-style-type: none"> • Korekcija anemije i splenomegalije i • Odsustvo simptoma bolesti
	Parcijalni	<ul style="list-style-type: none"> • Bilo kakvo poboljšanje anemije i splenomegalije, bez progresije simptoma bolesti, ili • Korekcija anemije (ili bilo koje poboljšanje transfuziono zavisne anemije) i poboljšanje simptoma bolesti bez progresije splenomegalije, ili • Bilo kakvo poboljšanje splenomegalije i smanjenje simptoma bolesti** bez progresije anemije.
<p>* Simptomi bolesti podrazumevaju tegobe prouzrokovane mikrovaskularnim poremećajima, svrab i glavobolju. **Simptomi bolesti podrazumevaju groznicu, gubitak težine, svrab, noćno preznojavanje, supfebrilne temperature, bol u kostima i zglobovima</p>		

Od uključenja u studiju, bolesnici su redovno praćeni na periodičnim lekarskim kontrolama i u tom periodu su prikupljani podaci vezani za pojavu tromboembolijskih komplikacija. Bolesnici koji se nisu pojavili na redovno zakazanoj kontroli su kontaktirani telefonom u cilju dobijanja podataka o tromboembolijskim komplikacijama. Svi bolesnici su bili uključeni u studiju najmanje šest meseci, odnosno do uzimanja uzoraka za laboratorijske analize u fazi 2 istraživanja. Nakon toga je nastavljen period praćenja do pojave prve tromboembolijske komplikacije. Bolesnici koji su dobili trombozu nisu dalje praćeni i eventualne ponovljene tromboze nisu registrovane. Asimptomatski bolesnici u pogledu tromboze su praćeni do završetka studije. Cela studija je trajala ukupno 42 meseca. Bolesnici kod kojih tokom trajanja studije nije objektivno verifikovana tromboza, svrstani su u grupu bolesnika bez tromboembolijskih komplikacija. Prosečno vreme praćenja od dijagnoze do tromboembolijskog događaja, ili do kraja studije (januar 2016.) je iznosilo oko 35 meseci (34.71 ± 10.36 ; opseg: 10-43 meseca).

Tromboembolijske komplikacije

Registrovane su sve tromboembolijske epizode. U odnosu na vreme nastanka, tromboze su podeljene u dve grupe:

- a) istorijske tromboze, koje su se javile bilo kada u životu pre postavljanja dg Ph⁺MPN i
- b) tromboze na dijagnozi i tokom praćenja.

Istorijske tromboze su definisane kao tromboze koje su registrovane posredstvom medicinske dokumentacije bolesnika, a koje su se dogodile pre nego što je postavljena dijagnoza Ph⁺MPN. Smatrano je da je bolesnik imao neku od gore navednih tromboza ukoliko je posedovao medicinsku dokumentaciju kojom je na objektivan način potvrđena tromboza. Takođe, ove tromboze su evidentirane i kao standardni faktor rizika za pojavu novih tromboza u okviru Ph⁺MPN.

Tromboze na dijagnozi i u periodu praćenja predstavljaju sve tromboze koje su se dogodile od momenta dijagnoze PhMPN, pa sve do trenutka prikupljanja podataka (Januar 2016).

Na osnovu pojave novih tromboza, bolesnici su podeljeni u dve grupe:

- Bolesnici bez tromboza na dijagnozi i tokom praćenja u studiji (asimptomatska grupa);
- Bolesnici koji su imali trombozu na dijagnozi i tokom praćenja u studiji (simptomatska grupa).

Tromboembolijske komplikacije su klasifikovane prema preporukama Campbell i sar (Campbell PJ, 2005) na: arterijske tromboze (AIM, CVI, TIA, tromboze gornjih i donjih ekstremiteta); venske tromboembolije (duboke venske tromboze, plućne tromboembolije, splahnhične venske tromboze, tromboze cerebralnih sinusa, tromboze portnih vena, tromboze hepatičnih vena, tromboze vena retine). Sve tromboze na dijagnozi i tokom praćenja u studiji morale su biti objektivno verifikovane metodom EHO Doppler pregleda, angiografije ili CT angiografije. Epizode koje nisu objektivno verifikovane nisu uzimane u analizu.

Mikrocirkulatorne smetnje nisu ubrojane u tromboembolijske događaje.

Kontrolni ispitanici

Kontrolna grupa zdravih ispitanika se sastojala od 33 odrasle osobe (starost Me 58 god., 14 m/19 ž), bez prethodnih tromboembolijskih komplikacija i bez antiagregacione terapije. Zdrave ispitanike su činili dobrovoljci zaposleni u Kliničkom centru Srbije, njihovi rođaci, ili prijatelji, kao i članovi porodica bolesnika uključenih u studiju. Od svih kontrolnih ispitanika su prikupljani demografski podaci, kompletna krvna slika, biohumoralni status, parametri hemostaze i markeri aktivacije koagulacije (PT, PTT, protrombin fragment F1+2, antifosfolipidna antitela) u trenutku ispitivanja.

Takođe, uzorci krvi zdravih ispitanika su korišćeni za dobijanje opsega referentnih vrednosti laboratorijskih analiza koje se ne rade standardno na Klinici za hematologiju, KCS. Zdravi kontrolni uzorci krvi su imunofenotipizirani metodom protočne citofluorimetrije u cilju definisanja fiziološkog opsega nivoa cirkulišućih leukocitno-trombocitnih agregata. U zdravim kontrolnim uzorcima plazme su ELISA metodom određene koncentracije solubilnih E-, L- i P- selektina, takođe u cilju definisanja fizioloških opsega.

M E T O D E

Uzorkovanje krvi za laboratorijske analize

Ispitanicima je periferna venska krv za sve planirane laboratorijske analize uzimana ujutru, pre doručka. Da bi se izbegla stres aktivacija trombocita, krv za analizu leukocitno-trombocitnih agregata i za testove hemostaze je uzimana bez elastične poveske. Uzorci krvi na antikoagulansu K₂-EDTA su uzimani za analizu krvne slike, izolaciju DNK u cilju detekcije genskih mutacija i za analizu nivoa leukocitno-trombocitnih agregata. Uzorci krvi na antikoagulansu Na-citratu su korišćeni za testove hemostaze, analizu nivoa solubilnih selektina i detekciju mutacije fII 20210A. Uzorci krvi bez antikoagulansa su korišćeni za biohemijske analize krvi i detekciju antikardiolipinskih antitela.

Analiza krvne slike

Parametri krvne slike su određeni na automatskom čitaču Pentra DX Nexus (Horiba medical, Kyoto, Japan).

Rutinski testovi hemostaze

Rutinski koagulacioni testovi- fibrinogen, PT i aPTT su određeni standardnom koagulacionom metodom na automatskom analizatoru ACL-700 (IL, Milano Italija) korišćenjem reagenasa istog proizvođača.

Test rezistencije na aktivirani protein C (APCR) je određen koagulacionom metodom korišćenjem komercijalnog kita Factor V Leiden (APCTM Resistance V), HemosIL (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija), na aparatu ACL-700, prema uputstvima proizvođača. Senzitivnost ovog testa za postojanje FV Leiden je 50%, a specifičnost je 98%.

Koncentracija fibrin degradacionih produkata (D-dimer) u plazmi je određena INNOVANCE® D-Dimer imunoturbidimetrijskim esejem (Siemens, Nemačka) na koagulometru SYSMEX 1500 (Siemens, Nemačka).

Enzimski imunoesej (ELISA) za kvantitativno određivanje koncentracije proteina

Određivanje humanog protrombin fragmenta F1+2

Za kvantitativno određivanje humanog protrombin fragmenta F1+2, je primenjen enzimski imunoesej- ELISA (Enzygnost* F1+2 (monoclonal), Dade Behring, Germany) prema preporukama proizvođača testa.

Postupak: u bazenčice mikrotitracione pločebložene monoklonskim mišjim antitelom (10-100 µg) na humani F1+2 se dodaje najprepufer za uzorke, a zatim ispitivani uzorci plazme, standardni serumi koncentracija 20,80, 400 i 1200 pmol/L, kao i pozitivna kontrolna plazma koncentracije 100±20 pmol/L. Inkubacija na temperaturi od 37°C traje 30 minuta. Ploče se peru 2 puta, tako što se u svaki bazenčić dodaje po 300 µl komercijalnog pufera za pranje. Zatim se u svaki bazenčić dodaje po 100 µl anti humanog protrombin/POD konjugata i inkubira tokom 15 minuta na 37°C. Nakon

pranja i istresanja ploča u bazenčice se dodaje po 100 µl rastvora tetrametil benzidina (TMB) koji služi kao supstrat u enzimskoj reakciji. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi i u mraku, reakcija se zaustavlja 0.5N rastvorom sumporne kiseline. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi optičke gustine se određuju spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracije humanog protrombin fragmenta F1+2 određuju se preračunavanjem pomoću standardnih krivulja dobijenih očitavanjem vrednosti optičkih gustina standardnih seruma određenih koncentracija.

Opseg referentnih vrednosti Enzygnost* F1+2 kita iznosi 69-229 pmol/L.

Određivanje antikardiolipinskih antitela (IgG i IgM)

Korišćeni su komercijalni kitovi za određivanje prisustva i koncentracije antikardiolipinskih antitela (Orgentec Diagnostica AG, Nemačka). Ukratko: u bazenčice mikrotitracione ploče obložene visoko prečišćenim kardioliipinom saturisanim β2 glikoproteinom i dodaju se ispitivani serumi u razblaženju 1:100, standardni serumi koncentracija 0; 7,5; 15; 30; 60 i 120 GPL-U/ml odnosno MPL-u/ml, kao i pozitivni i negativni kontrolni serumi. Inkubacija na sobnoj temperaturi traje 30 minuta. Ploče se peru 3 puta, tako sto se u svaki bazenčić dodaje po 300 µl komercijalnog pufera za pranje. Zatim se u svaki bazenčić dodaje po 100 µl anti humanog IgG ili IgM obeleženog peroksidazom i inkubira tokom 30 minuta. Nakon pranja i istresanja ploča u bazenčice se dodaje po 100 µl rastvora tetrametil benzidina (TMB) koji služi kao supstrat u enzimskoj reakciji. Nakon inkubacije od 15 minuta reakcija se zaustavlja 3M rastvorom sumporne kiseline. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi optičke gustine se određuju spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracije antikardiolipinskih antitela IgG i IgM izotipa određuju se preračunavanjem pomoću standardnih krivulja dobijenih očitavanjem vrednosti optičkih gustina standardnih seruma određenih koncentracija.

Interpretacija rezultata: svi uzorci čija preračunata vrednost prelazi 10 GPL-U/ml, odnosno 7 MPL-u/ml smatraju se pozitivnim.

Određivanje nivoa solubilnih selektina

Analizirano je ukupno 95 uzoraka plazmi poreklom od bolesnika obolelih od Ph-MPN i to: 39 PV, 27 ET, 29 PMF, pre primanja terapije i 28 zdravih kontrola.

U slučajevima gde je koncentracija selektina kod bolesnika pre primanja terapije bila povećana u odnosu na srednju vrednost koncentracije selektina uvećanu za vrednost dve standardne devijacije kod zdravih kontrola, nivo selektina je određivan i nakon primanja (citoreduktivne) terapije (E-selektin: 18 PV, 8 ET, 13 PMF, L-selektin: 17 PV, 15 ET, 8 PMF, P-selektin: 14 PV, 14 ET, 14 PMF).

Nivo selektina (E-selektin, L-selektin, P-selektin) u plazmi određivan je komercijalnim ELISA kitovima (Sigma-Aldrich), prema uputstvu proizvođača. U rezervoare ELISA-ploča koje su prethodno već bile obložene antitelom specifičnim za odgovarajući selektin, dodavano je po 100 μ l plazme, standarda ili pufera (slepa proba). Plazma pacijenata je razblaživana 50, 100 i 250 puta a plazma zdravih kontrola 50, 100 i 200 puta u slučaju E-selektina, P-selektina i L-selektina, respektivno. Nakon inkubiranja u trajanju od 2 sata i 30 minuta i ispiranja, dodavano je po 100 μ l specifičnog detekcionog antitela obeleženog biotinom, uz inkubaciju od 1 sata. Posle ispiranja i inkubacije sa streptavidinom obeleženim peroksidazom (HRP-Streptavidin) i ponovnog ispiranja, dodavan je hromogen TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), kao supstrat peroksidaze. Nakon inkubacije od 30 minuta, u mraku, reakcija je zaustavljena dodavanjem rastvora sumporne kiseline (Stop Solution) i zatim merena apsorbancija na 450 nm, na ELISA čitaču (ELISA Multiscan Plusplate reader, Labsystems, Finland).

Sve vrednosti merene su u duplikatu. Koncentracija selektina u plazmi pacijenata i zdravih kontrola određena je iz standardne krive i izražena u ng/ml.

Ispitivanje leukocitno-trombocitnih agregata

Bolesnici i kontrolni uzorci

Ispitivanje Le-Tr agregata je sprovedeno na uzorku od 95 bolesnika sa dg Ph⁻ MPN, na dijagnozi bolesti pre primene citoreduktivne i/ili antiagregacione terapije i posle šest meseci praćenja i lečenja. Uzorak od 33 zdravih kontrolnih odraslih osoba je uključen u ispitivanje u cilju utvrđivanja fizioloških vrednosti Le-Tr agregata.

Uzorkovanje periferne krvi i protokol za obeležavanje ćelija

Prisustvo leukocitno-trombocitnih agregata je ispitivano u uzorcima pune periferne krvi bolesnika i kontrolnih uzoraka, primenom testa direktne imunofluorescencije, prema modifikovanoj metodi Radovančević i sar, 2009. Uzorci periferne krvi su dvostruko antikoagulirani, u prvom koraku primenom antikoagulanasa – EDTA (Etilendiamintetrasirćetna kiselina), a zatim u drugom koraku primenom antikoagulanasa CTAD (Citrat-Teofilin-Adenozin-Dipiridamol) (Macey *et al*, 2009). Da bi se izbegla artefijalna aktivacija leukocita i trombocitaka posledica mehaničke stres iritacije, uzorak periferne krvi je dobijan venepunkcijom antekubitalne vene bez upotrebe poviske, sa širokom iglom promera 20-gauge. Nakon odbacivanja prva 3 mL, puna venska krv je prihvatana u vakumirane epruvete sa EDTA (BD Vacutainer K2E 3.6 mg, Becton Dickinson), a odmah zatim prebacivana u vakumirane epruvete sa CTAD (BD Vacutainer CTAD, Becton Dickinson).

Ćelije su obeležavane monoklonskim antitelima unutar 20min od venepunkcije, primenom testa direktne višekolorne imunofluorescencije (Barnard *et al*, 2009). Panel monoklonskih antitela je uključivao ispitivanje dva leukocitna antigena specifična za trombocite (CD61/CD42b) uz dva leukocitna antigena korišćena za selekcionisanje populacije neutrofila i monocita (CD45/CD14) prilikom analize. U epruvete su prvo sipana mišja anti-humana monoklonska antitela direktno konjugovana sa molekulima fluorescentnih boja (Tabela 7.), u optimalnim koncentracijama i prema prethodno utvrđenim kombinacijama. Zatim su u epruvete dodavani alikvoti od 100 µl pune

periferne krvi koji su inkubirani sa kombinacijom monoklonskih antitela 20min/22°C u mraku. Paralelno, alikvoti uzoraka periferne krvi su inkubirani i sa kombinacijom odgovarajućih izotipskih kontrola. Nakon inkubacije, eritrociti su lizirani komercijalnim reagensom prema pratećem protokolu (FACS Lysing Solution, BD). Lizirani uzorci su zatim centrifugirani na 1600rpm/5min/22°C, a supernatant je odstranjivan. Talog ćelija je zatim resuspendovan u rastvoru fosfatnog pufera za ispiranje (PBS, pH 7,2) (BD CellWASH, Becton Dickinson) i uzorak je ponovo centrifugiran na 1600rpm/5min/22°C. Posle ispiranja, ćelije su resuspendovane u 0,5 ml rastvora za fiksiranje (Cell Fix reagent, Becton Dickinson), i zatim su do analize čuvane u mraku na +4°C.

Tabela 7. Panel monoklonskih antitela korišćenih za ispitivanje leukocitno-trombocitnih agregata u perifernoj krvi na populaciji neutrofila i monocita

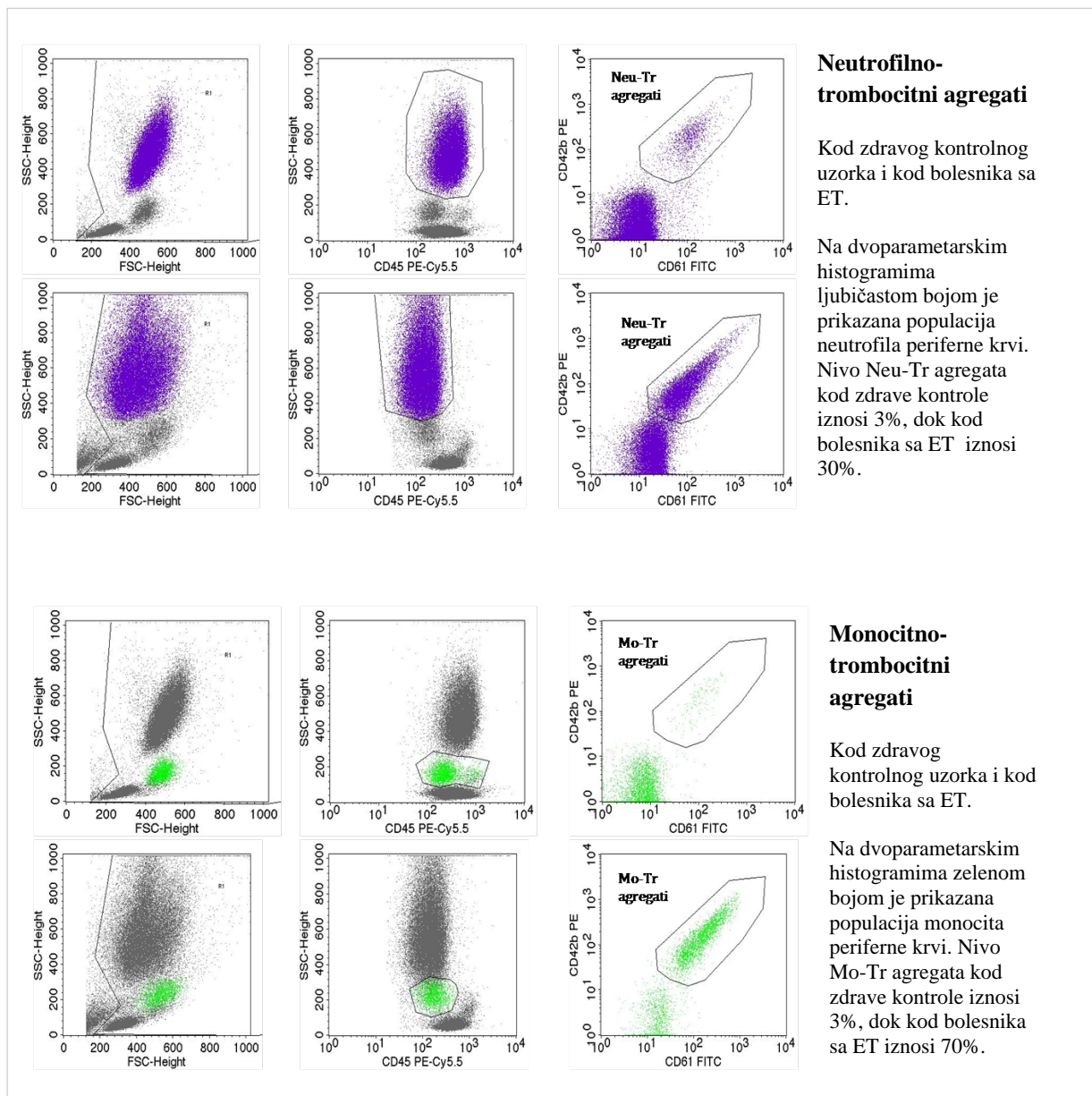
<i>Monoklonsko antitelo</i>	<i>Klon</i>	<i>Fluorohroma</i>	<i>Proizvođač</i>
CD61	RUU-PL 7F12	FITC	Becton Dickinson
CD42b	HIP1	PE	Becton Dickinson
CD45	2D1	APC	Becton Dickinson
msIgG1	X40	FITC	Becton Dickinson
msIgG1	X40	PE	Becton Dickinson
<i>Panel monoklonskih antitela</i>			
1. <i>CD61-FITC/CD42b-PE/CD45-APC</i>			
2. <i>msIgG1-FITC/msIgG1-PE/CD45-APC</i>			

Protočna citofluorimetrija

Ekspresija ispitivanih membranskih antigena specifičnih za populacije leukocita i trombocita je merena i analizirana na protočnom citofluorimetru (BD FACSCalibur 4CS, Becton Dickinson) primenom specifičnog softvera (BD CellQuest Pro Software ver. 4.0.2, Becton Dickinson). Protočni citofluorimetar je kalibrisan svakodnevno, primenom seta standardnih kalibracionih kuglica (CaliBRITE beads – unlabeled, FITC, PE, PerCP, APC) i specifičnog softvera (BD FACSComp Software, Becton Dickinson). Pri svakom merenju je prikupljano najmanje 100 000 nukleiranih ćelija uzorka po

epruveti, na nivou protoka od $< 1,000$ ćelija u sekundi. Podaci su čuvani za analizu u formi fajlova (Radovancevic *et al*, 2009).

Leukocitno–trombocitni agregati (Slika 4.) su identifikovani i procenjivani na populaciji selekcionisanih neutrofila (srednji nivo ekspresije CD45 antigena i visok stepen ćelijske granulacije, $CD45^{+medium}/SSC^{high}$) i monocita (visok nivo ekspresije CD45 antigena i srednji stepen ćelijske granulacije, $CD45^{+high}/SSC^{medium}$).



Slika 4. Leukocitno-trombocitni agregati kod zdravog kontrolnog uzorka i kod bolesnika sa ET

Rezultati su izražavani kao procenat ćelija u populaciji neutrofila odnosno monocita, koje su koekspimirale dva trombocitna antigena ($CD42b^+CD61^+$ populacija) (Barnard *et al*, 2009). Relativna vrednost fluorescentne emisije na log skali intenziteta, koja je poticala od vezanog monoklonskog antitela anti-CD42b-PE na populaciji neutrofila i monocita, procenjavana je kao prosečan intenzitet fluorescencije (*engl.* mean fluorescent intensity, MFI).

Povećana vrednost leukocitno-trombocitnih agregata je definisana kao $\bar{x} \pm 2SD$ kontrolne grupe zdravih ispitanika. Ona je iznosila za Neu-Tr agregate $\geq 16\%$, a za Mo-Tr agregate $\geq 10\%$.

Molekularno-genetička ispitivanja

Molekularno-genetičke analize su sprovedene kod 95 novodijagnostikovanih bolesnika sa Ph⁻MPN. Ispitivano je prisustvo mutacija u genima: *JAK2-V617F*, *MPL-S505N*, *MPL-W515K/L/A* i *CALR exon 9*, korišćenjem alel specifične reakcije lančanog umnožavanja DNK, (Polymerase chain reaction - PCR).

Za sve vrste molekularno-genetičkih ispitivanja korišćeni su uzorci periferne krvi, uzeti na K₂-EDTA antikoagulansu.

Izolacija granulocita iz periferne krvi

Periferna venska krv bolesnika je sakupljana u epruvetama sa antikoagulansom K₂EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, UK), a zatim razblaživana u odnosu 1:1.2 sa fosfatnim puferom (PBS-a, pH=7.2, bez Ca²⁺ i Mg²⁺) sa dodatkom 2mM EDTA. Uzorci krvi su nanošeni na gradijent gustine 1.077 g/L (Lymphocyte Separation Medium, LSM, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) i centrifugiranjem na 400 g, tokom 35 minuta, izolovane su MNC u interfazi, a eritrociti i zreli polimorfonuklearni granulociti u talogu. Nakon odlivanja supernatanta i eliminacije MNC, postupkom liziranja

eritrocita iz taloga sa hipotoničnim rastvorom (0.15 M NH₄Cl, 0.1 mM Na₂EDTA, 12 mM NaHCO₃), izolovani su granulociti. Granulociti su iz lizata eritrocita izolovani centrifugiranjem na 200 g tokom 2 minuta, a zatim isprani u PBS-u. Broj i vijabilnost granulocita određivana je bojenjem sa 0.4% rastvorom Tripan plavog (Life Technologies, USA), posle čega je odmah izdvajana DNK.

Izolacija DNK iz granulocita periferne krvi

Za izolaciju DNK iz granulocita periferne krvi je korišćena fenol-hloroformska metoda. Centrifugiranjem uzoraka granulocita sa rastvorom fenol/hloroform/izoamil alkohola (u odnosu 25:24:1) su izdvojene dve faze: gornja vodena, u kojoj se nalazila DNK i donja organska, u kojoj su se nalazili proteini. Za dalju analizu je korišćena vodena faza sa izolovanom DNK, koja je zatim precipitirana na -20°C tokom noći, dodavanjem 7.5M rastvora amino acetata i hladnog rastvora apsolutnog etil alkohola. Nakon precipitacije, uzorci DNK su mešani sa 70% etil alkoholom i talog DNK je izdvajan centrifugiranjem. Rekonstitucija DNK za PCR analizu je vršena sterilnom destilovanom vodom na 37°C, tokom noći.

Detekcija JAK2V617F mutacije (Kralovics R, 2006.)

Za PCR amplifikaciju (T3000 Thermocycler, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, Germany) su korišćeni prajmeri prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Setovi prajmera za detekciju JAK2V617F mutacije

Prajmer	sekvenca (5'-3')
JAK2-FWD	GTTTCTTAGTGCATCTTTATTATGGCAGA
JAK2-G-REV	FAM -TTACTCTCGTCTCCACAGAC
JAK2-T-REV	FAM -AAATTACTCTCGTCTCCACAGAA

Temperaturni profil PCR reakcije:

5 min/95°C - aktivacija Hot Star Taq polimeraze

30 ciklusa;

- 30 sec/94°C - denaturacija
- 30 sec /62°C - aniling
- 80 sec/72°C - elongacija

10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje nakoloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Prilikom određivanja JAK2V617F mutacije, PCR-om umnoženi produkti su sekvencirani BigDye Terminator V3.1 kitom za sekvenciranje na ABI PRISM 3130 automated DNA sequencer aparatu (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA), korišćenjem AB DNA Sequencing Analysis Software (v 5.2).

Prajmeri specifični za mutaciju su duži u odnosu na prajmere koji umnožavaju ishodnu formu gena (eng. "wild" type). Tokom PCR analize dolazi do amplifikacije sekvenci gena od interesa. Tom prilikom se stvaraju JAK2V617F sekvence, koje su za tri bazna para duže u odnosu na nemutirane JAK2 sekvence. Analiza DNK sekvenci (ABI3130xl) će pokazati dva različita pika, ukoliko bolesnik ima JAK2V617F mutaciju. Odnos ova dva pika (mutiranog - 190 baznih parova i nemutiranog - 187 baznih parova) ukazuje na različito alelno opterećenje prisutno u krvi bolesnika. Alelno opterećenje mutiranog gena je analizirano po formuli: $\frac{\text{visina pika}_{\text{JAK2V617F}}}{\text{visina pika}_{\text{wild}} + \text{visina pika}_{\text{JAK2V617F}}} \times 100 \%$.

Detekcija mutacija u genu MPL

Za PCR amplifikaciju su korišćeni prajmeri prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Setovi prajmera za detekciju mutacija u genu MPL

Prajmer	5'-3' sekvence
A_MPL-fwd	FAM-TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT
A_W515L-fwd	FAM-GGCCTGCTGCTGCTGAGATT
A_S505N-rev	CAGGCCCAAGGACGGCGT
B_MPL-fwd	TAMRA-TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT
B_W515K-fwd	TAMRA-GCCTGCTGCTGCTGAGGAA
B_W515A-rev	GTAGTGTGCAGGAAACTGCGC
AB_MPL-rev	CAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT

Reakciona smeša zapremine 20 μ L se sastojala od 5 μ L (50 ng) DNK, 10 μ L 2x AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Canada) i 5 μ L 4x MPL mešavine prajmera. (Furtado LV, i sar, 2013.)

