

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΘΡΟΜΒΩΣΗ-ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ-ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ»**

***Δ' ΕΞΑΜΗΝΟ***

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη του Ινωδολυτικού μηχανισμού ασθενών με Ιδιοπαθή  
Θρομβοκυττάρωση με τη μέθοδο της θρομβοελαστογραφίας »**

Ευσταθοπούλου Μαρία

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ) ανήκει στα Ph αρνητικά Μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα. Οι ασθενείς με ΙΘ κινδυνεύουν κυρίως από θρομβωτικές επιπλοκές, αλλά και αιμορραγικές, που αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Τα θρομβωτικά επεισόδια αφορούν το αρτηριακό και φλεβικό δίκτυο, αλλά και την μικροκυκλοφορία. Διάφοροι παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση έχουν αναγνωριστεί, με κυριότερους την ηλικία άνω των 60 ετών, το προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης και την παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F. Επίσης, διάφορα μοντέλα διαστρωμάτωσης κινδύνου έχουν προταθεί για την ανάδειξη των ασθενών υψηλού κινδύνου, όπως το IPSET-t score. Η παθοφυσιολογία της θρόμβωσης στην Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση είναι σύνθετη και πολυπαραγοντική. Η ενεργοποίηση και η αλληλεπίδραση λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων-με τη δημιουργία συσσωρεύσεων μεταξύ αυτών των κυττάρων-, ο ρόλος της χρόνιας φλεγμονής, της νέτωσης, η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης από τα μικροκυστίδια και η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην παθογένεση της θρόμβωσης. Τα παραπάνω βρίσκονται υπό την επίδραση οδηγών μεταλλάξεων, όπως η JAK2V617F, η CALR και η MPL. Και ενώ η προπηκτική διάθεση των ασθενών αυτών έχει σε μεγάλο βαθμό διαλευκανθεί, ασαφής παραμένει η συμπεριφορά τους μετά τη δημιουργία του θρόμβου, καθότι το ινωδολυτικό σύστημα σε αυτή την ομάδα ασθενών είναι λιγότερο μελετημένο. Σε αυτή την εργασία μελετήσαμε το ινωδολυτικό σύστημα 15 ασθενών με ΙΘ, χρησιμοποιώντας μια νέα μέθοδο Σφαιρικής Θρομβοελαστογραφίας, το TPA test, δηλαδή γρήγορη ενεργοποίηση της ινωδόλυσης με την προσθήκη σε ολικό αίμα Ιστικού Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου (TPA). Ασθενείς κατά τη διάγνωση του νοσήματος ή με αντίσταση στην ασπιρίνη εμφανίζουν αντίσταση στην ινωδόλυση. Η χορήγηση Υδροξουρίας φαίνεται ότι μειώνει αυτήν την αντίσταση και βελτιώνει το πηκτικό προφίλ των ασθενών αυτών.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ) -σύμφωνα με την αναθεωρημένη κατάταξη των αιματολογικών νεοπλασμάτων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας του 2016( ΠΟΥ 2016)-ανήκει στα Ph αρνητικά μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα (MYN), μαζί με την Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ) και την Πρωτοπαθή Μυελοϊνώση (ΠΜ).[1]Τα MYN συνιστούν κλωνικά νοσήματα του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (HSC), το οποίο υφίσταται σωματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερπλασία μίας ή περισσότερων σειρών στο μυελό των οστών. Η ΙΘ αφορά κυρίως την μεγακαρυοκυτταρική σειρά και χαρακτηρίζεται από θρομβοκυττάρωση (>450,000/μl αιμοπετάλια στο αίμα) και από την παρουσία στο μυελό των οστών μεγάλων μεγακαρυοκυττάρων, με υπερλοβωμένο πυρήνα. Η ετήσια επίπτωση της Ιδιοπαθούς Θρομβοκυττάρωσης υπολογίζεται σε 0,2-2,3 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό στο Δυτικό κόσμο.[1] Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 50-60 έτη, ενώ 20 % των ασθενών έχει ηλικία κάτω των 41 ετών.[2] Υπάρχει υπεροχή ως προς το γυναικείο φύλο, με αναλογία περίπου 2:1.Οι ασθενείς με Ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση έχουν αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης ή/και αιμορραγίας, ενώ μικρός αλλά υπαρκτός είναι ο κίνδυνος εξέλιξης σε άλλο μυελοϋπερπλαστικό νόσημα (Αληθή Πολυκυτταραιμία ή Μυελοϊνώση) ή σε Οξεία Λευχαιμία(<1% τα πρώτα 10 χρόνια).[2] Συγκριτικά με τα άλλα MYN η Ιδιοπαθής Θρομβοκυττάρωση χαρακτηρίζεται από ευνοϊκότερη πρόγνωση , όμως το προσδόκιμο επιβίωσης είναι μικρότερο σε σχέση με αντίστοιχες ηλικιακές ομάδες του γενικού πληθυσμού, κυρίως εξαιτίας των θρομβωτικών συμβαμάτων.[3] Έτσι η μέση επιβίωση των ασθενών με ΙΘ είναι 18-19,8 έτη, ενώ για την ΑΠ και την ΠΜ, 13,5 και 5,9 έτη αντίστοιχα.[4] Ωστόσο, ασθενείς με ΙΘ και χαμηλό κίνδυνο θρόμβωσης έχουν ακόμα μεγαλύτερη επιβίωση (26,7 έτη).[4] Ο μηχανισμός της θρόμβωσης είναι σύνθετος και πολυπαραγοντικός στην ΙΘ. Η ανακάλυψη συγκεκριμένων μεταλλάξεων, ο ρόλος των αιμοπεταλίων, των λευκών αιμοσφαιρίων, των μικροκυστιδίων, των NETs, της θρομβίνης , της χρόνιας φλεγμονής και άλλων παραγόντων αποσαφήνισε σε μεγάλο βαθμό την προπηκτική διάθεση των ασθενών με ΙΘ. [5] Ωστόσο ασαφής παραμένει η συμπεριφορά των ασθενών αυτών μετά τη δημιουργία του θρόμβου, καθότι το ινωδολυτικό σύστημα σε αυτό το νόσημα είναι λιγότερο μελετημένο. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη του ινωδολυτικού συστήματος με θρομβοελαστογραφία με TPA ασθενών με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση, διαγνωσμένων σύμφωνα με τα κριτήρια του ΠΟΥ του 2008 ή τα αναθεωρημένα κριτήρια του 2016.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Το 2016 ο ΠΟΥ αναθεώρησε τα κριτήρια διάγνωσης της ΙΘ, ορίζοντας 4 μείζονα και 1 έλασσον κριτήριο. Τα μείζονα κριτήρια είναι: 1)Αριθμός αιμοπεταλίων  $\geq 450.000/\mu\text{L}$ .2)μυελός των οστών με υπερπλασία που αφορά κυρίως την μεγακαρυοκυτταρική σειρά, με παρουσία αυξημένου αριθμού μεγάλων, ώριμων μεγακαρυοκυττάρων με υπερλοβωμένο πυρήνα, χωρίς στροφή προς τα αριστερά ή υπερπλασία της ερυθράς σειράς, και σπανιότερα μικρή αύξηση των ινών ρετικουλίνης (βαθμού 1 ίνωση).3) Δεν πληρούνται τα κριτήρια του ΠΟΥ Χρονίας Μυελογενούς Λευχαιμίας BCR/ABL1 θετικής, Αληθούς Πολυκυτταραιμίας, Πρωτοπαθούς Μυελοϊνώσεως, Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου ή άλλου νεοπλασματος της μυελικής σειράς.4)Παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F,CALR ή MPL. Το μοναδικό έλασσον κριτήριο είναι η απουσία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης ή η ύπαρξη κάποιου άλλου κλωνικού δείκτη. Η διάγνωση της ΙΘ απαιτεί την παρουσία και των 4 μείζονων κριτηρίων ή τα πρώτα 3 μείζονα και το έλασσον κριτήριο.[1]

### ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΙΘ

Η Ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση χαρακτηρίζεται από αυξημένα αιμοπετάλια στο αίμα, αυξημένο θρομβωτικό ή/και αιμορραγικό κίνδυνο και από συστηματικά συμπτώματα. Τα τελευταία οφείλονται σε διαταραχές και μικροθρομβώσεις στην μικροκυκλοφορία. Σε μια αναδρομική μελέτη που διεξήγαγε η Mayo Clinic και στην οποία συμμετείχαν 1076 ασθενείς με ΙΘ σε σύνολο 3023 ασθενών με MYN, το 14% των ασθενών με ΙΘ εμφάνισε αρτηριακή θρόμβωση λίγο πριν ή κατά τη διάγνωση, ενώ 8% φλεβική θρόμβωση. Επίσης, 6% αυτών παρουσίαζαν γενικά συμπτώματα. [6]. Οι αρτηριακές θρομβώσεις αφορούν κυρίως αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, στεφανιαία επεισόδια και περιφερική αρτηριοπάθεια. Οι φλεβικές θρομβώσεις αφορούν εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις, πνευμονική εμβολή και θρομβώσεις σε ασυνήθεις θέσεις, όπως τα σπλαγγχικά αγγεία (ΘΣΦ) και οι φλέβες του εγκεφάλου(ΘΕΦ). Οι τελευταίες μάλιστα είναι πιο συχνές σε ασθενείς με MYN απ’

ότι στο γενικό πληθυσμό. Από αυτήν την άποψη, οι μισές περιπτώσεις συνδρόμου Budd-Chiari( θρόμβωση ηπατικών φλεβών) παρατηρούνται κατά τη φυσική εξέλιξη ενός MYN, ενώ το 30% περιπτώσεων θρόμβωσης της Πυλαίας Φλέβας αφορά ασθενείς με MYN. Σημειωτέων, η ΘΣΦ μπορεί να προηγείται της διάγνωσης ενός MYN, συνοδευόμενη συχνά από φυσιολογική γενική αίματος.[7] Για το λόγο αυτό συνιστάται σε κάθε ασθενή με ΘΣΦ ή ΘΕΦ έλεγχος για αποκλεισμό MYN με μοριακό έλεγχο των μεταλλάξεων JAK2V617F, CALR και MPL, που θα συζητηθούν παρακάτω.[2]

Τα γενικά συμπτώματα αφορούν κυρίως την κόπωση σε ποσοστό 90%, τον κνησμό (52%), την κεφαλαλγία(47%), την αδυναμία συγκέντρωσης (55,8%), το πρώιμο αίσθημα κορεσμού (53%) και κοιλιακό άλγος λόγω σπληνομεγαλίας, νυχτερινή εφίδρωση(49%) και σπανιότερα απώλεια βάρους, πυρετό και ερυθρομελαλγία.[8][2]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ασθενείς με αριθμό αιμοπεταλίων άνω του  $10^6/\mu\text{l}$  έχουν αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Αυτό το παράδοξο φαινόμενο ονομάζεται επίκτητο VonWillebrand Σύνδρομο(AVWS) και προκαλείται από την παθητική απορρόφηση των υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών του παράγοντα VonWillebrand στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.[9],[10] Το 50% περιπτώσεων AVWS αφορά λεμφοϋπερπλαστικά και μυελοϋπερπλαστικά υποκείμενα νοσήματα. Επίσης το 50% των ασθενών με MYN θα εμφανίσουν εργαστηριακά ευρήματα υποδηλώντα AVWS (φυσιολογικό VWF:Ag, αντιγόνο VWF ,με μειωμένη δραστικότητα ριστοσετίνης (VWF:RCoA).Συνήθως το VWF:RCoA στο επίκτητο Von Willebrand σύνδρομο είναι κάτω από 20% και τελικά ο λόγος VWF:RCoA/VWF:Ag είναι κάτω από 0,7(φυσιολογικά είναι περίπου 1).Πρόκειται δηλαδή για ποιοτική διαταραχή του παράγοντα VonWillebrand, που ομοιάζει κλινικά και εργαστηριακά με τον τύπο 2A ή 2B της νόσου VonWillebrand.[11] Αντίθετα, τιμές αιμοπεταλίων κάτω των  $10^6/\mu\text{l}$  συνδέονται με αρτηριακές ή φλεβικές θρομβώσεις, ειδικά όταν συνυπάρχει η μετάλλαξη JAK2V617F.Αυτή η αντίφαση μεταξύ βαθμού θρομβοκυττάρωσης και κλινικού φαινοτύπου επηρεάζει σημαντικά την απόφαση του γιατρού για χορήγηση αντιαιμοπεταλιακής αγωγής.[12] Λίγα δεδομένα από μελέτες υπάρχουν σχετικά με τη συχνότητα και τους παράγοντες κινδύνου για αιμορραγία στα MYN.Η ηλικία άνω των 60, η εκσεσημασμένη θρομβοκυττάρωση $>10^6/\mu\text{l}$ , η λευκοκυττάρωση $> 10.000/\mu\text{l}$ , το προηγούμενο ιστορικό αιμορραγίας, η σπληνομεγαλία και η πυλαία υπέρταση, το AVWS, η χορήγηση ασπιρίνης ή άλλων αντιπηκτικών φαίνεται να προδιαθέτουν ισχυρά στην αιμορραγική διάθεση των

ασθενών. Η πιο συχνή ανατομική θέση αιμορραγίας είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας.[11] Ωστόσο, πολλοί ασθενείς κατά τη διάγνωση είναι ασυμπτωματικοί, έχοντας ως μόνο εύρημα τη θρομβοκυττάρωση σε τυχαίο έλεγχο.

