

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vesna A. Đorđević

**TIP I UČESTALOST HROMOZOMSKIH ABERACIJA I
ZNAČAJ MOLEKULARNOG MARKERA JAK2V617F U
PRIMARNOJ MIJELOFIBROZI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vesna A. Đorđević

**TYPE AND FREQUENCY OF CHROMOSOMAL
ABERRATIONS AND IMPORTANCE OF MOLECULAR
JAK2V617F MARKER IN PRIMARY MYELOFIBROSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI: **dr Sofija Pavković-Lučić,**
docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Andrija Bogdanović,
vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI
KOMISIJE:**

dr Sonja Pavlović,
naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo Univerziteta u Beogradu

dr Ivana Novaković,
redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE:

U trenutku kada je doktorska disertacija završena, čast mi je da izrazim veliku ličnu zahvalnost na bezrezervnoj ljudskoj i kolegijalnoj pomoći, koju su mi tokom izrade teze, uporedo sa stručnim sugestijama, savetima i podrškom, pružili uvaženi mentori, docent dr Sofija Pavković-Lučić i profesor dr Andrija Bogdanović.

Posebno se zahvaljujem zaposlenima iz laboratorije za citogenetiku i molekularnu genetiku, Klinike za hematologiju, Kliničkog centra Srbije, mojim bliskim saradnicama, specijalisti genetike Jelici Jovanović i dr Mariji Denčić-Fekete na kolegijalnoj saradnji i laborantima Mariji Pješčić, Stefanoski Svetlani, Emiliji Gajić i Branki Stojković na tehničkoj pomoći u realizaciji istraživanja.

Zahvaljujem se na korisnim sugestijama i savetima cenjenim članovima komisije, profesorki dr Sonji Pavlović i profesorki Ivani Novaković.

Na tehničkoj pomoći u realizaciji rezultata, zahvaljujem se dr Vesni Spasovki i dr Maji Peruničić-Jovanović.

Zahvaljujem se cenjenim kolegama iz Klinike za hematologiju Kliničkog centra Srbije i brojnim prijateljima koji su na bilo koji način doprineli uspešnom završetku istraživanja i finalnoj izradi ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam svojoj porodici, suprugu Milanu i ćerki Maši, na strpljenju, razumevanju, moralnoj podršci i ohrabrenjima da istrajem u ostvarenju svog cilja i da se na kraju radujemo svi zajedno.

Vesna Đorđević

TIP I UČESTALOST HROMOZOMSKIH ABERACIJA I ZNAČAJ MOLEKULARNOG MARKERA JAK2V617F U PRIMARNOJ MIJELOFIBROZI

SAŽETAK

Primarna mijelofibroza (PMF) je hronična, maligna hematološka bolest, koja se karakteriše leukoeritroblastnom krvnom slikom, anizopoikilocitozom eritrocita u obliku suze, različitim stepenom fibroze kostne srži i hepatosplenomegalijom usled ekstramedularne hematopoeze. Od genetičkih specifičnosti bolesti, ističu se hromozomske aberacije u patološkim, mijeloidnim ćelijama krvi i tačkasta mutacija V617F na genu *JAK2*.

Osnovni cilj studije bio je ispitati kariotipske i citogenetičke parametre i prisustvo mutacije *JAK2V617F* u genomu bolesnika sa *de novo* PMF. Ispitani su i drugi dijagnostički parametri, njihove međusobne korelacije i njihov uticaj na kumulativno preživljavanje bolesnika.

Analiza kariotipa vršena je konvencionalnom citogenetičkom metodom. Alel-specifična PCR analiza je korišćena za detekciju mutacije *JAK2V617F*. U studiji su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode.

Retrospektivnom analizom citogenetičkih rezultata 61 bolesnika, registrovan je patološki kariotip kod 41% bolesnika. Zastupljene su bile aberacije specifične za PMF: 13q-, 20q-, +8, ali i aberacije ređe zastupljene u ovoj bolesti.

Prospektivnom studijom bilo je obuhvaćeno 144 bolesnika. Ispitana je učestalost hromozomskih aberacija u kariotipu bolesnika, učestalost mutacije *JAK2V617F*, njihova međusobna korelacija i korelacija sa kliničkim i hematološkim, laboratorijskim parametrima. Hromozomske aberacije bile su zastupljene kod 29% bolesnika. Od specifičnih aberacija za PMF, najzastupljenija je bila trizomija hromozoma 9, a zatim 13q- i 20q-. Mutacija *JAK2V617F* je registrovana kod 55% bolesnika. Ispitivanjem korelacije mutacije i tipa kariotipa, odnosno mutacije i hromozomskih aberacija različitog stepena rizika, nije registrovana statistički značajna razlika ($p=0.153$).

Ispitivanjem značaja kliničkih i hematološko laboratorijskih parametara registrovana je razlika u preživljavanju bolesnika različitih prognoznih grupa primenom Lilskog, Servantesovog, IPSS, DIPSS prognoznih sistema (PS-a) (za sve $p<0.001$), Mayo PS za sve bolesnike ($p=0.001$) i Mayo PS za mlađe bolesnike ($p=0.013$).

Ispitivanjem uticaja mutacije *JAK2V617F*, pokazano je da ne postoji statistički zna-

čajna razlika ($p=0,807$) u preživljavanju bolesnika sa i bez mutacije.

Ispitivanjem značaja patološkog kariotipa i pojedinih hromozomskih aberacija na preživljavanje bolesnika, primenom DIPSS citogenetičkog prognosnog sistema (CPS-a) registrovana je statistički značajna razlika ($p=0.004$), dok primenom Lilskog, Mayo i IPSS CPS-a nije registrovana statistički značajna razlika ($p=0.155$, $p=0.214$, $p=0.152$).

Naši rezultati ukazuju da je opšta učestalost hromozomskih aberacija kod bolesnika sa PMF 32%. Najzastupljenije hromozomske aberacije su: +8, +9, 13q-, 20q-. Somatska mutacija *JAK2V617F* je zastupljena kod 55% bolesnika sa PMF. U slučaju ispitanih genetičkih parametra, nije konstatovana korelacija hromozomskih aberacija i mutacije *JAK2V617F*. Prognosno povoljne aberacije za bolesnike sa PMF su: solo 13q-, t/dup(1q) solo 20q-, solo +9, druge solo aberacije, dve aberacije isključujući nepovoljne i normalan kariotip. Nepovoljne hromozomske aberacije su: kompleksno aberantan kariotip, solo +8, solo -7/7q-, solo -5/5q-, i(17q), inv(3), 12p-, 11q23, dve aberacije uključujući nepovoljne.

Ključne reči: Hromozomske aberacije, mutacija *JAK2V617F*, prognosni sistemi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: 575.224.2:575.116:[616:612.119] (043.3)

**TYPE AND FREQUENCY OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS
AND IMPORTANCE OF MOLECULAR
JAK2V617F MARKER IN PRIMARY MYELOFIBROSIS**

ABSTRACT

Primary Myelofibrosis (PMF) is a chronic, malignant hematological disease, characterized by leukoerythroblastic blood picture, anisopoikilocytosis teardrop-shaped erythrocyte, different degree of bone marrow fibrosis and hepatosplenomegaly due to extramedullary hematopoiesis. Among genetic specificities of the disease, those that stand out are chromosomal aberrations in pathological, myeloid blood cells and point mutation V617F in the *JAK2* gene.

The main goal of study was to examine karyotype and cytogenetic parameters and presence of *JAK2V617F* mutation in the genome of patients with *de novo* PMF. Additionally, other diagnostic parameters, their mutual correlations and their effect on cumulative survival rate of patients were examined.

Karyotype analysis was performed by conventional cytogenetic method. Allele-specific PCR was used to detect the *JAK2V617F* mutation. The study used descriptive and analytical statistical methods.

By retrospective analysis of cytogenetic results that included 61 patients, abnormal karyotype was registered in 41% of them. Specific PMF aberrations that were found are : 13q-, 20q-, +8, but also aberrations that are rarely present in this disease.

Prospective study included 144 patients. The frequency of chromosomal aberrations was tested, so as the frequency of *JAK2V617F* mutation, their mutual correlation and correlation with clinical and hemato-laboratory parameters. Chromosomal aberrations were present in 29% of patients. Of specific aberrations for PMF, the most common was trisomy of chromosome 9, then 13q- and 20q-. *JAK2V617F* mutation was registered in 55% of patients. Examining the correlation between mutation and type of karyotype and mutation and chromosomal aberrations with various risk level, statistically significant difference was not registered ($p=0.153$).

Examining the importance of clinical and hematological parameters, difference was registered in survival of patients with different prognostic groups applying Lille, Cervantes, IPSS, DIPSS prognostic systems (PSs) (for all $p<0.001$), Mayo PS for all patients ($p=0.001$)

and Mayo PS for younger patients ($p=0.013$).

Testing the influence of the *JAK2V617F* mutation, it was noticed that there is no statistically significant difference ($p=0.807$) in the survival of patients with and without mutations.

Examining the importance of pathological karyotype and some chromosomal aberrations upon survival of patients, statistic significance ($p=0.004$) was registered using DIPSS cytogenetic prognostic system (CPS). Applying Lille, Mayo and IPSS CPSs, statistic significance was not registered ($p=0.155$ and $p=0.214$, $p=0.152$).

Our results indicate that the overall frequency of chromosomal abnormalities in patients with PMF is 32%. The most common chromosomal aberrations are: +8, +9, 13q- and 20q-. The incidence of *JAK2V617F* somatic mutation is 55% in our PMF patients cohort. Correlation between chromosomal aberrations and *JAK2V617F* mutation was not found.

It was also concluded that prognostically favorable chromosomal aberrations for patients with PMF are: 13q-, t/dup(1q), 20q-, +9, other solo aberrations, two coexisting aberrations excluding unfavorable aberrations and normal karyotype. Unfavorable aberrations are: the presence of complex karyotype, +8, -7/7q-, -5/5q-, i(17q), inv (3), 12p-, 11q23, and the coexistence of two unfavourable aberrations.

Keywords: Chromosomal aberrations, *JAK2V617F* mutation, prognostic systems

Scientific area: Biology

Scientific field: Genetics

UDC: 575.224.2:575.116:[616:612.119] (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hematopoeza	2
1.2. Mijeloproliferativne neoplazme	5
1.2.1. Molekularna regulacija mijelopoeze	6
1.2.2. Somatske mutacije u mijeloproliferativnim neoplazmama	9
1.2.3. Klasifikacija mijeloproliferativnih neoplazmi	14
1.3. Primarna mijelofibroza.....	16
1.3.1. Epidemiologija primarne mijelofibroze	17
1.3.2. Etiologija i patogeneza primarne mijelofibroze	17
1.3.3. Kliničke karakteristike	24
1.3.4. Laboratorijski nalazi	25
1.3.5. Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza	26
1.3.6. Prognoza bolesti.....	29
1.3.7. Lečenje bolesti	34
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1. Kriterijumi izbora ispitanika	38
3.2. Klinička i hematološka ispitivanja	38
3.3. Citogenetička i molekularno genetička ispitivanja	40
3.4. Prognozni sistemi i distribucija bolesnika na osnovu stepena rizika	43
3.5. Statistička analiza.....	46
4. REZULTATI	47
4.1. Kriterijumi za ispitivanje bolesnika.....	47
4.2. Retrospektivno ispitivanje.....	47
4.3. Prospektivno ispitivanje	50
4.3.1. Citogenetičko ispitivanje.....	52
4.3.2. Molekularno genetičko ispitivanje	57
4.3.3. Ispitivanje stepena fibroze, splenomegalije i distribucije CD34+ ćelija.....	58
4.3.4. Uticaj dijagnostičkih parametara na preživljavanje bolesnika ...	65
5. DISKUSIJA	79
5.1. Ispitivanje citogenetičke i molekularno genetičke osnove PMF	79

5.2. Ispitivanje povezanosti dijagnostičkih parametara na relaciji genotip-fenotip	87
5.3. Ispitivanje proliferativnog potencijala PMF.....	89
5.4. Ispitivanje uticaja dijagnostičkih parametara na dužinu života bolesnika sa PMF.....	91
6. ZAKLJUČCI.....	95
7. LITERATURA	97
8. SKRAĆENICE.....	122

1. UVOD

Prvi podaci o etiologiji malignih oboljenja datiraju s kraja XIX veka. Još je 1890. godine nemački patolog David von Hansemann, studirajući biopsije karcinoma, bio iznenadjen učestalošću jedarnih i mitotskih nepravilnosti. Iako nije imao objašnjenje za ove ćelijske pojave, smatrao je da su one u direktnoj vezi sa poreklom i razvojem malignih bolesti. Kasnije je pomenuta istraživanja i istraživanja drugih autora, Teodor Boveri sistematisao u somatsko-mutacionu teoriju kancera. Teorija polazi od hipoteze da genetičke promene, odnosno hromozomske abnormalnosti, predstavljaju krucijalni događaj za transformaciju normalne ćelije u malignu (1).

Mnoga otkrića iz oblasti genetike i molekularne genetike, omogućila su jasnije sagledavanje biologije maligne ćelije. Prvi spektakularni uspeh iz oblasti hematološke citogenetike dogodio se već 1960. godine. Nowell i Hungerford su otkrili prisustvo neobično malog hromozoma u ćelijama krvi bolesnika sa hroničnom mijeloidnom leukemijom (2). Novootkriveni marker, nazvan je Filadelfija (*engl.* Ph-Philadelphia) hromozom. Tehnikom traka, pokazano je da je Ph hromozom rezultat recipročne, balansirane translokacije između hromozoma 9 i 22 (3). Ovo je bila prva, konzistentna hromozomska aberacija, citogenetički marker za jednu malignu bolest i direktna potvrda Boverijeve hipoteze.

Filadelfija hromozom, savršen primer somatske mutacije u matičnoj ćeliji i direktan uzrok neoplastičnog procesa, prvo je u nizu otkrića iz oblasti hematologije. Obimna postojeća znanja o programima diferenciranja i sazrevanja, odnosno maturacije ćelija krvi u procesu hematopoeze, predstavljaju pravi model interpretacije kompleksnih reakcija na relaciji genotip-fenotip. Tako se rasvetljavaju postojeće i nastaju nove biološke hipoteze o nastanku, razvoju i lečenju premalignih i malignih stanja.

Hematološke maligne bolesti su do skora standardno dijagnostikovane i klasifikovane na osnovu morfologije ćelija, ekspresije površinskih ćelijskih markera, imunohistohemijskih i citogenetičkih promena, na osnovu rezultata patohistoloških nalaza, mijelograma i *in vitro* ćelijskih kultura prethodnika hematopoeze. Poslednjih godina posebno se ističe značaj gena i genskih mutacija u razvoju malignih bolesti krvi. Mnogi molekularni markeri postaju dijagnostički parametri, a molekularno genetičke metode, neophodne dijagnostičke procedure.

Koristeći ovo saznanje, postavljeni su principi savremene dijagnostike i klasifikacije malignih hematoloških bolesti (4) u kojima je evidentan značaj hromozomskih aberacija i genskih mutacija, odnosno molekularnih markera.

1.1. Hematopoeza

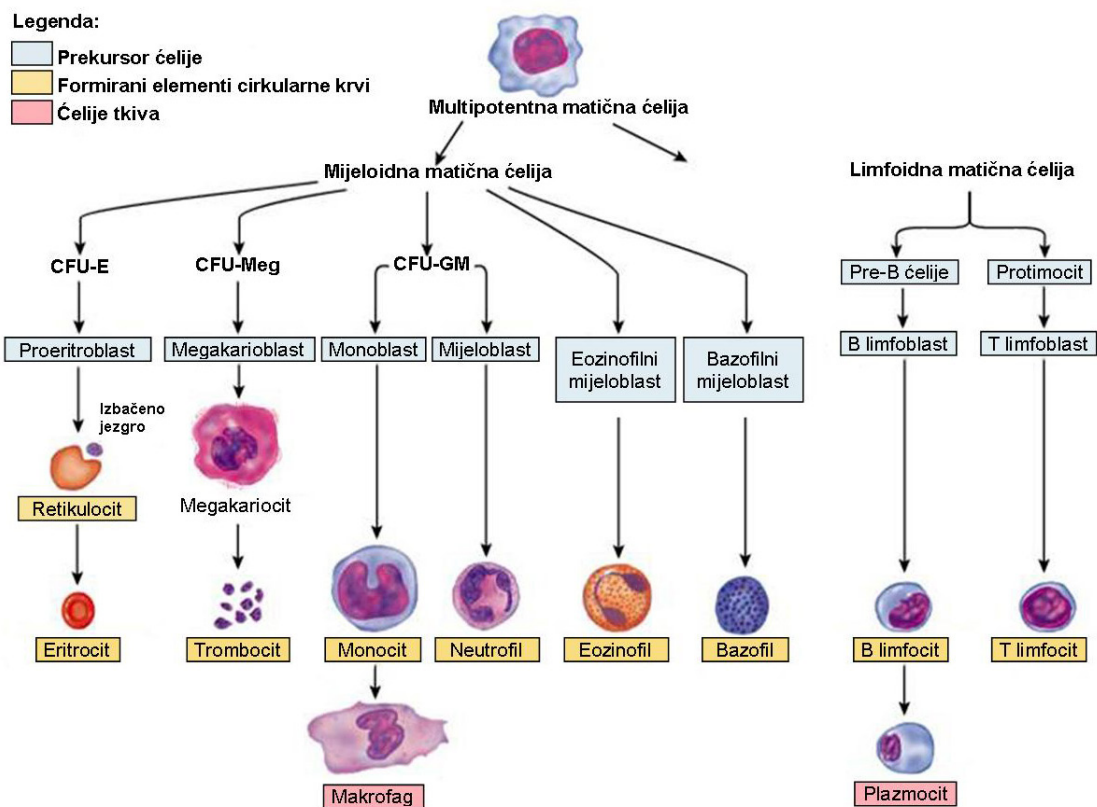
Hematopoeza je složen proces geneze zrelih ćelija krvi. Sve ćelije periferne krvi nastaju iz zajedničke multipotentne matične ćelije (MMC) hematopoeze interakcijom sa mikrosredinom koštane srži. Mikrosredinu koštane srži čine elementi strome, pomažuće ćelije i ćelijski produkti (5). Elementi strome su adventicijalne ćelije, fibroblasti, makrofagi, endotelijalne ćelije i adipociti. Pomažuće ćelije su limfociti i monociti, a ćelijski produkti su citokini, hematopoezni faktori rasta i komponente ekstraćelijskog matriksa.

U organizmu odraslih, hematopoeza se odvija u srži pljosnatih kostiju i poznata je kao medularna hematopoeza. U toku pojedinih hematoloških bolesti, hematopoeza se može odvijati i u organima u kojima se odvijala u stadijumu fetusa (u slezini, jetri i u delu koštane srži dugih kostiju). To je takozvana ekstramedularna hematopoeza. U normalnim, fiziološkim uslovima, iz matičnih ćelija hematopoeze nastaju ćelije svih krvnih loza kontinuirano, procesima ćelijskih deoba ili proliferacijom i procesom diferencijacije, odnosno sticanjem novih svojstava karakterističnih za jednu ćelijsku populaciju. Zrele krvne ćelije nastaju nizom maturacionih deoba, procesom koji se naziva opredeljivanje.

Iz MMC hematopoeze, dejstvom činilaca iz mikrosredine i pomenutim procesima, nastaju multipotentne ćelije mijelopoeze (eritropoeze, granulocito-monocitopoeze, megakariocitopoeze) i multipotentne ćelije limfopoeze (za B i T limfocite) (Slika 1). Iz ove dve loze potiču funkcionalno različiti tipovi ćelija (neutrofili, monociti/makrofage, bazofili, eozinofili, eritrociti, trombociti, mastociti, dendritične ćelije, B i T limfociti) (6).

Poznato je da postoje i dve vrste matičnih ćelija hematopoeze: dugotrajno i kratkotrajno repopulišuće. Dugotrajno repopulišuće matične ćelije hematopoeze su sposobne da prave sve ćelijske tipove tokom života jednog organizma, a ako se transplaciraju, zadržavaju ista svojstva (7). Kratkotrajno repopulišuće matične ćelije hematopoeze brzo obnavljaju ćelije mijeloidne i/ili limfoidne loze (8, 9). Mala grupa matičnih ćelija hematopoeze proizvodi prethodnike ili prekursore i zrele ćelije krvnih loza tokom života organizma.

Da bi se vršio kontinuirano proces hematopoeze, neophodno je da matične ćelije održavaju ravnotežu između stepena samoobnove i stepena diferenciranja (10). Tokom procesa samoobnove iz jedne matične ćelije nastaju jedna ili dve ćerke ćelije što obezbeđuje da se sačuva neophodan, stabilan broj matičnih ćelija. To govori da matične ćelije hematopoeze poseduju i proliferativni potencijal. Međutim, proliferativna aktivnost matičnih ćelija je mala (11). Najveći broj, preko 90% ovih ćelija, se nalazi u neproliferativnoj fazi ćelijskog ciklusa. Iz neproliferativne G_0 faze, matične ćelije ulaze u aktivan ćelijski ciklus da bi se nadoknadile ćelije koje su diferenciranjem izgubljene iz pula matičnih ćelija (11).



Slika 1. Šematski prikaz hematopoeze

Hematopoezne matične ćelije se karakterišu ekspresijom antigena na ćelijskim membranama. Najznačajnije obeležje ili marker matičnih ćelija je ekspresija CD34 antigena, takozvana CD34 pozitivnost (CD34+). Hematopoezne CD34+ ćelije su heterogena grupa ćelija koja se sastoji od multipotentnih prethodnika, opredeljenih prethodnika i frakcije matičnih ćelija. Svaka od ovih ćelija, pored CD34 pozitivnosti, ima i svoje specifične imunofenotipske osobine. Zahvaljujući ovoj karakteristici, matične ćelije se mogu prečistiti centrifugiranjem, prebrojati, obeležiti monoklonskim antitelima, obojiti, izdvojiti pomoću imunomagnetnih perli, a time i dalje istraživati.

Uprkos širokoj upotrebi, uloga CD34 molekula u hematopoezi je još uvek nedovoljno poznata. Opisana je njihova uloga u adheziji ćelija u procesu transplantacije (12). Humani i mišji CD34 molekuli su homologni i vrlo konzervativni u regionima koji su striktno odgovorni za kodiranje proteina (13), što daje mogućnost istraživanja molekula na modelu miša. U eksperimentalne svrhe koristi se sposobnost CD34+ ćelija da stvaraju kolonije u kratkotrajnim kulturama, kao i da održavaju dugotrajne *in vitro* ćelijske kolonije. Takođe, iz njih mogu nastati ćelije različitih krvnih loza hematopoeze u *in vivo* animalnim modelima. Zbog ovakvih osobina, CD34+ ćelije imaju veliku primenu u istraživanjima. Klinički

i eksperimentalni protokoli izdvajaju matične CD34+ ćelije različitim metodama izolacije, prečišćavajući ih i pripremajući za transplantaciju, gensku terapiju, kao i za moguću zame-nu i regeneraciju organa.

Opređeljene ćelije ili progenitori koji nastaju iz MMC sastoje se iz ćelija koje ima-ju sposobnost diferenciranja duž više ćelijskih linija (multipotentno opređeljene) ili jed-ne ćelijske linije (unipotentno opređeljene). One imaju mali kapacitet samoobnove, ali su mitotski aktivnije od matičnih ćelija. Najranije opređeljena mijeloidna ćelija koja stvara kolonije granulocita, eritrocita, monocita i megakariocita je zajednička i naziva se CFU-GEMM (*engl. Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythroid-Monocyte-Macrophage*) (11, 14). Međutim, u koštanoj srži se, pored matičnih i opređeljenih ćelija, nalaze i prethodnici pojedinih krvnih loza čija je morfologija definisana.

Poznato je da za eritroidnu lozu postoje dve klase morfološki prepoznatljivih pret-hodnika. Prva klasa je primitivnija i naziva se ranim prethodnicima, odnosno BFU-E (*engl. Burst Forming Unit-Erythroid*) i klasa zrelijih više diferenciranih, naziva se kasnim pret-hodnicima eritopoeze, odnosno CFU-E (*engl. Colony Forming Unit-Erythroid*).

Morfološke karakteristike prekursora eritropoeze pokazuju nagomilavanja prote-ina specifičnih za ćelije ove loze kao što je hemoglobin, a takođe i slabiju aktivnost jedra. Život eritrocita traje oko 120 dana od momenta kada pređu u perifernu krv, a nakon toga bivaju razgrađeni od strane makrofaga u slezini. Eritopoetin (EPO), faktor rasta za ćelije eritroidne loze, deluje prvenstveno na CFU-E prethodnike da bi podstakao njihovu proli-feraciju i razvoj eritroblasta (15, 16). Više od 80% CFU-E prethodnika ima EPO receptor (EPOR), dok mali broj BFU-E poseduje pomenute receptore. Preko svojih receptora EPO vrši uticaj na umnožavanje proeritoblasta i bazofilnih eritroblasta, dok se sazrevanje pome-nutih ćelija odigrava u odsustvu EPO faktora rasta.

Trombociti, kao i eritrociti, vode poreklo od zajedničkih megakariocitno-eritro-oidnih progenitora, odnosno od zajedničkih mijeloidnih progenitora (17). Prva ćelija pot-puno opređeljena za megakariocitnu liniju je CFU-Meg (*engl. Colony Forming Unit-Me-gakaryocyte*). Iz nje nastaju megakariociti, najkrupnije ćelije hematopoeze (dijametra od 50-100µm) koje sadrže veliko, multilobularno, poliploidno jedro (18). Megakariociti pod-ležu procesu endomitoze, pri čemu se umnožava njihova DNK, ali ćelije ne ulaze u anafazu i dalju citokinezu. Procesom sukcesivne deobe jedra, bez istovremene deobe citoplazme, dolazi do stvaranja megakariocita koji sadrže čak do 32 jedarna lobusa ili 64n hromozoma (18). Daljom deobom svaki megakariocit oslobađa približno 2000-3000 trombocita (19). Trombopoetin (TPO) je faktor rasta koji stimuliše produkciju megakariocita (20, 21). Fa-kori EPO i TPO pokazuju izvesnu homologiju polazeći sa N-kraja proteina što objašnjava izvesnu njihovu povezanost. Međutim, eritroidna i megakariocitna linija ne dele mnogo

zajedničkih proteina, niti faktora rasta specifičnih za njihovo diferenciranje.

Iz MMĆ hematopoeze nastaje pomenuta CFU-GEMM ćelija opredeljena za ćelije mijeloidne loze. U prisustvu faktora rasta: citokina SCF (*engl. Stem Cell Factor*), interleukina (IL-3, IL-6), faktora rasta CSF-GM (*engl. Colony Stimulating Factor-Granulocyte-Macrophage*) iz CFU-GEMM nastaju ćelije opredeljene za zajedničku granulocitno-monocitnu lozu ili CFU-GM (*engl. Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*) (14). Iz ovih ćelija daljim diferenciranjem nastaju prethodnici monocitnih i granulocitnih ćelija, da bi u završnoj fazi maturacionih deoba nastali monociti i sve tri vrste granulocita (neutrofilni, eozinofilni i bazofilni).

1.2. Mijeloproliferativne neoplazme

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) su klonalna oboljenja hematopoeznog tkiva koja nastaju usled bujanja ćelija jedne ili više različitih krvnih loza. Nekontrolisano bujanje ćelija može se odvijati u koštanoj srži i/ili ekstramedularnim organima sa skoro normalnim sazrevanjem. Ovoj grupi neoplazmi, po etiološkim i kliničkim karakteristikama, pripadaju slične bolesti koje se međusobno razlikuju po dominantnom tipu proliferišućih ćelija. Zajedničko za sve bolesti je da nastaju usled poremećaja u MMĆ koštane srži ili matičnoj ćeliji mijeloidnih loza (CFU-GEMM). Ekstramedularna hematopoeza postoji skoro u svim MPN, a pojedine bolesti se međusobno razlikuju po intenzitetu bujanja pojedinih krvnih ćelija i fibroblasta (22).

Otkrića koja su imala istorijski značaj za rasvetljavanje činjenica vezanih za dijagnostiku, klasifikaciju i lečenje MPN bila su sledeća (23):

- Prekretnica u nizu saznanja predstavlja klasifikacija iz 1951. godine (24) koja je podrazumevala da grupu mijeloproliferativnih bolesti (MPB), kako su se tada zvale MPN čine: hronična mijeloidna leukemija (HML), policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET), primarna mijelofibroza (PMF) i eritroleukemija (EL).
- 1960. godine otkriven je Ph hromozom, specifičan citogenetički marker za HML (2).
- Pomoću testa X-vezanog polimorfizma za genski lokus glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PD), 1967. godine je potvrđeno da je HML klonalna bolest matične ćelije hematopoeze (25). Usledili su slični testovi kojima je dokazana klonalna priroda PV (26), a zatim i PMF (27) i ET (28).
- Detaljnije objašnjenje porekla Ph hromozoma, usledilo je 1973. godine (3). Od tada se klasifikacija MPB bazirala na činjenici da je Ph hromozom citogenetički marker isključivo vezan za razvoj HML. Mijeloproliferativne bolesti su se neformalno klasifikovale u Ph pozitivnu ili HML i Ph negativne, sve ostale bolesti (PV, ET, PMF i EL). To je podra-

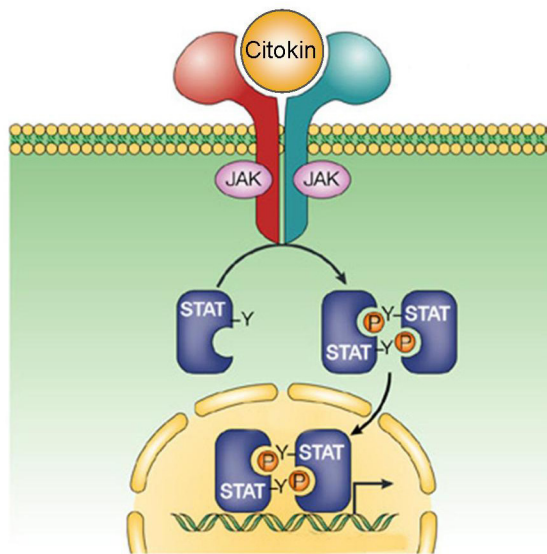
zumevalo obaveznu primenu konvencionalne citogenetičke analize u dijagnostici MPN. Razvojem molekularne biologije i primenom tehnika molekularne genetike, otkrivena je onkogeni uloga *BCR/ABL* fuzionog gena u razvoju HML (3). Uvedeni su precizniji terminološki pristupi, pa su se MPB delile na *BCR/ABL*-pozitivnu leukemiju (HML) i *BCR/ABL*-negativne bolesti (sve ostale).

- 1996. godine otkriven je imatinib (mezilat-2-fenilaminopirimidin), lek koji funkcioniše po principu inhibitora aktivnog mesta u *ABL* domenu fuzionog *BCR/ABL* gena (29). To je bila prekretnica u terapijskom pristupu MPN.
- 2005. godine u četiri nezavisne laboratorije došlo je do spoznaje da većina bolesnika sa *BCR/ABL*-negativnim bolestima u mijeloidnim ćelijama ima tačkastu mutaciju V617F u genu *JAK2* (30-33). Ovim otkrićem, otpočela je "era mutacije" *JAK2* (22) odnosno, intenzivirani su naučno istraživački radovi u domenu promena na genima iz familije Janus kinaze kako bi se, analogno HML, pronašao lek sličan imatinibu koji bi funkcionisao po principu inhibicije patološkog gena. Razvojem citogenetike, molekularne citogenetike i drugih molekularno genetičkih analiza, intenzivno je ispitivana uloga hromozomskih aberacija i mnogih gena u leukemogenezi MPN. Utvrđeno je da su neke od hromozomskih aberacija više zastupljene u ovim nego u drugim hematološkim bolestima, a izmenjeni oblici nekih gena postali su prepoznatljivi za pojedine entitete MPN.

1.2.1. Molekularna regulacija mijelopoze

Da bi se proces mijelopoze normalno odvijao potrebna je adekvatna transdukcija signala od odgovarajućih liganda, preko ćelijskih receptora do ciljnih molekula, koji će na signal odgovoriti ekspresijom određenih gena. Jedan od takvih puteva ćelijske transdukcije direktno zavisi od aktivacije intraćelijskih kinaza, nazvanih janus kinaze (*engl.* JAK- Just Another Kinase).

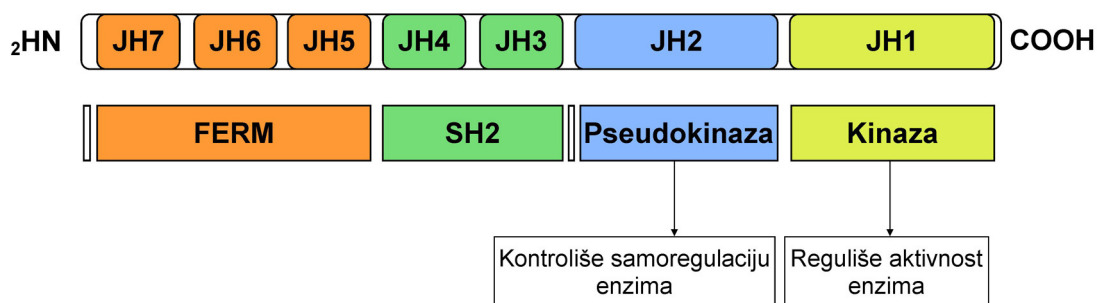
JAK molekuli pripadaju familiji nereceptorskih tirozin kinaza koje su u sprezi sa citokinim receptorima na ćelijskim membranama. Prenose signale nizvodno od membranskih receptora do jedra, posredstvom signalnih prenosioca i regulatora transkripcije, STAT (*engl.* Signaling Transducer and Activator of Transcription) molekula. Tako nastaje JAK-STAT signalni put (34, 35) preko koga se signal od citokinih receptora do ciljnih sekvenci na molekulu DNK, prenosi transduksijski preko JAK-STAT kaskada (Slika 2).



Slika 2. Šematski prikaz funkcije janus kinaza.

Put prenošenja signala aktivacijom JAK kinaza je relativno jednostavan, ima mali broj komponenti, dobro je definisan i specifičan je za svaki od receptorskih liganda. Međutim, kod ovog, kao i kod drugih puteva direktne signalizacije, postoji mogućnost dodatne signalizacije ili amplifikacije signala aktiviranjem drugih, manje specifičnih signalnih komponenti (cAMP aktivacija, paralelna intracelularna aktivacija Ras zavisnog puta transdukcije, aktivacija fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K), aktivacija struktura citoskeleta, kao i aktivacija transporta preko aktina) (36).

Identifikovana su četiri člana JAK familije: JAK1, JAK2, JAK3 i Tirozin kinaza 2 ili Tyk2. Naziv Janus (*lat.* Ianus) potiče od imena rimskog Boga početka i kraja, Božanstva sa dva lica (37), što znači da se u strukturi enzima razlikuju dva simetrična kraja. Svi članovi JAK familije poseduju sedam homologih domena (*engl.* JH-JAK Homology) organizovana u četiri regiona: kinazni domen-JH1, regulatorni pseudokinazni domen-JH2, SH2 i FERM domen (Slika 3). Na C-kraju JAK molekula nalazi se JH1 domen koji ima tirozin kinaznu aktivnost. Pseudokinazni domen JH2 je strukturno sličan tirozin kinazi, esencijalan je za normalnu aktivnost enzima iako je sam ne poseduje. Ovaj domen reguliše aktivnost JH1 domena preko inhibitorne uloge koju ispoljava. U normalnim fiziološkim uslovima, negativno reguliše kinaznu funkciju JAK2 kinaze (38, 39). Domeni JH3-JH4 strukturno predstavljaju SH2. Amino terminalni kraj JAK proteina obuhvata homologe od JH5 do JH7, naziva se FERM domen i odgovoran je za asocijaciju JAK kinaze sa citokinim receptorima i sa drugim enzimima.

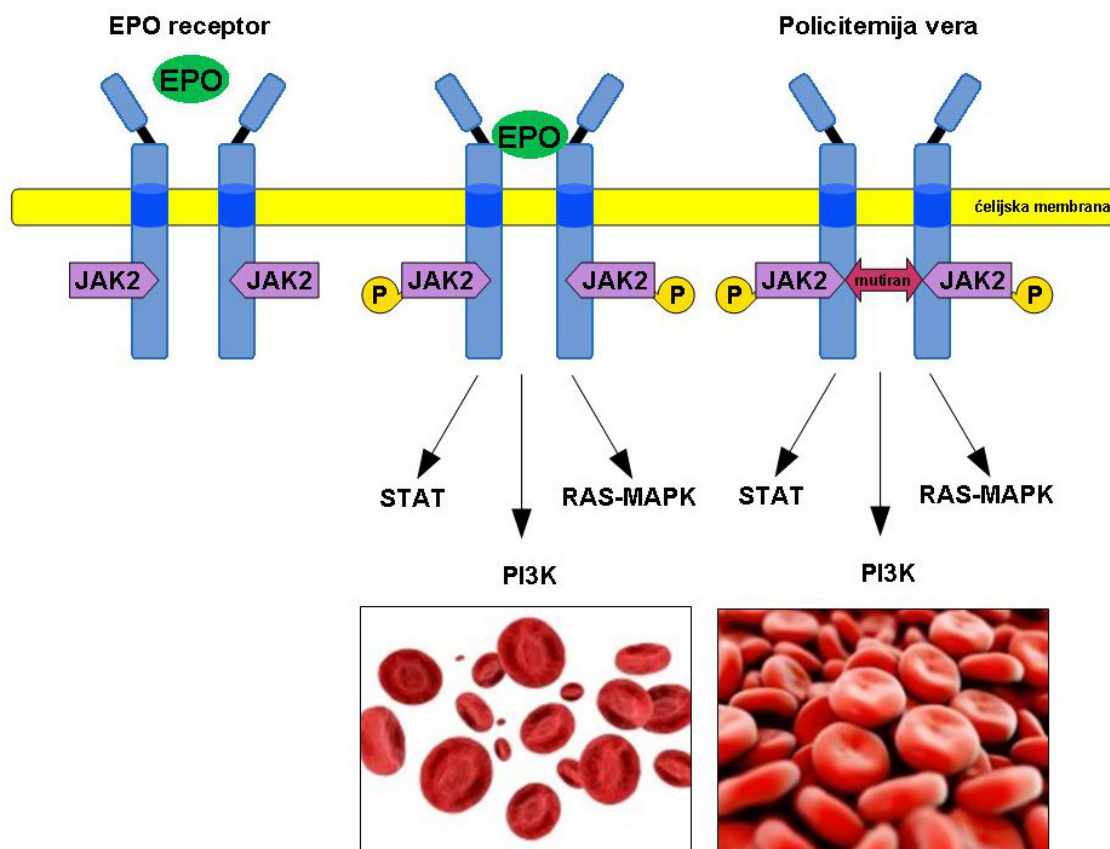


Slika 3. Šematski prikaz JAK familije tirozin kinaza

Pošto su JAK kinaze neposredno u vezi sa intraćelijskim domenima membranskih receptora, nakon vezivanja liganda dolazi do oligomerizacije ili konformacione promene JAK molekula. Stvara se njegova "kritična gustina", dolazi do autofosforilacije janus kinaze koja fosforiliše ostatke receptorskih domena i zatvara krug citokine aktivacije. Molekuli kao što su STAT, mitogen-aktivni kinazni protein (MAP) i PI3K aktiviraju se, dimerizuju i translociraju u jedro. Vezuju se za promotorne sekvence ciljnih gena i iniciraju njihovu transkripciju (37). Ceo proces je regulisan i kontrolisan na više nivoa od strane proteinskih tirozin fosfataza, supresora citokine signalizacije (*engl.* SOCS-Suppressors Of Cytokine Signaling) i inhibitora STAT molekula (40, 41).

