Analiza gena i proteina signalnih puteva Wnt i Sonic Hedgehog u primarnoj i sekundarnoj mijelofibrozi

Lucijanić, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:736777

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Lucijanić

Analiza gena i proteina signalnih puteva Wnt i Sonic Hedgehog u primarnoj i sekundarnoj mijelofibrozi

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Lucijanić

Analiza gena i proteina signalnih puteva Wnt i Sonic Hedgehog u primarnoj i sekundarnoj mijelofibrozi

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Zavodu za hematologiju, u Jedinici za molekularnu biologiju i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Rajko Kušec

Zahvala

Posebno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Rajku Kušecu, dr. med. na velikoj podršci, motivaciji i pruženom povjerenju.

Zahvaljujem dr. sc. Ani Livun, mag. biol. mol., Katarini Mariji Tupek, mag. med. lab. diagn., Senčici Pejša, bacc. med. lab. diagn., doc. dr. sc. Gorani Aralica, dr. med., prim. dr. sc. Čedni Tomasović-Lončarić, dr. med., Ivi Geček, bacc. med. lab. ing., Zorani Miletić, mag. biol. mol., doc. dr. sc. Tajani Štoos-Veić, dr. med., prof. dr. sc. Mladenu Petrovečkom, dr. med., prof. dr. sc. Vlatku Pejši, dr. med., prof. dr. sc. Ozrenu Jakšiću, dr. med., prof. dr. sc. Danki Grčević, dr. med., prof. dr. sc. Sonji Levanat, mag. chem., prof. dr. sc. Dori Višnjić, dr. med., prof. dr. sc. Radovanu Vrhovcu, dr. med., prof. dr. sc. Slavku Gašparovu, dr. med., osoblju Zavoda za hematologiju, osoblju Jedinice za molekularnu biologiju i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i osoblju Kliničkog zavodu za patologiju i citologiju na prijateljskim savjetima, stručnoj i znanstvenoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem i profesoru Antunu Milinkoviću, gimnazijskom profesoru biologije i kemije koji mi je svojim primjerom istinskog znanstvenika i pedagoga pokazao put kojim treba ići.

Zahvaljujem sinovima Mihaelu i Stjepanu i supruzi Jeleni na strpljenju i svemu lijepom što su donijeli u moj život.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Zdrava i bolesna krvotvorna matična stanica i njezin mikrookoliš 3
   1.2. Primarna i sekundarna mijelofibroza 8
   1.3. Mreža unutarstaničnih signalnih puteva 18
   1.4. WNT signalni put 20
   1.5. Sklerostin 23
   1.6. Sonic Hedgehog signalni put 27
2. HIPOTEZA 30
3. CILJEVI RADA 31
   3.1. Opći cilj 31
   3.2. Specifični ciljevi 31
4. ISPITANICI I METODE 32
   4.1. Ispitanici i materijal 32
   4.2. Metode 34
      4.2.1. Klinički parametri i laboratorijski testovi 34
      4.2.2. Izolacija RNA i RT-PCR 35
      4.2.3. Imunohistokemijska analiza 36
   4.3. Statistička obrada podataka 38
5. REZULTATI 39
   5.1. Karakteristike ispitanika 39
   5.2. Kanonski Wnt signalni put 42
      5.2.1. WNT3a 42
      5.2.2. β-katenin 46
      5.2.3. Sklerostin/*SOST* 51
   5.3. Sonic Hedgehog signalni put 55
      5.3.1. SHH 55
      5.3.2. GLI1 60
   5.4. Povezanost između WNT i SHH signalnih puteva 64
6. RASPRAVA 65
   6.1. Osvrt na karakteristike bolesnika 66
   6.2. Osvrt na kanonski WNT signalni put 68
   6.3. Osvrt na SHH signalni put 72
   6.4. Ograničenja istraživanja 74
   6.5. Publikacije proizašle iz istraživanja 75
7. ZAKLJUČCI 76
8. SAŽETAK 78
9. SUMMARY 79
10. LITERATURA 80
11. ŽIVOTOPIS 97

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABL (eng. Abelson tyrosine kinase) – Abelsonova tirozin kinaza

AKT (eng. Ak strain transforming) – Ak soj transformirajući

ALL (eng. acute lymphoblastic leukemia) – akutna limfoblastična leukemija

AlloSCT (eng. allogeneic stem cell transplantation) – alogenična transplantacija koštane srži

AML (eng. acute myeloid leukemia) – akutna mijeloična leukemija

AMM (eng. agnogenic myeloid metaplasia) – agnogena mijeloidna metaplazija

APC (eng. Adenomatous polyposis coli) – Adenomatozna polipoza kolona

BCR (eng. breakpoint cluster region) – regija u kojoj se grupiraju prijelomi

BCR-ABL – fuzijski gen/protein tipičan za kroničnu mijeloičnu leukemiju koji se sastoji od BCR (eng. Breakpoint cluster region; hrv. Regija u kojoj se grupiraju prijelomi) i ABL (eng. Abelson tyrosin kinase; hrv. Abelsonova tirozin kinaza)

β-TrCP (eng. beta Transducin repeat containing protein) – Protein s ponavljajućim elementima koji sadržavaju transducin beta

BMP (eng. Bone morphogenetic protein) – Koštani morfogenetski protein

CALR (eng. Calreticulin) – Kalretikulin

CCN2/CTGF (eng. Connective tissue growth factor) – Čimbenik rasta vezivnog tkiva

CD (eng. Cluster of differentiation) – klasifikacijska molekula na površini stanica

cDNA (eng. complementary deoxyribonucleic acid) – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

CIMF (eng. chronic idiopathic myelofibrosis) – kronična idiopatska mijelofibroza

CK1 (eng. Casein kinase 1) – Kazein kinaza 1

CLL (eng. chronic lymphocytic leukemia) – kronična limfocitna leukemija

CML (eng. chronic myeloid leukemia) – kronična mijeloična leukemija

c-MYC (eng. cellular Myelocytomatosis oncogene) – stanični Onkogen mijelocitomatoze

CNA (eng. copy number aberrations) – poremećaji u broju kopija gena

ΔCT (eng. difference in threshold cycles) – razlika između rednih brojeva ciklusa lančane reakcije polimeraze u kojima nastupa prag detekcije amplikona

DAB (eng. diaminobenzidine) – diaminobenzidin

DMSO (eng. dymethilsulfoxide) – dimetilsulfoksid

eng. – engleski jezik

ET (eng. essential thrombocythemia) – esencijalna trombocitemija

FGF (eng. Fibroblast growth factor) – Čimbenik rasta fibroblasta

FISH (eng. fluorescence in situ hybridization) – fluorescentna in situ hibridizacija

GLI (eng. Glioma associated oncogene) – Onkogen povezan s gliomom

GSK3 (eng. Glycogen synthase kinase 3) – Glikogen sintaza kinaza 3

hrv. – hrvatski jezik

HSC (eng. hematopoietic stem cell) – hematopoetska matična stanica

IL (eng. Interleukin) - Interleukin

IQR (eng. interquartile range) – interkvartilni raspon

IWG-MRT (eng. International working group for myeloproliferative neoplasms research and treatment) – Međunarodna radna grupa za istraživanje i liječenje mijeloproliferativnih neoplazmi

JAK2 (eng. Januse kinase 2) – Janus kinaza 2

LDH (eng. Lactate dehydrogenase) – Laktat dehidrogenaza

LRP5/6 (eng. Low density lipoprotein receptor related protein 5/6) – Protein srodan s receptorom za lipoprotein niske gustoće 5/6

MAPK (eng. Mitogen activated protein kinase) – Mitogenom aktivirana protein kinaza

MDS (eng. myelodysplastic syndrome) – mijelodisplastički sindrom

MF (eng. myelofibrosis) – mijelofibroza

MM (eng. multiple myeloma) – multipli mijelom

MMM (eng. myelofibrosis with myeloid metaplasia) – mijelofibroza s mijeloidnom metaplazijom

MPL (eng. Myeloproliferative leukemia virus) – Virus mijeloproliferativne leukemije

MPN (eng. myeloproliferative neoplasm) – mijeloproliferativna neoplazma

MS (eng. myelosclerosis) – mijeloskleroza

NHL (eng. Non Hodgkin lymphoma) – Non Hodgkinov limfom

npr. – na primjer

n.z. – rezultat nije statistički značajan

OMF (eng. osteomyelofibrosis) – osteomijelofibroza

OS (eng. overall survival) – ukupno preživljenje

PCR (eng. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze

PDGF (eng. Platelet derived growth factor) – Čimbenik rasta izveden iz trombocita

Ph- (eng. Philadephia chromosom negative) – Philadelphia kromosom negativna (mijeloproliferativna bolest)

PI3K (eng. Phosphatidyl inositol 3 kinase) – Fosfatidil inozitol 3 kinaza

PKA – protein kinaza A

PMF (eng. primary myelofibrosis) – primarna mijelofibroza

Analiza ROC krivulje (eng. Receiver Operating Characteristic curve analysis) – analiza krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika

PRV (eng. polycythemia rubra vera) – policitemija rubra vera

RNA (eng. ribonucleic acid) – ribonukleinska kiselina

RT-PCR (eng. real time polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Ras (eng. Rat sarcoma) – Sarkom štakora

RDW (eng. red cell distribution width) – širina distribucije volumena crvenih krvnih stanica

SCF (eng. Stem cell factor) – Čimbenik matičnih stanica

SDF1 (eng. Stromal cell derived factor 1) – Čimbenik izveden iz stromalnih stanica 1

SHH (eng. Sonic hedgehog) – Jež Sonic

shRNA (eng. short hairpin RNA) – kratka RNA poput ukosnice

SMF (eng. secondary myelofibrosis) – sekundarna mijelofibroza

SOST (eng. Sclerostin) – Sklerostin

STAT (eng. Signal transducer and activator of transcription) – Prijenosnik signala i aktivator transkripcije

SUFU (eng. Supressor of Fused) – Supresor Fused proteina

TCF/LEF (eng. T cell factor/Lymphoid enhancer binding factor) – T stanični čimbenik/Čimbenik koji se veže za limfoidni pojačivač

TGF-β (eng. Transforming growth factor beta) – Transformirajući čimbenik rasta beta

TIBC (eng. total iron binding capacity) – ukupni kapacitet vezanja željeza

tzv. – takozvani

VEGF (eng. Vascular endothelial growth factor) – Čimbenik rasta vaskularnih endotelnih stanica

WHO (eng. World health organization) – Svjetska zdravstvena organizacija

WNT (eng. Wingless related integration site) – Mjesto integracije koje se odnosi na Wingless

1. UVOD

Napredak molekularne biologije tijekom prošlog stoljeća omogućio je uvid u do tad skrivene osobitosti pojedinih ljudskih bolesti koje određuju njihov karakter i ponašanje. Tehnike poput fluorescentne in situ hibridizacije (FISH prema eng. fluorescence in situ hybridization) i lančane reakcije polimeraze (PCR prema eng. polymerase chain reaction) našle su nezamjenjivo mjesto u dijagnostici hematoloških malignih bolesti gdje su uzorci za analizu lako dostupni (mislimo na perifernu krv), a promjene genoma nekad odlučujuće za postavljanje same dijagnoze bolesti i donošenje odluke o daljnjem liječenju.