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ ΣΤΗ ΙΘ

Η θρόμβωση συνιστά την πιο συχνή εκδήλωση την ΙΘ, που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη νοσηρότητα και την θνητότητα των ασθενών. Η θρόμβωση αφορά το αρτηριακό και το φλεβικό δίκτυο, αλλά και την μικροκυκλοφορία. Μέχρι σήμερα πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάδειξη παραγόντων κινδύνου που αυξάνουν το κίνδυνο θρόμβωσης, ειδικά κατά τη διάγνωση του νοσήματος. Ο κίνδυνος θρόμβωσης στους ασθενείς με ΙΘ είναι 2-4% ανά ασθενή, ανά έτος.[13] Σε μια πολυκεντρική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 891 ασθενείς με ΙΘ, με κριτήρια διάγνωσης όπως ορίζονταν από τον ΠΟΥ, 129 (14%) και 62 (6%) ασθενείς με ΙΘ εμφάνισαν αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση κατά τη διάγνωση, αντίστοιχα.[14] Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε πιο πρόσφατη αναδρομική μελέτη της Mayo Clinic.[6] Ο κίνδυνος αρτηριακής θρόμβωσης είναι 1,2% ανά ασθενή/έτος, ενώ ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης 0,6% ανά ασθενή/έτος.[14],[15]. Ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση ήταν η ηλικία άνω των 60 ετών, το προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης, η ύπαρξη παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η αρτηριακή υπέρταση, το κάπνισμα και ο σακχαρώδης διαβήτης και η παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F.[14] Φαίνεται μάλιστα πως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από το πρώτο επεισόδιο θρόμβωσης έως τη διάγνωση της ΙΘ (< ή > από 24 μήνες) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα υποτροπής της θρόμβωσης στο μέλλον.[16] Ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι μεγαλύτερος κατά τη διάγνωση της ΙΘ ή λίγο μετά. Η αναλογία κινδύνου (HR) για αρτηριακή θρόμβωση στους ασθενείς με MYN συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό ήταν στους 3 μήνες, στο 1 έτος και στα 5 έτη από τη διάγνωση 3.0( 95% CI, 2.7 έως 3.4), 2.0(CI ,1.8 έως 2.2) και 1,5( CI ,1.4έως 1.6) αντίστοιχα. Υπάρχει ένας 10πλάσιος κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης (HR 9.7[7.8 έως 12,0]) στους 3 μήνες από τη διάγνωση, ο οποίος μειώνεται τον πρώτο και πέμπτο χρόνο από τη διάγνωση ,παραμένει όμως υψηλότερος από αυτόν του γενικού πληθυσμού αντίστοιχης ηλικιακής ομάδας.[17] Ο κίνδυνος υποτροπής της θρόμβωσης

είναι μεγαλύτερος για τους ασθενείς άνω των 60 ετών. Ειδικότερα, η ολική επίπτωση της υποτροπιάζουσας θρόμβωσης σε ασθενείς κάτω των 60 είναι 5,9 % ανά ασθενή ανά έτος, έναντι 8,9 % αυτών που είναι άνω των 60. Επίσης, η χορήγηση κυτταροστατικής αγωγής με Υδροξουρία μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής φλεβικής θρόμβωσης κατά 34%. [18]

Η κλασική διαστρωμάτωση του κινδύνου θρόμβωσης κατατάσσει του ασθενείς με ΙΘ σε δύο ομάδες: την ομάδα υψηλού κινδύνου, με ηλικία μεγαλύτερη των 60 ετών ή όσοι έχουν ιστορικό θρόμβωσης, ενώ η απουσία και των δύο αυτών παραγόντων χαρακτηρίζει τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου. Ο Barbuι και συνεργάτες εισήγαγε ένα προγνωστικό μοντέλο καθορισμού του θρομβωτικού κινδύνου που ονομάζεται IPSET-t και το οποίο λαμβάνει υπόψιν επιπλέον τους καρδιαγγειακούς παράγοντες (κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη) και τη μετάλλαξη JAK2V617F, κατατάσσοντας τους ασθενείς σε 3 κατηγορίες: χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου. [19] Συγκεκριμένα, το IPSET-t score καταχωρεί 2 βαθμούς στην ύπαρξη ιστορικού θρόμβωσης ή στην παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F, 1 βαθμό στην ηλικία άνω των 60 ετών και 1 βαθμό εφόσον υπάρχει τουλάχιστον 1 καρδιαγγειακός παράγοντας κινδύνου. Ο αριθμός των λευκών και των αιμοπεταλίων δε φάνηκε να αποτελεί ανεξάρτητο δυσμενή παράγοντα κινδύνου. Η ομάδα χαμηλού κινδύνου καθορίζεται από ένα score < 2, η ενδιάμεσου από ένα score = 2 και η υψηλού κινδύνου από score > 2. Ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι 1,03%, 2,35% και 3,56% ανά ασθενή/έτος αντίστοιχα. Συνολικά, το IPSET-t τροποποιεί σημαντικά τη διαστρωμάτωση κινδύνου συγκριτικά με το κλασικό σύστημα που λαμβάνει υπόψιν μόνο την ηλικία και το ιστορικό θρόμβωσης. Μόνο ένα ποσοστό 48% αυτών που θεωρούνταν «χαμηλού κινδύνου» (νέοι και ασυμπτωματικοί) εξακολουθούν να θεωρούνται χαμηλού κινδύνου με το IPSET-t. Το υπόλοιπο 52% είναι ενδιάμεσου κινδύνου (νέοι, ασυμπτωματικοί, με θετική τη μετάλλαξη JAK2V617F). Ένα μικρότερο ποσοστό 5% θεωρείται υψηλού κινδύνου (ασθενείς άνω των 60, χωρίς ιστορικό θρόμβωσης, αλλά που φέρουν τη μετάλλαξη και τουλάχιστον έναν παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου). Επιπροσθέτως, η πλειοψηφία των ασθενών που θεωρούνταν «υψηλού κινδύνου» (ασθενείς άνω των 60 ή με ιστορικό θρόμβωσης) αναταξινομούνται είτε ως «ενδιάμεσου» (31%) είτε ακόμα και ως «χαμηλού κινδύνου» (ασθενείς άνω των 60, χωρίς ιστορικό θρόμβωσης, καρδιαγγειακούς παράγοντες ή τη μετάλλαξη JAK2V617F). [19],[20] Η ύπαρξη καρδιαγγειακών παραγόντων (CV), όπως η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, το κάπνισμα, ο

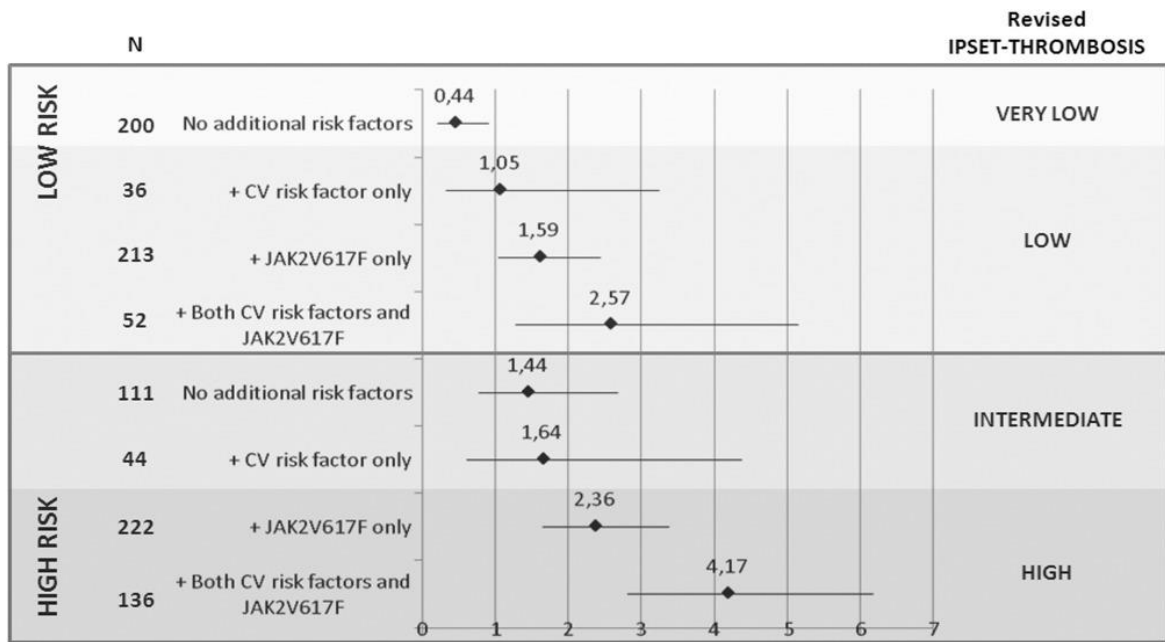
σακχαρώδης διαβήτης απαντώνται συχνά σε ασθενείς με ΙΘ. Ο Lekovic και συνεργάτες σε μια μελέτη με 244 ασθενείς με ΙΘ και με μέση παρακολούθηση 7 έτη, διαπίστωσαν αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε ασθενείς με CV παράγοντες.[21]

Μεταγενέστερα, το αναθεωρημένο r-IPSET-t score λαμβάνει υπόψιν 3 παραμέτρους για να περιγράψει 4 ομάδες κινδύνου, αποκλείοντας τους καρδιαγγειακούς παράγοντες ως δυσμενή προγνωστικά παράγοντα. Ειδικότερα, χρησιμοποιεί την ηλικία > 60, το προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης και την παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F. Έτσι, ασθενείς με ΙΘ κάτω των 60, χωρίς προηγούμενη θρόμβωση ή χωρίς τη μετάλλαξη JAK2V617F θεωρούνται πολύ χαμηλού κινδύνου, ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη, αλλά δεν έχουν ιστορικό θρόμβωσης είναι χαμηλού κινδύνου, ασθενείς με θρόμβωση και θετική τη μετάλλαξη θεωρούνται ενδιάμεσου κινδύνου. Τέλος υψηλού κινδύνου θεωρούνται όσοι πληρούν και τις 3 παραμέτρους.[22], [23],[114]. Η εικόνα 1 περιγράφει την κατάταξη των ασθενών σύμφωνα με το revised IPSET-t score. Το 2017 οι Tefferi και Barbui προσέθεσαν στο IPSET-t την παρουσία της μετάλλαξης MPL ως αρνητικό προγνωστικό παράγοντα.[24]

Η κατάταξη των ασθενών με ΙΘ σε ομάδα κινδύνου έχει κλινική και προγνωστική σημασία, καθορίζει δε και την απόφαση χορήγησης αντιαιμοπεταλιακής ή/και κυτταροστατικής αγωγής για την μείωση των αιμοπεταλίων, ειδικά στους ασθενείς υψηλού κινδύνου. Είναι αξιοσημείωτο πως όποιο προγνωστικό μοντέλο και να χρησιμοποιήσει κανείς, οι ασθενείς υψηλού κινδύνου συνιστούν το μεγαλύτερο ποσοστό (~65%), ενώ και η ολική τους επιβίωση είναι μικρότερη, συγκριτικά με αυτήν των ασθενών χαμηλού κινδύνου.[23]

Εικόνα 1: Κατάταξη κινδύνου ασθενών σύμφωνα με το revised IPSET-t (114. Barbui T et al. Am J Hematol. 2016).





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΙΘ

Η θρόμβωση στα MYN είναι ένα σύνθετο και πολυπαραγοντικό φαινόμενο, όχι πλήρως διαφωτισμένο. Παράγοντες που σχετίζονται με τη νόσο, -όπως η χρόνια φλεγμονή, οι αιματολογικές παράμετροι (λευκοκυττάρωση, ερυθροκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση) και η ύπαρξη μεταλλάξεων, πρωτίστως της JAK2V617F, και ακολούθως της MPL και της CALR- αλληλεπιδρούν με παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, όπως η ηλικία, το προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης, η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και το κάπνισμα.[25] Η κλασική τριάδα του Virchow που συνθέτει τον αιμοστατικό μηχανισμό -ενδοθήλιο, έμμορφα συστατικά αίματος, παράγοντες πήξης- βρίσκει πλήρη εφαρμογή στην κατανόηση της προπηκτικής διάθεσης ασθενών με MYN. Στη συνέχεια του κεφαλαίου ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της παθοφυσιολογίας της θρόμβωσης στην ΙΘ, τόσο υπό το πρίσμα των έμμορφων συστατικών του αίματος, του ρόλου του ενδοθηλίου και των παραγόντων πήξης, όσο και της επίδρασης συγκεκριμένων μεταλλάξεων.

#### 1.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

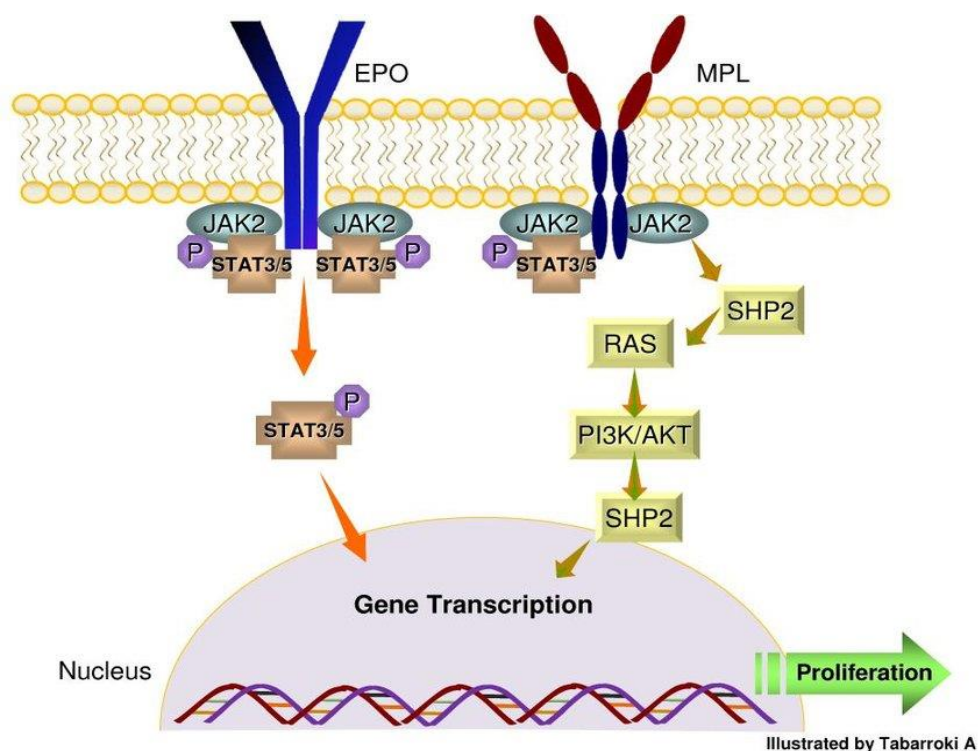
Τρεις οδηγοί «μεταλλάξεις» (driver mutations) χαρακτηρίζουν τα Φιλαδέλφεια αρνητικά Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα: η JAK2V617F, η MPL και η CALR. Περίπου 10% των ασθενών με ΙΘ δε φέρουν καμία από τις οδηγούς μεταλλάξεις και ονομάζονται τριπλά αρνητικοί (triple negative) ασθενείς. Μεγάλο ποσοστό των ασθενών αυτών κρύβουν σωματικές μεταλλάξεις που ενέχονται στην Κλωνική Αιμοποίηση Απροσδιόριστης Εξέλιξης (CHIP). Το CHIP θεωρείται διαδικασία σχετιζόμενη με τη γήρανση, όμως τα άτομα που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις έχουν 10πλάσιο κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικής κακοήθειας ή καρδιαγγειακής νόσου, ειδικά αν το VAF είναι μεγαλύτερο του 2%.[26]

## 1.Α.Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ JAK2V617F

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν επιτευχθεί σημαντικά βήματα σε μοριακό επίπεδο που επιτρέπουν τη διάγνωση αλλά και την κατανόηση των MYN. Το 2005 ανακαλύφθηκε από διαφορετικές ομάδες ερευνητών η μετάλλαξη JAK2V617F που συνιστά την πιο συχνή γενετική διαταραχή στην ΙΘ, απαντώμενη στο 50-60 % των ασθενών. Επίσης απαντάται σχεδόν στην πλειοψηφία των ασθενών με ΑΠ (~95%) και στο 30-40% με ΜΙ. [27],[28],[29],[30] Η JAK2 (Janus Activating Kinase 2) είναι μια πρωτεΐνη με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης, που παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται στο χρωμόσωμα 9, στο γενετικό τόπο (locus) p24.Μια σημειακή μετάλλαξη G προς T στο εξόνιο 14 του JAK2 οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 617, προκαλώντας συνεχή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης και του σηματοδοτικού μονοπατιού προς τον πυρήνα του κυττάρου. Πρόκειται για σωματική μετάλλαξη, σε ετερόζυγη κατάσταση, σπάνια όμως μεταπίπτει σε ομόζυγη(απώλεια ετεροζυγωτίας -«loss of heterozygosity-LOH»), λόγω μιτωτικού ανασυνδυασμού στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος 9(9pLOH).[31] Η JAK2 πρωτεΐνη ασκεί τη δράση της μέσω του υποδοχέα της Ερυθροποιητίνης (EPO-R), του υποδοχέα της Θρομβοποιητίνης (TPO-R) και του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων (G-CSFR).Αυτό εξηγεί γιατί η μετάλλαξη JAK2V617F ανευρίσκεται στην ΑΠ, στην ΙΘ και στην ΜΙ .Ο EPO-R είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 3 τμήματα: ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό. Στο άκρο του κυτταροπλασματικού τμήματος βρίσκεται συνδεδεμένη η JAK2 πρωτεΐνη σε ανενεργή μορφή. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρόσδεση της ερυθροποιητίνης στις ειδικές θέσεις σύνδεσης του EPO-R προκαλεί αλλαγή στη στερεοδομή του υποδοχέα και φωσφορυλίωση της JAK2, που είναι προσκολλημένη στο άκρο του. Η JAK2 πήρε το όνομά της από τον διπρόσωπο Ρωμαίο Θεό Ιανό(Janus), επειδή άλλοτε είναι ενεργή και άλλοτε αδρανοποιημένη. Ανήκει στις κινάσες τυροσίνης και αποτελείται από 7 υποομάδες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η C τελική περιοχή ( JH1)και η αμέσως παρακείμενη σε αυτή περιοχή της ψευδοκινάσης (JH2), που αναστέλλει την περιοχή της κινάσης.[32] Η μετάλλαξη JAK2V617F θεωρείται ότι αφορά την περιοχή της ψευδοκινάσης.[33] Η φωσφορυλίωση της JAK2 συνεπεία πρόσδεσης της ερυθροποιητίνης στον

υποδοχέα της επιφέρει φωσφορυλίωση 8 μορίων τυροσίνης στην ουρά του EPO-R, δημιουργώντας συνθήκες σύνδεσης και φωσφορυλίωσης του παράγοντα STAT5a/b. Έτσι ξεκινούν τρεις βασικές οδοί μεταγωγής σήματος προς τον πυρήνα του κυττάρου: 1) του JAK2/STAT5 και bcl-XL, 2) της οδού JAK2-Ras-MAPK και 3) της PI3K (φωσφατιδιλινοσιτόλης). Μετά την φωσφορυλίωση ο STAT διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων.[34] Η εικόνα 2 αποδίδει σχηματικά τη σύνδεση JAK2/EPO-R και του σηματοδοτικού μονοπατιού προς τον πυρήνα του κυττάρου.