Do sada je poznato šest članova STAT familije proteina. Kodiraju ih istoimeni geni i označeni su od STAT1-6, pri čemu STAT5 ima dva izotopa, a i b (34, 35). U citoplazmi su neaktivni STAT molekuli prisutni kao monomeri koji se odvajaju posle fosforilacije i dalje u citoplazmi grade homo i heterodimere kao što su STAT1, STAT2 i STAT3. U hematopetskim putevima regulacije, u kojima glavnu ulogu imaju interleukin 3 (IL-3) i GM-CSF, aktivne su JAK2 kinaze i molekuli STAT5 i STAT6; za delovanje G-CSF potrebni su JAK1 i JAK2 i STAT3, a za delovanje EPO aktivni su JAK2 i STAT5, STAT3 i STAT1 (42-45). Koja će se od JAK-STAT kaskada generisati i aktivirati zavisi od tipa citokina koji se vezuje za receptor.

Kod mijeloproliferativnih neoplazmi, usled somatskih mutacija na genima koji kontrolišu proces mijelopoeze, dolazi do geneze neadekvatnih transdukcijskih JAK-STAT kaskada. U tom slučaju izostaje povratni, indukcijski signal i ćelija kontinuirano proliferiše. Kod bolesnika sa PV registrovano je aktiviranje molekula DNK preko kaskada JAK2-STAT3, dok konstitutivna aktivnost STAT1 i STAT5 nije registrovana (Slika 4). Takođe, ovi bolesnici imaju potpuni nedostatak MPL receptora za trombopoetin i nije moguć prenos signala TPO (46, 47). Snižen nivo ekspresije konstitutivnog MPL receptora registrovan je i kod bolesnika sa ET (48).



Slika 4. Šematski prikaz signala faktora rasta preko JAK-STAT kaskada u fiziološki normalnim uslovima i u MPN-policitemiji veri

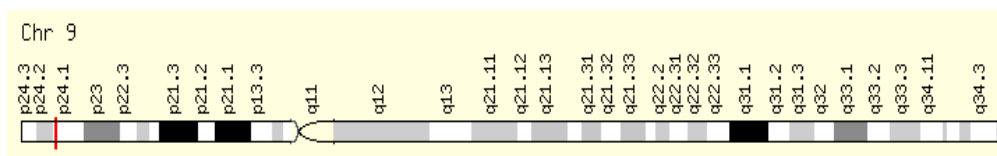
1.2.2. Somatske mutacije u mijeloproliferativnim neoplazmama

Kao što je već pomenuto, prva značajna otkrića iz oblasti molekularne patogeneze MPN desila su se 2005. godine. Registrovane su promene na genu koji kodira sintezu JAK2 enzima. Otkrićem tačkaste mutacije V617F, otpočela je ekspanzija istraživačkih poduhvata divljeg tipa *JAK2* gena, mutiranih alela i njihovih proteinskih produkata.

James i saradnici, kultivisanjem ćelija iz periferne krvi bolesnika sa PV, uočili su da je pomenuta mutacija bila prisutna u ćelijama mijeloidne loze (granulocitima, eritroblastima i trombocitima) nastalim iz CD34+ progenitora, dok su T ćelije bile bez mutacije (31). To dokazuje da je molekularna promena, mutacija V617F leukemogeni događaj, direktno vezan za genezu MPN. Do sličnih otkrića došlo se i u drugim laboratorijama (30,32,33). Takođe je pokazano, da je korišćenjem JAK2 kinaznih inhibitora i inaktivacijom ekspresije *JAK2* gena pomoću RNK fragmenata, takozvanom siRNK tehnologijom, moguće sprečiti formiranje EPO-nezavisnih eritroidnih kolonija kod PV (31). Ovo je dalje vodilo ka sekvenciranju i otkriću mutacije na *JAK2* genu u JH2 pseudokinaznom domenu. Identifiko-

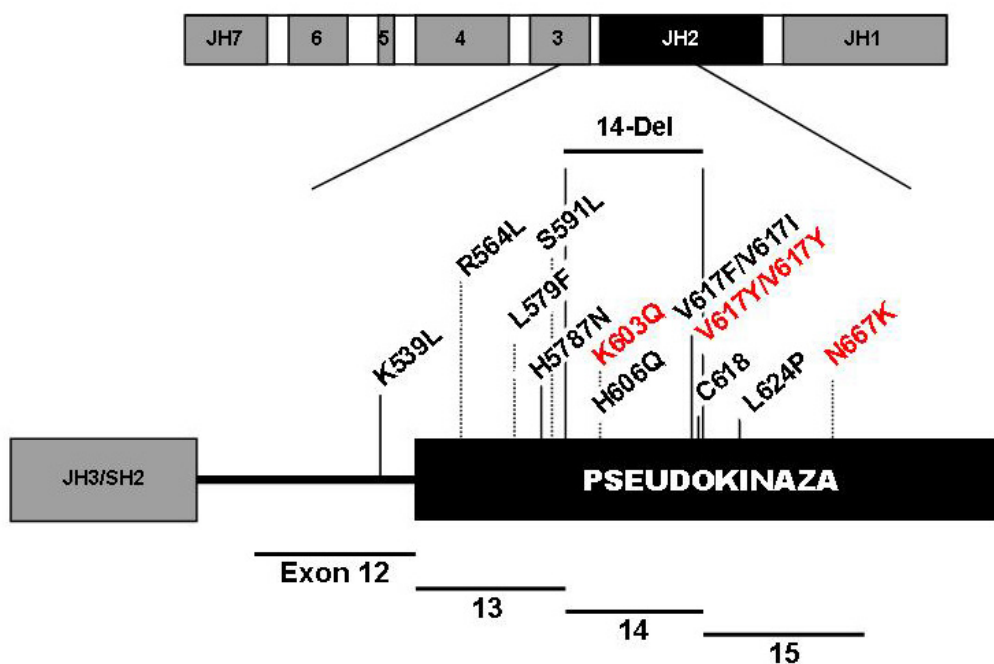
van je gubitak heterozigotnosti regiona na kratkom kraku hromozoma 9 (9p24.1) i otkriven region od 6.2 Mbp (32), zajednički za sve pacijente sa MPN, uključenih u analizu (Slika 5). Gubitak heterozigotnosti (9pLOH) je bio najviše izražen kod bolesnika sa PV (49). Daljim ispitivanjem regiona, konstatovano je da se na njemu nalazi gen za JAK2 kinazu.

9p24.1



Slika 5. Genomska lokacija *JAK2* gena: hromozom 9p24.1 (50)

Mutacija *JAK2*V617F je stečena somatska mutacija koju karakteriše zamena nukleotida G nukleotidom T na poziciji 1849 (c.1849G>T) u egzonu 14 *JAK2* gena (32, 33, 51, 52). Na proteinskom nivou ova promena dovodi do zamene aminokiselina; valin prelazi u fenilalanin na poziciji 617 (p.Val617Phe) (53, 54) (Slika 6). Strukturna pozicija valina je na gornjoj površini N-terminalnog lobusa JH2 domena. Zamenom valina dosta većim fenilalaninom, destabilizuje se konformacija JH2 domena koji ima autoinhibitornu ulogu (38, 51-53). Ovim se omogućuje konstantna aktivnost proteina, tako da ćelije postaju osjetljivije na faktore rasta. Na taj način prisustvo mutacije donosi proliferativnu prednost ćelijama nosiocima, izazivajući klonalnu ekspanziju.

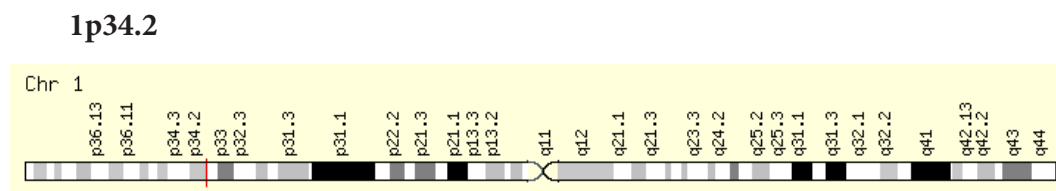


Slika 6. Šematski prikaz *JAK2* gena i proteina. Na proteinu su označene proučavane mutacije (crvenom bojom su obeležene kontrolne mutacije, a crnom mutacije pronađene kod bolesnika sa MPN)

Mutacija *JAK2V617F* je najviše prisutna kod bolesnika sa PV (oko 95%), dok je kod bolesnika sa ET i PMF njena učestalost oko 50% (54-56). Registrovane su i druge mutacije koje nastaju kao posledica rearanžmana na hromozomu 9. Kod bolesnika koji nemaju promenu *JAK2V617F*, detektovane su mutacije *JAK2* najčešće u egzonu 12. Visoku učestalost mutacija *JAK2* u egzonu 12, predstavljaju mutacije nastale delecijom i insercijom hromatina. Registrovane su i "missense" i tandem tačkaste mutacije: del/F537-K539ins/L i del/N542-E543 i K539L i H538KK539L (54, 57, 58). Dok se mutacija *JAK2V617F* ispoljava obično u homozigotnom obliku, mutacije egzona 12 su često ispoljene u heterozigotnom obliku kod bolesnika sa PV (54). Otkrivene su mutacije i u egzonima 13, 14 i 15 *JAK2* gena, koje potencijalno mogu biti odgovorne za leukemogeni proces u MPN.

Iako identifikacija aktivnih *JAK2* mutacija predstavlja veliki napredak u razumevanju molekularne patologije MPN, nameće se i dalje pitanje: kako jedna mutacija može da dovede do razvoja heterogene kliničke slike, odnosno do geneze različitih entiteta MPN? Još uvek je nejasno koji su molekularni mehanizmi odgovorni za široki spektar istih kliničkih karakteristika kod *JAK2V617F*-pozitivnih i *JAK2V617F*-negativnih podtipova MPN.

Jedan od bitnih gena za mijelopoezu je i *MPL* gen. Lociran je na kratkom kraku hromozoma 1 u regionu p34.2 (Slika 7) i kodira sintezu MPL receptora.



Slika 7. Genomska lokacija *MPL* gena: hromozom 1p34.2 (59)

Aktivnost ovog receptora, kao i liganda TPO, je veoma izražena u ranim hematopoetskim progenitorima i u ćelijama megakariocitne loze. Najčešće somatske mutacije koje pogađaju *MPL* gen su W515L (na proteinskom nivou dovodi do supstitucije triptofana leucinom) i W515K (na proteinskom nivou dovodi do supstitucije triptofana lizinom) (60). Kao što je slučaj sa *JAK2V617F* i ove mutacije se ispoljavljaju u ranim mijeloidnim progenitorima. Registrovane su u *JAK2V617F*-negativnim podtipovima MPN sa učestalošću od 5% do 11% kod bolesnika sa PMF (60, 61) i više od 9% kod bolesnika sa ET (62, 63).

Na osnovu eksperimenata vršenim na miševima, dokazano je da se kod ćelija nosioca mutacije *MPLW515L* izaziva citokin-nezavisna hipersenzitivnost na TPO, kao i konstitutivna aktivacija jednog od alternativnih puteva signalne transdukcije JAK-STAT/ERK/Akt, što dovodi do razvoja bolesti slične PMF (64).

Mutacije gena *MPL* koje su takođe registrovane u MPN su: *MPLW515S*, *MPLW515A* i *MPLS505N*, *MPLA506T*, *MPLA519T*. Uočena je njihova ekspresija u grupi bolesnika sa oblikom familijarne trombocitoze, pa se smatra da su ove mutacije direktno odgovorne za kliničku manifestaciju ove nasledne bolesti (64).

Interesantno je da su poslednjih godina registrovani sličajevi obolelih od MPN sa ekspresijom višestrukih mutacija na *MPL* genu, kao i bolesnici sa koekspresijom *JAK2V617F* i nekog od mutiranih *MPL* genskih alela (63, 65, 66).

Kod MPN koje se karakterišu hiper produkcijom eozinofila, registrovane su mutacije gena za receptor faktora rasta trombocitnog derivata, PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor). Postoje dva podtipa PDGFR receptora i dva različita kodirajuća gena. Alfa podtip PDGFR receptora kodira gen koji se nalazi na dugom kraku hromozoma 4 u regionu q12 (4q12). Najčešća i najpreciznije opisana mutacija je gubitak hromatina od 800kb u egzonu 12 *PDGFRα* gena. Krajnji ishod mikroleucije je *FIP1L1/PDGFRα* fuzioni gen (67). Time se gubi autoinhibitorna funkcija signal zavisnog PDGFRα receptora, a novonastali fuzioni gen kodira sintezu proteina koji ispoljava autonomnu tirozin kinaznu aktivnost i dovodi do nekontrolisane proliferacije eozinofilnih progenitora (63). Eksperimentalno je i potvrđeno da ćelije koje su sadržavale *FIP1L1/PDGFRα* gen, prethodno *in vitro* kultivisane, indukovale su intenzivnu proliferaciju eozinofila kod transplantiranih miševa (67).

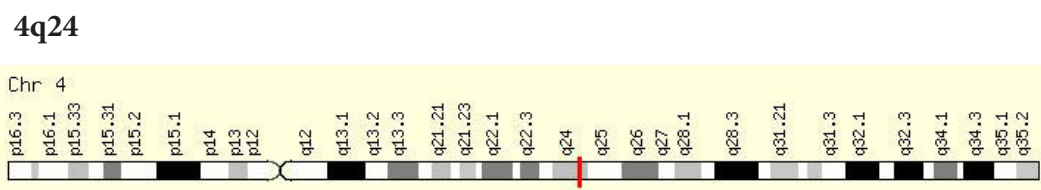
Kod hipereozinofilnih neoplazmi, registrovane su i translokacije hromozoma 4 sa homologim hromozomom t(4;4)(q12;q12) i hromozomom 1 t(1;4)(q44;q12) koje takođe dovode do izmena u egzonu 12 *PDGFRα* gena (67).

Beta tip PDGFR receptora kodira *PDGFRβ* gen, lociran na hromozomu 5 u regionu q31-32. Uočena je povezanost ekspresije ovog gena sa genima koji pokazuju onkogeni potencijal u eozinofilnim neoplazmama, ali daju pozitivan odgovor na terapiju imatinibom. Gen *PDGFRβ* može da fuzioniše sa različitim "partner" genima, ali je načešća fuzija sa *ETV6* (*TEL*) genom koji se nalazi na hromozomu 12, u regionu p13. Ovaj gen kodira transkripcioni faktor koji je bitan u procesu hematopoeze (68). Translokacijom hromozoma 5 i 12 t(5;12)(q33;q13) nastaje fuzioni *PDGFRβ/ETV6* gen koji eksprimira onkogeni potencijal. PDGFRβ receptor gubi autoinhibitorno svojstvo, postaje signalno nezavisan, aktivira jedan od konstitutivnih puteva ćelijske signalne transdukcije i dovodi do nekontrolisane klonalne proliferacije (69).

Mutacija koja je registrovana u retkom podtipu MPN, sistemske mastocitozi (70) je tačkasta mutacija D816V koja pogađa katalitički domen *KIT* gena. Gen je lociran na hromozomu 4 u regionu q12 i kodira sintezu tirozin kinaznog receptora (c-KIT), važnog

u strukturi matičnih ćelija hematopoeze. Preko c-KIT receptora, transdukuje se citokini signal i omogućava diferenciranje mastocitnih ćelija od primitivnih progenitora (71). Eksperimentalno je dokazano da mutacija D816V dovodi do signal nezavisnog diferenciranja mastocitnih ćelija, aktivirajući STAT5/PI3K/Akt signalni put i izazivajući fenotipsku ekspresiju sličnu simptomatologiji humane sistemske mastocitoze (72).

Mutacije *TET2* gena i njihov leukemogeni potencijal otkriven je kod bolesnika sa MPN, mijelodisplastičnim sindromom (MDS) i akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) (73). Do otkrića onkogene forme *TET2* gena došlo se indirektno, *in vitro* kultivisanjem progenitornih ćelija bolesnika sa dijagnozom PV i registrovanom mutacijom JAK2V617. Kod većine ovih bolesnika (oko 85%) zapažena je ekspanzija progenitornih ćelija koje su ispoljavale pozitivnost antigena CD34+ i CD38+ na račun multipotentnih progenitora sa imunofenotipom CD34+ i CD38-. Kod manjeg broja ovih bolesnika (oko 15%) zapaženo je suprotno ponašanje progenitornih kultura. Nezrele, multipotentne progenitorne ćelije (CD34+, CD38-), bile su u dominaciji u odnosu na zrelije progenitore (CD34+, CD38+) (73). Hipotetički se razmatrala mogućnost nove genetičke abnormalnosti koja bi bila uzrok imunofenotipske različitosti dve populacije bolesnika. Ista grupa istraživača dokazala je, kod 3 od 5 JAK2V617F-pozitivnih bolesnika sa PV i ekspanzijom CD34+ i CD38- ćelija, gubitak heterozigotnosti na hromozomu 4 u lokusu q24. (Slika 8) (74). Kod jednog bolesnika uočena je delecija genoma od 325 kB što je odgovaralo gubitku funkcije *TET2* gena (73). Usledilo je sekvenciranje i identifikacija mutacija *TET2* u MPN. Mutacije na genu *TET2* mogu biti "missense", "nonsense" i "frameshift" i eksprimiraju se u slučaju gubitka heterozigotnosti (75).



Slika 8. Genomska lokacija *TET2* gena: hromozom 4q24 (74)

TET2 gen pripada familiji *TET* gena (*TET1*, *TET2*, *TET3*). Ovi geni kodiraju sintezu proteina koji su po strukturi slični enzimima tripanozome (JBP1 i JBP2) za koje se zna da katalizuju oksidaciju 5-metil grupe timina.

Funkcija gena *TET2* nije dovoljno poznata, ali se zna da predstavlja, epigenetički odbrambeni sistem matične ćelije hematopoeze. Proteini familije *TET* gena su po svojoj katalitičkoj funkciji zavisne dioksidaze koje u strukturi sadrže Fe²⁺ i α-ketoglutarat. Katališu sukcesivne oksidacije od molekula 5-metilcitozina (5mC), preko 5-hidroksimetilcitozina

(5hmC), 5-formilcitozina (5fC), sve do 5-karboksicitozina (5caC) kojeg prepoznaje i iseca DNA reper, timin-DNA glikozilaza (TDG) (76).

Dugo se smatralo da je mutacija *JAK2V617* ključni momenat u leukemogenezi MPN. Otkrićem tumor supresor gena *TET2* stavovi su izmenjeni u korist onkogenog potencijala mutiranog *TET2* gena. Činjenice da se *TET2* gen eksprimira u CD34+ progenitornim ćelijama i da se mutirani oblici *TET2* gena mogu registrovati u različitim mijeloidnim neoplazmama, sugerišu pretpostavku da su *TET2* mutacije rani događaj u patogenezi MPN (75). Inicijalna istraživanja klonalnosti i udruženosti mutacija *TET2* i *JAK2V617* kod bolesnika sa MPN, pokazala su postojanje klonova sa koegzistencijom mutiranih oblika: *TET2*-mutiran/*JAK2V617* i *TET2*-mutiran/*JAK2*-divlji tip, ali nije registrovan klon *TET2*-divlji tip/*JAK2V617*. Rezultati ovog istraživanja jasno podržavaju hipotezu da mutacije *TET2* gena predstavljaju značajan "pre-*JAK2*" događaj u patogenezi mijeloidnih neoplazmi (73).

1.2.3. Klasifikacija mijeloproliferativnih neoplazmi

Klasifikacija MPN se konceptualno menjala. William Dameshek 1951. godine je prvi prepoznao proliferaciju mijeloidnih ćelija poreklom iz koštane srži, kao zajedničku karakteristiku nekih entiteta i nazvao ih mijeloproliferativnim bolestima (MPB) (24). Od tada, nizala su se otkrića iz oblasti citogenetike, imunologije, molekularne biologije itd., koja su omogućila preciznije sagledavanje mehanizama nastanka i razvoja bolesti. Postavljani su novi dijagnostički kriterijumi, data je mogućnost diferencijalnom pristupu naizgled istim, ali ipak različitim entitetima, a time je postojala neophodnost ka novim klasifikacionim pristupima MPN.

Otežavajuća okolnost dijagnostike, pa i klasifikacije ovih bolesti, je što su po simptomatologiji i kliničkom toku veoma slične. Osim toga, postoji mogućnost prelaska jednog oblika u drugi. To se naročito odnosi na ET i PV koje nekada prelaze u PMF, viši stupanj hronične faze.

Prva klasifikacija koja polazi od kliničkih, laboratorijskih, ali i od citogenetičkih i molekularnih parametara, je klasifikacija SZO iz 2001. godine (77). Po ovoj klasifikaciji MPN su podgrupa velike grupe različitih bolesti koje predstavljaju mijeloproliferativne neoplazme, hronične i akutne.

Grupu MPN čine:

- hronična mijeloidna leukemija [Ph hromozom, t(9;22)(q34;q11), *BCR/ABL*-pozitivna]
- esencijalna trombocitemija
- policitemija vera

- primarna mijelofibroza ili hronična idiopatska mijelofibroza (sa ekstramedularnom hematopoezom)
- hronična neutrofilna leukemija
- hronična eozinofilna leukemija i hipereozinofilni sindrom
- hronične mijeloproliferativne bolesti nespecifične ili neklasifikovane.

Ove bolesti predstavljaju tipične MPN. Međutim, po pomenutoj klasifikaciji u grupi mijelodisplastičnih/mijeloproliferativnih bolesti nalaze se bolesti koje po kliničkim i dijagnostičkim kriterijumima mogu predstavljati atipične MPN:

- atipična hronična mijeloidna leukemija
- mijelodisplastične/mijeloproliferativne bolesti, neklasifikovane

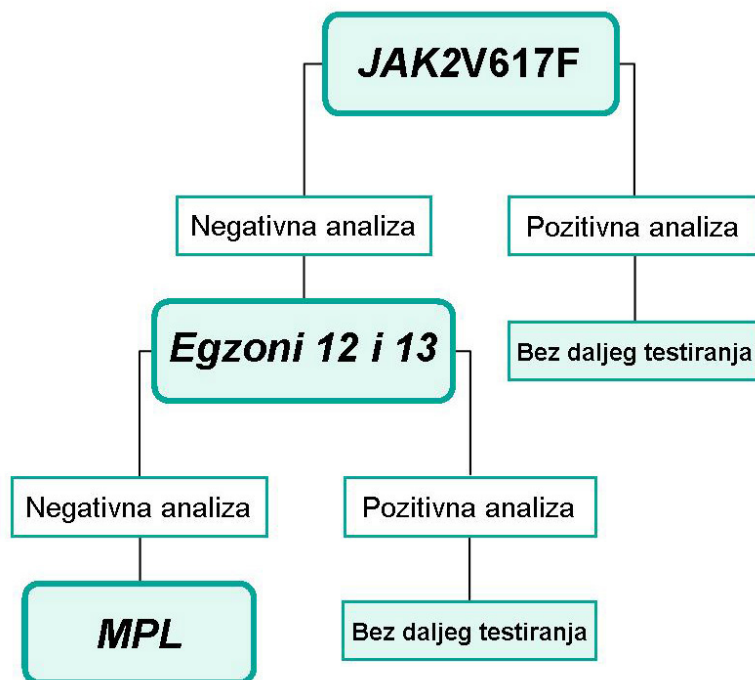
Do klasifikacije SZO iz 2001. godine značaj citogenetičke i molekularno genetičkih analiza je bio dijagnostički. To se pre svega odnosilo na detekciju Ph hromozoma i klasifikaciju HML i Ph-negativnih ili *BCR/ABL*-negativnih entiteta. Od 2001. godine izdvojili su se novi citogenetički, a pre svega molekularni markeri koji imaju i dijagnostički i prognozni značaj za MPN.

Svetska zdravstvena organizacija je 2008. godine izvršila reviziju klasifikacije hematoloških malignih bolesti (4). Do tada aktuelan naziv hronične mijeloproliferativne bolesti, izmenjen je u hronične mijeloproliferativne neoplazme (HMB→HMN) koje predstavljaju jednu od pet podgrupa mijeloidnih neoplazmi (Tabela 1).

Tabela 1. Šema klasifikacije mijeloidnih neoplazmi po preporukama SZO iz 2008 (78):

1. Mijeloproliferativne neoplazme
1.1. Hronična mijeloidna leukemija, <i>BCR/ABL</i> -pozitivna HML
1.2. Policitemija vera (PV)
1.3. Esencijalna trombocitemija (ET)
1.4. Primarna mijelofibroza (PMF)
1.5. Hronična neutrofilna leukemija (HNL)
1.6. Hronična eozinofilna leukemija (HEL)
1.7. Mastocitoza
1.8. Mijeloproliferativne neoplazme neklasifikovane (MPNn)
2. Mijeloidne i limfoidne neoplazme sa eozinofilijom i mutacijama <i>PDGFRα</i>, <i>PDGFRβ</i> ili <i>FGFR1</i>
3. Mijelodisplastični sindrom/Mijeloproliferativne neoplazme (MDS/MPN)
3.1. Hronična mijelomonocitna leukemija (HMML)
3.2. Juvenilna mijelomonocitna leukemija (JMML)
3.3. Atipična hronična mijeloidna leukemija, <i>BCR-ABL</i> negativna
3.4. MDS/MPN, neklasifikovane
4. Mijelodisplastični sindrom (MDS)
5. Akutna mijeloidna leukemija (AML)

Aktuelnom klasifikacijom iz 2008. godine definisani su novi dijagnostički kriteriji, molekularni markeri, karakteristični za pojedine entitete MPN (79,80). Pored konvencionalnih analiza, predložen je skrining mutacija najčešćih u grupi MPN (Tabela 1) (37), a u grupi *BCR/ABL*-negativnih (PV, ET, PMF) bolesti obavezan skrining mutacija na genima *JAK2* i *MPL* (Slika 9).



Slika 9. Algoritam testiranja molekularnih markera u *BCR/ABL*-negativnim MPN

1.3. Primarna mijelofibroza

Primarna mijelofibroza je hronična, maligna hematološka bolest, koja se karakteriše leukoeritroblastnom krvnom slikom, anizopoikilocitozom eritrocita u obliku suze, tzv. dakrocitozom, različitim stepenom fibroze koštane srži i hepatosplenomegalijom usled ekstramedularne hematopoeze (81-83). Bolest se karakteriše i povećanom gustinom krvnih sudova u koštanoj srži i mobilizacijom hematopoetskih progenitornih i matičnih ćelija u perifernu krv (82, 83). Prvi put bolest je prepoznata kod dva bolesnika koja su ispoljavala simptome mijelofibroze i ekstramedularne hematopoeze u jetri i slezini, a kasnije je bolest opisana kao poseban entitet (23). Preko četrdeset različitih naziva je korišćeno ili preporučeno za ovu bolest, kao što su: agnogeni mijeloidna metaplazija, idiopatska mijelofibroza, mijelofibroza sa mijeloidnom metaplazijom, splenična mijelozna, megakariocitna splenomegalija, osteomijeloretikuloza i mnogi drugi. Međunarodna radna grupa za istraživanje i

lečenje ove bolesti, postigla je 2006. godine dogovor da se isključivo koristi naziv primarna mijelofibroza (84).

1.3.1. Epidemiologija primarne mijelofibroze

Incidenca nastanka PMF je od 0.3 do 1.5 obolelih na 100 000 stanovnika (85). Prosečna starost bolesnika je 60 godina, a kod oko 10% obolelih PMF je dijagnostikovana pre četrdeset pete godine života (86). Prosečno vreme preživljavanja obolelih je oko 5 godina. Češće oboljevaju muškarci (82), a po nekim podacima bolest se javlja sa istom učestalošću kod oba pola (87). Registrovani su slučajevi PMF i kod dece, ali sa različitim kliničkim tokom i značajno dužim vremenom preživljavanja nego kod odraslih (88).

1.3.2. Etiologija i patogeneza primarne mijelofibroze

Etiologija bolesti je nepoznata. Kao i druge mijeloproliferativne neoplazme, PMF je klonalno oboljenje što je potvrđeno prisustvom istog oblika izoenzima G-6-PD u ćelijama eritrocitne, granulocitne i megakariocitne loze. Utvrđeno je da postoji povećana učestalost PMF kod osoba koje su izložene dejstvu jonizujućeg zračenja i benzena (11). Virus i estrogeni se takođe navode kao mogući etiološki činioci (89). Takođe, veća je učestalost PMF kod obolelih od sistemskih, autoimunih bolesti kao što je sistemski lupus eritematodes (81).

Patohistologija

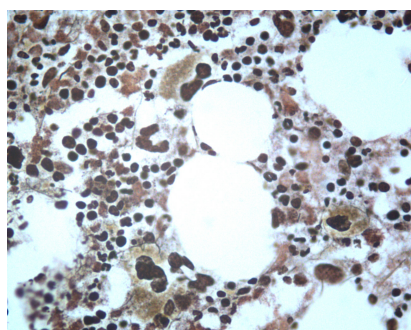
Jedna od karakteristika ove bolesti je i poliklonalnost fibroblasta. Fibroza koštane srži je reaktivan proces koji nastaje stimulacijom fibroblasta faktorima rasta koje luče megakariociti (89, 90). Progresivna priroda bolesti nastaje usled većeg stvaranja kolagena. Zbog neefektivne megakariocitopoeze, trombociti kao i megakariociti, oslobađaju velike količine faktora rasta zbog čega istovremeno dolazi do bujanja fibroblasta i stvaranje kolagena, a takođe i do proliferacije mnogih ćelija (91, 92). Zbog toga je za dijagnozu PMF neophodno uraditi histološki nalaz bioptata koštane srži, a parametri koji se tom prilikom prate su celularnost i prisustvo fibroze. Na osnovu ovih osobina može se pratiti dinamika bolesti što je od značaja za prognozu i lečenje.

Na predlog grupe evropskih patologa 2005. godine standardizovan je stepen mijelofibroze u bioptatu obolelih, a gradus fibroze procenjuje se od 0 do 3 (93) (Tabela 2).

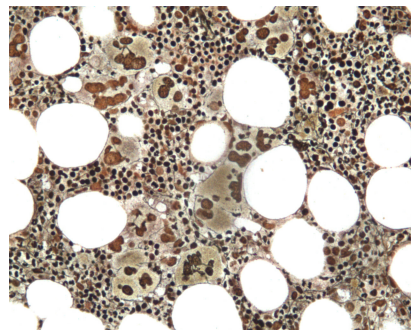
Tabela 2. Stepen fibroze koštane srži

Stepen	Opis
MF-0	<i>Retka retikulinska vlakna bez uticaja na normalnu koštanu srž</i>
MF-1	<i>Rastresita mreža retikulinskih vlakana posebno u perivaskularnim prostorima</i>
MF-2	<i>Difuzno povećanje retikulinskih vlakana, mestimično nakupljanje kolagenih vlakana sa/ili fokalnom osteosklerozom</i>
MF-3	<i>Difuzno povećanje retikulinskih vlakana, sa grubim nakupljanjem kolagenih vlakana, često povezani sa značajnom osteosklerozom</i>

Patohistološki nalaz biopтата koštane srži u odnosu na stepen fibroze može biti pre-fibrotični i fibrotični (93, 94). Prefibrotični stadijum (MF-0 i MF-1) je prisutan u oko 25% bolesnika (Slika 10). U koštanoj srži postoji hipercelularnost sa predominantnom granulocitnom i megakariocitnom lozom sa ili bez graničnog povećanja retikulina. Najveće promene nalaze se u megakariocitnoj lozi gde se uočava ne samo poremećaj histotopografije (nakupljanje i premeštanje megakariocita uz endotelnu granicu), već i poremećaj maturacije ovih ćelija (93, 95).



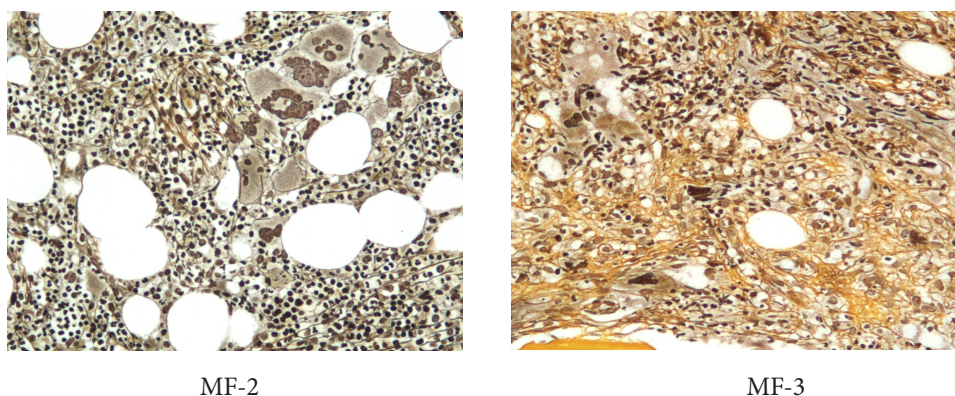
MF-0



MF-1

Slika 10. Prefibrotični stadijum koštane srži

Vreme prelaska iz prefibrotičnog u fibrotičani (fibro-sklerotični; MF-2, MF-3) tzv. manifestni oblik bolesti je nepredvidivo, ali se došlo do zaključka da povećanje broja morfološki izmenjenih megakariocita, predstavlja rani znak napredovanja bolesti. Terminalna fibrotična faza koštane srži se poklapa sa osteo-mijelosklerotičnim oblikom bolesti koji se karakteriše povećanjem gustine retikulinskih i kolagenih vlakana i stvaranjem polja hematopoeze koja su međusobno odvojena masnim ćelijama. Uočavaju se prošireni sinusi koštane srži sa značajnom hematopoezom (Slika 11).



Slika 11. Fribrotični stadijum koštane srži

U sklopu diferencijalne dijagnostike važno je razdvojiti prefibrotičnu i fibrotičnu fazu PMF od ET ili PV (81, 93).

Citogenetika

Prisustvo hromozomskih aberacija u patološkim ćelijama obolelih, još jedan je dokaz klonalnosti PMF. Međutim, zbog same prirode bolesti često su citogenetičke informacije o kariotipu bolesnika ograničene. Fibro-sklerotične promene u koštanoj srži otežavaju aspiraciju optimalnog broja ćelija za preparaciju, što se odražava na kvantitet i kvalitet mitotičkih ćelija za validnu citogenetičku analizu (96).

Po literaturnim podacima, prisustvo patološkog kariotipa u ćelijama koštane srži obolelih se registruje kod 30% do čak 75% (97-99). Međutim, precizniji podaci pokazuju da je učestalost hromozomskih aberacija u prefibrotičnom i fibrotičnom stadijumu bolesti oko 35%, dok je veća učestalost hromozomskih aberacija (od oko 65%), kod bolesnika sa mijelofibrozmom nastalom transformacijom ET i PV (100, 101).

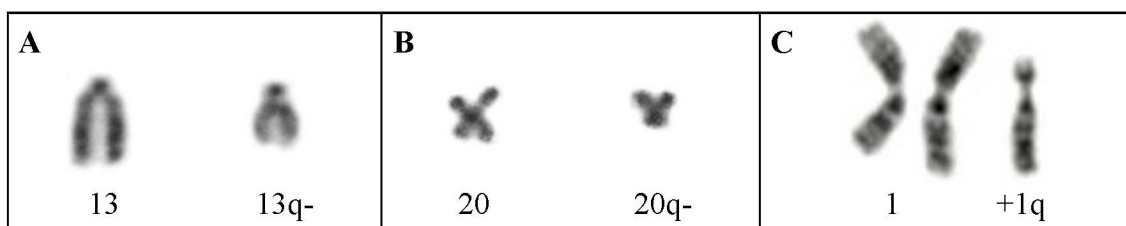
Tipičnih hromozomskih aberacija, isključivo vezanih za ovaj entitet bolesti nema. Postoje specifične aberacije određenih hromozoma koje se češće ispoljavaju u PMF, kao i drugim *BCR/ABL*-negativnim MPN. Izmene u kariotipu mogu biti različite. Najčešće su aberacije jednog hromozoma (solo aberacije), ali mogu koegzistirati dve ili više aberacija. Takođe, izmene u kariotipu mogu biti primarnog i sekundarnog tipa, naročito u uznapredovaloj fazi bolesti. Smatra se da su pojedine hromozomske aberacije kao balansirane i nebalansirane translokacije i kompleksno aberantan kariotip retka pojava u PMF (98, 102, 103).

Najčešće hromozomske aberacije u kariotipu obolelih su: delecija dugog kraka hromozoma 13 (13q-), delecija dugog kraka hromozoma 20 (20q-), parcijalna trizomija dugog kraka hromozoma 1 (+1q) i trizomija hromozoma 9 (+9). Procenjuje se da je zastupljenost ovih aberacija čak 35% od svih citiranih hromozomopatija u PMF (87, 97, 104).

Delecija dugog kraka hromozoma 13 je intersticijalna, sa tačkama prekida 13q12 i q22 (Slika 12 A). Ova aberacija se može javiti i u drugim mijeloidnim neoplazmama (105, 106).

Delecija dugog hromozoma 20 je aberacija koja se takođe javlja i u drugim mijeloidnim neoplazmama, najčešće u MDS i PV (107, 108). Iako morfološki izgleda kao terminalna, radi se o intersticijalnoj deleciji sa tačkama prekida q11 i q13 (Slika 12 B).

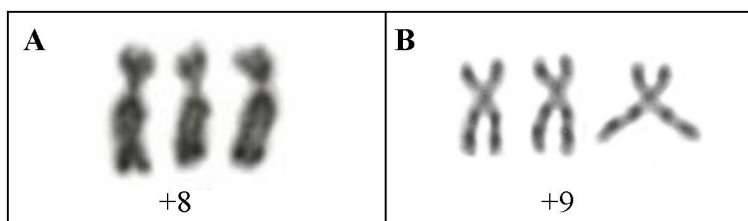
Parcijalna trizomija dugog kraka hromozoma 1 (+1q) je aberacija koja je registrovana gotovo u svim hematološkim malignitetima, ali se češće javlja u *BCR/ABL*-negativnim MPN i MDS. Smatra se da je trizomija 1q najčešća parcijalna trizomija uopšte, a razlog nastanka ove aberacije je nestabilnost heterohromatina u sekundarnoj konstrikciji (Slika 12 C). Pretpostavlja se da u genezi trizomije 1q stoji proces koji se odvija u tri sukcesivna događaja. Prvi je dekondezacija sekundarne konstrikcije (1qh), sledi hipermetilacija paracentromernog heterohromatina, zatim i duplikacija dugog kraka hromozoma. Krajnji ishod kompleksnog mehanizma je trizomija 1q ili parcijalna duplikacija regiona 1q21-1q32 ili nebalansirana translokacija (109-111).



Slika 12. Prikaz najčešćih hromozomskih aberacija u PMF.

A-delecija hromozoma 13; B-delecija hromozoma 20; C-parcijalna trizomija hromozoma 1
Napomena: Aberantni hromozomi i njihovi homolog, izdvojeni su iz kariotipova patoloških ćelija koštane srži bolesnika i prikazani parcijalno.

Po rezultatima nekih studija trizomije hromozoma 8 (+8) (Slika 13 A) i hromozoma 9 (+9) (Slika 13 B) su u grupi najčešćih (87, 100). Ove aberacije se mogu javiti gotovo u svim hematološkim malignim bolestima, kao jedine ili kao dodatne i kao takve predstavljaju odraz evolucije patološkog klona.



Slika 13. A-trizomija hromozoma 8; B-trizomija hromozoma 9

Napomena: Trizomični hromozomi izdvojeni su iz kariotipova patoloških ćelija koštane srži bolesnika i prikazani parcijalno.

Iako studije citogenetičkih rezultata iznose različite podatke o zastupljenosti pojedinih hromozomskih aberacija, na osnovu svih tih rezultata se zaključuje da su najčešće i rekurentne hromozomske aberacije za PMF: 13q-, 20q-, +8, +9 i rearanžmani hromozoma 1. Aberacije koje se ređe ispoljavaju u PMF su: kompletna ili parcijalna monozomija hromozoma 5 (-5/5q-) i 7 (-7/7q-), delecija kratkog kraka hromozoma 12 (12p-) i trizomija hromozoma 21 (+21) (102, 112).

Najnovija istraživanja ukazuju da bi, nebalansirana translokacija hromozoma 1 i 6 [der(6)t(1;6)(q21-23;p21,3)] (Slika 14) mogla biti specifična hromozomska aberacija, isključivo vezana za patogenezu PMF (113).