Temperaturni profil multipleks PCR reakcije:

10 min/95⁰C - aktivacija Taq polimeraze

38 ciklusa;

- 15 sec/94⁰C - denaturacija
- 30 sec/64⁰C - aniling
- 1 min/72⁰C - elongacija

5 min/72⁰C - finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje nakoloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Umnoženi produkti su sekvencirani sa BigDye Terminator V1.1 kitom za sekvenciranje na ABI PRISM 3130 automated DNA sequencer aparatu (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA).

Detekcija mutacija u genu TET2

Za PCR amplifikaciju su korišćeni prajmeri prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Setoviprajmerazadetekcijumutacija u genu TET2

Prajmer	5'-3' sekvence
TET2-ex6- fam-fwd	FAM- TTCTCAGGGATGTCCTATTGCTAAGT
TET2-ex6-rev	TCCCGCACCAAACACAGTAG

Analiza mutacije *TET2* je sprovedena alel specifičnom PCR metodom (Delhommeau *et al*, 2009). PCR produkti su analizirani naABI PRISM 3130 automated DNA sequencer aparatu (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA).

Detekcija mutacija u genu CALR

Za PCR amplifikaciju su korišćeni prajmeri prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Setoviprajmerazadetekcijumutacija u genu CALR

Prajmer	5'-3' sekvence
CALR-intr8-fam-fwd	FAM- GGCAAGGCCCTGAGGTGT
CALR-ex9-rev	GGCCTCAGTCCAGCCCTG

Za PCR analizu je korišćen kit AmpliTaq Gold 360 Mastermix (Applied Biosystems) (Klapfl T, 2013.).

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/95⁰C - aktivacija Taq polimeraze

10 ciklusa;

- 15 sec/94⁰C - denaturacija
- 15 sec/55⁰C - aniling
- 30 sec/72⁰C - elongacija

20 ciklusa

- 15 sec/89°C - denaturacija
- 15 sec/55°C - aniling
- 30 sec/72°C - elongacija

20 min/72°C - finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje nakoloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Umnoženi produkti su sekvencirani sa BigDye Terminator V3.1 kitom za sekvenciranje na ABI PRISM 3130 automated DNA sequencer aparatu (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA), uz korišćenje Gene Mapper software version 4.0 (Applied Biosystems).

Sekvenciranje PCR produkata

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems), kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). (Sanger F, 1977). Smeša za sekvenciranje, finalne zapremine 8 µl, sadrži sledeće komponente: 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp); 3,2 pmol prajmera za sekvenciranje i 3 µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems).

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1 min/ 96°C

25 ciklusa;

- 10 sec/96°C
- 5 sec/50°C
- 4 min/60°C

4°C/ ∞

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se dodaje 40 µl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na

13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 µl 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 µl HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

Ispitivanje prisustva mutacije u genu za protrombin FII 20210A

Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi. Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi 95 bolesnika sa Ph⁻MPN je primenjena metoda isaljavanja ("salting out") po Milleru 1988 (Miller SA, 1988.).

Uzorak venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat) se pomeša sa istom količinom pufera za lizu (Tabela 12.) i 15 do 20 minuta drži na + 4 °C. Potom se centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u fiziološkom puferu. Uzorak se ispira više puta centrifugiranjem tokom 15 min na 2000 obrtaja, dok talog ne pobeli. Nakon poslednjeg "ispiranja" supernatant se odbaci, a talogu doda 3 ml pufera A (Tabela 12.), 50 µl 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (Nadoddecisulfat) i uzorak se inkubira preko noći na 37 °C. Sledećeg dana se doda 1ml 6M NaCl, dobro promućka i centrifugira 15 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant se prenosi u čistu epruvetu i centrifugira 15 minuta na 4000 obrtaja. Supernatant se pažljivo preliva u čistu graduisanu epruvetu, a zatim se doda isti volumen izopropanola. Pažljivim mućkanjem izdvaja se beličasti končić DNK. Končić se pažljivo pokupi staklenim štapićem i potopi 30 sekundi u 70 % etanolu. DNK se osuši na vazduhu, a zatim se rastvori u 300 µl redestilovane vode.

Tabela 12. Sastav pufera

Pufer za lizu*	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0.32 M SAHAROZA	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl #	10 mM TRIS HCl#
10 mM TRIS HCl #	0,025 M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			

*Autoklavirati i čuvati na +4 °C, # pH 7.5

Koncentracija DNK u uzorku merena je spektrofotometrom na 260 nm, a čistoća DNK određivana ja na osnovu apsorbance uzorka na 260 i 280 nm.

Detekcija polimorfizma G20210A u genu za FII. Izolavana je totalna genomski DNK iz 5ml citrirane periferne krvi ispitanika, metodom iseljavanja. Koncentracija i kvalitet izolovane DNK su provereni spektrofotometrijski. Polimorfizam G20210A je detektovan uz pomoć reakcije lančane polimerizacije (PCR) i ispitivanja polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (engl. Restriction fragment length polymorphism - RFLP). Za amplifikaciju ciljnog segmenta gena dužine 345bp, koji obuhvata polimorfno mesto, upotrebljeni su prajmeri čija je sekvenca: [5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3' i 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C-3']. Nakon provere na 8% poliakrilamidnom gelu, produkti amplifikacije inkubirani su sa 4 U (unit-jedinica) restrikcionog enzima Hha I na 37°C u toku 16 h. Nakon digestije produkti su analizirani elektroforezom na 8% poliakrilamidnim gelovima bojenim etidijum-bromidom i prosvetljavanim na UV transilimatoru. Kod osoba GG genotipa se na gelu detektuje samo trakadužine: 345 bp, heterozigoti GA genotipa imaju prisutne dve trake od 345 i 322 bp, dok bi homozigoti AA genotipa imali traku od 322 bp (Shema 2).

Shema 2. Analiza genotipa na poliakrilamidnom gelu



In vitro ćelijska kultura

In vitro rast matičnih ćelija hematopoeze poreklom iz koštane srži je ispitivan kod 90 bolesnika obuhvaćena ovom studijom. Po potrebi, analiza je dopunjena kulturom cirkulišućih prethodnika hematopoeze kod ukupno 22 bolesnika:

- Ukoliko kulturom koštane sržini su detektovane spontano formirane kolonije eritroblasta, ili megakariocita;
- Ako je uzorak koštane srži bio nedovoljan za analizu, zbog prisustva fibroze (tzv „suvapunkcija“);
- Ukoliko je *in vitro* ćelijska kultura rađena u preliminarnom dijagnostičkom postupku, pre biopsije koštane srži (diferencijalna dijagnoza eritrocitoza).

Kontrolni uzorci koštane srži i periferne krvi za evaluaciju rasta *in vitro* kolonija su dobijeni od 29 zdravih volontera, bez evidentirane hematološke bolesti.

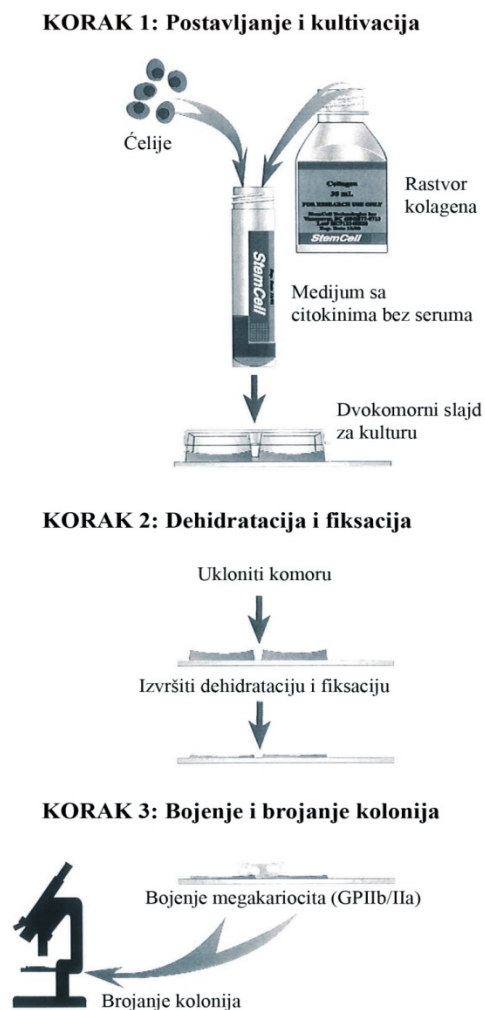
Uzorkovanje i priprema mononukleara za analizu

Uzorci aspirata koštane srži i periferne venske krvi su antikoagulirani heparinom, a zatim razblaživani u hranljivom medijumu, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma-Aldrich Ltd, UK). Mononukleirane ćelije (MNC) su izdvajane na gradijentu gustine 1.077 g/L (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich Ltd, UK), centrifugiranjem na 1500-1600 rpm, tokom 30-35 minuta. Nakon ispiranja u IMDM centrifugiranjem na 1600 rpm tokom 10 minuta, MNC su kultivisane u različitim finalnim koncentracijama, u zavisnosti od vrste planiranog eseja. *In vitro* ćelijska kultura eritroblastnih (Burst-Forming-Unit-Erythroid, BFU-E) i granulocitno-monocitnih (Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Monocyte, CFU-GM) kolonija je rađena na polučvrstoj podlozi od metilceluloze, po standardizovanoj metodologiji proizvođača (Stem Cell Technologies Inc, Canada). *In vitro* ćelijska kultura megakariocitnih kolonija (Colony-Forming-Unit-Megakaryocyte, CFU-Mk) je rađena na polučvrstoj podlozi od kolagena, po standardizovanoj metodologiji proizvođača (Stem Cell Technologies Inc, Canada).

***In vitro*ćelijska kultura BFU-E i CFU-GM na podlozi od metilceluloze**

Komercijalna podloga za kulturu (H4434, Stem Cell Technologies Inc, Canada) se sastojala od 0.9 % metilceluloze, 30 % fetalnog telećeg seruma, 1 % albumina iz goveđeg seruma, 5×10^{-5} β -merkaptotetanol, IMDM i smeše stimulatora rasta (SCF, GM-CSF, IL-3, EPO). Mešavina za kulturu spontano formiranih BFU-E kolonija (sBFU-E) nije sadržala EPO. Smeša za kulturu (finalni volumen 3.3 mL) sastavljena od podloge sa metilcelulozom i suspenzije 2×10^4 MNC koštane srži, odnosno 2.2×10^5 MNC periferne krvi, je raspoređena u petri šolje (35x10mm Becton Dickinson). Sve kulture su postavljene u duplikatu u cilju preciznije evaluacije rezultata. Ćelije su inkubirane do formiranja kolonija, tokom 14 dana u CO₂ inkubatoru (HERACell 150i, Heraeus) na temperaturi 37°C, u uslovima apsolutne vlažnosti i 5% CO₂ u vazduhu. Kolonije granulocita i eritroblasta su analizirane na osnovu morfoloških osobina, pod invertnim mikroskopom (Zeiss Opton ICM 405, Germany), na standardnim uveličanjima (250x).

BFU-E kolonija (Slika 5b.) je definisana (Iscove i sar, 1974.), kao grupa od najmanje 100 smežuranih hemoglobinizovanih eritroblasta crvene boje, ili kao grupa od 2-5 klastera eritroblasta, sa najmanje 20 eritroblasta po jednom klasteru. CFU-GM kolonija (Slika 5a.) je definisana kao grupa od najmanje 20 granulocita (CFU-G), makrofaga (CFU-M), ili ćelija obe linije (CFU-GM), a kolonije koje nastaju od primitivnijih prethodnika mogu sadržati i nekoliko hiljada ćelija u jednom, ili više klastera.



Slika 6. Dijagram MegaCult procedure za identifikaciju humanih CFU-Mk ćelija

Komercijalna podloga za kulturu MegaCult-C je formulisana na takav način da stimuliše rast CFU-Mk kolonija u gelovima na bazi kolagena. Finalne koncentracije komponenti koje se nalaze u medijumu pre dodavanja ćelija (0.1 mL) i rastvora kolagena (1.2 mL) u MegaCult[®]-C medijumu sa citokinima prikazane su u tabeli 13.

Tabela 13. Sastav podloge MegaCult sa finalnim koncentracijama komponenti

Komponente MegaCult®-C medijuma	Finalna koncentracija
Kolagen	1.1 mg/ml
Bovine Serum Albumin	1%
Rekombinantni humani insulin	10 µg/ml
Humani transferin (gvožđe saturisani)	200 µg/ml
L-glutamin	2 mM
2-Merkaptoetanol	10 ⁻⁴ M
rh Trombopoetin	50 ng/ml
rh IL-6	10 ng/ml
rh IL-3	10 ng/ml
IMDM	

Isti medijum je dostupan i bez citokina za ispitivanje rasta i maturacije spontano formiranih CFU-Mk kolonija (sCFU-Mk). Smeša za kulturu sastavljena od medijuma, kolagena i suspenzije 2.2×10^5 MNC koštane srži (finalni volumen 3.3 mL) je raspoređena u dvokomorne slajdove (Double-Chamber Slides, Thermo Nunc, USA). Upotrebom dvokomornih slajdova omogućena je inkubacija, a zatim fiksacija i bojenje celokupne ćelijske kulture na jednom slajdu.

Sve kulture su postavljane u duplikatu, u cilju preciznije evaluacije rezultata. Ćelije su inkubirane do formiranja kolonija, tokom 10-12 dana u termostatu (HERACell 150i, Heraeus) na temperaturi 37°C, u uslovima apsolutne vlažnosti i 5% CO₂ u vazduhu. Nakon inkubacije, ćelijske kulture su najpre dehidrirane i fiksirane smešom metanola i acetona u srazmeri 1:3, a zatim imunocitohemijski obojene.

Humane CFU-Mk kolonije su detektovane ćelijskim bojenjem primarnim antitelom za megakariocitno specifični antigen GPIIb/IIIa (CD41). Značajna amplifikacija primarnog signala je postignuta vezivanjem primarnog, sa konjugovanim detekcionim sistemom koji se sastoji od sekundarno biotinizovanog antitela i alkalne fosfataze. CFU-Mk kolonije su analizirane na osnovu boje pod svetlosnim mikroskopom (Leica, ReichertMicrostar IV, USA), na standardnim uveličanjima (5x i 10x).

Tri kategorije (tipa) ćelijskih kolonija mogu biti identifikovane u MegaCult[®]-C kulturama: čiste megakariocitne kolonije (CFU-Mk), mešovite megakariocitne kolonije (sadrže druge linije kao dodatak megakariocitnim) i ne-megakariocitne kolonije. Megakariociti i trombociti, koji eksprimiraju glikoprotein IIb/IIIa (CD41), pojaviće se u ružičastoj boji posle fiksacije i bojenja (Slika br. 2). Bojenje Evans plavim uzrokuje da nukleusi svih ćelija budu blede plavi bez obzira na ćelijsku liniju. Kao rezultat, CFU-Mk kolonije se pojavljuju kao grupe ćelija saružičasto obojenom membranom i plavim nukleusima. Na osnovu broja megakariocita u sastavu, CFU-Mk kolonije su podeljene na: male (3 – 20 ćelija po koloniji), srednje (21 – 49 ćelija po koloniji) i velike (više od 50 ćelija po koloniji). Velike megakariocitne kolonije potiču od primitivnijih Mk prethodnika, dok su manje kolonije nastale od zrelijih Mk pretodnika.

Statistička analiza

Rezultati dobijeni od svih pacijenata kao i rezultati ispitivanih bolesnika po grupama i kontrolnih ispitanika, su statistički analizirani i međusobno upoređeni.

U okviru programskog paketa Microsoft Office for Windows, baza podataka je kreirana pomoću namenskog programa Access, a statistička obrada podataka pomoću programskog paketa Statistical Package for Social Sciences-SPSS 18.02 for Windows.

U opisivanju podataka su korišćene metode deskriptivne statistike, mere centralne tendencije i mere varijabiliteta. U statističkoj analizi podataka su korišćene parametarske i neparametarske statističke analitičke metode. Od metoda analitičke statistike su korišćene: metode identifikacije empirijskih raspodela, metode za procenu značajnosti razlike (studentov t test za dva velika nezavisna uzorka, test sume rangova i hi-kvadrat (χ^2) test, jednofaktorska analiza kovarijanse-ANCOVA) i metode za procenu značajnosti povezanosti (univarijantna i multivarijantna binarna logistička regresiona analiza). Za praćenje bolesnika je primenjena Kaplan-Meier-ova kriva preživljavanja, a prediktori vremena do nastupanja izabranog događaja Koksovim proporcionalnim hazardnim regresionim modelom. Sve analize su urađene onako kako je nameravano (intention to treat).

Rezultati

DEMOGRAGFSKO-KLINIČKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA

U studiju je uključeno ukupno 95 bolesnikasa Ph⁺MPN, pri čemu je najveći broj bolesnika bio sa PV (41.1%), dok je broj bolesnika sa ET (28.4%) i PMF (30.5%) bio sličan. Osnovne demografske karakteristike bolesnikai zdravih kontrola su prikazane u tabeli 14. Prosečna starost ispitanika bila je 59 godina (opseg: 22-83), sa predominacijom ženskog pola (60%). Starijih od 60 godina bilo je 49.5% bolesnika. Između podtipova Ph⁺MPN je postojala statistički značajna razlika u pogledu starosti. Bolesnici sa PMF bili su statistički značajno stariji u odnosu na bolesnike sa ET ($p < 0.05$), dok u odnosu na bolesnike sa PV ta razlika nije bila značajna. Takođe, u grupi bolesnika sa PMF učestalost osoba starijih od 60 godina je bila značajno veća u odnosu na grupu bolesnika sa ET ($p < 0.05$).

Tabela 14. Demografske karakteristike bolesnika

KARAKTERISTIKE	Ph ⁺ MPN (n=95)	Kontrole (n=33)	P ₁	Ph ⁺ MPN podtipovi			P ₂
				PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	
Starost (godine) \bar{x} (SD) min-max	58.98 (14.0) 22-83	54.61 (13.17) 26-81	0.104	58.87 (12.1) 22-80	53.56 (16.1) 22-83	64.17 (12.9) 28-83	0.015*
Starost, f (%) < 60 god ≥ 60 god	48 (50.5) 37 (49.5)	20 (60.6) 13 (39.4)	0.317	21 (53.8) 18 (46.2)	18 (66.7) 9 (33.3)	9 (31.0) 20 (69.0)	0.025*
Pol, f (%) Muški Ženski	38 (40) 57(60)	14 (42) 19 (58)	0.807	21 (53.8) 18 (46.2)	8 (29.6) 19 (70.4)	9 (31.0) 20 (69.0)	0.071
Istorija tromboze, f (%) Ne Da	83(87.4) 12(12.6)	33 (100) 0 (0)		34 (87.2) 5 (12.8)	21 (77.8) 6 (22.2)	28 (96.6) 1 (3.4)	0.107
Standardni faktori rizika za trombozu, f (%) Ne Da	44 (46.3) 51 (53.7)	20 (60.6) 13 (39.4)	0.157	18 (46.2) 21 (53.8)	17 (63.0) 10 (37)	9 (31) 20 (69)	0.057

Ph⁺MPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; p₁-Ph⁺MPN vs kontrole; p₂-PV vs ET vs PMF.

Od svih bolesnika sa Ph^hMPN uključenih u studiju, pozitivnu istoriju tromboza je imalo ukupno 12 (12.6%) bolesnika, sa predominacijom arterijskih tromboza (Tabela 14). Standardni faktori rizika za trombozu (starost >60 god i/ili pozitivna istorija tromboza) su bili prisutni kod 53.7% bolesnika sa Ph^hMPN. Zastupljenost bolesnika koji su imali visoki rizik za pojavu tromboze na osnovu prisustva bar jednog od ova dva standardna faktora rizika je bila najveća u grupi bolesnika sa PMF i u odnosu na bolesnike sa ET ta razlika je bila statistički značajna ($p < 0.05$).

Pre dijagnostikovanja Ph-MPN trombozu je imalo 12/95 bolesnika. Čak 11 trombotičnih događaja (91.7%) bile su arterijske tromboze dok je samo kod jednog bolesnika postojala ranija venska tromboza. Vrste "istorijskih" tromboembolijskih događaja za celu ispitivanu grupu prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Tip i lokalizacija „istorijskih“ tromboza kod 12 bolesnika sa Ph^hMPN

TIP TROMBOZE	PV n (%)	ET n (%)	PMF n (%)
ARTERIJSKE	6 (15.4)	4 (14.8)	1 (3.4)
Cerebrovaskularni insult	3 (7.7)	2 (7.4)	1 (3.4)
Akutni infarkt miokarda	1 (2.6)		
Tranzitorni ishemični atak - TIA	1 (2.6)	1	
Tromboze arterija ekstremiteta	1 (2.6)	1	
VENSKE		1 (8.3)	
Duboka venska tromboza		1 (8.3)	

Ph^hMPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

KARDIOVASKULARNI FAKTORI RIZIKA ZA TROMBOZU

Prisustvo bar jednog klasičnog faktora za aterosklerozu (pušenje, hipertenzija, dijabetes, hiperlipidemija) u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN bilo je značajno veće učestalosti u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (Tabela 16). Posmatrano pojedinačno, učestalost arterijske hipertenzije (HTA) i hiperlipidemije (HLP) je bila

značajno veća u ispitivanoj grupi nego u kontrolnoj grupi. Podtipovi Ph-MPN se nisu značajno razlikovali u pogledu učestalosti faktora rizika za kardiovaskularna oboljenja.

Tabela 16. Kardiovaskularni faktori rizika za trombozu

KARAKTERISTIKE	Ph-MPN (n=95)	Kontrole (n=33)	P	Ph-MPN podtipovi			P
				PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	
Pušači, f (%)							
Ne	72 (75.8)	28 (84.8)	0.336	28 (71.8)	21(77.8)	23(79.3)	0.743
Da	23 (24.2)	5 (15.2)		11 (28.2)	6(22.2)	6(20.7)	
Hipertenzija, f (%)							
Ne	46 (48.4)	30 (90.9)	0.0001*	18(46.2)	15(55.6)	13(44.8)	0.677
Da	49 (51.6)	3 (9.1)		21 (53.8)	12(44.4)	16(55.2)	
Diabetes mellitus, f (%)							
Ne	90 (94.7)	33 (100)	0.327	39 (100)	24(88.9)	27(93.1)	0.124
Da	5(5.3)	0 (0)		0(0)	3(11.1)	2(6.9)	
Hyperlipidemija, f (%)							
Ne	38 (40.0)	32 (97)	0.0001*	18 (46.2)	10(37.0)	10(34.5)	0.582
Da	57 (60.0)	1 (3)		21 (53.8)	17(63.0)	19(65.5)	
Kardiovaskularni faktori rizika za trombozu, f (%)							
Ne	15 (15.8)	24 (72.7)	0.0001*	8 (20.5)	4 (14.8)	3 (10.3)	0.517
Da	80 (84.2)	9 (27.3)		31 (79.5)	23 (85.2)	26 (89.7)	

Ph-MPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

PARAMETRI KRVNE SLIKE

Koncentracija Hb i vrednost Hk u grupi bolesnika sa PV su bili značajno veći nego kod bolesnika sa ET i PMF ($p < 0.01$) (Tabela 17). Takođe, koncentracija Hb i vrednost Hk u grupi bolesnika sa ET su bili značajno veći nego kod bolesnika sa PMF ($p < 0.01$). Učestalost Hk > 0.47 bila je značajno veća u grupi bolesnika sa PV, nego u ET i PMF ($p < 0.01$). Broj Le u grupi bolesnika sa PV je bio značajno veći nego u ET ($p < 0.01$) i PMF ($p < 0.05$). Učestalost leukocitoze ($Le > 10 \times 10^9/L$) je bila značajno veća u grupi bolesnika sa PV, nego u ET ($p < 0.01$). Procenat neutrofila (Neu) i apsolutni broj neutrofila (ABN) u grupi bolesnika sa PV su bili značajno veći nego u ET ($p < 0.01$). ABN u PV je bio značajno veći u odnosu na PMF ($p < 0.05$). ABMo u grupi bolesnika sa PV je bio značajno veći u odnosu na ET ($p < 0.01$). Broj Tr u grupi

bolesnika sa ET je bio statistički značajno veći u odnosu na grupu bolesnika sa PV ($p < 0.05$).

Tabela 17. Parametri krvne slike

PARAMETRI	Ph-MPN (n=95)	Ph-MPN podtipovi			p	Kontrole (n=33)
		PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)		
Hb , g/L \bar{x} (SD) min-max	139.6 (6.6) 90-171	150.0 (13.0) 110-171	138.9 (9.7) 122-160	126.4 (16.4) 90-156	0.0001*	143.0 (16.1) 102-170
Hk , L/L \bar{x} (SD) min-max	0.44 (0.5) 0.28-0.53	0.48 (0.03) 0.38-0.53	0.43 (0.03) 0.38-0.52	0.39 (0.05) 0.28-0.49	0.0001*	0.42 (0.04) 0.33-0.50
Hk > 0.47L/L (%) Ne Da	66 (69.5) 29 (30.5)	16 (41) 23 (59)	24 (88.9) 3 (11.1)	26 (89.7) 3 (10.3)	0.0001*	29 (87.9) 4 (12.1)
Le , $\times 10^9/L$ \bar{x} (SD); med; min-max	12.4 (9.1) 9.9 3.4-62.3	14.4 (9.7) 12.1 5.4-61.7	9.2 (2.8) 9.2 3.4-15.8	12.7 (11.1) 9.9 3.8-62.3	0.003*	6.2 (1.4) 6 3.9-9.8
Le > $10 \times 10^9/L$ (%) Ne Da	48 (50.5) 47 (49.5)	14 (35.9) 25 (64.1)	19 (70.4) 8 (29.6)	15 (51.7) 14 (48.3)	0.022*	33 (100) 0 (0)
Neu , % \bar{x} (SD); min-max	65.7 (8.0) 44-85.3	68.2 (7.2) 44-82	62.8 (7.5) 44.9-73.9	65.1 (8.8) 45-85.3	0.021*	53.5 (7.2) 42.8-68.9
ABN , $\times 10^9/L$ \bar{x} (SD); med min-max	8.2 (6.0) 6.72 2.1-39.49	9.9 (6.6) 8.16 2.38-39.49	5.8 (2.0) 6.09 2.1-10.3	8.2 (6.9) 6.45 2.34-38	0.001*	3.4 (1.1) 2.98 1.74-5.44
Mo , % \bar{x} (SD); med min-max	5.5 (2.1) 5.1 2.1-12.5	5.8 (2.0) 5.7 2.1-11.4	5.0 (1.4) 4.8 2.4-7.6	5.5 (2.6) 4.8 2.6-12.5	0.229	8.3 (2.3) 8 4.7-13.5
ABMo , $\times 10^9/L$ \bar{x} (SD); med min-max	0.7 (0.8) 0.51 0.16-7.03	0.9 (1.2) 0.62 0.30-7.03	0.5 (0.2) 0.45 0.16-0.85	0.7 (0.5) 0.49 0.18-1.87	0.006*	0.5 (0.2) 0.48 0.27-0.88
Tr , $\times 10^9/L$ \bar{x} (SD); min-max	736 (282) 124-1289	669 (277) 135-1289	816 (242) 296-1193	754 (311) 124-1274	0.105	218 (44) 153-312
Tr > $450 \times 10^9/L$ (%) Ne Da	16 (16.8) 79 (83.2)	7 (17.9) 32 (82.1)	2 (7.4) 25 (92.6)	7 (24.1) 22 (75.9)	0.240	33 (100) 0 (0)

Ph-MPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; Hb - hemoglobin; Hk - hematokrit; Le - leukociti; Neu - neutrofilii; ABN - apsolutni broj neutrofila; Mo - monociti; ABMo - apsolutni broj monocita; Tr - trombociti

BIOHEMIJSKI PARAMETRI

Sedimentacija eritrocita je u grupi bolesnika sa PMF bila značajno veća u odnosu na PV i ET ($p < 0.01$). Koncentracija fibrinogena u celoj grupi bolesnika sa Ph⁻MPN je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$). Koncentracija glukoze je bila u okviru fizioloških vrednosti u svim ispitivanim grupama (Tabela 18). Frakcija HDL je u grupi bolesnika sa ET bila značajno veća nego u PMF ($p < 0.05$). Frakcija LDL je u grupi zdravih kontrola bila značajno veća nego u grupi bolesnika sa Ph⁻MPN ($p < 0.01$). Koncentracija triglicerida je u grupi bolesnika sa Ph⁻MPN bila značajno veća nego u grupi zdravih kontrola ($p < 0.01$).