Možda i najbolji primjer rečenog je otkriće Petera Nowella iz 1961. (1) kako je u tumorskim stanicama oboljelih od kronične mijeloične leukemije (CML prema eng. chronic myeloid leukemia) redovito prisutna ista kromosomska promjena, kromosom neobičnog oblika. Promjenu je nazvao Phialdelphia kromosomom u čast sveučilišta na kojem je radio. Njegovo je otkriće bilo među prvim dokazima kako maligne bolesti nose promjene genoma koje vjerojatno diktiraju ponašanje tumorskih stanica. Uskoro je pokazano kako je to spoj između 9. i 22. kromosoma (2) i kako se na mjestu spoja stvara BCR-ABL (regija-gdje-se-grupiraju-prijelomi BCR prema eng. breakpoint-cluster-region i Abelsonova-tirozin-kinaza ABL prema eng. Abelson-tyrosin-kinase) (3,4), novi gen i novi protein ne prisutan u zdravom ljudskom tijelu. BCR-ABL ima funkciju tirozin kinaze i u tumorskoj stanici služi kao glavni pokretač na stalnu diobu i tumorsko ponašanje.

Prava snaga njegovog otkrića pokazala se kad je na prijelazu 20. i 21. stoljeća sintetizirana mala molekula, imatinib mesilat ili Gleevec® (5), koja selektivno ihibira BCR-ABL molekulu. Bolest se do tada vrlo teško liječila, transformirala je u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML prema eng. acute myeloid leukemia) i završavala smrtnim ishodom u gotovo svim slučajevima. Alogenična transplantacija koštane srži bila je jedina mogućnost potencijalnog izlječenja uz sve komplikacije koje ju prate. Uvođenjem ove nove molekule u terapiju nastupila je revolucija u hematologiji i onkologiji. Ljudima koje je čekala beznadna budućnost i umiranje pod kliničkom slikom AML nekoliko godina nakon otkrivanja bolesti, omogućen je gotovo normalan život bez znakova tumorske bolesti.

Još jedno za hematologiju važno otkriće bio je pronalazak V617F mutacije u egzonu 14 *Janus-kinaza-2* (*JAK2* prema eng. *Janus-kinase-2*) gena od strane četiri nezavisne grupe

autora (6-9). JAK2 proteinski produkt sudjeluje u unutarstaničnom prijenosu signala za (među ostalim) eritropoetinski receptor. Aktivirajuća V617F mutacija daje lažni signal tumorskoj krvotvornoj stanici da je cijelo vrijeme stimulirana eritropoetinom i prisutna je u oko 95% policitemija rubra vera (PRV prema eng. polycythemia rubra vera), u oko 50% esencijalnih trombocitemija (ET prema eng. essential thrombocytosis) i u preko 50% primarnih mijelofibroza (PMF prema eng. primary myelofibrosis) (10). Zahvaljujući ovom relativno jednostavnom genetičkom testu danas je moguće s visokom sigurnošću razlučiti puno češća reaktivna stanja povišenih vrijednosti hemoglobina od autonomnog tumorskog rasta, kao i bolje definirati pojedine hematološke bolesti (11,12).

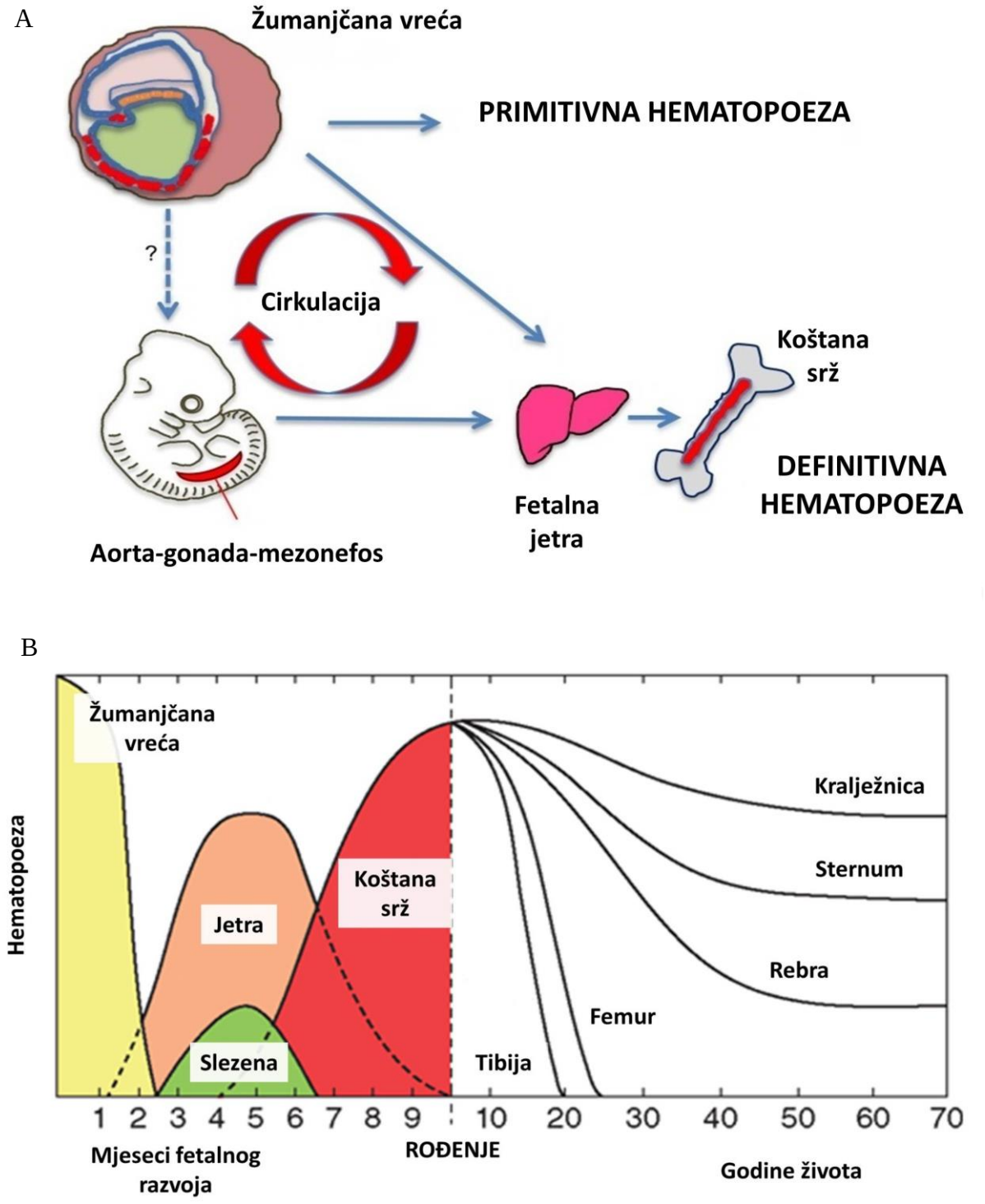
Ono što je jučer bilo apstraktno, danas predstavlja medicinski temelj koji svaki liječnik hematolog mora dobro poznavati i svakodnevno koristiti. Spuštajući se u kliničkom razmišljanju od razine ljudskog tijela, preko pojedinih organa, same stanice i njezinih organela, pa do razine makro i mikromolekula, puni znanstvene radoznalosti pitamo se što će nam napredak medicinskih znanosti sljedeće donijeti.

1.1. Zdrava i bolesna krvotvorna matična stanica i njezin mikrookoliš

Sve stanice ljudskog tijela razvile su se iz jedne jedine stanice – zigote koja je imala svojstvo **matičnosti** (eng. stemness), tj. imala je svojstvo očuvanja dugoročnog samoobnavljanja uz nesazrijevanje, ali i sposobnost diobama dati potomstvo koje će sazrijeti u bilo koji tip stanice koji je moguć u ljudskom tijelu. Postupnim diobama, dio stanica ostaje matičnima, a dio gubi raspon mogućih oblika stanica u koje može sazrijeti, a konačno i sposobnost samoobnavljanja sve dok ne nastanu zrele terminalno diferencirane stanice koje tvore različita tkiva i organe.

Tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja dio matičnih stanica usmjerio se prema proizvodnji krvnih stanica, ali i dalje su zadržale dugoročno svojstvo samoobnavljanja. One se nazivaju **krvotvornim/hematopoetskim matičnim stanicama** (HSC prema eng. hematopoietic stem cell). Tijekom fetalnog razvoja HSC nastaju u nekoliko valova (13) na nekoliko mjesta u tijelu (Slika 1). Najranije prepoznato mjesto razvoja tih stanica je fetalni retroperitoneum, nabor tkiva uz fetalnu aortu zvan aorta-gonada-mezonefros jer daje osnovu i za razvoj drugih organa, a odakle stanice koje okružuju fetalnu aortu pupaju u njen lumen i postaju HSC. Zatim slijedi drugi val stanica hematopoeze koje nastaju u placenti i žumanjčanoj vreći te naseljavaju jetru i slezenu gdje proizvodnja krvi traje sve do poroda, a tada primarno mjesto u proizvodnji krvnih stanica postaju HSC koje su u međuvremenu naselile koštanu srž. U jetri odraslog čovjeka mogu se dokazati HSC koje se aktivno dijele i sazrijevaju niskim intenzitetom tijekom cijeloga života (14). HSC se mogu prepoznati bojanjem na površinski marker CD34 kojeg izražavaju, međutim ova molekula nije ekskluzivna samo za njih jer ga izražava i endotel krvnih žila (što svjedoči o biološkoj povezanosti ove dvije vrste tkiva).

Zanimljivo je kako u slučaju kad koštana srž prestane biti dovoljna za proizvodnju krvnih stanica, kao npr. pri razvoju fibroze koštane srži ili tijekom teške hipoksije, tjelesni impulsi stimuliraju razvoj ekstramedularne hematopoeze (i to najčešće upravo u organima gdje je ona već jednom i bila prisutna: jetri, slezeni ili retroperiteonumu). Otočići novonastale hematopoeze su tumorsko tkivo koje ometa normalnu funkciju zahvaćenih organa što uz neadekvatnu proizvodnju krvi čini dodatan klinički problem.



Slika 1: A) Mjesta hematopoeze tijekom fetalnom razvoja i kasnijeg života, preuzeto i adaptirano prema Bo Chen, 2014. (15). **B)** Mjesta hematopoeze različito su aktivna tijekom života, preuzeto i adaptirano prema Digital World Medical School (16).