Slika 14. Translokacija hromozoma 1 i 6, kao der(6)t(1;6)(q21-23;p21,3) (114)

Citogenetička analiza u PMF ima i dijagnostički i prognozni značaj. Neki autori smatraju da je normalan kariotip superioran, a aberantan kariotip inferioran prognozni parametar (87). Međutim, izdvajaju se i pojedini hromozomski rearanžmani koji nose bolju prognozu bolesti. Tefferi i saradnici u grupu dobrih prognoznih parametara svrstavaju solo aberacije 13q- i 20q- (115), dok Hussein i saradnici smatraju pomenute delecije, ali i trizomiju hromozoma 9 aberacijama sa dobrom prognozom (116). Sve ostale hromozomske aberacije predstavljaju lošu predispoziciju, a najlošiju prognozu nosi kompleksno aberantan kariotip.

Na osnovu kariotipa može se odrediti i stadijum bolesti. Ukoliko u kariotipu egzistiraju solo aberacije najčešće se radi o početnoj fazi, dok sekundarne aberacije govore o evoluciji bolesti. Trizomije hromozoma 8 i 9 mogu biti primarne u patološkom ćelijskom klonu, ali se često ispoljavaju i kao sekundarne i kao takve predstavljaju loš prognozni parametar i ukazuju na uznapredovalu fazu bolesti (97, 102, 108).

Klasična citogenetička analiza je dovoljno informativna i za inicijalnu dijagnostiku i praćenje toka bolesti PMF. Međutim, dešava se da citogenetička analiza ili nije moguća ili nije validna ili nije dovoljno informativna za pretragu molekularnih markera i u takvim slučajevima preporuka je konvencionalnu analizu dopuniti nekom od molekularno gene-

tičkih, kao što je fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl.* FISH-Fluorescence *In Situ* Hybridization) ili lančana reakcija polimeraze (*engl.* PCR-Polymerase Chain Reaction) (96).

Molekularni markeri

Najvažniji molekularni markeri u PMF su mutacija *JAK2V617F* i mutacije *MPL* gena u kodonu 515: W515L i W515K (*MPLW515L/K*). Po klasifikaciji SZO iz 2008. godine, ove mutacije pripadaju grupi glavnih dijagnostičkih kriterijuma.

Učestalost mutacije *JAK2V617F* je oko 50% kod bolesnika sa PMF (117, 118). Kao što je pomenuto, protein ovog genskog alela je konstitutivna tirozin kinaza koja aktivira nizvodni deo transdukcije citokinog signalnog puta i dovodi do citokin-nezavisne aktivacije, transformacije i proliferacije hematopoetske matične ćelije.

U odnosu na prisustvo ili odsustvo pomenute mutacije u ispitivanim ćelijama, bolesnici sa PMF mogu se podeliti u dve dijagnostičke grupe: *JAK2V617F*-pozitivne i *JAK2V617F*-negativne. Ukoliko se molekularno genetičkim metodama ne registruje pomenuta mutacija, pristupa se pretraživanju drugih molekularnih markera.

Kod *JAK2V617F*-negativnih bolesnika potrebno je pristupiti hronološkom ispitivanju mogućih mutacija, najpre *JAK2* gena u egzonima 12 i 13, a zatim *MPL* gena u kodonu 515 (119).

Zastupljenost *MPLW515L/K* mutacija kod bolesnika sa PMF je od 5-10% (65, 120). S obzirom na to da je divlji tip *MPL* gena odgovoran za *MPL* receptor i stimulaciju ćelije trombopoetinom, logično je i prisustvo alela *MPLW515L/K* kod bolesnika sa povećanim brojem trombocita. Takođe, u patohistološkom nalazu bioptata koštane srži svih *MPLW515L/K*-pozitivnih bolesnika, prisutna je hiperplazija ćelija megakariocitne loze (61). Mutacije *MPL* gena u kodonu 515 registrovane su kod pacijenata sa PMF i ET (1-3%), dok kod obolelih od PV nisu registrovane. Zbog toga se rezultati molekularno genetičkih analiza *MPL* gena koriste kao kriterijumi diferencijalne dijagnostike kod pomenuta tri entiteta MPN. Dijagnostički algoritam molekularnih markera za najčešće BCR/ABL-negativne MPN prikazan je na slici 9.

Dugo je bila aktuelna hipoteza da su mutacije *MPLW515L/K* isključivo karakteristika megakariocitne, a *JAK2V617F* eritroidne proliferacije. To je i potvrđeno eksperimentom na miševima, gde je ekspresija *JAK2V617F* bila evidentna kod jedinki sa PV-sličnim fenotipom bez trombocitoze, dok je *MPLW515L* mutacija registrovana kod jedinki sa fenotipski ekprimiranom trombocitozom (60). Međutim, publikovani su i slučajevi koekspresije oba molekularna markera i u svim slučajevima nivo ekspresije alela *MPLW515L* je bio viši od *JAK2V617F*. Interesantno je istaći da su bolesnici sa dijagnozom ET i PMF

i eksprimiranim *MPLW515L* i *JAK2V617F* alelima, imali megakariocitnu hiperplaziju, trombocitozu, ali i visok nivo hemoglobina u poređenju sa bolesnicima koji su eksprimirali samo *MPLW515L* (60).

Kod negativnih *JAK2V617F* i *MPLW515L/K* pacijenata, radi se molekularna pretraga mogućih mutacija u JAK-STAT signalnom putu. Najčešće se rade analize gena za citokine receptore, ostale članove tirozin kinazne JAK familije (*JAK1*, *JAK3*, *Tyk2*) i analize gena središnjih komponenti ćelijskog signalnog puta, *STAT2* ili *STAT5* (61).

Iako *JAK2V617F* nema direktnog uticaja na homodimernu strukturu citokinih receptora (*EPOR*, *MPL* i *GSCFR*) posredstvom, preko alternativnog JAK-STAT signalnog puta, dolazi do dimerizacije transmembranskog dela receptora i remećenja njihove strukture i funkcije (121).

Analiza specifičnih genskih mutacija je od velikog značaja za dijagnozu i prognozu PMF. Detekcija molekularnih markera najvećeg značaja ima za odluku protokola prilikom lečenja bolesti. Konvencionalni terapijski pristupi kod bolesnika sa PMF deluju na pojedine simptome bolesti (leukocitozu, trombocitozu, anemiju, splenomegaliju), suprimiraju ih i drže pod kontrolom, dok ciljna molekularna terapija podrazumeva primenu tirozin kinaznih, *JAK2* inhibitora, koji deluju na izmenjene proteine i vrše kontrolu fenotipskih (hematoloških i kliničkih) parametra bolesti.

Distribucija CD34+ ćelija

Jedna od karakteristika PMF je i porast broja *CD34+* ćelija u perifernoj krvi bolesnika. Pozitivnost *CD34* membranskog antigena eksprimiraju hematopoetske matične ćelije (*HMC*) i hematopetske progenitorne ćelije (*HPC*) koje prelaze iz koštane srži u perifernu krv, zbog bujanja fibroblasta i prekomerne aktivnosti faktora rasta (122, 123).

Mobilizacija *CD34+* ćelija je specifičnost po kojoj se PMF razlikuje od ostalih *BCR/ABL*-negativnih MPN i prediktor je akceleracije i blastne transformacije bolesti (124). Zastupljenost *CD34+* ćelija u koštanoj srži zdrave osobe je od 1- 3%, a u cirkulišućoj krvi oko 0.05%. Neki autori su ustanovili da vrednost *CD34+* ćelija u perifernoj krvi bolesnika sa PMF može biti i 360 puta veća nego kod zdravih osoba i 18 do 30 puta veća u odnosu na bolesnike sa dijagnozom drugih *BCR/ABL*-negativnih MPN (124). Vršene su i prospektivne studije kod bolesnika sa različitim dijagnozama mijeloidnih neoplazmi u kojima se poredio odnos nivoa *CD34+* ćelija sa indeksom mijeloproliferacije (leukocitozom, trombocitozom i splenomegalijom) i indeksom mijelodeplecije (anemijom, trombocitopenijom ili leukopenijom). Ustanovljena je direktna korelacija *CD34+* ćelija sa parametrima mijeloproliferacije (124). U slučaju porasta broja leukocita i/ili trombocita u perifernoj krvi

ili usled porasta volumena slezine, broj cirkulišućih CD34+ ćelija se takođe povećavao u odnosu na kontrolne vrednosti. Pokazano je da je vrednost cirkulišućih CD34+ ćelija bolji dijagnostički parametar i pokazatelj proliferativnog potencijala PMF, od patohistoloških (125), kliničkih (126) i eritrokinetičkih (127) karakteristika ove bolesti.

Na osnovu rezultata istraživanja o specifičnostima mobilizacije CD34+ ćelija, njihovoj dinamici ponašanja u perifernoj cirkulaciji i *in vitro* ćeliskim kulturama, o njihovoj dinamičkoj povezanosti sa drugim mijeloproliferativnim parametrima, može se zaključiti da je prospektivni monitoring CD34+ ćelija kod bolesnika sa PMF, jedan od bitnih metodoloških pristupa u dijagnozi, prognozi i evaluaciji ove bolesti.

1.3.3. Kliničke karakteristike

Oko polovine obolelih od PMF je bez simptoma u vreme postavljanja dijagnoze i većina njih ostaje bez simptoma tokom 3 do 5 godina, a bolest se slučajno otkriva redovnim medicinskim pregledima (81).

U razvijenim zemljama Evrope, zbog češće medicinske kontrole, veći je broj obolelih kod kojih se dijagnoza PMF postavlja u ranom prefibrotičnom stadijumu bolesti.

Rani stadijum PMF povezan je sa trombocitozom, čija je vrednost obično $<1000 \times 10^9/L$, graničnim stepenom anemije, normalnim ili granično povećanim vrednostima laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu, blago povišenim leukocitima, ali odsustvom leukoeritroblasta, mijelocita i dakriocita u krvnoj slici (81, 82, 128).

Obično se uočava granično uvećanje slezine. U koštanoj srži nema retikulinske fibroze, ali postoje promene u veličini i morfologiji megakariocita u vidu hipo i hiperlobulacije jedra (129). Prefibrotični stadijum se obično razvija u manifestni oblik bolesti godinu dana nakon postavljanja dijagnoze.

U stadijumu manifestacije bolesti, najčešće su izraženi simptomi anemije: umor, malaksalost, palpitacije, kao i simptomi hiperkatabolizma: noćno znojenje, gubitak u telesnoj težini, subfebrilnost (81, 82, 128). Česta pojava su i bolovi ispod levog rebarnog luka i osećaj nadutosti uzrokovani splenomegalijom kao posledicom mijeloidne metaplazije (81, 83, 130). Splenomegalija je prisutna u 85-100% obolelih, a masivna splenomegalija, kada slezina ulazi u malu karlicu, viđa se kod 10% bolesnika (83). U većini slučajeva, ispoljena je i hepatomegalija, tj. jetra se palpira više od 1cm ispod desnog rebarnog luka (83, 129). Limfadenopatija je opisana kod 10-20% obolelih i obično je umerenog stepena (11). Česti su bolovi u kostima koji se pojačavaju na pritisak i moguće su različite promene na koži.

Jedna od specifičnosti bolesti je ekstramedularna hematopoeza. Ova pojava je gotovo u svim organima, seroznim opnama, žlezdama, zglobovima itd. Kliničke manife-

stacije ekstramedularne hematopoeze i eventualne komplikacije razlikuju se i zavise od lokalizacije ove pojave.

Nakon splenektomije može doći do intenziviranja ekstramedularne hematopoeze što je povezano sa povećanim brojem cirkulišućih HMC i HPC, kao i gubitkom filtracione funkcije slezine (129).

1.3.4. Laboratorijski nalazi

Anemija je najčešći laboratorijski nalaz PMF. Uočava se kod 50-70% obolelih, a kod 25% bolesnika je teškog stepena (hemoglobin < 80g/L). Srednja vrednost hemoglobina se kreće između 90 i 120g/L (129). Uzrok anemije je multifaktorijalan: neefektivna eritropoeza, skraćen vek eritrocita, povećana destrukcija eritrocita u slezini, autoimuni fenomeni, itd.

Anizopoikilocitoza i dakriocitoza je česta pojava kod bolesnika sa PMF. Verifikuje se pregledom razmaza periferne krvi (81, 89, 129). Smatra se da ovakva deformacija oblika eritrocita, nastaje usled otežanog prolaska eritrocita kroz fibroznu koštanu srž ili zbog neefektivne eritropoeze u slezini (89).

Kod bolesnika sa PMF ukupan broj leukocita je povećan na račun granulocita (129). Srednja vrednost broja leukocita je između 10 i $14 \times 10^9/L$, a može da varira od 0.4 do $237 \times 10^9/L$ (129). Leukocitoza se registruje kod 50% obolelih (83), a leukopenija kod 13-25% (83, 129). Procenat mijeloblasta u perifernoj krvi kreće se između 0 i 20%. Uočava se pojava hipo i hipersegmentacije jedra i patološka granulacija granulocita. Neutrofilna alkalna fosfataza je povećana kod 25% bolesnika, ali i snižena kod takođe 25% bolesnika (129).

Pri postavljanju inicijalne dijagnoze 37% bolesnika ispoljava trombocitopeniju, dok se kod 28% uočava trombocitoza (129). Srednja vrednost broja trombocita kreće se između 175 i $580 \times 10^9/L$. Registrovane su i ekstremne vrednosti od $15 \times 10^9/L$ do $3215 \times 10^9/L$ (129). Trombocitopenija je posledica redukovane megakariocitopoeze, subkličičke forme diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK) i hipersplenizma (81, 89). Pored smanjenog broja, trombociti imaju i poremećenu funkciju što sve zajedno dovodi do krvarenja.

Oko 10% bolesnika ispoljava težak stepen pancitopenije (smanjeni broj eritrocita, leukocita i trombocita), što je posledica poremećene hematopoeze sve tri ćelijske loze i izraženog hipersplenizma. Pancitopeničan nalaz periferne krvi sugeriše na izraženu fibrozu koštane srži (129).

Povećanje broja progenitornih ćelija hematopoeze, kao i prisustvo CD34+ ćelija u perifernoj krvi je specifičnost laboratorijskih nalaza bolesnika sa PMF. Kao što je pomenu- to, ova pojava je u korelaciji sa stepenom progresije bolesti (124-127, 129).

Od ostalih laboratorijskih nalaza izdvajaju se: povećana koncentracija mokraćne

kiseline u serumu, hipo i hiperkalcemija, povećanje laktatdehidrogenaze (LDH) i bilirubina (81, 89, 129). Leukocitna alkalna fosfataza i nivo vitamina B12 su povišeni, a nivo folata je smanjen (131).

1.3.5. Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza

Dijagnoza bolesti se obično lako postavlja na osnovu kliničke slike, splenomegalije i leukoeritoblastoze sa dakriocitozom u perifernoj krvi. Ipak, da bi se precizno dijagnostikovala i da bi se otklonila sumnja o eventualnoj mogućnosti druge bolesti, određeni su dijagnostički kriterijumi za PMF.

U kliničkoj praksi se primenjuju kriterijumi definisani od strane SZO iz 2008., a za određivanje stadijuma bolesti predloženi kriterijumi iz 2001. godine (132) (Tabela 3).

Tabela 3. Kriterijumi prefibrotičnog i fibrotičnog stadijuma PMF

Prefibrotični stadijum PMF	KLINIČKA SLIKA	
	<i>Slezina i jetra</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Odsustvo ili blago uzražena splenomegalija ili hepatomegalija
	<i>Hematološki parametri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Blaga anemija • Blaga do umerena leukocitoza • Blaga do značajna trombocitoza
	MORFOLOŠKI NALAZI	
	<i>Krv</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Odsustvo ili blago izražena leukoeritoblastoza • Odsustvo ili blago izražena poikilocitoza • Odsustvo ili nekoliko dakriocita
<i>Koštana srž</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hipercelularnost • Proliferacija neutrofila • Proliferacija megakariocita • Atipični megakariociti • Odsustvo ili minimalna retikulinska fibroza 	
Fibrotični stadijum PMF	KLINIČKA SLIKA	
	<i>Slezina i jetra</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Umerena do značajna splenomegalija ili hepatomegalija
	<i>Hematološki parametri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Umerena do značajne anemija • Leukociti smanjeni do povišeni • Trombociti smanjeni do povišeni
	MORFOLOŠKI NALAZI	
	<i>Krv</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Leukoeritoblastoza • Izražena poikilocitoza • Izražena dakriocitoza
<i>Koštana srž</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Retikulinska i/ili kolagena fibroza • Hipocelularnost • Prošireni sinusi koštane srži • Intraluminarna hematopoeza • Proliferacija neutrofila • Izražena proliferacija megakariocita • Atipični megakariociti • Osteoskleroza 	

Dijagnostički kriterijumi za PMF po klasifikaciji SZO iz 2008. godine svrstani su u grupu glavnih i sporednih kriterijuma (78) (Tabela 4). Za potvrdu PMF potrebna su sva tri glavna i bilo koja dva sporedna dijagnostička kriterijuma.

Tabela 4. Dijagnostički kriterijumi za PMF

Glavni kriterijumi
<ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferacija megakariocita i atipične forme istih u prisustvu retikulinske i/ili kolagene fibroze ili u odsustvu retikulinske fibroze proliferacija i atipija megakariocita mora da bude praćena povećanjem celularnosti srži, proliferacijom granzlocita i smanjenom eritropoezom (prefibrotična celularna faza bolesti) 2. Ne ispunjava kriterijume SZO za CML, PV, MDS ili druge mijeloidne neoplazme 3. Prisustvo <i>JAK2V617F</i> ili drugih klonalnih markera (npr. <i>MPLW515L/K</i>) ili u odsustvu klonalnih markera, negiranje reaktivne fibroze usled drugih prikrivenih zapaljenskih ili neoplastičnih bolesti
Sporedni kriterijumi
<ol style="list-style-type: none"> 1. Leukoeritroblastoza 2. Porast serumske LDH 3. Anemija 4. Palpabilna splenomegalija

Poslednjih godina, molekularni klonalni markeri zauzimaju veliku pažnju naučnih i kliničkih istraživanja i značajno mesto klasifikacija mijeloidnih neoplazmi. Objavljeni su različiti modaliteti klasifikacija kako bi se što preciznije izvršila podela sličnih, a ipak suštinski različitih bolesti. Jedna od takvih je i pomenuta podela na *JAK2V617F*-pozitivne i *JAK2V617F*-negativne entitete. Klasifikaciji MPN data je i molekularna dimenzija (128). Primarna mijelofibroza i ostale *BCR/ABL*-negativne MPN, se dele na *JAK2* mutaciono pozitivnu i *JAK2* mutaciono negativnu (128) (Tabela 5). Na osnovu ovog klasifikacionog modela najvažniji dijagnostički kriterijumi su prisustvo bilo koje mutacije u *JAK2* genu i odsustvo *BCR/ABL* fuzionog transkripta.

Tabela 5. Dijagnostički kriterijumi za *JAK2*-pozitivnu i *JAK2*- negativnu PMF

<i>JAK2</i>-pozitivna PMF (dijagnoza zahteva potvrdu A1 i A2 kriterijuma i bilo koja dva B kriterijuma)
<ol style="list-style-type: none"> A1. Retikulin gradusa 3 ili više (na skali od 0-4) A2. Mutacija na <i>JAK2</i> genu B1. Palpabilna splenomegalija B2. Anemija nepoznatog porekla (hemoglobin <11,5g/L za muškarce; <10g/L za žene) B3. Dakriociti u perifernoj krvi B4. Leukoeritroblasti u perifernoj krvi (prisustvo najmanje dva nezrela eritrocita ili nezrelih mijeloidnih ćelija u perifernoj krvi) B5. Sistemski simptomi (noćno znojenje, gubitak telesne težine >10% za oko 6 meseci ili difuzan bol u kostima) B6. Histološki dokaz o ekstramedularnoj hematopoezi

JAK2-negativna PMF (dijagnoza zahteva potvrdu A1, A2, A3 kriterijuma i bilo koja dva B kriterijuma)

- A1.** Retikulin gradusa 3 ili više (na skali od 0-4)
 - A2.** Odsustvo mutacije na *JAK2* genu
 - A3.** Odsustvo *BCR/ABL* fuzionog gena
 - B1.** Palpabilna splenomegalija
 - B2.** Anemija nepoznatog porekla (hemoglobin <11,5g/L za muškarce; <10g/L za žene)
 - B3.** Dakriociti u perifernoj krvi
 - B4.** Leukoeritroblasti u perifernoj krvi (prisustvo najmanje dva nezrela eritrocita ili nezrelih mijeloidnih ćelija u perifernoj krvi)
 - B5.** Sistemski simptomi (noćno znojenje, gubitak telesne težine >10% za oko 6 meseci ili difuzan bol u kostima)
 - B6.** Histološki dokaz o ekstramedularnoj hematopoezi
-

Pomenuti kriterijumi prevashodno služe da se PMF dijagnostički razlikuje i odvoji od drugih bolesti koje mogu izazvati slične kliničke manifestacije i patološke reakcije.

Diferencijalno dijagnostički treba razlikovati PMF od CML koja se takođe karakteriše splenomegalijom i leukocitozom. Međutim, prisustvo Ph hromozoma ili *BCR/ABL* fuzionog transkripta i niske vrednosti alkalne fosfataze (APL) ukazuju na CML.

Kako se prilikom dijagnoze PMF registruje značajnija trombocitoza ($>600 \times 10^9/L$), ova bolest se može zameniti sa ET. Međutim, za ET nije karakteristično prisustvo dakriocita i nezrelih ćelija granulocitne i eritroidne loze u krvi. Često se ET teško razlikuje od prefibrotičnog stadijuma, a PV od fibrotičnog, manifestnog oblika PMF. U ovakvim slučajevima, diferencijalni kriterijum dijagnoze je fibroza koštane srži koja se ne registruje kod ET, a slabo je izražena kod PV (82, 93, 129, 133, 134).

Reaktivna fibroza koštane srži može se javiti kod metastaza malignih tumora, infekcija i raznih inflamatornih stanja uključujući i autoimuna oboljenja. Leukemija vlasastih ćelija, poremećaji mastocitnih ćelija i maligni limfomi mogu imati sličnu kliničku sliku (81). Međutim, brz tok bolesti i specifičan patohistološki nalaz, ukazuju na postojanje drugog oboljenja (81).

Kod oko trećine bolesnika sa PMF mogu se registrovati kariotipske promene u vreme postavljanja inicijalne dijagnoze. S obzirom na to da je aberantan kariotip češći kod bolesnika sa PMF u odnosu na bolesnike sa PV i ET, učestalost hromozomskih aberacija može biti jedan od diferencijalnih kriterijuma ovih bolesti. Takođe, pojedine hromozomske aberacije mogu imati dijagnostički značaj kod razlikovanja PMF od drugih entiteta mijeloidnih neoplazmi naročito od neklasifikovanih oblika MDS/MPN. Pri dijagnozi PMF najčešće aberacije su delecije 13q i 20q, trizomije hromozoma 8 i 9, kao i aberacije hromozoma 1, 5 i 7 (97, 100, 135, 136). Neke od ovih aberacija su specifične (1q+, 13q-, 20q-), dok su druge, poput 5q- i 7q- retke u PMF i mogu biti od koristi u dijagnostičkoj proceduri (85, 136).

1.3.6. Prognoza bolesti

Prognoza PMF je najlošija od svih hroničnih mijeloproliferativnih oboljenja (137). Dužina života bolesnika sa PMF je za 31% kraća u odnosu na zdrave osobe istih godina i pola (37). Preživljavanje obolelih je od 4 do 7 (138-141), prosečno 5 godina (37). Kod mlađih osoba, bolest može trajati duže (86, 140, 142). Međutim, postoje i druge varijacije u vremenu preživljavanja bolesnika u zavisnosti od prisustva ili odsustva osnovnih dijagnostičkih (kliničkih i laboratorijskih) parameta koji su definisani kao prognozni (143). Prognozni parametri su najčešće nezavisne varijable u analizi praćenja dužine života bolesnika. Osnovni prognozni parametri za PMF su:

- godine života
- pol
- konstitutivni simptomi ili simptomi katabolizma (gubitak telesne težine za više od 10% u periodu od 6 meseci, noćno znojenje i subfebrilnost)
- palpabilna splenomegalija
- palpabilna hepatomegalija
- koncentracija hemoglobina
- broj leukocita
- broj trombocita
- prisustvo blasta u perifernoj krvi

Gotovo sve studije koje su ispitivale uticaj prognoznih parametara na dužinu života bolesnika sa PMF, registrovale su direktnu korelaciju starijeg životnog doba (>65godina) i anemiju sa kraćim preživljavanjem obolelih (82). Neke od studija konstatovale su indikatore loše prognoze: konstitutivne simptome (87, 139, 144, 145), leukocitozu ($10-30 \times 10^9/L$) (87, 95, 97, 144, 146), leukopeniju (87, 144), cirkulišuće blaste (87, 95), povećanje broja granulocitnih prekursora u cirkulaciji (95, 146), trombocitopeniju ($<100 \times 10^9/L$) (97, 145). Različitim kombinacijama varijabli prognoznih parametara konstatovane su i određene pravilnosti u analizi preživljavanja bolesnika. Medijana preživljavanja kod pacijenata mlađih od 56 godina može biti duža za 10 godina, a pacijentima iste starosne grupe, koji nemaju anemiju ni hiperkatabolične simptome, vreme preživljavanja može biti 15 i više godina (86). Takođe, među pacijentima starijeg životnog doba, registrovano je duže prosečno preživljavanje (10 i više godina) ukoliko nemaju ispoljenu anemiju, leukopeniju, izrazitu leukocitozu, cirkulišuće blaste ili hiperkatabolične simptome. Međutim, ukoliko su ispoljena bilo koja dva od navedenih parametra, medijana preživljavanja može biti manja od 3 godine (82).

Na osnovu svih studija jasno su izdvojeni nepovoljni prognozni parametri koji se nazivaju i faktorima rizika:

- godine (>65 godina),
- konstitutivni simptomi ili simptomi katabolizma (gubitak telesne težine za više od 10% u periodu od 6 meseci, noćno znojenje i subfebrilnost),
- anemija (koncentracija hemoglobina <100g/L),
- broj leukocita (<4x10⁹/L ili >30x10⁹/L),
- prisustvo blasta u cirkulaciji (>1%).

Poslednjih godina opšte je prihvaćena podela bolesnika na grupe sa niskim, srednjim i visokim rizikom. Stratifikacija bolesnika prema stepenu rizika može biti izuzetno korisna kod izbora terapije. Posebno je važno odrediti faktore rizika u slučaju agresivne terapije kada se očekuje intenzivna eradikacija krvnih elemenata ili kod mlađih pacijenata kada je potencijalno moguća alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (82).

Splenomegalija i hepatomegalija takođe imaju prognozni značaj za bolesnike sa PMF i predstavljaju nepovoljnu predispoziciju za duže preživljavanje (87, 95, 97, 144, 145, 148). Histološke karakteristike koštane srži prognozno su značajne. Viši stepen fibroze ili osteoskleroza predstavljaju negativan (87, 95, 144, 145), dok je viši stepen celularnosti pozitivan parametar i preduslov dužeg preživljavanja bolesnika (95).

Neki od važnih dijagnostičkih parametara, kao što su kariotip i mutacija *JAK2V617F*, nivo CD34+ ćelija u perifernoj krvi, izdvojeni su i ispitivani kao nezavisne varijable u analizama preživljavanja bolesnika.

Studije koje su pratile uticaj kariotipa kao nezavisnog prognozno parametra, pokazale su da je aberantan kariotip faktor inferioriornog preživljavanja (82, 87, 97, 138, 139, 147). Međutim, uočena je rezlika i u dužini preživljavanja bolesnika sa patološkim kariotipom. Neke od studija navode da su aberacije: +8, -7/7q-, -5/5q-, inv(3), i(17q), 12p- i rearranžmani 11q23 u korelaciji sa kraćim preživljavanjem, dok su delecije 13q i 20q i trizomija hromozoma 9 u vezi sa dužim preživljavanjem bolesnika (87, 99, 104, 115, 138, 149, 150).

Prognozni značaj mutacije *JAK2V617F* i značaj genetičkog opterećenja ovog alela na preživljavanje bolesnika sa PMF je aktuelno pitanje mnogih studija. U jednom retrospektivnom istraživanju na 152 bolesnika (117), uočena je direktna povezanost kratkog preživljavanja i alela *JAK2V617F*, dok je u drugim prospektivnim studijama na različitom broju bolesnika registrovana direktna korelacija pomenute mutacije sa većim stepenom splenomegalije i leukemijskom transformacijom (145, 174), ali ne i sa preživljavanjem (138, 151, 152). Različiti su i rezultati istraživanja značaja genetičkog opterećenja alela *JAK2V617F* na dužinu kumulativnog preživljavanja bolesnika, što se može opravdati razlikom meto-

dološkog pristupa i razlikom tipa ćelija od kojih se polazi prilikom ispitivanja genetičkog opterećenja (138).

Prisustvo mutacije V617F na oba *JAK2* alela (nulizigotnost) je u direktnoj vezi sa kraćim preživljavanjem bolesnika (149, 151-153). Nizak nivo ili heterozigotni oblik pomenute mutacije je povezan sa pojavom trombocitoze, dok je visok nivo, homozigotno stanje mutacije u vezi sa leukocitozom i splenomegalijom (151). Takođe, ustanovljeno je da se anemija, trombocitopenija ili leukopenija tokom evolucije bolesti razvijaju kod bolesnika kod kojih nije registrovana mutacija *JAK2V617F* pri dijagnozi, dok je razvoj izrazite splenomegalije i leukemijska transformacija bolesti karakteristična za bolesnike kod kojih je evidentirana pomenuta mutacija pri inicijalnom dijagnostičkom pregledu (151). Mutacija *JAK2V617F* je u direktnoj vezi sa hiperproliferativnim karakteristikama bolesti. Odrasle fenotipske progresije, tj. leukemijske transformacije bolesti, ali nema direktnog uticaja na dužinu preživljavanja obolelih (120, 138, 151-153).

Jedan od biomarkera PMF je porast CD34+ ćelija u perifernoj krvi. Smatra se da stepen mijeloidnih progenitora u cirkulaciji predstavlja odraz proliferativne aktivnosti malignog ćelijskog klona (154). U različitim studijama pokazana je značajna razlika u distribuciji CD34+ ćelija u perifernoj krvi tokom celularne i fibrotične faze bolesti (154-156). U ranoj, hipercelularnoj fazi, evidentan je porast mijeloidnih progenitornih ćelija u koštanoj srži, dok je u perifernoj krvi njihov broj manji. Suprotna raspodela pomenutih ćelija je u fibrotičnom stadijumu bolesti (156). Porast CD34+ ćelija u perifernoj krvi rezultat je proliferativnog potencijala neoplastičnog klona, ali je i indikator stepena narušenosti mikrosredine hematopoeznog tkiva kolagenom fibrozom, angiogenezom, izmenjenom sinusoidnom arhitekturom itd. (157).

U brojnim studijama je pokazano da je nivo CD34+ ćelija u perifernoj krvi u direktnoj korelaciji sa brojem leukocita i nezrelih mijeloidnih ćelija u perifernoj krvi, kao i sa veličinom palpabilne slezine (124, 154-156). Pomenuti prognozni parametri predstavljaju biomarkere ekstramedularne hematopoeze i kao takvi indikatori su progresije bolesti.

Primarna mijelofibroza je neizlečiva bolest. Kvalitet života bolesnika je ugrožen zbog ogromne splenomegalije, citopenije, hiperkatabolizma i brojnih drugih kliničkih i hematoloških poteškoća. Najčešći uzroci smrti su posledice portne hipertenzije ili hepatosplenoportne tromboze, tromboze na različitim anatomskim mestima u organizmu, srčane insuficijencije, infekcije, plućne hipertenzije, krvarenja zbog trombocitopenije ili hemostatskih poremećaja, kao i transformacija ove bolesti u akutnu neoplazmu (37). Prelaz PMF u akutnu leukemiju dešava se kod oko 10% bolesnika. Smatra se da je pojava akutne leukemije najčešće posledica prethodnog mijelosupresivnog lečenja (81), ali kod manjeg broja bolesnika, leukemija iz PMF nastaje i bez prethodnog terapijskog tretmana (87, 143).

Prognozni sistemi stepena rizika

Zbog različitog ispoljavanja osnovnih dijagnostičkih parametara pri inicijalnom pregledu i njihovog različitog uticaja na dužinu bolesti, definisani su bodovni ili prognozni sistemi (PS-i) pomoću kojih se bolesnici sa PMF svrstavaju u grupe sa različitim stepenom rizika. Nakon pionirskih (158, 159), nastajali su novi i danas se koriste različiti PS-i čiji je osnovni cilj, optimalna kategorizacija bolesnika radi adekvatnog i blagovremenog terapijskog tretmana. Klasifikacija bolesnika se vrši na osnovu ispoljavanja ili neispoljavanja nekih od osnovnih prognoznih parametara, tzv. faktora rizika.

Najpoznatiji je Lilski PS koji polazi od dva prognozna parametra, koncentracije hemoglobina i broja leukocita u perifernoj krvi (87). Oba parametra su sa jasno definisanim vrednostima i na osnovu njih bolesnici se svrstavaju u tri prognozne grupe sa različitim stepenom rizika: niskim, srednjim i visokim.

Grupa španskih istraživača je 1997. godine objavila rezultate analiza preživljavanja 106 inicijalno dijagnostikovanih bolesnika sa PMF (139). Ispitivano je deset kliničkih i laboratorijskih parametara, a multivarijantnom statističkom analizom izdvojeno je četiri, koji su uticali na morbiditet i mortalitet bolesnika: godine života, konstitutivni simptomi, koncentracija hemoglobina ($<100\text{g/L}$) i cirkulišući blasti. Statističkim analizama jasno su se izdvojile dve grupe bolesnika definisane kao "kratko-živeći" i "dugo-živeći". Parametar u kojem su se ove dve prognozne grupe bitno razlikovale je životno doba bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze. Svi bolesnici stariji od 64 godine imali su kraće preživljavanje (prosečno 24 meseca), dok su bolesnici mlađi od 55 godina duže živeli (prosečno 99 meseci) (139). Na osnovu toga, PS iz 1997. godine se odnosi na sve bolesnike sa PMF i sledećim prognoznim parametrima: godine života (>64), konstitutivni simptomi, koncentracija hemoglobina ($<100\text{g/L}$) i prisustvo nezrelih mijeloidnih ćelija u cirkulaciji (139).

Drugi PS iz 1998. godine, odnosi se na mlađe bolesnike, starosne strukture od 46 do 55 godina (86). Oba bodovna sistema prepoznaju četiri prognozne grupe koje su definisane brojem parametara koje bolesnik ispoljava u momentu postavljanja dijagnoze.

Sličan prethodnim je PS iz 2009. godine koji se bazira na rezultatima Međunarodne radne grupe za istraživanje i lečenje mijelofibroze (IWG-MRT- International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment). Ovaj PS se naziva IPSS (International Prognostic Scoring System) (138) i polazi od pet kriterijuma koji su prediktori kratkog preživljavanja bolesnika: godine života (>65), ispoljavanje konstitutivnih simptoma, koncentracija hemoglobina ($<100\text{g/L}$), broj leukocita ($>25 \times 10^9/\text{L}$) i broj nezrelih mijeloidnih ćelija u cirkulaciji ($\geq 1\%$). Po ovom PS-u razlikuju se četiri prognozne grupe sa različitim stepenom rizika: niskim, srednjim-1, srednjim-2 i visokim (138).

Caramazza i saradnici su 2011. godine objavili dinamički model DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System) koji je u osnovi modifikovani IPSS PS (150). DIPSS model ima prednost u odnosu na prethodni jer je njegova primena moguća u bilo kom momentu tokom bolesti, a modifikovan je tako što rizičnom faktoru, koncentraciji hemoglobina manjoj od 100g/L, dodeljuje dva, a ne jedan bod. Kao i prethodni i DIPSS PS ima četiri prognozne grupe, ali je broj ispoljenih parametara koje definišu stepen rizika promenjen u odnosu na IPSS PS.

Grupa istraživača sa Mayo klinike u Americi, statističkim analizama preživljavanja bolesnika sa PMF ustanovila je veću značajnost novih, ali i manju značajnost nekih od dijagnostičkih parametara. Elliott i saradnici su 2007. godine objavili PS koji izostavlja konstitutivne simptome kao faktor rizika, podrazumeva dve rizične vrednosti broja leukocita (manju od $4 \times 10^9/L$ i veću od $30 \times 10^9/L$) i uključuje broj trombocita i apsolutni broj monocita kao faktore rizika. Ovaj PS sadrži četiri prognozna parametra: koncentraciju hemoglobina ($<100g/L$), broj leukocita ($<4 \times 10^9/L$ ili $>30 \times 10^9/L$), broj trombocita ($<100 \times 10^9/L$) i broj monocita ($>1 \times 10^9/L$) i tri prognozne grupe sa različitim stepenom rizika: niskim, srednjim i visokim (160). Pomenuti Mayo PS se odnosi na mlađe bolesnike sa PMF, starosne dobi do 60 godina.

Iste godine, objavljen je PS koji se odnosi na sve bolesnike sa PMF (140). Ovaj sistem prognoze je dopunjeno izdanje prethodnog. Sadrži pet prognoznih parametara, pri čemu je prisustvo nezrelih ćelija u cirkulaciji ($\geq 1\%$) dodatni faktor rizika u odnosu na prethodni model. Takođe, sadrži prognozne grupe sa: niskim, srednjim i visokim stepenom rizika (140).

Prednost oba Mayo PS-a u odnosu na prethodne, je što se mogu primeniti pri inicijalnom pregledu bolesnika kada je često raspoloživa samo krvna slika, dok su podaci o konstitutivnim simptomima bolesnika često izostavljeni.

Kariotip bolesnika sa PMF predstavlja se kao nezavisan prognozni parametar, kako bi se preciznije zaključilo koje su hromozomske aberacije nosioci loše, a koje nosioci dobre prognoze bolesti, posmatrano kroz kumulativno preživljavanje bolesnika. Objavljeno je više različitih citogenetičkih prognoznih sistema (CPS-a) kojima se vrši stratifikacija kariotipa u odnosu na tip aberacija koje nose određen stepen rizika.

Lilski CPS (87) je jedan od najstarijih i najčešće primenjivanih. Po ovom sistemu, normalan kariotip je povoljan, a aberantan nepovoljan faktor rizika, pa se i stratifikacija bolesnika u analizama morbiditeta i mortaliteta vrši prema tipu kariotipa na pomenute dve prognozne grupe.

Tefferi i saradnici su 2005. godine objavili CPS koji podrazumeva podelu bolesnika prema kariotipu u tri prognozne grupe (115). Povoljan parametar je normalan kariotip,

srednje povoljan su 13q- i 20q-, dok su sve ostale aberacije nepovoljan prognostički parametar. Ova grupa istraživača ustanovila je malu razliku, statistički bez značaja, u preživljavanju bolesnika iz grupe sa povoljnim i srednje povoljnim aberacijama.

IPSS CPS koristi činjenicu da neke hromozomske aberacije predstavljaju parametar prognoze bolji i od normalnog kariotipa (116). Po ovom sistemu, definisane su četiri prognostičke grupe. Povoljan parametar su: +9, 13q- i 20q- kao jedine aberacije, normalan kariotip je srednje povoljan-1, srednje povoljan-2 je trizomija hromozoma 8 ili kompleksno aberantan kariotip i nepovoljan parametar je kariotip sa drugim hromozomskim rearanžmanima.

Iako najnoviji, DIPSS CPS sadrži dve prognostičke grupe, sa većim brojem hromozomskih i kariotipskih rearanžmana potvrđenih kao povoljan ili nepovoljan parametar prognoze (150).