Εικόνα 2:



Ο ρυθμός αιμοποίησης μειώνεται, όταν πλέον δε χρειάζεται, με τους ακόλουθους μηχανισμούς: 1. Αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα EPO-R και της JAK2 μέσω ειδικών φωσφατάσων. 2. Ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος EPO-R/ Ερυθροποιητίνης και αποδόμηση από το πρωτεάσωμα. Για αυτήν την ενέργεια απαραίτητη είναι η JAK2. Η μετάλλαξη JAK2V617F βρίσκεται στο αρχέγονο, πολυδύναμο αιμοποιητικό

κύτταρο, σε όλα τα κύτταρα της μυελικής σειράς και σπανιότερα στα Β και ΝΚ λεμφοκύτταρα. Έχει επίσης βρεθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, του σπληνός και των σπλαχνικών αγγείων ασθενών με σύνδρομο Budd-Chiari.[35],[98] Η ύπαρξη της μετάλλαξης JAK2V617F συνδέεται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που συνιστούν έναν ιδιαίτερο κλινικό φαινότυπο στα ΜΥΝ, όπως η μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης, η αυξημένη αιμοσφαιρίνη, αυξημένες τιμές αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων( αλλά μικρότερες από των αμετάλλακτων),η χαμηλή ερυθροποιητίνη ορού, ο κίνδυνος θρόμβωσης και η εξέλιξη σε ΑΠ/ΜΙ. [36], [37] Επίσης, η ύπαρξη της μετάλλαξης συνδέεται με θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις. [38] Οι ασθενείς με ΙΘ JAK2V617F (+) έχουν κλινική εικόνα ενδιάμεση μεταξύ αυτών με ΙΘ wild type και αυτών με ΑΠ, όπου σχεδόν η πλειοψηφία είναι JAK2V617F(+). [39] ,[40] Αναφορικά με τις αιματολογικές παραμέτρους, οι ασθενείς με ΙΘ JAK2+ έχουν υψηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτη, και λευκών αιμοσφαιρίων από τους wildtype, ενώ δε διαφέρουν οι τιμές αιμοπεταλίων.[41] Πολλές μελέτες, κυρίως αναδρομικές, έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση της μετάλλαξης στον κίνδυνο θρόμβωσης σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση. Όπως προαναφέρθηκε , η JAK2V617F αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα θρόμβωσης και έχει ενταχθεί σε μοντέλα κατάταξης κινδύνου, όπως το IPSET-t score.[19] Ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι 2πλάσιος στους ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη, συγκριτικά με αυτούς που δεν την έχουν(OR 1,83-1,92).Ο κίνδυνος αφορά τόσο τις αρτηριακές όσο και τις φλεβικές θρομβώσεις. [42],[43] Φαίνεται μάλιστα πως η θρομβογόνο δυναμική της μετάλλαξης JAK2V617F είναι πιο σαφής κατά την φυσική εξέλιξη της νόσου, παρά κατά αρχικά της στάδια. Ο Carobbio και συνεργάτες κατέδειξε ότι η συχνότητα θρόμβωσης μεταξύ ασθενών με ΙΘ wild type, ΙΘ JAK2V617F (+) και με ΑΠ είναι παρόμοια τα πρώτα 5 χρόνια, εντούτοις αυξάνεται στους ασθενείς με ΙΘ JAK2V617F (+) και σε αυτούς με ΑΠ με την πάροδο του χρόνου, συγκριτικά με τους αμετάλλακτους.[40] Όπως προαναφέρθηκε η ομόζυγη κατάσταση της μετάλλαξης JAK2V617F(+) σπάνια ανευρίσκεται σε ασθενείς με ΙΘ(~2-4%), σχετίζεται όμως με μεγαλύτερο κίνδυνο θρόμβωσης συγκριτικά με την ετερόζυγη ή φυσιολογική(wild type) κατάσταση. Επίσης ασθενείς με ομόζυγη μετάλλαξη έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της θρόμβωσης.[44]

Σε κυτταρικό επίπεδο, η μετάλλαξη προκαλεί αύξηση του αριθμού ερυθρών, αιμοπεταλίων και λευκών και της λειτουργικότητας των λευκών αιμοσφαιρίων, που είναι μετρήσιμη μέσω της έκφρασης του CD11b και του CD177, αλλά και του

αυξημένου LAP score.[45] Επίσης, οι ασθενείς με τη JAK2V617F μετάλλαξη έχουν αυξημένα επίπεδα TF και P-Σελεκτίνης. Συγκεκριμένα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη επάγουν τη θρόμβωση μέσω αυξημένης έκφρασης P-Σελεκτίνης, η οποία αντιστρέφεται με τη χορήγηση υδροξουρίας.[46] Έχει βρεθεί ακόμα πως οι ασθενείς που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, εκτός από αυξημένη συγκέντρωση και δραστικότητα του TF, έχουν μειωμένα επίπεδα TFPI, του αναστολέα του ιστικού παράγοντα.[47] Όλα τα παραπάνω συνεισφέρουν στην προοδική διάθεση των ασθενών μέσω ενεργοποίησης, συσσώρευσης και προσκόλλησης των λευκών και των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο και μέσω ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της αιμόστασης.[48],[49]

Ωστόσο, αυτό που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τόσο τον φαινότυπο του Μυελοϋπερπλαστικού Νοσήματος, όσο και τον κίνδυνο θρόμβωσης είναι το αλληλικό φορτίο, δηλαδή ο λόγος του μεταλλαγμένου προς το φυσιολογικό γονίδιο (wild type). Χαμηλό αλληλικό φορτίο προσδίδει έναν φαινότυπο που ομοιάζει περισσότερο με ΙΘ, ενώ υψηλό φορτίο (>30%) με Αληθή Πολυκυτταραιμία.[34] Στο παραπάνω συμπέρασμα κατέληξαν και άλλοι ερευνητές, όπου διαπίστωσαν το αλληλικό φορτίο των ασθενών με Αληθή Πολυκυτταραιμία να είναι μεγαλύτερο από αυτών με ΙΘ JAK2V617F (+) (45,13+/- 19,92% έναντι 31,12%+/-18,69% αντίστοιχα).[41] Ήδη από το 2007 ο Vannucchi και συνεργάτες κατέδειξε πως οι ασθενείς με ΙΘ και ομόζυγοι ως προς τη μετάλλαξη JAK2 έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων.[50] Επιπροσθέτως, αλληλικό φορτίο 20-25% ή παραπάνω είναι ανεξάρτητος παράγοντας αρτηριακής ή φλεβικής θρόμβωσης. [51] Ασθενείς με υψηλό φορτίο έχουν αυξημένη ενεργοποίηση λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και αυξημένο ενδογενές δυναμικό παραγωγής θρομβίνης.[52]

Επιπροσθέτως, ασθενείς με σταθερά υψηλό φορτίο >50% στην πορεία της νόσου έχουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε Μυελοϊνώση και μεγαλύτερη συχνότητα θρομβωτικών επεισοδίων.[53] Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε μεταγενέστερα ο Bertozzi και συνεργάτες σε μια αναδρομική μελέτη, όπου διαπιστώθηκε πως ασθενείς με ΑΠ ή ΙΘ και υψηλό φορτίο (>75%) έχουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε Μυελοϊνώση και είναι περισσότερο επιρρεπείς σε θρομβωτικές ή αιμορραγικές επιπλοκές.[54] Ταυτόχρονα, το αλληλικό φορτίο ασθενών με ΙΘ που έχουν υποστεί κάποιο θρομβωτικό επεισόδιο είναι υψηλότερο από αυτών χωρίς τέτοιο σύμβαμα στο ιστορικό τους).[41],[51] Αξίζει τέλος να σημειωθεί πως η μετάλλαξη JAK2V617F ανευρίσκεται σε ένα ποσοστό περίπου 0,1-0,5% υγιών ανθρώπων.[55]

## 1.Β.Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ (MPL)

Μεταλλάξεις στην περιοχή σύνδεσης του διαμεμβρανικού με το κυτταροπλασματικό τμήμα του Υποδοχέα της Θρομβοποιητίνης MPL (MPL= Myeloproliferative leukemia virus/TPOR) έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με ΜΙ και ΙΘ, που είναι JAK2V617F αρνητικοί. Αυτή η περιοχή του υποδοχέα φαίνεται ότι έχει ανασταλτικό χαρακτήρα, ενώ οι μεταλλάξεις που την αφορούν οδηγούν σε ενεργοποίηση του υποδοχέα και ακολούθως του μονοπατιού JAK/STAT, επί απουσίας πρόσδεσης της Θρομβοποιητίνης. .Ανευρίσκονται περίπου στο 5% των ασθενών με ΙΘ .Οι μεταλλάξεις αφορούν το εξόνιο 10 του γονιδίου του MPL, που εδράζεται στο 1p34 και ανακαλύφθηκε το 2006. Το εξόνιο 10 αντιστοιχεί περίπου στη διαμεμβρανική περιοχή του MPL και ξεκινά με ένα αμινοξύ τρυπτοφάνης (Trp491) και καταλήγει σε ένα επίσης αμινοξύ τρυπτοφάνης (Trp515). Το Trp515 ελέγχει το διμερισμό και την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι η W515L και η W515K, ενώ σπανιότερες οι W515S, W515R9, W515A.[56],[57],[58],[59] Συγκριτικά με τους ασθενείς που είναι JAK2V617F, οι MPL θετικοί έχουν χαμηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης, αλλά υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων και ερυθροποιητίνης ορού.[59] Αναφορικά με τον κίνδυνο θρόμβωσης οι MPL+ ασθενείς έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο θρόμβωσης από τους JAK2+. Ο Yang και συνεργάτες διεξήγαγε μια μεταανάλυση στην οποία συμμετείχαν 1257 ασθενείς με ΙΘ από 3 διαφορετικές μελέτες[73 MPL(+) και 1184 JAK2V617F(+)].Σε αυτόν τον πληθυσμό οι MPL ασθενείς έχουν μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο θρόμβωσης (RR = 1.80 (1.08–3.01),  $P = 0.025$ ), υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων, χαμηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοσφαιρίνης, ευρήματα συμβατά με προηγούμενα δεδομένα από τη μελέτη του Beer.[59],[60] Έτσι, ιστορικό θρόμβωσης πριν ή κατά τη διάγνωση της ΙΘ διαπιστώνεται στο 20% ασθενών JAK2V617F+, 25% MPL+, στο 13% CALR+ 24% στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς.[61] Οι οδηγοί μεταλλάξεις θεωρούντο αμοιβαίως αποκλειόμενες. Ωστόσο ο Mansier και συνεργάτες αποκάλυψε πως η MPL ή η CALR μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα ποσοστό περίπου 10% των ασθενών με ΙΘ JAK2+ με χαμηλό αλληλικό φορτίο. Η κλινική σημασία όμως αυτής της συνύπαρξης δεν έχει διαλευκανθεί.[62]

## 1.Γ.Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΗΣ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗΣ (CALR).