Tijekom oplodnje jajne stanice, kao i tijekom kasnijih dioba i sazrijevanja njezinih stanica potomaka, niti u jednom trenutku nije riječ o usamljenim ili izoliranim stanicama, već su one cijelo vrijeme u kontaku sa svojim mikrookolišom. One tijesno komuniciraju s okolnim stanicama direktno i indirektno putem mnogobrojnih molekula, uronjene su u određeni mikrookoliš koji ih hrani, usmjerava i brine o njima da bi jednog dana i one postale tkivo koje će nastaviti s održavanjem istog mikrookoliša u kakvom su potekle. Gotovo je nevjerojatno koliko je sličnosti između životnog puta stanice i ljudskog bića kao jedinke. Čini se kako su zakoni prirode univerzalni na svim razinama funkcioniranja (Slika 2).

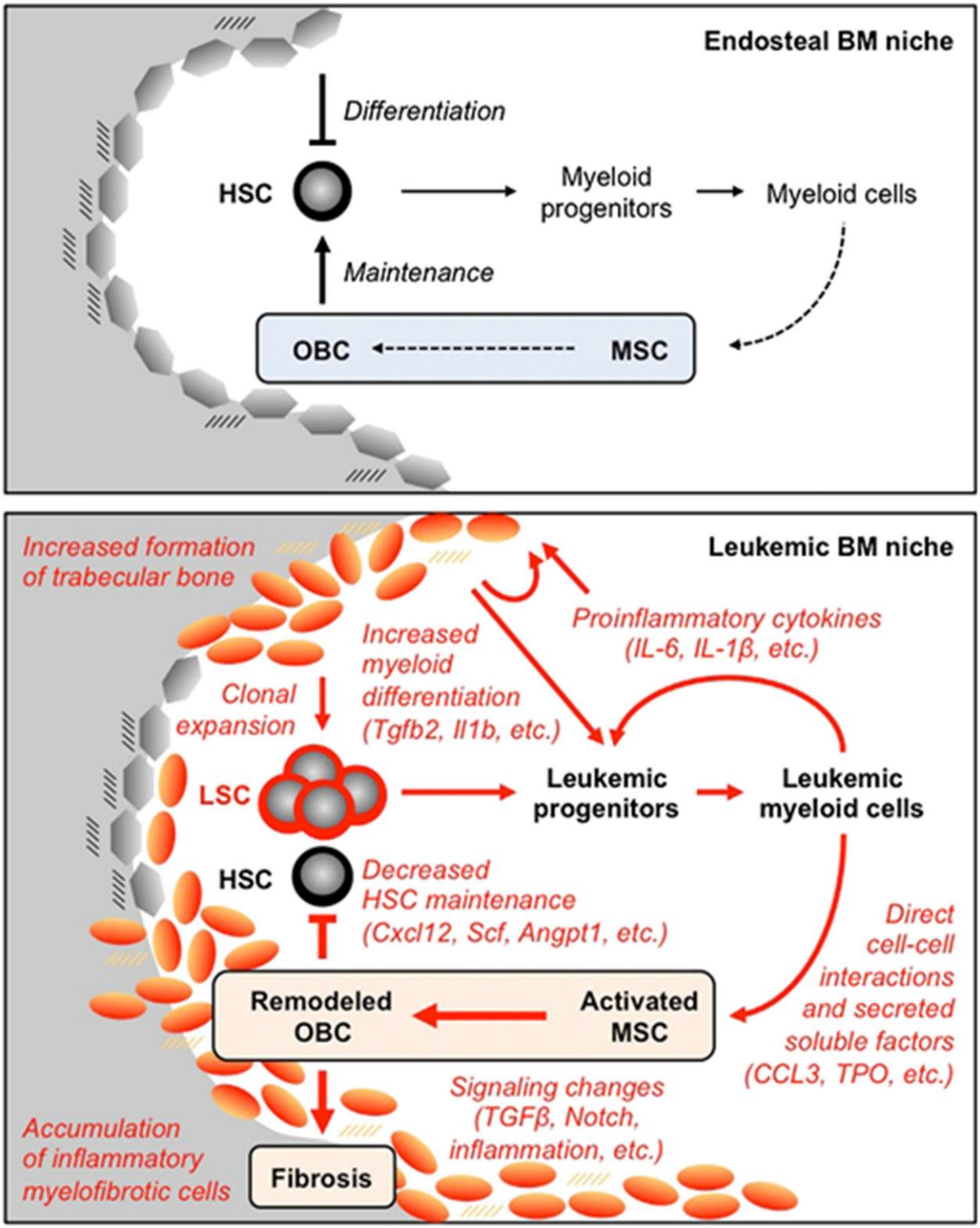
Zašto HSC biraju upravo jetru, slezenu, odnosno koštanu srž kao svoj dom?

U tim se organima razvija induktivni hematopoetski mikrookoliš u kojem su prisutne visoke koncentracije stimulativnih citokina i površine susjednih stanica prekrivene su molekulama „ljepljivim“ za HSC. Kada se matične stanice usidre, same počnu proizvoditi lepezu molekula potrebnih za poticanje induktivnog mikrookoliša i razvija se zatvoreni krug, životna zajednica između matičnih/sazrijevajućih stanica hematopoeze i stanica strome. Unutar koštane srži prepoznata su dva velika odjeljka ili niše hematopoeze: endostalna koja citokinski preferira samoobnavljanje HSC i perivaskularna koja potiče usmjeravanje i sazrijevanje HSC u zrele oblike stanica (17).

Sve što vrijedi u fiziološkim uvjetima odvija se i nakon tumorske preobrazbe matične stanice. Pokazano je kako mijeloproliferativne neoplazme (MPN prema eng. myeloproliferative neoplasm) direktnim kontaktom i citokinski remodeliraju stanice strome da iste počnu favorizirati leukemijski klon (tumorsku matičnu stanicu) nad zdravom hematopoezom. To može dovesti do razvoja mijelofibroze i osteoskleroze uslijed prozvodnje velike količine profibrogenih i proosteogenih citokina (18) (Slika 3).



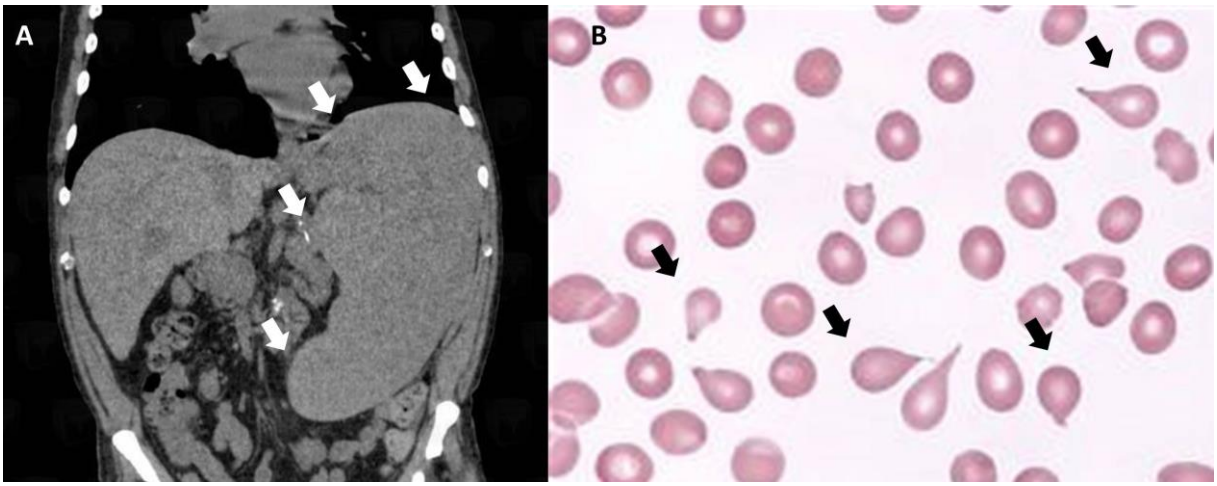
Slika 2: Koraljni greben i njegov mikorookoliš kao analogija mikrookoliša koštane srži. Preuzeto sa www.istockphoto.com.



Slika 3: Leukemijski klon remodelira hematopoetsku nišu tako da niša počne favorizirati tumorske matične stanice nad normalnom hematopoezom. Preuzeto iz Schepers, 2013. (18).

1.2. Primarna i sekundarna mijelofibroza

PMF je tumorska bolest porijekla krvotvorne matične stanice (19) s incidencijom od 0,1 do 1 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje (20). PMF je karakterizirana povećanom proliferacijom mijeloidnih stanica uz snažnu citokinsku aktivnost koja rano tijekom razvoja bolesti dovodi do ožiljkavanja koštane srži (mijelofibroze (MF)). Dolazi do mobilizacije CD34+ HSC (blasta) u perifernu krv, te do aktivacije ekstramedularne hematopoeze u alternativnim hematopoetskim organima - slezeni i jetri. U bolesnika se često susreću masivna splenomegalija (slezena palpabilna za >10cm pod lijevim rebrenim lukom) (Slika 4A) i bizarni oblici crvenih krvnih stanica uz umjerenu retikulocitozu (patognomonični su pojava dakriocita – eritrocita oblikovanih poput suze i leukoeritroblastoza – pojava nezrelih eritroidnih i mijeloidnih stanica u perifernoj krvi) (Slika 4B). Obično su prisutne povišene vrijednosti Laktat dehidrogenaze (LDH prema eng. Lactate dehydrogenase) i znatna anizocitoza (povišena širina distribucije volumena crvenih krvnih stanica (RDW prema eng. red cell distribution width)). U bolesnika mogu biti izraženi iscrpljujući konstitucijski simptomi (gubitak na tjelesnoj težini >10% u šest mjeseci, noćna znojenja i neobjašnjeni (sup)febriliteti >37,5°C), bolovi u kostima, bolovi/nelagoda pod lijevim rebrenim lukom (uslijed rastuće slezene) te simptomi uzrokovani insuficijencijom koštane srži – brzo umaranje, skolnost krvarenju i infekcijama. Bolest značajno utječe na lošiju kvalitetu života oboljelih (21).



Slika 4: Za potpuno razvijeni PMF su karakteristični **A)** masivna splenomegalija (bijele strelice) koja je posljedica ekstramedularne hematopoeze i **B)** dakriociti – eritrociti oblikovani poput suze (crne strelice) u razmazu periferne krvi što oboje pridonosi visokom stupnju anizocitoze koji se susreće u ovoj bolesti.

Trenutačni naziv bolesti (primarna mijelofibroza - PMF) nije jedini. Bolest je još poznata i kao kronična idiopatska mijelofibroza (CIMF prema eng. chronic idiopathic myelofibrosis), osteomijelofibroza (OMF prema eng. osteomyelofibrosis), mijeloskleroza (MS prema eng. myelosclerosis), agnogena mijeloidna metaplazija (AMM prema eng. agnogenic myeloid metaplasia) i mijelofibroza s mijeloidnom metaplazijom (MMM prema eng. myelofibrosis with myeloid metaplasia).