Iako je poznat uticaj molekularnih markera *JAK2V617F* i *MPLW515L/K* za razvoj PMF, još uvek nije dovoljno ispitana korelacija ovih i ostalih prognostičkih parametara. Istraživanja su više bazirana na utvrđivanju nivoa genetičkog opterećenja oba, a pre svega *JAK2V617F* gena (60, 65, 120, 161). Rezultati analiza preživljavanja *JAK2V617F*-pozitivnih i *JAK2V617F*-negativnih bolesnika, govore o dužem preživljavanju bolesnika sa divljim tipom alela (120). Moguća su i preporučena nova ispitivanja korelacije mutiranog *JAK2* gena sa faktorima rizika različitih PS-a (120), kao i ispitivanje korelacije divljeg i mutiranog tipa alela sa kariotipom i hromozomskim aberacijama koje su različitog stepena rizika (23, 162, 163).

1.3.7. Lečenje bolesti

Lečenje PMF je simptomatsko. Ukoliko su bolesnici bez simptoma ili faktora rizika za nastanak komplikacija, racionalan pristup je kliničko praćenje bolesnika, a terapija se odlaže do ispoljavanja promena (81, 83, 89, 129, 164). Jedini terapijski pristup koji je doveo do produžetka preživljavanja sa mogućnošću izlečenja bolesnika je alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (ATMČH) (165). Međutim, u slučaju ATMČH, ukoliko se primeni mijeloablativni kondicioni protokol radi supresije imunog odgovora, rizik od smrtnosti je 25-48% (166, 167).

Terapijski tretman PMF se uslovno može podeliti na konvencionalni i eksperimentalni. Konvencionalni pristup podrazumeva terapijske modalitete koji se koriste za kontrolisanje i lečenje anemije, splenomegalije, proliferaciju ćelija mijeloidne loze i konstitutivne simptome.

Najvećim delom konvencionalni pristup lečenja je palijativan. Izražena mijeloproliferacija sa ispoljenom ekstramedularnom hematopoezom, može se suzbiti lekovima poput hidroksiuree (Litalir) koji je lek izbora za kontrolu leukocitoze, trombocitoze ili organomegalije (82, 128, 136, 168). Slično hidroksiurei, interferon alfa ili gama (INF α , INF γ) imaju citoreduktivan efekat (169), a u nekim slučajevima za alternativni tretman može se primeniti i kladribin (170).

Ukoliko se isključe uzroci koji se mogu lečiti (deficit hematinika, autoimuna hemolizna anemija) anemija u PMF se može kontrolisati androgenima. Mnogi od preparata androgenih hormona uspešno suzbijaju anemiju (kod 30-60% obolelih) međutim, brojni sporedni efekti ograničavaju širu primenu ovih preparata. Zbog manje izraženih neželjenih reakcija, najčešće se koristi sintetski, atenuirani androgen, danazol (171, 172). Alternativni pristup lečenja anemije je eritropoetinom (EPO). Povoljan efekat EPO je registrovan kod oko 30-50% bolesnika (173, 174). Bolji odgovor na terapiju se postiže kod pacijenata kod kojih je bazalni nivo EPO nizak (83, 129). Mogući su i tretmani koji uključuju kombinaciju androgena i EPO (85).

Splenektomija je važan pristup u lečenju PMF, ali je često rizik od ovog zahvata kod bolesnika sa izrazitom splenomegalijom visok. Najčešće komplikacije splenektomije su krvarenje, infekcije i tromboze. Indikacije za splenektomiju mogu biti simptomatska splenomegalija, refraktana na lečenje hidroksiureom, portalna hipertenzija i anemija koja zahteva česte transfuzije (175). Izrazita trombocitopenija takođe može biti indikacija, ali su takvi bolesnici veoma rizični i imaju lošu prognozu (175).

Kod bolesnika, kod kojih postoji povećan rizik od splenektomije, a posebno kod onih koji imaju bolove zbog čestih infarkta slezine, preporučuje se radioterapija. Međutim, kod oko četvrtine bolesnika nakon radioterapije slezine, javlja se produžena pancitopenija, najverovatnije zbog smanjenog broja cirkulišućih progenitornih ćelija hematopoeze u krvi. Zbog ovog efekta, rutinska zračna terapija se izbegava, osim kod izuzetnih slučajeva, te je poželjan individualni terapijski pristup. Radioterapija se može ponoviti i primeniti na drugim mestima ekstramedularne hematopoeze, takođe i kod ekstremne hepatomegalije (176).

Simptomi hiperkatabolizma (noćno znojenje, gubitak telesne težine, subfebrilnost i opšta slabost organizma) nastaju indirektno kao posledica dejstva mnogih citokina koji se oslobađaju i patogeno deluju u koštanoj srži. Među citokinima je i tumor nekrozni faktor α (TNF- α) koji vrši direktnu inhibiciju hematopoeze (177), stimuliše proliferaciju fibroblasta, ali je i ključni medijator povišene telesne temperature i slabosti organizma (178). Za kontrolu konstitucionih simptoma u terapijske svrhe se koriste antagonisti TNF- α među

kojima je najpoznatiji talidomid, ali i drugi analozi kao lenalidomid, lek druge generacije sa efikasnijom inhibicijom TNF- α , kao i pomalidomid, lek koji je u drugoj fazi kliničkog ispitivanja (179-182).

Nakon otkrića mutacije *JAK2V617F* i uloge ovog alela u patofiziologiji PMF, pokrenuta su mnoga istraživanja u farmakoindustriji i sintetisani su izvesni medikamenti koji funkcionišu po principu kinazne inhibicije. Međutim, postoje i terapeutici koji deluju na drugim nivoima simptomatologije i fiziologije bolesti. Novi terapijski modaliteti neformalno se mogu podeliti na JAK-STAT ciljanu terapiju i ostale terapijske pristupe izvan JAK-STAT signalnog domena. JAK-STAT ciljana terapija podrazumeva direktne inhibitore JAK1 i JAK2, kao što je ruxolitinib (183) i indirektne m-TOR inhibitore, kao što je everolimus (RAD001) (184).

Među terapijskim modalitetima koji ne obuhvataju JAK-STAT signalni put, najveća pažnja je usredsređena na lekove koji inhibiraju epigenetičke fenomene, metilaciju DNK ili deacetilaciju histonskih proteina.

Pomenuti terapijski modaliteti su još uvek u fazi ispitivanja i za sada se primenjuju u okviru kliničkih studija.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja su bili ispitivanje citogenetičkih parametara i molekularnog markera, mutacije *JAK2V617F* kod bolesnika sa *de novo* PMF. Iz osnovnih, proistekli su i dodatni ciljevi koji su podrazumevali ispitivanje i drugih dijagnostičkih parametara PMF, njihove međusobne korelacije i njihov uticaj na simptomatologiju bolesti i dužinu života bolesnika. Zbog toga su svi ciljevi svrstani u četiri grupe:

1. Ispitivanje citogenetičke i molekularno genetičke osnove PMF

- Ispitivanje učestalosti patološkog kariotipa
- Utvrđivanje tipa i učestalosti hromozomskih aberacija u patološkom kariotipu
- Ispitivanje učestalosti mutacije *JAK2V617F*
- Ispitivanje korelacije mutacije *JAK2V617F* sa tipom kariotipa (normalan i aberantan) i sa tipom hromozomskih aberacija

2. Ispitivanje povezanosti dijagnostičkih parametara na relaciji genotip-fenotip

- Ispitivanje korelacije kariotipa i hromozomskih aberacija sa stepenom fibroze koštane srži bolesnika

3. Ispitivanje proliferativnog potencijala PMF

- Ispitivanje stepena splenomegalije
- Ispitivanje distribucije apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija u perifernoj krvi
- Ispitivanje korelacije stepena fibroze koštane srži i apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija
- Ispitivanje korelacije splenomegalije i apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija
- Ispitivanje korelacije broja leukocita i blasta sa apsolutnim brojem cirkulišućih CD34+ ćelija

4. Ispitivanje uticaja dijagnostičkih parametara na dužinu života bolesnika sa PMF

- Ispitivanje kumulativnog preživljavanja bolesnika u odnosu na njihove kliničke i hemato-laboratorijske parametre, koristeći različite kliničke prognozne sisteme
- Ispitivanje kumulativnog preživljavanja bolesnika na osnovu molekularnog markera, mutacije *JAK2V617F*
- Ispitivanje kumulativnog preživljavanja bolesnika koristeći citogenetičke prognozne sisteme

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kriterijumi izbora ispitanika

Istraživanjem je obuhvaćeno 205 novootkrivenih bolesnika sa dijagnozom PMF. Bolesnici su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije (KCS). Studija je izvedena delom kao retrospektivna, a delom kao prospektivna. Retrospektivni deo odnosi se na citogenetičke rezultate 61 bolesnika lečenih u periodu od 1993. do 2003. godine (98). Prospektivnim ispitivanjem obuhvaćeno je 144 bolesnika, lečenih u periodu od 2004. do 2010. godine. Ispitivanje se odnosilo na analizu citogenetičkih rezultata i osnovnih kliničkih i hematološko laboratorijskih parametara bolesti. Kod 51 bolesnika je sprovedena i molekularno genetička analiza mutacije *JAK2V617F* i distribucija CD34+ ćelija u perifernoj krvi obolelih.

Prospektivno ispitivanje je prethodno odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije. Bolesnici su dali pristanak za sva osnovna ispitivanja sprovedena radi postavljanja dijagnoze bolesti, kao i pismenu saglasnost za dodatna, planirana ispitivanja prikupljenog biološkog materijala.

3.2. Klinička i hematološka ispitivanja

Iz osnovne medicinske dokumentacije prikupljeni su podaci o demografskim i kliničkim karakteristikama bolesnika: godine starosti, pol, prisustvo konstitutivnih simptoma, organomegalija, limfadenopatija, podaci o eventualnim prethodnim bolestima i tretmanima. Pored osnovnih kliničkih, utvrđeni su i standardni hematološki parametri:

Krvna slika: Standardna laboratorijska analiza gde se iz uzorka krvi bolesnika određuje broj eritrocita, trombocita, broj i tip leukocita, koncentracija hemoglobina.

Mijelogram: Analiza razmaza aspirata koštane srži dobijenih punkcijom grudne kosti ili ilijačnog grebena i bojenih metodom May-Grinwald-Giemsa (MGG). Celularnost punktata je procenjivana na osnovu kriterijuma Bernarda, određivanjem broja ćelija sa jedrom na mikroskopu na uveličanju 400 puta (185).

Patohistološki nalaz ili biopsija koštane srži: Biopsija koštane srži je urađena iz zadnje ilijačne kriste bolesnika, sa patohistološkom analizom biopsije.

Biopsijski uzorci su fiksirani u neutralnom puferisanom formalinu, dekalcifikovani u mravljoj kiselini, rutinski procesuirani i kalupljeni u parafinu, a zatim su sečeni i pripremani preparati debljine 4 μ m.

Morfološka analiza biopsije je rađena na preparatima bojenim standardnim metodama hematoksilin-eosin, Giemsa i reticulin (Gordon-Sweet). Procenjivani su stepen fibroze i celularnost u skladu sa preporukama SZO iz 2008. godine (94).

In vitro ćelijska kultura: Mononukleari iz koštane srži ili periferne krvi su nakon izolacije na gustinskom gradijentu u definisanom broju, kultivisani na polučvrstoj podlozi od metilceluloze ili kolagena, u prisustvu optimalnih koncentracija faktora rasta ili bez faktora stimulacije. Tokom 7-14 dana inkubacije, na temperaturi od 37°C, u uslovima apsolutne vlažnosti i 5% CO₂, formiraju se kolonije sastavljene od granulocita (CFU-GM), eritroblasta (BFU-E, CFU-E) i megakariocita (CFU-Mk), koje su brojane pod invertnim mikroskopom.

Određivanje veličine slezine: Na osnovu podataka iz medicinske dokumentacije, utvrđeno je da je veličina slezine određivana fizičkim pregledom i izražavana u centimetrima pod rebarnim lukom ili ultrazvučnom dijagnostikom, što je svakako precizniji metod.

Određivanje apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija: Određivanje apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija, primenom metoda imunofenotipizacije i protočne citometrije (IPCM), sprovedeno je prema internacionalnim preporukama i standardima (186-189). Za ispitivanje su korišćeni nativni uzorci periferne krvi bolesnika, uzimani venepunkcijom u standardnim epruvetama sa antikoagulansom (K₂EDTA). Uzorci periferne krvi 14 odraslih, zdravih osoba, poslužili su kao kontrola. Analiza je sprovedena istovremeno u duplikatu i u slučaju ispitivanih bolesnika i kontrolnih uzoraka.

U radu je korišćena metoda dvokolorne direktne imunofluorescencije, a merenje i analiza uzoraka vršena je metodom multiparametarske protočne citometrije. Rezultati su izražavani kao procenat CD34+ ćelija u populaciji nukleiranih ćelija periferne krvi i to kao aritmetička sredina dve vrednosti. Apsolutni broj CD34+ ćelija u perifernoj krvi (ćelije/ μ l) je izračunavan primenom metoda dvostruke-platforme (186-189) i to na osnovu procenta CD34+ ćelija (vrednost sa protočnog citometra) i koncentracije leukocita u ispitivanom uzorku periferne krvi (vrednost sa hematološkog brojača) (HORIBA Medical, ABX Pentra DX 120, Francuska).

3.3. Citogenetička i molekularno genetička ispitivanja

Ispitivanje kariotipa bolesnika vršeno je konvencionalnom procedurom, a pretraga molekularnog markera, mutacije V617F u egzonu 14 *JAK2* gena, molekularno genetičkim metodama.

Citogenetička analiza: Citogenetička analiza je rađena pri inicijalnom pregledu bolesnika pre bilo kakve terapije. Korišćene su nestimulisane ćelije iz aspirata koštane srži, a preparacija je obavljena odmah nakon dobijanja adekvatnog uzorka ili nakon 24-časovnog kultivisanja ćelija. Provera natalnog kariotipa vršena je stimulacijom limfocita periferne krvi na blastnu transformaciju, mitogenom fitohemaglutininom. Preparacija je rađena nakon 72-časovnog kultivisanja ćelija u optimalnim uslovima.

Tehnikom HG-traka (190) obrađeni su uzorci i pripremani hromozomi za analizu. HG-tehnika je modifikovana konvencionalna GTG-tehnika, prilagođena uslovima rada laboratorije za citogenetiku i molekularnu genetiku, Klinike za hematologiju, KCS. Osnovna razlika i specifičnost ove u odnosu na ostale standardne citogenetičke analize je kombinacija delovanja tripsina i kolcemida u hipotoničnoj fazi ćelijske preparacije.

Pripremljeni preparati su bojeni sa 2% rastvorom gimze u fosfatnom puferu (0,9% KH_2PO_4 i 1,2% Na_2HPO_4 , pH6,8), a zatim analizirani na svetlosnom mikroskopu (Opton-Axiophot). Citogenetička analiza je obavljena na deset pregledanih ćelija u metafazi kod normalnog ili na dvadeset mitoza u slučaju aberantnog kariotipa. Neke od mitoza su fotografisane, a kod bolesnika sa hromozomskim aberacijama pripreman je i fotodokumentovan kariogram.

Opisivanje kariotipa i definisanje hromozomskih aberacija vršeno je po preporukama Međunarodnog sistema nomenklature za humanu citogenetku iz 2009. godine (*engl.* ISCN-An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (191). Po ISCN preporukama, patološki klon je definisan nalazom najmanje dve ćelije sa istom strukturnom aberacijom, odnosno trizomijom istog hromozoma ili nalazom bar tri metafaze sa monozomijom istog hromozoma. Marker (mar) hromozom je strukturno izmenjen hromozom čiji se raspored traka ne može prepoznati, dok je derivat (der), hromatinski prepoznatljiv hromozom sa nepoznatim strukturnim rearanžmanom.

Molekularno genetičke analize za proveru mutacije *JAK2V617F*: Provera prisustva mutacije V617F u egzonu 14 gena *JAK2* izvršena je kod 51 pacijenata. Detekcija mutacije vršena je metodom alel-specifičnog PCR-a kod 35, a metodom DNK sekvenciranja kod 16 bolesnika.

Al-el-specifični PCR i detekcija JAK2V617F mutacije

Ispitivanje statusa *JAK2* gena analizom al-el-specifičnog PCR-a, vršeno je na uzorku DNK koji je prethodno izolovan iz granulocitnih i mononuklearnih ćelija periferne krvi. Odvajanje granulocita i mononuklearnih ćelija od ostalih elemenata krvi, izvedeno je metodom razdvajanja na dvostrukom gradijentu Ficoll-a (*engl.* Ficoll-Histopaque 1119, flotacione gustine 1.119g/ml i Ficoll-Histopaque 1077, flotacione gustine 1.077g/ml) (SIGMA, Aldrich, USA), prema uputstvu proizvođača. Time je omogućeno kompletno izolovanje i sakupljanje mijeloidnih ćelija krvi koje nose divlji ili mutirani *JAK2* gen.

Za ekstrakciju genomske DNK korišćen je QIAampDNA BloodMiniKit (QIAGEN, Germany). U lančanoj reakciji polimeraze ili analizi PCR-a, selektivno se umnožava odabrani region DNK u kojem se može nalaziti određena mutacija ili polimorfizam. Prajmeri koji se u reakciji koriste su specifični i svojim vezivanjem za određene nukleotidne sekvence ograničavaju region DNK koji se ispituje. Za razliku od standardne analize, al-el-specifični PCR koristi bar jedan prajmer koji je na svom 3' kraju komplementaran datoj mutaciji ili polimorfizmu. To znači da će se u prisustvu određenog alela prajmer vezati i započeti replikaciju samo ukoliko je sekvenca tog prajmera u potpunosti komplementarna sekvenci na DNK. Genotip, tj. prisustvo određenog alela, indikovaće pojavu amplifikovanog produkta. Dva ciklusa umnožavanja, tzv. nested PCR-a, se koristi da bi se povećala specifičnost DNK amplifikacije.

U radu je korišćen modifikovani protokol Baxter-a i saradnika (33). Modifikacija se odnosi na uvođenje "nested" PCR amplifikacije. U prvom ciklusu koriste se nizvodni, kontrolni prajmer (Fcont) i uzvodni prajmer (Rev), čime se umnožava region od 364bp u kome se potencijalno nalazi mutacija. Ovaj produkt umnožavanja se dobija i sa normalnog i sa mutiranog alela i služi kao interna kontrola PCR reakcije. U sledećem ciklusu PCR-a umnoženi produkt služi kao matrica. Za umnožavanje se koristi nizvodni, specifični prajmer (Fspec) koji se vezuje za mutirani alel i uzvodni prajmer (Rev). Ukoliko postoji mutacija u analiziranom regionu, nakon ovog ciklusa dobija se PCR produkt veličine 203bp.

Za PCR amplifikaciju korišćeno je 80ng DNK za svaki uzorak i QIAGEN Hot start polimeraza u svim reakcijama. U prvom ciklusu primenjen je 1μmol/l Fcont i Rev prajmera, a u drugom 1μmol/l Fspec i Rev prajmera (Tabela 6).

Tabela 6. Sekvence prajmera u detekciji mutacije *JAK2V617F* metodom Al-el-specifični PCR

Fkontrolni (Fcont)	5'ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG3'
Fspecifični (Fspec)	5'AGCATTTGGTTTTAAAT'TATGGAGTATATT3'
Reverzni (Rev)	5'CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA3'

Uslovi za prvi ciklus umnožavanja su 15 minuta na 95°C, a zatim 35 ciklusa (94°C, 58°C i 72°C, svaki u trajanju od 30 sekundi) i 10 minuta na 72°C finalne elongacije. Uslovi za drugi ciklus su isti, osim temperature hibridizacije prajmera, koja je bila 62°C (192). Proizvodi dobijeni primenom PCR su analizirani na 2% agaroznom gelu.

Identifikacija DNK sekvence

Elektroforeza PCR produkta je rađena na horizontalnom 2% agaroznom gelu. Agaroza je polisaharid koji nakon rastvaranja, kuvanja i laganog hlađenja, formira gustu mrežu koja služi kao matriks za detekciju i identifikaciju amplifikovanih PCR produkata. U električnom polju, u blago alkalnom puferu, molekuli DNK se kreću kroz agarozni matriks od katode ka anodi. Brzina kretanja molekula DNK zavisi od njihove veličine, gustine gela, električne struje i drugih parametara kao što su temperatura, puferski sistem itd.

Pufer, 1 puta koncentrovan TAE (0,04 M Tris-acetat; 0,002 M EDTA pH 8,0) koristi se za pripremanje gela i elektroforezu. Prilikom pripreme gela, dodaje se etidijum bromid u finalnoj koncentraciji 0,5µg/µl. Etidijum bromid je molekul koji se interkalira u DNK, ima sposobnost fluoroscencije pod UV svetlom i predstavlja najpogodnije sredstvo za identifikaciju DNK u agaroznom gelu.

DNK sekvenciranje i detekcija JAK2V617F mutacije

Molekuli DNK koji se ispituju izolovani su iz granulocita fenol-hloroformskom ekstrakcijom, a zatim su precipitirani etanolom.

Prilikom ispitivanja JAK2V617F mutacije, PCR-om umnoženi produkti su sekvencirani, a potom i analizirani (BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit; ABI Prism 3130 Automated DNK Sequencer).

Kvantitativna, u stvarnom vremenu izvođena, reakcija lančanog umnožavanja zasnovana na alelnom diskriminacionom eseju [(Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction-based allelic discrimination assay (AS-qPCRs)] je korišćena za detekciju broja kopija mutacije V617F u egzonu 14 JAK2 gena. Prajmeri korišćeni u pomenutoj analizi dati su u tabeli 7.

Tabela 7. Sekvence prajmera u detekciji mutacije JAK2V617F metodom AS- qPCRs

"sens" graničnici	normalan JAK2	5'-GCGCGGTTTTAAAT'TATGGAGTATGTG-3'
	mutiran JAK2V617F	5'-GCGCGGTTTTAAAT'TATGGAGTATGTT-3'
"antisens" graničnici	cDNK	5'-CCGCTTTTTTCAGATATGTATCTAGTGATCC-3'
	DNK	5'-GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC-3'

6-FAM probe	cDNK	5'-TGGAGACGAGAATATTCTGGTTCAGGAGTTTG-3'
	DNK	5'-TGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCT-3'

Broj kopija je određen poređenjem serije rastvora plazmida dobijenih kloniranjem *JAK2* i *ABL* gena preko cDNK ili DNK umnožaka iz ćelijske linije U937, koja sadrži nemutirani tip (*JAK2*-WT) i HEL (*engl. Human Erythroleukemia cell Line*) ćelijske linije, koja sadrži mutirani tip gena (*JAK2*V617F) u TOPO-TA vektorima (Invitrogene).

3.4. Prognozni sistemi i distribucija bolesnika na osnovu stepena rizika

Uticao dijagnostičkih parametara na kumulativno preživljavanje bolesnika vršeno je primenom prognoznih sistema. Značajnost kliničkih i hematološko laboratorijskih parametara ispitana je pomoću nekoliko PS-a: Lilskog, Servantesovog, IPSS, DIPSS, Mayo PS-a za sve bolesnike (87, 139, 138, 150, 140). Za mlađe bolesnike primenjen je Mayo PS (160) koji podrazumeva uzrasnu strukturu bolesnika do 60 godina. Servantesov PS (86) za mlađe bolesnike (starosti od 46 do 55 godina) nije mogao da bude primenjen, jer je broj bolesnika bio mali i nije zadovoljavao kriterijume statističke analize.

Dijagnostički kriterijumi primenjenih PS-a, definisani su kao faktori rizika i o njima je bilo reči u prethodnom poglavlju, a prikazani su tabelarno (Tabele 8-13).

Tabela 8. Lilski PS (87)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	hemoglobin <100g/L	1
2.	leukociti(<4x10 ⁹ /L ili >30x10 ⁹ /L)	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji	1
3.	visok	2

Tabela 9. Servatesov PS (139)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	godine života (>64)	1
2.	konstitutivni simptomi	1
3.	hemoglobin (<100g/L)	1
4.	blasti u cirkulaciji	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji-1	1
3.	srednji-2	2
4.	visok	3

Tabela 10. IPSS PS (138)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	godine života (>65)	1
2.	konstitutivni simptomi	1
3.	hemoglobin (<100g/L)	1
4.	leukociti (>25x10 ⁹ /L)	1
5.	blasti u cirkulaciji (>1%)	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji – 1	1
3.	srednji – 2	2
4.	visok	≥3

Tabela 11. DIPSS PS (150)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	godine života (>65)	1
2.	konstitutivni simptomi	1
3.	hemoglobin (<100g/L)	2
4.	leukociti (>25x10 ⁹ /L)	1
5.	blasti u cirkulaciji (>1%)	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji – 1	1 ili 2
3.	srednji – 2	3 ili 4
4.	visok	>4

Tabela 12. Mayo PS (140)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	hemoglobin (<100g/L)	1
2.	leukociti (<4x10 ⁹ /L ili >30x10 ⁹ /L)	1
3.	trombociti (<100x10 ⁹ /L)	1
4.	monociti (>1x10 ⁹ /L)	1
5.	blasti u cirkulaciji	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji	1
3.	visok	≥2

Tabela 13. Mayo PS za mlađe bolesnike (≤ 60 godina) (160)

Prognozni parametri		Bodovanje
1.	hemoglobin (<100g/L)	1
2.	leukociti (<4x10 ⁹ /L ili >30x10 ⁹ /L)	1
3.	trombociti (<100x10 ⁹ /L)	1
4.	monociti (>1x10 ⁹ /L)	1
Prognozne grupe (stepen rizika)		Broj faktora rizika
1.	nizak	0
2.	srednji	1
3.	visok	≥2

Po uzoru na druge relevantne studije (86, 87, 139) i u našem radu, rezultat citogenetičke analize je posmatran kao nezavisan prognozni parametar. Univarijantno ispitivanje značajnosti kariotipa i hromozomskih aberacija je praktično, zbog činjenice da citogenetička analiza može da bude neuspešna ili nevalidna pri dijagnozi bolesnika, a i tehnički ispravno, jer bolesnici sa različitim stepenom rizika na osnovu kliničkih i hematološko laboratorijskih parametara mogu imati različite varijetete hromozomskih aberacija u kariotipu (87).

Za analizu značajnosti kariotipa, odnosno hromozomskih aberacija u kumulativnom preživljavanju bolesnika korišćeni su CPS-i: Lilski, Mayo, IPSS i DIPSS (87, 140, 138, 150). Tipovi kariotipa i hromozomskih aberacija, nosioca različitog stepena rizika pomenutih CPS-a, prikazani su tabelarno (Tabele 14-17).

Tabela 14. Lilski CPS (87)

Prognozni parametri		Prognozne grupe
1.	normalan	povoljan
2.	aberantan	nepovoljan

Tabela 15. Mayo CPS (140)

Prognozni parametri		Prognozne grupe
1.	normalan	povoljan
2.	13q- ili 20q-	srednje povoljan
3.	ostale aberacije	nepovoljan

Tabela 16. IPSS CPS (138)

Prognozni parametri		Prognozne grupe
1.	+9 ili 13q- ili 20q-	povoljan
2.	normalan	srednje povoljan-1
3.	+8 ili kompleksno aberantan	srednje povoljan-2
4.	ostale aberacije	nepovoljan

Tabela 17. DIPSS CPS (150)

Prognozni parametri		Prognozne grupe
1.	solo 13q-t/dup(1q) solo 20q- solo +9 druge solo aberacije dve aberacije isključujući nepovoljne normalan	povoljan
2.	kompleksno aberantan solo +8 solo -7/7q- solo -5/5q- i(17q) inv(3) 12p- 11q23 dve aberacije uključujući nepovoljne	nepovoljan

3.5. Statistička analiza

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih statističkih metoda primenjeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike, parametarski i neparametarski.

Parametarski test primenjen u ovoj studiji je t test.

Neparametarski testovi primenjeni u studiji su:

- Hi kvadrat test
- Mann-Whitney U test

Pored testova razlike, izvršena je i analiza povezanosti i to Spirmanova korelaciona analiza. Za analizu preživljavanja korišćena je Kaplan-Meierova kriva preživljavanja, a međugrupne razlike su testirane Log-rank testom.

Svi podaci su obrađeni u SPSS 15.0 (Čikago, Illinois, SAD) softverskom paketu.

4. REZULTATI

4.1. Kriterijumi za ispitivanje bolesnika

Studijom su obuhvaćeni rezultati retrospektivnog i prospektivnog ispitivanja bolesnika sa dijagnozom PMF. Bolesnici su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 1993. do 2010. godine. Dijagnoza bolesnika je postavljena na osnovu kliničkih i patoloških kriterijuma za PMF (193, 194) uz reviziju dijagnoza bolesnika lečenih u periodu od 1993. do 2008., kada je SZO postavila nove kriterijume za mijeloidne neoplazme (78, 80).

4.2. Retrospektivno ispitivanje

Retrospektivno ispitivanje obuhvata bolesnike koji su lečeni u periodu od januara 1993. do decembra 2003. godine. Ispitivanje se odnosilo na utvrđivanje učestalosti patološkog kariotipa i tipa hromozomskih aberacija pri citogenetičkoj analizi bolesnika vršenoj u momentu postavljanja dijagnoze.

Istraživanjem je obuhvaćen 61 bolesnik. Žena je bilo 31, a muškaraca 30 prosečne starosti 63 godine (opseg godina 37-88). Analiza nije bila moguća kod 10 (16%) bolesnika zbog nedostatka ćelija u deobi. Trideset (59%) bolesnika je imalo normalan kariotip, a kod 21 (41%) detektovane su hromozomske aberacije. Mozaičan kariotip registrovan je kod 11 bolesnika, dok je kod 10 uočeno prisustvo samo patoloških ćelija u analiziranom uzorku. Rezultati patoloških kariotipova bolesnika prikazani su u tabeli 18, a učestalosti hromozomskih aberacija u tabeli 19.

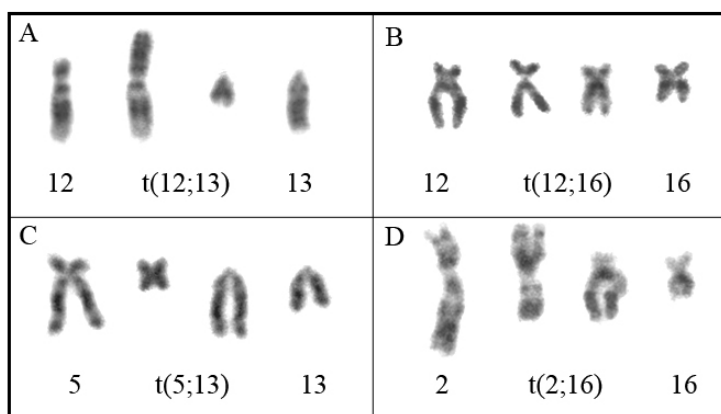
Tabela 18. Rezultati patoloških kariotipova bolesnika

Bolesnik	Pol/Godine	Kariotip
1	Ž/69	47,XX,+8[6]/46,XX[5]
2	Ž/57	46,XX,add(18)(q11)[9]/46,XX[2]
3	Ž/67	46,XY,t(2;16)(q31;q24)[16]
4	Ž/61	90,XXXX,-14,-20[5]/46,XX[10]
5	M/69	46,XY,add(4)(q25),-6,-8,-10,-12,+r,+3mar[cp20]
6	M/57	46,XY,-12,+mar[3]/46,XY[9]
7	Ž/67	46,XX,t(5;13)(q13;q32)[18]/46,XX[2]
8	M/77	47,XY,t(12;13)(p12;q13)[12]
9	Ž/67	46,XX,del(20)(q11q13)[11]
10	M/63	47,XY,+21[11]/46,XY[3]
11	Ž/41	48,XX,+X,+8[8]/46,XX[2]
12	Ž/81	48,XX,+8,+mar[4]/46,XX[6]
13	M/88	46,XY,-18,+mar[4]/[46,XY[2]
14	M/53	46,XY,-20,+mar[14]/47,XY,idem,+8[2]
15	Ž/74	46,XX,del(20)(q11q13)[3]/46,XX[7]
16	Ž/70	46,XX,add(6)(p23),del(11)(q11)[8]/51-62,XX,idem,+2,+4,+5,+6,+del(6)(q23),+7,+8,+9,+10,+11,+11,+12,+13,+14,+17,+20[2]/46,XX[10]
17	Ž/65	46,XX,del(18)(q21)[20]
18	Ž/52	46,XX,t(12;16)(q24;q24)[13]
19	M/75	46,X,-Y[20]
20	Ž/59	46,XX, del(13)(q13q32)[2]/46,XX,idem,del(11)(q21q23)[19]
21	Ž/50	46,XY,add(18)(p11)[20]

Tabela 19. Učestalosti hromozomskih aberacija

Aberacije hromozoma	Jedna lezija* (n=12)	Dve ili više lezija° (n=9)	Učestalost abercije (n=21)	Učestalost abercije (%)
Hromozom 8			6	28.5
+8	1	4		
-8		1		
Hromozom 12			5	23.8
-12		2		
+12		1		
t(12;13)	1			
t(12;16)	1			
Hromozom 20			5	23.8
del(20q)	2			
-20		2		
+20		1		
Hromozom 13			4	19.0
del(13q)		1		
t(12;13)	1			
t(5;13)	1			
+13		1		
Hromozom 18			4	19.0
der(18q)	2			
-18		1		
del(18q)	1			
Hromozom 9			1	4.7
+9	1			
Hromozom 21			1	4.7
+21	1			
Polni hromozomi			2	9.5
-Y	1			
+X		1		
Ekstra hromatinski materijal			5	23.8
mar		5		
* Prisustvo jedne numeričke ili strukturne aberacije u kariotipu				
° Prisustvo dve ili više numeričkih ili strukturnih aberacija u kariotipu				
n-Broj bolesnika				

Hromozom koji je najčešće aberantan je hromozom 8 (28%), a najučestalija aberacija je trizomija 8, kao jedina ili kao udružena sa dve ili više aberacija. Slede rearanžmani hromozoma 12 i 20 (24%), a zatim aberacije hromozoma 13 i 18 sa istom učestalošću (19%). Zastupljene su monozomije i trizomije pomenutih hromozoma, specifične delecije 13q- i 20q-, ali i neke od aberacija koje su retko opisane, kao del(18q) i derivat hromozoma 18. Trizomija hromozoma 9 bila je zastupljena u kompleksno aberantnom kariotipu jednog (5%) bolesnika, a trizomija 21 sa istom učestalošću registrovana je kao jedina kariotipska promena. Kod 2 (10%) bolesnika zabeležene su numeričke aberacije polnih hromozoma, a prisustvo dodatnog hromatinskog materijala (marker i ring hromozom) u kariotipu 5 (24%) bolesnika. Registrovane su i translokacije hromozoma 2, 5, 12, 13 i 16, prvi put opisane kod bolesnika sa PMF (Slika 15).



Slika 15. Parcijalni kariotipovi sa translokacijama. A-balansirana translokacija hromozoma 12 i 13; B-balansirana translokacija hromozoma 12 i 16; C-balansirana translokacija hromozoma 5 i 13; D-balansirana translokacija hromozoma 2 i 16.

4.3. Prospektivno ispitivanje

Prospektivnim istraživanjem obuhvaćeni su bolesnici lečeni u periodu od januara 2004. do decembra 2010. godine. Ovaj deo studije se odnosi na ispitivanje učestalosti hromozomskih aberacija i mutacije *JAK2V617F*, kao i ispitivanje drugih dijagnostičkih parametara, njihove međusobne korelacije i njihov uticaj na stepen preživljavanja bolesnika.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 144 bolesnika. Žena je bilo 55, muškaraca 89 (Grafikon 1), sa medijanom godine života 65 (opseg godina 28-80). Njihovi osnovni demografski, hematološki i dijagnostički parametri za PMF, prikazani su u tabeli 20.

Grafikon 1. Distribucija bolesnika različitog pola

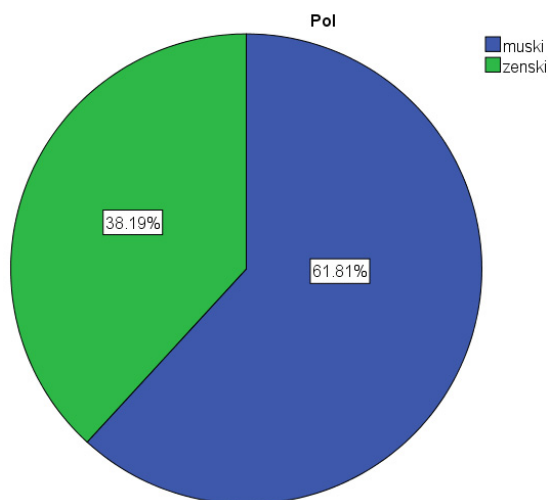


Tabela 20. Klinički i hematološko laboratorijski parametri pri dijagnozi bolesnika

Parametri	Medijana (opseg)	Broj ispitanih/broj registrovanih bolesnika (N/n)	Učestalost (%)
Godine života	65.5 (28-80)	144	100
Pol, M/Ž		144/89/55	62/38
Hemoglobin (Hb, g/L)	124.0 (45-181)		
Hb (<100g/L)		144/21	14.6
Leukociti (Le x10 ⁹ /L)	11.1 (1.6-83.2)		
Le (<4 ili >30x10 ⁹ /L)		144/19	13.2
Trombociti (Tr x10 ⁹ /L)	687.5 (28-2684)		
Tr (<100x10 ⁹ /L)		144/9	6.2
Blasti u cirkulaciji (≥1%)	(0-9)	144/21	14.6
Broj CD34+ (μl per.k), normalan/uvećan	21.0 (1-1325)	50/11/39	22/78
Konstitutivni simptomi		144/25	17.4
Palpabilana splenomegalija		137/98	71.5
Stepen fibroze koštane srži		138	
MF-0		138/3	2.2
MF-1		138/25	18.1
MF-2		138/66	47.8
MF-3		138/44	31.8
Validna citogenetička analiza		144/126	87.5
Kariotip, normalan / aberantan		126/90/36	71.4/28.6
JAK2V617F, poz/neg		51/28/23	54.9/45.1

4.3.1. Citogenetičko ispitivanje

Citogenetička analiza je urađena kod 126 (88%) bolesnika. Kod 18 (12%) bolesnika analiza nije bila moguća zbog suve punkcije koštane srži ili zbog niskog mitotskog indeksa ili nedostatka ćelija u deobi. Devedeset bolesnika je imalo normalan kariotip, a jedna bolesnica Robertsonovu translokaciju što predstavlja polimorfizam normalnog kariotipa (72%). Kod 36 (28%) bolesnika registrovane su hromozomske aberacije (Grafikon 2). Prisustvo samo patoloških ćelija u analiziranom uzorku imalo je 14 bolesnika, a kod 22 registrovana je koegzistencija patoloških i normalnih ćelija (Tabela 21).

Grafikon 2. Distribucija bolesnika sa normalnim i aberantnim kariotipom.