Το 2013 ανακαλύφθηκε η μετάλλαξη στο γονίδιο της Καλρετικούλινης, που ανευρίσκεται στο 67% ασθενών με ΙΘ, που δε φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F ή MPL. Συνολικά η μετάλλαξη αυτή ανευρίσκεται στο 20-20% των ασθενών με ΙΘ και στο 25-35% αυτών με ΜΙ. Επίσης ανευρίσκεται στο Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο της Ανθεκτικής αναιμίας με δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση (MDS-RARS και Θρομβοκυττάρωση). Η μετάλλαξη της CALR είναι αμοιβαίως αποκλειώμενη με τις JAK2V617F και MPL. Οι ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση CALR+ έχουν χαμηλότερη τιμή αιμοσφαιρίνης και λευκών αιμοσφαιρίων και υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση συγκριτικά με αυτούς που είναι JAK2V617F+. Σε μια διάμεση παρακολούθηση 5,7 έτη οι ασθενείς με ΙΘ CALR+ είχαν μακρότερη ολική επιβίωση συγκριτικά με αυτούς που ήταν JAK2V617F+ ή MPL+.[61],[63] Επίσης, οι ασθενείς αυτοί έχουν μικρότερο κίνδυνο θρόμβωσης σε σχέση με αυτούς που είναι JAK2V617F+ ή MPL+ και εξέλιξης σε ΜΙ.[64], [65] Ειδικά αναφορικά με την πρόγνωση, οι ασθενείς με ΙΘ CALR+ έχουν καλύτερη επιβίωση ελεύθερης θρόμβωσης (thrombosis free survival).[66] Πρώτος ο Klampf και οι συνεργάτες του κατέγραψε 2πλάσια συχνότητα θρόμβωσης ανάμεσα στους JAK2+ και στους CALR+ (13% έναντι 6,3% στα 5 έτη, 21% έναντι 11% στα 10 έτη και 27,1% έναντι 12,8% στα 15 έτη αντίστοιχα).[63] Ομοίως, σε μία μελέτη από τον Rumi και συνεργάτες, οι ασθενείς με ΙΘ JAK2+ είχαν διπλάσιο κίνδυνο θρόμβωσης συγκριτικά με αυτούς που είχαν μεταλλάξεις της CALR. [65] Φαίνεται όμως πως η ευνοϊκή επίδραση της CALR στην επιβίωση ελεύθερης θρόμβωσης αφορά κυρίως νέους ασθενείς, κάτω των 60.[61]

Πάνω από 30 μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 της Καλρετικούλινης έχουν βρεθεί. Οι περισσότερες (~65%) αφορούν τύπου-1 μεταλλάξεις, δηλαδή 52-bp ελλείψεις, το 32% τύπου-2 μεταλλάξεις, δηλαδή 5-bp προσθήκες, και το υπόλοιπο ποσοστό σπανιότερου τύπου μεταλλάξεις. Οι τύπου-1 μεταλλάξεις συνδέονται με φαινότυπο περισσότερο συμβατό με Μυελοϊνωση ή με αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της ΙΘ σε Μυελοϊνωση. Οι τύπου-2 μεταλλάξεις συνδέονται με το φαινότυπο της ΙΘ, με πολύ υψηλές τιμές αιμοπεταλίων, με μικρότερο κίνδυνο θρόμβωσης και με ηπιότερη κλινική πορεία.[67] Επίσης ασθενείς με τύπου-2 μεταλλάξεις είναι νεότεροι σε

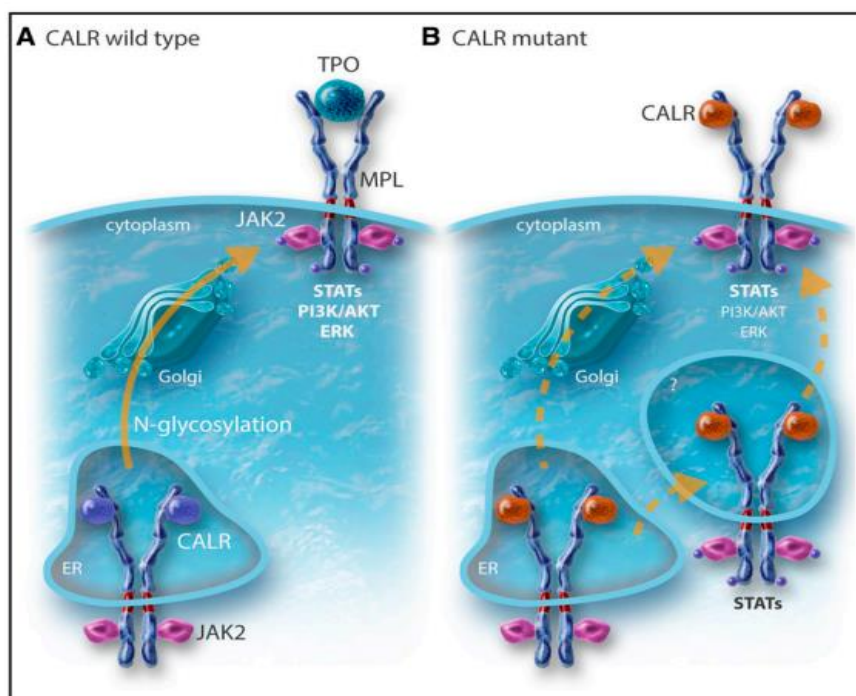


ηλικία.[67] Αναφορικά με τον κίνδυνο θρόμβωσης, η μετάλλαξη αυτή δε διαφοροποιεί το IPSET score.[68]

Η Καλρετικουλίνη λειτουργεί ως πρωτεΐνη συνοδός (chaperone= σαπερώνη) στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) των κυττάρων. Συμβάλλει στο «πακετάρισμα» των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών του ΕΔ μέσω του N-γλυκοζυλιωμένου άκρου τους. Επίσης, συμβάλλει στην ομοιόσταση του  $Ca^{+2}$  του ΕΔ, που είναι η μεγαλύτερη αποθήκη ενδοκυττάρου ασβεστίου. Η φυσιολογική πρωτεΐνη προσδένεται στα ιόντα  $Ca^{+2}$  καθιστώντας τα ανενεργά. Η μετάλλαξη στο μόριό της προκαλεί απώλεια πρόσδεσης στο ασβέστιο, με αποτέλεσμα αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του στο κυτταρόπλασμα. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του  $Ca^{+2}$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων.[69] Η κινητοποίηση των ιόντων  $Ca^{+2}$  από το ΕΔ προωθεί την προσκόλληση των μεγακαρυοκυττάρων στο εξωκυττάριο στρώμα και την παραγωγή αιμοπεταλίων. Ειδικότερα, η κινητοποίηση των ιόντων  $Ca^{+2}$  προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης στο ΕΔ και ταυτόχρονα είσοδο στο κυτταρόπλασμα μέσω διαύλων  $Ca^{+2}$  εξωκυττάρου ασβεστίου. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για αλλαγές στον κυτταροσκελετό και το δίκτυο ακτίνης, που παίζουν ρόλο στην προσκόλληση των μεγακαρυοκυττάρων στο εξωκυττάριο στρώμα, τη δημιουργία ψευδοποδίων και την παραγωγή αιμοπεταλίων. Η μετάλλαξη στο εξόνιο 9 προκαλεί αντικατάσταση των αρνητικά φορτισμένων αμινοομάδων από θετικές ομάδες στο C τελικό άκρο της καλρετικουλίνης, με αποτέλεσμα απώλεια της πρόσδεσής της στο ΕΔ. Οι τύπου-1 μεταλλάξεις(52–bp ελλείψεις) εξαλείφουν σχεδόν όλες τις αρνητικά φορτισμένες αμινοομάδες, ενώ η τύπου-2(5 bp προσθήκες) διατηρούν σχεδόν το 50% των ομάδων αυτών.[63] Ακολουθώς η σύνδεση της CALR με τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης (TPO-R/MPL) ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης JAK-STAT.[70] Για την αλληλεπίδραση μεταξύ μεταλλαγμένης CALR και TPO-R απαιτείται να υπάρχει μια περιοχή πρόσδεσης γλυκάνης και μια περιοχή N-γλυκοζυλίωσης του TPO-R/MPL. Το μεταλλαγμένο C άκρο της της καλρετικουλίνης με τις θετικά φορτισμένες αμινοομάδες ενεργοποιεί τον υποδοχέα. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ μεταλλαγμένης καλρετικουλίνης και του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης οδηγεί σε διμερισμό της JAK2 και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT 5.[34],[71] Θεωρείται πως η μεταλλαγμένη CALR λειτουργεί σαν ανώμαλη «σαπερώνη» και μετακινείται μαζί με τον MPL από το ΕΔ στην επιφάνεια του κυττάρου. Ο κίνδυνος θρόμβωσης στους ασθενείς με μεταλλαγμένη CALR είναι

μειωμένος διότι σε αυτή την ομάδα ασθενών η μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή της θρομβίνης, στην ενεργοποίηση, στην συσσώρευση και την αποκοκκιοποίηση των αιμοπεταλίων, απορρυθμίζεται. [72] Η εικόνα 3 παριστά το μηχανισμό δράσης της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης καλρετικουλίνης

Εικόνα 3:

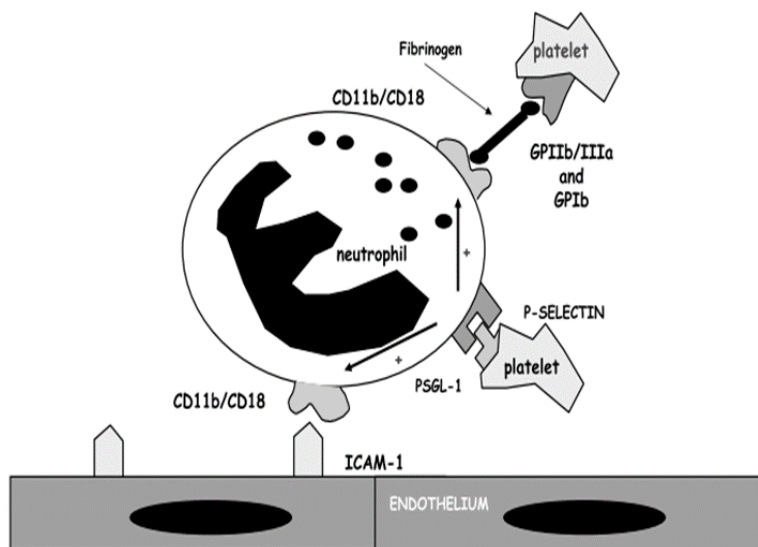


#### 1.Δ. ΑΛΛΕΣ ΜΗ ΟΔΗΓΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το γενετικό προφίλ των Μυελοϊπερπλαστικών νοσημάτων είναι αρκετά πολύπλοκο. Παράλληλα με τις οδηγούς μεταλλάξεις, η παρουσία των οποίων αρκεί για την εμφάνιση του αντίστοιχου κλινικού φαινοτύπου, σε πολλούς ασθενείς συνυπάρχουν σωματικές μεταλλάξεις, ήδη γνωστές από την παθοφυσιολογία άλλων αιματολογικών νοσημάτων, όπως είναι τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία. Αυτές οι σωματικές μεταλλάξεις ενέχονται κυρίως σε γονίδια που αφορούν το μάτισμα του RNA, όπως το SF3B1 και SRSF2, επιγενετικούς παράγοντες, που αφορούν τη μεθυλίωση του DNA, όπως η TET2 και το DNMT3A, την τροποποίηση ιστονών, όπως το ASXL1, IZH1, IZH2, και μεταγραφικούς παράγοντες (RUNX1, TP53). Η συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων είναι: ASXL1(7-20%), TET2(9-11%), DNMT3A(7%), SF3B1(5%), RUNX1(1-2%), EZH2(2-4%) IDH2(1%). Η παρουσία τους αποτελεί έλασσον κριτήριο στα

αναθεωρημένα κριτήρια του ΠΟΥ για την Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση. Αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη ως προς την ολική επιβίωση και εξέλιξη προς λευχαιμία ασθενών με Μυελοϊνώση. Αντίθετα, στην ΙΘ φαίνεται ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο θρόμβωσης. Ειδικότερα, η παρουσία των ASXL1, RUNX1 και EZH2 συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο θρόμβωσης στην ΙΘ.[73] Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με την έναρξη της νόσου και μπορεί να προηγούνται της εμφάνισης της JAK2V617F.[34] Έχει διατυπωθεί η άποψη πως όταν εμφανίζεται πρώτα η μετάλλαξη TET2 και έπειτα η JAK2V617F, ο φαινότυπος είναι αυτός της ΙΘ, ενώ όταν προηγείται η JAK2V617F, προκύπτει ΑΠ.[74] Η TET2 και η DNMT3A αυξάνουν την ικανότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για αυτοανανέωση και διαφοροποίηση. Πρόσφατα προτάθηκε ένα νέο προγνωστικό μοντέλο επιβίωσης για την ΙΘ, το MIPSS-ET, στο οποίο έχουν ενσωματωθεί 4 προγνωστικοί παράγοντες: 1) ηλικία >60 (4 βαθμοί), 2) η παρουσία των μεταλλάξεων SF3B1, SRSF2, TP53 και U2AF1 (2 βαθμοί), το ανδρικό φύλο (1 βαθμός) και τιμές λευκών αιμοσφαιρίων  $\geq 11 \times 10^9/L$  (1 βαθμός). Οι ασθενείς κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες: χαμηλού κινδύνου (0-1 βαθμοί, μέση ολική επιβίωση 34,4 έτη), ενδιάμεσου κινδύνου (2-5 βαθμοί, μέση OS 14,1 έτη), και υψηλού κινδύνου ( $\geq 6$  βαθμοί, με μέση OS 7,9 έτη).[75]

## 2.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ



Εικόνα 4:Σχηματική απεικόνιση αλληλεπίδρασης λευκών αιμοσφαιρίων/αιμοπεταλίων/ενδοθηλίου

Τα λευκά αιμοσφαίρια συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης των Μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων μέσω ενεργοποίησης και αλληλεπίδρασης με το ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια( ιδέ σχηματικά εικόνα 4).Αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης στην ΙΘ, ο οποίος μειώνεται με τη χορήγηση κυτταροστατικής αγωγής με Υδροξουρία. Ασθενείς με τιμές λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση πάνω από τη μέση τιμή έχουν διπλάσιο σχετικό κίνδυνο θρόμβωσης συγκριτικά με αυτούς με χαμηλότερες τιμές λευκών.[76],[77] Ο Tefferi και συνεργάτες, χρησιμοποίησε τα δεδομένα 605 ασθενών με ΙΘ κατά τη διάγνωσή τους και διαπίστωσε αυξημένο κίνδυνο αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης σε αυτούς με υψηλές τιμές αιμοσφαιρίνης και τιμές λευκοκυττάρων >15.000/μl ή ακόμα και σε τιμές >8.700/μl.Εντούτοις δεν κατάφερε να αποδείξει συσχέτισμό της αρχικής τιμής λευκών αιμοσφαιρίων με τον κίνδυνο υποτροπής της θρόμβωσης.[78] Αντιθέτως ο De Stefano και συνεργάτες σε μια πολυκεντρική, αναδρομική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 133 ασθενείς με ΑΠ και 120 ασθενείς με ΙΘ, η θρόμβωση υποτροπίασε σε 78 ασθενείς (30,7%). Η

πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε έναν ανεξάρτητο κίνδυνο υποτροπής αρτηριακής θρόμβωσης (hazard ratio [HR] 2.16, 95% CI 1.12–4.18) σε ασθενείς με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων >12.400 μl τη στιγμή του πρώτου θρομβωτικού επεισοδίου. Ο αρνητικός προγνωστικός ρόλος της λευκοκυττάρωσης για την επανεμφάνιση της θρόμβωσης ήταν εξαρτώμενος από την ηλικία των ασθενών και φάνηκε πως επηρεάζει τους νεότερους εξ' αυτών (κάτω των 60 ετών).[79] Σε πιο πρόσφατη μελέτη αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων >11.000/μl αποδείχθηκε αρνητικός προγνωστικός παράγοντας θρομβωτικού επεισοδίου. [80]

Ο ρόλος των λευκών αιμοσφαιρίων στο μηχανισμό της αιμόστασης έγκειται στην αλληλεπίδρασή τους και στην προσκόλληση στο ενδοθήλιο και στα αιμοπετάλια, με τη συμμετοχή της σελεκτίνης και των ιντεγκρινών. Η P-Σελεκτίνη(CD62P) κινητοποιείται προς την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων και αλληλοεπιδρά με το PSGL-1 (P-selectinglycoproteinligand-1), που βρίσκεται στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων. Προκύπτει κατά αυτόν τον τρόπο μια σταθερή σύνδεση των αιμοπεταλίων πάνω στα κυκλοφορούντα λευκά αιμοσφαίρια και κύλιση των λευκών πάνω στο ενδοθήλιο που εκφράζει P-Σελεκτίνη. Η επακόλουθη προσκόλληση μεσολαβείται από το CD11b/CD18 της επιφάνειας των λευκών, το οποίο προσδένεται είτε στον υποδοχέα GP1b των αιμοπεταλίων, είτε μέσω του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa. [81] Τα μικτά συσσωματώματα λευκών/αιμοπεταλίων που προκύπτουν θεωρούνται υπεύθυνα για την παθογένεση της θρόμβωσης στα MYN. Η χρήση της ασπιρίνης μπορεί να μειώσει αυτά τα συσσωματώματα, μειώνοντας την έκφραση του CD11b στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων.[82]

Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα επηρεάζουν τον αιμοστατικό μηχανισμό και μέσω παραγωγής ριζών οξυγόνου, μέσω απελευθέρωσης από το ενδοκυττάρια κοκκία τους ελαστασών και μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα κυτταρικά στοιχεία (αγγειακό τοίχωμα, αιμοπετάλια, μονοκύτταρα). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου, όπως το NO, μπορούν να ενεργοποιήσουν το ινωδογόνο, τον παράγοντα V, τον VIII, τον vonWillebrand, τον παράγοντα X, τον PAI-1 (αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου), την α2-αντιπλασμίνη. Επιπλέον τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν από τα κοκκία τους πρωτεάσες, όπως η ελαστάση και η καθεψίνη G, οι οποίες προκαλούν λύση των ενδοθηλιακών κυττάρων και αποκάλυψη ιστικού παράγοντα (TF), το απαραίτητο έναυσμα για την έναρξη της εξωγενούς οδού της αιμόστασης. Επίσης προκαλούν αναστολή της απαγόμενης από τη θρομβίνη παραγωγής

προστακυκλίνης. Τέλος προκαλούν πρωτεολυτική διάσπαση της θρομβομοντουλίνης, ενός ενδοθηλιακού συστατικού που προσδέεται στη θρομβίνη και μαζί ενεργοποιούν την Πρωτεΐνη C, που έχει αντιπηκτική δράση. Η καθεψίνη G αλληλεπιδρά και με τα αιμοπετάλια, μέσω του PAR4 υποδοχέα τους, αλλάζοντας την γλυκοπρωτεϊνική σύσταση της επιφάνειάς τους, επιτυγχάνοντας καλύτερη συσσώρευση αιμοπεταλίων. In vitro πειράματα έδειξαν πως η ελαστάση μπορεί πρωτεολυτικά να αδρανοποιήσει αρκετούς αναστολείς της πήξης, όπως την πρωτεΐνη C, την πρωτεΐνη S, την αντιθρομβίνη, τον TFPI. Τέλος, τόσο η ελαστάση όσο και η καθεψίνη μπορούν να διασπασούν και να ενεργοποιήσουν τον παράγοντα V.[81],[83],[49] Οι ασθενείς με ΑΠ και ΙΘ έχουν στα λευκά τους αιμοσφαίρια αυξημένη έκφραση CD11b και LAP (Αλκαλική Φωσφατάση των λευκών αιμοσφαιρίων) και αυξημένη ελαστάση, γεγονός που υποδηλώνει μια συνεχή ενεργοποίηση των κυττάρων σε αυτά τα νοσήματα. Επίσης τα μονοκύτταρα στα MYN παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση Ιστικού παράγοντα (TF) στην επιφάνειά τους.[84]

### 3.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΕΤΩΣΗΣ

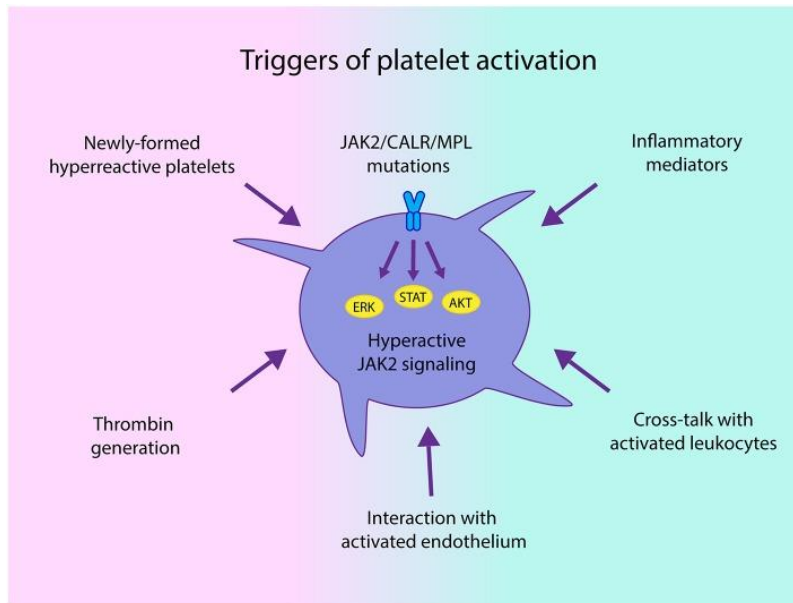
Μικρόβια, προφλεγμονώδεις παράγοντες, ενεργές ρίζες οξυγόνου ή ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διεγείρουν τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, τα οποία απελευθερώνουν το πυρηνικό υλικό τους, δημιουργώντας ένα εξωκυττάριο δίκτυο, δίκην ιστού. Το δίκτυο αυτό αποτελείται από DNA, ιστόνες και από το περιεχόμενο των ενδοκυττάρων κοκκίων τους και ονομάζεται NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Η Νέτωση είναι μια σταδιακή διαδικασία, που συνίσταται στη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης, την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά την κυτταρόλυση.[85] Η μεταμεταγραφική τροποποίηση της χρωματίνης μεσολαβείται από το ένζυμο PAD4, ένα ένζυμο που υπάρχει σε αφθονία στα κοκκιοκύτταρα. Αδρανοποίηση του PAD4 οδηγεί σε αναστολή της Νέτωσης. Η Νέτωση πρωτοπεριγράφηκε ως αμυντικός μηχανισμός στην παγίδευση μικροβίων.[86] Αργότερα αποκαλύφθηκε ο προπηκτικός ρόλος της. Οι ιστόνες διεγείρουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και προάγουν την εξαρτώμενη από αυτά παραγωγή θρομβίνης. Επίσης οι ιστόνες θεωρούνται τοξικές για το ενδοθήλιο, προκαλώντας βλάβη σε αυτό, επακόλουθη συσσώρευση αιμοπεταλίων και

αποκάλυψη του ιστικού παράγοντα (TF)- εφελκτική γεγονότα του καταρράκτη της πήξης. Επιπροσθέτως, μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι οι ιστόνες προκαλούν είσοδο ιόντων  $Ca^{++}$  στο κυτταρόπλασμα διαφόρων κυττάρων (ενδοθηλιακά, αιμοπετάλια). Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου προκαλεί έκκριση του VWF και περαιτέρω συσσώρευση αιμοπεταλίων.[87] Ειδικά ένζυμα (DNAάσες) και η ηπαρίνη διασπών το ικρίωμα του NET, εμποδίζοντας τη δημιουργία του θρόμβου. Τα NETs ακόμα παγιδεύουν ερυθρά αιμοσφαίρια και ινωδογόνο, συμβάλλοντας στη δημιουργία του ερυθρού θρόμβου.[85] Τα πολυμορφοπύρρηνα ασθενών με MYN έχουν αυξημένη παραγωγή NETs, ειδικά όσων φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F. Η θεραπεία με τον αντι- JAK2 αναστολέα Ruxolitinib φαίνεται ότι μειώνει το σχηματισμό NETs και τον κίνδυνο θρόμβωσης. Επίσης, η έκφραση του PAD4, της πρωτεΐνης που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό NET, είναι αυξημένη στα ουδετερόφιλα που φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F.[88]

#### 4.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος αλληλοεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της πήξης και το ενδοθήλιο, υπό την ενίσχυση φλεγμονωδών κυτταροκινών. Τα αιμοπετάλια εκτός από το ρόλο τους στην αιμόσταση, αποτελούν συστατικά της εγγενούς ανοσίας και της φλεγμονής και παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην ανοσοθρόμβωση των MYN.[89] Τόσο η θρομβοκυττάρωση, όσο και η in vivo ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνεισφέρουν στην προπηκτική διάθεση των MYN. Ωστόσο, δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ βαθμού θρομβοκυττάρωσης και θρομβωτικού κινδύνου. Αντίθετα, τιμές αιμοπεταλίων  $>1,000-1,500 \times 10^9/L$  συνδέονται με αιμορραγική διάθεση, λόγω επίκτητου Von Willebrand Συνδρόμου (AVWS), όπως προαναφέρθηκε.

#### 4Α.ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στα MYN

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι εμφανής στα MYN από την ανεύρεση δεικτών ενεργοποίησης στο πλάσμα ασθενών, όπως η διαλυτή και επιφανειακή P-σελεκτίνη, ο PF4, ο PDGFR, ο μεταβολίτης της θρομβοξάνης TXB2.[52],[90],[91] Οι παθολογικοί κλώνοι στα MYN προάγουν μια συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, με απελευθέρωση προφλεγμονοδών κυτταροκινών, όπως IL-6, IL-8 και TNFα. Οι οδηγιοί μεταλλάξεις στα MYN( JAK2V617F, MPL) πυροδοτούν το ενδοκυττάριο μονοπάτι JAK/STAT, δίνοντας γένεση σε διάφορες φλεγμονώδεις κυττοκίνες όπως η λιποκαλίνη-2, TNFα, IL-6. Αυτοί οι μεσολαβητές της φλεγμονής προάγουν την ενεργοποίηση τόσο των κακόηθων όσο και των μη κακόηθων κυττάρων, προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο και επακόλουθη πυροδότηση του μηχανισμού της πήξης.[92],[93] Ειδικότερα, συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της αθηρωμάτωσης του ενδοθηλίου, που με τη σειρά της οδηγεί στην αρτηριακή θρόμβωση στα MYN.[94] Επίσης, οι κυττοκίνες αυτές, μαζί με αγγειοδραστικές ουσίες, όπως η σεροτονίνη και η ισταμίνη, προκαλούν αύξηση του ιστικού παράγοντα (TF) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, δίνοντας έναυσμα στην εξωγενή οδό της αιμόστασης.[13],[95] Ο ρόλος της χρόνιας φλεγμονής στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης στα MYN προκύπτει και από τα υψηλά επίπεδα της CRP(C-αντιδρώσας πρωτεΐνης) στους ασθενείς με θρομβωτικό σύμβαμα.[96] Τα ενεργοποιημένα λευκά αιμοσφαίρια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι μεσολαβητές της φλεγμονής αλληλοεπιδρούν με τα αιμοπετάλια και



ενεργοποιούν όχι μόνο αυτά που προέρχονται από τον παθολογικό κλώνο αλλά και αυτά που προέρχονται από τα φυσιολογικά μεγακαρυοκύτταρα. Επίσης, η υπερπαραγωγή νεοσχηματισμένων αιμοπεταλίων (turn over) στη ΙΘ φαίνεται ότι ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπερπηκτική διάθεση, καθότι τα νεαρά αυτά αιμοπετάλια είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένα/θρομβογόνα.[89] Το ADP είναι ενεργοποιητής συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων τους P2Y1, P2Y12 και P2X1. Μελέτες έχουν δείξει πως τα αιμοπετάλια ασθενών με ΙΘ JAK2V617F(+) είναι περισσότερο ευαίσθητα στο ADP, με αποτέλεσμα αυξημένη συσσώρευση και ενδογενή παραγωγή θρομβίνης. Το ADP προσδεδεμένο στον P2Y12 υποδοχέα αυξάνει την απελευθέρωση του περιεχομένου των πυκνών και α-κοκκίων των αιμοπεταλίων, την έκφραση TF, την μετακίνηση της P-σελεκτίνης στην κυτταρική μεμβράνη και εν τέλει συμβάλλει στη δημιουργία του θρόμβου.[97] Η εικόνα 5 παριστά σχηματικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στα MYN.

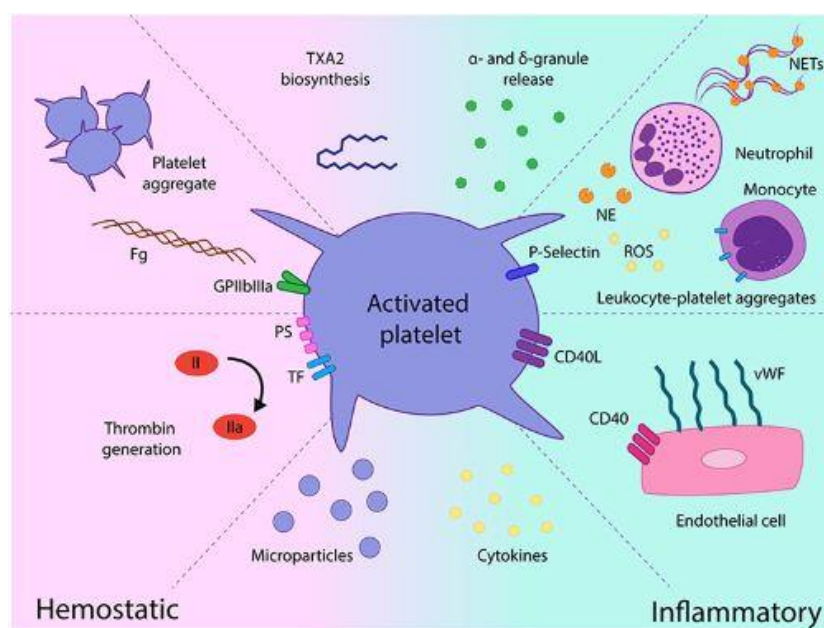
#### 4B. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλληλοεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος. Στα MYN παρατηρούνται υψηλά επίπεδα αντιγόνου vWF, διαλυτής θρομβομοντουλίνης και E-σελεκτίνης.[84] Η απελευθέρωση vWF από τα σωματίδια Weibel-Palade ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, κινητοποιώντας προς την επιφάνειά τους το CD40L, που προσδένεται στο CD40 του ενδοθηλίου. Η σύζευξη CD40-CD40L οδηγεί σε απελευθέρωση TF από το ενδοθήλιο και έναρξη του καταρράκτη της πήξης.

Ενεργές ρίζες οξυγόνου και κυττοκίνες επίσης ενεργοποιούν το ενδοθήλιο.

Υπενθυμίζεται πως ενδοθηλιακά κύτταρα σπληνός και ήπατος ασθενών με ΜΙ και ΑΠ με Budd-Chiari σύνδρομο, φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F. [98] Μελέτες έχουν δείξει πως ο αριθμός των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι δείκτης βλάβης του ενδοθηλίου σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως η σήψη, ο καρκίνος και η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση. Τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σημαντικά αυξημένα στα MYN.[99] Η εικόνα 6 παριστά σχηματικά την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο στα MYN.

Εικόνα 6:



## 5.Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΩΝ

Τα μικροκυστίδια (microparticles, MP) είναι μικρά σωματίδια μεγέθους 0,1-1 $\mu$ m, που προέρχονται από θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, του τραύματος και της απόπτωσης. Κύρια πηγή τους είναι τα αιμοπετάλια, όπως επίσης τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ανευρίσκονται αυξημένα σε πολλά νοσήματα, όπως ο καρκίνος και συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο αρτηριακής ή φλεβικής θρόμβωσης και μετάστασης. Σε αυτές τις καταστάσεις παράγονται από τα κακοήθη, αλλά και τα φυσιολογικά κύτταρα και φέρουν στην επιφάνειά τους αυξημένη ποσότητα Ιστικού παράγοντα και φωσφολιπιδίων.[100] Τα φωσφολιπίδια (φωσφατιδυλοσερίνη), που είναι συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης, είναι το απαραίτητο υπόστρωμα για την έναρξη του καταρράκτη της πήξης.[101] Οι ασθενείς με MYN έχουν αυξημένα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια πλούσια σε TF, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στην υπερπηκτική κατάσταση των ατόμων αυτών.[102] Οι ασθενείς με ΙΘ, και ειδικά αυτοί που φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F έχουν αυξημένο ενδογενές δυναμικό παραγωγής θρομβίνης. Η απομάκρυνση με υπερφυγοκέντρηση των μικροκυστιδίων από το πλάσμα των ασθενών αυτών φάνηκε ότι μειώνει το ενδογενές δυναμικό της θρομβίνης και κατ'έπекταση την θρομβοφιλική διάθεση.