PMF je klasificirana kao Philadephia kromosom negativna (Ph-) MPN zajedno s PRV i ET (22) te s njima dijeli mnoge biološke i kliničke karakteristike. PMF tumorske matične stanice (među ostalim) imaju sklonost sazrijevanja u atipične megakariocite te u perifernoj krvi prilikom dijagnoze zna biti prisutna znatna trombocitemija. Stoga je u prefibrotskoj fazi bolest ponekad teško razlučiti od ET koja je također karakterizirana snažnom megakariocitnom proliferacijom (23). Za razliku od ostalih Ph- MPN, PMF pokazuje sklonost agresivnijem biološkom ponašanju/kliničkom tijeku bolesti i češću transformaciji u akutnu leukemiju (24,25). Dijagnostički kriteriji za PMF, PRV i ET prema klasifikaciji Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO prema eng. World health organization) (22) prikazani su Tablici 1.

Fibroza koštane srži u sklopu PMF odraz je snažne citokinske aktivnosti tumorskih stanica i strome (26). Fibroza je poliklonalni poremećaj i smatra se reaktivnom (sekundarnom) promjenom usprkos sugestivnom imenu osnovne bolesti. U perifernoj krvi i u koštanoj srži oboljelih prisutne su visoke razine citokina koje promoviraju upalu, fibrozu i neoagiogenezu kao npr. Transformirajući-čimbenik-rasta-beta-1 (TGF-β1 prema eng. Transforming-growth-factor-beta-1), Čimbenik-rasta-vaskularnih-endotelnih-stanica (VEGF prema eng. Vascular-endothelial-growth-factor), Čimbenik-rasta-fibroblasta (FGF prema eng. Fibroblast-growth-factor), Čimbenik-rasta-izveden-iz-trombocita (PDGF prema eng. Platelet-derived-growth-factor), Čimbenik-izveden-iz-stromalnih-stanica-1 (SDF1 prema eng. Stromal-cell-derived-factor-1), Interleukin-6 (IL6 prema eng. Interleukin-6), Interleukin-8 (IL8 prema eng. Interleukin-8), Čimbenik-matičnih-stanica (SCF prema Stem-cell-factor) i drugi (27-32).

Tipične patohistološke promjene koštane srži koje se susreću u „celularnoj“ fazi bolesti su hipercelularna koštana srž uz snažnu granulocitnu proliferaciju i atipične oblike megakariocita različitih veličina koji formiraju nakupine (Slika 5A). U razvijenoj, „kolagenoj“ fazi bolesti dolazi do odlaganja retikulinskih i kolagenih vlakana, razvoja hipocelularne koštane srži uz atipične megakariocitne oblike, formiranja zadebljanih, iregularnih koštanih gredica

(osteoskleroza) i proširenja vaskulanih prostora (dilatacije sinusoida) unutar koštane srži (Slika 5B). Težina fibroze koštane srži stupnjuje se prema trenutno važećem Europskom konsenzusu (33) koji je prikazan u Tablici 2. Stupanj fibroze koštane srži utječe na preživljenje bolesnika (34-36).

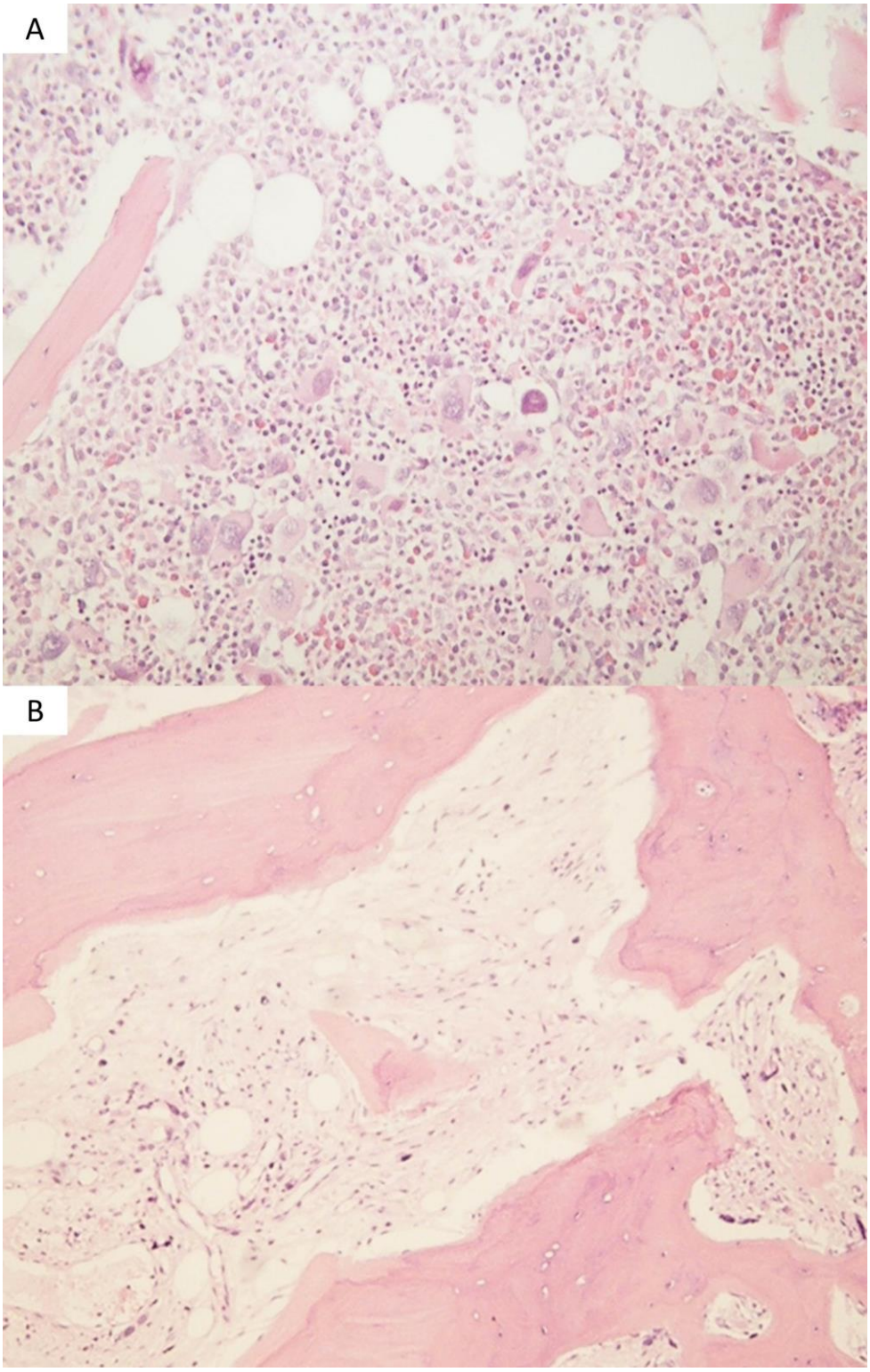
Tablica 1: Dijagnostički kriteriji za PMF, PRV i ET prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (22). Dijagnoza PMF zahtjeva da su ispunjena sva tri velika kriterija + barem dva mala kriterija. Dijagnoza PRV zahtjeva da su ispunjena ili dva velika kriterija + jedan mali kriterij ili prvi veliki kriterij + dva mala kriterija. Dijagnoza ET zahtjeva da su ispunjena sva četiri velika kriterija.

	PMF	**PRV**	**ET**
Veliki kriteriji	• Proliferacija atipičnih megakariocita * udružena s retikulinskom i/ili kolagenom fibrozom ili ** • Nisu ispunjeni WHO kriteriji za CML, PRV, MDS ili drugu mijeloidnu neoplazmu • Prisustvo *JAK2* V617F ili drugog markera klonalnosti ili odsustvo dokaza da je fibroza srži reaktivna	• Hemoglobin >185g/L (muškarci) ili 165 g/L (žene) ili *** • Prisustvo *JAK2* V617F ili *JAK2* egzon 12 mutacije	• Broj trombocita ≥450 x10^9/L • Proliferacija megakariocita s velikim i morfološki zrelim oblicima • Nisu ispunjeni WHO kriteriji za CML, PRV, PMF, MDS ili drugu mijeloidnu neoplazmu • Prisustvo *JAK2* V617F ili drugog markera klonalnosti ili odsustvo dokaza da je trombocitoza reaktivna
Mali kriteriji	• Leukoeritroblastoza • Povišen LDH • Anemija • Palpabilna splenomegalija	• Trilinijska proliferacija mijeloidnih stanica u koštanoj srži • Subnormalna razina eritropoetina • Rast endogenih eritroidnih kolonija	

* Atipije megakariocita: mali do veliki megakariociti s aberantnim jezgra/citoplazma omjerom, hiperkromatske i nepravilno oblikovane jezgre, guste nakupine megakariocita.

** U odsustvu retikulinske fibroze promjene megakariocita moraju biti udružene s porastom celularnosti koštane srži, proliferacijom granulocita i često smanjenom eritropoezom (tzv. prefibrotska PMF).

*** Hemoglobin ili hematokrit >99te centile referentnog raspona za dob, spol, visinu ili lokaciju na kojoj bolesnik živi. Ili masa eritrocita >25% iznad srednje predviđene. Ili Hemoglobin >170 g/L (muškarci) ili 150 g/L (žene) ako je isto udruženo s održanim porastom ≥20 g/L, a koji se ne može pripisati korekciji sideropenije.



Slika 5: A) „Celularna“ faza PMF odlikovana je hipercelularnom koštanom srži uz atipične forme megakariocita (bojenje hemalaun-eozin, povećanje x400). **B)** „Kolagena“ faza PMF odlikovana je hipocelularnom koštanom srži uz odlaganje retikulinskih i kolagenih vlakana, razvojem osteoskleroze i proširenjem vaskularnih prostora (bojenje hemalaun-eozin, povećanje x200).

Tablica 2: Trenutačno važeći Europski konsenzus o stupnjevanju fibroze koštane srži (37).