Tabela 18. Biohemijski parametri

PARAMETRI	Ph ⁻ MPN (n=95)	Kontrole (n=33)	P ₁	Ph ⁻ MPN podtipovi			P ₂
				PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	
SE (mm/h)							
\bar{x} (SD)	14 (19)	13 (9)	0.075	6 (5)	11 (9)	27 (29)	0.0001*
med	8	10		3	10	15	
min-max	2-110	2-36		2-22	2-34	2-110	
CRP (mg/L)							
\bar{x} (SD)	2.6 (4.5)	2.0 (2.9)	0.557	1.8 (2.1)	1.8 (2.7)	4.4 (7.1)	0.280
med	1.0	0.8		0.9	0.8	1.1	
min-max	0.2-32.3	0.2-14.1		0.2-7.7	0.2-12.5	0.2-32.3	
Fibrinogen (g/L)							
\bar{x} (SD)	5.6 (1.5)	4.8 (0.9)	0.015*	5.6 (1.5)	5.2 (1.4)	5.8 (1.6)	0.340
med	5.6	4.8		5.6	4.7	5.7	
min-max	2.7-10.7	3.3-7.2		3.5-9.3	2.7-8.5	3.8-10.7	
Glc (mmol/L)							
mean (SD)	4.9 (0.9)	5.4 (0.9)	0.012	4.7 (0.7)	5.1 (1.1)	4.9 (0.8)	0.219
min-max	2.9-8.9	3.9-7.6		2.9-6.4	3.3-5.6	3.5-7.1	
Hol (mmol/L)							
\bar{x} (SD)	4.9 (1.3)	5.4 (1.2)	0.068	4.7 (1.2)	5.2 (1.2)	4.9 (1.4)	0.489
min-max	2.3-6.2	3.1-7.5		2.8-7.5	2.9-7.5	2.3-8.5	
HDL (mmol/L)							
\bar{x} (SD)	1.3 (0.4)	1.4 (0.4)	0.066	1.3 (0.4)	1.4 (0.3)	1.1 (0.3)	0.028*
min-max	0.7-2.0	0.7-2.1		0.7-2.0	0.8-1.9	0.7-1.9	
LDL (mmol/l)							
\bar{x} (SD)	2.9 (1.1)	3.5 (1.0)	0.004*	2.8 (0.9)	3.1 (0.9)	2.9 (1.1)	0.473
min-max	0.8-6.0	1.6-5.2		1.0-4.8	1.1-4.8	0.8-6.0	
Trig (mmol/L)							
\bar{x} (SD)	1.6 (0.7)	1.1 (0.6)	0.001*	1.5 (0.6)	1.5 (0.7)	1.8 (0.8)	0.289
med	1.4	1.0		1.4	1.4	1.6	
min-max	0.5-4.2	0.1-2.5		0.8-3.6	0.5-2.8	0.9-4.2	

Ph⁻MPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; SE - sedimentacija eritrocita; CRP - C-reaktivni protein; Glc - glukoza; hol - holesterol; HDL - lipoproteini velike gustine; LDL - lipoproteini male gustine; Trig - trigliceridi; p₁- Ph⁻MPN vs kontrole; p₂- PV vs ET vs PMF

PARAMETRI HEMOSTAZE

Vrednost PT-a izražena u procentima normalnih vrednosti bila je značajno manja, dok je prosečna vrednost aPTT-a bila značajno veća u celoj grupi bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 19). Prosečne aktivnosti faktora koagulacije FII i FV u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN bile su bili značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.01$). Srednja koncentracija F₁₊₂ je u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN ($p < 0.01$), kao i u grupama PV ($p < 0.05$) i PMF ($p < 0.01$) bila značajno veća u odnosu na grupu zdravih kontrola. Antikardiolipinska antitela (ACLA) su detektovana kod 4 (4.2%) bolesnika sa Ph^hMPN, kod jednog bolesnika sa PV i tri bolesnika sa PMF.

Mutacija FII 20210A je detektovana kod 3 (3.15%) bolesnika sa Ph^hMPN, a povećana rezistencije aktiviranog proteina C (APCR manje od 2.1) kod 5 (12.5%) bolesnika u ispitivanoj grupi od 40 bolesnika sa Ph^hMPN.

Tabela 19. Parametri hemostaze

PARAMETRI	MPN (n=95)	Kontrole (n=33)	P ₁	Ph ^h MPN podtipovi			P ₂
				PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	
PT (%) x̄ (SD) med min-max	76 (11) 76 31-105	101 (13) 100 74-125	0.0001*	77 (10) 76 58-100	78 (12) 78 31-102	72 (12) 72 45-105	0.072
PTT (s) x̄ (SD) med min-max	30.1 (5.1) 29.5 19.0-54.2	25.9 (2.5) 25.2 21.5-31.7	0.0001*	29.8 (4.8) 28.2 23.7-44.0	30.3 (6.3) 29.5 19.0-54.2	30.4 (4.2) 30.2 22.5-40.2	0.468
FII (%) x̄ (SD) med min-max	93 (21) 93 26-163	104 (16) 108 74-145	0.009*	94 (16) 91 66-133	94 (21) 102 26-122	89 (28) 87 42-121	0.503
FV (%) x̄ (SD) med min-max	86 (18) 86 38-133	103 (18) 104 66-134	0.0001*	84 (17) 83 38-124	85(19) 86 41-130	88 (19) 89 56-133	0.543
FVII (%) x̄ (SD) min-max	98 (23) 30-139	106 (17) 62-131	0.108	103 (17) 56-139	98 (24) 30-131	93 (28) 41-132	0.103
D-dimer (mg/L) x̄ (SD) med min-max	0.6 (0.7) 0.4 0.2-6.1	0.4 (0.4) 0.3 0.2-2.1	0.265	0.4 (0.3) 0.3 0.2-1.2	0.5(0.3) 0.3 0.2-1.4	0.9 (1.1) 0.5 0.1-6.1	0.064
F1+2 (pmol/L) x̄ (SD) med min-max	200 (130) 154 76-949	139 (43) 134 83-291	0.007*	198 (151) 149 83-949	162 (53) 157 89-262	240 (142) 192 76-670	0.245

Ph^hMPN - Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; PT - protrombinsko vreme; PTT - parcijalno tromboplastinsko vreme; FII - faktor II; FV - faktor V; FVII - faktor VII; F₁₊₂ - fibrin degradacioni produkti 1+2; p₁- Ph^hMPN vs kontrole; p₂- PV vs ET vs PMF.

IN VITRO ĆELIJSKA KULTURA PRETHODNIKA HEMATOPOEZE IZ KOŠTANE SRŽI

Rast *in vitro* hematopoeznih kolonija iz koštane srži je prikazan je u tabeli 20. Ukupan broj CFC kolonija u PV je bio značajno veći u odnosu na referentne vrednosti, kao i u odnosu na vrednosti u grupi bolesnika sa PMF (p < 0.01). Broj CFU-GM

kolonija u grupi bolesnika sa PMF je bio značajno snižen u odnosu na referentne vrednosti ($p < 0.01$). Broj BFU-E kolonija u grupi bolesnika sa PV je bio značajno povećan u odnosu na referentne vrednosti, kao i u odnosu na vrednosti u grupama bolesnika sa ET i PMF ($p < 0.01$). Ukupan broj EC i broj eBFU-E kolonija u PV je bio značajno veći nego u ET i PMF ($p < 0.01$).

Tabela 20. Rast *in vitro* hematopoeznih kolonija iz koštane srži

TIP KOLONIJA	PV (n=36)	ET (n=27)	PMF (n=27)	KONTROLE	P ₁	P ₂
CFC/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	248 (100) 232 89-483	208 (148) 194 19-650	160 (96) 137 22-354	155 (64) 152 31-283	PV <u>0.0001</u> ET 0.201 PMF 0.987	PV vs ET 0.097 PV vs PMF <u>0.002</u> ET vs PMF 0.295
CFU-GM/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	43 (21) 42 4-93	42 (24) 52 6-78	40 (41) 34 6-218	56 (27) 50 13-120	PV 0.080 ET 0.127 PMF <u>0.010</u>	PV vs ET 0.923 PV vs PMF 0.185 ET vs PMF 0.315
BFU-E/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	188 (80) 174 66-363	132 (103) 129 13-464	106 (82) 90 1-262	89 (49) 85 18-189	PV <u>0.0001</u> ET 0.151 PMF 0.682	PV vs ET <u>0.010</u> PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF 0.392
CFU-Mk/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	14 (20) 4 0-77	21 (47) 2 0-230	10 (20) 2 0-85	7 (2) 6 0-17	PV 0.902 ET 0.447 PMF 0.123	PV vs ET 0.757 PV vs PMF 0.458 ET vs PMF 0.825
EC/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	74 (56) 63 13-232	17 (24) 6 0-98	24 (39) 2 0-136			PV vs ET <u>0.0001</u> PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF 0.707
eBFU-E/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	73 (55) 60 12-222	16 (24) 5 0-98	24 (39) 2 0-136			PV vs ET 0.0001 PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF 0.864
eCFU-Mk/10⁴ MNČ \bar{x} (SD) med min-max	1.1 (2.2) 0 0-10	0.9 (1.9) 0 0-7	0.3 (0.7) 0 0-3			PV vs ET 0.921 PV vs PMF 0.124 ET vs PMF 0.167

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; MNČ - mononukleirane ćelije; CFC - Colony-Forming-Cells; CFU-GM - Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Monocyte; BFU-E - Burst-Forming-Unit-Erythroid; CFU-Mk - Colony-Forming-Unit-Megakaryocyte; EC - Endogenous Colonies; eBFU-E - endogenous Burst-Forming-Unit-Erythroid; eCFU-Mk - endogenous Colony-Forming-Unit-Megakaryocyte; p₁- PhMPN vs kontrole; p₂- PV vs ET vs PMF.

Korelacije broja CFC i EC sa parametrima krvne slike. U ET, ukupan broj CFC kolonija je bio u negativnoj korelaciji sa brojem Tr ($r_o = -,404$; $p < 0.05$). Ukupan broj EC u ET je bio u pozitivnoj korelaciji sa brojem Er, ($r_o = ,688$; $p < 0.01$), koncentracijom Hb ($r_o = ,418$; $p < 0.05$), Hk ($r_o = ,521$; $p < 0.01$).

Korelacije broja CFC i EC sa JAK2V617F mutacionim statusom. Ukupan broj EC u ET je bio u pozitivnoj korelaciji sa prisustvom JAK2 V617F mutacije ($r_o = ,521$; $p < 0.01$) i JAK2 alelnim opterećenjem ($r_o = ,583$; $p < 0.01$). U PMF, ukupan broj EC bio u pozitivnoj korelaciji sa JAK2 alelnim opterećenjem ($r_o = ,777$; $p < 0.01$).

MUTACIJE U GENIMA JAK2, TET2, MPL i CALR

U našoj grupi bolesnika sa Ph⁺MPN mutacija JAK2V617F je detektovana sa učestalošću od 69.5%. Grupa bolesnika sa PV je imala statistički značajno veću učestalost ove mutacije u odnosu na grupe bolesnika sa ET i PMF ($p < 0.01$). Stepenn alelnog opterećenja JAK2V617F je u grupama bolesnika sa PV i PMF bio značajno veći nego u grupi bolesnika sa ET ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

Mutacije u genu TET2 su detektovane kod 16.8% bolesnika sa Ph⁺MPN. Različiti tipovi ovih mutacija su prikazani u tabeli 20. Kod 4.2% bolesnika sa Ph⁺MPN su detektovane mutacije u genu MPL. Mutacije u genu za CALR su detektovane kod 17.9% bolesnika sa Ph⁺MPN, sa statistički značajno većom učestalošću u grupama bolesnika sa ET i PMF u odnosu na PV ($p < 0.01$). Stepenn alelnog opterećenja CALR u grupi bolesnika sa PMF je bio bio značajno veći nego u grupi bolesnika sa ET ($p < 0.05$).

Tabela 21. Genske mutacije

MUTACIJA	MPN	PV	ET	PMF	P
JAK2V617F, f (%) ne da	29 (30.5) 66 (69.5)	1 (2.6) 38 (97.4)	14 (51.9) 13 (48.1)	14 (48.3) 15 (51.7)	PV vs ET <u>0.0001</u> PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF <u>0.789</u>
JAK2V617F alelno opter, f (%) \bar{x} (SD) med min-max	42 (26) 36 6-100	48 (24) 42 17-100	20 (9) 20 8-40	44 (31) 36 6-100	PV vs ET <u>0.001</u> PV vs PMF <u>0.418</u> ET vs PMF <u>0.019</u>
JAK2V617F alelnoopter, f (%) <50 >50	45 (68.2) 21 (31.8)	22 (57.9) 16 (42.1)	13 (100)	10 (66.7) 5 (33.3)	PV vs ET <u>0.004</u> PV vs PMF <u>0.556</u> ET vs PMF <u>0.044</u>
TET2, f (%) ne da	79 (83.2) 16 (16.8)	32 (82.1) 7 (17.9)	20 (74.1) 7 (25.9)	27 (93.1) 2 (6.9)	PV vs ET <u>0.436</u> PV vs PMF <u>0.282</u> ET vs PMF <u>0.073</u>
MPL, f (%) ne da	91 (95.8) 4 (4.2)	39 (100)	25 (92.6) 2 (7.4)	27 (93.1) 2 (6.9)	PV vs ET <u>0.164</u> PV vs PMF <u>0.178</u> ET vs PMF <u>0.941</u>
CALR, f (%) ne da	78 (82.1) 17 (17.9)	38 (97.4) 1 (2.6)	20 (74.1) 7 (25.9)	20 (69) 9 (31)	PV vs ET <u>0.006</u> PV vs PMF <u>0.001</u> ET vs PMF <u>0.672</u>
CALR alelno opter, (%) \bar{x} (SD) med min-max	48 (8) 50 33-58		43 (8) 47 33-50	50 (6) 50 37-58	ET vs PMF <u>0.042</u>

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

Tabela 22. Struktura mutacija u genu TET2 (egzoni 5-6)

Nukleotidna promena	Posledica mutacije	Podtip Ph-MPN	JAK2V617F	tromboza
429delT	Asp143fs	PV	+	-
4859G>A	Gly1620Glu	ET	+	-
5893C>A	Leu1965Met	PV	+	+
1507G>T	Glu503*	ET	-	-
3366_3369 3373A>G 5708C>A	Thr1122fs Lys1125Glu Ala1903Asp	PV	+	-
2799G>T	Gln933His	ET	+	-
461C>A	Pro154Gln	PMF	-	-
196C>A 763C>A	His66Asn Gln255Lys	ET	-	-
78G>T	Gln26His	PMF	-	-
3560G>T	Gly118Val	PV	+	-
859>A 5084>A	His287Asn Pro1695His	PV	+	-
2012C>A	Ala671Asp	ET	+	-
3053C>A	Pro1018Gln	PV	+	-
3949A>G	Asn1317Asp	PV	+	-
3839C>T	Thr1280Ile	ET	-	-
3913A>C 3978delC	Ile1305Leu Ile1326fs	ET	+	-

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

Korelacije između prisustva genskih mutacija i markera aktivirane koagulacije

U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN prisustvo mutacija u genu za CALR je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima F₁₊₂ ($r_o = ,242$; $p < 0.05$). Nije uočena korelacija između markera aktivirane koagulacije i prisustva V617F mutacije na JAK-2 genu, kao i mutacija u TET2 ili MPL genu.

MARKERI AKTIVACIJE ĆELIJA KRVI

Leukocitno-trombocitni agregati

Nivoi leukocitno-trombocitnih agregata u vreme dijagnoze Ph⁺MPN

Rezultati merenja nivoa leukocitno-trombocitnih agregata u vreme postavljanja dijagnoze Ph⁺MPN je prikazan u tabeli 23. Prosečni nivoi Neu-Tr i Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF su bili značajno povećani u odnosu na nivoe u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika ($p < 0.01$), ali se nisu međusobno značajno razlikovali.

Opseg normalnih vrednosti za nivoe leukocitno-trombocitnih agregata ($x \pm 2SD$) u grupi zdravih kontrola je iznosio 2-16% za Neu-Tr agregate i 2-10% za Mo-Tr agregate. Povećani nivoi Neu-Tr agregata su detektovani kod 61.5% bolesnika sa PV, 77.8% bolesnika sa ET i 62.1% bolesnika sa PMF. Povećani nivoi Mo-Tr agregata su detektovani kod 38.5% bolesnika sa PV, 48.1% bolesnika sa ET i 48.3% bolesnika sa PMF.

Iako se prosečan intenzitet fluorescencije - MFI u ispitivanim grupama bolesnika sa Ph⁺MPN nije značajno razlikovao u odnosu na grupu zdravih kontrola, detektovane su razlike između pojedinih podtipova. Prosečna vrednost Neu-Tr MFI u grupi bolesnika sa PV je bila značajno veća u odnosu na ET i PMF ($p < 0.05$). Takođe, prosečna vrednost Mo-Tr MFI u grupi bolesnika sa PV je bila značajno veća u odnosu na PMF ($p < 0.05$).

Tabela 23. Nivoi leukocitno-trombocitnih agregata u vreme dijagnoze Ph⁺MPN

AGREGATI	PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	KONTROLE (n=33)	P ₁	P ₂
Neu-Tr agregati (%) \bar{x} (SD) min-max	22.6 (11.2) 4-44	24.3 (10.9) 8-51	22.2 (12.2) 3-42	8.9 (3.4) 3-16	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.662 PV vs PMF 0.995 ET vs PMF 0.718
Neu-Tr, f(%) Normalni Povišeni	15 (38.5) 24 (61.5)	6 (22.2) 21 (77.8)	11 (37.9) 18 (62.1)	33 (100) 0 (0)	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.434 PV vs PMF 0.964 ET vs PMF 0.201
Neu-Tr MFI \bar{x} (SD) med min-max	177 (116) 145 44-524	114 (62) 89 46-298	118 (83) 94 27-413	135 (103) 101 37-557	PV 0.060 ET 0.462 PMF 0.330	PV vs ET <u>0.017</u> PV vs PMF <u>0.012</u> ET vs PMF 0.919
Mo-Tr (%) \bar{x} (SD) med min-max	10.5 (7.1) 9 2-29	16.9 (16.9) 10 4-74	12.8 (7.7) 10 1-31	5.2 (2) 5 2-10	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.056 PV vs PMF 0.214 ET vs PMF 0.634
Mo-Tr, f (%) Normalni Povišeni	24 (61.5) 15 (38.5)	14 (51.9) 13 (48.1)	15 (51.7) 14 (48.3)	33 (100) 0 (0)	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.164 PV vs PMF 0.418 ET vs PMF 0.992
Mo-Tr MFI \bar{x} (SD) med min-max	128 (78) 104 40-371	99 (48) 92 42-252	94 (68) 79 26-370	112 (66) 91 36-318	PV 0.321 ET 0.696 PMF 0.097	PV vs ET 0.192 PV vs PMF <u>0.015</u> ET vs PMF 0.235

Ph⁺MPN – Filadelfija negativne mijeloproliferativne neoplazme; PV – policitemija vera; ET – esencijalna trombocitemija; PMF – primarna mijelofibroza; Neu-Tr – Neutrofilno-trombocitni agregati; Mo-Tr – Monocitno-trombocitni agregati; MFI – intenzitet fluorescencije; p₁ - poređenje razlika između podtipova Ph⁺MPN i zdravih kontrola; p₂ - poređenje razlika između podtipova Ph⁺MPN (PV vs ET vs PMF).

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i standardnih faktora rizika za trombozu. Povećani nivoi Neu-Tri Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF nisu korelirali sa prisustvom standardnih faktora rizika za trombozu (starošću > 60 godina i/ili pozitivnom istorijom tromboza).

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu. Povećani nivoi Neu-Tri Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF nisu korelirali sa prisustvom kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu.

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i parametara krvne slike. U grupi bolesnika sa PV, povećani nivoi Neu-Tr agregata pozitivno koreliraju sa Hk ($p < 0.05$; $r_o=,321$) i brojem Tr ($p < 0.01$; $r_o=,527$), a povećani nivoi Mo-Tr agregata pozitivno koreliraju sa brojem Tr ($p < 0.01$; $r_o=,632$).

U grupi bolesnika sa PMF povećani nivoi Neu-Tr agregata pozitivno koreliraju sa brojem Tr ($p < 0.05$; $r_o=,444$).

Analizirani su nivoi leukocitno-trombocitnih agregata u grupama PV, ET i PMF bolesnika sa visokim hematokritom ($Hk > 0.47$), leukocitozom ($Le > 10 \times 10^9/L$) i trombocitozom ($Tr > 450 \times 10^9/L$). U sva tri podtipa Ph⁺MPN nije utvrđena razlika u nivoima Neu-Tr i Mo-Tr agregata između grupa bolesnika sa i bez leukocitoze. Bolesnici sa PV i $Hk > 0.47$ su imali značajno veće nivoe Neu-Tr agregata u odnosu na bolesnike sa $Hk < 0.47$ ($p < 0.05$). Bolesnici sa PV i brojem $Tr > 450 \times 10^9/L$ su imali značajno veće nivoe Neu-Tr agregata u odnosu na bolesnike sa brojem $Tr < 450 \times 10^9/L$ ($p < 0.05$). Bolesnici sa PMF i brojem $Tr > 450 \times 10^9/L$ su imali značajno veće nivoe Neu-Tr agregata u odnosu na bolesnike sa brojem $Tr < 450 \times 10^9/L$ ($p < 0.01$).

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i parametara hemostaze. Povećani nivoi Neu-Tr i Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF nisu korelirali sa koncentracijom D-dimera, kao ni sa koncentracijom F_{1+2} .

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i parametara inflamacije. Povećani nivoi Neu-Tr agregata u ET su korelirali sa vrednošću CRP-a ($r_o = ,480$; $p < 0.05$), a u PMF sa koncentracijom fibrinogena ($r_o = ,385$; $p < 0.05$).

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i genskih mutacija. U celoj grupi bolesnika sa Ph⁺MPN prisustvo mutacije JAK2V617F je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima Neu-Tr agregata ($r_o = ,303$; $p < 0.01$), a prisustvo mutacija u genu MPL je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima Mo-Tr agregata ($r_o = ,243$; $p < 0.05$).

Povećani nivoi Neu-Tr i Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF nisu korelirali sa prisustvom JAK2 V617F mutacije i JAK2 V617F alelnim opterećenjem.

U grupi bolesnika sa ET, prisustvo mutacije u genu za CALR je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima Mo-Tr agregata ($r_o = ,386$; $p < 0.05$).

Korelacije između nivoa leukocitno-trombocitnih agregata i ukupnog broja *in vitro* kolonija. Povećani nivoi Neu-Tr i Mo-Tr agregata u PV, ET i PMF nisu korelirali sa ukupnim brojem CFC i EC.

Praćenje nivoa leukocitno-trombocitnih agregata

Bolesnici su lečeni različitim terapijskim kombinacijama: samo hidroksiurea, hidroksiurea + aspirin i samo aspirin. Terapijske flebotomije su takođe primenjivane kod bolesnika sa PV u cilju održavanja Hk u okviru normalnih vrednosti. Ukupno 7 (7.8%) bolesnika sa Ph⁺MPN je lečeno hidroksiureom, 28 (31.1%) kombinacijom hidroksiuree i aspirina, 50 (55.6%) bolesnika je lečeno samo aspirinom, dok je 5 (5.6%)

bolesnika bilo bez terapije. Bolesnici koji su primali citoreduktivnu terapiju (hidroksiurea sama, ili u kombinaciji sa aspirinom) su retestirani po uspostavljanju kompletne, ili parcijalne remisije bolesti. Vreme potrebno za postizanje remisije je variralo u opsegu od 6 do 9 meseci, od početka citoreduktivne terapije. Bolesnici koji su primali samo aspirin, ili koji nisu bili na terapiji, retestirani su 6 meseci od prvog testiranja na dijagnozi. S obzirom na to da je mali broj bolesnika sa Ph⁺MPN bio bez terapije, oni su isključeni iz statističke analize.

Od ukupno 95 bolesnika sa Ph⁺MPN uključenih u studiju, retestirano je ukupno 90 bolesnika. Petoro bolesnika su isključeni iz daljeg praćenja: tri bolesnika sa PMF (letalni ishod zbog progresije bolesti + letalni ishod u snu + zadesna smrt) i dva bolesnika sa PV (letalni ishod zbog CVI + alogena transplantacija koštane srži zbog transformacije bolesti u limfoblastni limfom).

Rezultati merenja nivoa leukocitno-trombocitnih agregata na kontroli su prikazani u tabeli 23. Prosečni nivoi Neu-Tr agregata u grupama bolesnika sa ET i PMF su i dalje bili značajno povećani u odnosu na nivoe u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika ($p < 0.01$). U grupi bolesnika sa PV je zabeleženo sniženje nivoa Neu-Tr agregata, koji se više nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Takođe, nivoi Neu-Tr agregata u grupi bolesnika sa PV su na kontroli bili značajno niži u odnosu na grupu bolesnika sa PMF ($p < 0.05$).

Prosečni nivoi Mo-Tr agregata u grupi bolesnika sa ET su i na kontrolibili značajno povećani u odnosu na nivoe u grupi zdravih ispitanika ($p < 0.05$). U grupama bolesnika sa PV i PMF je zabeleženo sniženje nivoa Mo-Tr agregata, koji se više nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Prosečni nivoi Mo-Tr agregata u grupama bolesnika sa PV ($p < 0.01$) i PMF ($p < 0.05$) su na kontroli bili značajno niži u odnosu na grupu bolesnika sa ET.

Povećani nivoi Neu-Tr agregata su se i dalje održavali kod 10.8% bolesnika sa PV, 25.9% bolesnika sa ET i 34.6% bolesnika sa PMF, a povećani nivoi Mo-Tr agregata kod 2.7% bolesnika sa PV, 11.1% bolesnika sa ET i 11.5% bolesnika sa PMF.

Prosečan intenzitet fluorescencije za Neu-Tr i Mo-Tr agregate je na kontroli u grupama bolesnika sa ET i PMF bio značajno snižen u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0.01$). Takođe, prosečan intenzitet fluorescencije za Neu-Tr ($p < 0.01$) i Mo-Tr ($p < 0.05$) agregate je na kontroli u grupama bolesnika sa ET i PMF bio značajno snižen u odnosu na grupu bolesnika sa PV.