[103] Τα μικροκυστίδια περιέχουν PSGL-1 (PselectinGlycoproteinligand -1), η οποία αλληλεπιδρά με την P-Σελεκτίνη των αιμοπεταλίων, ενισχύοντας τη συσσώρευσή τους και καταλήγοντας στη δημιουργία θρόμβων πλούσιων σε αιμοπετάλια. [104], [105] Επιπροσθέτως, οι ασθενείς με ΙΘ που είναι JAK2V617F+ έχουν περισσότερα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια με προπηκτικές ιδιότητες από αυτούς που είναι CALR+ ή triple negative (TN). Αυτό εν μέρει οφείλεται στην μεγαλύτερη έκφραση P-σελεκτίνης στα ΜΡ των ασθενών που είναι JAK2+ , συγκριτικά με αυτούς που φέρουν την μετάλλαξη CALR ή είναι triple negative. Φαίνεται επίσης πως η JAK2 μετάλλαξη, πέραν του υπέρμετρου πολλαπλασιασμού της μυελικής/μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στο μυελό των οστών, προκαλεί και μια μεγάλη απελευθέρωση μικροκυστιδίων στην κυκλοφορία. [106]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΤΟ ΙΝΩΔΟΛΥΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η αιμόσταση είναι ένα πολύπλοκο σύστημα μηχανισμών που περιλαμβάνει τη συμμετοχή των έμμορφων στοιχείων του αίματος, τους παράγοντες πήξης και το ενδοθήλιο. Για περιγραφικούς λόγους διακρίνεται σε τρία στάδια: 1. την αρχική αιμόσταση, 2. το μηχανισμό της πήξης, 3. την ινωδόλυση. Η τελευταία συνίσταται στην πρωτεολυτική διάσπαση του ινώδους (ινικής), με σκοπό την αναχαίτιση της υπέρμετρης επέκτασης του θρόμβου και την αποκατάσταση της φυσιολογικής αιματικής ροής στο αγγείο. Η ινωδολυτική διαδικασία ξεκινά με την έκλυση του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA), το οποίο μετατρέπει το πλασμινογόνο (αδρανές προένζυμο, που συντίθεται στο ήπαρ) σε πλασμίνη. Ο t-PA κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένος με τον αναστολέα του (PAI-1). Η ενεργοποίηση του συστήματος επαφής και η πυροδότηση της ενδογενούς οδού της πήξης προκαλεί ταυτόχρονη έναρξη και του ινωδολυτικού μηχανισμού. Η πλασμίνη μέσω αλληλεπίδρασης με κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης στο δίκτυο ινικής, διασπά την ινική σε αδιάλυτα προϊόντα λύσεως (τα Δ-διμερή και τα FDPs). Το ινωδολυτικό σύστημα περιλαμβάνει και 3 αναστολείς: τον PAI-1 ( αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου), που είναι ο κύριος αναστολέας της ινωδόλυσης, τον PAI-2 και την α2-αντιπλασμίνη, που αναστέλλει την πλασμίνη. Ο PAI-1 παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και το ήπαρ, ενώ βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα αιμοπετάλια. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα σε φυσιολογικές καταστάσεις είναι χαμηλή. Αυξάνεται στη στεφανιαία νόσο, στη θρόμβωση και στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο PAI-2 παράγεται στον πλακούντα και παίζει ρόλο στον τοκετό.[107]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

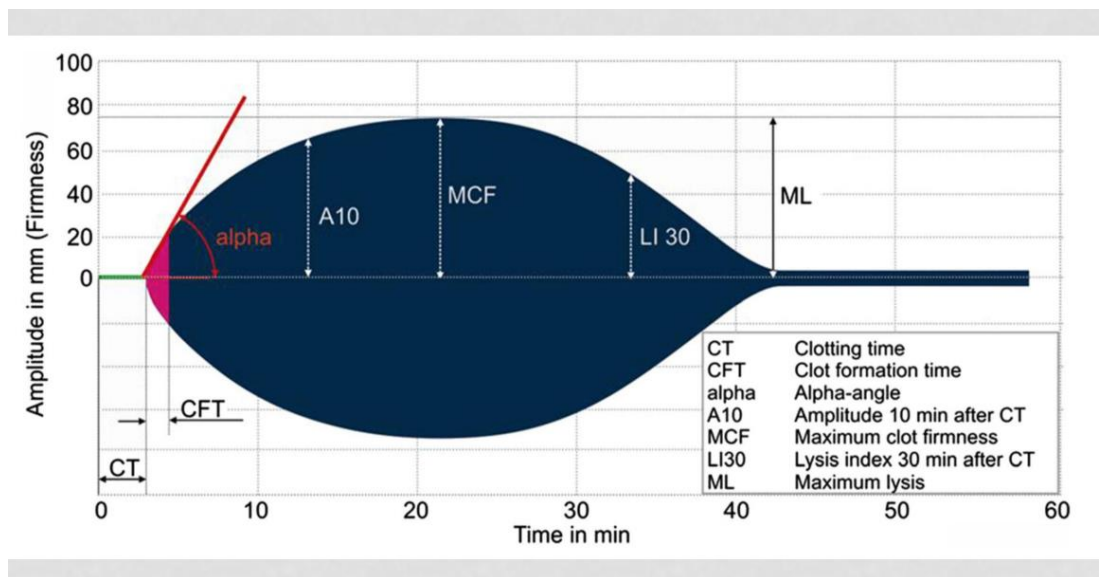
### ΣΦΑΙΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΗΞΗΣ-ΘΡΟΜΒΟΕΛΑΣΤΟΓΡΑΦΙΑ

Μολονότι η υπερπηκτικότητα και ο αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης είναι δεδομένα στα Μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, όταν οι κλασικές δοκιμασίες πήξης, όπως ο χρόνος προθρομβίνης(PT) και ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης( aPTT) εφαρμόζονται σε αυτούς τους ασθενείς, δε διαπιστώνονται σημαντικές αποκλίσεις από τις φυσιολογικές τιμές. Αυτό συμβαίνει διότι παρόλη την ευρεία χρήση τους οι κλασικές δοκιμασίες πήξης έχουν συγκεκριμένους περιορισμούς σε ότι αφορά την σφαιρική εκτίμηση της αιμοστατικής κατάστασης του ασθενούς. Η μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων δεν μας δίνει πληροφορίες για την λειτουργικότητά τους, ενώ οι μετρήσεις των χρόνων προθρομβίνης (PT) και μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) αντικατοπτρίζουν την ταχύτητα δημιουργίας του αρχικού θρόμβου χωρίς να δίνουν πληροφορίες για την σταθερότητα του και τη μετέπειτα λύση του. Η εισαγωγή νέων μεθόδων που αφορούν στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και στη σφαιρική εκτίμηση της αιμόστασης μπορούν να καλύψουν τους περιορισμούς αυτούς δίνοντας στον κλινικό γιατρό την δυνατότητα να εκτιμήσει την αιμορραγική διάθεση του ασθενούς και να κάνει στοχευμένες και αποτελεσματικότερες παρεμβάσεις υποκατάστασης για την ανάσχεση της αιμορραγίας(χορήγηση αιμοπεταλίων, FFPs, αντινωδολυτικών ουσιών). Εντούτοις αποδεικνύεται πως οι σφαιρικοί μέθοδοι της αιμόστασης μπορούν να αναδείξουν την προπηκτική διάθεση των ασθενών και να εκτιμήσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης. Η Περιστροφική Θρομβοελαστογραφία( ROTEM) δίνει πληροφορίες όχι μόνο για την ταχύτητα σχηματισμού του θρόμβου αλλά και για την ποιότητά του δηλαδή τη σταθερότητά του, για το μέγεθός του και την ταχύτητα της λύσης του από τον ινωδολυτικό μηχανισμό. Πραγματοποιείται με ολικό αίμα, γεγονός που μας δίνει πληροφορίες για όλα τα στοιχεία που συμμετέχουν στη διαδικασία της αιμόστασης πλην του ενδοθηλιακού τοιχώματος.

Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ενεργοποιητές μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, την επάρκεια ή ένδεια παραγόντων πήξης και ινωδογόνου και για την κατάσταση της ινωδολύσης στη δεδομένη στιγμή. Η αρχή μεθόδου της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας είναι η ακόλουθη: Μέσα σε μία κυψελίδα στην οποία έχουμε προσθέσει ολικό αίμα μαζί με

ενεργοποιητές της πήξης εμβαπτίζεται ένα έμβολο το οποίο πραγματοποιεί αργές και ήπιες παλινδρομικές κινήσεις. Ο σχηματισμός του θρόμβου που ακολουθεί δυσχεραίνει αυτή την κίνηση. Η δυσκολία στην κίνηση καταγράφεται σαν δημιουργία θρόμβου, απεικονίζεται γραφικά και παραμετροποιείται. Οι παράμετροι της θρομβοελαστογραφίας που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι οι εξής: CT (clotting time): ο χρόνος που απαιτείται για να αρχίσει να δημιουργείται θρόμβος, CFT (clot formation time): ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσει ο θρόμβος στο μέγεθος των 20mm, α angle( γωνία): η κινητική του θρόμβου που εκφράζεται σαν τη γωνία που σχηματίζει η εφαπτομένη στο διάγραμμα του θρόμβου με τον οριζόντιο άξονα, MCF (maximum clot firmness): Το μέγιστο μέγεθος που φθάνει ο θρόμβος, LI (60): η ποσοστιαία μείωση του μεγέθους του θρόμβου μια ώρα μετά την έναρξη του σχηματισμού του. Οι δύο βασικές δοκιμασίες (EXTEM,INTEM) περιέχουν μόνο ενεργοποιητές της εξωγενούς και της ενδογενούς οδού της πήξης. Το EXTEM γίνεται με προσθήκη ιόντων  $Ca^{++}$  και TF. Το INTEM γίνεται με προσθήκη ιόντων  $Ca^{++}$  και ελλαγικού οξέος(ενεργοποιητής ενδογενούς οδού) [108] Στην εικόνα 7 απεικονίζεται το γράφημα θρομβοελαστογραφίας με τις βασικές παραμέτρους του.

Η δυνατότητα της θρομβοελαστογραφίας να εκτελείται παρά την κλίνη του ασθενούς εντός μιας ώρας από την αιμοληψία και η αποδεδειγμένη συσχέτιση μεταξύ της θρομβοελαστογραφικής καμπύλης και των επιπέδων των αιμοστατικών παραγόντων στο πλάσμα των ασθενών αποτελούν τους κύριους παράγοντες που καθιέρωσαν τη μέθοδο σε επείγουσες καταστάσεις πηκτικών διαταραχών. Έτσι σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως στην καρδιοχειρουργική, στην μαιευτική-γυναικολογία, στην μεταμόσχευση ήπατος ,στην αντιμετώπιση του τραύματος.[109],[110]



Εικόνα 7: Παράμετροι Θρομβοελαστογραφίας: CT (clotting time): Ο χρόνος που απαιτείται για να αρχίσει να δημιουργείται θρόμβος, CFT (clot formation time): ο χρόνος που απαιτείται για να δημιουργηθεί θρόμβος μεγέθους 20mm,  $\alpha$  angle: η εφαπτομένη της κινητικής της ανάπτυξης του θρόμβου, A5,A10,A15,A20: Η διάσταση που απέκτησε ο θρόμβος σε χρόνους 5,10,15,20 λεπτά, MCF (maximum clotting firmness): Η μεγαλύτερη διάσταση που απέκτησε ο θρόμβος LI30, LI60: το ποσοστό της ινωδόλυσης 30 και 60 λεπτά από την έναρξη της δημιουργίας του θρόμβου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Στο πρόσφατο παρελθόν αρκετοί ερευνητές μελέτησαν τη δυναμική του θρόμβου στα Μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα με τη χρήση των σφαιρικών δοκιμασιών της πήξης. Ο Tripodi και συνεργάτες παρατήρησε μειωμένο CFT και αυξημένο MCF στο θρομβοελαστογράφημα ασθενών με MYN και αυξημένο ενδογενές δυναμικό θρομβίνης (ETP:Endogenous Thrombin Potential), υποδηλώντα υπερπηκτική κατάσταση. Η χορήγηση Υδροξουρίας μειώνει το ETP.[111] Σε μεταγενέστερη ανάλυση βρέθηκαν ανάλογα αποτελέσματα: Οι ασθενείς με ΙΘ κατά τη διάγνωσή τους έχουν μεγαλύτερη α-γωνία στο EXTEM και FIBTEM, μικρότερο CT και CFT στο EXTEM και υψηλότερο MCF(EXTEM, INTEM,FIBTEM), συγκριτικά με τους υγιείς μετέχοντες. Ο αιματοκρίτης και η τιμή των αιμοπεταλίων φάνηκε πως είναι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τις παραμέτρους του ROTEM. Για παράδειγμα, σε υψηλές τιμές αιμοπεταλίων παρατηρείται χαμηλότερο CT και CFT, ενώ το MCF είναι υψηλότερο. Από τα παραπάνω θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως οι ασθενείς που κατά τη διάγνωση έχουν μικρό CT ή/και CFT ή μεγάλο MCF έχουν αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης συγκριτικά με αυτούς με τιμές CT,CFT, MCF παρόμοιες με του υγιούς πληθυσμού. Η χορήγηση κυτταροστατικής αγωγής με υδροξουρία αυξάνει το CT(EXTEM, FIBTEM) και μειώνει το MCF(EXTEM), μειώνοντας το θρομβωτικό κίνδυνο.[112]

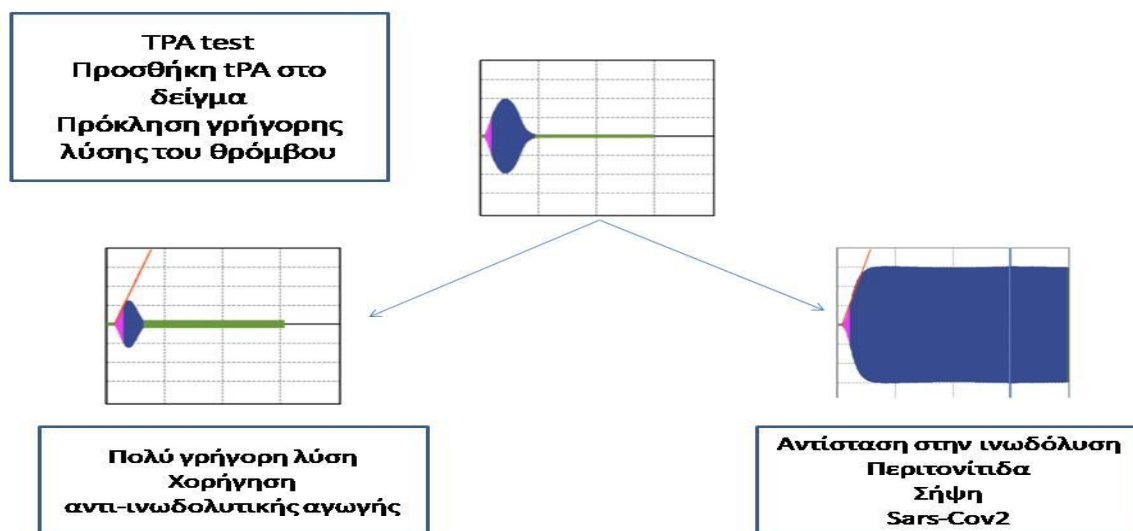


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στις ήδη υπάρχουσες κλασικές πλέον δοκιμασίες της θρομβοελαστογραφίας έρχεται να προστεθεί μία καινούργια δοκιμασία για την καλύτερη διερεύνηση της ινωδόλυσης, το TPA-test. Στη δοκιμασία αυτή προστίθεται ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου ο οποίος ενεργοποιεί την ινωδόλυση και συνεπώς τη γρήγορη λύση του θρόμβου. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να διαγνώσουμε εγκαίρως την άκαιρη ινωδόλυση, την παρουσία αντι-ινωδολυτικών φαρμάκων στο δείγμα να βελτιστοποιήσουμε τη δόση των χορηγούμενων αντι-ινωδολυτικών για την αποφυγή παρενεργειών και να ανιχνεύσουμε την «αντίσταση» στην ινωδόλυση σε διάφορες υπερπηκτικές καταστάσεις όπως σήψη, φλεγμονή, MYN, καρκίνος, SARS-CoV2 λοίμωξη. Τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας για να διερευνήσουμε πιθανή αντίσταση στην ινωδόλυση στους ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση. Στην εικόνα 8 απεικονίζεται η αρχή μεθόδου της Θρομβοελαστογραφίας με TPA και τα γραφήματα σε παθολογικές καταστάσεις (αριστερά υπερϊνωδόλυση, δεξιά Αντίσταση στην Ινωδόλυση/υπερπηκτικότητα).