Stupanj 0	Linearna i raštrkana vlakna retikulina bez presijecanja što odgovara normalnoj koštanoj srži
Stupanj 1	Labava mreža retikulinskih vlakana s mnogo presijecanja, pogotovo u perivaskularnim područjima
Stupanj 2	Difuzna i gusta mreža retikulnskih vlakana s opsežnim presijecanjima uz povremene fokalne nakupine kolagena ili fokalnu osteosklerozu
Stupanj 3	Difuzna i gusta retikulnska mreža s opsežnim presijecanjima uz grube depozite kolagena i često udružena s znatnom osteosklerozom

PRV i ET mogu tijekom vremena razviti fibrozu koštane srži kada se takvo stanje naziva sekundarnom mijelofibrozom (SMF). SMF postupno gubi kliničke odlike primarne bolesti i razvija kliničke odlike karakteristične za PMF (anemijski sindrom, leukoeritroblastoza i dakriociti u perifernoj krvi, splenomegalija uz udružene komplikacije, pojava konstitucijskih simptoma) te se povećava rizik za transformaciju u akutnu leukemiju. Sukladno kliničkom toku dolazi do pojave karakterističnih patohistoloških promjena koštane srži: odlaganja retikulnskih i kolagenih vlakana, proširenja vaskulanih prostora te osteoskleroze koštanih gredica. Ipak, post PRV SMF pokazuje u prosjeku veću celularnost koštane srži, a morfologija megakariocita ostaje karakterističnija za osnovnu bolest (normalna/hiperlobulirana morfologija bez jako izraženih defekata u sazrijevanju megakariocita te rijetko formiranje gustih nakupina) u odnosu na PMF (38). Kriteriji Međunarodne radne grupe za istraživanje i liječenje mijeloproliferativnih neoplazmi (IWG-MRT prema eng. International working group for myeloproliferative neoplasms research and treatment) (39) prema kojima se postavlja dijagnoza SMF nastale iz PRV i ET prikazani su u Tablici 3. Ukoliko je prisutna klinička i patohistološka slika mijelofibroze, a ranije nije bila poznata dijagnoza MPN, nije uvijek moguće razlikovati da li je riječ o PMF ili SMF. Također kada se SMF razvija iz ET, moguće je da je incijalna dijagnoza bila pogrešno postavljena s obzirom na sličnost u prezentaciji prefibrotske faze PMF i ET.

PRV i ET se mogu prezentirati uz znatni stupanj fibroze koštane srži, ali da ne ispunjavaju kriterije za SMF. Reaktivna fibroza koštane srži se također može susresti u i sklopu drugih bolesti kao npr. u sklopu mijelodisplastičkog sindroma (12,40), hairy cell leukemije i drugih limfoidnih neoplazmi, metastatskih karcinoma, sistemskih autoimunih bolesti (41), infekcija i drugih kroničnih upalnih zbivanja i kroničnih toksičnih oštećenja koštane srži (22,42).

Tablica 3: IWG-MRT kriteriji za SMF nastale iz PRV i ET (39). Za dijagnozu SMF potrebna su 2 glavna kriterija i 2 dodatna kriterija u oba slučaja.

Kriteriji za post PRV SMF	**Kriteriji za post ET SMF**
Glavni kriteriji: • Dokumentirana ranija PRV • Fibroza koštane srži stupanj 2 ili 3	**Glavni kriteriji:** • Dokumentirana ranija ET • Fibroza koštane srži stupanj 2 ili 3
Dodatni kriteriji: • Razvoj anemije ili gubitak potrebe za venepunkcijama ako je bolesnik bez citoreduktivne terapije • Leukoeritroblastoza • Pojava palpabilne splenomegalije ili porast ranije palpabilne slezene ≥5 cm • Pojava jednog ili više konstitucijskih simptoma (gubitak na tjelesnoj težini >10% u šest mjeseci, noćna znojenja, neobjašnjeni (sup)febriliteti >37,5°C)	**Dodatni kriteriji:** • Razvoj anemije i pad u hemoglobinu od ≥20 g/L • Leukoeritroblastoza • Pojava palpabilne splenomegalije ili porast ranije palpabilne slezene ≥5 cm • Povišen LDH • Pojava jednog ili više konstitucijskih simptoma (gubitak na tjelesnoj težini >10% u šest mjeseci, noćna znojenja, neobjašnjeni (sup)febriliteti >37,5°C)

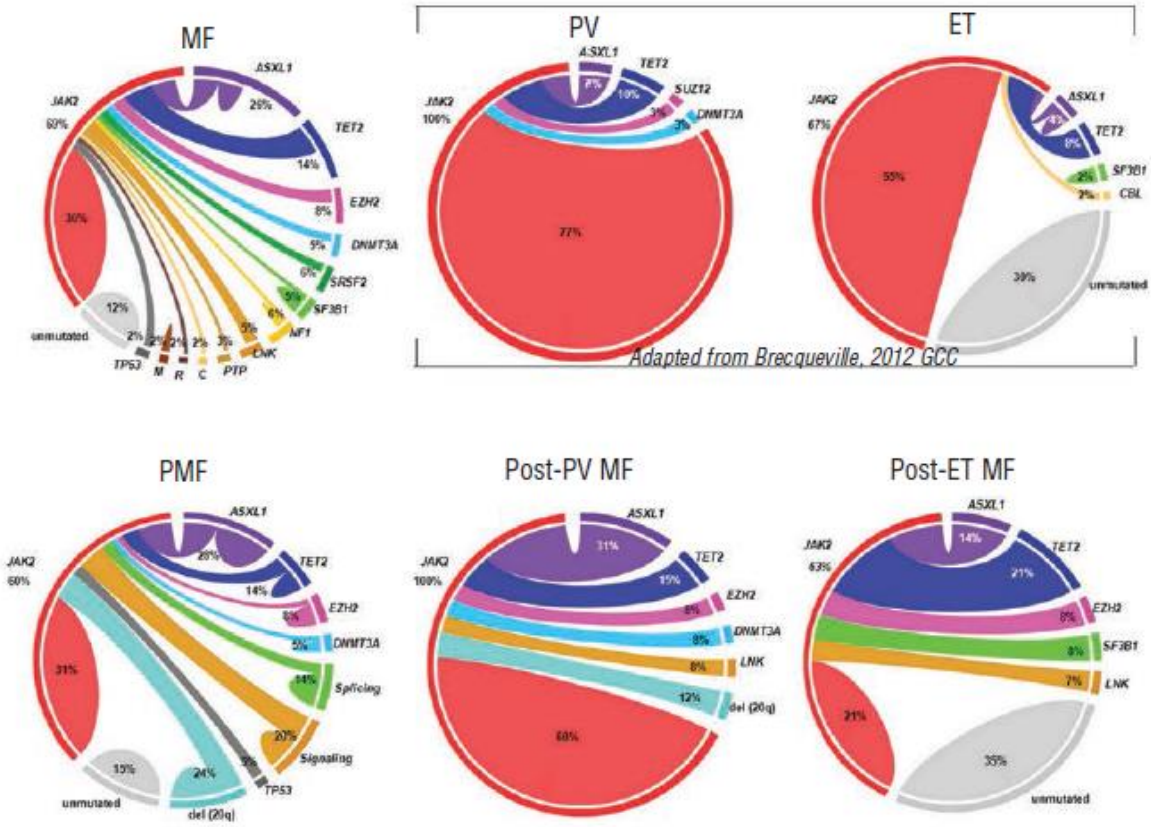
Primarni genetički poremećaj koji dovodi do pojave Ph- MPN još uvijek nije prepoznat. Mutacija V617F u egzonu 14 *JAK2* gena prisutna je u više od 95% bolesnika s PRV, u oko 50% bolesnika s ET i u više od 50% bolesnika s PMF, te je najčešći genetički poremećaj u ovim bolestima (10). *JAK2* V617F mutacija dovodi do konstitucijski aktivne JAK/Prijenosnik-signala-i-aktivator-transkripcije (STAT prema eng. Signal-transducer-and-activator-of-transcription) signalne osovine te Sarkom-štakora (Ras prema eng. Rat-sarcoma)/Mitogenom-aktivirana-protein-kinaza (MAPK prema eng. Mitogen-activated-protein-kinase) i Fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K prema eng. Phosphatidyl-inositol-3-kinase)/Ak-soj-transformirajući (AKT prema eng. Ak-strain-transforming) signalnih puteva što pridonosi snažnoj upalnoj atmosferi koja se susreće u ovim bolestima (10). I *JAK2* V617F mutirani i *JAK2* divlji tip bolesnici pokazuju klinički odgovor na specifičnu JAK inhibiciju (smanjenje slezene i poboljšanje konstitucijskih simptoma) (43) te je u obje grupe bolesnika povišena aktivnost JAK/STAT signalnog puta (44).

5-10% bolesnika s *JAK2* V617F negativnom PMF nosi mutaciju *Virus-mijeloproliferativne-leukemije* (*MPL* prema eng. *Myeloproliferative-leukemia-virus*) gena koji kodira trombopoetinski receptor (45), dok je nedavno otkriveno kako od preostalih „dvostruko

negativnih“ bolesnika 86% nosi mutaciju *Kalretikulin* (*CALR* prema eng. *Calreticulin*) gena (46). Drugim rječima, većina bolesnika s PMF (oko 90%) nosi neku od ove tri mutacije (47,48). U jednoj od kohorti bolesnika prijavljeno je kako je 58% imalo mutaciju u *JAK2*, 25% u *CALR* i 8,3% u *MPL* (47).

Mutacijski status se odražava na fenotip bolesti i na prognozu bolesnika. *JAK2* mutirani bolesnici pokazuju jači mijeloproliferativni potencijal uz više vrijednosti leukocita i hemoglobina (11,49,50). U većini objavljenih kohorti bolesnika mutirani *JAK2* nije ukazivao na lošiju prognozu (49,51,52), ali rezultati nisu jednoznačni (11). Među *JAK2* mutiranim bolesnicima, oni s višim opterećenjem mutiranim *JAK2* alelom (eng. allele burden) imaju bolju prognozu u odnosu na one s manjim opterećenjem mutiranim *JAK2* alelom (51-53). *MPL* mutirani bolesnici su stariji i češće imaju konstitucijske simptome (50), a imaju sličnu prognozu kao *JAK2* mutirani bolesnici (48,50). *CALR* mutirani bolesnici su mlađi i imaju veći broj trombocita (47,54,55), a imaju bolju prognozu u odnosu na ostale (47,48,53,55) (što je moguće vezano samo uz tip 1 mutacije (56,57)). Trostruko negativni bolesnici imaju lošu prognozu (47,48,54).

Molekularnom analizom bolesnika s PMF i SMF nastalom iz PRV i ET (58,59) nisu dokazane značajne razlike u poremećajima broja kopija gena (CNA prema eng. copy number aberrations), ali je sekvencioniranjem 23 gena važnih za leukemogenezu (komponente citokinskih signalnih puteva, epigenetički regulatori, transkripcijski čimbenici i molekule koje sudjeluju u splicingu ribonukleinskih kiselina (RNA prema eng. ribonucleic acid)) utvrđeno je kako se mutacijski spektar ovih bolesti i molekarni put do nastanka mijelofibroze razlikuju (Slika 6). Najčešća kromosomska abnormalnost u PMF je izolirana delecija dugog kraka kromosoma 20, dok su defekti kromosoma 1 česta pojava u post PRV SMF (38). U jednoj je manjoj studiji utvrđeno je kako post PRV SMF u odnosu na PMF nosi veći broj kariotipskih abnormalnosti i prisutan je veći postotak bolesnika s kompleksnim kariotipom i/ili dva i više malignih klonova (38). Navedeno sugerira da je mijelofibroza u post PRV SMF odraz progresije osnovne bolesti i akumulacije većih genetičkih abnormalnosti, a u PMF je intrinzična odlika bolesti ne nužno vezana uz nepovoljnu citogenetiku (38). U svakom slučaju, klinička prezentacija i tijek ovih bolesti su vrlo slični („u biti jednaki“ (60)).