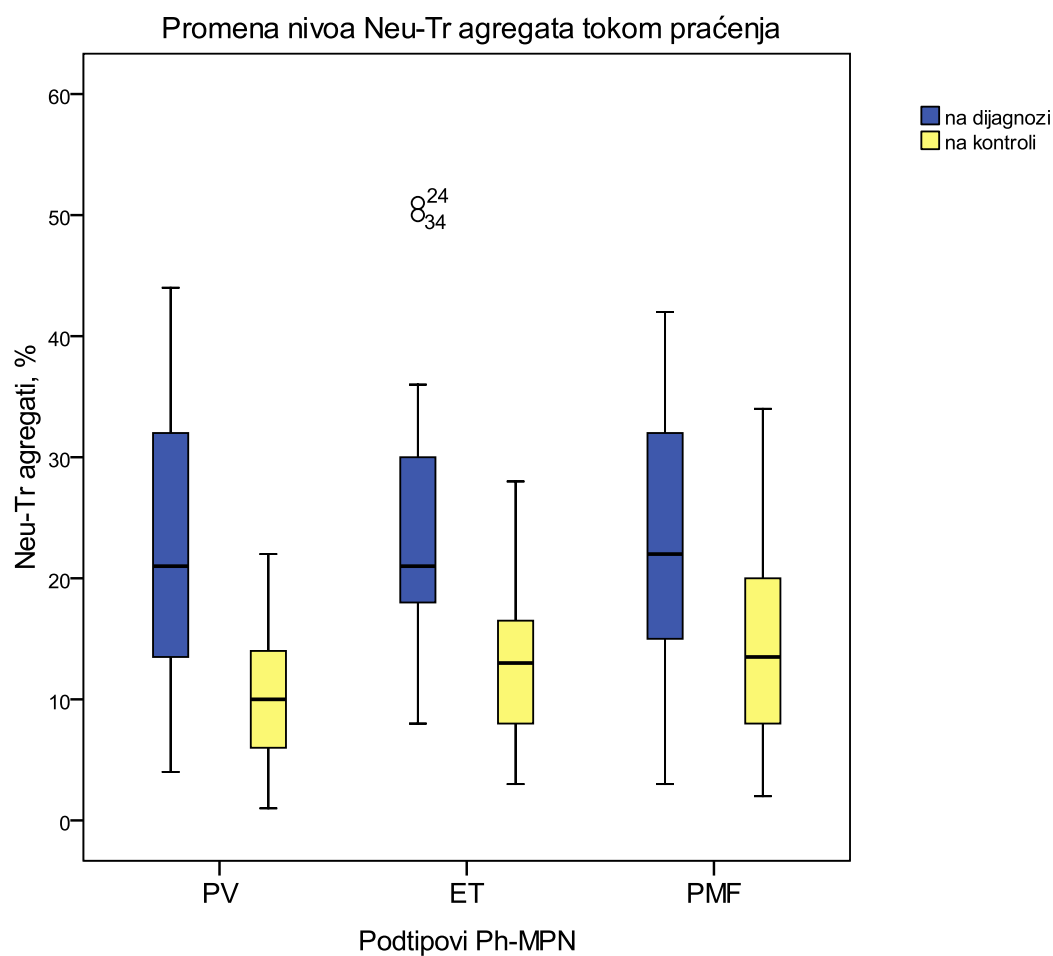
Tabela 24. Nivoi leukocitno-trombocitnih agregata posle terapije

AGREGATI	PV (n=37)	ET (n=27)	PMF (n=26)	KONTROLE (n=33)	P₁	p₂
Neu-Tr agregati (%) \bar{x} (SD) min-max	10.5 (5.0) 1-22	13.3 (6.8) 3-28	14.5 (9.2) 2-34	8.9 (3.4) 3-16	PV 0.134 ET <u>0.002</u> PMF <u>0.002</u>	PV vs ET 0.064 PV vs PMF <u>0.029</u> ET vs PMF 0.578
Neu-Tr agregati, f(%) normalni povećani	33 (89.2) 4 (10.8)	20 (74.1) 7 (25.9)	17 (65.4) 9 (34.6)	33 (100) 0 (0)	PV 0.052 ET <u>0.002</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.113 PV vs PMF <u>0.022</u> ET vs PMF 0.491
Neu-Tr agregati MFI \bar{x} (SD) med min-max	102 (31) 100 40-172	82 (21) 83 52-145	84 (27) 79 46-151	135 (103) 101 37-557	PV 0.626 ET <u>0.002</u> PMF <u>0.005</u>	PV vs ET 0.004 PV vs PMF <u>0.011</u> ET vs PMF 0.915
Mo-Tr agregati (%) \bar{x} (SD) med min-max	5.1 (2.9) 4 1-17	7.2 (3.1) 7 2-14	5.5 (2.7) 5 1-11	5.2 (2) 5 2-10	PV 0.077 ET <u>0.044</u> PMF 0.705	PV vs ET <u>0.002</u> PV vs PMF 0.286 ET vs PMF <u>0.040</u>
Mo-Tr agregati, f(%) normalni povećani	36 (97.3) 1 (2.7)	24 (88.9) 3 (11.1)	23 (88.5) 3 (11.5)	33 (100) 0 (0)	PV 0.341 ET <u>0.049</u> PMF <u>0.045</u>	PV vs ET 0.170 PV vs PMF 0.157 ET vs PMF 0.961
Mo-Tr agregati MFI \bar{x} (SD) med min-max	94 (31) 92 38-159	77 (22) 72 43-133	76 (28) 71 35-160	112 (66) 91 36-318	PV 0.685 ET <u>0.006</u> PMF <u>0.010</u>	PV vs ET 0.019 PV vs PMF <u>0.025</u> ET vs PMF 0.817

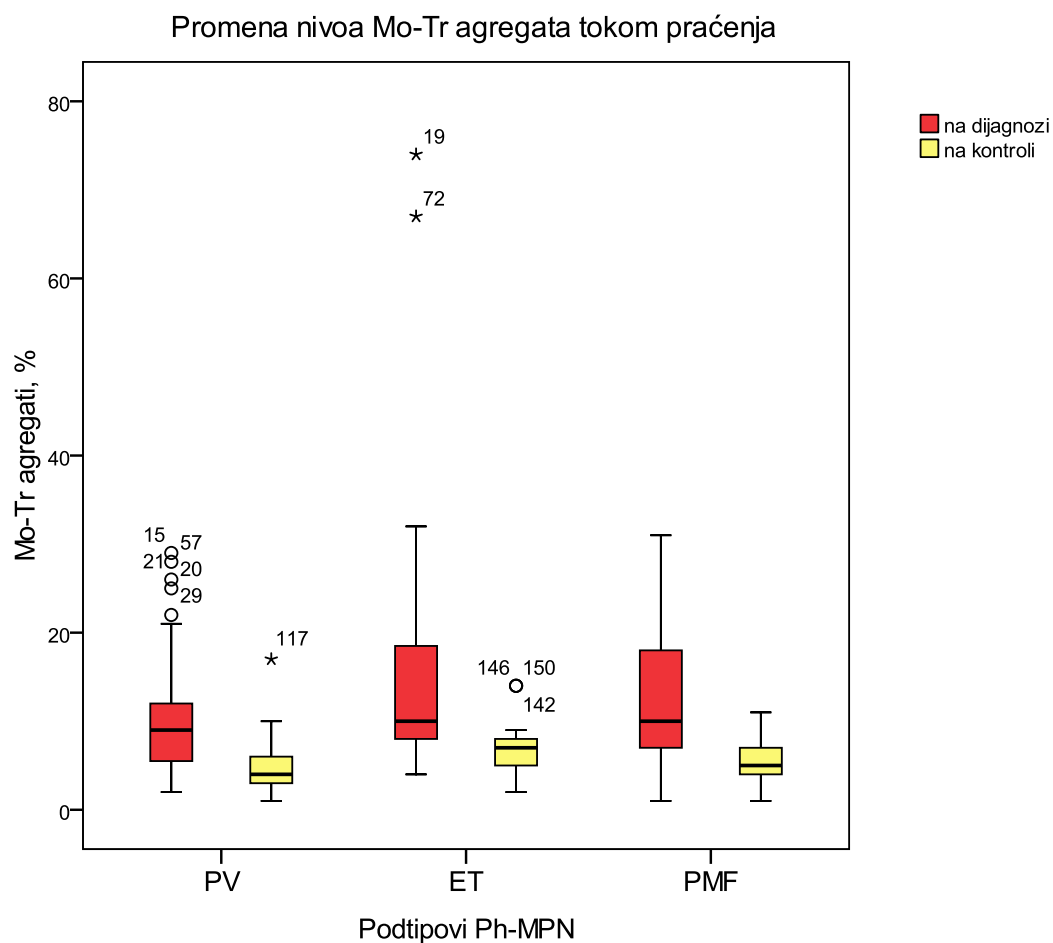
PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza; Neu-Tr - Neutrofilno-trombocitni; Mo-Tr - Monocitno-trombocitni; MFI - intenzitet fluorescencije; p₁ - poređenje razlika između podtipova PhMPN i zdravih kontrola; p₂ - poređenje razlika između podtipova Ph-MPN (PV vs ET vs PMF); p₁ - poređenje razlika između podtipova PhMPN i zdravih kontrola; p₂ - poređenje razlika između podtipova Ph-MPN (PV vs ET vs PMF).

Komparativni prikaz nivoa leukocitno-trombocitnih agregata na dijagnozi i na kontroli

Tokom perioda praćenja došlo je do značane redukcije prosečnih nivoa Neu-Tr i Mo-Tr agregata u svim podtipovima Ph-MPN, u odnosu na vrednosti u vreme dijagnoze ($p < 0.01$) (Grafik 1 i 2).

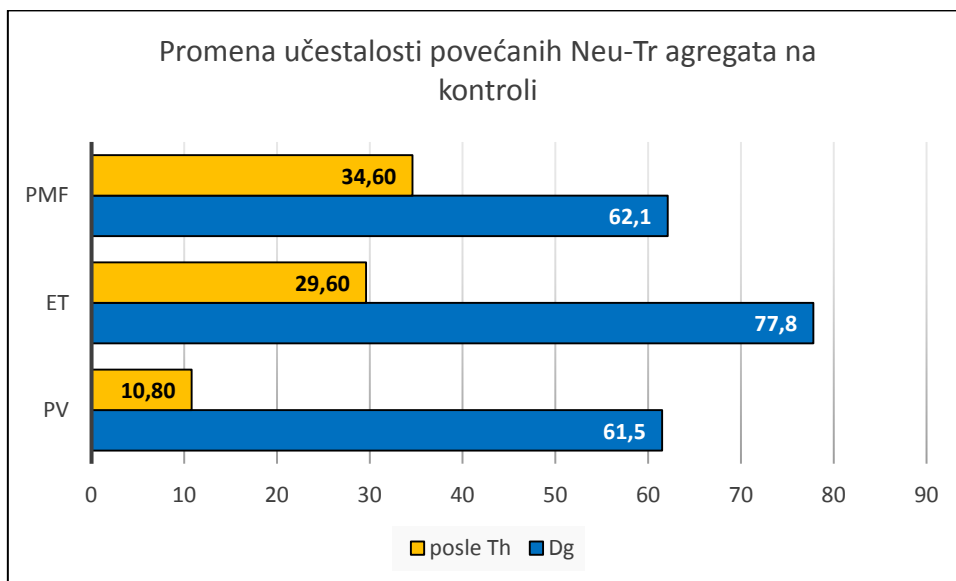


Grafik 1. Promena nivoa Neu-Tr agregata tokom praćenja

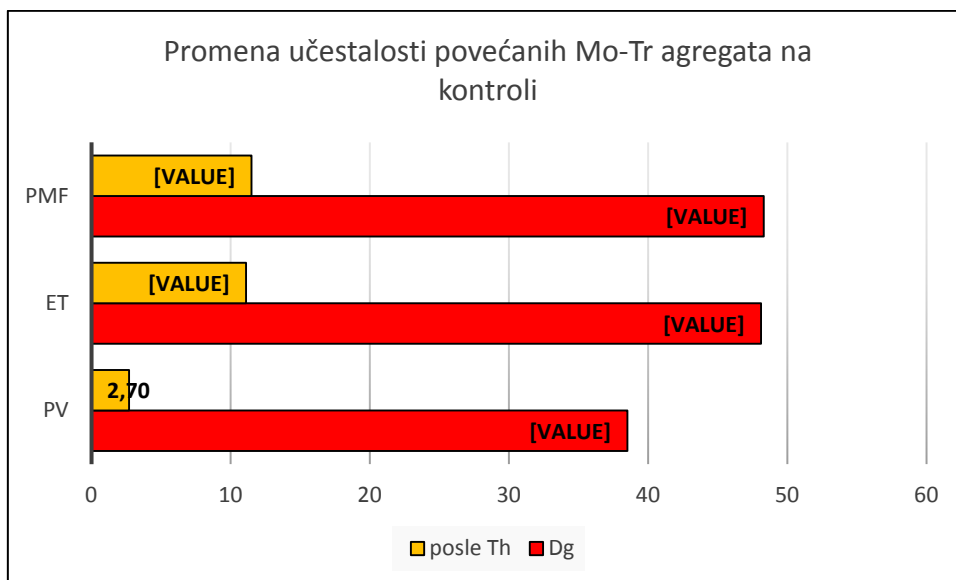


Grafik 1. Promena nivoa Mo-Tr agregata tokom praćenja

Promena učestalosti povećanih leukocitno-trombocitnih agregata je prikazana na graficima 3 i 4. Učestalost povećanih Neu-Tr i Mo-Tr agregata je na kontroli bila značajno niža u odnosu na vrednosti na dijagnozi u PV ($p < 0.01$), ET ($p < 0.01$) i PMF ($p < 0.05$; $p < 0.01$).



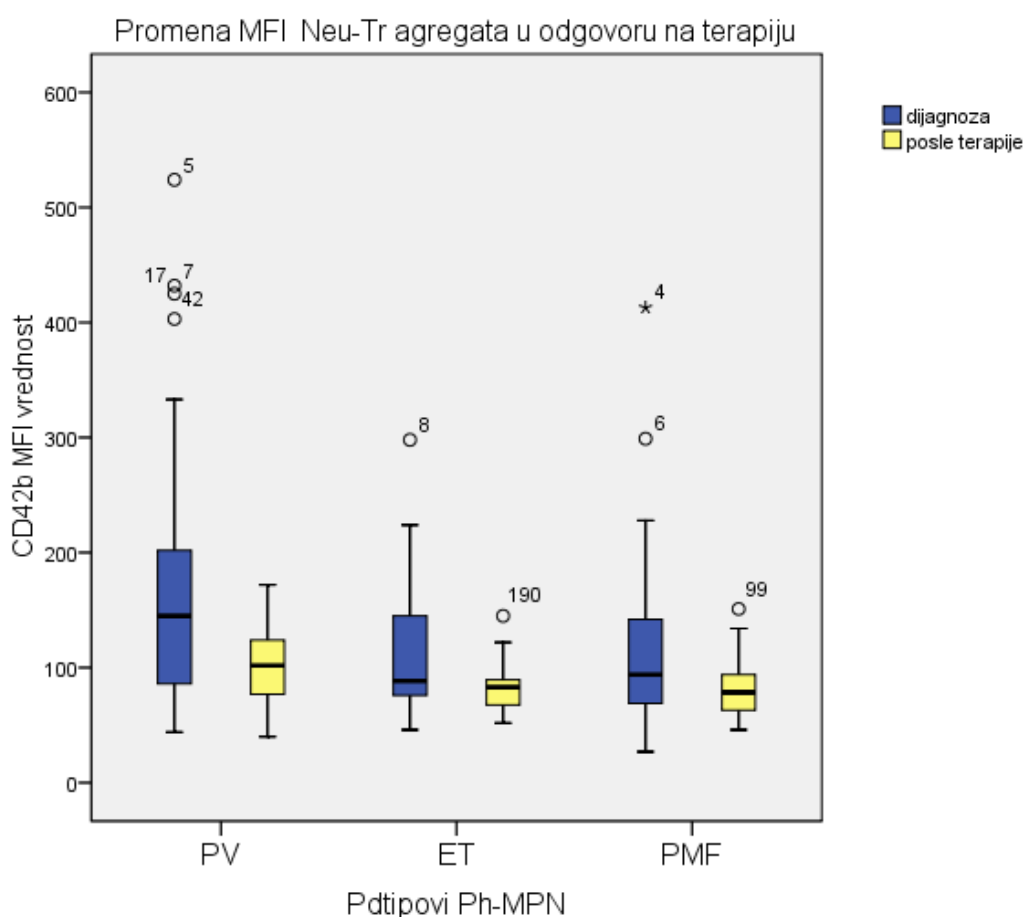
Grafik 3. Promena učestalosti povećanih Neu-Tr agregata na kontroli



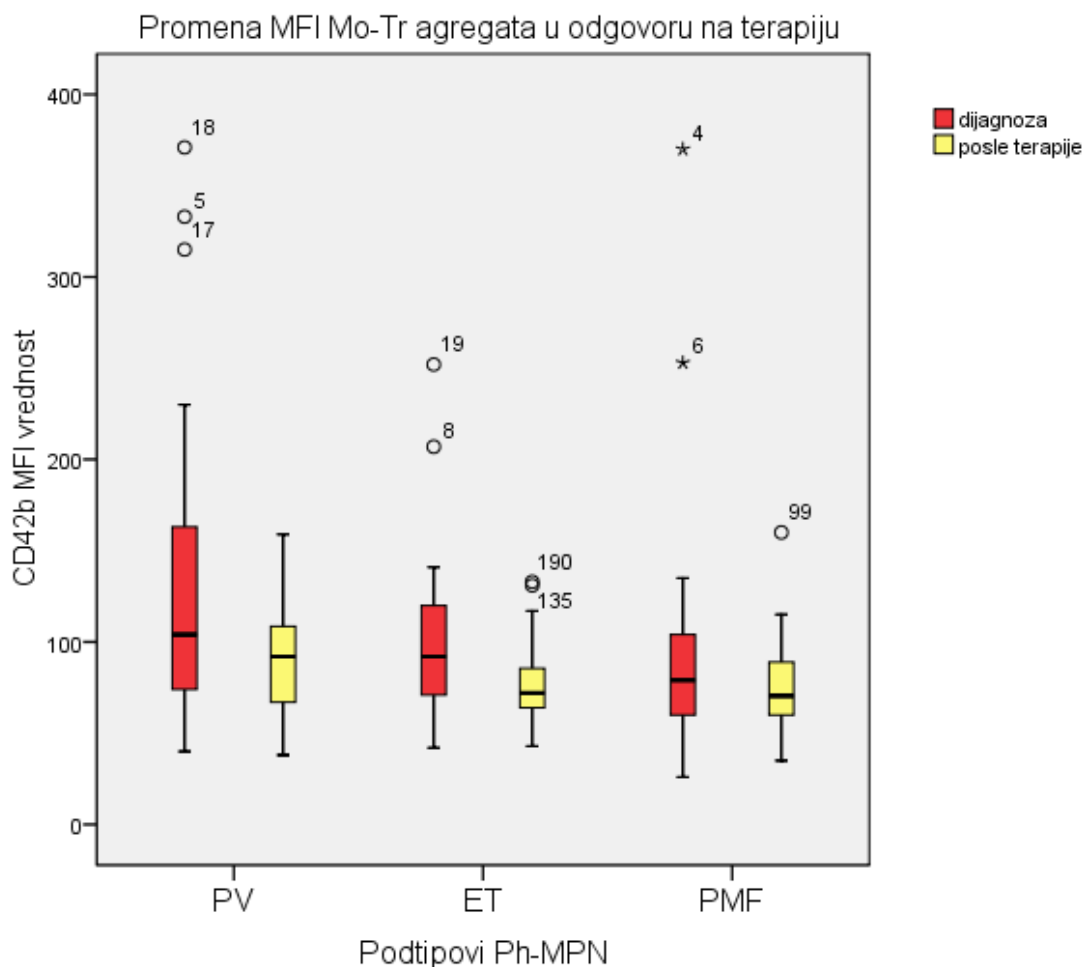
Grafik 4. Promena učestalosti povećanih Mo-Tr agregata na kontroli

Promena prosečnih vrednosti MFI leukocitno-trombocitnih agregata u periodu praćenja je prikazana na graficima 5 i 6. U grupi bolesnika sa PV prosečna vrednost MFI Neu-Tr agregata je na kontroli bila značajno snižena u odnosu na prosečne

vrednosti u vreme dijagnoze ($p < 0.01$). U grupama bolesnika sa ET i PMF takođe je izmereno sniženje MFI Neu-Tr agregata na kontroli, ali je ono bilo na granici statističke značajnosti ($p=0.051$; $p=0.055$). Prosečna vrednost MFI za Mo-Tr aggregate je na kontroli bila značajno snižena u odnosu na početne vrednosti u grupi bolesnika sa PV ($p < 0.05$). U grupi bolesnika sa ET prosečne vrednosti MFI za Mo-Tr aggregate su se na kontroli snizile u odnosu na početne, ali je ovo sniženje bilo na granici statističke značajnosti ($p=0.058$). U grupi bolesnika sa PMF, sniženje MFI za Mo-Tr aggregate na kontroli nije dostiglo statističku značajnost ($p=0.292$).



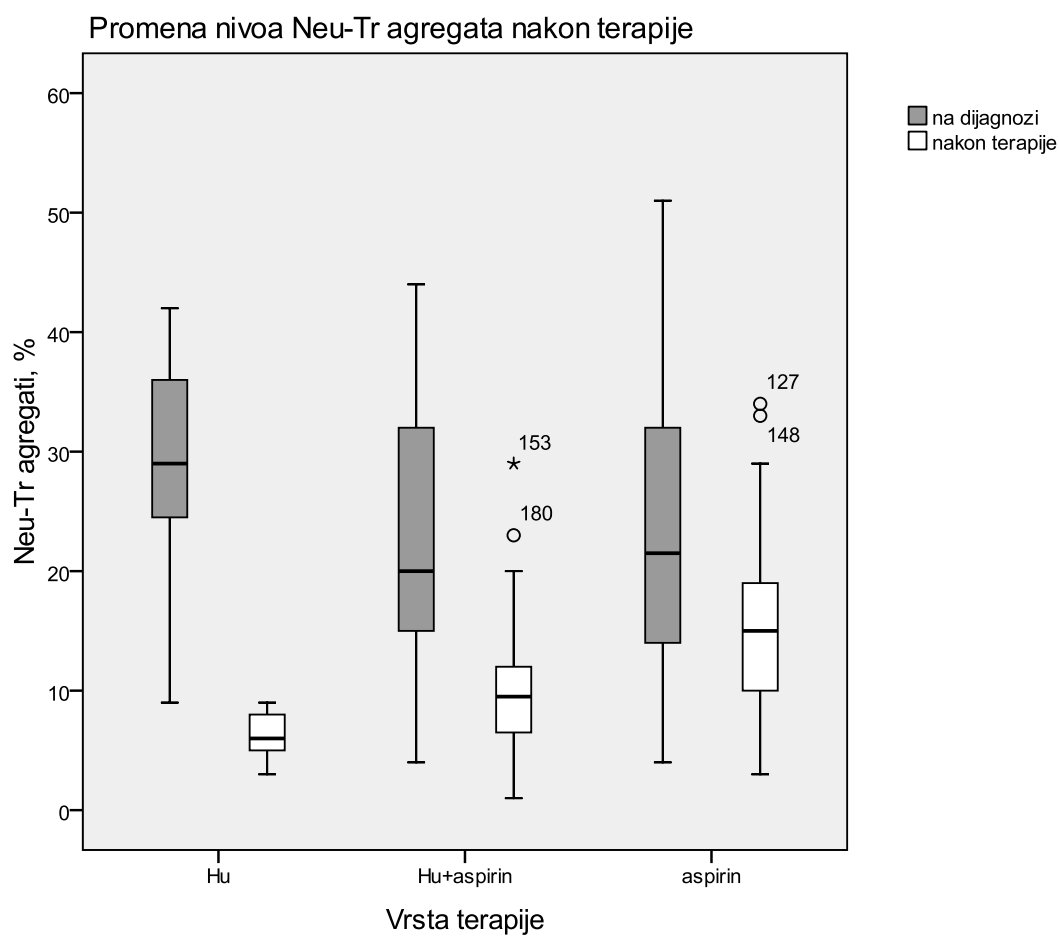
Grafik 5. Promena MFI Neu-Tr agregata na kontroli



Grafik 6. Promena MFI Mo-Tr agregata na kontroli

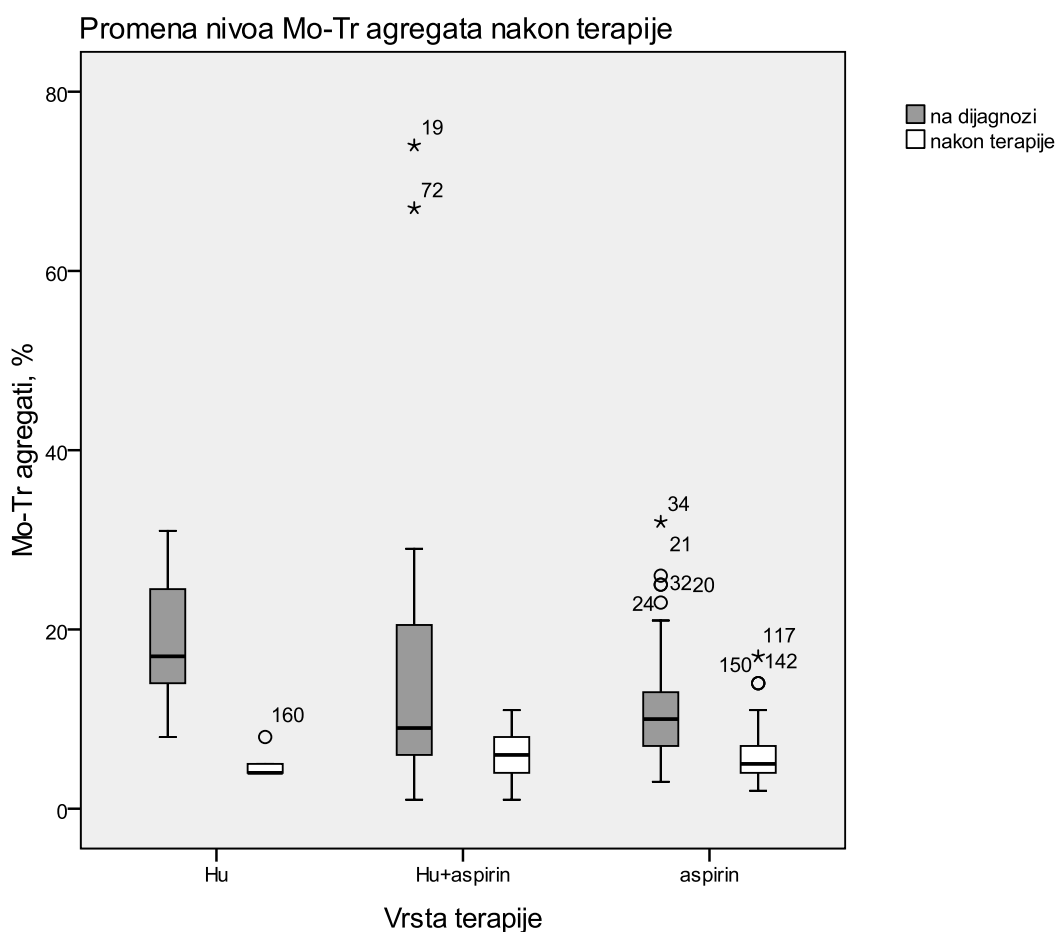
Grupa bolesnika sa Ph⁺MPN je podeljena u grupe na osnovu vrste primenjene terapije (hidroksiurea, hidroksiurea+aspirin, aspirin) i u ovim grupama je posmatran efekat terapije na nivo leukocitno-trombocitnih agregata.

Kada su u pitanju Neu-Tr agregati, sva tri tipa terapije su izazvala statistički značajno sniženje nivoa na kontroli ($p < 0.01$) (Grafik 7).



Grafik 7. Promena nivoa Neu-Tr agregata u odgovoru na terapiju

Nivoi Mo-Tr agregata u odgovoru na sva tri tipa terapije su takođe statistički značajno redukovani u odnosu na vrednosti u vreme dijagnoze ($p < 0.01$) (Grafik 8).



Grafik 8. Promena nivoa Mo-Tr agregata u odgovoru na terapiju

Ispitivanje nivoa solubilnih selektina kod bolesnika sa Ph^hMPN

U celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN prosečni nivoi solubilnog E-selektina u PV ($p < 0.01$), ET ($p < 0.05$) i PMF ($p < 0.01$) su u vreme dijagnoze bolesti bili značajno povećani u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Bolesnici sa PV i PMF su imali značajno veće prosečne vrednosti solubilnog E-selektina u odnosu na grupu bolesnika sa ET ($p < 0.05$). Povećani nivoi solubilnog E-selektina su detektovani kod 33.3% bolesnika sa PV, 18.5% bolesnika sa ET i 27.6% bolesnika sa PMF.