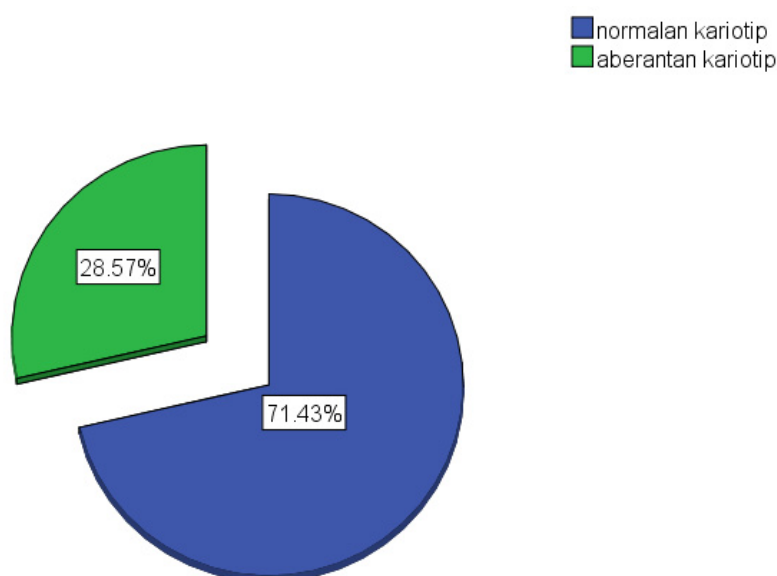


Tabela 21. Patološki kariotipovi bolesnika

Bolesnik	Pol/Godine	Kariotip
1	Ž/64	47,XX,+8[3]/48XX,+8,+10[5]/46XX[2]
2	M/77	46,XY,del(6)(p23),del(8)(q22)[20]
3	M/60	46,XY,del(13)(q12q22)[19]/46,XY[1]
4	M/68	47,XY,+mar[20]
5	M/57	46,XY,-7,+dmin[15]/46,XY[5]
6	M/62	46,XY,del(20)(q11q13)[20]
7	Ž/48	46,XX,rob(13;14)(q10;q10)[10]
8	Ž/65	47,XX,+9[1]/46,XX[19]
9	Ž/50	46,XX,del(13)(q12q22)[19]/46,XX[1]

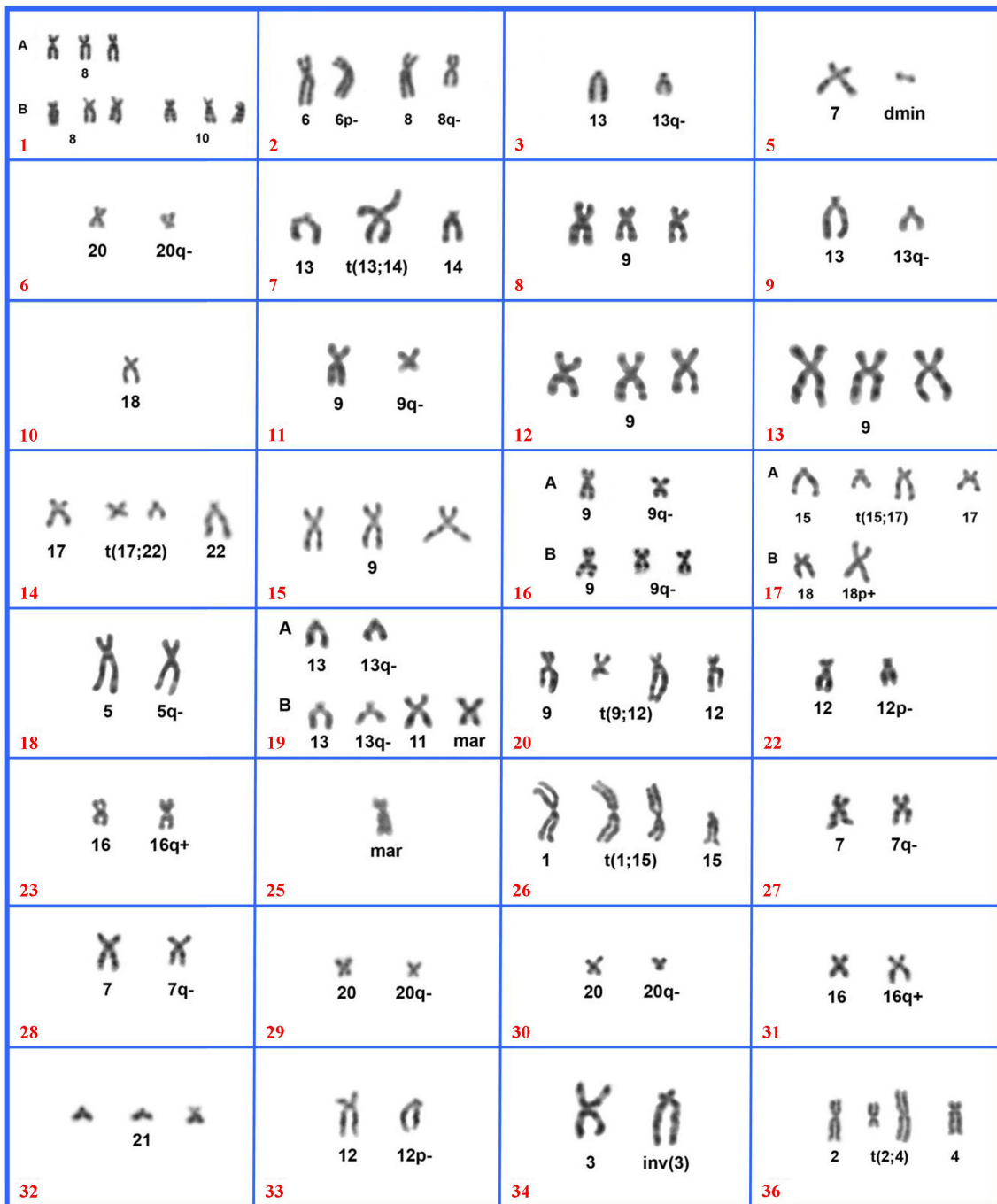
Bolesnik	Pol/Godine	Kariotip
10	Ž/64	45,XX,-18[3]/46,XX[17]
11	M/72	46,XY,del(9)(q21)[8]/46,XY[5]
12	Ž/62	47,XX,1qh+c,+9[5]/46,XX,1qh+c[5]
13	M/73	47,XY,+9[6]/[46,XY[9]
14	Ž/80	46,XX,t(17;22)(q11;q13)[20]
15	M/62	47,XY,+9[3]/46,XY[13]
16	Ž/45	46,XX,del(9)(q22)[3]/47,XX,idem,+del(9)(q22)[17]
17	M/58	46,XY,t(15;17)(q22;q25)[15]/46,XY,add(18)(p11)[3]
18	M/63	46,XY,del(5)(q13q31)[9]/46,XY[8]
19	Ž/59	46,XX,del(13)(q12q22)[1]/46,XX,idem,-11,+mar[19]
20	M/70	46,XY,t(9;12)(q22;q24)[2]/46,XY[20]
21	Ž/70	46,XX, add(18)(p11)[18]/≈52,XX[2]
22	M/75	46,XY,del(12)(p11p13)[3]
23	Ž/54	46,XX,ins(16)(q?)[2]/46,XX[8]
24	M/79	48,XY,+2mar[8]/46,XY[12]
25	M/80	47,XY,+mar[10]
26	Ž/70	46,XX,der(15)t(1;15)(cen;cen)[20]
27	M/75	46,XY,del(7)(q31)[12]/46,XY[8]
28	M/70	46,XY,del(7)(q32)[18]/46,XY[2]
29	Ž/60	46,XX,del(20)(q11q13)[20]
30	M/69	46,XY,del(20)(q11q13)[10]
31	Ž/66	46,XX,add(16)(q?)[11]/46,XX[3]
32	M/768	47,XY,+21[3]/46,XY[10]
33	M/73	46,XY,del(12)(p11p13)[20]
34	Ž/61	46,XX,inv(3)(p13q27)[3]/46,XX[7]
35	M/50	45,X,-Y[10]
36	Ž/70	46,XX,t(2;4)(q21;p16)[10]
37	M/76	45,X,-Y[10]

Hromozom koji je načešće aberantan je 9 (16%), a najčešća aberacija je trizomija 9, prisutna kao jedina u kariotipu tri bolesnika. Zastupljene su delecija i translokacija ovog hromozoma. Slede aberacije hromozoma 13 i to 13q- i translokacija (11%). Delecija 20q i aberacije hromozoma 7, 12 i 18 registrovane su sa istom učestalošću (8%). Ređe zastupljene su aberacije hromozoma 1, 8, 15, 16, 17, Y (5%) i aberacije hromozoma 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 14 i 21 (3%), sa monozomijom, trizomijom, translokacijom i inverzijom pomenutih hromozoma. Ekstrahromatinski materijal u vidu markera i duplo minutnog (dmin) hromozoma, konstatovan je kod 4 (11%) bolesnika. Pomenute hromozomske aberacije i njihove učestalosti prikazane su u tabeli 22, a parcijalni kariotipovi nekih bolesnika prikazani su na slici 16.

Tabela 22. Učestalosti hromozomskih aberacija

Aberacije hromozoma	Jedna lezija* (n=29)	Dve ili više lezija° (n=8)	Učestalost abercije (n=37)	Učestalost abercije (%)
Hromozom 1			2	5.4
1qh+c		1		
der(15)t(1;15)	1			
Hromozom 2			1	2.7
t(2;4)	1			
Hromozom 3			1	2.7
inv(3)	1			
Hromozom 4			1	2.7
t(2;4)	1			
Hromozom 5			1	2.7
del(5)	1			
Hromozom 6			1	2.7
del(6)	1			
Hromozom 7			3	8.1
del(7)	2		2	
-7		1	1	
Hromozom 8			2	5.4
+8		1		
del(8q)		1		
Hromozom 9			6	16.2
+9	1	2		
del(9q)		2		
t(9;12)	1			
Hromozom 10			1	2.7
+10		1		
Hromozom 11			1	2.7
-11		1		
Hromozom 12			3	8.1
del(12p)	2			
t(9;12)	1			
Hromozom 13			4	10.8
del(13q)	2	1		
t(13;14)	1			
Hromozom 14			1	2.7
t(13;14)	1			
Hromozom 15			2	5.4
der(15)t(1;15)	1			
t(15;17)	1			
Hromozom 16			2	5.4

Aberacije hromozoma	Jedna lezija* (n=29)	Dve ili više lezija° (n=8)	Učestalost abercije (n=37)	Učestalost abercije (%)
ins(16q)	1			
add(16q)	1			
Hromozom 17			2	5.4
t(15;17)	1			
t(17;22)	1			
Hromozom 18			3	8.1
-18	1			
add(18p)	1	1		
Hromozom 20			3	8.1
del(20q)	3			
Hromozom 21			1	2.7
+21	1			
Hromozom 22			1	2.7
t(17;22)	1		1	
Polni hromozomi			2	5.4
-Y	2			
Ekstra hromatinski materijal			4	10.8
mar	1	2		
dmin		1		
* Prisustvo jedne numeričke ili strukturne aberacije u kariotipu				
° Prisustvo dve ili više numeričkih ili strukturnih aberacija u kariotipu				
n-Broj bolesnika				



Slika 16. Parcijalni patološki kariotipovi bolesnika

A i B- Prisustvo dva patološka ćelijska klona

Napomena: Brojevi iz tabele se poklapaju sa rednim brojevima patoloških kariotipova bolesnika iz tabele 5.

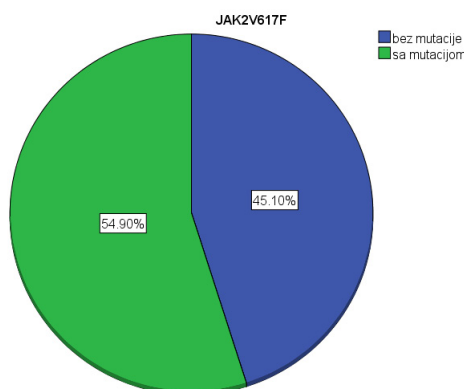
Sagledavajući sveobuhvatno rezultate retrospektivnog i prospektivnog ispitivanja, može se ustanoviti da je ukupan broj bolesnika obuhvaćen ispitivanjem bio 205. Citogenetička analiza je sprovedena kod 177 (86%) bolesnika. Kod 28 (14%) bolesnika analiza nije bila moguća. Patološki kariotip je registrovan kod 57 (32%) bolesnika. Od specifičnih hromozomskih aberacija za PMF registrovane su +8, +9, 13q-, 20q-, kod ukupno 19 bo-

lesnika sa učestalošću 34%. Zabeležene su i druge nespecifične aberacije za PMF kao što su balansirane translokacije, ekstra hromatinski materijal, kompleksno aberantan kariotip.

4.3.2. Molekularno genetičko ispitivanje

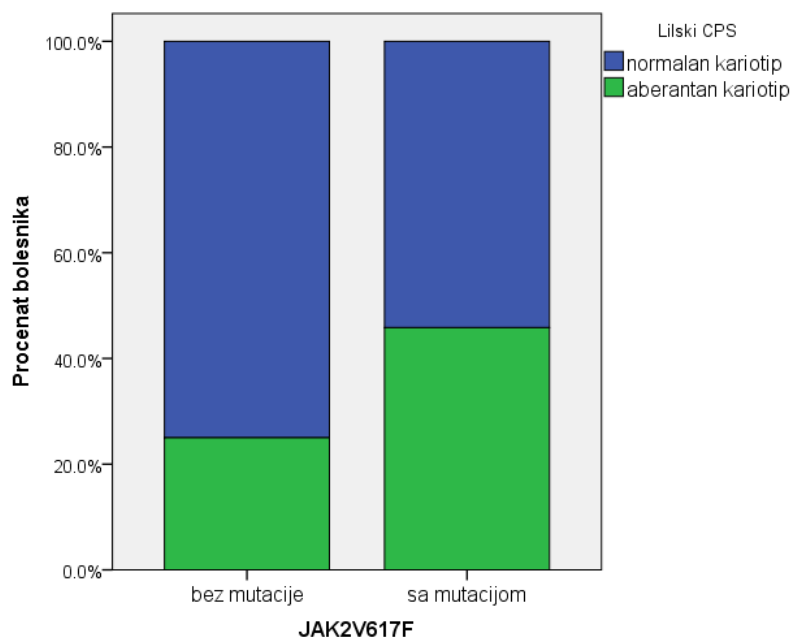
Ispitivanje prisustva mutacije V617F na genu *JAK2* izvršeno je kod 51 bolesnika. Mutacija je registrovana kod 28 (55%) bolesnika, a kod 23 (45%) bolesnika nije bilo pomenute mutacije (Grafikon 3).

Grafikon 3. Distribucija bolesnika na osnovu registrovane mutacije *JAK2*V617F



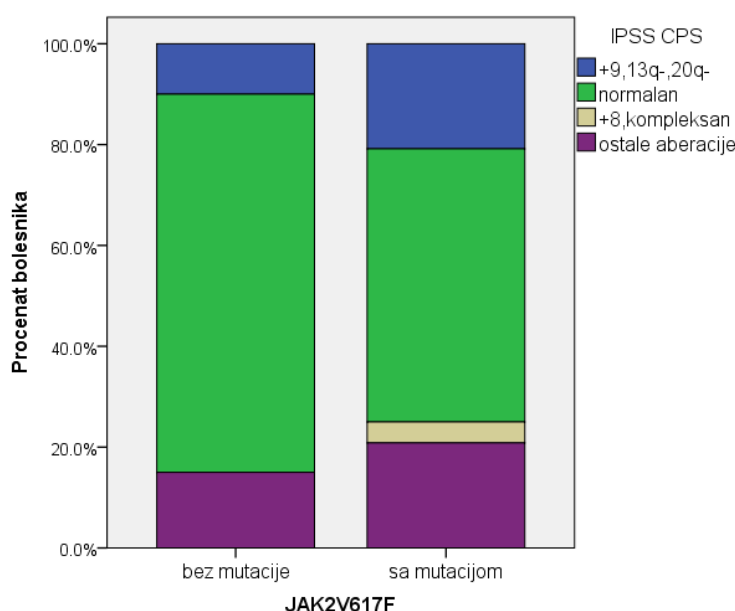
Ispitivanjem korelacije mutacije *JAK2*V617F i kariotipa primenom Lilskog CPS-a, ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike ($X^2=2.046$; $p=0.153$) između prognozno povoljne (normalan kariotip) i nepovoljne (aberantan kariotip) grupe bolesnika (Grafikon 4). U obe grupe bolesnika sa i bez mutacije, registrovano je više bolesnika sa normalnim kariotipom (75% i 54%), u odnosu na one sa aberantnim kariotipom (25% i 46%).

Grafikon 4. Korelacija kariotipa i mutacije *JAK2*V617F



Ispitivanjem korelacije mutacije *JAK2V617F* i kariotipa koristeći IPSS CPS, ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike ($Z=-0.055$; $p=0.956$) između grupa bolesnika koji su probandi hromozomskih aberacija različitog stepena rizika. Nije registrovana povezanost mutacije i hromozomskih aberacija (Grafikon 5). U grupi bolesnika bez mutacije, najviše je sa normalnim kariotipom (75%), najmanje (10%) sa hromozomskim aberacijama koje su prognozno povoljne: +9, 13q- i 20q-. U grupi bolesnika sa mutacijom, takođe je najviše sa normalnim kariotipom (54%), dok su bolesnici sa povoljnim kariotipskim promenama (+9, 13q-, 20q-) zastupljeni u istoj distribuciji kao i bolesnici sa ostalim hromozomskim aberacijama (21%). Bolesnici sa +8 ili kompleksno aberantnim kariotipom bili su pozitivni na *JAK2V617F* (4%).

Grafikon 5. Korelacija hromozomskih aberacija i mutacije *JAK2V617F*

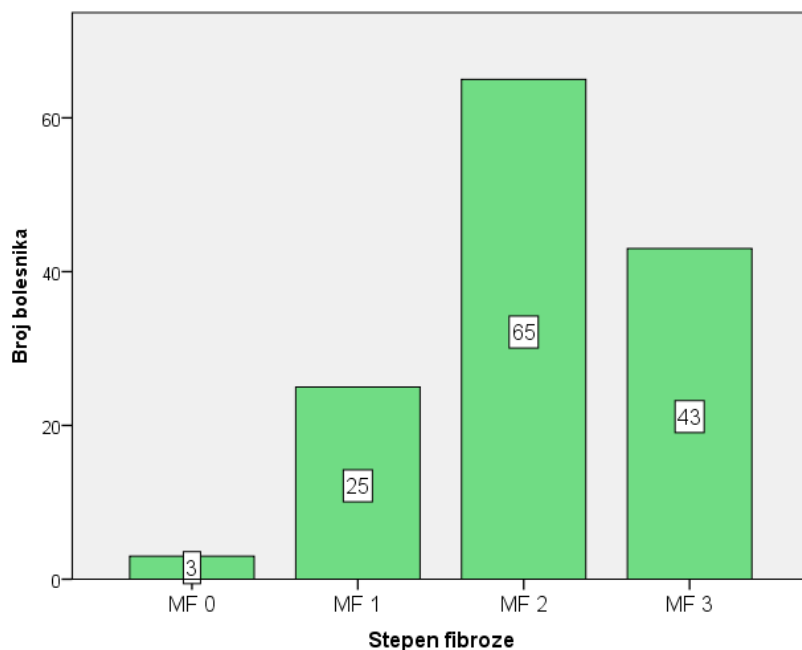


4.3.3. Ispitivanje stepena fibroze, splenomegalije i distribucije CD34+ ćelija

Iz arhivskih podataka bolesnika uzeti su podaci o stepenu fibroze koštane srži i dimenzije slezine (izražene u centimetrima). Distribucija apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija bolesnika određena je u odnosu na kontrolne vrednosti. Ispitana je korelacija citogenetičkih rezultata sa stepenom fibroze koštane srži i apsolutnim brojem CD34+ ćelija u perifernoj krvi bolesnika, što je dalo jasniju sliku o kliničkom statusu i povezanosti genotipa i fenotipa bolesti.

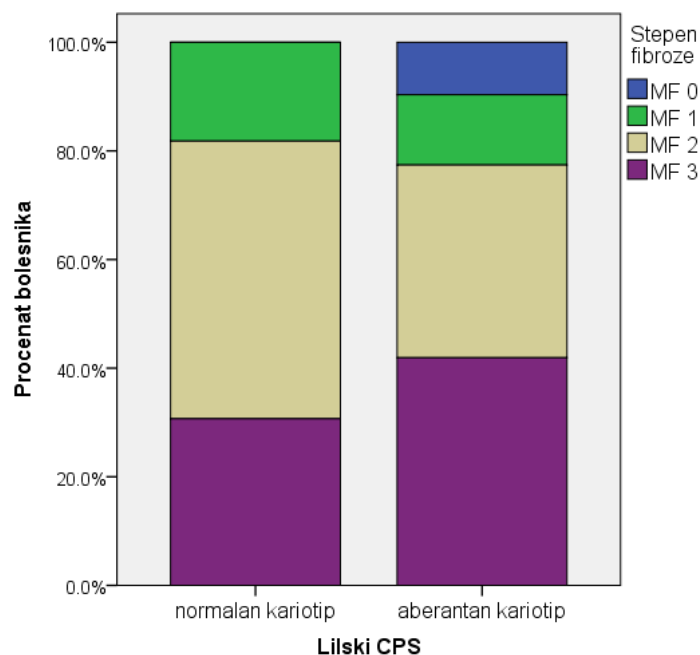
Patohistološki nalaz bio je dostupan kod 136 bolesnika. Najveći broj bolesnika (48%) je imao stepen fibroze gradusa MF-2 (Grafikon 6).

Grafikon 6. Distribucija bolesnika sa različitim stepenom fibroze koštane srži



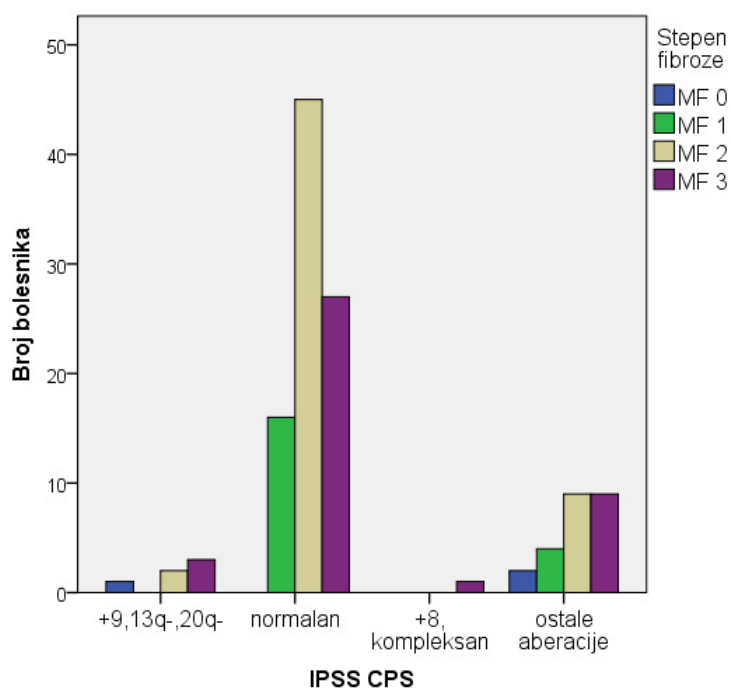
Ispitivanjem korelacije stepena fibroze koštane srži i kariotipa, koristeći Lilski CPS, ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike ($Z=-0.393$; $p=0.694$) između prognozno povoljne (normalan kariotip) i nepovoljne (aberantan kariotip) grupe bolesnika. Nije registrovana povezanost patološkog kariotipa sa stepenom fibroze koštane srži (Grafikon 7). Od bolesnika sa normalnim kariotipom najviše je sa stepenom fibroze MF-2 (51%), zatim sa fibrozom MF-3 (31%), a najmanje sa MF-1 (18%). U grupi bolesnika sa patološkim kariotipom najviše je sa MF-3 (42%), manje sa MF-2 (36%), a najmanje sa MF-1 i MF-0 (13% i 10%) gradusom fibroze.

Grafikon 7. Korelacija kariotipa i stepena fibroze koštane srži



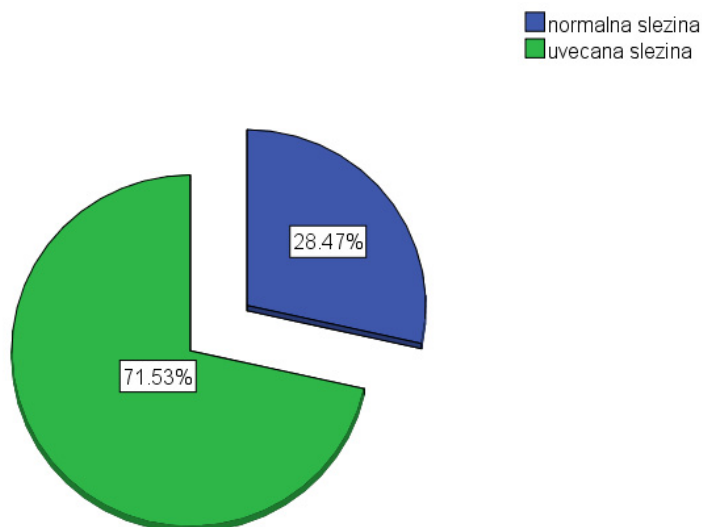
Ispitivanjem korelacije stepena fibroze koštane srži i kariotipa, koristeći IPSS CPS, takođe nije registrovana statistički značajna razlika ($\rho=-0.016$; $p=0.862$). Nije uočena povezanost hromozomskih aberacija različitog stepena rizika sa stepenom fibroze koštane srži bolesnika (Grafikon 8). Kod bolesnika sa normalnim kariotipom, najviše je sa MF-2 (51%), manje sa MF-3 (31%), najmanje sa MF-1 (18%) stepenom fibroze. Kod bolesnika sa povoljnim citogenetičkim markerima (+9, 13q-, 20q-), najviše je bolesnika sa MF-3 (50%), zatim sa MF-2 (33%), najmanje sa MF-0 (17%), dok bolesnika sa gradusom fibroze MF-1 nije bilo. Jedan bolesnik sa trizomijom hromozoma 8 je sa stepenom fibroze MF-3. U grupi bolesnika sa drugim aberacijama, podjednako su zastupljeni oni sa MF-2 i MF-3 (po 38%), zatim sa MF-1 (17%), a najmanje je bolesnika sa gradusom fibroze MF-0 (8%).

Grafikon 8. Korelacija hromozomskih aberacija i stepena fibroze koštane srži



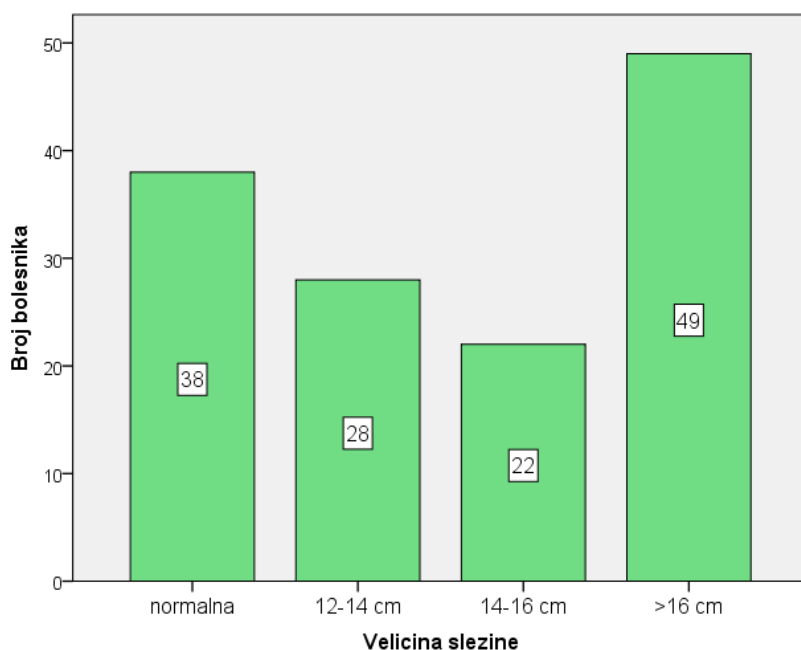
Detaljni podaci o veličini slezine bili su dostupni kod 137 bolesnika. Splenomegalija je ispoljena kod 98 (72%) bolesnika (Grafikon 9).

Grafikon 9. Distribucija bolesnika na osnovu veličine slezine



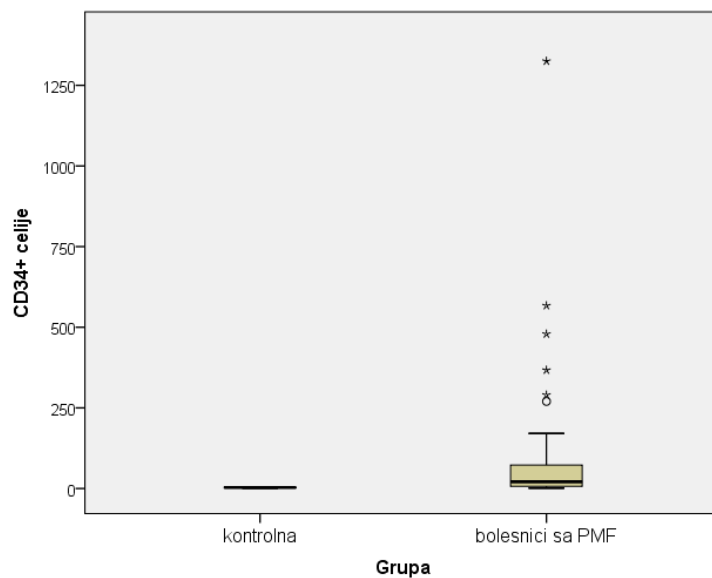
Radi preciznijih analiza i na osnovu literaturnih preporuka (195, 196), urađena je i distribucija veličine slezine u četiri kategorije: normalna i splenomegalija niskog, srednjeg i visokog stepena. Svaki stepen splenomegalije podrazumeva uvećanje slezine u rasponu dodatna dva centimetara, pri čemu splenomegaliju visokog stepena ili izrazitu splenomegaliju predstavlja slezina veća od 16 cm. Ustanovljeno je da je najveći broj bolesnika (34%) imao izrazitu splenomegaliju (Grafikon 10).

Grafikon 10. Distribucija bolesnika na osnovu kategorizovane veličine slezine



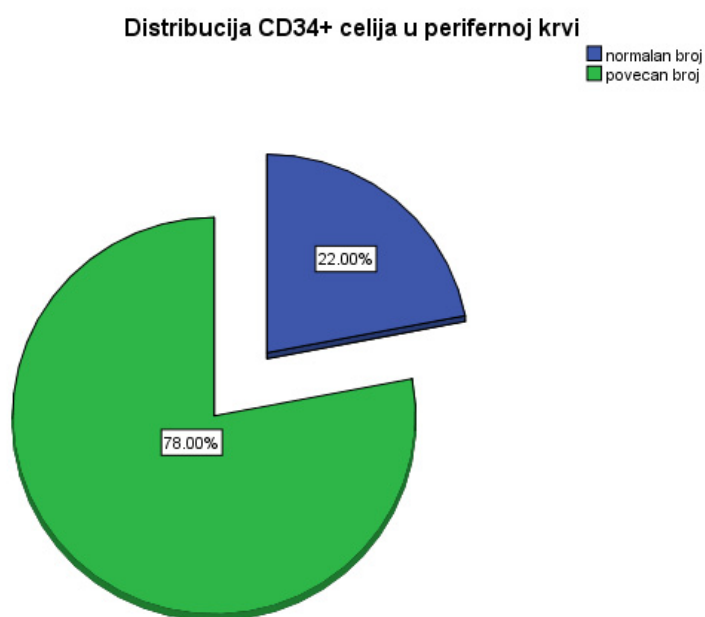
Kod 50 bolesnika ispitana je distribucija apsolutnog broja cirkulišućih CD34+ ćelija. Statistički značajna razlika ($Z=-4.705$; $p<0.001$) uočena je između kontrolne grupe (14 zdravih osoba) i ispitanih bolesnika u distribuciji CD34+ ćelija u perifernoj krvi (Grafikon 11).

Grafikon 11. Distribucija apsolutnog broja CD34+ u kontrolnoj i ispitanoj grupi bolesnika



Povećani broj ćelija registrovan je kod 39 (78%) bolesnika, dok je 11 bolesnika imalo distribuciju ćelija u granicama kontrolnih vrednosti (Grafikon 12).

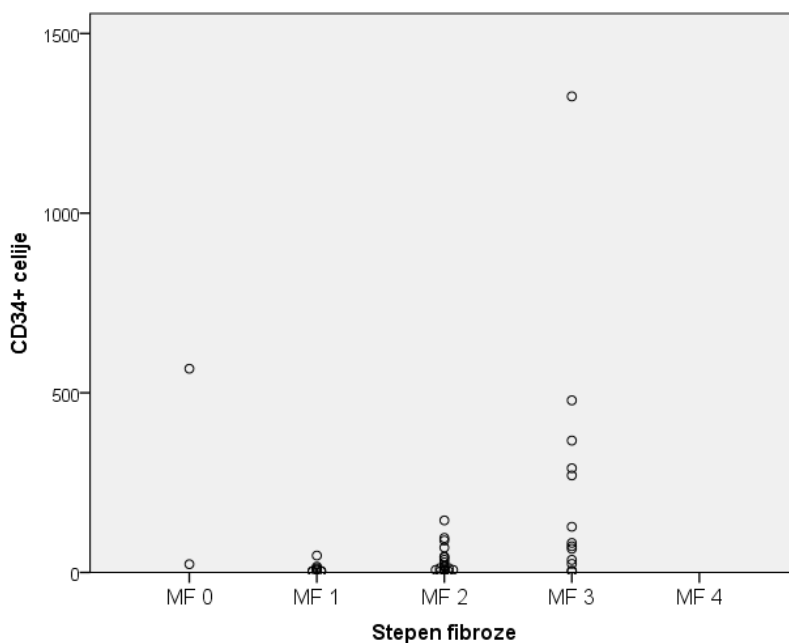
Grafikon 12. Distribucija bolesnika sa normalnim i povećanim brojem CD34+ ćelija u perifernoj krvi



Imajući u vidu činjenicu da se broj progenutornih ćelija povećava u perifernoj krvi srazmerno stepenu fibroze u koštanoj srži i veličini slezine, testirana je korelacija ovih parametara i u našoj grupi bolesnika.

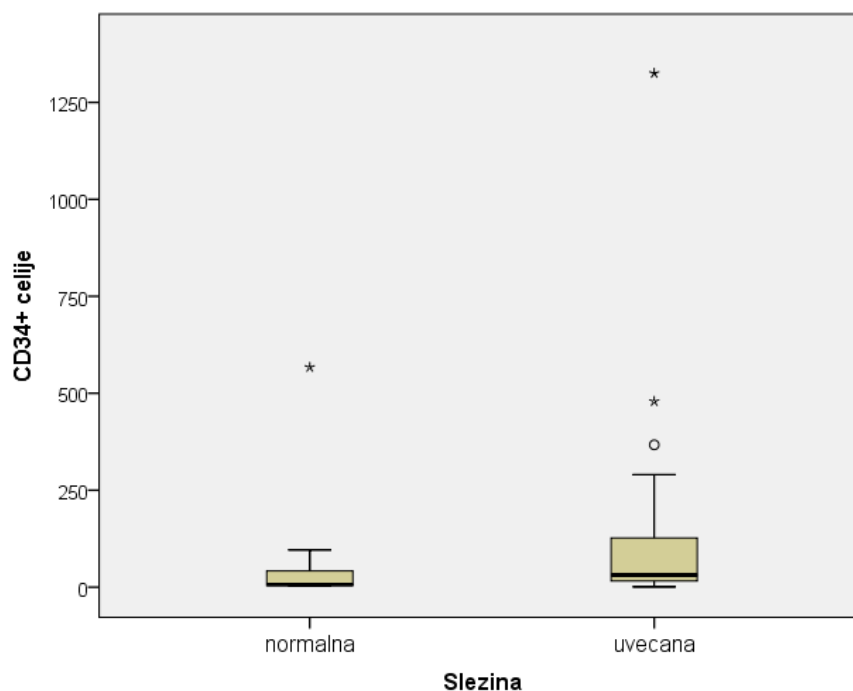
Testiranje povezanosti stepena fibroze i distribucije CD34+ ćelija bila je moguća kod 45 bolesnika. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija ($\rho=0.432$; $p=0.003$) između stepena fibroze i apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi bolesnika (Grafikon 13).

Grafikon 13. Korelacija stepena fibroze koštane srži i distribucije CD34+ ćelija u perifernoj krvi

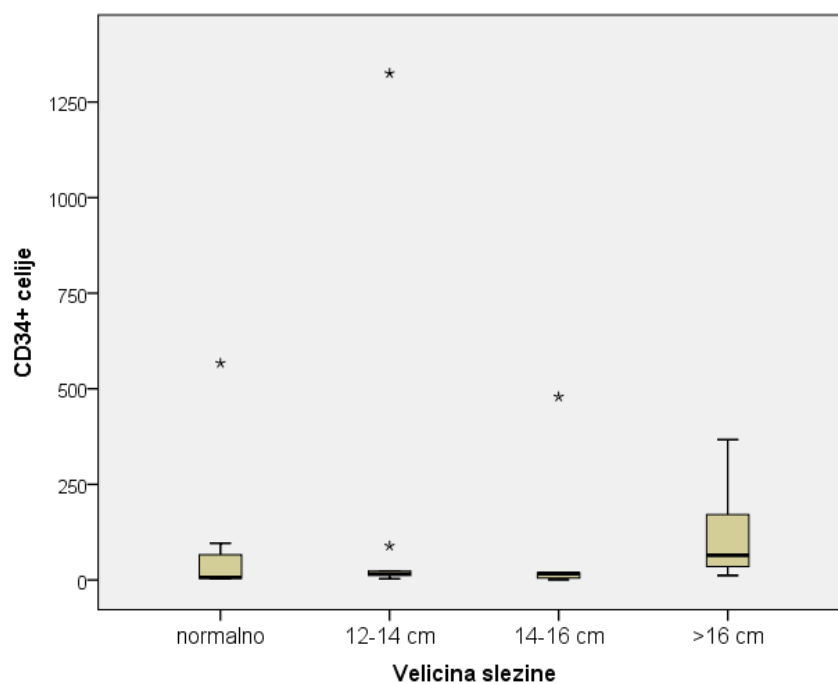


Testiranje povezanosti veličine slezine i distribucije CD34+ ćelija u cirkulaciji urađeno je kod 47 bolesnika. Uočena je statistički značajna razlika ($Z=-2.372$; $p=0.018$), u distribuciji CD34+ ćelija u perifernoj krvi, između bolesnika sa normalnom slezinom i bolesnika sa uvećanom slezinom (Grafikon 14). Takođe je registrovana i statistički značajna razlika ($\rho=0.385$; $p=0.008$) u distribuciji CD34+ ćelija u perifernoj krvi, između grupa bolesnika podeljenih u odnosu na kategorizovanu veličinu slezine (Grafikon 15). Najveći broj bolesnika sa splenomegalijom visokog stepena ($>16\text{cm}$), imao je i povišen apsolutni broj CD34+ ćelija u perifnoj krvi.

Grafikon 14. Korelacija splenomegalije i distribucije CD34+ ćelija u perifernoj krvi



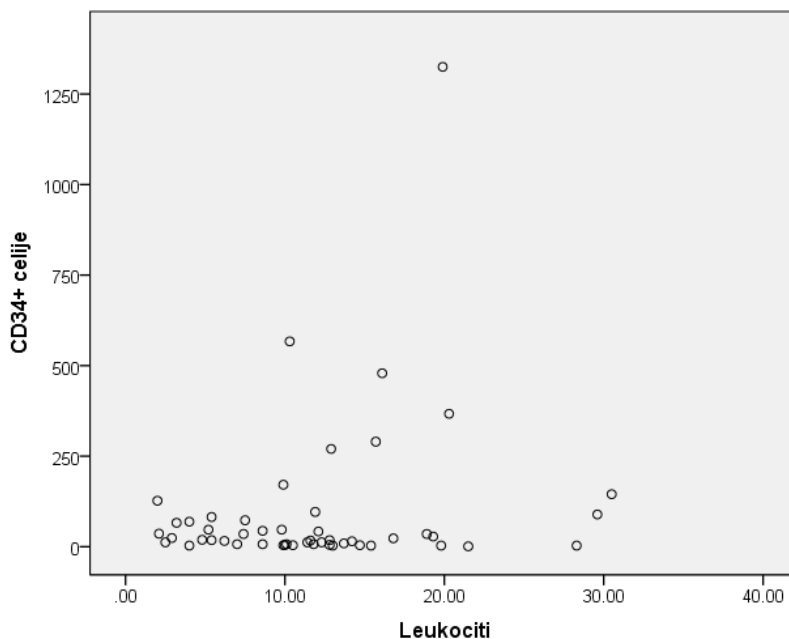
Grafikon 15. Korelacija kategorizovane veličine slezine i distribucije CD34+ ćelija u perifernoj krvi



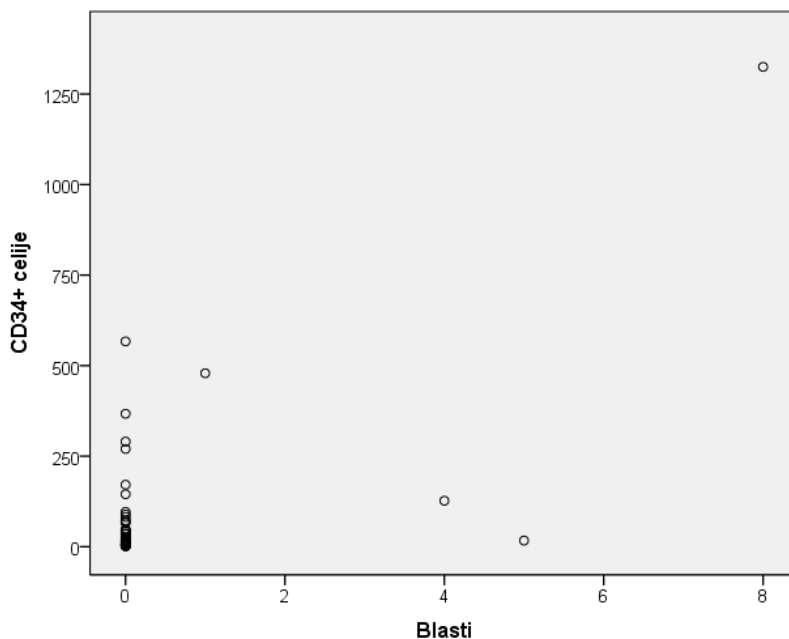
Od hematoloških laboratorijskih parametara, značajno je bilo testirati korelaciju između broja leukocita i blasta sa distribucijom cirkulišućih CD34+ ćelija. Korelacija nije registrovana između CD34+ ćelija i leukocita ($\rho=-0.039$; $p=0.790$), ali je nađena značajna, pozitivna korelacija između CD34+ ćelija i blasta ($\rho=0.305$; $p=0.031$) u perifernoj krvi bo-

lesnika (Grafikoni 16 i 17).