Slika 6: Prikaz učestalosti i distribucije genetičkih mutacija (obod kruga) između PMF, PRV i ET u gornjem redu te PMF, post PRV SMF i post ET SMF u donjem redu. Preuzeto iz Brecqueville, 2014. (58).

Morbiditet i mortalitet bolesnika s PMF i SMF najčešće je uzrokovan progresijom osnovne bolesti (citopenije uslijed napredovanja mijelofibroze ili razvoja akutne leukemije), kardiovaskularnim bolestima (ubrzana ateroskleroza uslijed kronične citokinske stimulacije i drugih čimbenika), trombotskim i hemoragijskim komplikacijama (61-64). Medijan preživljenja iznosi 5 do 6 godina od postavljanja dijagnoze (64). Stratifikacija rizika smrti u trenutku postavljanja dijagnoze kod bolesnika s PMF postiže se pomoću Međunarodnog prognostičkog sustava bodovanja (IPSS prema eng. International prognostic scoring system) (64) koji u obzir uzima dob bolesnika, hemoglobin, leukocite, postotak cirkulirajućih blasta i prisustvo konstitucijskih simptoma. Stratifikacija rizika smrti može se učiniti i tijekom praćenja bolesnika pomoću Dinamičkog međunarodnog prognostičkog sustava bodovanja (DIPPS prema eng. Dynamic international prognostic scoring system) (65) koji evaluira iste parametre i boduje ih ako se jave tijekom praćenja bolesnika. Bolesnici s progresivnom bolesti (i akumulacijom novih čimbenika rizika tijekom praćenja) imaju znatno veći rizik smrti. Prognostički bodovni sustavi prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5: Prikaz dva najčešće korištena prognostička sustava bodovanja – IPSS (64) koji se koristi prilikom postavljanja dijagnoze i DIPPS (65) koji se koristi tijekom praćenja bolesnika.

	IPSS	**DIPSS**
Varijable i broj bodova koji im je pridružen	• Dob >65 godina = 1 bod • Hemoglobin <100 g/L = 1 bod • Leukociti >25 x10^9/L = 1 bod • Cirkulirajući blasti ≥1% = 1 bod • Konstitucijski simptomi = 1 bod	• Dob >65 godina = 1 bod • Hemoglobin <100 g/L = 2 boda • Leukociti >25 x10^9/L = 1 bod • Cirkulirajući blasti ≥1% = 1 bod • Konstitucijski simptomi = 1 bod
Kategorije rizika prema broju bodova i očekivani medijan preživljenja	• 0 bodova = niski rizik, medijan 11,3 godine • 1 bod = srednji-1 rizik, medijan 7,9 godina • 2 boda = srednji-2 rizik, medijan 4 godine • ≥3 boda = visoki rizik, medijan 2,3 godine	• 0 bodova = niski rizik, medijan nije postignut • 1-2 boda = srednji-1 rizik, medijan 14,2 godine • 3-4 boda = srednji-2 rizik, medijan 4 godine • 5-6 bodova = visoki rizik, medijan 1,5 godina

Dostupne terapijske opcije u PMF i SMF su ograničene i uglavnom nemaju kurativni potencijal (s iznimkom alogenične transplantacije koštane srži (AlloSCT prema eng. allogeneic stem cell transplantation) koja je pogodna samo za određenu grupu bolesnika).

Terapija je stoga adaptirana prema riziku procijenjenom pomoću IPSS ili DIPSS skora.

- U bolesnika u kojih je bolest niskog ili srednjeg-1 rizika i nemaju izražene tegobe najčešće nikakva specifična terapija nije potrebna.
- U bolesnika niskog i srednjeg-1 rizika koji imaju izražene subjektivne tegobe (uslijed splenomegalije, svrbeža, umora, bolova u kostima ili izraženih konstitucijskih simptoma) ili je potrebna kontrola prekomjerne produkcije krvnih stanica/anemije indicirana je konvencionalna terapija (hidroksiurea, eritropoetin ukoliko nije palpabilna slezena, androgeni, danazol, kortikosteroidi, talidomid).
- Bolesnici srednjeg-2 i visokog rizika koji su mlađi od 65 godina i nemaju limitirajuće komorbiditete kandidati su za AlloSCT (Slika 7). U bolesnika srednjeg-2 i visokog rizika palijacija izraženih tegoba odnosno kontrola anemije/prekomjerne produkcije krvnih stanica postiže se konvencionalnom terapijom kako je navedeno ranije. Kao

opcije još su dostupne splenektomija i radioterapija (cilj su lokusi ektramedularne hematopoeze, pluća u slučaju plućne hipertenzije te bolni ektremiteti). JAK inhibitori potencijalno mogu produljiti preživljenje bolesnika (66), ali ne mogu postići remisiju bolesti i povlačenje mijelofibroze. Trenutno se koriste kao „bridging“ do transplantacije ako su bolesnici pogodni za ovu proceduru.

A

Indications for HSCT:
- Intermediate-2 or high DIPSS risk disease
- Consider in patients with lower risk disease who have high risk mutations or heavy transfusion requirements

Conditioning intensity:
- Younger, fit patients should be considered for MAC HSCT to optimize relapse and graft failure rates
- Targeted Bu/Cy regimens may be superior to TBI based MAC regimens, but the role of high dose Bu/Flu regimens is unclear.
- If using RIC, more intense regimens such as Flu/Mel may provide an advantage over lower intensity Bu/Flu RIC or NMA regimens

Pre-transplant therapy:
- JAK2 inhibitors are indicated for symptom control and splenomegaly
- If using JAK2 inhibitors prior to HSCT, caution in withdrawing therapy should be taken (taper prior to conditioning or early after HSCT) to avoid inflammatory reaction or tumor lysis syndrome
- Splenectomy or splenic radiation can improve hematopoietic recovery and should be considered on an individual basis

Donor selection:
- Unrelated donors lead to outcomes that are less optimal than matched related donors and should be reserved for higher risk patients
- Data regarding haploidentical and umbilical cord blood HSCT is sparse, not recommended outside the context of clinical trial

Graft source:
- Peripheral blood is preferred over bone marrow (especially in RIC) to facilitate engraftment and avert prolonged cytopenias after HSCT.
- A higher CD34 count $>5.7 \times 10^6$ CD34/kg in the peripheral blood stem cell product has been associated with faster engraftment. [28]

B

Table 2. Allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis

Author	N	*Median age (years)*	*1-year TRM, %*	*5-year overall survival, %*	*5-year progression free-survival, %*
Ballen *et al.*[15]	289	47	27 (sibling), 43 (unrelated)	37 (sibling), 30 (unrelated)	33 (sibling), 27 (unrelated)
Patriarca *et al.*[16]	100	49	35	31	28
Robin *et al.*[17]	147	53	29 (4 years)	39 (4 years)	32 (4 years)
Kerbauy *et al.*[22]	104	47	27	61 (7 years)	-
Deeg *et al.*[21]	56	43	35	58	-

Abbreviation: TRM, transplant-related mortality.

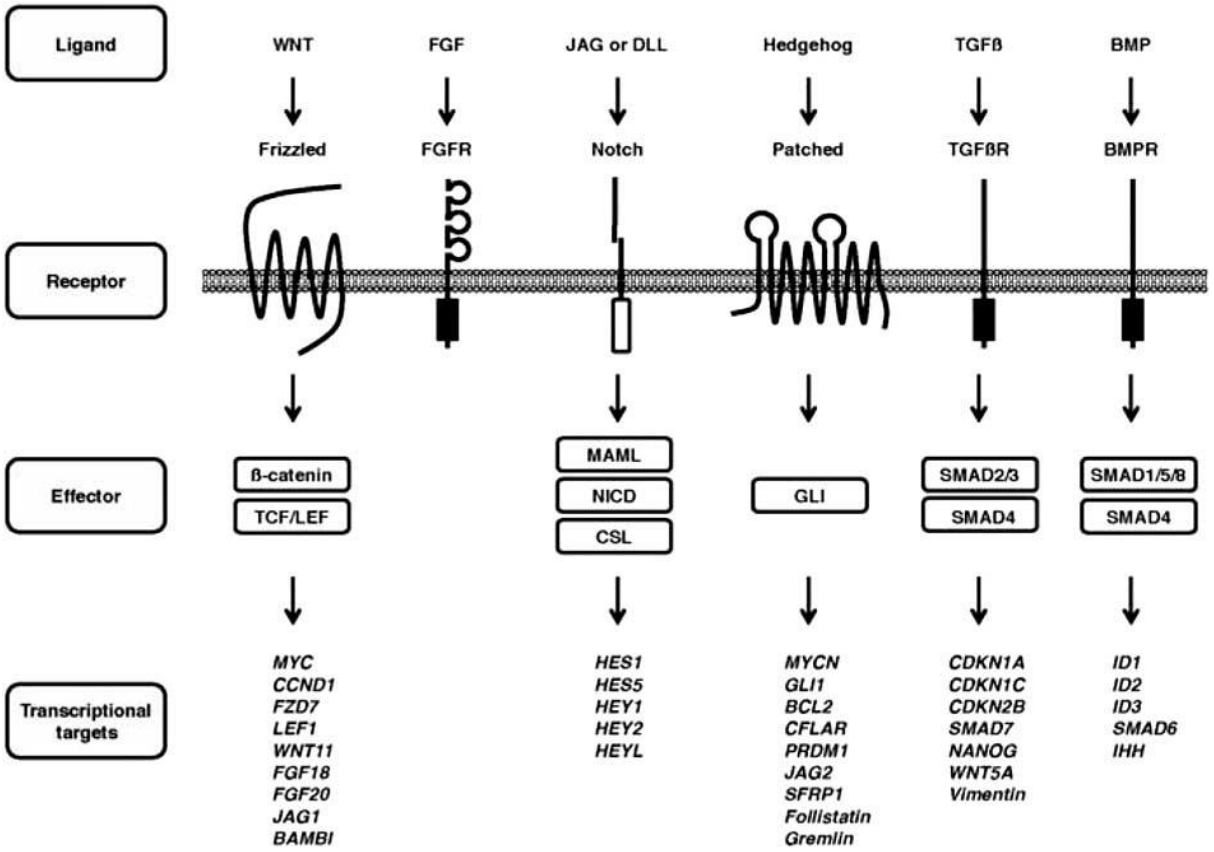
Slika 7: A) Sažetak indikacija i odabira modaliteta za AlloSCT u mijelofibrozi, preuzeto iz Kekre, 2016. (67). **B)** Ishodi bolesnika s mijelofibrozom nakon AlloSCT, preuzeto iz Ballen, 2012. (68), citirane su prethodno objavljene kohorte bolesnika (69-73).