Prosečni nivoi solubilnog L-selektina u PV ($p < 0.01$), ET ($p < 0.01$) i PMF ($p < 0.05$) su u vreme dijagnoze bolesti bili značajno povećani u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Bolesnici sa PV su imali značajno veće prosečne vrednosti solubilnog L-selektina u odnosu na grupe bolesnika sa ET i PMF ($p < 0.01$). Povećani nivoi solubilnog L-selektina su detektovani kod 84.6% bolesnika sa PV, 37.0% bolesnika sa ET i 20.7% bolesnika sa PMF.

Prosečni nivoi solubilnog P-selektina u PV, ET i PMF su u vreme dijagnoze bolesti bili značajno povećani u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika ($p < 0.01$), ali bez značajnih razlika između pojedinačnih podtipova (tabela 25). Povećani nivoi solubilnog P-selektina su detektovani kod 92.3% bolesnika sa PV, 96.3% bolesnika sa ET i 93.1% bolesnika sa PMF.

Tabela 25. Nivoi solubilnih selektina u vreme dijagnoze Ph^hMPN

SELEKTINI	PV (n=39)	ET (n=27)	PMF (n=29)	KONTROLE (n=28)	P ₁	P ₂
E-selektin, (ng/mL) \bar{x} (SD) med min-max	37.2 (18.3) 33.2 14.5-107.1	26.8 (12.5) 26.5 5.8-53.1	37.3 (20.0) 34.5 10.8-87.5	19.0 (10.0) 19.5 0-33.7	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.028</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET <u>0.020</u> PV vs PMF <u>0.965</u> ET vs PMF <u>0.048</u>
E-selektin, f (%) Normalan Povišen	26 (66.7) 13 (33.3)	22 (81.5) 5 (18.5)	21 (72.4) 8 (27.6)	28 (100) 0 (0)	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.023</u> PMF <u>0.004</u>	PV vs ET <u>0.184</u> PV vs PMF <u>0.612</u> ET vs PMF <u>0.422</u>
L-selektin, (μ g/mL) \bar{x} (SD) min-max	3.51 (1.2) 0.8-6.3	2.4 (1.0) 1.1-4.7	2.1 (1.4) 0.5-6.3	1.3 (0.6) 0.2-2.7	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.013</u>	PV vs ET <u>0.0001</u> PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF <u>0.377</u>
L-selektin, f (%) Normalan Povišen	6 (15.4) 33 (84.6)	17 (63) 10 (37)	23 (79.3) 6 (20.7)	28 (100) 0 (0)	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.023</u>	PV vs ET <u>0.0001</u> PV vs PMF <u>0.0001</u> ET vs PMF <u>0.176</u>
P-selektin, (ng/mL) \bar{x} (SD) med min-max	281.8 (172.0) 247.5 89.8-930.0	247.3 (100.4) 217.86 70.3-525.6	354.0 (523.8) 235.2 113.1-3000.0	69.8 (29.7) 68.7 1.7-147.1	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET <u>0.720</u> PV vs PMF <u>0.975</u> ET vs PMF <u>0.670</u>
P-selektin, f (%) Normalan Povišen	3 (7.7) 36 (92.3)	1 (3.7) 26 (96.3)	2 (6.9) 27 (93.1)	28 (100) 0 (0)	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET <u>0.639</u> PV vs PMF <u>1.000</u> ET vs PMF <u>1.000</u>

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i standardnih faktora rizika za trombozu. Nivo P-selektina je u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN u korelaciji sa standardnim visokim rizikom za trombozu ($r_o=,387$; $p<0.0001$).

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu. Povećani nivoi solubilnih selektina (E-, L- i P-) nisu korelirali sa prisustvom kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu.

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i parametara krvne slike. U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo E-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa brojem Le ($r_o=,271$; ; $p<0.01$), ABN ($r_o=,323$; $p<0.01$) i ABMo ($r_o=,216$; $p<0.05$).

Nivo L-selektina je u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN u korelaciji sa brojem Le ($r_o=,552$; $p<0.0001$), ABN ($r_o=,586$; $p<0.0001$), ABMo ($r_o=,317$; $p<0.01$), Hb ($r_o=,295$; $p<0.01$) i Hk ($r_o=,407$; $p<0.0001$).

Nivo P-selektina je u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN u korelaciji sa brojem Leu ($r_o=,337$; $p<0.001$), ABN ($r_o=,326$; $p<0.001$), Tr ($r_o=,359$; $p<0.0001$).

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i parametara hemostaze. U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo E-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa D-dimerom ($r_o=,241$; $p<0.05$). U grupi bolesnika sa ET nivo E-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa D-dimerom ($r_o=,537$; $p<0.01$).

U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo P-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa D-dimerom ($r_o=,281$; $p<0.01$) i sa F1+2 ($r_o=,406$; $p<0.01$). U grupi bolesnika sa PV nivo P-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa D-dimerom ($r_o=,387$; $p<0.05$). U grupi bolesnika sa PMF, nivo P-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa F1+2 ($r_o=,586$; $p<0.01$).

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i parametara inflamacije. U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo E-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa CRP-om ($r_o=,258$; $p<0.05$).

U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo L-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa SE ($r_o=,311$; $p<0.01$).

U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN nivo P-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa fibrinogenom ($r_o=,210$; $p<0.05$). U grupi bolesnika sa PV nivo P-selektina je u pozitivnoj korelaciji sa fibrinogenom ($r_o=,439$; $p<0.01$) i SE ($r_o=,334$; $p<0.05$).

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i genskih mutacija. U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN prisustvo mutacije JAK2V617F je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima E-selektina ($r_o = ,278$), L-selektina ($r_o = ,456$) i P-selektina ($r_o = ,498$) ($p < 0.01$). Stepen JAK2V617F alelnog opterećenja u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN je u pozitivnoj korelaciji sa nivoima E- i L-selektina ($r_o = ,380$; $r_o = ,372$; $p < 0.01$). U grupi bolesnika sa Ph⁺MPN prisustvo mutacija u genu za CALR je u negativnoj korelaciji sa nivoima solubilnog L-selektina ($r_o = -,230$; $p < 0.05$).

Korelacije između nivoa solubilnih selektina i ukupnog broja *in vitro* kolonija. Kod bolesnika sa PV ukupan broj EC bio u pozitivnoj korelaciji sa nivoom solubilnog E-selektina ($r_o=,347$; $p<0.05$). Ukupan broj EC u ET je bio u pozitivnoj korelaciji sa nivoom solubilnog P-selektina ($r_o=,443$; $p<0.05$). U PMF, ukupan broj CFC kolonija je bio u negativnoj korelaciji sa nivoom solubilnog P-selektina ($r_o=-,430$; $p<0.05$).

Praćenje nivoa solubilnih selektina

Rezultati merenja nivoa solubilnih selektina posle primenjene terapije kod selektovane grupe bolesnika sa PV, ET i PMF, koji su inicijalno imali povećane nivoe, je prikazan u tabeli 26. Prosečni nivoi E-, L- i P-selektina u svim ispitivanim grupama bolesnika sa Ph^hMPN su i dalje bili značajno povećani u odnosu na nivoe u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika ($p < 0.01$).

Tabela 26. Nivoi solubilnih selektina posle terapije kod selektovane grupe bolesnika sa povećanim vrednostima na dijagnozi Ph-MPN

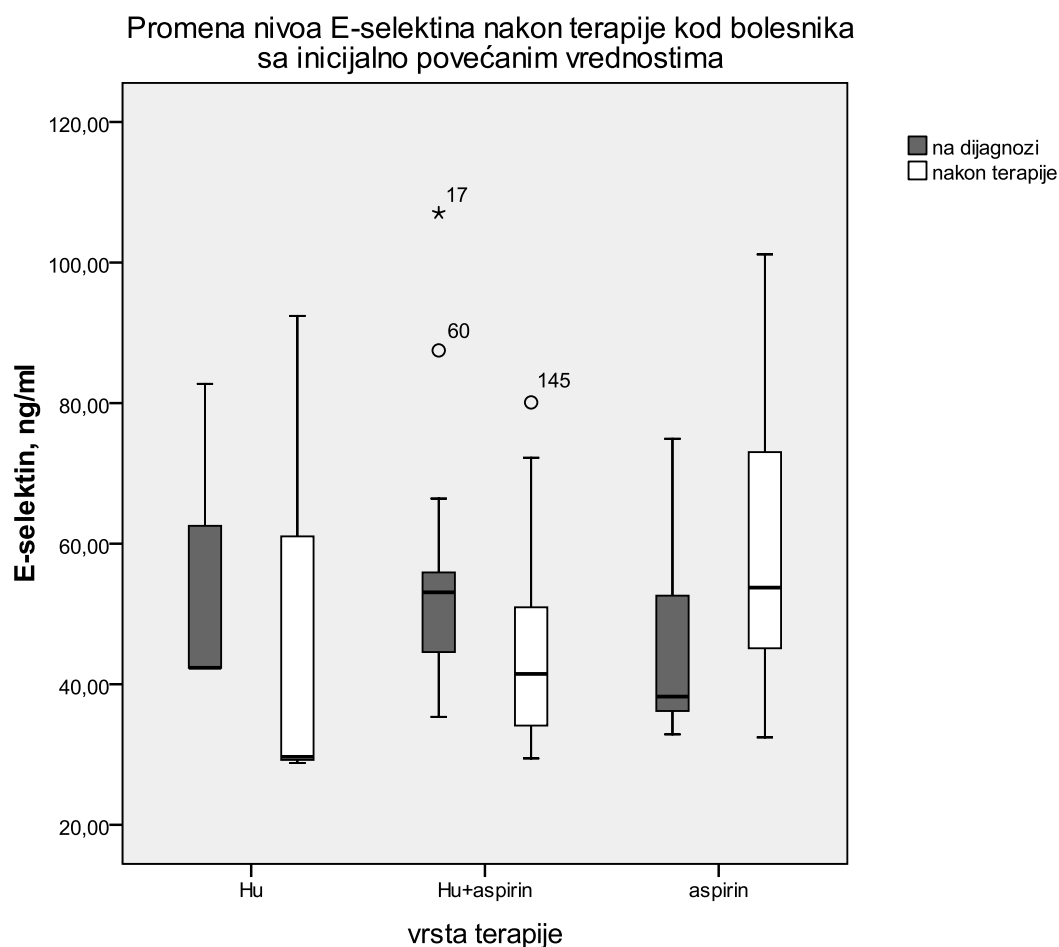
SELEKTINI	PV	ET	PMF	KONTROLE	P ₁	P ₂
E-selektin , (ng/mL) \bar{x} (SD) med min-max	(n=18) 58.8 (19.4) 50.8 29.7-101.2	(n=8) 46.5 (16.2) 43.5 28.8-78.8	(n=13) 50.8 (21.1) 41.0 29.5-92.4	(n=28) 19.0 (10.0) 19.5 0-33.7	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.0001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.129 PV vs PMF 0.157 ET vs PMF 0.916
L-selektin , (μg/mL) \bar{x} (SD) min-max	(n=17) 2.7 (1.3) 1.0-5.5	(n=15) 2.2 (1.0) 0.7-4.0	(n=8) 3.0 (1.5) 1.3-5.3	(n=28) 1.3 (0.6) 0.2-2.7	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.001</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.244 PV vs PMF 0.688 ET vs PMF 0.166
P-selektin , (ng/mL) \bar{x} (SD) med min-max	(n=14) 183.1 (127.9) 147.8 36.2-430.8	(n=14) 130.1 (67.1) 110.4 41.4-240.6	(n=14) 210.4 (65.7) 221.2 94.4-310.5	(n=28) 69.8 (29.7) 68.7 1.7-147.1	PV <u>0.0001</u> ET <u>0.004</u> PMF <u>0.0001</u>	PV vs ET 0.427 PV vs PMF 0.164 ET vs PMF <u>0.004</u>

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

Komparativni prikaz nivoa solubilnih selektina pre i posle terapije

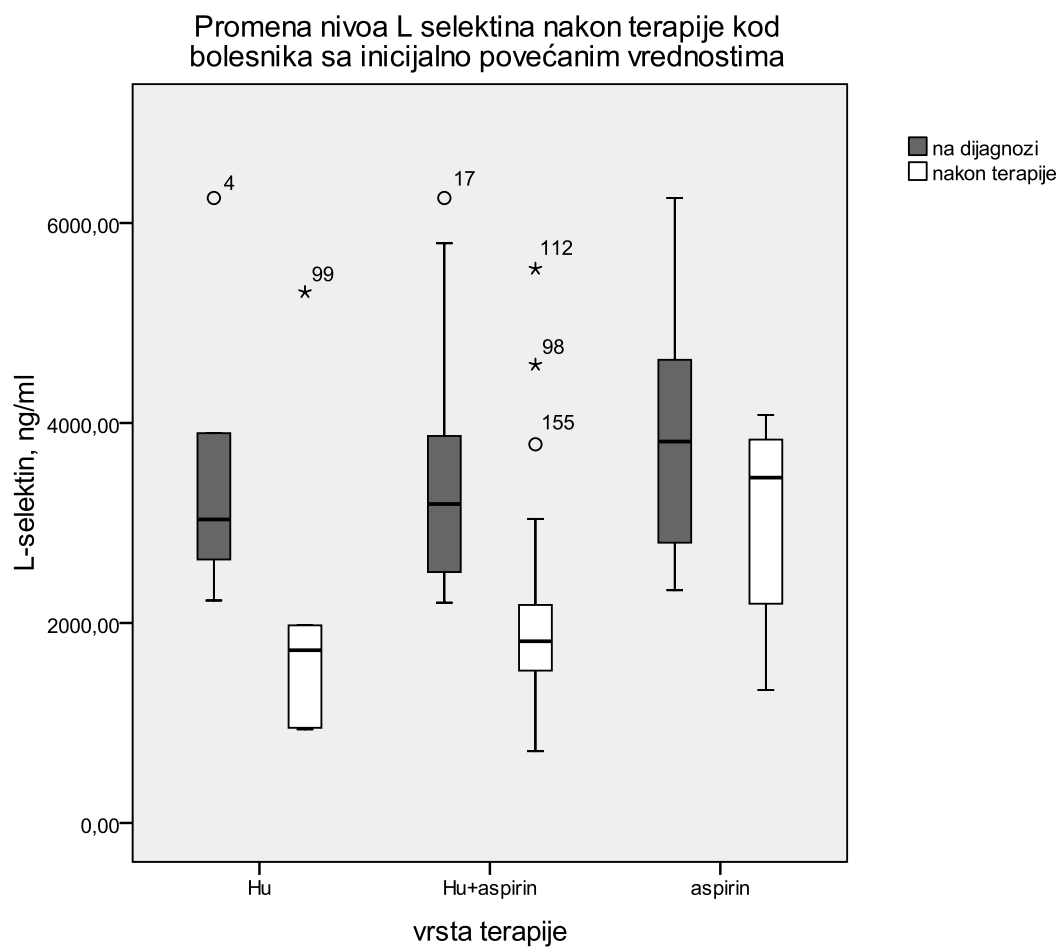
Grupa bolesnika sa Ph^hMPN koja je imala inicijalno povišene vrednosti solubilnih selektina je podeljena u tri podgrupe na osnovu vrste primljene terapije (hidroksiurea, hidroksiurea + aspirin, aspirin) i u ovim grupama je posmatran efekat terapije na nivoe selektina.

Grupa bolesnika sa Ph⁺MPN sa inicijalno povišenim nivoima E-selektina, koja je primala samo hidroksiureu je bila isuviše mala (tri bolesnika), zbog čega je izostavljena iz statističke analize. Nivoi E-selektina su značajno redukovani pod uticajem kombinovane terapije hidroksiurea + aspirin. Bolesnici koji su primali samo aspirin su na kontroli značajno povećali nivoe E-selektina u odnosu na vrednosti iz perioda dijagnoze ($p < 0.01$) (Grafik 9).



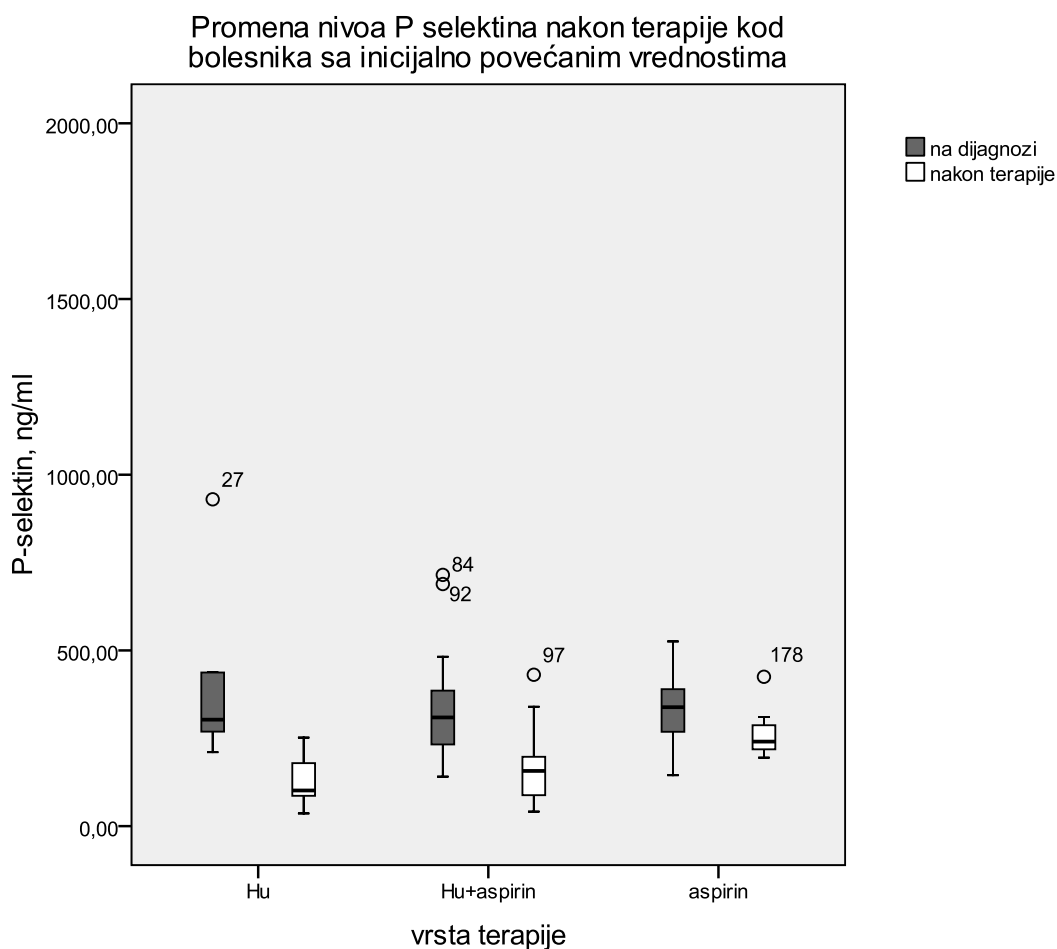
Grafik 9. Promena nivoa solubilnog E-selektina u odgovoru na terapiju

Grupa bolesnika sa Ph⁺MPN sa inicijalno povišenim nivoima L-selektina je u sve tri terapijske grupe imala sniženje nivoa u odnosu na početne vrednosti, (grupe HU i ASP; $p < 0.05$, a grupa HU+ASP, $p < 0.01$) (Grafik 10).



Grafik 10. Promena nivoa solubilnog L-selektina u odgovoru na terapiju

Grupa bolesnika sa Ph^vMPN sa inicijalno povišenim nivoima P-selektina je u grupama HU i HU+ASP imala značajno sniženje nivoa u odnosu na period dijagnoze ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Grafik 11).



Grafik 11. Promena nivoa solubilnog P-selektina u odgovoru na terapiju

TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE KOD BOLESNIKA SA Ph^hMPN TOKOM PERIODA PRAĆENJA

Tokom perioda praćenja koji je prosečno trajao 39 meseci (interval: 0-43), tromboembolijske komplikacije su registrovane kod 12.6% bolesnika sa Ph^hMPN: 4.2% PV, 3.16% ET, and 5.26% PMF.

Ukupan period praćenja 95 bolesnika je bio 275 bolesničkih godina, i u tom periodu stopa incidencije prvog trombotičnog događaja u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN je iznosila 4.36 na 100 bolesničkih godina. Stopa incidence prvog trombotičnog

dogadaja u grupi bolesnika sa PV je iznosila 3.33 trombotična događaja na 100 bolesničkih godina, u ET grupi 3.9 trombotična događaja na 100 bolesničkih godina i u PMF 6.6 trombotična događaja na 100 bolesničkih godina.

Tip i učestalost tromboza u različitim podtipovima Ph^hMPN su prikazani u tabeli 26. Među trombozama koje su se dogodile u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN, najčešći je bio cerebrovaskularni insult (50%), dok su tromboze svih ostalih lokalizacija (akutni infarkt miokarda, infarkt slezine, tromboza distalne aorte, plućna embolija, duboka venska tromboza noge, tromboflebitis) bile podjednako zastupljene (po 8.33%).

Tabela 27. Tip i lokalizacija tromboza kod 12 bolesnika sa Ph^hMPN u periodu praćenja

	PV , n (%)	ET , n (%)	PMF , n (%)
ARTERIJSKE TROMBOZE	3 (25)	2 (16.6)	4 (33.3)
Cerebrovaskularni insult	1 (8.3)	2 (16.6)	3 (25)
Akutni infarkt miokarda	1 (8.3)		
Infarkt slezine	1 (8.3)		
Tromboza distalne aorte			1 (8.3)
VENSKE TROMBOZE	1 (8.3)	1 (8.3)	1 (8.3)
Plućna embolija			1 (8.3)
Duboka venska tromboza		1 (8.3)	
Tromboflebitis površinskih vena	1 (8.3)		

PV - policitemija vera; ET - esencijalna trombocitemija; PMF - primarna mijelofibroza

**Ispitivanje uticaja faktora vezanih za karakteristike
bolesnika i faktora vezanih za odlike bolesti
na nastanak tromboza nakon postavljanja
dijagnoze MPN**

U ovom delu rada ispitivane su vrednosti većeg broja faktora koji su vezani za karakteristike samog bolesnika kao i vrednosti parametara koji su vezani za odlike bolesti u grupi bolesnika koji su tokom praćenja dobili dokumentovanu trombozu. Dobijeni rezultati su poređeni sa nalazima kod bolesnika koji tokom praćenja nisu imali tromboembolijskih epizoda.

Među kardiovaskularnim faktorima rizika, učestalost arterijske hipertenzije je bila značajno veća u grupi Ph⁺MPN bolesnika sa trombozom ($p < 0.05$) (Tabela 28). Trend veće učestalosti dijabetesa i veće zastupljenosti osoba starijih od 60 godina, je takođe dokazan u grupi Ph⁺MPN bolesnika sa trombozom, ali ove razlike nisu dostigle statističku značajnost ($p = 0.058$).

Grupa bolesnika sa Ph⁺MPN i trombozom u periodu praćenja se nije značajno razlikovala u pogledu prosečnih vrednosti nivoa Neu-Tr and Mo-Tr agregata u odnosu na grupu bolesnika koja nije imala tromboze (Tabela 30).

Grupa bolesnika sa trombozom je imala značajno veće nivoe solubilnog P-selektina, u odnosu na grupu bolesnika bez tromboza ($p < 0.05$). Nivoi hemostatskih parametara u plazmi su mereni sa ciljem da se ispita hiperkoagulabilno stanje bolesnika. Nije bilo značajnih razlika u nivoima F1+2, D-dimera i PCG-a između grupa bolesnika sa Ph⁺MPN sa i bez tromboze (Tabela 29). Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti urođene trombofilije i prisustva ACLA između grupa bolesnika sa i bez tromboze.

Tabela 28. Kliničke i karakteristike krvne slike bolesnika sa Ph⁺MPN u zavisnosti od prisustva tromboze

KARAKTERISTIKE		BEZ TROMBOZE	SA TROMBOZOM	p
Starost, god	\bar{x} (SD) min-max	58.0 (14.45) 22-83	65.7 (8.21) 52-75	0.077
Starost, f (%)	<60 god >60 god	45 (54.2) 38 (45.8)	3 (25.0) 9 (75.0)	0.058
Pol, f (%)	muški ženski	34 (41.0) 49 (59.0)	4 (33.3) 8 (66.7)	0.614
Pušenje, f (%)	ne da	61 (73.5) 22 (26.5)	11 (91.7) 1 (8.3)	0.170
Hipertenzija, f (%)	ne da	44 (53.0) 39 (47.0)	2 (16.7) 10 (83.3)	0.019*
Dijabetes, f (%)	ne da	80 (96.4) 3 (3.6)	10 (83.3) 2 (16.7)	0.058
Hiperlipidemija, f (%)	ne da	35 (42.2) 48 (57.8)	3 (25.0) 9 (75.0)	0.256
Istorija tromboza, f (%)	ne da	72 (86.7) 11 (13.3)	11 (91.7) 1 (8.3)	0.632
Leukociti (x10⁹/L)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	12.68 (9.61) 9.90 (8.40-13.10) 3.40-62.30	10.58 (2.52) 9.30 (8.82-12.72) 7.60-14.90	0.836
Leukocitoza, f(%)	<10x10 ⁹ /L >10x10 ⁹ /L	41 (49.4) 42 (50.6)	7 (58.3) 5 (41.7)	0.563
Hemoglobin (g/L)	\bar{x} (SD) min-max	139.88 (17.30) 90.00-171.00	137.83 (11.30) 125.00-161.00	0.693
Hematokrit (L/L),	\bar{x} (SD) min-max	0.44 (0.06) 0.28-0.53	0.43 (0.05) 0.37-0.52	0.645
Hematokrit, f (%)	<0.47 >0.47	56 (67.5) 27 (32.5)	10 (83.3) 2 (16.7)	0.265
Trombociti (x10⁹/L)	\bar{x} (SD) min-max	721.84 (288.28) 124.00-1289.00	837.92 (222.32) 473.00-1134.00	0.185
Trombocitoza, f (%)	<450x10 ⁹ /L >450x10 ⁹ /L	16 (19.3) 67 (80.7)	0 (0) 12 (100)	0.095

Tabela 29. Karakteristike hemostaze i genskih mutacija kod bolesnika sa Ph⁺MPN u zavisnosti od prisustva tromboze

KARAKTERISTIKE		BEZ TROMBOZE	SA TROMBOZOM	p
PT (%)	\bar{x} (SD) med min-max	76 (11.31) 76 31-105	77 (13) 78 45-91	0.361
aPTT (%)	\bar{x} (SD) med min-max	30.29 (5.1) 29.5 19-54.2	28.97 (5.22) 27.7 23.7-44.0	0.140
F1+2 (pmol/L)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	197.80 (132.08) 152.77 (121.15-237.59) 76.15-948.86	220.62 (115.43) 210.50 (116.86-285.52) 110.92-441.24	0.551
D-dimer (mg/L)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	0.54 (0.70) 0.36 (0.22-0.66) 0.19-6.09	0.75 (0.54) 0.64 (0.30-1.13) 0.19-2.05	0.069
AT (%)	\bar{x} (SD) min-max	98.74 (11.36) 69.40-125.30	99.12 (11.37) 84.70-125.50	0.921
PCG	\bar{x} (SD) min-max	0.68 (0.14) 0.33-0.97	0.61 (0.15) 0.17-0.73	0.120
APCR (%)	\bar{x} (SD) med min-max	2.36 (0.32) 2.45 1.56-2.90	2.34 (0.22) 2.40 1.70-2.60	0.247
FII 20210A, f (%)	ne da	80 (96.4) 3 (3.6)	12 (100)	1.00
ACLA, f (%)	ne da	79 (95.2) 4 (4.8)	12 (100)	1.00
Urođena trombofilija, f (%)	ne da	76 (91.6) 7 (8.4)	11 (91.7) 1 (8.3)	1.00
JAK2V617F, f (%)	ne da	24 (28.9) 59 (71.1)	5 (41.7) 7 (58.3)	0.370
JAK2V617F alelnoopter. (%)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	42.34 (26.09) 36.00 (22.00-58.00) 6.00-100.00	35.43 (22.62) 27.00 (23.00-36.00) 18.00-85.00	0.602
JAK2V617F alelnoopter, f (%)	<50 >50	39 (66.1) 20 (33.9)	6 (85.7) 1 (14.3)	0.292
TET2, f (%)	ne da	68 (81.9) 15 (18.1)	11 (91.7) 1 (8.3)	0.684
MPL, f (%)	ne da	80 (96.4) 3 (3.6)	11 (91.7) 1 (8.3)	0.423
CALR, f (%)	ne da	68 (81.9) 15 (18.1)	10 (83.3) 2 (16.7)	0.905

PT-protrombinsko vreme; aPTT-aktivirano tromboplastinsko vreme; F1+2-fibrin degradacioni produkti 1+2; AT-antitrombin; PCG-proGlobal C; APCR-rezistencija na aktivirani protein C; FII 20210A-Mutacija protrombina; ACLA-antikardiolipinska antitela; JAK2V617F-mutacija u genu za janus kinazu 2; TET2-mutacija u genu za tet metilcitozin dioksigenazu 2; MPL-mutacija u genu za trombopoetin receptor; CALR-mutacija u genu za kalretikulin.