Grafikon 16. Korelacija distribucije CD34+ ćelija i leukocita u perifernoj krvi



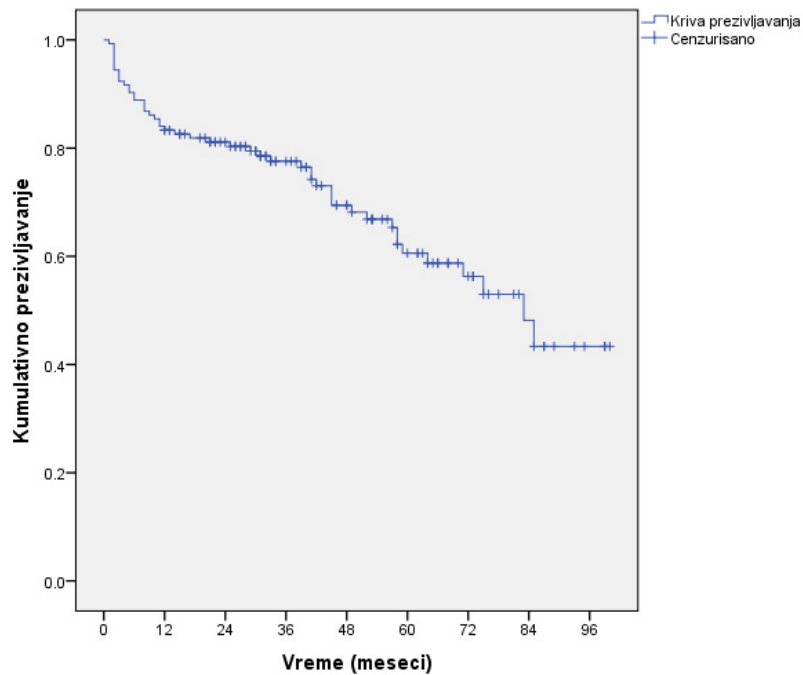
Grafikon 17. Korelacija distribucije CD34+ ćelija i blasta u perifernoj krvi



4.3.4. Uticaj dijagnostičkih parametara na preživljavanje bolesnika

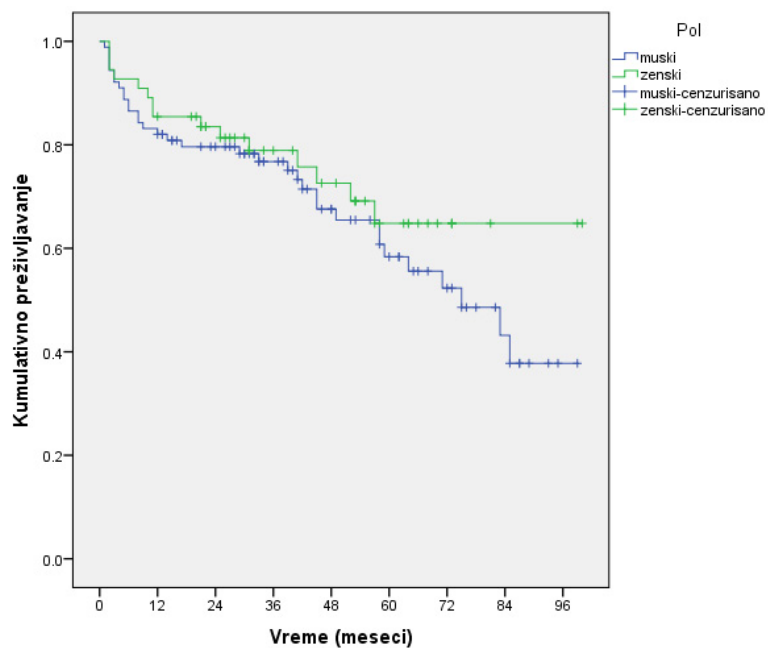
U ispitanoj grupi bolesnika u posmatranom periodu (od 2004. do 2010. godine) umrlo je 49, a ostalo je 95 živih bolesnika. Medijana kumulativnog preživljavanja iznosi 83 meseca (interval poverenja 67.66-98.34) (Grafikon 18).

Grafikon 18. Kumulativno preživljavanje bolesnika



Statistička analiza preživljavanja u odnosu na pol bolesnika pokazala je da nema razlike u preživljavanju između polova ($X^2=0.862$; $p=0.353$) (Grafikon 19).

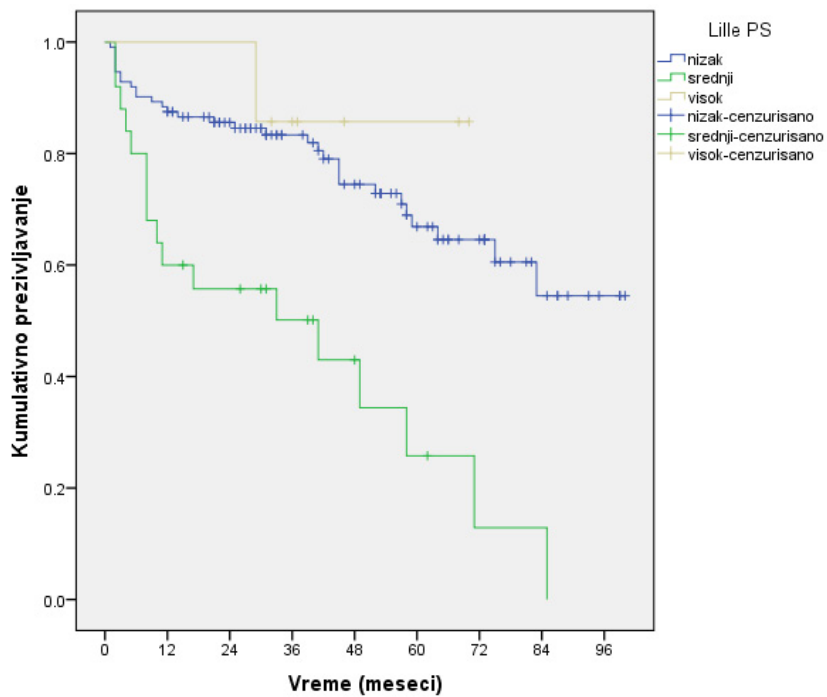
Grafikon 19. Kriva preživljavanja bolesnika u odnosu na pol.



Ispitivanje kumulativnog preživljavanja bolesnika na osnovu kliničkih i laboratorijskih parametara vršeno je preko PS-a.

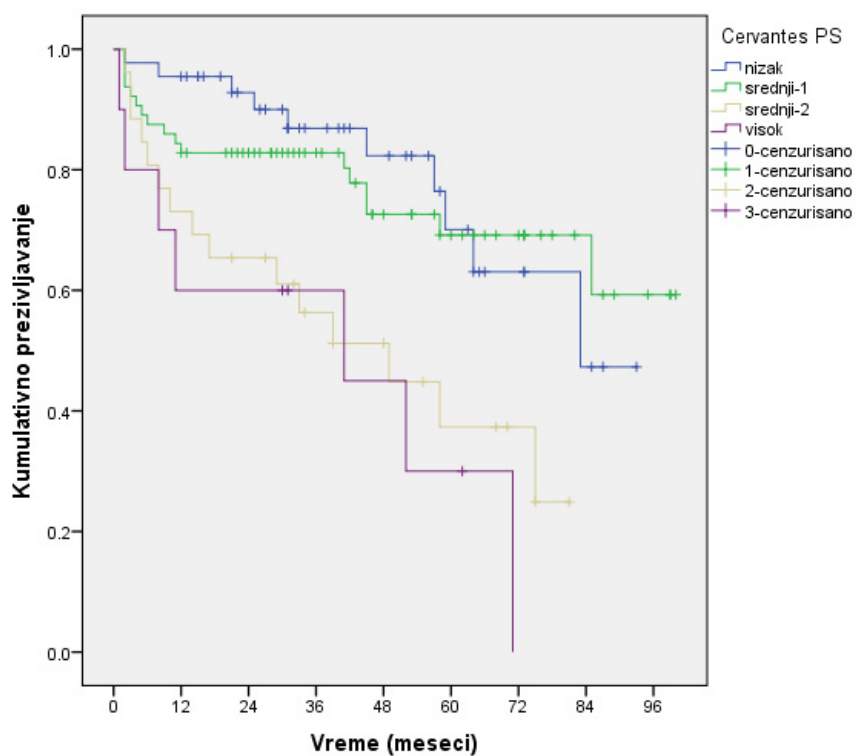
Analizom pomoću Lilskog PS-a uočeno je da postoji statistički značajna razlika ($X^2=21.286$; $p<0.001$) između bolesnika sa različitim stepenom rizika (Grafikon 20).

Grafikon 20. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Lilskog PS-a



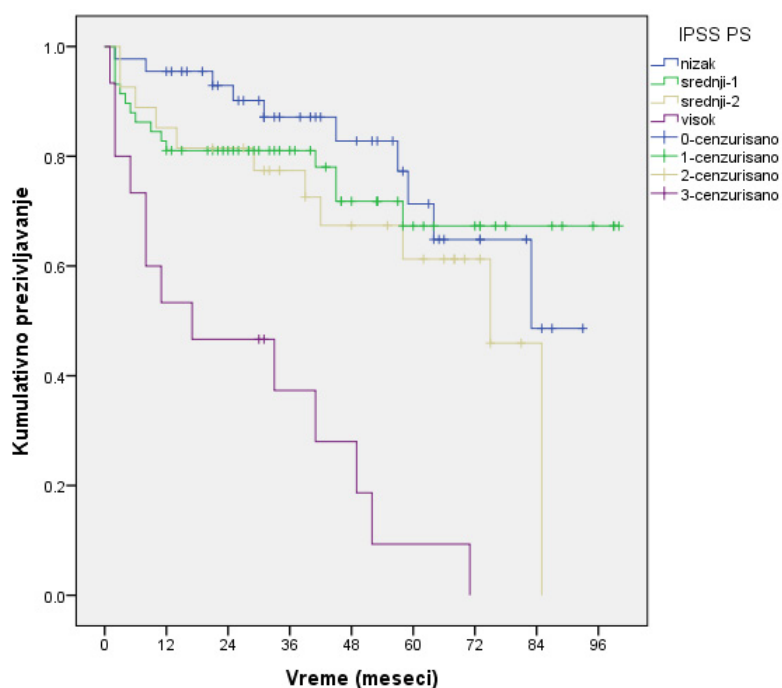
Servantesovim PS-om takođe je registrovana statistički značajna razlika ($X^2=18.987$; $p<0.001$) u preživljavanju bolesnika, razvrstanih u četiri grupe na osnovu parametara različitog stepena rizika. Uočava se jasna preraspodela grupa, pri čemu bi razlika u preživljavanju bila izraženija posmatranjem dve grupe bolesnika: grupa niskog i srednjeg-1 rizika i grupa bolesnika visokog i srednjeg-2 rizika (Grafikon 21).

Grafikon 21. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Servantesovog PS-a



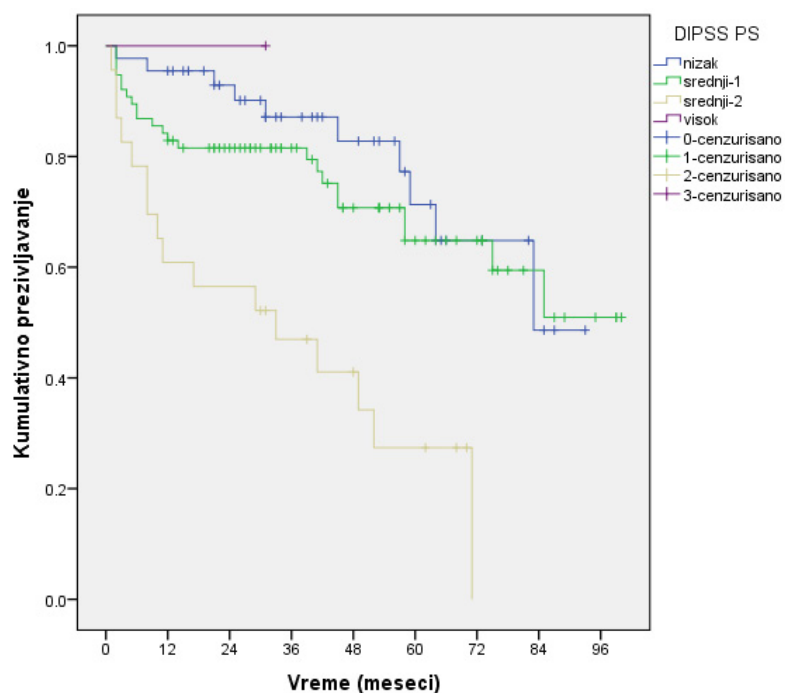
Po preporukama IPSS PS-a bolesnici su svrstani u četiri prognostičke grupe i statističkom analizom je pokazana značajna razlika ($X^2=34.139$; $p<0.001$) u preživljavanju bolesnika (Grafikon 22). Jasno se izdvajaju grupa sa niskim stepenom rizika, gde je i viša kumulativna stopa preživljavanja i grupa sa visokim rizikom, gde je uočljivo niža stopa preživljavanja u odnosu na preostale bolesnike. Obe grupe srednjeg stepena rizika imaju sličan nivo preživljavanja i približavaju se krivi preživljavanja grupe sa niskim stepenom rizika.

Grafikon 22. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu IPSS PS-a



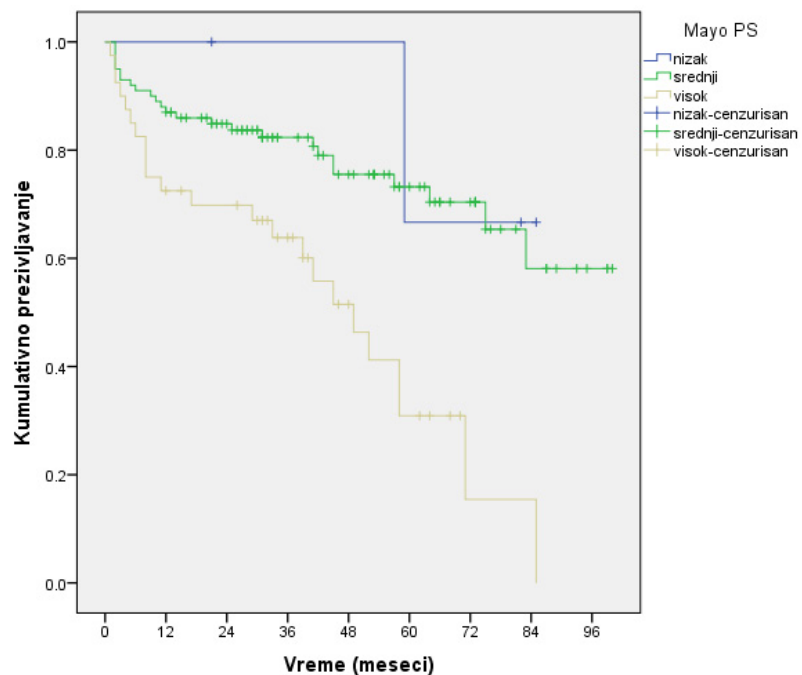
Ispitivanjem preživljavanja na osnovu DIPSS PS-a takođe je registrovana statistički značajna razlika ($X^2=20.839$; $p<0.001$) (Grafikon 23). U analizi ovog modela, ako se zanemari grupa visokog rizika u kojoj postoji samo jedan bolesnik, uočava se izdvajanje dve grupe. Jednu grupu čine bolesnici sa sličnom dinamikom preživljavanja, tj. bolesnici sa niskim i srednjim-1 stepenom rizika, dok drugu grupu predstavljaju bolesnici sa srednjim-2 stepenom rizika.

Grafikon 23. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu DIPSS PS-a



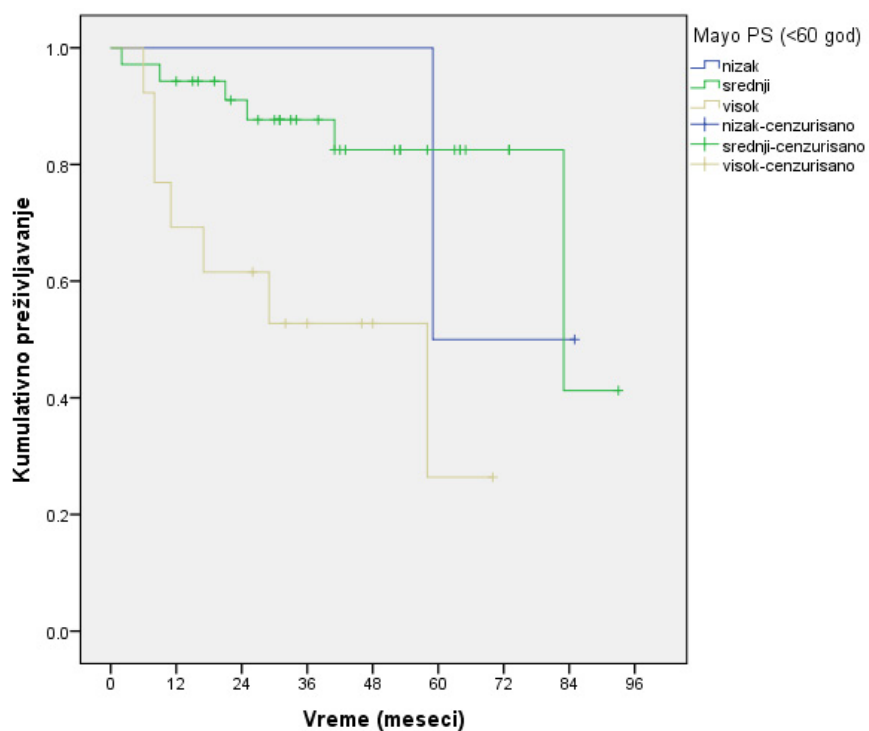
Na osnovu Mayo PS-a koji se odnosi na opštu populaciju bolesnika, registrovana je statistički značajna razlika ($X^2=17.050$; $p=0.001$) u preživljavanju. Dominantne grupe bolesnika su sa srednjim i visokim stepenom rizika sa jasnom razlikom u preživljavanju (Grafikon 24).

Grafikon 24. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Mayo PS-a



Za analizu preživljavanja mlađe populacije bolesnika korišćen je Mayo PS. Našu grupu bolesnika mlađih od 60 godina, činilo je 50 bolesnika. Analizom je ustanovljeno da postoji značajna razlika ($X^2=8.742$; $p=0.013$) u preživljavanju. Dominiraju grupe bolesnika sa srednjim i visokim stepenom rizika, sa razlikom u preživljavanju (Grafikon 25).

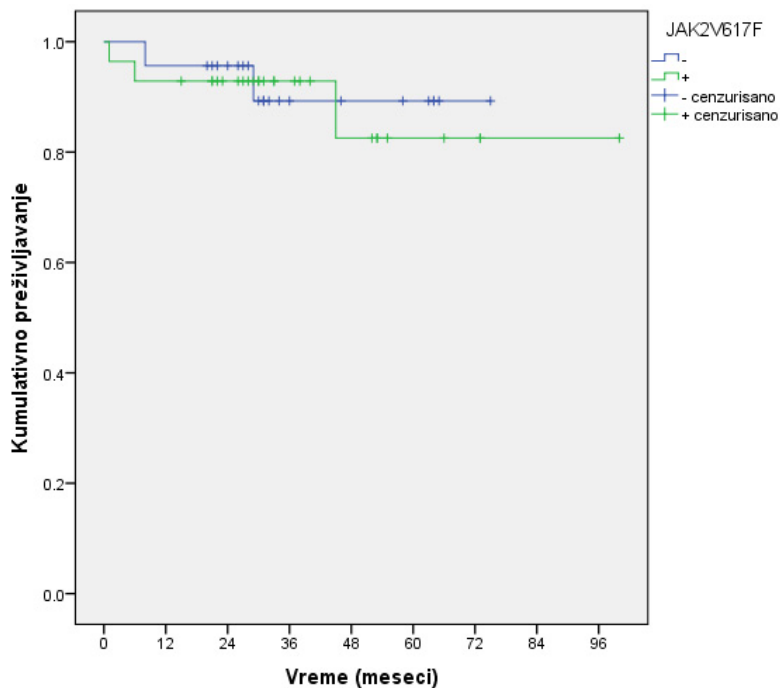
Grafikon 25. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Mayo PS-a za mlađe bolesnike



Testiranje uticaja mutacije *JAK2V617F* na preživljavanje urađeno je kod 51 bolesnika.

Dvadeset osam bolesnika je bilo *JAK2V617F*-pozitivnih, a 23 *JAK2V617F*-negativnih. Analiza je pokazala da nema statističke značajne razlike ($X^2=0.060$; $p=0.807$) u preživljavanju ove dve grupe bolesnika (Grafikon 26).

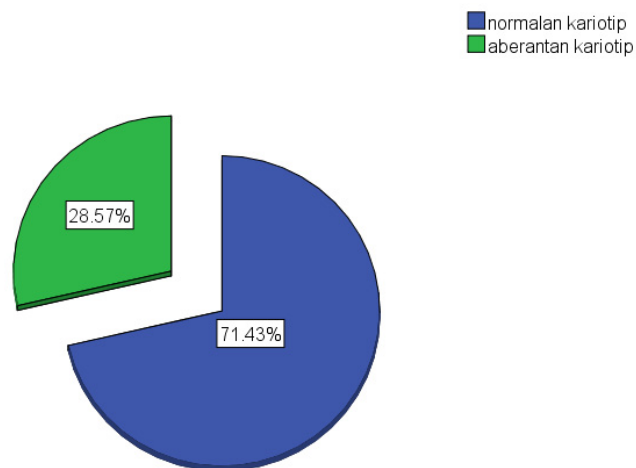
Grafikon 26. Kriva preživljavanja bolesnika u odnosu na mutaciju *JAK2V617F*



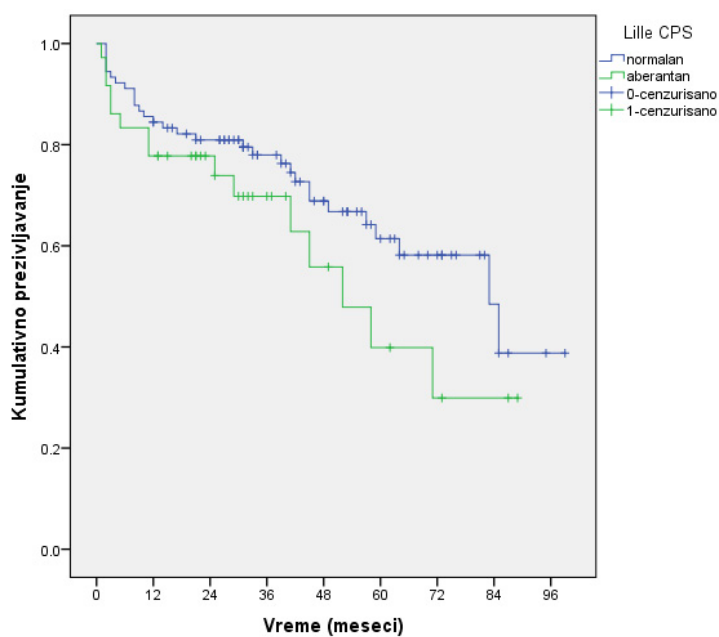
Uticaj normalnog kariotipa i različitih hromozomskih aberacija na preživljavanje, ispitan je kod 126 bolesnika na osnovu CPS-a.

Na osnovu Lilskog CPS-a ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike ($X^2=2.027$; $p=0.155$) u preživljavanju bolesnika sa i bez hromozomskih aberacija (Grafikoni 27 i 28).

Grafikon 27. Distribucija bolesnika po tipu kariotipa na osnovu Lilskog CPS-a

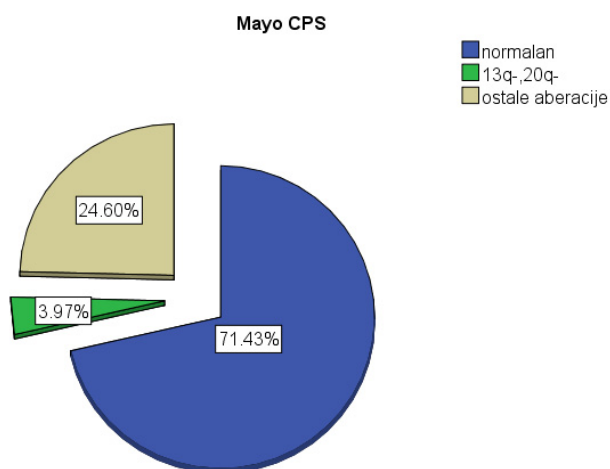


Grafikon 28. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Lilskog CPS-a

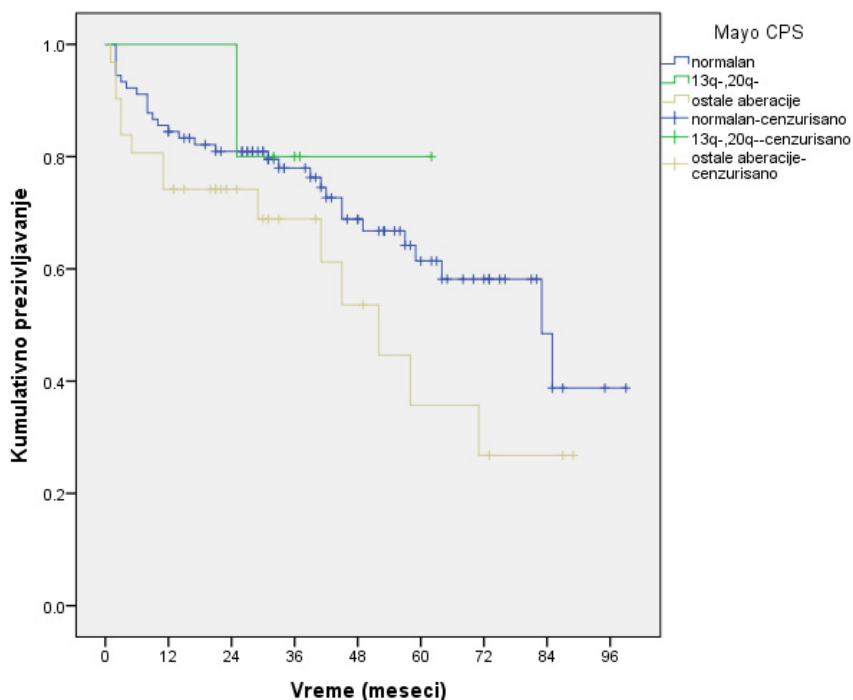


Ispitujući nivo preživljavanja bolesnika sa Mayo CPS-om registrovano je da nema statistički značajne razlike ($X^2=3.088$; $p=0.214$) među bolesnicima (Grafikoni 29 i 30). Može se uočiti da je najmanja grupa bolesnika sa hromozomskim rearanžmanima srednje povoljnog stepena rizika (13q- i 20q-), dok dominiraju grupe sa normalnim kariotipom i drugim aberacijama.

Grafikon 29. Distribucija bolesnika prema hromozomskim aberacijama različitog stepena rizika na osnovu Mayo CPS-a

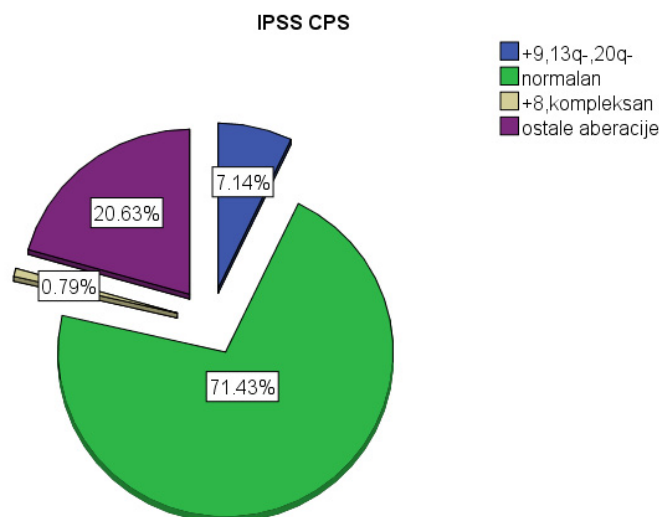


Grafikon 30. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu Mayo CPS-a

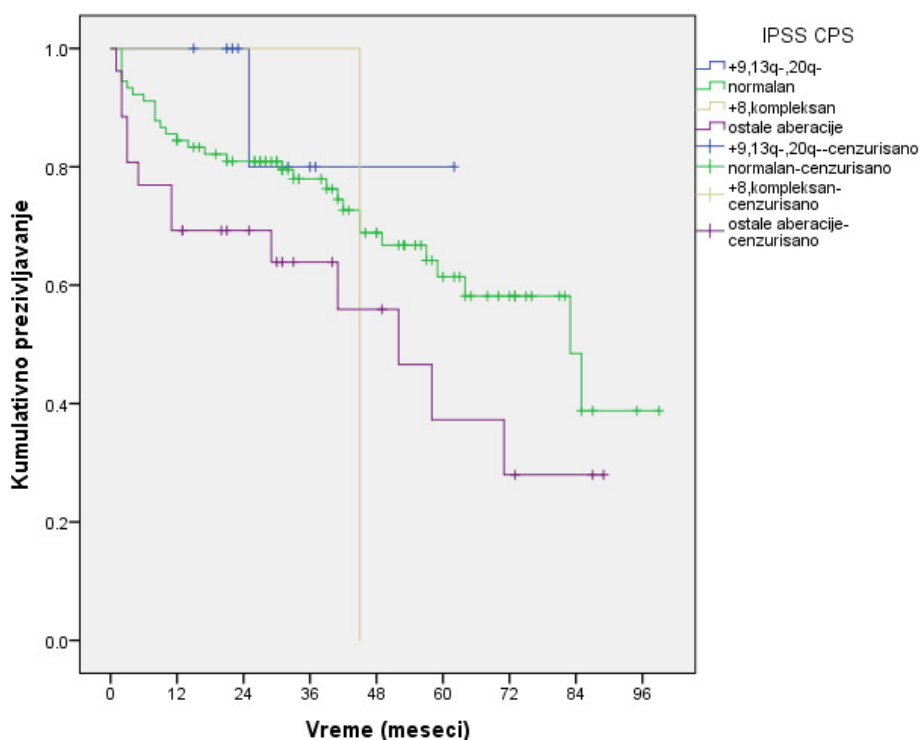


Na osnovu IPSS CPS-a registrovano je da nema statistički značajne razlike ($X^2=5.288$; $p=0.152$) u preživljavanju bolesnika svrstanih u četiri kategorije (Grafikoni 31 i 32). Po ovom sistemu, najmanje bolesnika je sa povoljnim (+9, 13q- i 20q-) i srednje lošim (+8 i kompleksne aberacije) stepenom rizika, a dominiraju grupe bolesnika sa srednje povoljnim (normalan kariotip) i nepovoljnim izmenama u kariotipu (ostale aberacije).

Grafikon 31. Distribucija bolesnika prema hromozomskim aberacijama različitog stepena rizika na osnovu IPSS CPS-a

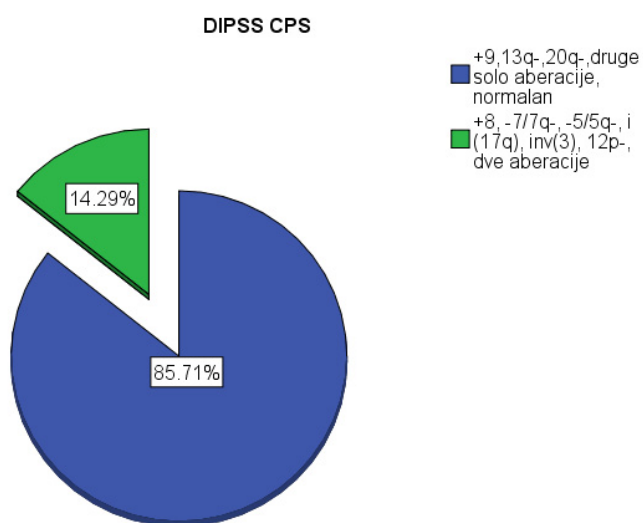


Grafikon 32. Kriva preživljavanja bolesnika na osnovu IPSS CPS-a

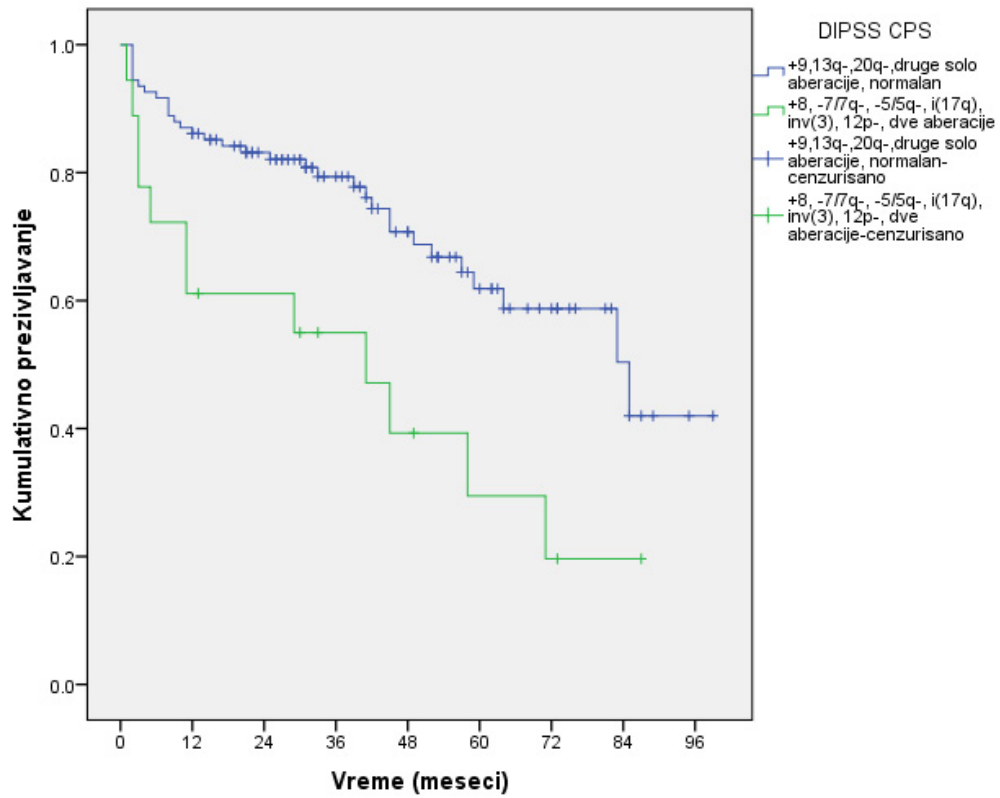


Statistički značajna razlika registrovana je ispitivanjem preživljavanja na osnovu DIPSS CPS-a ($X^2=8.371$; $p=0.004$). Po preporukama ovog sistema, razlikuju se bolesnici sa hromozomskim aberacijama povoljnog i bolesnici sa aberacijama nepovoljnog stepena rizika (Grafikoni 33 i 34). U grupi su domonirali bolesnici (108) sa povoljnim izmenama u kariotipu (+9, 13q-, 20q-, druge solo aberacije, dve aberacije izuzev nepovoljnih, normalan kariotip), a manji broj bolesnika (18) bio je sa nepovoljnim citogenetičkim markerima (solo+8, solo-7/7q-, solo-5/5q-, inv(3), 12p- 11q23, dve nepovoljne aberacije, kompleksno aberantan kariotip).

Grafikon 33. Distribucija bolesnika prema hromozomskim aberacijama različitog stepena rizika na osnovu DIPSS CPS-a



Grafikon 34. Kriva preživljanja bolesnika na osnovu DIPSS CPS-a



5. DISKUSIJA

Primarna mijelofibroza je bolest sa različitom manifestacijom kliničke slike i različitom prognozom. Od ove bolesti oboljevaju osobe starijeg životnog doba (169), što je bio slučaj i u našoj grupi bolesnika. Medijana preživljavanja je različita: neki umiru brzo, dok ima bolesnika koji žive deceniju i više nakon postavljanja dijagnoze (130, 138-141). To zavisi od brojnih različitih faktora, kao što su godine života, fizičko stanje organizma, komorbiditeti i od drugih parametara o kojima je bilo reči i u ovom radu. Lečenje PMF je uglavnom palijativno, a izlečenje je moguće jedino ATMČH. Ipak, tokom ATMČH veći je rizik od smrtnog ishoda, posebno kod starijih bolesnika. Zbog toga je, u trenutku postavljanja dijagnoze bolesti, vrlo važno identifikovati parametre koji nose veći stepen rizika za nepovoljno preživljavanje, korigovati ih adekvatnom terapijom i na taj način doprineti kvalitetnijem i dužem životu bolesnika. Takođe je važno pronaći parametre koji omogućuju praćenje toka bolesti. Citogenetički i molekularni markeri su svako pravi primer parametara bitnih za dijagnozu, ali i za monitoring i prognozu bolesti.

5.1. Ispitivanje citogenetičke i molekularno genetičke osnove PMF

U vezi sa pomenutim činjenicama, naše ispitivanje je koncipirano tako da se primarno utvrdi koje su hromozomske aberacije prisutne i kolika je učestalost mutacije *JAK2V617F* u trenutku postavljanja dijagnoze PMF. Kod manjeg broja bolesnika citogenetički rezultati su prikupljeni retrospektivno, dok su kod većine bolesnika citogenetička i molekularna ispitivanja sprovedena prospektivno, što je omogućilo analizu korelacije kariotipa i genske mutacije, kao i analizu povezanosti pomenutih markera sa drugim kliničkim i hematološkim parametrima.

Ispitivanje korelacije kariotipa i različitih kliničkih i hematoloških i laboratorijskih parametara vršeno je pomoću CPSa koji podrazumevaju citogenetičke markere kao nezavisne prognozne kriterijume. U tu svrhu su korišćeni Lilski, kao najstariji i najkoncizniji i IPSS, moderniji, ali i najinformativniji prognozni model.

Od značaja je bilo utvrditi i uticaj normalnog, odnosno aberantnog kariotipa i somatske mutacije na preživljavanje bolesnika. Kod bolesnika obuhvaćenih prospektivnom analizom bili su dostupni demografski, klinički i hematološki podaci, što je iskorišćeno za

utvrđivanje preživljavanja na osnovu opštih PS-a.