1.3. Mreža unutarstaničnih signalnih puteva

Proces samoobnavljanja HSC strogo je reguliran evolucijski očuvanom mrežom unutarstaničnih signalnih puteva. Impulsi preneseni putem ove mreže odlučuju o sudbini stanice, npr. hoće li se stanica dijeliti, mirovati ili ići u apopotozu, hoće li nakon diobe sazrijevati ili i dalje ostati matična. Budući da je stroga regulacija staničnog ciklusa temeljna funkcija ovog sustava, njegovi poremećaji mogu dovesti do fetalnih malformacija i maligne preobrazbe.

Prepoznato je nekoliko glavnih signalnih molekula i njihovih puteva koji čine temeljni okvir mreže (74). To su **Mjesto-integracije-koje-se-odnosi-na-Wingless (WNT prema eng. Wingless-related-integration-site), Hedgehog, FGF, Notch i TGF-β/Koštani-morfognetski-protein (BMP prema eng. Bone-morphogenetic-protein)** signalni putevi (Slika 8).

Njihovi unutarstanični efektori imaju ulogu transkripcijskih čimbenika koji osim regulacije staničnog ciklusa reguliraju i proizvodnju elemenata ostalih signalnih puteva te indirektno utječu na njihovu razinu i aktivnost. Djelovanjem jednog, pokreću se brojni procesi pozitivne i negativne povratne sprege na drugim signalnim putevima. Neto učinak stimulacije stanice ovisi o tipu aktivirane molekule, tipu receptora, istovremenoj kostimulaciji stanice i unutarstaničnoj modulaciji prenešenog signala. Stimulacija iste hematopoetske matične stanice istom molekulom može imati potpuno različite učinke ovisno o tome gdje se stanica fizički nalazi, u kakav je mikrookoliš uronjena i koliko su drugi djelovi mreže signalnih puteva trenutno aktivni (17).



Slika 8: Šest glavnih signalnih puteva nazvano prema svojim glavnim ligandima /receptorima čine temeljni okvir mreže molekula koje upravljaju sudbinom stanica u našem tijelu. Preuzeto iz Katoh, 2011. (74).

Wnt i Hedgehog signalni putevi sastavni su (nerazdvojni) dio opisane mreže i dirigiraju razvojem fetalnih tkiva i postizanjem simetrije tijela, te su visoko očuvani tijekom evolucije kralježnjaka. Sukladno tome, njihovo usklađeno djelovanje je bitno za očuvanje homeostaze embrionalnih i odraslih tkiva (75). Glavni ligandi WNT i Hegehog signalnih puteva su različite molekule iz WNT i Hedgehog obitelji, a preneseni unutarstanični signal potaknut vezanjem liganda za receptor (i konačni učinak na ciljne stanice) među ostalim ovisi i o mikrookolišu u kojem molekule djeluju (prisutnost inhibitora ili ko-čimbenika) (74,76,77).

1.4. WNT signalni put

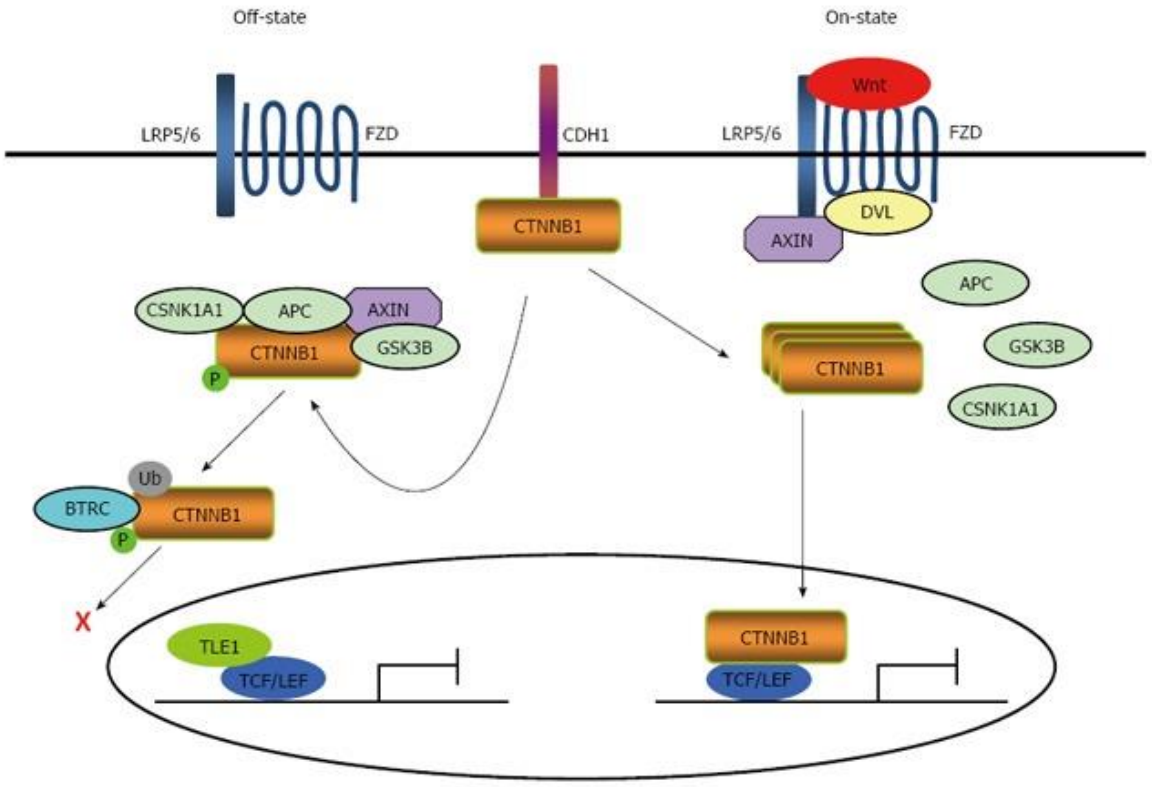
WNT signalni put (78) se sastoji od dva glavna kraka: klasičnog ili kanonskog koji ovisi o β-kateninu kao transkripcijskom čimbeniku i ne-kanonskog koji ne ovisi o β-kateninu. Aktivacija kanonskog WNT signalnog puta vezana je uz malignu transfomaciju, akumualciju koštane mase, poticanje fibroze, neoangiogeneze, kao i gubitak međustanične adhezije i metastaziranje tumora (79-83). Ne-kanonski WNT put sudjeluje u regulaciji polarnosti stanica i unutarstaničnog kalcija te je neophodan prilikom embrionalnog razvoja. Njegovi su učinci najčešće susprotstavljeni djelovanju kanonskog WNT signalnog puta (84).

Pregled kanonskog WNT signalnog puta prikazan je na Slici 9. Vezanje kanonskih WNT liganada (WNT1, WNT3a, WNT8) za receptor Frizzled potiče formiranje membranskog kompleksa s Proteinom-srodnim-s-receptorom-za-lipoprotein-niske-gustoće-5/6 (LRP5/6 prema eng. Low-density-lipoprotein-receptor-related-protein-5/6) koji zatim veže unutarstanične proteine Dishevelled i Aksin za staničnu membranu. Time se raspada unutarstanični proteinski kompleks koji se sastoji od Aksina, Adenomatozne-polipoze-kolona (APC prema eng. Adenomatous-polyposis-coli), Glikogen-sintaza-kinaze-3 (GSK3 prema eng. Glycogen-synthase-kinase-3) i Kazein-kinaze-1 (CK1 prema eng. Casein-kinase-1). Ovaj proteinski kompleks u uvjetima bez kanonske WNT stimulacije drži zarobljenim β-katenin što dovodi do njegove fosforilacije, ubikvitinacije i razgradnje. Prilikom kanonske WNT stimulacije dolazi do oslobađanja β-katenina koji se suudružuje s T-staničnim-čimbenikom (TCF prema eng. T-cell-factor)/Čimbenikom-koji-se-veže-za-limfoidni-pojačivač (LEF prema eng. Lymphoid-enhancer-binding-factor) i ulazi u staničnu jezgru gdje inducira transkripcijsku aktivaciju ciljnih gena. β-katenin može inducirati ekspresiju gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa (*Stanični-onkogen-mijelocitomatoze* (*c-MYC* prema eng. *cellular-Myelocytomatosis-oncogene*) (85,86), *Ciklin-D1*), procese fibroze (*Kolagen1, TGF-β, Endotelin1, Čimbenik-rasta-vezivnog-tkiva* (*CCN2/CTGF* prema eng. *Connective-tissue-growth-factor*) (87,88) i neoangiogeneze (*IL8, VEGF*) (89,90).

Osim kao transkripcijski čimbenik, β-katenin ima ulogu i u formiranju međustaničnih spojeva jer stupa u proteinski kompleks s E-kadherinom i omogućava njegovu stabilitzaciju na membrani stanica. Prilikom aktivacije i translokacije β-katenina u jezgru dolazi do slabljenja međustaničnih veza. β-katenin također promovira transkripciju proteina koji inhibiraju

transkripciju E-cadherina i pridonose njegovoj razgradnji (81) čime promovira metastaziranje tumora. Aktivacija kanonskog WNT puta promovira diferencijaciju osteoblasta i inducira proizvodnju Osteoprotegerina čime favorizira akumulaciju koštane mase (91). Njegova uloga je također prepoznata u više fibrotskih poremećaja (82) kao npr. u idiopatskoj plućnoj fibrozi, cirozi jetre, sistemskoj sklerozi i fibroznim poremećajima bubrega.