Tabela 30. Karakteristike *in vitro* ćelijske kulture, leukocitno-trombocitnih agregata i selektina kod bolesnika sa Ph⁺MPN u zavisnosti od prisustva tromboze

KARAKTERISTIKE		BEZ TROMBOZE	SA TROMBOZOM	p
EC (/10 ⁴ MNĆ)	\bar{x} (SD) med min-max	44 (53) 25 0-232	28 (29) 23 0-86	0.650
CFC (/10 ⁴ MNĆ)	\bar{x} (SD) med min-max	208 (113) 202 19-544	218 (164) 183 28-650	0.859
Neu-Tr agregati (%)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	22.42 (11.00) 3.00-51.00	26.67 (13.38) 6.00-44.00	0.227
Mo-Tr agregati (%)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	12.32 (9.50) 10.00 (7.00-17.00) 1.00-67.00	17.83 (18.87) 12.00 (7.25-22.00) 4.00-74.00	0.337
E-selektin (ng/mL)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	33.68 (18.22) 30.12 (21.68-40.26) 5.76-107.06	38.42 (15.58) 37.61 (25.10-51.38) 14.45-66.42	0.214
L-selektin (ng/mL)	\bar{x} (SD) min-max	2814.09 (1423.63) 452.87-6250.00	2296.49 (837.96) 1155.41-3870.23	0.223
P-selektin (ng/mL)	\bar{x} (SD) med (IQR) min-max	286.39 (329.54) 223.73 (157.16-304.52) 70.30-3000.00	346.89 (163.78) 314.53 (209.67-417.44) 158.47-688.94	0.034*

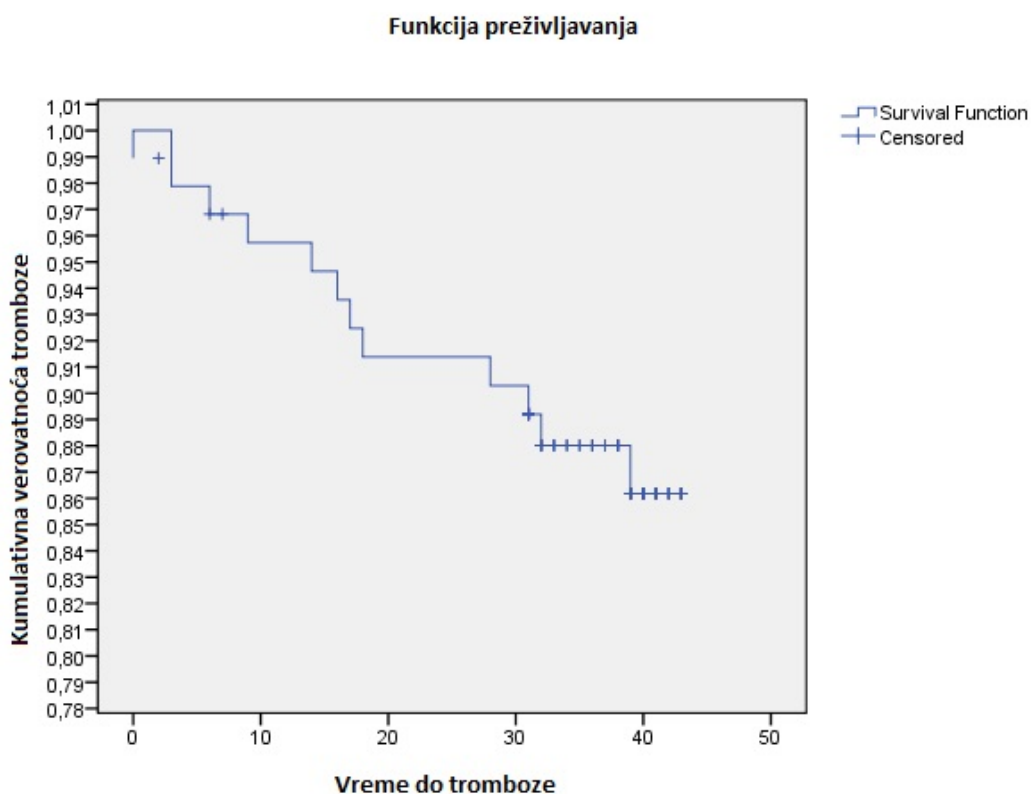
EC-endogene kolonije; CFC-stimulisane kolonije; Neu-Tr-neutrofilno-trombocitni; Mo-Tr-monocitno-trombocitni

Utvrđivanje prognostičkog značaja ispitivanih parametara za pojavu tromboembolijskih komplikacija

Sa ciljem da se ispita prognostički značaj različitih parametara koji su u literaturi dovedeni u vezu sa povećanim vaskularnim rizikom, analizirani su sledeći faktori: starost, pol, istorija tromboza, ukupni standardni faktori rizika (starost preko 60 godina i/ili pozitivna istorija prethodnih tromboza), ukupni i pojedinačni kardiovaskularni faktori rizika, (HTA, DM, HLP, pušenje), hematokrit, broj leukocita, broj trombocita, prisustvo mutacije JAK2V617F i alelno opterećenje, prisustvo TET2 i MPL mutacija, prisustvo CALR mutacija i alelno opterećenje, markeri aktiviranih leukocita, trombocita

i endotela (Neu-Tri Mo-Tr agregati, solubilni selektini E-, L-i P-) i markeri aktivirane koagulacije (F₁₊₂, D-dimer, AT, PCG), markeri urođene trombofilije (FV Leiden i/ili FII 20210A), ukupan broj in vitro kolonija (EC, CFC).

Vreme do tromboembolijskog događaja je prikazano Kaplan-Meier-ovom krivom (Grafik 12). Rezultati univarijantne i multivarijantne COX regresione analizesu prikazani na Tabeli br. 16. Univarijantna COX regresiona analiza je identifikovala HTA kao značajan faktor rizika za tromboembolijske događaje ($p < 0.05$). U multivarijantnoj COX regresionoj analizi potvrđeno daod svih analiziranih parametara Mo-Tr agregati predstavljaju jedini nezavistan prediktor tromboze (HR=1.561, 95% CI:1.007-2.420, $p=0.046$). Takođe je potvrđen aditivniefekat između povećanih nivoa Mo-Tr agregatai HTA (HR=1.975, 95%CI: 1.215-3.212, $p=0.006$), koji u interakciji značajno povećavaju rizik za nastanak tromboze.



Grafik 12. Vreme do tromboembolijskog događaja

Tabela 31. Univarijantna i multivarijantna COX regresiona analiza potencijalnih prediktora tromboze

VARIJABLE	HR	95% CI	p
Starost (godine)	1.049	0.99-1.10	0.066
Starost>60 godina	3.472	0.93-12.84	0.062
Ženski pol	1.419	0.42-4.72	0.569
^a Prethodna istorija tromboza	0.612	0.076-4.561	0.612
Standardni faktori rizika	2.888	0.781-10.680	0.112
Kardiovaskularni faktori rizika	0.866	0.190-3.955	0.853
Hipertenzija	5.008	1.097-22.875	0.038
Dijabetes	4.412	0.965-20.178	0.056
Hiperlipidemija	1.978	0.535-7.311	0.307
Pušenje	0.268	0.035-2.075	0.207
PV	0.661	0.199-2.200	0.500
ET	0.856	0.232-3.162	0.815
PMF	1.757	0.556-5.545	0.337
Leukociti ($\times 10^9/L$)	0.961	0.857-1.077	0.492
Leukocitoza ($>10 \times 10^9/L$)	0.715	0.227-2.253	0.567
Hemoglobin (g/L)	0.992	0.959-1.026	0.637
Hematokrit (L/L)	0.047	0.0-1291.34	0.557
Hematokrit >0.47	0.446	0.098-2.036	0.297
Trombociti ($\times 10^9/L$)	1.001	0.999-1.003	0.246
Trombocitoza ($>450 \times 10^9/L$)	26.175	0.031-22317.189	0.343
JAK2V617F mutacija prisustvo	0.572	0.182-1.804	0.341
JAK2V617F alelnoopter. >50%	0.321	0.039-2.67	0.293
JAK2V617F alelnoopter. (%)	0.988	0.956-1.021	0.460
CALR mutacije prisustvo	0.908	0.199-4.145	0.901
CALR alelnoopter. (%)	1.029	0.843-1.256	0.778
TET2 mutacije prisustvo	0.433	0.056-3.359	0.424
MPL mutacija prisustvo	2.303	0.297-17.884	0.425
EC ($/10^4$ MNC)	0.993	0.978-1.007	0.333
CFC ($/10^4$ MNC)	1.001	0.996-1.006	0.704
Neu-Tr agregati (%)	1.027	0.977-1.079	0.300
Mo-Tr agregati (%)	1.034	0.988-1.071	0.061
	1.041	1.001-1.083	0.046
E-selektin (ng/mL)	1.011	0.984-1.039	0.413
L-selektin (ng/mL)	1.00	0.999-1.00	0.228
P-selektin (ng/mL)	1.00	0.999-1.002	0.542
F1+2 (pmol/L)	1.001	0.997-1.005	0.569
D-dimer (mg/L)	1.259	0.783-2.025	0.342
AT (%)	0.999	0.945-1.056	0.967
PCG	0.045	0.001-1.675	0.093
Urođena trombofilija (FV Leiden, FII 20210A)	1.078	0.139-8.352	0.943

Boldovani elementisu signifikantni u univarijantnoj COX regresionoj analizina nivou $p < 0.05$.

Boldovani i podvučeni elementisu signifikantni u multiparametrijskoj COX regresionoj analizi uključujući sve sa $p < 0.10$ iz univarijantne analize.

^a“Prethodna istorija tromboza” je definisana kao tromboza koja se dogodila pre dijagnoze Ph/MPN.

Diskusija

Iako tromboza relativno često komplikuje klinički tok Ph^hMPN i predstavlja glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa PV i ET, mehanizam nastanka protrombogenog stanja u ovim bolestima još uvek nije potpuno razjašnjen. U ranijim analizama je jasno ustanovljeno da starija dob bolesnika (tj. preko 60 godina života) i prethodna tromboza u životu predstavljaju faktore rizika za pojavu tromboze nakon dijagnoze Ph^hMPN. Zbog toga je preporučeno da se kod bolesnika sa PV i ET terapija citoreduktivnim lekovima sprovodi u zavisnosti od prisustva ovih faktora rizika (Tefferi A, 2011.). Međutim, starija dob i prethodne tromboze predstavljaju faktore rizika za trombozu i u generalnoj populaciji i nisu odraz prirode bolesti i mehanizama koji dovode do tromboze u Ph^hMPN. Zbog toga je identifikovanje bioloških parametara koji odražavaju mehanizam nastanka protrombogenog stanja u Ph^hMPN od izuzetne važnosti jer bi kvantifikovanje tih faktora moglo preciznije da ukaže na rizik od tromboze kod pojedinačnog bolesnika.

U dosadašnjim studijama nije ustanovljena direktna veza između povećanja broja eritrocita ili trombocita i pojave trombotičnih komplikacija, pa je gotovo sigurno da pored povećanja broja krvnih ćelija postoje i drugi činioci koji utiču na kreiranje protrombogenog stanja kod bolesnika sa Ph^hMPN. Prema novijim shvatanjima u nastanku tromboze najvažniju ulogu ima interakcija između aktiviranih ćelija krvi i aktiviranog endotela koja rezultuje pojavom hiperkoagulabilnog stanja u krvi. Međutim, precizan sled događaja koji dovode prekomernog aktiviranja ćelija krvi i endotela nije poznat.

U većem broju retrospektivnih studija pokušano je da se identifikuju markeri aktivacije ćelija krvi i endotela, sa ciljem da se definišu bolesnici kod kojih je rizik od pojave tromboze posebno povećan. Nažalost, rezultati ovih ispitivanja su uglavnom nekonkluzivni, a neretko i kontraverzni pa ih je teško interpretirati u odnosu na njihov klinički, ili patogenetski značaj. Metodološke razlike tokom sprovođenja analiza, različiti kriterijumi za uključivanje bolesnika u ove studije, kao i mnoge druge razlike u dizajnu i sprovođenju istraživanja, otežavale su komparaciju rezultata i mogućnost donošenja zaključaka na većem uzorku. S obzirom na to da su sve ove studije bile retrospektivne, markere povećane aktivnosti ćelija krvi i endotela je u funkciji vremena bilo teško povezivati sa trombozama koje su se desile u prošlosti, prema dizajnu nekih

studija čak i do pet godina pre dijagnoze Ph^hMPN. Zbog toga je postojala potreba da se ovakva istraživanja sprovedu u prospektivnom studijama.

STRUKTURA BOLESNIKA PREMA PODTIPU Ph^hMPN

Prema našem znanju ovo je prva prospektivna studija koja je ispitala povezanost između markera aktiviranih ćelija krvi i endotela sa pojavom trombotičnih komplikacija kod bolesnika sa Ph^hMPN. U studiju je uključeno 95 konsekutivnih bolesnika sa Ph^hMPN, a među njima su najbrojniji bili bolesnici sa PV (41.1%). Prema rezultatima ranijih studija, ovaj podtip Ph^hMPN je i u evropskoj populaciji najzastupljeniji (Moulard O. i sar, 2013.). Iako je prema evropskom registru retkih bolesti godišnja incidenca obolelih od PMF u odnosu na ET mnogo manja (3 vs 24/100.000 stanovnika) ([www.orpha.net.](http://www.orpha.net)), u našoj studiji je broj bolesnika sa PMF (30.5%) bio skoro izjednačen sa brojem uključenih bolesnika sa ET (28.4%). Ovako značajan udeo bolesnika sa PMF u našoj grupi bi se mogao objasniti činjenicom da je PMF, iako ređa bolest od PV i ET, često praćena opštim simptomima, kao što su groznica, gubitak težine, svrab, noćno preznojavanje, supfebrilne temperature, bol u kostima i zglobovima i zbog toga se češće dijagnostikuje. Naprotiv, moguće je da se bolesnici sa PV i ET, ukoliko nemaju tegobe prouzrokovane mikrovaskularnim poremećajima, svrab, ili glavobolju, slučajno otkrivaju, te mnogi od njih ostaju nedijagnostikovani zbog svog indolentnog toka bolesti (Vannucchi A, i sar, 2010.)

STANDARDNI FAKTORI RIZIKA ZA TROMBOZU

U periodu dijagnoze Ph^hMPN, standardni faktori rizika za trombozu su bili prisutni kod 53.7% bolesnika uključenih u studiju, a najveća zastupljenost bolesnika koji su imali visoki rizik za pojavu tromboze (starost > 60 god i/ili pozitivna istorija tromboza) je evidentirana u grupi bolesnika sa PMF.

Starosna struktura bolesnika

S obzirom na činjenicu da od Ph⁺MPN najčešće oboljevaju osobe starosti 50-60 godina, prosečna starost naših ispitanika od 59 godina je bila očekivana. Skoro polovina bolesnika u studiji je bila starija od 60 godina, što je za nas bilo od posebnog značaja s obzirom da se prema standardnim kriterijumima ova starosna kategorija smatra visokorizičnom za pojavu tromboembolijskih komplikacija i samim tim zahteva primenu citoreduktivne terapije i intenzivnije praćenje. U grupi bolesnika sa PMF učestalost osoba starijih od 60 godina je bila najveća i prema tom kriterijumu 69% bolesnika sa PMF se nalazilo u kategoriji visokog rizika za pojavu tromboze.

Istorija prethodnih tromboza

Od svih bolesnika sa Ph⁺MPN uključenih u studiju, pozitivnu istoriju tromboza je imalo ukupno 12 (12.6%) bolesnika. Kada je u pitanju ET, učestalost istorijskih tromboza u našoj grupi bolesnika (22%) je bila u okvirima rezultata iz velikih Evropskih studija (10-29%), ali je učestalost istorijskih tromboza u PV od 12.8% bila niža u odnosu na iste izvore (34-39%) (Tefferi A, 2007). U velikoj studiji, koja se bavila istraživanjem prognostičkih faktora za pojavu tromboze, mijelofibroze i leukemije u kliničkom toku ET (Passamonti i sar, 2008.), u grupi od 605 bolesnika istorija prethodnih tromboza je evidentirana sa učestalošću od 14.8%.

Učestalost istorijskih tromboza u našoj grupi bolesnika sa PMF je bila najniža u odnosu na ostale podtipove i iznosila je 3.4%. Takođe, ona je bila niža u poređenju sa rezultatima iz studije Elliotta i saradnika (Elliott MA i sar, 2010.), u kojoj je procenjivan prediktivni značaj istorijskih tromboza za pojavu novih tromboza u PMF, pri čemu je pozitivna istorija tromboza u grupi od 205 bolesnika sa PMF evidentirana sa učestalošću od 13.2%. Bolesnici sa PMF slične starosne strukture kao bolesnici u našoj studiji (medijana starosti=67 godina, opseg 27-80 godina) su bili uključeni u retrospektivnu studiju Alvarez-Larran i sar (Alvarez-Larran i sar, 2008.), koja je imala cilj da ispita aktivacioni status trombocita, leukocita i koagulacionog sistema u ovoj bolesti. Od ukupno 26 bolesnika sa PMF uključenih u ovu studiju, pozitivnu istoriju tromboza je

imalo 9 (34.6%) bolesnika, što je 10 puta više nego u našoj grupi bolesnika sa PMF, ali više i u poređenju sa drugim velikim evropskim studijama (Elliott MA i sar, 2010.).

Među trombozama koje su se u našoj grupi bolesnika dogodile pre dijagnoze Ph^hMPN, najviše su bile zastupljene arterijske tromboze. Naime, od ukupno 12 bolesnika, koji su tromboze dobili pre dijagnoze Ph^hMPN, čak njih 11 (91.7%) je imalo arterijske tromboze, dok je samo kod jednog bolesnika od ranije evidentirana venska tromboza. Češća pojava arterijskih u odnosu na venske tromboze u periodu pre postavljanja dijagnoze mijeloproliferacije je evidentirana kod bolesnika sa PMF (Elliott MA i sar, 2010.), dok je u istoj studiji struktura tromboza u periodu praćenja bila promenjena u korist venskih tromboza. Ova inverzija u strukturi novih u odnosu na stare tromboze je objašnjena činjenicom da maligna progresija bolesti, koja je u PMF izraženija nego u PV i ET pogoduje nastanku venskih tromboza, uz podsećanje da je hiperkoagulabilnost jedna od uobičajenih osobina različitih maligniteta.

Među našim bolesnicima koji su imali arterijske tromboze u prošlosti, četiri bolesnika su imala multiple tromboze: dva bolesnika sa ET i jedan sa PMF su imali više tromboza različite lokalizacije, dok je samo bolesnik sa PV imao dve arterijske tromboze iste lokalizacije (CVI).

Kardiovaskularni faktori rizika za trombozu

Prisustvo bar jednog klasičnog faktora za aterosklerozu (pušenje, hipertenzija, dijabetes, hiperlipidemija) u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN bilo je značajno veće učestalosti u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, iako su ove dve grupe bile slične u pogledu prosečne starosti i polne distribucije. Posmatrano pojedinačno, učestalost arterijske hipertenzije (HTA) i hiperlipidemije (HLP) je bila značajno veća u ispitivanoj grupi nego u kontrolnoj grupi. Osnovni kriterijum za uključenje kontrolnih ispitanika u ovu studiju je bio taj da prethodno nisu imali tromboembolijske događaje, pa je i manja učestalost kardiovaskularnih faktora rizika u ovoj grupi očekivan nalaz. Podtipovi Ph^hMPN se nisu značajno razlikovali u pogledu učestalosti faktora rizika za kardiovaskularna oboljenja. U opštoj populaciji, učestalost kardiovaskularnih faktora

rizika varira u zavisnosti od interakcija genetskih, demografskih, sociokulturalnih i ekonomskih faktora (Erem C i sar, 2008; Chockalingam A i sar, 2006.). Takođe, učestalost kardiovaskularnih faktora rizika se povećava sa starenjem. Značaj kardiovaskularnih faktora rizika za procenu sklonosti ka trombozi u Ph⁺MPN je do sada dokazan jedino u ET (IPSET-thrombosis) (Barbui i sar, 2012.).

MARKERI AKTIVACIJE KOAGULACIONOG SISTEMA

Značajno povećani nivoi protrombin fragmenta F₁₊₂, markera aktivacije koagulacije, su detektovani u celoj grupi bolesnika sa Ph⁺MPN. Koncentracija F₁₊₂ je bila povećana u PV, ET, ali najviše u PMF. U grupi bolesnika sa PMF je takođe zabeleženo povećanje prosečnih vrednosti D-dimera, što u kombinaciji sa povećanjem F₁₊₂ ukazuje na aktivaciju sistema koagulacije u ovoj bolesti. Povećane vrednosti F₁₊₂ u plazmi bolesnika sa PMF (Alvarez-Larran A i sar, 2008.) i ET (Arellano-Rodrigo E i sar, 2008.) su potvrđene i u drugim studijama, koje su se bavile ispitivanjem aktivnosti koagulacionog sistema u Ph-MPN. Interesantno je da u ovim studijama povećanje koncentracije F₁₊₁ nije bilo praćeno i povećanim vrednostima D-dimera.

U cilju isključivanja drugih uzročnika tromboembolijskih komplikacija, u našoj studiji je ispitivano prisustvo urođene trombofilije (mutacije FV Leiden i FII 20210A) i prisustvo ACLA, ali se pokazalo da u grupi bolesnika koji su dobili trombozu tokom perioda praćenja ovi markeri nemaju značajnu učestalost. Marker urođene trombofilije su takođe ispitivani i u drugim studijama koje su se bavile analizom leukocitno-trombocitnih interakcija u Ph-MPN (Arrelano-Rodrigo E, i sar, 2006.). U spomenutoj studiji, u grupi od 53 bolesnika sa ET, mutacija FII 20210A (dva bolesnika) i pozitivna ACLA (dva bolesnika) su bile razlog za isključenje iz analize i studija ispitivanja uticaja aktivacionog statusa leukocita i trombocita na sklonost ka trombozama je rađena na 49 bolesnika.

GENSKE MUTACIJE I AKTIVNOST HEMOSTAZNOG SISTEMA

Bolesnici koji su imali mutacije u genu za CALR u našoj studiji su imali povećane vrednosti F1+2. Sa druge strane, mutacije u genima JAK2, TET2 i MPL nisu korelirale sa markerima aktivirane koagulacije. Povezanost mutacija u genu za CALR sa povećanom sklonošću ka trombozama je dokazana kod niskorizičnih bolesnika sa ET (Alvarez-Larran A i sar, 2016.). Iako u našoj grupi bolesnika povezanost mutacije V617F u genu JAK2 nije bila povezana sa markerima aktivacije hemostaznog sistema, treba imati u vidu da se upravo "latentne" forme mijeloproliferativnih neoplazmi, čija je prva prezentacija tromboza, otkrivaju zahvaljujući detekciji JAK2V617F mutacije i endogenih eritroblastnih i/ili megakariocitnih kolonija (Boissinot M i sar, 2006.).

MARKERI AKTIVACIJE ĆELIJA KRVI

Leukocitno-trombocitni agregati u vreme dijagnoze Ph⁺MPN

U ovoj studiji, merenjem nivoa cirkulišućih Le-Tr agregatametodom protočne citometrije, mi smo našli povećan procenat *in vivo* aktiviranih leukocita i trombocita u celoj grupi bolesnika sa Ph⁺MPN na dijagnozi, u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Prosečne vrednosti nivoa Neu-Tr i Mo-Tr agregata su na dijagnozi bile povećane u svim podtipovima, bez značajnih međusobnih razlika između PV, ET i PMF. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljenih retrospektivnih studija (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006; Villmov T i sar, 2003; Falanga A i sar, 2005; Alvarez-Larran A i sar, 2008; Coucelo M i sar, 2014.), u kojima su nivoi Le-Tr agregata ispitivani u različitim podtipovima Ph⁺MPN. Prvi put povećani nivoi Mo-Tr agregata u Ph⁺MPN su detektovani 2001 godine, u studiji Jensen MK i saradnika (Jensen MK i sar, 2001.), na maloj grupi od 17 PV, 15 ET i 17 PMF bolesnika. Jedan deo bolesnika uključenih u ovu studiju je već primao terapiju u vreme analize agregata. Zaključak iz ove studije je bio da postoji povezanost između povećanih nivoa Mo-Tr agregata i pozitivne istorije tromboza.

Dve godine kasnije, Villmow je sa saradnicima analizirao nivoe Neu-Tr i Mo-Tr agregata u grupi koja se sastojala od 13 PV, 12 ET, 12 PMF i 10 HML bolesnika, koji su takođe bili na terapiji (Villmow T i sar, 2003.). Villmow je potvrdio nalaz iz prethodne studije Jensena da u ovim bolestima postoje povećani nivoi Mo-Tr agregata, ali i povećani nivoi Neu-Tr agregata, koji u prethodnoj studiji nisu bili analizirani. Zaključak ove studije je bio da povećani nivoi Le-Tr agregata predstavljaju rezultat povećane aktivacije Le i Tr u cirkulaciji bolesnika sa Ph⁺MPN, ali povezanost ovih povećanih nivoa sa prethodnim trombozama nije dokazana.

Povećani nivoi Le-Tr agregata su kasnije dokazani u još dve retrospektivne studije (Falanga A i sar, 2005; Arellano-Rodrigo i sar, 2006.), ali pokušaj da se dovedu u vezu sa pozitivnom istorijom tromboza je izostao. Nakon objavljivanja rezultata naredne studije, u kojoj su ispitivani nivoi Neu-Tr agregata kod 75 bolesnika sa ET i povezanost sa istorijskim trombozama opet nije dokazana (Falanga A i sar, 2006.), Falanga je sa saradnicima istakla da je procenu ovih bioloških markera neophodno izvršiti u prospektivnim studijama. Dve godine kasnije, Alvarez-Larran je sa saradnicima objavio rezultate studije Neu-Tr i Mo-Tr agregata u maloj grupi od 26 bolesnika sa PMF (Alvarez-Larran A i sar, 2008.), u kojoj je potvrdio da i u ovoj bolesti postoji povećana aktivnost Le i Tr, slično kao i u PV i ET. Ova studija se međutim nije bavila ispitivanjem povezanosti povećanih nivoa agregata i pozitivnom istorijom tromboza u PMF.

Poslednja retrospektivna studija koja je povećane nivoe Neu-Tr agregata dovela u vezu sa pozitivnom istorijom tromboza u PV i ET je bila studija portugalske grupe autora (Coucelo i sar, 2014.), ali su i u ovoj studiji ispitivani bolesnici bili na terapiji.