Prospektivnih studija sa citogenetičkim rezultatima bolesnika sa PMF je relativno malo. Retke su i studije koje obuhvataju veći broj novodijagnostikovanih bolesnika (preko 100). Studije koje su uključile veći broj bolesnika, često su nastale kombinovanjem *de novo* bolesnika i bolesnika sa transformisanim oblikom drugih MPN (najčešće PV i ET) (101-103).

Razlozi ograničenog broja objavljenih citogenetičkih rezultata su svakako i tehničke prirode i delom se odnose na prirodu bolesti, a delom na poteškoće prilikom izvođenja preparativne metode. Često je tehnički teško dobiti iz fibrotične koštane srži reprezentativni uzorak aspirata za preparaciju ćelija. Takođe je teško bez stimulacije ćelija na diferencijaciju dobiti adekvatan broj ćelija u metafazi mitotske deobe za validnu citogenetičku analizu. Zbog toga je, po literaturnim podacima, evidentirana velika razlika u učestalosti hromozomskih aberacija i ona se kreće od 30% do čak 75%, (87, 97, 101, 147).

Na osnovu rezultata iz literature izdvojene su hromozomske aberacije koje se češće ispoljavaju u kariotipu bolesnika sa PMF. Od svih registrovanih, više od 90% predstavljaju 20q-, 13q-, +8, +9, 12p-, parcijalna trizomija 1q i rearanžmani hromozoma 5 (-5/5q-) i 7 (-7/7q-) (98, 101, 116). Aberacije: 20q-, 13q- i +9 se najčešće ispoljavaju kao solo aberacije i to u oko 15-25% patološkog kariotipa (101, 116, 141).

Posmatrajući pojedinačno hromozomske aberacije u okviru naših ispitivanja, može se konstatovati da je najučestalija trizomija 8, što nije slučaj za objavljene studije sa velikim grupama ispitanika (87, 101, 102, 112, 116). Trizomija 8 je registrovana kod 6 bolesnika (11%) i to u kariotipu dva bolesnika kao jedina, dok je kod 4 bolesnika udružena kariotipska aberacija. Trizomija 8 je najčešća aberacija mijeloidnih i limfoidnih neoplazmi. Prediktor je loše prognoze, a razlog za to je umnoženi efekat gena na hromozomu 8, pri čemu se najveći značaj pridaje *FGFR1* genu, koji je receptor fibroblastnog faktora rasta, a smešten je u regionu 8p11. Sve promene unutar ovog regiona, uključujući *FGFR1*, eksprimiraju se fenotipski na isti način, dajući karakterističnu citomorfološku sliku bolesti, prepoznatljivu kao 8p11 mijeloproliferativni sindrom (197).

Po literaturnim podacima delecije 13q- i 20q- su najučestalije i predstavljaju 10% svih registrovanih aberacija u PMF (194). Međutim, u našoj grupi bolesnika ove aberacije su nešto manje zastupljene i to 13q- kod 4, a 20q- kod 5 bolesnika, što u odnosu na ukupan broj bolesnika sa aberantnim kariotipom iznosi 7% i 9%. Iako su kariotipske promene, ove aberacije predstavljaju dobar prognozni parametar. Delecijom na dugom kraku hromozoma 13 dolazi do gubitka gena za retinoblastom-*RBI*, što predstavlja inicijalni leukemogeni događaj za mnoge hemopatije (98, 105, 140). Mutageni potencijal delecije 20q- objašnjava

se ekspresijom protoonkogeno *C-SRC1*, lociranim distalno od tačaka prekida. Delecijom, protoonkogen ostaje intaktan i aktivira se promenom položaja na hromozomu (98).

Prema podacima iz literature, učestalost trizomije 9 u PMF je 5-10% (112, 116). U našoj grupi bolesnika, učestalost +9 je 7% (4 bolesnika), što se poklapa sa rezultatima prethodno objavljenih istraživanja. Kao i prethodne i ova aberacija je prediktor dobre prognoze bolesti (116, 150).

Parcijalna trizomija dugog kraka hromozoma 1 je jedna od specifičnih aberacija za PMF. Međutim, oprečni su rezultati po pitanju njene učestalosti. U nekim studijama +1q predstavlja trećinu od ukupno registrovanih aberacija (97, 101) dok u drugim, učestalost ove aberacije je niska (87) ili nije registrovana (98). U našoj grupi bolesnika, trizomija 1q je registrovana u kariotipu jedne bolesnice, odnosno 2%, a ispoljena je kao nebalansirana translokacija sa hromozomom 15 [der(15)t(1;15)(cen;cen)].

Parcijalna trizomija dugog kraka hromozoma 1 se može javiti i u drugim malignim hemopatijama. Na dugom kraku ovog hromozoma nalaze se geni koji kontrolišu normalnu kinetiku ćelija mijeloidne loze. Neki od gena su odgovorni za proliferaciju i diferencijaciju (*IL-6RA*, *MNDA*, *CENPF*), a neki za programiranu ćelijsku smrt ili apoptozu (*CASP8*, *CFLAR*) (111). U slučaju trizomije 1q, amplifikuju se geni na q kraku, a fiziološka ravnoteža aktivnih gena se pomera u korist proliferativnih. Time se objašnjava proliferativna prednost patoloških ćelija (nosioca aberacije +1q) u odnosu na normalne (110, 111).

Prema najnovijim podacima, smatra se da je nebalansirana translokacija hromozoma 6 i 1 [der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3)] specifična upravo za mijelofibrozu (113). Predstoje dodatna molekularno genetička istraživanja koja bi dokazala moguću povezanost pomenute aberacije sa PMF. Kod ovog hromozomskog rearanžmana nastaje parcijalna trizomija dugog kraka hromozoma 1 (+1q) i parcijalna monozomija kratkog kraka hromozoma 6 (6p-). Svi geni, smešteni u regionu 1q21-q23 su trizomični, a geni locirani od 6p21 do terminalnog dela su monozomični. U slučaju ove aberacije, patogeni efekat se pridaje genu *FKBP51* lociranom u regionu 6p21, koji kodira sintezu FK506-vezanog proteina. Registrovana je intenzivna ekspresija pomenutog gena u megakariocitima obolelih od PMF (110). U našoj grupi bolesnika niko nije imao pomenutu aberaciju, a podaci iz literature ukazuju na činjenicu da je ova aberacija, iako specifična, retko prisutna u kariotipu obolelih (112).

Aberacije hromozoma 5 i 7 su ređe zastupljene u PMF od prethodno pomenutih. Najčešće su u pitanju delecije, ređe monozomije, translokacije ili drugi rearanžmani. Po našim rezultatima delecija dugog kraka hromozoma 5 (5q-) registrovana je kod jednog bolesnika (2%), a monozomija i delecija dugog kraka hromozoma 7 (-7/7q-) kod ukupno 3 (5%) bolesnika.

Delecija hromozoma 5 može biti sa tačkama prekida (q13q31), (q13q33) i (q15q33). Iako se javlja u različitim hematološkim bolestima, aberacija je specifična za MDS (198). Patogeni efekat delecije zavisi od toga u kojoj meri su aberacijom pogođeni tumor supresorni geni locirani u regionu 5q31-q32 (112). Delecije hromozoma 7 i 5, češće se javljaju u MPN kao posledica efekta hemio i/ili radio terapije prilikom lečenja primarne maligne bolesti (101).

Aberacije kratkog kraka hromozoma 12 najčešće su vezane za patogenezu akutne limfoblastne leukemije, ali se mogu javiti i u drugim hemopatijama, kao i u PMF. Navođeni su različiti tipovi aberacija, a najviše delecije, translokacije i dicentrici (199). Kod delecije prekidi na p kraku mogu biti u regionu p11, p12 ili p13 ili se radi o intersticijalnoj deleciji p11p13. Gen koji se najčešće pominje u slučaju rearanžmana 12p je *ETV6*, takođe poznat kao *TEL* gen koji kodira sintezu ETS transkripcionog faktora (199). Gubitak aktivnosti *ETV6* gena je jedan od razloga maligne transformacije ćelije. Prvi put je otkriven mutagen efekat *ETV6* u translokaciji t(5;12)(q33;p13), odnosno u fuzionom genu *PDGFRβ/ETV6* u hroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji (72). Smatra se da je lezija 12p- najčešća aberacija u malignim hemopatijama (16).

Aberacije hromozoma 12 su registrovane kod 8 naših bolesnika (14%). U kariotipu 3 bolesnika (5%) registrovani su tipični rearanžmani 12p. Delecija na p kraku hromozoma uočena je kod 2 (4%), a translokacija kod 1 (2%) bolesnika. Od ostalih aberacija zasutpljene su monozomija (4%), triziomija (2%) i translokacije (4%) na q kraku hromozoma.

Na osnovu podataka iz literature može se zaključiti da su najčešće aberantni hromozomi i najčešći tipovi aberacija u PMF upravo ovi pomenuti (96-101). S obzirom na to, da je PMF neizlečiva bolest i da je jedan od ishoda bolesti transformacija u akutnu leukemiju, zapažanja su da bolesnici sa -7/7q-, -5/5q-, 12p-, aberacijama 1q, +8 i +9 imaju veći stepen leukemijske transformacije (50%, 30%, 25%, 19%, 21% i 17%) od bolesnika sa sa 20q- ili 13q- (10% i 0%) (112).

U PMF, kao i u drugim malignim hematološkim bolestima, moguća je detekcija i drugih, ređih ili prvi put viđenih aberacija i kariotipskih rearanžmana. Od ostalih hromozomskih aberacija, registrovanih kod naših bolesnika, vredi pomenuti aberacije hromozoma 18, 16, 3, 21, aneuplodije polnih hromozoma, deleciju (9q) i translokacije.

Jedan od češće aberantnih hromozoma u našoj grupi ispitanika je hromozom 18. Aberacije ovog hromozoma uočene su kod 7 (12%) bolesnika. Rearanžmani tipa adicije i derivat hromozom 18 registrovani su kod 3, monozomija kod 2 i delecija dugog kraka kod jednog bolesnika. Slične aberacije, odnosno dodatak hromatinskog materijala u vidu insercije i adicije na hromozomu 16q, detektovane su kod 2 (4%) bolesnika. Aberacije hro-

mozoma 18 i 16 sporadično se pominju u pojedinim studijama, bez nekog objašnjenja leukemogenog značaja ovih citogenetičkih markera (101, 102).

Pericentrična inverzija hromozoma 3 sa tačkama prekida (p13q27) registrovana je u kariotipu jedne (2%) bolesnice. U hematološkim malignim bolestima inv(3) se često pominje u AML. Reč je o paracentričnoj inverziji hromozoma 3 sa tačkama prekida u regionu q21q26. Ovaj tip inverzije i translokacija homologih hromozoma, odnosno inv(3)/t(3;3) prepoznatljivi su kao entiteti molekularnih markera po klasifikaciji SZO iz 2008. godine (80). Međutim, kod naše bolesnice radi se o tipu aberacije koja se selektivno citira u citogenetičkim studijama za akutne leukoze (200), dok u studijama za PMF se ne pominje.

Delecija dugog kraka hromozoma 9 (9q-) registrovana je u kariotipu 2 (4%) bolesnika. Delecija (9q) se javlja u malignim hemopatijama najčešće u AML i MDS (201). Tačka prekida je na q kraku u regionu q22, ali se pominje i intersticijalna delecija sa prekidima q13q22 (201). Delecija (9q) je marker loše predikcije bolesti. Često se javlja kao dodatna ili u sklopu kompleksno aberantnog kariotipa. Kod jedne bolesnice uočena je kao solo aberacija u primarnom ćelijskom klonu, ali i kao dodatna u evolutivno mlađem klonu (što nije registrovana pojava po literaturnim podacima), a može da govori o mutagenoj prodornosti same aberacije (Slika 16; n-16).

Trizomija hromozoma 21 je aberacija koja se često može videti u akutnim leukemijama, MDS, ali i u MPN (87, 98, 116). U našoj studiji trizomija hromozoma 21 (+21) registrovana je u kariotipu 2 (4%) bolesnika.

Aneuploidije polnih hromozoma su česte numeričke aberacije kod bolesnika sa malignim hemopatijama. Po literaturnim podacima, najčešća pojava je gubitak Y hromozoma (-Y), ali se javlja i trizomija i monozomija X-a (+X, -X). Gubitak Y hromozoma može biti primarna i sekundarna aberacija (202). U malignim hemopatijama češće se ispoljava kao dodatna aberacija i to pre svega u CML, različitim entitetima AML i MDS i kao takva signalizira evoluciju bolesti. Međutim, postoje i mišljenja da ova aberacija nije pouzdan klonski marker, imajući u vidu da je gubitak ovog hromozoma česta kariotipska anomalija kod muškaraca starijih od 60 godina (202). Zbog toga je bitno da se kod bolesnika, kojima je citogenetička analiza utvrdila gubitak Y hromozoma u ćelijama koštane srži, uradi i provera natalnog ili konstitucionog kariotipa.

Po literaturnim podacima učestalost aberacije -Y u hematološkim bolestima je oko 6,5% (153, 202). U našoj studiji gubitak Y hromozoma registrovan je u kariotipu 3 (5%) bolesnika. Kod 2 bolesnika aberacija je primarna i klonskog karaktera, dok je kod jednog gubitak ovog hromozoma karakteristika natalnog kariotipa, što je i potvrđeno citogenetičkom analizom na stimulisanim limfocitima iz periferne krvi bolesnika.

U odnosu na druge studije, naši rezultati pokazuju veliku učestalost translokacija u patološkom kariotipu. Kod 8 (14%) bolesnika detektovane su recipročne translokacije od kojih je jedna Robertsonova. Balansirane translokacije su retka pojava u MPN [(isključujući t(9;22)(q34;q11) u CML] (147, 162, 203). U kariotipu 5 bolesnika registrovane su balansirane translokacije autozomalnih hromozoma kao jedini kariotipski rearanžmani: t(12;13), t(12;16), t(5;13), (2;16) (Slika 15A, B, C, D) i t(17;22), t(9;12) (Slika 16 ; n-14 i n-17). Kod jednog bolesnika zabeležena je koegzistencija dva nezavisna patološka klona, jednog sa t(15;17) i drugog sa adicijom na p kraku hromozoma 18. Dva nezavisna, patološka ćelijska klona u maligno proliferišućem hematopoeznom tkivu je pojava koja se sporadično registruje u akutnim leukemijama, ali je u hroničnim mijeloproliferacijama jako retka. Na osnovu toga možemo da konstatujemo da je mozaičan kariotip našeg bolesnika sa neuobičajnim aberacijama jedinstven citogenetički nalaz.

Incidenca pojave Robertsonove translokacije u humanoj populaciji je 1 prema 1000 novorođenih (204). Robertsonova translokacija je specifičan rearanžman koji nastaje fuzijom akrocentričnih hromozoma. Od svih registrovanih, najzastupljenije su Robertsonove translokacije hromozoma 13 i 14 i hromozoma 13 i 15 [rob(13;14) i rob(13;15)] (204). Smatra se da je većina Robertsonovih translokacija, detektovanih u kariotipu bolesnika sa nekom od malignih hemopatija, konstitucionog porekla (204). Ipak, neki ove fuzije akrocentrika dovode u vezu sa razvojem neoplazija, što su pokazali i eksperimenti na životinjskim modelima (204).

Ispitivanjem incidence Robertsonove translokacije u kariotipu 5633 bolesnika sa različitim dijagnozama malignih hemopatija, konstatovano je da je učestalost ove aberacije u pomenutoj grupi bolesnika 0,09% i da je najzastupljenija u AML (204). U grupi naših bolesnika, rob(13;14) je registrovana u kariotipu jedne bolesnice (Slika 16; n-7), što bi značilo da je učestalost ove konstitucione aberacije 1,7% u PMF.

Analizirajući naše rezultate i poredeći ih sa rezultatima drugih studija, možemo konstatovati da je opšta učestalost patološkog kariotipa 32%. Po literaturnim podacima, učestalost hromozomskih aberacija u početnom stadijumu bolesti je oko 35%. Veća učestalost aberacija je u odmakloj fazi bolesti ili prilikom transformaciji ET i PV u PMF (100, 101). Imajući u vidu da se ova studija odnosi na rezultate inicijalnih citogenetičkih analiza, možemo konstatovati da su naši rezultati očekivani i odgovaraju podacima iz literature (87, 97, 101, 147). Međutim, u našoj studiji neočekivano je niži stepen aberacija u prospektivnom, u odnosu na retrospektivno ispitivanje (28% vs 41%). Razlozi su verovatno tehničke prirode. S obzirom na to da se za retrospektivnu analizu vršilo prikupljanje rezultata iz citogenetičkih protokola i arhivirane dokumentacije, moguće je da je bolest pojedinih bo-

lesnika bila u uznapredovalom fibrotičnom stadijumu ili u transformisanom obliku ET ili PV, a da taj podatak nije evidentiran. Eventualan dokaz za to je veća učestalost trizomije 8 u retrospektivnoj studiji (6/27 bolesnika), pri čemu je u kariotipu čak 4 bolesnika, trizomija 8 registrovana u sklopu dve i više aberacija, što po literaturnim podacima predstavlja evoluciju patološkog klona (150, 197, 205).

Takođe, možemo da konstatujemo da su najčešće aficirani aberacijom hromozomi 8, 9, 13 i 20. Zastupljenost pomenutih hromozoma sa bilo kakvom aberacijom (monozomijom, trizomijom, delecijom i translokacijom) registrovana je u kariotipu 31 (54%) bolesnika. Kao i po literaturnim podacima (86, 87, 138-140, 150, 160) i u našoj grupi najzastupljenije hromozomske aberacije su +8, +9, 13q-, 20q- sa učestalošću od 34% u odnosu na ukupne aberacije. Kao što je pomenuto, +8 je najčešća aberacija u retrospektivnom, dok su +9, 13q- i 20q- više zapažene u prospektivnoj analizi kariotipa, što je dodatni dokaz o različitosti statusa bolesnika u okviru dva tipa ispitivanja.

Interesantno je da su neke od aberacija, koje se u literaturi pominju kao specifične i česte za PMF, kao parcijalna trizomija 1q ili der(6)t(1;6), u našim rezultatima zastupljene retko ili uošte nisu detektovane. Česte su aberacije hromozoma 18 i 16, što takođe nije slučaj sa rezultatima objavljenih studija.

Specifičnost naših rezultata u odnosu na rezultate drugih studija takođe je i velika učestalost recipročnih translokacija, od kojih su neke od njih prvi put registrovane u PMF. S obzirom na to da se radi o rezultatima citogenetičkih analiza na početku bolesti, onda je pojava translokacija u nalazima bolesnika sa PMF svakako interesantan podatak.

Somatska mutacija *JAK2V617F* je klasifikacijom SZO iz 2008. godine (78) postavljena kao jedan od glavnih dijagnostičkih kriterijuma u *BCR/ABL*-negativnim MPN. Najveći broj rezultata objavljenih istraživanja je iz domena strukture i uloge "divljeg" i mutiranog oblika *JAK2* alela u neoplastičnom procesu. Poznato je da je maligna transformacija u MPN kompleksan proces u kome je sprega mutiranog ili nemutiranog *JAK2* gena sa drugim genima progenitornih ćelija, bitan momenat. Iako je poslednjih godina ispitivanje mutacije *JAK2V617F* intenzivirano i dalje postoje dileme kada dolazi do nastanka mutacije. Postoje dve alternativne hipoteze: prva govori da je nastanak mutacije *JAK2V617F* inicijalni momenat u klonskoj evoluciji MPN; druga hipoteza navodi da pomenutoj mutaciji prethodi genomski nestabilnost progenitornih ćelija (119). Drugoj hipotezi ide u prilog činjenica da bolesnici mogu da boluju od hronične mijeloproliferativne bolesti, a da nemaju mutaciju.

O povezanosti mutacije *JAK2V617F* sa hromozomskim aberacijama, mišljenja su takođe podeljena. Veći broj nalaza govori da ne postoji korelacija (49, 54, 141, 194), dok

neke studije povezuju mutaciju sa određenim hromozomskim rearanžmanima (162, 163).

Ispitivanjem klonalnosti progenitornih ćelija kod bolesnika sa *BCR/ABL*-negativnim MPN došlo se do interesantnih podataka. Nakon citogenetičkih i molekularnih analiza na kultivisanim CD34+ ćelijama, ustanovljeno je da hromozomske aberacije +8 i +9 prethode mutaciji *JAK2V617F* (119). Dugotrajnim kultivisanjem kolinija CD34+ progenitora i njihovom molekularnom analizom, dokazana je evolucija ćelija koje su u genomu imale udružene trizomije hromozoma 8 i 9 ali bez mutacije, do ćelijskog klona sa istim aberacijama i homozigotnom mutacijom. Istraživači su ovim eksperimentom potvrdili i tranziciju "divljeg" tipa *JAK2* gena preko mutiranog alela u heterozigotnom, do homozigotnog stanja, opisanom u literaturi kao fenomen homologe rekombinacije ili uniparentalne dizomije (119, 206).

Učestalost mutacije *JAK2V617F* u MPN je najveća od svih malignih hemopatija, a učestalost mutacije u PMF je 40% - 57% (31-33). Našim ispitivanjem registrovano je prisustvo mutacije *JAK2V617F* kod 55% bolesnika, što odgovara objavljenim literaturnim podacima (78-80, 84, 102, 119, 120).

Da bi ispitali korelaciju mutacije *JAK2V617F* sa tipom kariotipa, odnosno korelaciju mutacije sa hromozomskim aberacijama, koristili smo modele CPS-a.

Primenom Liskog CPS-a (87) testirali smo korelaciju mutacije i normalnog, odnosno aberantnog kariotipa. Jednostavnom distribucijom nije registrovana povezanost mutacije i aberantnog kariotipa. Pored toga, dokazano je i da je više bolesnika bilo bez mutacije sa normalnim kariotipom (75%), ali i više bolesnika sa detektovanom mutacijom i normalnim kariotipom (54%). Na osnovu našeg rezultata možemo da konstatujemo da ne postoji veza između molekularnog markera i patološkog kariotipa u PMF.

Korelacija *JAK2V617F* sa hromozomskim aberacijama vršena je modelom IPSS CPS-a (116). Na ovaj način želeli smo da ispitamo povezanost mutacije sa kariotipom, sa specifičnim i svim drugim hromozomskim aberacijama distribuiranim na osnovu stepena rizika. Međutim, ni primenom ovog prognoznog modela nije registrovana statistička značajnost. Time nije ni dokazana povezanost mutacije sa hromozomskim aberacijama, čak ni sa aberacijama koje nose lošu prognozu.

Većina studija pokazuje rezultate slične našim (141, 194), ali ima i podataka koji govore o statistički značajnoj povezanosti aberacija +9 i 7q- sa *JAK2*-pozitivnim, a 13q-, 20q-, +21 sa *JAK2*-negativnim genotipom (162, 163, 207).

Distribucijom, na osnovu prisustva ili odsustva mutacije, konstatovano je da je najviše bolesnika sa normalnim kariotipom (54% i 75%). Mutacija je registrovana kod svih bolesnika sa nepovoljnim hromozomskim aberacijama. Obe pomenute distribucije su bile

očekivane. Međutim, pokazano je i da je kod neočekivano većeg broja bolesnika sa povoljnijim hromozomskim aberacijama (+9, 13q- i 20q-) registrovana mutacija (21%), u odnosu na bolesnike bez mutacije (10%). Ne postoji genetičko objašnjenje ovakvog rezultata, osim da je na ovaj indirektan način potvrđena pomenuta teorija o klonskoj evoluciji ćelija gde hromozomske aberacije prethode mutaciji (119). U kontekstu toga, bilo bi primereno prospektivno pratiti duži vremenski period samo bolesnike sa hromozomskim aberacijama bez *JAK2* mutacije, da bi se ispitivanjem dokazalo da li je i u kom trenutku evolucije bolesti došlo do pojave mutacije *JAK2V617F*. Osim toga, genski lokus za *JAK2* tirozin kinazu nalazi se na kratkom kraku hromozoma 9 i logično bi bilo očekivati da su trizomije hromozoma 9, bilo kompletne ili parcijalne za 9p, bez obzira na status *JAK2* gena, loš prognozni parametar. Međutim, to je u praksi drugačije, što je i pokazano na osnovu rezultata ispitivanja velikih, kooperativnih grupa (84, 92).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da konstatujemo da ne postoji povezanost između molekularnog markera i citogenetičkih markera različitog stepena rizika. Time je i dokazano da hromozomske aberacije, posmatrane u sklopu korišćenih CPS-a (87,140,138,150), nose određen stepen rizika isključivo u pogledu stope preživljavanja bolesnika, ali se ne mogu dovesti u vezu sa molekularnim markerom, mutacijom *JAK2V617F*. Sve ovo ukazuje na ulogu i drugih molekularnih mehanizama, pored pomenute mutacije i *JAK-STAT* signalnog puta u evoluciji i prognozi bolesti.

Moguć razlog kontradiktornog rezultata je i mala veličina uzorka. U grupi sa povoljnijim hromozomskim aberacijama bilo je 7 bolesnika, a u grupi sa prognozno lošim aberacijama bila je samo jedna bolesnica. Rezultat bi svakako bio bliži realnoj distribuciji da je uzorak bolesnika sa povoljnim i nepovoljnim hromozomskim aberacijama bio veći.

Ispitivanjem distribucije i korelacije mutacije *JAK2V617F* i citogenetičkih markera može se konstatovati da se neki naši rezultati poklapaju sa literaturnim podacima, a neki su jedinstveni i specifični. Mada je ispitivanje izvršeno kod samo 51 bolesnika, rezultati o zastupljenosti mutacije *JAK2V617F* i njegove korelacije sa hromozomskim aberacijama su bitni podaci u analizi ovog molekularnog markera kao dijagnostičkog parametra u PMF.

5.2. Ispitivanje povezanosti dijagnostičkih parametara na relaciji genotip-fenotip

Iako su se primarni ciljevi našega rada odnosili na genetičku analizu PMF, želeli smo i da ispitamo povezanost genotipa i fenotipa bolesti. U tu svrhu bilo je potrebno testirati vezu citogenetičkih ili molekularno genetičkih rezultata, sa nekim od kliničkih ili he-

matoloških parametara. Zbog većeg broja ispitanih bolesnika i zbog raznolikosti rezultata, odlučili smo se za ispitivanje korelacije kariotipa i stepena fibroze koštane srži, specifičnu fenotipsku karakteristiku PMF.

Poznato je da se patohistološki nalaz bioptata koštane srži bolesnika sa PMF klasifikuje na prefibrotični (MF-0 i MF-1) i fibrotični (MF-2 i MF-3) (93, 94). Po literaturnim podacima, kod najvećeg broja bolesnika prvi simptomi bolesti se manifestuju u fibrotičnom stadijumu (94-97). U vezi sa pomenutim, želeli smo da utvrdimo koji je tip fibrotične koštane srži najčešće ispoljen kod naših bolesnika, upravo na početku manifestacije bolesti.

Testirali smo i korelaciju normalnog i aberantnog kariotipa, odnosno korelaciju pojedinih hromozomskih aberacija sa stepenom fibroze koštane srži. Ovim ispitivanjem želeli smo da utvrdimo da li tip kariotipa ili pojedine hromozomske aberacije više ili manje koreliraju sa određenim stepenom fibroze.

U našoj grupi ispitanih, najviše je bilo bolesnika (47%) sa MF-2 stepenom fibroze. Ispitivanjem korelacije stepena fibroze i kariotipa, koristeći Lilski CPS, ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike između prognozno povoljne (normalan kariotip) i nepovoljne (aberantan kariotip) grupe bolesnika. Najveći broj bolesnika sa normalnim kariotipom ima fibrozu gradusa MF-2 (51%), dok najveći broj bolesnika sa patološkim kariotipom (42%) ima viši stepen fibroze (MF-3) koštane srži. Nije registrovana statistički značajna razlika koja bi govorila o apsolutnoj povezanosti patološkog kariotipa i MF-3 stepena fibroze, ali je dobijen očekivan rezultat koji govori o većoj povezanosti patološkog kariotipa sa najvišim stepenom fibroze koštane srži kod bolesnika sa PMF.

Primenom IPSS CPS-a testirana je korelacija stepena fibroze koštane srži sa kariotipom i različitim hromozomskim aberacijama. Ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike koja bi govorila o povezanosti hromozomskih aberacija različitog stepena rizika sa stepenom fibroze koštane srži bolesnika. Takođe je pokazano da najveći broj bolesnika sa normalnim kariotipom ima fibrozu gradusa MF-2 (51%). Najviše bolesnika sa povoljnim citogenetičkim markerima (+9, 13q-, 20q-) ima fibrozu gradusa MF-3 (50%). Kod bolesnice sa nepovoljnom kariotipskom promenom (+8) registrovan je takođe MF-3 stepen fibroze (100%), a od bolesnika sa svim ostalim hromozomskim aberacijama najviše ih je (38%) kako sa MF-2, tako i sa MF-3 gradusom fibroze. Ovakvom distribucijom pokazano je da su bolesnici sa normalnim kariotipom imali niži stepen fibroze od bolesnice sa aberacijom većeg stepena rizika (+8). Neočekivano je najveći broj bolesnika sa prognozno dobrim hromozomskim aberacijama imao viši stepen fibroze u odnosu na bolesnike sa hromozomskim aberacijama visokog rizika, među kojima je bilo i bolesnika sa MF-2 gradusom fibroze. Naše zapažanje analize poklapa se sa statističkim rezultatom i na osnovu toga možemo da

konstatujemo da primenom IPSS CPS-a nije registrovana očekivana korelacija normalnog kariotipa i prognozno dobrih hromozomskih aberacija sa nižim stepenom fibroze, kao ni korelacija srednje dobrih i loših hromozomskih aberacija sa najvišim stepenom fibroze koštane srži bolesnika.

Na osnovu patohistoloških rezultata može se konstatovati da je kod najvećeg broja bolesnika registrovana fibroza koštane srži gradusa MF-2 i MF-3 što se poklapa sa literaturnim podacima (90, 91, 95). Međutim, naše ispitivanje se odnosilo na analizu patohistoloških rezultata pri inicijalnoj dijagnozi bolesti, dok druge studije obuhvataju i bolesnike kod kojih PMF predstavlja fibroznu transformaciju ET i PV gde je viši stepen fibroze koštane srži očekivana manifestna pojava.

Ispitivanje korelacije citogenetičkih rezultata sa patohistološkim nalazom bioptata koštane srži bolesnika je specifičnost ovog rada i zbog toga se naši rezultati ne mogu porediti sa rezultatima drugih studija. Postoje podaci koji govore o korelaciji patohistoloških nalaza sa hematološkim laboratorijskim parametrima bolesnika (90, 91), ali nema podataka o korelaciji stepena fibroze koštane srži sa citogenetičkim markerima bolesti.

5.3. Ispitivanje proliferativnog potencijala PMF

Ekstramedularna hematopoeza nastaje kao posledica fibroze koštane srži i inicira niz poremećaja kao što su splenomegalija i povećanje apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi bolesnika. Obe karakteristike PMF odraz su proliferativnog potencijala bolesti. Zbog toga smo želeli da analiziranjem i ispitivanjem korelacije pomenutih parametara, procenimo povezanost stepena ekstramedularne hematopoeze i proliferativnog potencijala bolesti u momentu postavljanja dijagnoze.

Splenomegalija je karakteristika ne samo PMF, već i fibrozne transformacije posle PV i ET (post-PV i post-ET). Simptom je koji opterećuje organizam, izaziva bol, napetost, mehaničke poteškoće i nepovoljno utiče na kvalitet života (208). Oko 10% bolesnika sa PMF ima izrazitu splenomegaliju već na prezentaciji, a 50% bolesnika razvije splenomegaliju u toku prve četiri godine bolesti (197).

U našem radu korišćeni su podaci o veličini slezine bolesnika iz medicinske dokumentacije. Kod većeg broja bolesnika veličina slezine je utvrđena palpatornom, a kod manjeg, ultrazvučnom dijagnostikom. Statističkom analizom na osnovu jednostavne distribucije (normalna i uvećana slezina), registrovana je splenomegalija kod 72% bolesnika. Po literaturnim podacima splenomegaliju ispoljava 85%, pa čak i do 100% *de novo* dijagno-

stikovanih bolesnika (83, 128). Verovatan razlog odstupanja naših rezultata od literaturnih je palpatorna dijagnostika koja je, iako manje precizna od ultrazvučne (195, 196), iz objektivnih razloga najčešće primenjivana u našoj dijagnostici.

Za razliku od drugih studija gde je korišćen jednostavan parametar za splenomegaliju (slezina manja ili veća od 8cm ili 10cm ispod levog rebarnog luka) (87, 97, 130), u našoj analizi je primenjena preciznija šema. Po preporukama nekih autora (195, 196) koristili smo podelu veličine slezine na osnovu koje je izvršena distribucija bolesnika u četiri kategorije: bolesnici sa normalnom slezinom, splenomegalijom niskog, srednjeg i visokog stepena. Takođe je uočeno da je najveći broj bolesnika (34%) imao splenomegaliju visokog stepena, odnosno veličinu slezine preko 16cm.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da konstatujemo da je splenomegalija ispoljena kod najvećeg broja bolesnika, što se poklapa sa literaturnim podacima (87, 97, 130, 138, 140). Za razliku od drugih studija (83, 128), našim ispitivanjem je pokazano da je i veliki broj bolesnika bio bez splenomegalije, što je retkost za PMF, a od bolesnika sa splenomegalijom najviše je bilo sa slezinom većom od 16cm. Razlog ovakvog paradoksalnog rezultata je verovatno palpatorna dijagnostika, koja je manje objektivna analiza od ultrazvučne.

Povećanje apsolutog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi bolesnika je jedna od karakteristika PMF. Po literaturnim podacima, zastupljenost CD34+ ćelija u koštanoj srži zdrave osobe je od 1-3%, a u cirkulišućoj krvi oko 0.05% (124). Broj cirkulišućih hematopoetskih CD34+ prekursora u PMF može biti veći od 8-167 puta u odnosu na vrednosti kontrolne grupe i 18-30 puta u odnosu na druge *BCR/ABL*-negativne MPN (122- 124).

Analizom distribucije CD34+ ćelija u cirkulaciji i ispitivanjem korelacije ovih ćelija sa drugim mijeloproliferativnim parametrima (stepenom fibroze, splenomegalijom, leukocitozom i pojavom blasta u perifernoj krvi bolesnika), želeli smo da ispitamo proliferativni potencijal PMF.

Povećanje apsolutnog broja CD34+ prekursora u perifernoj krvi registrovano je kod 78% bolesnika. Kao i u drugim studijama (124, 209, 210) i u našem istraživanju registrovana je statistički značajna razlika komparacijom dobijenih vrednosti za bolesnike i za kontrolnu grupu (zdrave osobe). Kod jednog bolesnika vrednost CD34+ ćelija u perifernoj krvi je bila veća čak za 220 puta od kontrolnih.

Poznato je da je mobilizacija HMC i HPC iz koštane srži u cirkulaciju, proces precizno kontrolisan interakcijom citokina i receptora, proteina, hemokina fibroblasta, osteoblasta ili endotelijalnih ćelija i drugih adhezionih prekursora, koji čine mikrosredinu hematopoeznog tkiva. U mijeloproliferativnim neoplastičnim bolestima, a najviše u PMF,

dolazi do stalno prisutne mobilizacije CD34+ ćelija iz koštane srži u perifernu krv usled izmenjene ćelijske niše i narušene arhitektonike hematopoeznog tkiva (209).

Na osnovu pomenutih činjenica, želeli smo da ispitamo u kojoj meri stepen fibroze koštane srži naših bolesnika utiče na distribuciju CD34+ ćelija u perifernoj krvi. Ispitivanje korelacije ovih parametara je bilo moguće kod 45 bolesnika i statističkom analizom je ustanovljeno da postoji značajna, pozitivna korelacija između distribucije CD34+ ćelija u perifernoj krvi i stepena fibroze u koštanoj srži. Registrovana je najveća mobilizacija CD34+ ćelija u cirkulaciju, upravo kod bolesnika sa fibrotičnim stadijumom bolesti, odnosno sa stepenom fibroze koštane srži MF-2 i MF-3.

Ispitivanje korelacije apsolutnog broja CD34+ ćelija u cirkulaciji i veličine slezine, bilo je moguće kod 47 bolesnika. Statistički značajna pozitivna korelacija registrovana je kako primenom šeme jednostavne distribucije splenomegalije, tako i primenom šeme kategorizovane veličine slezine. Na osnovu obe distribucije najveći broj bolesnika je imao splenomegaliju visokog stepena i povećanu distribuciju apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi.

S obzirom na to da su kao i povećanje apsolutnog broja CD34+ prekursora i povećani broj leukocita i nezrelih mijeloidnih ćelija u perifernoj krvi odraz proliferativnog kapaciteta bolesti (123), ispitali smo i povezanost ovih parametara. Ustanovili smo korelaciju u distribuciji blasta i CD34+ ćelija, dok korelacija leukocitoze i apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi nije registrovana.

Na osnovu ispitivanja stepena ekstramedularne hematopoeze i proliferativnog potencijala PMF, može se konstatovati da se većina naših rezultata poklapa sa rezultatima drugih studija (122-124, 154-156). Visoke prosečne vrednosti ispitanih kliničkih i hematoloških laboratorijskih parametara (fibroze koštane srži, splenomegalije, povećanje apsolutnog broja) CD34+ ćelija, kao i pozitivne korelacije pomenutih parametara, ukazuju da je kod većine naših bolesnika registrovana bolest u fibrotičnoj fazi sa visokim stepenom proliferativne aktivnosti.

5.4. Ispitivanje uticaja dijagnostičkih parametara na dužinu života bolesnika sa PMF

Primarna mijelofibroza je bolest sa specifičnom simptomatologijom i dijagnostičkim parametrima koji različito utiču na tok bolesti i preživljavanje bolesnika. Zbog toga su u primeni različiti PS-i pomoću kojih se, na osnovu ispoljenosti ili neispoljenosti pojedinih

dijagnostičkih parametra, procenjuje stepen rizika bolesnika. Poslednjih godina je skoriranje bolesnika postala redovna procedura u primarnoj dijagnostičkoj praksi, a sve u cilju odabira pravog terapijskog pristupa i predviđanja dubine terapijskog odgovora.

U našoj studiji analiza kumulativnog preživljavanja urađena je kod 144 bolesnika (55 žena i 89 muškaraca). Prosečna godina starosti bila je 65.5, što se poklapa sa podacima iz literature o uzrastnoj strukturi u populaciji obolelih (85-87). U posmatranom periodu (od 2004. do 2010. godine) registrovano je 49 umrih i 95 živih bolesnika, sa medijanom kumulativnog preživljavanja 83 meseca. Pokazano je da nema razlike u preživljavanju između polova, što se takođe poklapa sa literaturnim podacima (85-88).

U radu je izvršena multivarijantna analiza preživljavanja na osnovu kliničkih i hematoloških laboratorijskih parametara i univarijantna analiza na osnovu molekularnog markera i hromozomskih aberacija.

Primenom različitih prognoznih modela, želeli smo da testiramo uticaj proverenih dijagnostičkih parametara na preživljavanje bolesnika i primenljivost aktuelnih PS-a u uslovima naše dijagnostike. Zbog toga smo se odlučili za jednostavnije PS-e: Lilski (87) i Servantesov (139); i savremenije: IPSS (138), DIPSS (150), Mayo za sve bolesnike (140).

Za populaciju mlađih bolesnika, odlučili smo se da primenimo Mayo PS (160) koji se odnosi na uzrasnu strukturu do 60 godina starosti bolesnika. Servantesov PS (86) nije primenjen, jer se odnosi na bolesnike starije od 46, a mlađe od 55 godina. Takvih je u našoj grupi bilo svega 16, što je nereprezentativni uzorak za statističku analizu.