Εικόνα 8:



Μελετήσαμε 15 ασθενείς με Ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση, διαγνωσμένους από το 2010 έως το 2022, σύμφωνα με τα κριτήρια διάγνωσης του ΠΟΥ του 2008 και τα αναθεωρημένα κριτήρια του 2016. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά των

ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Από τους 15 ασθενείς, οι 12 (80 %) ήταν γυναίκες και οι 3(20 %) άνδρες. Η μέση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν 57,1 έτη. Κατά τη διάγνωση η μέση τιμή των αιμοπεταλίων ήταν 771.000/μl (εύρος 460-2.000.000/μl) και η μέση τιμή των λευκών αιμοσφαιρίων 9.462/μl(εύρος 5300-14730) . Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος για την ανάδειξη των οδηγών μεταλλάξεων JAK2V617F, MPLκαι CALR.Έτσι, 13 από τους από τους 15 ασθενείς φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F (81,25%), 1 είναι θετικός για την μετάλλαξη CALR (6,6 %) και ένας(6,6 %) για την MPL.Σε δύο από τους 15 ασθενείς (ποσοστό 13,3%) σημειώθηκε θρομβωτικό επεισόδιο λίγο πριν ή κατά τη διάγνωση της Ιδιοπαθούς Θρομβοκυττάρωσης. Το ένα περιστατικό αφορούσε αρτηριακή θρόμβωση (ΑΕΕ), ενώ το δεύτερο Πνευμονική Εμβολή. Οι 13 από τους 15 ασθενείς χαρακτηρίζονται ως χαμηλού καρδιαγγειακού κινδύνου, με βάσει το ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, δυσλιπιδαιμίας ή καπνίσματος, ενώ 2 κατατάσσονται αντίστοιχα στην ομάδα ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου. Κατά την περίοδο της μελέτης, όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν αντιαιμοπεταλιακή/αντιπηπτική αγωγή( 14 ασπιρίνη και ένας DOAC). Σε 3 (3,7,13 στον πίνακα 1) από τους συμμετέχοντες ασθενείς η εξέταση πραγματοποιήθηκε κατά τη διάγνωση της Ιδιοπαθούς θρομβοκυττάρωσης και δεν ελάμβαναν υδροξουρία για την μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων( είχαν μόνο πρόσφατη έναρξη ασπιρίνης).Επίσης 3 ασθενείς δεν ελάμβαναν υδροξουρία λόγω νεαρής ηλικίας(<60 ετών) και απουσίας ιστορικού θρόμβωσης (χαμηλό IPSET score)(5,11,15). Μία ασθενής(9) δεν ελάμβανε Υδροξουρία με δική της πρωτοβουλία. Συνολικά , 8 από τους 15 ασθενείς ελάμβαναν κυτταροστατική αγωγή με Υδροξουρία, τη στιγμή της μελέτης.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των ασθενών της μελέτης στο CT /MCF στο EXTEM και στο TPA test. Στους 3 ασθενείς (3,7,13 στον πίνακα 1) που η μελέτη πραγματοποιήθηκε κατά τη διάγνωση του νοσήματος(οπότε δεν λαμβάνουν HU) διαπιστώθηκε μείωση του CT και αυξημένο μέγεθος θρόμβου(MCF) στο EXTEM test και στο TPA test, δηλαδή μετά την ενεργοποίηση της θρομβόλυσης. Στους υπόλοιπους 4 ασθενείς που δεν ελάμβαναν Υδροξουρία είτε λόγω χαμηλού IPSET score(5,11,15) είτε λόγω προσωπικής επιλογής(9), διαπιστώνεται φυσιολογική τιμή CT και MCF στο EXTEM test, γεγονός που μάλλον υποδηλώνει την αντιθρομβωτική δράση της ασπιρίνης. Αντίθετα, στους 3 από αυτούς (9,11,15) παρατηρήθηκε αυξημένο μέγεθος θρόμβου (MCF) στο TPA test, γεγονός που υποδηλώνει αντίσταση στην ινωδόλυση που δεν μπορεί να υπερκεράσει η χορήγηση της ασπιρίνης. Στους 3 ασθενείς από αυτούς(5,9,11) το CT ήταν εντός φυσιολογικών τιμών στο TPA test. Γενικώς, παρατηρούμε πως όσοι ασθενείς λαμβάνουν Υδροξουρία τη στιγμή της ανάλυσης (8 συνολικά ασθενείς) έχουν φυσιολογικές τιμές CT και MCF στο EXTEM test, γεγονός που υποδηλώνει την αντιθρομβωτική δράση της Υδροξουρίας στην ΙΘ (ήδη γνωστή και από παλαιότερες μελέτες).[113] Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στο TPA test (ασθενείς 1,2,6,12). Σε μία ασθενή (14) παρατηρήσαμε το εξής: Στην πρώτη μέτρηση εμφάνισε αυξημένο MCF στο EXTEM και στο TPA test (72 και 53 mm αντίστοιχα, πίνακας 3, γραμμή 1), το οποίο οφείλεται στην μείωση της χορηγούμενης δόσης υδροξουρίας (λόγω τοξικότητας) και στην αντίσταση στην ασπιρίνη που εμφάνισε η ασθενής. Μετά την αύξηση της χορηγούμενης Υδροξουρίας και της ασπιρίνης το MCF μειώθηκε και στα 2 τεστ(πίνακας 3, γραμμή 2). Τέλος, σε κάποιους ασθενείς φαίνεται πως παρόλη τη χορηγηθείσα κυτταροστατική και αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, στο TPA test το MCF παραμένει μεγάλο, γεγονός που μάλλον υποδεικνύει αυξημένη αντίσταση την Ινωδόλυση των ασθενών αυτών(ασθενείς 4,10,14).

Συμπερασματικά, από τη μελέτη αυτή μπορεί κανείς να υποθέσει πως οι ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση παρουσιάζουν έναν επιπλέον κίνδυνο θρόμβωσης, λόγω αντίστασης στην ινωδόλυση. Η χορήγηση Υδροξυουρίας φαίνεται πως δρα προστατευτικά ως προς τον κίνδυνο αυτό. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα, με συμμετοχή πολλών ασθενών για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Η θρομβοελαστογραφία με TPA αποτελεί μια νέα μέθοδο, απλή και γρήγορη, που μπορεί να δώσει μελλοντικά πληροφορίες για την υπερπηκτική κατάσταση ασθενών με ΙΘ, ακόμα και όταν τα αιμοπετάλια είναι φυσιολογικά σε αριθμό και λειτουργικότητα, όπως και οι κλασικές μέθοδοι θρομβοελαστογραφίας.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ασθενών της μελέτης ( 1=ναι 0=όχι)

ΑΞΘΕΝΗΣ	ΦΥΛΟ	ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΤΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Hct%	Hb g/dl	WBC/μl	PLTs	JAK2V617F	CALR	MPL	3ple Negative	ISTORIKO	ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ	ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ	ΦΛΕΒΙΚΗ	ΕΙΔΟΣ	ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΣ	ΚΙΝΔΥΝΟΣ	HU	ΑΣΠΙΡΙΝΗ	DOAC's	CT(EXTEM)min	MCF(EXTEM)mm	CT(TPA test)min	MCF(TPA test)mm
1	A	1961	41	2010	43%	14	7.000	2.000.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	0	1	0	0	1	ΤΥΛΑΙΑ ΜΕΣΕΝΤΕΡΙΟΣ	ΥΨΗΛΟΣ	1	0	1	75 (38-65)	64 (53-68)	53(30-59)	29 (21-43)
2	θ	1952	68	2020	36%	12	12.800	550.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	52 (38-65)	68 (53-68)	47 (30-59)	43 (21-43)
3(Μεταγγωση)	A	1952	69	2021	47%	18	13.000	917.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	1	1	0	0	ΑΕΕ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	36 (38-65)	71 (53-68)	29 (30-59)	50 (21-43)
4	θ	1958	62	2020	45.7%	15,3	7.580	667.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	50 (38-65)	68 (53-68)	37 (30-59)	46 (21-43)
5	A	1978	41	2019	46	15	14.730	530.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	50 (38-65)	61 (53-68)	45 (30-59)	24 (21-43)
6	θ	1950	69	2019	39,8	14	8.170	460.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	58 (38-65)	65 (53-68)	46 (30-59)	34 (21-43)
7(Μεταγγωση)	θ	1969	52	2021	38,6	12,3	8.700	1.245.000	0	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	38(38-65)	70 (53-68)	27 (30-59)	59 (21-43)
8	θ	1960	52	2012	45,5	13,5	11.300	700.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	49 (38-65)	63(49-65)	28 (30-59)	41 (21-43)
9	θ	1955	62	2017	44	14	7.000	650.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	0	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	39 (38-65)	67 (53-68)	32 (30-59)	46 (21-43)
10	θ	1959	52	2011	42,8	14,1	6.300	800.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	0	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	40(38-65)	64(49-65)	30 (30-59)	51 (21-43)
11	θ	1978	40	2018	41,5	13,8	9.490	595.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	50 (38-65)	64(49-65)	30 (30-59)	44 (21-43)
12	θ	1934	75	2009	43,9	14,1	13.520	720.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	0	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	61 (38-65)	66(49-65)	40 (30-59)	35 (21-43)
13(Μεταγγωση)	θ	1953	69	2022	46,7	14,7	8.040	505.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	0	0	0	0	0	ΕΝΩΔΙΑΜΕΣΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	36 (38-65)	70 (49-65)	32(30-59)	48 (21-43)
14	θ	1960	54	2014	45	14	9.000	711.000	0	0	ΘΕΤΙΚΟ	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	1	1	0	40 (38-65)	62(49-65)	29 (30-59)	49 (21-43)
15	θ	1970	51	2021	42	13	5.300	510.000	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	0	1	0	0	0	0	ΧΑΜΗΛΟΣ	ΧΑΜΗΛΟΣ	0	1	0	45 (38-65)	66(49-58)	28 (30-59)	44 (21-43)

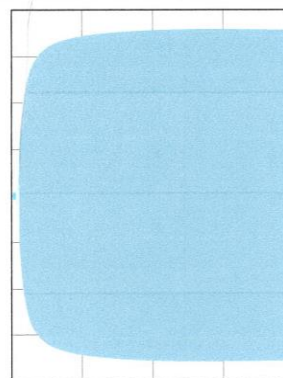
Πίνακας 2: Αποτελέσματα ασθενών στο EXTEM και στο TPA test

ΑΣΘΕΝΗΣ	HU	CT(EXTEM)min	MCF(EXTEM)mm	CT(TPA test)min	MCF(TPA test)mm
1	1	75 (38-65)	64 (53-68)	53(30-59)	29 (21-43)
2	1	52 (38-65)	68 (53-68)	47 (30-59)	43 (21-43)
3	0	36 (38-65)	71 (53-68)	29 (30-59)	50 (21-43)
4	1	50 (38-65)	68 (53-68)	37 (30-59)	46 (21-43)
5	0	50 (38-65)	61 (53-68)	45 (30-59)	24 (21-43)
6	1	58 (38-65)	65 (53-68)	46 (30-59)	34 (21-43)
7	0	38 (38-65)	70 (53-68)	27 (30-59)	59 (21-43)
8	1	49 (38-65)	61 (53-68)	28 (30-59)	41 (21-43)
9	0	38 (38-65)	67 (53-68)	32 (30-59)	46 (21-43)
10	1	40 (38-65)	67 (53-68)	30 (30-59)	51 (21-43)
11	0	50 (38-65)	64(49-65)	30 (30-59)	44 (21-43)
12	1	61 (38-65)	66(49-65)	40 (30-59)	35 (21-43)
13	0	36 (38-65)	70 (53-68)	32(30-59)	48 (21-43)
14	1	40 (38-65)	62 (53-68)	29 (30-59)	49 (21-43)
15	0	45 (38-65)	66 (53-68)	28 (30-59)	40 (21-43)

Πίνακας 3: Ασθενής 14, πριν την αύξηση της Υδροξουρίας και της ασπιρίνης και αντίστοιχα θρομβοελαστογραφήματα (EXTEM/TPA test)

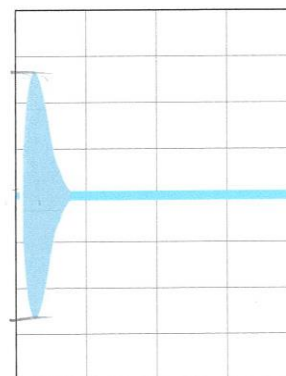
ΑΣΘΕΝΗΣ	HU	CT(EXTEM) min	MCF(EXTEM)mm	CT(TPA test)min	MCF(TPA test)mm
14	1	47 (38-65)	72(49-65)	33(30-59)	53 (21-43)
14	1	40 (38-65)	62(49-65)	29(30-59)	49 (21-43)

Name: [REDACTED]  
 Date of birth: \*  
 Ward:  
 Sample No. or QC: Lot ID:  
 Patient No.:  
 Test: EX-test  
 Start time: 30.05.2022 20:20:05 - Run time: 40m:00s (Stopped)  
 Results: CT 47s ▶ 38-65  
 AS: 65  
 A10: 69  
 A20: 71  
 MCF: 72



Channel: 1  
 t: c: CP44064CA862D

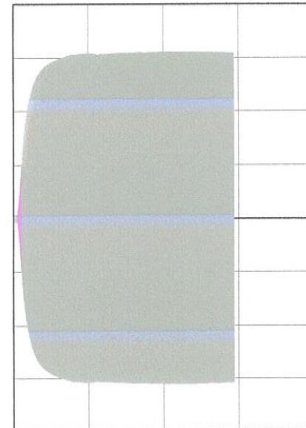
Name: [REDACTED]  
 Date of birth: \*  
 Ward:  
 Sample No. or QC: Lot ID:  
 Patient No.:  
 Test: TPA-test  
 Start time: 30.05.2022 20:20:41 - Run time: 40m:00s (Stopped)  
 Results: CT 33s ▶ 30-59  
 → MCF 53  
 LT 262s  
 ML 97% ▶ 92-100