U većini ovih studija su međutim analizirani bolesnici koji su već primali citoreduktivnu, ili antiagregatornu terapiju, što otežava poređenje sa našim rezultatima. Osim toga, u spomenutim studijama su postojali značajni nedostaci u metodologiji analize Le-Tr agregata, koji su dovodili do naknadne, arteficijelne aktivacije Le i Tr, a koji su u našoj studiji eliminisani dodatnim procedurama (venepunkcija bez elastične poveske i dvojno antikoagulisanje krvi za analizu agregata na K2-EDTA i CTAD). Leukocitno-trombocitni agregati mogu biti detektovani i u krvi zdravih osoba, ali u

malim koncentracijama, koje se kreću od 1 do 10% populacije neutrofila i monocita (Macey M i sar, 2011.).

Povećanje nivoa Le-Tragregata iznad fizioloških vrednosti se najčešće viđa u bolestima i stanjima povezanim sa inflamacijom i trombozama (Cerletti C i sar, 2012; Radovančević R i sar, 2009.). Dobro je poznato da uzajamno dejstvo prokoagulantnih i inflamatornih stimulusa takođe postoji i u Ph^hMPN, što je glavni razlog za povećanje nivoa Le-Tr agregata u cirkulaciji. Korelacija povećanih nivoa Neu-Tr agregata sa parametrima inflamacije je zapažena i u našoj studiji i to u grupama ET (sa CRP-om) i PMF (sa fibrinogenom).

Naši rezultati su pokazali da je veći broj bolesnika u svim ispitivanim podtipovima Ph^hMPN imao povećanje nivoa Neu-Tr agregata, nego Mo-Tr agregata.

Retrospektivne studije koje su ispitivale vrednosti leukocitno-trombocitnih agregata u Ph ^h MPN					
br.	Autor, god.	Podtip (broj ispitanika)	Terapija	Tip Le-Tr agregata	Povezanost sa istorijskim trombozama
1	Jensen MK, 2001	PV (17) ET (15) PMF (17)	-/+	Mo-Tr	+
2	Villmow T, 2003.	PV (13) ET (12) PMF (12) HML (10)	+	Neu-Tr Mo-Tr	-
3	Falanga A, 2005.	PV (34) ET (46)	-/+	Neu-Tr	-
4	Arrelano-Rodrigo, 2006.	ET (53)	+	Neu-Tr Mo-Tr	-
5	Falanga A, 2006.	ET (75)	+	Neu-Tr	-
6	Alvarez-Larran, 2008.	PMF (26)	+	Neu-Tr Mo-Tr	-
7	Coucelo, 2014.	PV (31) ET (49)	+	Neu-Tr Mo-Tr	+

Vrednosti Le-Tr agregata tokom primenjene terapije

Prosečni nivoi Le-Tr agregata izmereni nakon postizanja kompletnog, ili parcijalnog odgovora na citoreduktivnu terapiju, ili 6 meseci od dijagnoze kod bolesnika koji su primali antiagregatornu terapiju, bili su značajno sniženi u svim podtipovima Ph⁺MPN u odnosu na vrednosti određene u vreme dijagnoze. S obzirom da su sve dosadašnje studije koje su se bavile ispitivanjem vrednosti Le-Tr agregata kod bolesnika sa Ph⁺MPN bile retrospektivne, one nisu mogle da porede vrednosti ovih parametara pre i posle terapije. Zbog toga nije moguće direktno uporediti naše rezultate sa rezultatima drugih istraživača. Međutim, smanjivanje vrednosti Le-Tr agregata u skladu je sa zapažanjima da primena citoreduktivne terapije, ali i aspirina smanjuje učestalost tromboembolijskih komplikacija. Posebno je važna činjenica da primena monoterapije aspirinom dovodi do smanjivanja broja Le-Tr agregata i bez istovremenog smanjivanja broja krvnih ćelija. Takav rezultat ukazuje da aktiviranje trombocita ima važnu ulogu u nastanku Le-Tr agregata i da inhibiranje trombocitnih funkcija rezultuje smanjivanjem broja agregata. Drugim rečima, broj Le-Tr agregata mogao bi biti direktni pokazatelj stepena trombocitne aktivacije u cirkulaciji. Međutim, za sada nije jasno da li određivanje broja Le-Tr agregata može biti efikasan način za procenu antiagregacionog efekta aspirina kod bolesnika sa Ph⁺MPN.

Interesantno je da se od svih podtipova grupa PV izdvojila po najvećem procentu bolesnika kod kojih su nivoi oba tipa Le-Tr agregata (neutrofilni i monocitni) normalizovani nakon terapije. Osim toga, prosečna vrednost MFI za obe vrste Le-Tr agregata (Neu-Tr i Mo-Tr) u grupi bolesnika sa PV je takođe bila značajno snižena u odnosu na inicijalne vrednosti ($p < 0.01$). To praktično znači da je kod ovih bolesnika nakon primene citoreduktivne terapije, ne samo smanjen broj Le-Tr agregata, već je bio smanjen i prosečan broj trombocita koji su agregirali po jednom leukocitu.

Pokušali smo da utvrdimo koji su faktori mogli uticati na promenu nivoa agregata u PV. Grupa bolesnika sa PV se na dijagnozi značajno razlikovala u odnosu na grupe bolesnika sa ET i PMF izraženom poliglobulijom, sa statistički značajno povećanim vrednostima Hb i Hk ($p < 0.01$). Učestalost visokog hematokrita ($Hk > 0.47$ L/L) je kod ovih bolesnika takođe bila značajno veća u odnosu na ostale podtipove Ph⁺

MPN($p < 0.01$). Visoke vrednosti Hksu na dijagnozi PV korelirale sa povećanim nivoima Neu-Tr agregata. Osim toga, učestalost leukocitoze na dijagnozi je u PV grupi bila značajno veća u odnosu na grupe ET i PMF ($p < 0.01$).

Bolesnici sa PV su u odgovoru na citoreduktivnu terapiju hidroksiureom u najvećem procentu postigli kompletan hematološki odgovori u momentu retestiranja Le-Tr agregata su imali normalizovane vrednosti Hk, Hb i Le. Iz svih ovih razloga mi smo pretpostavili da je na sniženje nivoa Le-Tr agregata kod bolesnika sa PV uticalo, ne samo smanjenje broja aktiviranih Le, već i eliminacija poliglobulije. U literaturi ne postoje podaci o tome kojim mehanizmima bi visok Hk mogao uticati na aktivaciju Le i Tr, iako je dokazana uloga eritrocita u patogenezi tromboza u Ph⁺MPN. S obzirom na to da se prema dosadašnjim istraživanjima i povećano stvaranje Le-Tr agregata smatra jednim od protrombogenih mehanizama, moguće je da postoji međusobna interakcija između eritrocita, leukocita i trombocita, u kojoj povećana masa eritrocita dodatno aktivira Le i Tr.

Efekti terapije na aktivnost leukocita i trombocita

U našoj studiji, bolesnici sa Ph⁺MPN su primali citoreduktivnu i/ili antiagregatornu terapiju, na osnovu čega su podeljeni u tri ispitivane grupe (terapija hidroksiureom, terapija aspirinom i kombinovana terapija hidroksiureom i aspirinom). U okviru ovih grupa je praćena promena nivoa Le-Tr agregata, kao i nivoa solubilnih selektina.

U sve tri terapijske grupe je uočeno značajno smanjenje aktivnosti leukocita i trombocita, koje se manifestovalo sniženjem nivoa Le-Tr agregata oba tipa (Neu-Tr i Mo-Tr). Ovo sniženje je bilo izazvano različitim mehanizmima, koji su podrazumevali smanjenje broja aktiviranih Le i Tr pod uticajem hidroksiuree, kao i antiagregatorno dejstvo aspirina. Zanimljivo je međutim, da su se uprkos ovoj smanjenoj aktivnosti leukocita i trombocita, tromboembolijske komplikacije ipak dešavale u periodu praćenja. Od 12 bolesnika koji su dobili tromboze u periodu praćenja, njih 9 je na dijagnozi imalo povećane nivoe Le-Tr agregata. Iz ove grupe jedan bolesnik nije

retestiran, jer je u međuvremenu dobio trombozu sa letalnim ishodom., a dva bolesnika su i na kontroli održavala povećane nivoe Le-Tr agregata. Dakle, uprkos normalizaciji nivoa Le-Tr agregata u odgovoru na terapiju, šest bolesnika sa Ph⁺MPN je ipak dobilo tromboze. Zanimljiv je i podatak da jedan bolesnik sa PMF inicijalno nije imao povećane nivoe Le-Tr agregata, ali je već posle dva meseca od postavljanja dijagnoze dobio trombozu sa letalnim ishodom. Dvoje bolesnika sa tromboembolijskim komplikacijama (PV i PMF) su inicijalno stratifikovani u grupu niskog rizika i nisu lečeni citoreduktivnom terapijom. Jedan od njih (bolesnik sa PV) inicijalno nije imao povećanje Le-Tr agregata, ali je dobio trombozu.

Efekat citoreduktivne terapije

Primenom sofisticiranih testova kod bolesnika sa ET, koji su bili na terapiji hidroksiureom (Bellucci S i sar, 1993.), ili anagrelidom (Bellucci S i sar, 1999.), dokazano je da se hiperaktivnost i disfunkcija trombocita održavaju čak i kada se broj trombocita normalizuje. Falanga i sar su takođe dokazali prisustvo leukocitne aktivacije, uprkos citoreduktivnoj terapiji. Takođe, perzistiranje aktivacije trombocita i endotelnih ćelija posle citoreduktivne terapije je dokazana i u drugim studijama (Blann A i sar, 2004; Karakantza M i sar, 2004.). Ovi rezultati mogu ukazati na to da se rizik za pojavu tromboze, iako smanjen, ne eliminiše u potpunosti sa normalizacijom broja trombocita i leukocita pod uticajem hidroksiuree, što je osim u prethodno citiranim retrospektivnim studijama, pokazano i u prospektivnim kontrolisanim kliničkim studijama (Cortelazzo S, i sar, 1995.).

Kod bolesnika sa ET je nakon terapije anagrelidom dokazano je povećanje volumena trombocita, što je najverovatnije povezano sa perzistiranjem abnormalnih velikih, zrelih megakariocita tipičnih za ET i PV (Bellucci S i sar, 1999.). Ovo je još jedan dokaz da se povećan rizik za trombozu kod trombocitemičnih bolesnika ne eliminiše sa normalizacijom broja trombocita (Fruchtman SM i sar, 2005.). Ako se uporede mehanizmi delovanja hidroksiuree i anagrelida, može se zaključiti da hidroksiurea efikasno smanjuje broj leukocita i trombocita, čime se može objasniti redukcija nivoa leukocitno-trombocitnih agregata (Maugeri N i sar, 2005.). Na ovaj

način je i u prospektivnoj kontrolisanoj PT1 studiji objašnjeno zbog čega se u grupi bolesnika sa ET koji su primali hidroksiureu, učestalost arterijskih tromboza bila niža u odnosu na grupu bolesnika koja je dobijala anagrelid (Campbell P i sar, 2005; Harrison CN i sar, 2005.).

Efekti terapije aspirinom

Sa farmakološke tačke gledišta, dobro je poznato da aspirin (acetilsalicilna kiselina) smanjuje sintezu tromboksana A₂, a samim tim i aktivaciju trombocita (Patrono C i sar, 2004.). Zbog kooperacije između trombocita i granulocita u pogledu metabolizma arahidonske kiseline, smanjeno stvaranje tromboksana A₂ takođe dovodi do smanjene sinteze leukotrijena u granulocitima, a samim tim i njihove smanjene aktivacije (Grossi A i sar, 1986.). Takođe, smanjenje nivoa Neu-Tr agregata zavisnih od aktivacionog statusa Neu i Tr je uočeno kod bolesnika sa ET koji su primali aspirin (Falanga A i sar, 2005a.). Navedenim mehanizmima se može objasniti efikasnost aspirina u sniženju učestalosti tromboza, što je pokazano u prospektivnoj, kontrolisanoj ECLAP studiji kod bolesnika sa PV (Landolfi R i sar, 2004.). Takođe je dokazano da aspirin primenjen kod bolesnika sa ET popravlja simptome eritromelalgije (van Genderen PJ i sar, 1996; Michiels JJ i sar, 2000; van Genderen i sar, 1997.), po analogiji sa PV u kojoj je aspirin takođe efikasan u redukciji drugih trombotičnih manifestacija.

Nivoi solubilnih selektina na dijagnozi

Povećanje prosečnih koncentracija solubilnih E-, L- i P- selektina je u našoj studiji uočeno u svim podtipovima Ph⁺MPN u vreme dijagnoze, ali sa različitom učestalošću. Većina bolesnika sa PV, ET i PMF je imala povećanje koncentracije solubilnog P-selektina u vreme dijagnoze. Povećan L-selektin je takođe imala većina bolesnika sa PV, ali mnogo manji broj bolesnika sa ET i PMF. Na kraju, najmanje bolesnika iz svih podtipova Ph⁺MPN je imalo povećan solubilni E-selektin na dijagnozi.

Činjenica da je većina naših bolesnika imala povećanje solubilnog P-selektina u vreme dijagnoze indirektan je pokazatelj povećane aktivnosti trombocita. Naime, inicijalna athezija aktiviranih trombocita za neutrofile i monocite se ostvaruje upravo posredstvom P-selektina sa površine trombocita, koji se vezuje za leukocite. Na osnovu činjenice da je u našoj studiji povećanje nivoa P-selektina bilo udruženo sa povećanjem broja Le i Tr, moglo bi se zaključiti da je P-selektin senzitivniji marker povećane aktivnosti, ne samo Tr, već i Le. Povećane vrednosti P-selektina u cirkulaciji su utvrđene u mnogim kliničkim stanjima udruženim sa trombozom (Frijns CIM i sar, 1997; Griesshammer M i sar, 1999; Falanga A i sar, 1999.). P-selektin je takođe marker aktiviranih endotelnih ćelija (Carlos T i sar, 1994.). Značajno povećane koncentracije solubilnog P-selektina su prethodno nađene u Ph⁺MPN (Robertson B i sar, 2007.), ali nije bila potvrđena povezanost sa pojavom tromboza. Do sada su dokazani povećani nivoi solubilnog P-selektina kod bolesnika sa PMF i trombozama (Alvarez-Larran A, 2008.) i povećana ekspresija membranskog P-selektina kod bolesnika sa ET i trombozom (Arrellano-Rodrigo E i sar, 2006.), čime je podržana teorija o ulozi aktiviranih trombocita u trombogenezi.

Povećani nivoi solubilnih P- i E- selektina su detektovani i u studiji Cella i sar (Cella i sar, 2010.) u PV i ET, ali ovi autori, za razliku od nas nisu detektovali povećanje L-selektina u svojoj grupi ispitivanih bolesnika.

Naši bolesnici sa Ph⁺MPN i prisutnim standardnim faktorima rizika za trombozu su imali povećane nivoe P-selektina na dijagnozi. Takođe, povećani nivoi solubilnih selektina su u našoj studiji bili u pozitivnoj korelaciji sa parametrima aktiviranog sistema koagulacije (E-selektin sa D-dimerom, P-selektin sa D-dimerom i F1+2), kao i sa markerima inflamacije (E-selektin sa CRP, L-selektin sa SE, P-selektin sa fibrinogenom). Ovi nalazi ukazuju na to da u Ph⁺MPN postoji istovremena tesna povezanost između aktiviranih ćelija krvi i endotela sa jedne strane i aktivirane koagulacije i inflamacije sa druge strane.

Takođe smo utvrdili da su prisustvo JAK2V617F mutacije i veći stepen JAK2V617F alelnog opterećenja, kao i veća in vitro proliferativna aktivnost (broj EC) praćeni povećanjem nivoa solubilnih selektina (E-, L- i P-). Korelacija između povećanih nivoa solubilnog P-selektina i prisustva JAK2V617F mutacije u grupi

bolesnika sa Ph⁺MPN je detektovana i u drugim studijama (Robertson B i sar, 2007.). Poznato je da JAK2V617F mutacija ima ulogu u aktivaciji hematopoeznih ćelija, čineći ih preosetljivim na dejstvo trombopoetina i eritropoetina, pa logično pretpostaviti da povećani nivoi solubilnih selektina kod JAK2V617F pozitivnih bolesnika predstavljaju rezultat aktivacije trombocita, leukocita i endotelnih ćelija.

Promena nivoa solubilnih selektina u odgovoru na terapiju

Naši rezultati su pokazali da je citoreduktivna terapija hidroksiureom (monoterapija i/ili u kombinaciji sa aspirinom)uzrokovala sniženje nivoa solubilnih E-, L- i P- selektina u grupama bolesnika kod kojih su na dijagnozi ove vrednosti bile povećane. Za razliku od naših rezultata, u studiji Cella i sar (Cella i sar, 2010.) je dokazano da terapija hidroksiureom ne snižava značajno nivoe solubilnogP- selektina u cirkulaciji bolesnika sa PV i ET. Monoterapija aspirinom nije imala nikakvog uticaja na sniženje nivoa E- i P- selektina kod naših bolesnika. Štaviše, u grupi bolesnika koja je imala već inicijalno povećane nivoe E- selektina, a koja je bila samo na terapiji aspirinom, ovi nivoi su se na retestiranju još više povećali. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije Robertson B i sar, (2007.), u kojoj je dokazano da se nivoi P- selektina u grupi bolesnika sa Ph⁺MPN ne menjaju u odgovoru na terapiju aspirinom.

TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE TOKOM PERIODA PRAĆENJA

Kako je već pomenuto, primena standardnih faktora rizika (starost preko 60 godina i prethodna tromboza) trebalo bi da omogući identifikovanje onih bolesnika kod kojih je rizik od tromboze u toku trajanja Ph⁺MPN mali i koji ne zahtevaju primenu citoreduktivne terapije. S druge strane, kod bolesnika sa visokim rizikom preporučuje se primena citoreduktivnih lekova koji bi trebalo da smanje rizik od pojave tromboembolijskih komplikacija.Predikcija tromboembolijskih komplikacija, koje

nastaju posle postavljanja dijagnoze Ph^hMPN izuzetno je važna za bolesnike zbog toga što blagovremenim monitoringom i adekvatnom terapijom mogu biti prevenirane. Rezultati ove studije su potvrdili da uprkos stratifikaciji bolesnika prema standardnim faktorima rizika i terapijskom pristupu u skladu sa aktuelnim terapijskim vodičima, značajna proporcija bolesnika sa PV, ET i PMF dobija vaskularne komplikacije tokom bolesti.

Tokom prosečnog perioda praćenja koji je iznosio 275 bolesničkih godina, ukupna stopa incidencije prvog trombotičnog događaja u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN je iznosila 4.36 na 100 bolesničkih godina. Kada su u pitanju bolesnici sa PV i ET, naši rezultati (3.33 trombotična događaja na 100 bolesničkih godina u grupi od 39 bolesnika sa PV i 3.9 trombotičnih događaja na 100 bolesničkih godina u grupi od 27 bolesnika sa ET) su u saglasnosti sa podacima iz literature (Marchioli R i sar, 2005; Carobbio A i sar, 2011.). Sa druge strane, ukupna stopa incidence tromboza od 6.6 na 100 bolesničkih godina, koja je evidentirana u grupi od 29 bolesnika sa PMF je bila veća u poređenju sa rezultatima novijih studija (Barbui T i sar, 2010.). S obzirom na to da su bolesnici sa PMF u našoj studiji bili značajno stariji od bolesnika sa PV i ET, mi pretpostavljamo da je veća prosečna starost mogla doprineti povećanju incidence tromboza u ovoj grupi bolesnika.

Nekolicina autora je nedavno objavila rezultate prema kojima povećana retikulinska fibroza koštane srži u Ph^hMPN predstavlja nezavisni prediktor za trombozu i hemoragiju (Musolino C i sar, 2000; Finazzi G i sar, 2012; Barbui T i sar, 2012.). Ova otkrića su ukazala na značaj preciznog diferencijalno dijagnostičkog razdvajanja rane-prefibrotične faze PMF od prave ET u monitoringu rizika za trombozu. U skladu sa ovim opservacijama, naši rezultati takođe ukazuju na to da rizik od vaskularnih komplikacija ne sme biti potcenjen kod bolesnika sa PMF, posebno ukoliko su starijeg životnog doba.

Iako literaturni podaci ukazuju na to da je rizik od arterijskih tromboza kod bolesnika sa PV i ET najveći u vreme dijagnoze Ph^hMPN, a da nakon toga počinje da opada (Landolfi R i sar, 2008.), mi smo u periodu praćenja posle postavljanja dijagnoze mijeloproliferacije identifikovali veću incidencu arterijskih, u odnosu na venske tromboze u svim podtipovima Ph^hMPN. Kada je u pitanju ET, naši rezultati su u

saglasnosti sa prethodnim (Carobbio A i sar, 2011; Harrison CN i sar, 2005; Gisslinger H i sar, 2013.) koji su dokazali da je incidenca arterijskih tromboza 2-3 puta veća u poređenju sa venskim trombozama u ovoj bolesti. Prema literaturnim podacima (Barbui T i sar, 2013.), očekivano je da u PV i PMF arterijske i venske tromboze budu podjednako zastupljene, ali to nije potvrđeno u našoj grupi bolesnika.

Precizna stratifikacija rizika je od ključnog značaja za formiranje individualnog terapijskog pristupa, sa primarnim ciljem da se preveniraju trombozne komplikacije. Prema trenutno važećoj stratifikaciji faktora rizika za trombozu u Ph⁺MPN, svi bolesnici treba da primaju antiagregatornu terapiju, dok je citoreduktivna (antitrombocitna) terapija rezervisana samo za visokorizične bolesnike, sa namerom da se niskorizični bolesnici poštede od neželjenih efekata ovakve terapije. Ovaj terapijski princip međutim bolesnike iz standardno niskorizične kategorije izlaže povećanom riziku za dobijanje tromboembolijskih komplikacija u budućnosti.

Utvrđivanje prognostičkog značaja ispitivanih parametara za pojavu tromboembolijskih komplikacija

Iako patogeneza tromboza u Ph⁺MPN još uvek nije sasvim razjašnjena, pretpostavlja se da povećana aktivacija cirkulišućih, klonalno izmenjenih ćelija krvi, u kombinaciji sa reakcijom endotela na inflamatorne stimuluse, ima centralnu ulogu u formiranju trombofilnog fenotipa. Ph⁺MPN se odlikuju preklapanjem kliničko-patoloških osobina između pojedinačnih podtipova bolesti, koje najverovatnije potiče od zajedničkog molekularnog poremećaja, uključujući I JAK2V617F mutaciju (Skoda CR i sar, 2015.). Osim toga, ne postoje jasni podaci da se mehanizmi odgovorni za nastanak tromboza značajno razlikuju između PV, ET i PMF. Iz tog razloga, mi smo odlučili da analiziramo celokupnu grupu bolesnika sa Ph⁺MPN, bez podele na podtipove.

Specifičnosti bolesnika, kao što su starost preko 60 godina i istorija prethodnih tromboza su dobro poznati faktori, povezani sa povećanim rizikom za nove tromboze, ali oni nisu specifični za bolest Ph⁺MPN, s obzirom na to da predstavljaju takođe prediktore trombotičnog rizika i u opštoj populaciji.

U našoj studiji, 3 od ukupno 12 bolesnika koji su dobili trombozu tokom perioda praćenja, inicijalno su stratifikovani u grupu niskorizičnih bolesnika, što ukazuje na to da aktuelni model stratifikacije omogućava da se neki visokorizični bolesnici pogrešno klasifikuju u grupu niskorizičnih bolesnika.

Istraživanje novih prediktivnih faktora za trombozu u Ph⁺MPN i usavršavanje aktuelnog modela za stratifikaciju rizika za trombozu je bio predmet istraživanja u nekoliko velikih novijih studija (Barbui T i sar, 2010; Vannucchi AM i sar, 2007; Lussana F i sar, 2009; Borowczyk M i sar, 2015; Barbui T i sar, 2012.). Nedavno je formiran prognostički skor za trombozu u ET (IPSET-thrombosis) (Barbui T i sar, 2012.) koji je standardne faktore rizika za trombozu dopunio dodatnim faktorima rizika, kao što su prisustvo *JAK2V617F* mutacije i kardiovaskularni faktori rizika, čiji je značaj dokazan u ovoj grupi bolesnika. Međutim, čak i u relativno homogenoj grupi koju čine bolesnici sa ET, ovaj novi skor samo blago povećava predikciju budućih trombotičnih događaja (diskriminatorna snaga od 65%, vs. 60% za Harrell's C-concordance index) u poređenju sa konvencionalnom stratifikacijom rizika. Protrombotični uticaj *JAK2V617F* mutacionog statusa i/ili alelnog opterećenja, je potvrđen u PV, ET i PMF u najnovijim studijama (Barbui T i sar, 2010; Vannucchi AM i sar, 2007; Lussana F i sar, 2009; Borowczyk M i sar, 2015.). Mi međutim nismo našli veću incidencu *JAK2V617F* mutacije, kao ni veće alelno opterećenje u našoj grupi bolesnika koji su dobili trombozu u okviru Ph⁺MPN. S obzirom na to da je visoko *JAK2V617F* alelno opterećenje nedavno potvrđeno kao nezavisni prediktor nastanka venskih tromboza u Ph⁺MPN (Borowczyk M i sar, 2015.), izostanak korelacije u našoj studiji bi se mogao objasniti predominacijom arterijskih tromboza među našim bolesnicima.

Nivoi Neu-Tr i Mo-Tr agregata u našoj studiji su se razlikovali blago, ali ne i značajno između grupa bolesnika sa i bez tromboze (koja je nastala posle dijagnoze mijeloproliferacije). U skladu sa trenutno važećim patogenetskim mehanizmima tromboze u Ph⁺MPN, kreiranim i potvrđenim na osnovu rezultata retrospektivnih studija, (Coucelo M i sar, 2014; Jensen MK i sar, 2001.), mi smo u našem prospektivnom istraživanju našli pozitivnu korelaciju između nivoa cirkulišućih Le-Tr agregata i sklonosti ka trombozi. Korišćenjem multivarijantnog COX proporcionalnog hazard regresionog modela, mi smo pokazali da povećanje bazičnih vrednosti Mo-Tr

agregata predstavlja umeren, ali nezavistan prediktivni faktor za pojavu tromboze. To praktično znači da povećanje nivoa cirkulišućih Mo-Tr agregata za jednu standardnu devijaciju (SD), povećava rizik za nastanak tromboze 1.561 puta.

Aktivirani monociti snažno pokreću aktivaciju koagulacionog procesa u krvi, posredstvom oslobađanja tkivnog faktora, proteaza i reaktivnih kiseoničnih grupa (Bouchard BA i sar, 2003.). Naši rezultati ukazuju na to da nivo Mo-Tr agregata, kao mera aktivacionog statusa cirkulišućih monocita, određen na prezentaciji bolesti, u određenom stepenu ukazuje na trombogeni potencijal bolesnika sa Ph^hMPN. Sa druge strane, u našoj studiji nivo Neu-Tr agregata nije bio značajno povezan sa povećanim rizikom za trombotične događaje. Rezultati naše studije ukazuju na to da bi monociti mogli biti ključne ćelije u okviru leukocitne linije, čija aktivacija doprinosi stvaranju protrombotičnog stanja kod bolesnika sa Ph^hMPN.

Iako je prediktivna uloga kardiovaskularnih faktora rizika za trombozu prepoznata u ET (IPSET-thrombosis) (Barbui T i sar, 2012.), ona još uvek nije potvrđena u PV i PMF. Mi smo utvrdili da se HTA izdvojila kao nezavisni faktor rizika u celoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN u univarijantnom COX regresion modelu. Rezultati multivarijantne COX regresione analizesu pokazali da je interakcija između nivoa Mo-Tr agregata i HTA aditivna. To znači da ukoliko bolesnik sa Ph^hMPN ima i HTA kao komorbiditet, svako povećanje nivoa Mo-Tr agregata za jednu SD će povećati rizik za trombozu 1.975 puta.