Kod svih primenjenih PS-a registrovana je statistički značajna razlika u preživljavanju pojedinih grupa bolesnika različitog stepena rizika. Interesantno je da se kod Servantesovog, IPSS i DIPSS PS-a mogu uočiti da se krive srednje rizičnih grupa bolesnika asimptotski približavaju grupama sa niskim ili visokim stepenom rizika (dihotomija prognoznih parametara). To govori da je kod ovih PS-a postoji veliki broj prognoznih grupa. U slučaju naših bolesnika dovoljna je i raspodela faktora rizika koja bi skoriranjem dala samo dve prognozne grupe (visokog i srednjeg rizika). Međutim i kod ovih PS-a je registrovana statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika, što znači da je i ovakva raspodela zadovoljavajuća.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da konstatujemo da je bilo koji od ispitanih modela za skoriranje prihvatljiv i primenljiv u našoj dijagnostičkoj praksi. Takođe je potvrđeno da su bitni dijagnostički parametri za status, tok bolesti i preživljavanje bolesnika sa PMF: godine života, koncentracija hemoglobina u krvi, broj leukocita i trombocita u krvi, prisustvo blasta i monocita u cirkulaciji i konstitutivni simptomi.

S obzirom na to da smo u sklopu primarnih ciljeva testirali učestalost hromozom-

skih aberacija i mutacije *JAK2V617F* i korelaciju ovih parametara, želeli smo da ispitamo i njihov uticaj na ukupno preživljavanje bolesnika. Pomenute parametre tretirali smo kao nezavisne prognozne i njihov uticaj na preživljavanje testirali smo nezavisno od ostalih dijagnostičkih parametara.

Ispitivanjem preživljavanja na osnovu mutacije *JAK2V617F*, pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika sa i bez mutacije. Rezultati većeg broja studija se (120, 138, 151-153), poklapaju sa našim nalazima, mada ima i rezultata koji govore o značaju pomenute mutacije na preživljavanje bolesnika (117).

Opšti zaključak pomenutih istraživanja, kao i najnovijeg prognoznog scoring sistema iz 2011. godine (211) u vezi mutacije *JAK2V617F*, je da ovaj molekularni marker nema direktnog uticaja na dužinu preživljavanja obolelih, ali da utiče na fenotipsku progresiju i leukemijsku transformaciju bolesti. Na osnovu dobijenih rezultata takođe možemo da zaključimo da mutacija nema direktnog uticaja na preživljavanje bolesnika.

Kariotip i hromozomske aberacije tretirali smo kao nezavisne prognozne parametre i testirali ih odvojeno od ostalih dijagnostičkih parametara. Na ovaj način smo želeli da ispitamo uticaj hromozomskih aberacija na preživljavanje bolesnika, ali i svrsishodnost aktuelnih CPS-a u praksi citogenetičke dijagnostike. Da bi analiza bila opsežna i više informativna, primenili smo Lilski (87), Mayo (140), IPSS (138) i DIPSS CPS-e, jer sadrže različit broj prognoznih grupa, a istim hromozomskim aberacijama dodeljuju različite stepene rizika. Na taj način smo testirali uticaj istih hromozomskih aberacija sa različitim stepenom rizika na preživljavanje istih probanda.

Primenom Lilskog, Mayo i IPSS modela nije registrovana značajna razlika u preživljavanju stratifikovanih bolesnika. To znači da normalan kariotip i hromozomske aberacije koje favorizuju pomenuti sistemi (+9, +8, 13q-, 20q-) nemaju uticaja na preživljavanje bolesnika, bez obzira koji stepen rizika imaju.

Suprotno od prethodnih sistema, DIPSS CPS je pokazao statistički značajnu razliku u preživljavanju. To znači da je podela bolesnika u samo dve prognozne grupe na osnovu različitih kariotipskih promena, svrsishodna i primenjiva u našoj citogenetičkoj dijagnostici.

Na osnovu svih prognoznih rezultata možemo da konstatujemo da je za analizu preživljavanja na osnovu kariotipa i hromozomskih aberacija, nepotrebna stratifikacija bolesnika na veći broj prognoznih grupa. Na primeru naših bolesnika, primenom različitih CPS-a je pokazano da normalan kariotip, kao i prognozno dobre (+9, 13q-, 20q-) i prognozno loša aberacija (+8) imaju isti efekat na preživljavanje bolesnika. Zbog toga je DIPSS CPS praktičniji jer je jednostavan i definiše samo dve grupe hromozomskih aberacija sa

različitim stepenom rizika. Na osnovu naših rezultata, a primenom DIPSS CPS-a možemo da zaključimo:

- da su prognozno povoljne aberacije za bolesnike sa PMF: solo 13q-, t/dup(1q) solo 20q-, solo +9, druge solo aberacije, dve aberacije isključujući nepovoljne i normalan kariotip;
- da su prognozno nepovoljne aberacije: kompleksno aberantan kariotip, solo +8, solo -7/7q-, solo -5/5q-, i(17q), inv(3), 12p-, 11q23, kao i dve aberacije uključujući nepovoljne.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata našeg ispitivanja kojim je obuhvaćeno 205 bolesnika sa *de novo* PMF, a koje je podrazumevalo analizu citogenetičkih i molekularno genetičkih markera, kao i kliničkih, hematoloških laboratorijskih i patohistoloških parametara bolesti, možemo da zaključimo sledeće:

- Učestalost patološkog kariotipa u ispitanoj grupi bolesnika iznosila je 41% u retrospektivnoj i 28.6% u prospektivnoj analizi.
- Najučestalije hromozomske aberacije su: +8 (11%), 20q- (9%), 13q- (7%), +9 (7%).
- Metodom alel-specifičnog PCR-a dokazana je učestalost mutacije *JAK2V617F* kod 55% bolesnika.
- Primenom Lilskog i IPSS CPS-a nije registrovana korelacija aberantnog kariotipa i mutacije *JAK2V617F*, kao ni hromozomskih aberacija različitog stepena rizika i mutacije *JAK2V617F*.
- Primenom Lilskog i IPSS CPS-a nije registrovana korelacija između tipa kariotipa (normalan i aberantan) i stepena fibroze koštane srži, kao ni korelacija između hromozomskih aberacija različitog stepena rizika i stepena fibroze koštane srži.
- Splenomegalija je registrovana kod 72% bolesnika, a splenomegalija visokog stepena kod 34% bolesnika.
- Povećanje apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi u odnosu na kontrolne vrednosti, registrovano je kod 78% bolesnika.
- Registrovana je pozitivna korelacija, između distribucije apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi i stepena fibroze u koštanoj srži.

- Registrovana je pozitivna korelacija, između distribucije apsolutnog broja CD34+ćelija u perifernoj krvi i splenomegalije i na osnovu jednostavne distribucije i distribucijom prema kategorizovanoj veličini slezine.
- Dokazana je direktna korelacija u distribuciji blastnih i CD34+ ćelija, ali ne i korelacija povećanog broja leukocita i apsolutnog broja CD34+ ćelija u perifernoj krvi.
- Statističkim analizama i primenom Lilskog, Servantesovog, IPSS, DIPSS i Mayo PS-a, registrovana je značajna razlika u preživljavanju bolesnika, na osnovu čega se zaključuje da su osnovni dijagnostički kriterijumi: godine života, koncentracija hemoglobina u krvi, broj leukocita i trombocita u krvi, prisustvo blasta i monocita u cirkulaciji i konstitutivni simptomi, bitni prognozni parametri za bolesnike sa PMF.
- S obzirom na to da nije dokazana statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika sa i bez eksprimirane mutacije *JAK2V617F*, zaključujemo da pomenuta mutacija nema direktnog uticaja na dužinu preživljavanja obolelih.
- S obzirom na to da je statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika na osnovu hromozomskih aberacija registrovana primenom DIPSS CPS-a, zaključujemo da su prognozno povoljne aberacije za bolesnike sa PMF: solo 13q-, t/dup(1q) solo 20q-, solo +9, druge solo aberacije, dve aberacije isključujući nepovoljne, normalan kariotip; a nepovoljne: kompleksno aberantan kariotip, solo +8, solo -7/7q-, solo -5/5q-, i(17q), inv(3), 12p-, 11q23, dve aberacije uključujući nepovoljne.

7. LITERATURA

1. Manchester KL Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends in cell biology*. 1995;5:384-387.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497-1501.
3. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-293.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. World Health Organization (WHO) classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. International agency for research on cancer (IARC), Lyon. 2008.
5. Metcalf D. General introduction to hemopoiesis. In: Metcalf D, Nicola NA, editors. *The hemopoietic colony-stimulating factors*. 1st published, Cambridge University Press. 1995;pp.10-28.
6. Keller G, Paige C, Gilboa E, Wagner EF. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature*. 1985;318:149-154.
7. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1:661-673.
8. Harrison DE, Zhong RK. The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10134-10138.
9. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification

- of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124:1929-1939.
10. Dexter TM, Spooncer E, Schofield R, Lord BI, Simmons P. Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells*. 1984;10:315-339.
 11. Čolović M, Janković G. Regulacija normalne hematopoeze. U: Pijanović P, urednik. *Maligne bolesti krvi*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd. 1999. st. 20.
 12. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:12240-12244.
 13. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*. 1991;3:175-184.
 14. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78:2791-2808.
 15. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation *in vitro*: definition of three erythroid colony responses. *Blood*. 1977;49:855-864.
 16. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*. 1978;51:527-537.
 17. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 1996;88:1284-1296.
 18. Odell TT, Jackson CW, Gosslee DG. Maturation of rat megakaryocytes studied by microspectrophotometric measurement of DNA. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1965;119:1194-1199.

19. Long MW. Megakaryocyte differentiation events. *Semin Hematol.* 1998;35:192-199.
20. Bartley TD, J. Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell.* 1994;77:1117-1124.
21. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature.* 1994;369:565-568.
22. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2006;355:2452-2466.
23. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia.* 2008;22:3-13.
24. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6:372-375.
25. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967;58:1468-1471.
26. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med.* 1976;295:913-916.
27. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood.* 1978;51:189-194.
28. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood.* 1981;58:916-919.
29. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of *BCR-ABL* positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-566.

30. 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, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
31. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
32. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352:1779-1790.
33. 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. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
34. Mertens C, Darnell JE Jr. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell*. 2007;131:612.
35. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*. 2007;282:20059-20063.
36. Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang XY, Algate PA, Franklin RA, Oberhaus SM, Steelman LS, McCubrey JA. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia*. 1999;13:1109-1166.
37. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:171-191.

38. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell*. 2003;14:1448-1459.
39. Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MG. Tyrosine phosphorylation of JAK2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol*. 2004;24:4968-4978.
40. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:900-911.
41. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem*. 2000;275:29338-29347.
42. Ward AC, Toun I, Yoshimura A. The JAK-STAT pathway in normal and preturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000;95:19-29.
43. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*. 2001;8:1327-1338.
44. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem*. 2005;280:27251-27261.
45. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:271-278.
46. Röder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*. 2001;29:694-702.
47. Moliterno AR, Hankins DW, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:572-580.

48. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood*. 1997;90:4031-4038.
49. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the *JAK2*V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162-2168.
50. www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=jak2
51. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired *JAK2* mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005;280:22788-22792.
52. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, Erber WN, Kusec R, Larsen TS, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Griesshammer M, Reilly JT, Cheung BY, Harrison CN, Green AR. Mutation of *JAK2* in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108:3548-3555.
53. Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in *JAK2* exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol*. 2009;9:58:1-14.
54. Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Yeh CH, Zhang ZJ, Verstovsek S, Albitar M. Mutation profile of *JAK2* transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J Mol Diagn*. 2009;11:49-53.
55. Skoda R. Update on the impact of the *JAK2* mutation on signalling pathways in myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol Suppl*. 2007;68:5-8.
56. Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;1-10.

57. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of *JAK2* exon 12 in patients with *JAK2* (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:1686-1689.
58. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459–468.
59. <http://gene4.weizmann.ac.il/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPL>
60. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108:3472–3476.
61. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3:1140-1151.
62. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112:141-149.
63. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Garrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of *MPL 515W L/K* mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112:844–847.
64. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in *JAK2V617F*-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007;35:1641–1646.

65. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, Mesa RA, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. Concurrent *MPL515* and *JAK2V617F* mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol.* 2006;135:683–687.
66. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM; GIMEMA—Italian Registry of Myelofibrosis; MPD Research Consortium. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring *MPL* mutation. *Br J Haematol.* 2007;137:244-247.
67. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M, Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre SE, Stone R, Gilliland DG. A tyrosine kinase created by fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348:1201-1214.
68. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. The *TEL/ETV6* gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* 1998;12:2392-2402.
69. Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR, Gilliland DG. The *TEL*/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14845–14850.
70. Valent P. Systemic mastocytosis. *Cancer Treat Res.* 2008;142:399–419.
71. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. Prognostic impact of *c-KIT* mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood.* 2006;107:3463-3468.
72. Harir N, Boudot C, Friedbichler K, Sonneck K, Kondo R, Martin-Lannere S, Kenner L, Kerenyi M, Yahiaoui S, Gouilleux-Gruart V, Gondry J, Benit L, Dusanter-Fourt I,

- Lassoued K, Valent P, Moriql R, Gouilleux F. Oncogenic kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade. *Blood*. 2008;112:2463–2473.
73. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lecluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N Engl J Med*. 2009;360:2289-2301.
 74. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TET2>
 75. Abdel-Wahab O, Levine RL. Genetics of the myeloproliferative neoplasms. Verstovsek S, Tefferi A, editors. In: *Myeloproliferative neoplasms*. Humana press is part of Springer Science+Business Media (www.springer.com). 2011;pp:48-52.
 76. Ko M, Rao A. *TET2*: epigenetic safeguard for HSC. *Blood*. 2011;118:4501-4503.
 77. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302.
 78. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, Bloomfield CD, Thiele J. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. In: *World Health Organization (WHO) classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th edition. International agency for research on cancer (IARC), Lyon. 2008;pp:18-63.
 79. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*. 2009;115:3842–3847.
 80. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Lekuemia*. 2008;22:14-22.

81. Čolović M. Agnogeni mijeloidna metaplazija (Primarna mijelofibroza s mijeloidnom metaplazijom). U: Čolović M, Janković G. Maligne bolesti krvi. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd. 1999;st:151-156.
82. Tefferi A. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *N Engl J Med.* 2000;342:1255-1265.
83. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003;17:1211-1226.
84. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, Levine R, Le Bousse-Kerdiles MC, Wadleigh M, Campbell PJ, Silver RT, Vannucchi AM, Deeg HJ, Gisslinger H, Thomas D, Odenike O, Solberg LA, Gotlib J, Hexner E, Nimer SD, Kantarjian H, Orazi A, Vardiman JW, Thiele J, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res.* 2007;31:737-740.
85. Tefferi A. The forgotten myeloproliferative disorder: myeloid metaplasia. *The Oncologist.* 2003;8:225-231.
86. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol.* 1998;102:684-690.
87. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, Bauters F. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood.* 1996; 88:1013-1018.
88. Altura RA, Head DR, Wang WC. Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2000;109:459-462.
89. Hoffman R, Mingjiang X and Barosi G. Primary myelofibrosis; Etiology and pathoge-

nesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, Mc Glave P, Heslop H editors. Hematology, basic principles and practice. 5th edition. Churchill Livingstone an imprint of Elsevier. 2008.

90. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocytopenia and variables of prognostic impact. *Leuk Lymphoma*. 1996;22:303-317.
91. Thiele J, Zankovich R, Steinberg T, Fischer R, Diehl V. Agnogenic myeloid metaplasia (AMM)-correlation of bone marrow lesions with laboratory data: A longitudinal clinicopathological study on 114 patients. *Hematol Oncol*. 1989;7:327-343.
92. Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, Cervantes F, Deeg HJ, Reilly JT, Verstovsek S, Dupriez B, Silver RT, Odenike O, Cortes J, Wadleigh M, Solberg LA Jr, Camoriano JK, Gisslinger H, Noel P, Thiele J, Vardiman JW, Hoffman R, Cross NCO, Gilliland DG, Kantarjian H. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). *Blood*. 2006;108:1497-1503.
93. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90:1128-1132.
94. Thiele J, Kvasnicka HM, Barosi G, Orazi A, Vardiman JW. Primary myelofibrosis. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. In: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. IARC, Lyon. 2008;pp:44-47.
95. Kvasnicka HM, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer*. 1997;80:708-719.
96. Tefferi A, Meyer RG, Wyatt WA, Dewald GW. Comparison of peripheral blood interphase cytogenetics with bone marrow karyotype analysis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2001;115:316-319.

97. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol.* 1997;98:96-102.
98. Djordjevic V, Dencic-Fekete M, Jovanovic J, Bizic S, Jankovic G, Bogdanovic A, Cemerikic-Martinovic V, Gotic M. Cytogenetics of agnogenic myeloid metaplasia: a study of 61 patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173:57-62.
99. Hussein K, Huang J, Lasho T, Pardanani A, Mesa RA, Williamson CM, Ketterling RP, Hanson CA, Van Dyke DL, Tefferi A. Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 2009;82:255-259.
100. Miller JB, Testa JR, Lindgren V, Rowley JD. The pattern and clinical significance of karyotypic abnormalities in patients with idiopathic and postpolycythemic myelofibrosis. *Cancer.* 1985;55:582-591.
101. Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW. Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2001;113:763-771.
102. Reilly JT. Cytogenetic Findings in Classical MPNs. Verstovsek S, Tefferi A, editors. In: *Myeloproliferative neoplasms.* Humana press is part of Springer Science+Business Media (www.springer.com). 2011;pp:69-83.
103. Cox MC, Panetta P, Venditti A, Abruzzese E, Del Poeta G, Cantonetti M, Amadori S. New reciprocal translocation t(6;10) (q27;q11) associated with idiopathic myelofibrosis and eosinophilia. *Leuk Res.* 2001;25:349-351.
104. Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, Dewald GW, Tefferi A. Presence of unfavorable cytogenetic abnormalities is the strongest predictor of poor survival in secondary myelofibrosis. *Cancer.* 2006;106:1985-1989.
105. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910-1916.

106. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 2000;95:1925-1930.
107. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-2088.
108. Diez-Martin JL, Graham DL, Pettitt RM, Dewald GW. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc*. 1991;66:287-299.
109. Djordjevic V, Jankovic G, Suvajdzic N, Marisavljevic D, Pantic M, Bogdanovic A, Sefer D, Dencic M, Colovic M. A der(14)t(1;14)(q12;p11) in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;160:89-93.
110. Djordjević V, Dencić-Fekete M, Jovanović J, Drakulić D, Stevanović M, Janković G, Gotić M. Pattern of trisomy 1q in hematological malignancies: a single institution experience. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;186:12-18.
111. Fonatsch C, Haase D, Freund M, Bartels H, Tesch H. Partial trisomy 1q. A nonrandom primary chromosomal abnormality in myelodysplastic syndromes? *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;56:243-253.
112. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol*. 2009;82:329-338.
113. Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, Spurbeck J, Ross FM, Watmore AE, Reilly JT, Cross NC, Dewald GW, Tefferi A. Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2005;130:229-232.
114. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/der6t0106q21p21ID1546.html>

115. Tefferi A, Dingli D, Li CY, Dewald GW. Prognostic diversity among cytogenetic abnormalities in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer*. 2005;104:1656-1660.
116. Hussein K, Pardananin AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International prognostic scoring system-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood*. 2010;115:496-499.
117. Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K, Döhner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès M-C, Desterke C, Guertton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian J-J, Viallard J-F, Brière J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT. V617F mutation in *JAK2* is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2006;107:2098-2100.
118. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative *JAK2V617F* assessment reveal a strong association between clonality and *JAK2V617F* in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of *JAK2V617F*-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107:4139-4141.
119. Wang X, LeBlanc A, Gruenstein S, Xu M, Mascarenhas J, Panzera B, Wisch N, Parker C, Goldberg JD, Prchal J, Hoffman R, Najfeld V. Clonal analyses define the relationships between chromosomal abnormalities and *JAK2V617F* in patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2009;37:1194-1200.
120. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of *JAK2V617F* mutated allele. *Blood*. 2009;114:1477-1483.
121. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for *JAK2V617F*-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:18962-18967.
122. Xu M, Bruno E, Chao J, Huang S, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Prchal JT, Barosi G, Hoffman R; MPD Research Consortium. Constitutive mobilization of CD34+

cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood*. 2005;105:4508-4515.

123. Ni H, Barosi G, Rondelli D, Hoffman R. Studies of the site and distribution of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:833-839.
124. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34+ cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001;98:3249-3255.
125. BuysSENS N, Bourgeois NH. Chronic myelocytic leukemia versus idiopathic myelofibrosis. A diagnostic problem in bone marrow biopsies. *Cancer*. 1977;40:1548-1561.
126. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol*. 1999;17:2954-2970.
127. Barosi G, Cazzola M, Frassoni F, Orlandi E, Stefanelli M. Br J Haematol. Erythropoiesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia: recognition of different classes of patients by erythrokinetics. *Br J Haematol*. 1981;48:263-272.
128. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl Med*. 2006;355:2452-2466.
129. Lichtman MA. Idiopathic myelofibrosis (myelofibrosis with myeloid metaplasia). In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Pchal JT, editors. *Williams hematology*. 7th edition. McGraw-Hill Medical. 2007;pp:342-345.
130. Cervantes F, Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. *Semin Oncol*. 2005;32:395-402.
131. Labar B. Idiopatska mijelofibroza. U: Krznarević-Vohalski G, urednik. *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga. 2007;st:196-200.
132. 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*. 2007;110:1092-1097.
133. Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. *Haematologica*. 2000;85:1126-1134.
134. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol*. 2004;19:1245-1260.
135. Trautmann U, Rubbert A, Gramatzki M, Henschke F, Gebhart E. Multiple chromosomal changes and karyotypic evolution in a patient with myelofibrosis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992;61:6-10.
136. Dingli D, Mesa RA, Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: new developments in pathogenesis and treatment. *Intern Med*. 2004;43:540-547.
137. Rozman C, Giralt M, Feliu E, Rubio D, Cortés MT. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer*. 1991;67:2658-2663.
138. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, Vannucchi AM, Mesa RA, Demory JL, Barosi G, Rumi E, Tefferi A. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113:2895-2901.
139. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C, Montserrat E. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1997;97:635-640.
140. Tefferi A, Huang J, Schwager S, Li CY, Wu W, Pardhanani A, Mesa RA. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution. *Cancer*. 2007;109:2083-2088.

141. Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, Cortes J, Lynn A, Keating MJ, Thomas DA, Pierce S, Kantarjian H, Verstovsek S. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood*. 2009;113:4171-4178.
142. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2008;22:905-914.
143. Michiels JJ. Diagnostic criteria of the myeloproliferative disorders (MPD): essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic megakaryocytic granulocytic metaplasia. *Neth J Med*. 1997;51:57-64.
144. Rupoli S, Da Lio L, Sisti S, Campanati G, Salvi A, Brianzoni MF, D'Amico S, Cinciripini A, Leoni P. Primary myelofibrosis: a detailed statistical analysis of the clinicopathological variables influencing survival. *Ann Hematol*. 1994;68:205-212.
145. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine*. 1983;62:353-371.
146. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti MC, Ricci P, Vianelli N, Gianni L, Zuffa E, Aloe Spiriti MA, Latagliata R, Pileri S, Magrini U, Gugliotta L, Morra E, Bernasconi C, Mandelli F, Tura S. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol*. 1990;75:4-9.
147. Demory JL, Dupriez B, Fenaux P, Lai JL, Beuscart R, Jouet JP, Deminatti M, Bauters F. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. *Blood*. 1988;72:855-859.
148. Hasselbalch HC. Idiopathic myelofibrosis-an update with particular reference to clinical aspects and prognosis. *Int J Clin Lab Res*. 1993;23:124-138.
149. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011;86:1017-1026.

150. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, Hanson C, Pardanani A, Tefferi A. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*. 2011;25:82-88.
151. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian registry of myelofibrosis. *JAK2 V617F* mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007;110:4030-4036.
152. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gary Gilliland D. The *JAK2(V617F)* tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*. 2005;131:320-328.
153. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A. Low *JAK2V617F* allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008;22:756-761.
154. Thiele J, Kvasnicka HM. CD34+ stem cells in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol*. 2002;17:507-521.
155. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol*. 2005;128:42-48.
156. Thiele J, Kvasnicka HM, Czieslick C. CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. *Ann Hematol*. 2002;81:86-89.
157. Wolf BC, Neiman RS. Hypothesis: splenic filtration and the pathogenesis of extramedullary hematopoiesis in agnogenic myeloid metaplasia. *Hematol Pathol*. 1987;1:77-80.

158. Bouroncle BA, Doana CA. Myelofibrosis. Clinical, hematologic and pathologic study of 110 patients. *Am J Med Sci.* 1962;243:697-715.
159. Ward HP, Block MH. The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine.* 1971;50:357-420.
160. Elliott MA, Verstovsek S, Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, Tefferi A. Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leuk Res.* 2007;31:1503-1509.
161. McLornan D, Percy M, McMullin MF. *JAK2V617F*: A single mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulster Med J.* 2006;75:112–119.
162. Dunlap J, Kelemen K, Leeborg N, Braziel R, Olson S, Press R, Huang J, Gatter K, Loriaux M, Fan G. Association of *JAK2* mutation status and cytogenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2011;135:709-719.
163. Tefferi A, Sirhan S, Sun Y, Lasho T, Finke CM, Weisberger J, Bale S, Compton J, LeDuc CA, Pardanani A, Thorland EC, Shevchenko Y, Grodman M, Chung WK. Oligonucleotide array CGH studies in myeloproliferative neoplasms: comparison with *JAK2V617F* mutational status and conventional chromosome analysis. *Leuk Res.* 2009;33:662-664.
164. Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, Tefferi A. Prognosis in transplant-eligible patients with agnogenic myeloid metaplasia: a simple CBC-based scoring system. *Cancer.* 2006;106:623-630.
165. Kröger N, Mesa RA. Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. *Leukemia.* 2008;22:474-486.
166. Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C, Chauncey TR, Doney K, Georges GE, Kiem HP, Martin PJ, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Sandmaier BM, Warren EH, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood.* 2003;102:3912-3918.

167. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, Prchal JT, Popat U, Alessandrino EP, Spivak JL, Smith BD, Klingemann HG, Fruchtman S, Hoffman R. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2005;105:4115-4119.
168. Callum J. Primary myelofibrosis. http://sunnybrook.ca/uploads/Primary_Myelofibrosis.pdf
169. Gilbert HS. Long term treatment of myeloproliferative disease with interferon-alpha-2b: feasibility and efficacy. *Cancer*. 1998;83:1205-1213.
170. Tefferi A, Silverstein MN, Li CY. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment after splenectomy in patients who have myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1997;99:352-357.
171. Besa EC, Nowell PC, Geller NL, Gardner FH. Analysis of the androgen response of 23 patients with agnogenic myeloid metaplasia. The value of chromosomal studies in predicting response and survival. *Cancer*. 1982;49:308-313.
172. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Hehlmann R, Hoffman R, Kiladjian JJ, Kröger N, Mesa R, McMullin MF, Pardanani A, Passamonti F, Vannucchi AM, Reiter A, Silver RT, Verstovsek S, Tefferi A. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29:761-770.
173. Rodriguez JN, Martino ML, Dieguez JC, Prados D. rHuEpo for the treatment of anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Experience in 6 patients and meta-analytical approach. *Haematologica*. 1998;83:616-621.
174. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Hernández-Boluda JC, Sureda A, Torrebadell M, Montserrat E. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br J Hematol*. 2004;127:399-403.

175. Labar B, Hauptmann E i saradnici. Zloćudni tumori granulocita i monocita. Idiopatska mijelofibroza. Lečenje. U: Krznarević-Vohalski G, urednik. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2007;st:198-199.
176. Cervantes F. Myelofibrosis: biology and treatment options. *Eur J Hematol Suppl.* 2007;68:13-17.
177. Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood.* 1995;85:989-996.
178. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* 1986;163:1433-1450.
179. Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Gray L, Tefferi A. Etanercept, a soluble tumor necrosis factor receptor, palliates constitutional symptoms in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of a pilot study. *Blood.* 2002;99:2252-2254.
180. Strupp C, Germing U, Scherer A, Kündgen A, Mödder U, Gattermann N, Haas R. Thalidomide for the treatment of idiopathic myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 2004;72:52-57.
181. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, Mesa RA, Thomas D, Lasho TL, Hogan WJ, Litzow MR, Allred JB, Jones D, Byrne C, Zeldis JB, Ketterling RP, McClure RF, Giles F, Kantarjian HM. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2006;108:1158-1164.
182. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood.* 2011;117:3494-3504.
183. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, McQuitty M, Hunter DS, Levy R, Knoops L, Cervantes F, Vannucchi AM, Barbui T, Barosi G. JAK inhibition with Ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366:787-798.
184. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, Tozzi L, Biamonte F,

- Bartalucci N, Gattoni E, Lupo ML, Finazzi G, Pancrazzi A, Antonioli E, Susini MC, Pieri L, Malevolti E, Usala E, Occhini U, Grossi A, Caglio S, Paratore S, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM; AIRC-Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative (AGIMM) investigators. Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2011;118:2069-2076.
185. Stefanović S, Ristić M, Jančić M. Hematološki atlas. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb, 1990.
186. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother*. 1996;5:213-226.
187. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van der Schoot CE, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*. 1998;34:128-142.
188. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haemaol*. 1999;21:301-308.
189. D'Archangelo M. Flow cytometry: new guidelines to support its clinical application. *Cytometry*. 2007;72B:209-210.
190. Novak A, Kruskic M, Ludoski M, Jurukovski V. Rapid method for obtaining high-quality chromosome banding in the study of hematopoietic neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994;74:109-114.
191. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. *ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. S.Karger, Basel. 2009.
192. Spasovski V, Tošić N, Kostić T, Pavlović S, Čolović M: Mutacija *JAK2-V617F* kod bolesnika sa mijeloproliferativnim neoplazijama: veza sa mutacijom *FLT3-ITD*. *Srp Arh*

Celok Lek. 2010;9-10:614-618.

193. Michielis JJ, Kvasnicka HM, Thiele J, editors. Myeloproliferative disorders. Current perspectives on diagnostic criteria, histopathology and treatment in essential thrombocythemia, polycythemia ribra vera and chronic idiopathic myelofibrosis. Rotterdam and Cologne: ISBN. 2005.
194. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of *BCR/ABL*-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol.* 2008;87:1-10.
195. Burchard GD, Browne E, Sievertsen J, May J, Meyer C. Spleen size determined by ultrasound in patients with sickle cell trait, HbAC trait and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in a malaria hyperendemic area (Ashanti Region, Ghana). *Acta Trop.* 2001;80:103–109.
196. Yazdanpanah Y, Thomas AK, Kardorff R, Talla I, Sow S, Niang M, Stelma FF, Decam C, Rogerie F, Gryseels B, Capron A, Doehring E. Organometric investigations of the spleen and liver by ultrasound in *Schistosoma mansoni* endemic and nonendemic villages in Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:245-249.
197. Jackson CC, Medeiros LJ, Miranda RN. 8p11 myeloproliferative syndrome: a review. *Hum Pathol.* 2010;41:461-476.
198. Santana-Davila R, Holtan SG, Dewald GW, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, Steensma DP, Tefferi A. Chromosome 5q deletion: specific diagnoses and cytogenetic details among 358 consecutive cases from a single institution. *Leuk Res.* 2008;32:407-411.
199. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, Pui CH, Rivera GK, Grosveld GC, Behm FG. 12p Abnormalities and the *TEL* Gene (*ETV6*) in childhood Acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1997;90:4559-4566.
200. Kollia P, Stavroyianni N, Stamatopoulos K, Zoi K, Viniou N, Mantzourani M, No-

- guchi CT, Paterakis G, Abazis D, Pangalos C, Loukopoulos D, Yataganas X. Molecular analysis of transferrin receptor mRNA expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;115:19-24.
201. Chen Z. Molecular cytogenetic markers related to prognosis in hematological malignancies. *World J Pediatr.* 2006;4:252-259.
202. Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, Shurafa M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27:11-16.
203. Andrieux J, Demory JL, Morel P, Plantier I, Dupriez B, Caulier MT, Bauters F, Lai JL. Frequency of structural abnormalities of the long arm of chromosome 12 in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;137:68-71.
204. Welborn J. Constitutional chromosome aberrations as pathogenetic events in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;149:137-153.
205. Bakshi SR, Brahmabhatt MM, Trivedi PJ, Dalal EN, Patel DM, Purani SS, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Trisomy 8 in leukemia: A GCRI experience. *Indian J Hum Genet.* 2012;18:106-108.
206. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2002;30:229-236.
207. Zamora L, Xandri M, Garcia O, Marcé S, Xicoy B, Granada I, Navarro JT, Millá F. Association of JAK2 mutation status and cytogenetic abnormalities at diagnosis in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2012;137:677-678.
208. Randhawa J, Ostojic A, Vrhovec R, Atallah E, Verstovsek S. Splenomegaly in myelofibrosis-new options for therapy and the therapeutic potential of Janus kinase 2 inhibitors. *Journal of Hematology and Oncology.* 2012;5:43:1-7.
209. Wang X, Zhang W, Ishii T, Sozer S, Wang J, Xu M, Hoffman R. Correction of the ab-

normal trafficking of primary myelofibrosis CD34+ cells by treatment with chromatin-modifying agents. *Cancer Res.* 2009;69:7612-7618.

210. Xu M, Bruno E, Chao J, Ni H, Lindgren V, Nunez R, Mahmud N, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Liu E, Prchal JT, Rondelli D, Barosi G, Hoffman R. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2005;105:1699-1705.
211. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardanani A, Cervantes F, Passamonti F, Tefferi A. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011;29:392-397.

8. SKRAĆENICE

Ph	Filadelfija hromozom
MMĆ	Multipotentna matična ćelija
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythroid-Monocyte-Macrophage
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
EPO	Eritopoetin
EPOR	Eritropoetinski Receptor
CFU-Meg	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
TPO	Trombopoetin
SCF	Stem Cell Factor
IL	Interleukin
CSF-GM	Colony Stimulating Factor-Granulocyte-Macrophage
MPN	Mijeloproliferativne neoplazme
MPB	Mijeloproliferativne bolesti
HML	Hronična mijeloidna leukemija
PV	Policitemija vera
ET	Esencijalna trombocitemija
PMF	Primarna mijelofibroza
<i>BCR</i>	Breakpoint Cluster Region
<i>ABL</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog gene
<i>JAK</i>	Just Another Kinase
STAT	Signaling Transducer and Activator of Transcription
PI3K	Fosfatidilinozitol-3 kinaza
G-6-PD	Glukoza-6-Fosfat Dehidrogenaza
Tyk2	Tirozin kinaza 2
MAP	Mitogen-aktivni kinazni protein
SOCS	Suppressors Of Cytokine Singnaling gene
MPL	Myeloproliferative leukemia-receptor za trombopoetin
TPO	Trombopoetin
<i>PDGFR</i>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
<i>FIP1L1</i>	Factor Interacting with PAP-like 1
<i>ETV6 (TEL)</i>	Translocation-Ets-Leukemia
<i>TET</i>	Ten-Eleven-Translocation

<i>KIT</i>	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
MDS	Mijelodisplastičnim sindrom
AML	Akutna mijeloidna leukemija
5mC	5-metilcitozin
5hmC	5-hidroksimetilcitozin
5fC	5-formilcitozin
5caC	5-karboksicitozin
TDG	Timin-DNA glikozilaz
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
<i>FGFR1</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor1
HNL	Hronična neutrofilna leukemija
HEL	Hronična eozinofilna leukemija
MPNn	Mijeloproliferativne neoplazme neklasifikovane
HMML	Hronična mijelomonocitna leukemija
JMML	Juvenilna mijelomonocitna leukemija
MF	Marrow fibrosis
<i>MPL</i>	Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene
GSCFR	Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor
HMC	Hematopoetske matične ćelije
HPC	Hematopoetske progenitorne ćelije
LDH	Laktatdehidrogenaza
PS	Prognozni sistem
CPS	Citogenetički prognostički sistem
ATMČH	Alogena transplatacija matičnih ćelija hematopoeze
INF	Interferon
TNF	Tumor nekrozni faktor
m-TOR	Mammalian target of rapamycin
MGG	May-Grinwald-Giemsa
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-Mk	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
IPCM	Imunofenotipizacija i protočna citometrija
HG	Hypotonic giemsa banding of chromosomes
GTG	Giemsa trypsin banding of chromosomes
ISCN	An International System for Human Cytogenetic Nomenclature
TAE	Tris-acetat EDTA

PCR	Lančana reakcija polimeraze
<i>JAK2-WT</i>	Just Another Kinase 2-wild type
HEL	Human Erythroleukemia cell line
<i>C-SRC1</i>	Human Sarcoma 1 gene
<i>RB-1</i>	Retinoblastoma 1 gene
<i>IL-6RA</i>	Interleukin 6 receptor
<i>MNDA</i>	Myeloid Cell Nuclear Differentiation Antigen
<i>CENPF</i>	Centromere Protein F
<i>CASP8</i>	Caspase 8 gene
<i>CFLAR</i>	CASP8 And FADD-Like Apoptosis Regulator
<i>FKBP51</i>	FK506 binding protein 51
cAMP	Cyclin Adenosine Monophosphate
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
siRNK (siRNA)	Small interfering RNA
LOH	Loss of heterozygosity
FISH	Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
K ₂ EDTA	Potassium-Ethylenediaminetetraacetic acid
AS-qPCRs	Quantitative Real-time Ppolymerase Chain Reaction-based allelic discrimination assay
U937	Humana hematopoezna ćlijska linija
APL	Alkalna fosfataza
IWG-MRT	International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment
IPSS	International Prognostic Scoring System
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System

Napomena: Po Međunarodnom dogovoru imena gena pišu se kurzivom, a genski produkti standardnim slogom

BIOGRAFIJA

Vesna Đorđević (rođ. Pendić) rođena je 01. 09. 1966. god. u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Diplomirala je 28. 12. 1991. na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9.10.

Poslediplomske studije upisala je školske 1992/93. godine na Katedri za genetiku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Specijalistički rad pod naslovom "Citogenetika hroničnih mijeloproliferativnih bolesti" odbranila je 11. 07. 1996. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Magistarski rad pod nazivom "Varijantne translokacije hromozoma 9 i 22 u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji" odbranila je 11. 11. 2002. godine. na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Na sednici Naučno-nastavnog veća Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 10. 06. 2005. godine, stiče zvanje istraživača-saradnika za naučnu oblast genetike.

Tema za izradu doktorske disertacije Vesne Đorđević, pod naslovom "**Tip i učestalost hromozomskih aberacija i značaj molekularnog markera JAK2V617F u primarnoj mijelofibrozi**", prihvaćena je od strane Veća naučnih oblasti prirodnih nauka, Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 02. 06. 2011. godine.

Pojedini rezultati iz doktorske disertacije publikovani su u okviru tri naučna rada u međunarodnim časopisima i u vidu sedam saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Vesna Đorđević je prisustvovala i brojnim radnim skupovima iz oblasti hematologije i citogenetike, među kojima su najznačajniji sastanci o dijagnostici i lečenju hronične mijeloidne leukemije i *BCR/ABL* negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi.

Mr Vesna Đorđević član je Društva genetičara Srbije i Evropskog udruženja citogenetičara. Autor je i koautor 25 naučnih radova i 105 sažetaka sa naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Весна Ђорђевић

Потписана _____
број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

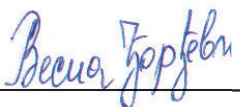
Тип и учесталост хромозомских аберација и значај молекуларног маркера

JAK2V617F у примарној мијелофибрози

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.09.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Весна Ђорђевић _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Тип и учесталост хромозомских аберација и значај молекуларног
Наслов рада _____ маркера JAK2V617F у примарној мијелофибрози _____

Ментор _____ Доцент др Софија Павковић-Лучић и Професор др Андрија Богдановић _____

Потписана _____ Весна Ђорђевић _____

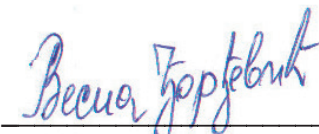
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 20. 09. 2013. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Тип и учесталост хромозомских аберација и значај молекуларног маркера

JAK2V617F у примарној мијелофибрози

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

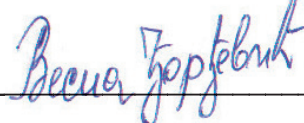
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, _____ 20. 09. 2013.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.