Channel: 2  
 t: TP44165AA c: CP44064CA862D

Ασθενής 14, μετά την αύξηση της Υδροξυουρίας και της ασπιρίνης ,με αντίστοιχα θρομβοελαστογραφήματα (EXTEM/TPA test)

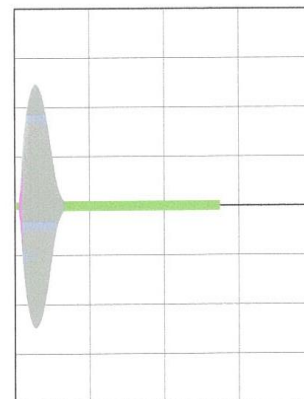
Name [REDACTED]  
Date of birth : \*  
Ward :  
Sample No. or QC: Lot ID :  
Patient No. :  
Test : EX-test  
Start time : 21.02.2023 18:21:57 - Run time: 29m:39s (Running)  
Results :  
CT 40s ▶ 38-65  
A5 59mm ▲ 39-58  
A10 61mm ▶ 47-64  
A20 62mm ▶ 52-67  
MCF 62mm ▶ 53-68



Channel: 1

t: c: CP44064CA862D

Name [REDACTED]  
Date of birth : \*  
Ward :  
Sample No. or QC: Lot ID :  
Patient No. :  
Test : TPA-test  
Start time : 21.02.2023 18:23:52 - Run time: 27m:44s (Running)  
Results :  
CT 29s ▼ 30-59  
MCF 49mm ▲ 21-43  
LT 257s  
ML 97% ▶ 92-100



Channel: 2

t: TP44165AA c: CP44064CA862D

## ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 WHO revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20):2391-2405.
2. Accurso V, Santoro M, Mancuso S. et al. The Essential thrombocythemia in 2020: What we know and where we still have to dig deep. *Clin Med Insights Blood disorders* 2020; 13:1-8.
3. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek. Assessing the Thrombotic risk of patients with Essential Thrombocythemia in the Genomic Era. *Leukemia* 2017;31(9):1845-1854.
4. Luque PD, Jouanneau-Courville R, Riou J et al. Leukemic evolution of polycythemia vera and essential thrombocythemia: genomic profiles predict time to transformation. *Blood Adv* 2020; 4:4887-4897.
5. Buxhofer-Ausch V, Steurer M, Sormann S. et al. Influence of platelet and white blood cell counts on major thrombosis - analysis from a patient registry in essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2016 ;97(6):511-516.
6. Szuber N, Mudireddy M, Nicolosi M, et al. 3023 Mayo Clinic patients with myeloproliferative neoplasms: risk-stratified comparison of survival and outcomes data among disease subgroups. *Mayo Clin Proc* 2019; 94:599-610.
7. Smalberg H, Arends LR, Vall D et al. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2012;120(25):4921-4928.
8. Tefferi A, Pardanani A. Essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2019; 381:2135-2144.
9. Epstein E., Goedel A. Hämorrhagische Thrombocythämie bei vasculärer Schrumpfmilz. *Virchows Archiv Pathologische Anatomie Physiologie Klinische Medizin.* 1934; 292:233–248.
10. Michiels J.J. Acquired von Willebrand disease due to increasing platelet count can readily explain the paradox of thrombosis and bleeding in thrombocythemia. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 1999; 5:147–151.
11. Awada H, Voso MT, Guglielmelli P, et al. Essential Thrombocythemia and Acquired von Willebrand Syndrome: The Shadowlands between Thrombosis and Bleeding. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 30;12(7):1746.



12. Falchi L., Bose P., Newberry K.J., Verstovsek S. Approach to patients with essential thrombocythaemia and very high platelet counts: What is the evidence for treatment? *Br. J. Haematol.* 2017; 176:352–364.
13. Ball S, Thein KZ, Maiti A et al. Thrombosis in Philadelphia negative classical myeloproliferative neoplasms: a narrative review on epidemiology, risk assessment, and pathophysiologic mechanisms. *J Thromb Thrombolysis* 2018; 45:516-528.
14. Carrobbio A, Thiele J, Barbui T et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood* 2011;117(22):5857-5859.
15. Casini A, Fontana P, Lecompte TP. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management. *J Thromb Haemost.* 2013;11(7):1215-1227.
16. Montanaro M, Latagliata R, Cedrone M et al. Thrombosis and survival in essential thrombocythemia: A regional study of 1,144 patients. *Am J Hematol.* 2014 89:542-546.
17. Hulcrantz M, Bjorkholm M, Dickman PW et al. Risk for Arterial and Venous Thrombosis in Patients with Myeloproliferative Neoplasms: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2018 ;168(5):317-325.
18. De Stefano V, Rossi E, Za T. et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008 93:372-380.
19. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A et al. Development and validation of an international prognostic score of thrombosis in World Health Organization -Essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012; 120:5128-5133.
20. Mancuso S, Accurso V, Santoro M et al. The essential thrombocythemia, thrombotic risk stratification and cardiovascular risk factors. *Adv Hematol* 2020; 2020: 9124821.
21. Lekovic D, Gotic M, Sefer D et al. Predictors of survival and cause of death in patients with essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2015; 95:461-466.
22. Haider M, Gangat N, Lasho T et al. Validation of the revised International Prognostic Score of Thrombosis for Essential Thrombocythemia (IPSET-thrombosis) in 585 Mayo Clinic patients. *Am J Hematol* 2016; 91:390-394.
23. Santoro M., Accurso V., Mancuso S. et al. Comparison between thrombotic risk scores in Essential thrombocythemia and survival implications, *Hematol Oncology* 2019;37:434-437.

24. Tefferi A and Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia :2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology* 2017; 91:94-108.
25. Sankar, K., Stein, B. L., Rampal, R. K. Thrombosis in the Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Treatment and Research*, (2019), 159–178.
26. Hasselbalch HC, Elvers M, Schafer AI. The pathobiology of thrombosis, microvascular disease, and hemorrhage in the myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021 22;137(16):2152-2160.
27. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-61.
28. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
29. Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 4:387-97.
30. James C, Ugo V, Le Couédic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
31. 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.
32. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013 23;32(21):2601-13.
33. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, et al. JAK2 V617F Constitutive Activation Requires JH2 Residue F595: A Pseudokinase Domain Target for Specific Inhibitors. *PLOS ONE* 2010 (6): e11157.
34. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017.9;129(6):667-679.

35. Teofili L, Martini M, Iachinimoto MG et al. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;117:2700-07.
36. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19:1847-1849.
37. Cheung B, Radia D, Pantelidis P et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.*2006; 132:244-245.
38. De Stefano, V., Rossi, E., Za, T et al. JAK2 V617F mutational frequency in essential thrombocythemia associated with splanchnic or cerebral vein thrombosis. *Am. J. Hematol.*2011, 86: 526-528.
39. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukemia and Lymphoma Group. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet.* 2005 3;366(9501):1945-53.
40. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa CM, Salmoiraghi S, Delaini F, Rambaldi A, Barbui T. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2009;37(9):1016-21;37(9):1016-21.
41. Hu L, Pu L, Ding Y et al. Relationship between JAK2V617F mutation, allele burden and coagulation function in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology* 2017; 22:354-360.
42. Ziakas P. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica* 2008;93(9):1412-1414.
43. Qin Y, Wang X, Zhao C et al. The impact of JAK2V617F mutation on different types of thrombosis risk in patients with essential thrombocythemia: a meta-analysis. *Int J Hematol.*2015;102:170-180.
44. De Stefano V, Za T, Rossi E et al. GIMEMA Chronic Myeloproliferative Neoplasms Working Party. Increased risk of recurrent thrombosis in patients with essential thrombocythemia carrying the homozygous JAK2 V617F mutation. *Ann Hematol.* 2010;89(2):141-6.
45. Arachchillage DR, Laffan M. Pathogenesis and Management of Thrombotic Disease in Myeloproliferative Neoplasms. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Sep;45(6):604-611.;45(6):604-611.
46. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N et al. Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica* 2019; 104:70-81

47. Gadomska G, Stankowska K, Boinska J et al. Activation of the tissue factor-dependent extrinsic pathway and its relation to JAK2 V617F mutation status in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016, 27:817-821.
48. Coucelo M, Caetano G, Sevivas T, et al. JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Int J Hematol.* 2014;99(1):32-40.
49. Maleknia M, Shahrabi S, Ghanavat M, et al. Essential thrombocythemia: a hemostatic view of thrombogenic risk factors and prognosis. *Mol Biol Rep.* 2020;47(6):4767-4778.
50. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood.* 2007 1;110(3):840-6.
51. Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydłowska A, Kroll-Balcerzak R, Balcerzak A, Iwoła M, Michalak M, Komarnicki M. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res.* 2015;135(2):272-80.
52. Arellano Rodrigo A, Alvarez-Larrán A, Reverte JC et al, Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol* 2009; 84:102-8.
53. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol.* 2014 ;89(5):517-23.
54. Bertozzi I, Bogoni G, Biagetti G et al. Thromboses, and hemorrhages are common in MPN patients with high JAK2V617F allele burden. *Ann Hematol* 2017, 96:1297-1302.
55. Nielsen C, Bojesen SE, Børge G. et al. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica* 2014;99(9):1448-1455.
56. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006;3(7): e270.
57. Defour JP, Chachoua I, Pecquet C, et al. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(5):1214-6.
58. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108: 3472-3476

59. Beer PA, Cambell PJ, Scott LM et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112:141-9.
60. Yang E, Wang M, Wang Z, et al. Comparison of the effects between MPL and JAK2V617F on thrombosis and peripheral blood cell counts in patients with essential thrombocythemia: a meta-analysis. *Ann Hematol.* 2021;100(11):2699-2706.
61. Gangat N, Wassie EA, Lasho TL et al. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history. *Eur J Haematol.*2015;94(1):31-36.
62. Mansier O, Luque Paz D, Ianotto JC et al. Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Am J Hematol.* 2018;93(4):E84-E86.
63. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369:2379-90.
64. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;19;369(25):2391-2405.
65. Rumi E, Pietra D, Ferretti V et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123(10):1544-1551.
66. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014 ;123:1552-1555.
67. Pietra D, Rumi E, Ferretti V et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2016 ;30: 431-438.
68. Finazzi G, Carobbio A, Guglielmelli P, et al. Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. *Blood.* 2014 16;124(16):2611-2.
69. Di Buduo CA, Moccia F, Battiston M, et al. The importance of calcium in the regulation of megakaryocyte function. *Haematologica* 2014; 99: 769–778
70. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016 10;127(10):1307-16.
71. Chachoua I, Pecquet C, El Khoury M et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutant. *Blood* 2016; 127:1325-3.

72. Zini R, Guglielmelli P, Pietra E et al. CALR mutational status identifies different disease subtypes of essential thrombocythemia showing distinct expression profiles. *Blood Cancer J.* 2017; 7(12):638.
73. Guglielmelli P, Gangat N, Coltro G., et al. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood Cancer J.* 2021 27;11(4):77.
74. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014 3;123(14):2220-8.
75. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Br J Haematol.* 2020 ;189(2):291-302.
76. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008; 26:2732-6.
77. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007 ;109(6):2310-3.
78. Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj A. The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood.* 2007 1;109(9):4105.
79. De Stefano V, Za T, Rossi E et al. Leukocytosis is a risk factor for recurrent arterial thrombosis in young patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2010, 85:97-100.
80. Lim Y, Lee JO, Kim SH, et al. Prediction of thrombotic and hemorrhagic events during polycythemia vera or essential thrombocythemia based on leukocyte burden. *Thromb Res.* 2015;135(5):846-51.
81. Falanga A, Marchetti M, Barbui T et al. Pathogenesis of thrombosis in Essential Thrombocythemia and Polythemia Vera: the role of Neutrophils. *Semin Hematol* 2005 42:239-47.
82. Trelinski J, Tybura M, Smolewski P, et al. The influence of low-dose aspirin and hydroxyurea on platelet-leukocyte interactions in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009 ;20(8):646-51.
83. Eckle I, Seitz R, Egbring R, et al. Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1991;372(11):1007-13.
84. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2000;96(13):4261-6.
85. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5.

86. Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 30;207(9):1853-62.
87. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS et al. Neutrophil extra-cellular traps promote deep venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012, 10:136-144.
88. Wolach O, Sellar RS, Martinod K et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* 2018 ;10(436).
89. Marin Oyarzún CP, Heller PG. Platelets as Mediators of Thromboinflammation in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Front Immunol* 2019, 10:1373.
90. Patrono C, Rocca B, De Stefano V. Platelet activation and inhibition in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2013; 121(10):1701-1711
91. Rocca B, Ciabattini G, Tartaglione R, et al. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost*. 1995;74(5):1225-30.
92. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(3):348-58.
93. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, et al. TNF $\alpha$  facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 8;118(24):6392-8.
94. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):969-79.
95. Kawano H, Tsuji H, Nishimura H, et al. Serotonin induces the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Blood* 2001 ;97(6):1697-702.
96. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G et al. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and Pentraxin-3. *Hematologica* 2011; 96:315-8.
97. Panova-Noeva M, Marchetti M, Russo L, ADP-induced platelet aggregation and thrombin generation are increased in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Thromb Res*. 2013;132(1):88-93.
98. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009 21;113(21):5246-9.
99. Torres C, Fonseca AM, Leander M, et al. Circulating endothelial cells in patients with venous thromboembolism and myeloproliferative neoplasms. *PLoS One*. 2013 5; 8(12): e 81574.
100. Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thromb Res*. 2012; 129 Suppl 1: S132-6.

101. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS et al. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2013 ;11(7):893-897.
102. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, et al. Elevated-procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2009;94(7):911-8.
103. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with Essential Thrombocythemia. *Am J Hematol* 2014; 89:68-73.
104. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med*. 2004 ;10(4):171-8.
105. Taniguchi Y, Tanaka H, Luis EJ et al. Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2017, 106:691-703.
106. Charpentier A, Lebreton A, Rauch A et al. Microparticle phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2016; 101:365-8.
107. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):647-54.
108. Luddington, R.J. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical & Laboratory Haematology* 2005;27: 81-90.
109. Schmidt AE, Israel AK, Refaai MA. The Utility of Thromboelastography to Guide Blood Product Transfusion. *Am J Clin Pathol*. 2019 9;152(4):407-422.
110. Goerlinger K, Dirkmann D, Kiss G. et al. ROTEM-based management for diagnosis and treatment of acute haemorrhage during liver transplantation: A-322. *Eur J of Anaesthesiol* 2006 ;23: 85.
111. Tripodi A, Chantarangkul V, Gianniello F, et al. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2013;92(12):1633-9.
112. Trelínski J, Okońska M, Robak M, et al. Assessment of rotation thromboelastometry parameters in patients with essential thrombocythemia at diagnosis and after hydroxyurea therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016;27(2):205-9.
113. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med*. 1995 27;332(17):1132-6.
114. Barbui T. Refining prognostication of thrombosis in ET. *Am J Hematol*. 2016 Jun;91(4):361-3.