Arterijska hipertenzija predstavlja jedan od konvencionalnih faktora rizika za ateroskleroza. Dobro je poznato da ateroskleroza predstavlja zajedničku patološku osnovu za kliničku manifestaciju HTA, naročito u starijem životnom dobu. Ateroskleroza predstavlja stanje sa aktiviranom koagulacijom i inflamacijom, u kom su takođe potvrđeni povećani nivoi Le-Tr agregata u cirkulaciji (Catellier DJ i sar, 2008.). Imajući u vidu prosečnu starost bolesnika u našoj studiji, ateroskleroza je očekivan patološki supstrat za HTA, koja dodatno povećava sklonost ka trombozi kod bolesnika sa Ph^hMPN.

Iako je prosečan nivo solubilnog P-selektina u našoj grupi bolesnika sa Ph^hMPN i trombozom bio značajno veći u poređenju sa grupom bolesnika koja nije imala novih

tromboza, prediktivna vrednost ovog parametra za trombozu nije potvrđena u multivarijantnom COX proporcionalnom hazard regresionom modelu.

Aktivacioni status leukocita i trombocita se menja u funkciji vremena i mnoge okolnosti utiču na njega (hrana, sportski treninzi, konzumiranje duvana, emotivni stres, inflamatorne bolesti, terapija). U cilju veće reproducibilnosti dobijenih rezultata, mi smo odabrali strategiju prospektivnog istraživanja, tokom kojeg je uticaj perifernih faktora sveden na minimum. Pa ipak, u našoj studiji bila su prisutna i neka ograničenja. Broj uključenih bolesnika, kao i broj vaskularnih događaja u periodu praćenja su bili relativno mali, što je umanjilo snagu finalne statističke analize. Iz tog razloga, diskriminatorni značaj Mo-Tr agregata u prepoznavanju bolesnika koji su u povećanom riziku za dobijanje trombozaposle postavljanja dijagnoze Ph^hMPN, treba oprezno tumačiti. Pa ipak, naša namera nije bila da kreiramo novi prediktivni model za trombozu, zasnovan na merenjima nivoa biomarkera leukocitne i trombocitne aktivacije, već pre svega da utvrdimo da li Le-Tr agregati isolubilni selektini uopšte imaju prediktivnu snagu. Sasvim je jasno da sa praktične tačke gledišta poseban značaj ima prepoznavanje bolesnika svrstanih u niskorizičnu kategoriju na osnovu procene standardnih faktora rizika, koji će tokom bolesti ipak dobiti trombozu. Nažalost, mi nismo bili u mogućnosti da u našoj studiji sprovedemo subanalizu Le-Tr agregata i selektina u grupama niskorizičnih i visokorizičnih bolesnika, jer je broj vaskularnih događaja u svakoj od ovih grupa bio mali.

Ovo je prva studija u kojoj su markeri aktiviranih leukocita i trombocita prospektivno istraživani kao potencijalni faktori rizika za trombozu. Sasvim je jasno da je izabrana strategija optimalna za nalaženje faktora koji mogu pomoći u identifikovanju bolesnika sa Ph^hMPN, koji su pod povećanim rizikom za razvoj tromboza. Naši rezultati ukazuju na to da uprkos terapiji prilagođenoj stepenu rizika, značajan procenat bolesnika sa Ph^hMPN dobija velike, ili fatalne tromboembolijske komplikacije posle dijagnoze mijeloproliferacije. Iako je naša studija uključila relativno mali broj bolesnika i period praćenja nije bio dovoljno dugačak da bi se evidentirale sve tromboembolijske komplikacije, najsenzitivniji faktori rizika za trombozu su se ipak pokazali. Naši rezultati su selektovali Mo-Tr agregate kao nezavistan, ali slab faktor rizika za trombozu. Konkomitantno prisustvo HTA naknadno učvršćuje prediktivnu ulogu Mo-Tr

agregata. Znajući da je smanjenje rizika za trombozu primarni cilj terapije u Ph⁺MPN, specijalnu pažnju bi trebalo obratiti na lečenje HTA. S obzirom na naš nalaz da povećanje bazalnog nivoa Mo-Tr agregata predstavlja nezavistan prediktor za trombozu u Ph⁺MPN, ova analiza bi mogla biti značajna u monitoringu bolesnika za pojavu tromboze.

Cilj našeg istraživanja nije bio stvaranje novog prediktivnog modela, nego procenjivanje da li bi neki od ispitivanih faktora mogli da budu kandidati za dopunu već postojećeg prediktivnog modela. Pre nego što bi se određivanje nivoa cirkulišućih Mo-Tr agregata moglo predložiti kao prognostički test za stratifikaciju bolesnika sa Ph⁺MPN u različite rizične grupe, ovaj biološki marker bi trebalo testirati u kombinaciji sa potvrđenim faktorima rizika u okviru studija na mnogo većem broju bolesnika. Postoji mogućnost da će se uključanjem većeg broja bolesnika u ova istraživanja, kao i produženjem perioda praćenja u okviru ovog test modela detektovati i neki drugi faktori rizika za trombozu.

Z a k l j u č c i

Ovo je prva studija u kojoj su markeri aktiviranih leukocita i trombocita prospektivno ispitivani kao potencijalni faktori rizika za trombozu kod bolesnika sa Ph⁺MPN.

Najvažniji zaključci ove studije su:

1. Uprkos terapiji prilagođenoj stepenu rizika, značajan procenat bolesnika sa Ph⁺MPN dobija tromboembolijske komplikacije u toku trajanja bolesti nakon što dijagnoza mijeloproliferacije bude postavljena.
2. Vrednosti leukocitno-trombocitnih agregata (Neu-Tr i Mo-Tr) u krvi su povećane u svim podtipovima Ph⁺MPN u odnosu na fiziološke vrednosti.
3. Nivoi solubilnih selektina (E-, L- i P-) su povećani u svim podtipovima Ph⁺MPN u odnosu na fiziološke vrednosti.
4. Primena citoreduktivne i antiagregatorne terapije redukuje nivoe leukocitno-trombocitnih agregata, kao i nivoe solubilnih selektina na fiziološke vrednosti.
5. U prospektivnom ispitivanju Mo-Tr agregati su se pokazali kao nezavistan prediktor za pojavu tromboembolijskih komplikacija u Ph⁺MPN.
6. Konkomitantno prisustvo HTA naknadno učvršćuje prediktivnu ulogu Mo-Tr agregata za pojavu tromboze u Ph⁺MPN.
7. Iako su u krvi bolesnika nađene povećane vrednosti markera aktiviranja koagulacionog sistema (F1+2 i D-dimera) oni nisu imali prediktivnu vrednost za pojavu tromboze.
8. Prediktivnu vrednost u prospektivnoj studiji nisu imale ni mutacije JAK-2, TET2, MPL i CALR.
9. Znajući da je smanjenje rizika za trombozu primarni cilj terapije u Ph⁺MPN, posebnu pažnju bi trebalo obratiti na lečenje HTA s obzirom na njenu adiktivnu ulogu uz povišene vrednosti Mo-Tr agregata.

L i t e r a t u r a

A

Alvarez-Larran A, Cervantes F, Bellosillo B, Giralt M, Julia A, Hernandez-Boluda JC, et al. Essential thrombocythemia in young individuals: frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients. *Leukemia*, 2007; 21:1218-1223.

Alvarez-Larran A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, et al. Increased platelet leukocyte and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann Hematol*, 2008;87(4):269-276.

Alvarez-Larran A, Pereira A, Guglielmelli P, Hernandez-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, et al. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*, 2016;101(8):926-931.

Arrellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. (2006) Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*, 91:169-175.

Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis, occurrence, and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*, 2008;84:102-108.

Adams BD, Baker R, Lopez JA, Spencer S. Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(3):585-602.

Afshar-Khargan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(1):34-39.

Alonci A, Allegra A, Bellomo G, Penna G, D'Angelo A, Quartarone E, Musolino C. Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematol Oncol*.2008;26(4):235-239.

Arrellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. (2006) Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*, 91:169-175.

Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*. 2009;84(2):102-108.

B

Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010;115(4):778-782.

Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*, 2011;29:3179-3184.

Barbui T, Finazzi G, Carobbio A. (2012) Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*.120;5128-5133.

Barbui T, Thiele J, Carobbio A, et al. Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. *Blood*, 2012;120(3):569-571.

Barbui T, Finazzi G, Falanga, A. (2013) Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*, 122(13):2176-2184.

Barnard MR, Krueger LA, Frelinger III AL, Furman MI, Michelson AD. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Current Protocols in Cytometry* (2003) 6.15.1-6.15.8. Copyright © 2003 by John Wiley & Sons, Inc.

Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A (2008) Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia* 22: 437-438.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061.

Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*, 2008;112(1):141-149.

Bellucci S, Ignatova E, Jaillet N, Boffa MC. Platelet hyperactivation in patients with essential thrombocythemia is not associated with vascular endothelial cell damage as judged by the level of plasma thrombomodulin, protein S, PAI-1, t-PA, and vWF. *Thromb Hemost* 1993;70:736-742.

Bellucci S, Legrand C, Boval B, Drouet L, Caen J. Studies of platelet volume, chemistry and function in patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Br J Haematol*, 1999;104:886-892.

Belotti A, Elli E, Speranza T, Lanzi E, Pioltelli P, Pogliani E. Circulating endothelial cells and endothelial activation in essential thrombocythemia: results from CD146+ immunomagnetic enrichment-flow cytometry and soluble E-selectin detection. *Am J Hematol.* 2012;87(3):319-320.

Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group Protocols. *Semin Hematol.* 1986;23(2):132-143.

Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, et al. (2014) JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood*; 124: 2104-2115.

Blann A, Caine G, Bareford D. Abnormal vascular, platelet and coagulation markers in primary thrombocythaemia are not reversed by treatments that reduce the platelet count. *Platelets*, 2004;15:447-449.

Boissinot M, Lippert E, Girodon F, Dobo I, Fouassier M, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood*, 2006;108:3223-3224.

Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydłowska A, Kroll-Balcerzak R, Balcerzak A, Iwola M, Michalak M, Komarnicki M. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. (2015) *Thrombosis Research*, 135:272-280.

Bouchard BA, Tracy PB. (2003) The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost*, 1:464-9.

Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, Galieni P, Dispensa E. Reduction of antithrombin III, protein C and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. *Am J Hematol.* 1996;52(1):14-20.

Brinkman HJ, Mertens K, van Mourik JA. Proteolytic cleavage of protein S during the hemostatic response. *J Thromb Haemost.* 2005;3(12):2712-2720.

C

Campbell PJ, Bareford D, Erber WN, et al. Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy. *J Clin Oncol*, 2009;27(18):2991-2999.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CI, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1945-53.

- Carlos TM, and Harlan JM. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84:2068-2101.
- Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors and Jak2 mutation status. *Blood*, 2007; 109:2310-2313.
- Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2008;26:2732-2736.
- Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*, 2009;37(9):1016-1021.
- Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011; 117(22):5857-5859.
- Catellier DJ, Aleksic N, Folsom AR, Boerwinkle E. (2008) Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Flow Cytometry Study of Monocyte and Platelet Markers: Intraindividual Variability and Reliability. *Clinical Chemistry*, 54;8: 1363-1371.
- Cazzola M, Kralovics R. (2014) From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*; 123: 3714-3719.
- Cella G, Marchetti M, Vianello F, et al. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost*. 2010;104(1):151-156.
- Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, De Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis Research*, 2012; 129:263-266.
- Cervantes F, Alvarez-Larran A, Arrelano-Rodrigo E, Granelli M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia* 2006;20(1):55-60.
- Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. (2008) Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 22:905-914.
- Cervantes F, Dupriez B, Passamonti F, Vannucchi AM, Morra E, Reilly JT, Demory JL, Rumi E, Guglielmelli P, Roncoroni E, Tefferi A, Pereira A. (2012) Improving Survival Trends in Primary Myelofibrosis: An International Study. *J Clin Oncol* 30:2981-2987.
- Chockalingam A, Campbell NR, Fodor G. Worldwide epidemic of hypertension. *Can J Cardiol* 2006;22:553-555.

Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero P, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*, 1990; 8: 556-562.

Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med*, 1995;332(17):1132-1136.

Coucelo M, Caetano G, Sevivas T, Almeida Santos S, Fidalgo T, Bento C, Fortuna M, Duarte M, Menzes C, Ribeiro ML. (2014) JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Int J Hematol*. 99:32-40.

D

Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res*, 2009;33(1):67-73.

Dameshek W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*; 6: 372-375.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécuse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 May 8;360(22):2289-301.

De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: efficacy of treatment in preventing re-thrombosis in different clinical settings. *Blood* 2006; 108:119a.

De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica*, 2009;94(5):733-737.

De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Increased risk of recurrent thrombosis in patients with essential thrombocythemia carrying the homozygous JAK2 V617F mutation. *Ann Hematol*, 2010;89:141-146.

Dienava-Verdoold I, Marchetti MR, te Boome LC, et al. Platelet-mediated proteolytic down regulation of the anticoagulant activity of protein S in individuals with haematological malignancies. *Thromb Haemost*.2012;107(3):468-476.

Di Raimondo F, Palumbo GA, Molica S, Giustolisi R. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases. *Acta Haematol* 2001;106(4):177-183.

Duchemin J, Ugo V, Ianotto JC, Lecucq L, Mercier B, Abgrall JF. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res.* 2010;126(3):238-242.

E

Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Br J Haematol.* 2005;128(3):275-290.

Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica*, 2010;95(10):1788-1791.

Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, Sangkhae V, Fox NE, Chen J, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *PNAS*, 2014;111(6):2295-2300.

Erem C, Hacıhasanoglu A, Kocak M, Deger O, Topbas M. Prevalence of prehypertension and hypertension and associated risk factors among Turkish adults: Trabson Hypertension Study. *J Public Health (Oxf)* 2008;31:47-58.

F

Falanga, A., Marchetti, M. Evangelista V et al. (1999). Neutrophil activation and hemostasis changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factors. *Blood.* 93:2506-2514.

Falanga, A., Marchetti, M. Evangelista V et al. Polymorphonuclear leucocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 2000;96:4261-4266.

Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol.*2005a;33(5):523-530.

Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.*2007;35(5):702-711.

Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol.* 2005b;42(4):239-247.

Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96(13):4261-4266.

Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:571-581.

Faurschou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbach HC. High prevalence of hyperhomocysteinemia due to marginal deficiency of cobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*, 2000;65(2):136-140.

Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, et al. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia*, 2012;26(4):716-719.

Friedenberg WR, Roberts RC, David DE. Relationship of thrombohemorrhagic complications to endothelial cell function in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*. 1992;40(4):283-289.

Frijns CJM, Kappelle LJ, van Gijn J, Neiuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. (1997) Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 28:2214-2218.

Fruchtman SM, Petit RM, Gilbert HS, Fiddler G, Lyne A, Anagrelide study group. Anagrelide: analysis of long-term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative disorders. *Leuk Res*, 2005;29:481-491.

Furtado LV1, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *J Mol Diagn*. 2013 Nov;15(6):810-8.

G

van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R, et al. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost*, 1996;76:333-338.

van Genderen PJ, Mulder PG, Waleboer M, van de Mosedijk D, Michiels JJ. Prevention and treatment of thrombotic complications in essential thrombocythemia : efficacy and safety of aspirin. *Br J Haematol*, 1997;97:179-184.

Gisslinger H, Rodeghiero F, Ruggeri M, et al. Homocysteine levels in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Br J Haematol*, 1999;105(2):551-555.

Gisslinger H, Mullner M, Pabinger I, et al. Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study. *Haematologica*, 2005;90(3):408-410.

Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J et al. ANAHYDRET Study Group. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013; 121(10):1720-1728.

Goerttler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel H, Pahl HL. (2005) The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood*;106:2862-2864.

Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B, Grunewald M, Bangerter M, Bergmann L.(1999) Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythemia. *Thromb Res*. 96:191-196.

Grossi A, Vannucchi AM, Rafanelli D, Filimberti E, Rossi Ferrini P. Beta-thromboglobulin contents in megakaryocytes of patients with myeloproliferative diseases. *Thromb Res*, 1986;43:367-374.

Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med*, 1995; 123: 656-664.

H

Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets*. 1997;8(6):379-383.

Harrison CN, Donohoe S, Carr P, Dave M, Mackie I, Machin SJ. Patients with essential thrombocythemia have an increased prevalence of antiphospholipid antibodies which may be associated with thrombosis. *Thromb Haemost*, 2002;87(5):802-807.

Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005b; 353(1):33-45.

Harrison CN. Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005a;409-415.

J

James C, UgoV, Le Coue´dic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garc,on L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148.

Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M., Issa, J.P. (2005) JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* **106**, 3370-3373.

Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbach HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Hematol*. 2000;110(1):116-124.

Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbach HC. (2001) Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol*. 66, 143-151.

Jensen MK, de Nully Brown P, Thorsen S, Hasselbach HC. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol*, 2002;69(3):185-191.

K

Karakantza M, Giannakoulas NC, Zikos P, et al. Markers of endothelial and in vivo platelet activation in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Int J Hematol*, 2004;79(3):253-259.

Kiladijan JJ, Cervantes F, Leebek FW, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008;111:4922-4929.

Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanesi C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005) A Gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, 1779-1790.

Kralovics R, Teo SS, Li S, Theoharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1377-80.

Kubota Y, Tanaka T, Ohnishi H, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase primes platelets from patients with chronic myelogenous leukemia for thrombopoietin induced aggregation. *Leukemia*, 2004;18(6):1127-1137.

L

Landolfi R, Ciabattoni G, Patrignani P, et al. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood*. 1992;80(8):1965-1971.

Landolfi R, Rocca B, Patrono C. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;20(3):203-222.

Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350(2):114-124.

Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(3):617-633.

Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R et al. European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with Polycythemia Vera. *Blood*, 2007; 109: 2446-2452.

Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculations. *Leukemia*, 2008;22:2020-2028.

Larsen T. S., Pallisgaard N., Moller M. B., et al., The Jak2 V617F allele burden in essential thrombocythaemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis – impact on disease phenotype, *Eur. J. Haematology*. 79 (2007) 508-515.

Lee HS, Park LC, Lee EM et al. Incidence rates and risk factors for vascular events in patients with essential thrombocythemia: a multicenter study from Korea. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012;12(1):70-75.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7,387-397.

Levine RL, Pardananani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7: 673-683.

Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupre, N., Skoda, R.C., Hermouet, S. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865-1867.

Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*; 123: 2220-2228.

Lussana F, Caberlson S, Pagani C, Kamphuisen PW, Buller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. (2009) *Thromb Res*, 124(4):409-417.

M

Macey M, McCarthy D, Azam U, Milne T, Golledge P, Newland A. Ethylenediaminetetraacetic Acid Plus Citrate-Theophylline-Adenosine-Dipyridamole (EDTA-CTAD): A Novel Anticoagulant for the Flow Cytometric Assessment of Platelet and Neutrophil. Activation Ex Vivo in Whole Blood Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2003; 52B:30–40.

Macey M, Hagi-Pavli E, Stewart J, Wallace GR, Stanford M, Shirlaw P, Fortune F. (2011) Age, gender and disease-related platelet and neutrophil activation *ex vivo* in whole blood samples from patients with Behcet's disease. *Rheumatology*;50:1849-1859.

Maugeri N, Malato S, Femia EA, et al. Clearance of circulating activated platelets in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*.2011;118(12):3359-3366.

Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2V617F mutation and hemostasis in patients with myeloproliferative disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;36(3-4):148-159.

Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2008; 112(10):4061-4068.

Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2224-2232.

Maugeri N, Giordano G, Petrilli MP, de Gaetano G, et al. Leucocyte activation in myeloproliferative disease. *J Thromb Haemost*. ISTH, Sydney 2005:1594 (abst).

Michiels JJ, Barbui T, Finazzi G, et al. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and possible future study designs of the PVSG. *Leuk Lymphoma*, 2000;36:239-253.

Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, van der Planken M, De Raeve H, Schroyens W. Clinical and laboratory features, pathobiology of platelet-mediated thrombosis and bleeding complications, and the molecular etiology of essential thrombocythemia and polycythemia vera: therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(3):174-207.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.

Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa R. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*, 2013;92:289-297.

Musolino, C., Alonci, A., Bellomo, G., Tringali, O., Spatari, G., Quartarone, C., Rizzo, V., Calabro, L., Bagnato, G., and Frisina, N. (2000) Myeloproliferative disease: markers of endothelial and platelet status in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Hematology* **4**, 397–402.

N

Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, Hayasaka H, Shimizu C, Moriyama T. The basis examination of leukocyte–platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *International Journal of Laboratory Hematology* 2013; 35: 534–541.

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*; 369: 2391-2405.

O

Oppliger Leibundgut E, Hom MP, Brunold C, Pfanner-Meyer B, Marti D, Hirsiger H, Tobler A, Zwicky C. (2006) Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica*; 91: 1465-1472.

www.orpha.net.

Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. (2015) Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*; 372: 601-612.

P

Palandri F, Polverelli N, Catani L, Ottaviani E, Baccarani M, Vianelli N. Impact of leukocytosis on thrombotic risk and survival in 532 patients with essential thrombocythemia: a retrospective study. *An Hematol*. 2011;90(8):933-938.

Panova-Noeva M, Marchetti M, Buoro S, et al. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinant of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. *Blood*. 2011a;118(9):2599-2601.

Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol*.2011b;86(4):337-342.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. (2006) MPL 515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*; 108:3472-3476.

Pardanani A, Lasho TL, Hussein K, Schwager SM, Finke CM, Pruthi RK, et al. JAK2V617F mutation screening as part of hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: Assessment of value in series of 664 consecutive patients. *Mayo Clin Proc*, 2008;63(4):457-459.

Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004;117:755-761.

Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Chiara E, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*, 2008;93(11):1645-1651.

Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*, 2010;24(9):1574-1579.

Passamonti F, Caramazza D, Mora B, et al. It is time to change thrombosis risk assessment for PV and ET? *Best Pract Res Clin Haematol*, 2014;27:121-127.

Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004;126:234S-264S.

Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J et al. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood*, 2012;119(20):4625-4635.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*; 3: e270.

R

Radovancevic R, Matijevic N, Bracey AW, Radovancevic B, Elayda M, Gregoric ID, Frazier OH. Increased leukocyte-platelet interactions during circulatory support with left ventricular assist devices. *ASAIO Journal* 2009; 55: 459-464.

Rafail S, Ritis K, Schaefer K, et al. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNF alpha involvement. *Thromb Res*, 2008;122(3):366-375.

Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, et al. (2014) Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*; 123: e123-e133.

Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, Greaves M. (2007) Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationship with JAK2 V617F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5:1679-1685.

Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. (2014) Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*; 123: 1552-1555.

Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, et al. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol*, 2002;71(1):1-6.

Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. (2014) JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*;123(10):1544-51.

S

Sanger,F., Nicklen,S. and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schaub FX, Jager R, Looser R, et al. (2009) Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F. *Blood*; 113: 2022-2027.

Schaub FX, Looser R, Li S, et al. (2010) Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*; 115: 2003-2007.

Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Warren, A.J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R. (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* **356**, 459-468.

Skoda CR, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Experimental Hematology*, 2015;43:599-608.

Sozer S, Hoffman R, et al. Laser-capture microdissection and analysis of liver endothelial cells from patients with Budd-Chiari syndrome. *Methods Mol Biol*, 2011;755:405-415.

Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008;112:231-9.

Staerk J, Defour JP, Pecquet C et al. (2011) Orientation-specific signaling by thrombopoietin receptor dimmers. *EMBO J*; 30:4398-4413.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, (ed). (2008) WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

T

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, 2007a: 1092-1097.

Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost*. 2007b;33:313-320.

Tefferi A. (2008) The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 22:3-13.

Tefferi A. Annual clinical updates in hematological malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 2011;86(3):292-301.

Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012;87:285-293.

Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. (2014) CALR vs JAK2 vs MPL- mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*; 28: 1472-1477.

Telinski J, Wierzbowska A, Krawczynska A, et al. Plasma levels of angiogenic factors and circulating endothelial cells in essential thrombocythemia: correlation with cytoreductive therapy and JAK2V617F mutational status. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(9):1727-1733.

Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, et al. Elevated procoagulant microparticle-expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009;94(7):911-918.

Turitto VT, Weiss HJ. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science*. 1980;207(4430):541-543.

V

Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. (2011) New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*; 118: 1723-1735.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al: MPD Research Consortium. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. (2007) *Leukemia*, 21(9):1952-1959.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*, 2008;112(3):844-847.

Vannucchi AM. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Intern Emerg Med*, 2010;5:177-184.

Villmov T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff A.C. (2003) Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thrombosis Research* 108, 139-145.

Vicente, C., Vázquez, I., Marcotegui, N., Conchillo, A., Carranza, C., Rivell, G., Bandrés, E., Cristobal, I., Lahortiga, I., Calasanz, M.J., Odero, M.D. (2007) JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers. *Leukemia* **21**, 2386-2390.

W

Weinberg RS. (1997) In vitro Erythropoiesis in Polycythemia Vera and other Myeloproliferative Disorders. *Seminars in Hematology*; 34(1): 64-69.

Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complications rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*, 2006; 81: 159-166.

Z

Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica*, 2008;93(9):1412-1414.

Zucker S, Mielke CH. Classification of thrombocytosis based on platelet function test: correlation with hemorrhagic and thrombotic complications. *J Lab Clin Med* 1972; 80:385-394.

Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6830-6840.

Biografija

Dr Dijana Šefer je rođena 01. jula 1963. godine u Beogradu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 02. marta 1990. godine, sa srednjom ocenom 9,46. Stručni ispit je položila 1991. godine, a od 29. oktobra 1991. godine je zaposlena kao lekar na specijalizaciji na Klinici za hematologiju, Kliničkog centra Srbije. Specijalizaciju iz kliničke farmakologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1991/92 godine, a specijalistički ispit je položila 28. oktobra 1996. godine sa odličnom ocenom. Od 03. decembra 1996. godine kao lekar specijalista kliničke farmakologije zaposlena je u laboratoriji za in vitro ćelijsku kulturu Klinike za hematologiju KCS. Magistarski rad pod nazivom "Značaj određivanja spontano formiranih matičnih ćelija megakariocitopoeze i eritrocitopoeze u krvi i kostnoj srži bolesnika sa trombocitozom", čiji je mentor Prof dr Darinka Bošković, odbranila je 31. marta 2005. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na istom fakultetu je prijavila doktorat iz Hematologije, a tema je 22.10.2013. odobrena na Univerzitetu u Beogradu. Odlukom Naučnog veća Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu 28. oktobra 2010. godine mr sci med Dijana Šefer je izabrana u istraživačko zvanje "Istraživač saradnik".

Njena doktorska disertacija pod naslovom "Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa Filadelfija-negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama" je deo prijavljenog istraživačkog projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, pod nazivom "Ispitivanje patogeneze hematoloških maligniteta", broj projekta: OI175053, rukovodilac projekta Dr sci med Vladan Čokić, Naučni savetnik u Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju, Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Mr sci med Dijana Šefer je koautor 43 publikacije, koje obuhvataju 12 radova i 21 saopštenje na međunarodnim skupovima i 10 na skupovima nacionalnog značaja. Mentor doktorske disertacije je Prof dr Predrag Miljić. Mr sci med Dijana Šefer je član hematološke sekcije SLD od 1992. godine i član je sekcije kliničkih farmakologa SLD od 1996. godine.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Dijana Šefer _____

broj indeksa _____ doktorske studije po starom programu _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa Filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 04.08.2016. _____



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dijana Šefer

Broj indeksa doktorske studije po starom programu

Studijski program

Naslov rada „Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa Filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama”

Mentor Prof dr Predrag Miljić

Potpisani/a Dijana Šefer

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.08.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Značaj leukocitno-trombocitnih interakcija za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod bolesnika sa Filadelfija negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

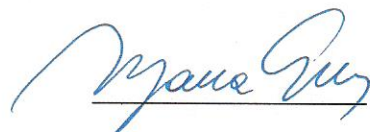
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 04.08.2016. _____



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.