WNT1 gen i uloga kanonskog WNT signalnog puta u onkogenezi otkriveni su na mišjem modelu karcinoma dojke (92). Kasnije je njegova uloga prepoznata u cijelom nizu malignih bolesti. Pojačana ekspresija elemenata kanonskog WNT signalnog puta povezana je s lošijom prognozom (93) i sklonosti metastaziranju u karcinomu dojke (94). Aktiviran je u različitih tipova gastrointestinalnih tumora (kolorektalni karcinom, kolangiokarcinom, karcinom gušterače, hepatocelularni karcinom) (83,95,96). Kanonski WNT signalni put aktiviran je u pojedinim tipovima hematoloških neoplazmi (kroničnoj limfocitnoj leukemiji (CLL prema eng chronic lymphocytic leukemia), CML, AML, multiplom mijelomu (MM prema eng. multiple myeloma), ali ne i u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (ALL prema eng. acute lymphoblastic leukemia)), te je nužan za preživljenje tumorske matične stanice (83)

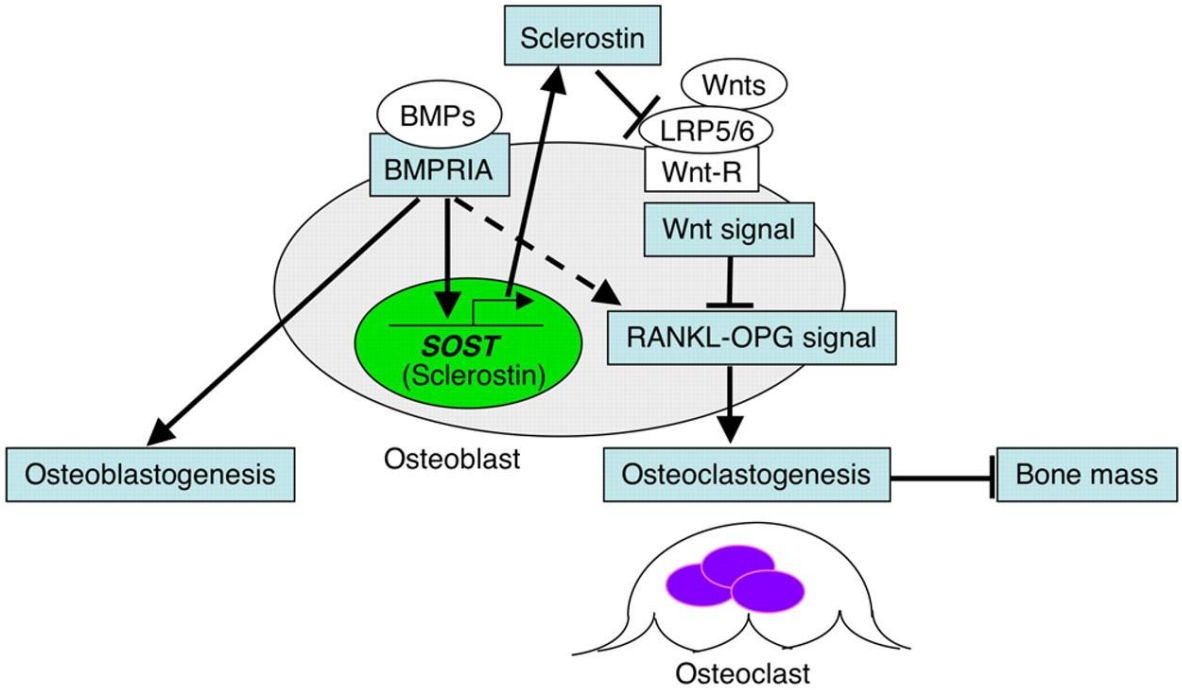


Slika 9: Shematski prikaz kanonskog WNT signalnog puta. Preuzeto iz Liu, 2016. (96).

Uloga kanonskog Wnt signalnog puta u PMF nije u potpunosti definirana, ali dosadašnje spoznaje ukazuju da je ovaj put aktiviran u oboljelih od PMF. SMF nije istraživana. U prvom od tri rada koji su evaluirali kanonski WNT put u PMF nije uočena razlika u *β-katenin* mRNA ekspresiji između PMF, PRV i ET, kao niti između PMF i kontrolnih ispitanika (97). U drugom je radu imunohistokemijski pokazano da je u megakariocitima oboljelih od PMF prisutna niža ekspresija β-katenina u odnosu na PRV i ET (98). Isto je imunohistokemijski potvrđeno u trećem radu gdje je još pokazano i da bolesnici s PMF imaju veću ekspresiju β-katenina u vaskularnim endotelnim stanicama u odnosu na PRV, ET i kontrole (99).

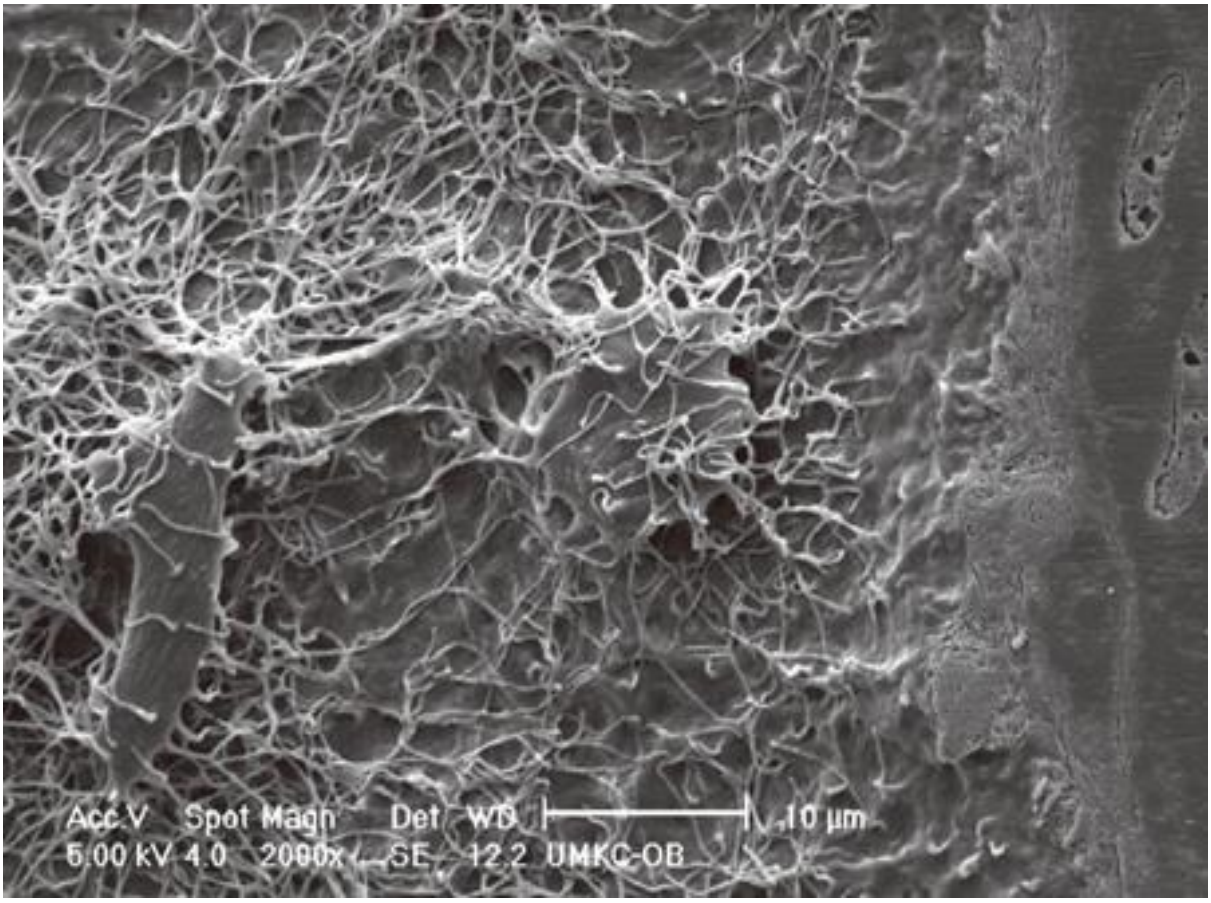
1.5. Sklerostin

Sklerostin je inhibitor kanonskog Wnt signalnog puta. Gotovo u potpunosti se proizvodi (u fiziološkim uvjetima) u zrelim osteocitima ukopanim unutar koštanog matriksa i služi kao evolucijski očuvani negativni regulator koštane mase (100,101). Protein je proizvod *SOST* gena. Nakon što je stvoren i izlučen iz osteocita, veže se na LRP5/LRP6 receptore na osteoblastima putem kojih inhibitorno djeluje na kanonski WNT signalni put i suprimira njegovu aktivnost (102) (Slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz SOST signalnog puta i njegovi učinci na metabolizam kosti. Preuzeto iz Kamiya, 2008. (103).

Osteociti su najbrojnije stanice unutar koštanog matriksa i svojim izdancima (kanalikulima) komuniciraju međusobno, ali i s površinom kosti gdje se vrši aktivni proces izgradnje nove kosti (Slika 11). Zanimljivo je kako su novoukopani osteociti negativni na bojanje na Sklerostin, a počinju ga izražavati tek kad nastupi primarna mineralizacija okolnog tkiva (104) što sugerira kako je Sklerostin signal osteoblastima na površini kako novonastale kosti ima dovoljno. Osim u osteocitima, Sklerostin se može proizvoditi i u osteoklastima i hondrocitima zglobova (105,106).



Slika 11: Osteocit pomoću svoje vrlo razgranate mreže izdanaka (kanalikula) ukalupljenih u koštani matriks komunicira s površinom kosti. Preuzeto iz Bonewald, 2010. (107).

Urođeni nedostatak/gubitak funkcije Sklerostina u ljudi dovodi do razvoja tri slična klinička entiteta koji se manifestiraju povećanom koštanom masom, različitog su intenziteta kliničke slike i uglavnom ne dolazi do zahvaćanja drugih organskih sustava. **Sklerosteoza** je autosomno recesivna bolest uzrokovana mutacijama s gubitkom funkcije u *SOST* genu i posljedičnim potpunim nedostatkom Sklerostina (108). Oboljeli se često rađaju sa sindaktilijom, a tijekom djetinjstva i mladenačkog razdoblja razviju gluhoću, leziju facijalnog živca ili znakove povišenog intrakranijalnog tlaka (Slika 12). **Van Buchemova bolest** je posljedica mutacija u regulatornom elementu *SOST* gena koji je odgovoran za njegovu postnatalnu ekspresiju. U serumu su obično prisutne niske, ali detektabilne razine Sklerostina (109) (pitanje „leaky" transkripcije ili proizvodnje u drugim stanicama gdje bi transkripcija bila regulirana drugim regulatornim elementima), a klinička slika je blaža nego u sklerosteozi. **Worthova bolest** posljedica je mutacije LRP5 s pojačanom aktivnošću receptora i sličnom no nešto blažom kliničkom slikom kao u prethodne dvije bolesti (110,111).

Gubitkom funkcije LRP5 gena (i time ihibicijom kanonskog Wnt signalinga) razvija se **Osteoporoza-pseudogliom** koji se u oboljih manifestira ranim razvojem osteoporoze i sljepoće zbog poremećene vaskularizacije oka. Ovo je stanje analogno prejakoj stimulaciji Sklerostinom, iako je regulacija istog u oboljelih neoštećena (112).



Slika 12: Kronološki portreti bolesnice sa sklerosteozom. Bolesnica je rođena sa sindaktilijom, a tijekom djetinjstva je postupno razvila gluhoću, leziju facijalnog živca, dismorfiju lica, a kasnije i povišeni intrakranijalni tlak od čega je i preminula u dobi od 54 godine. Preuzeto iz Moester, 2010. (113).

Budući da ovaj citokin ima centralnu ulogu u negativnoj regulaciji koštanog metabolizma kroz suprimiranje kanonskog WNT signalnog puta, njegova se inhibicija pokazala uspješnim terapijskim pristupom u oboljelih od osteoporoze (114). Zanimljivo je ipak kako su povišene vrijednosti Sklerostina prema nekim radovima vezane uz povišen rizik fraktura (115), ali isto nije potvrđeno u drugim istraživanjima (116). Također je na neki način iznenađujuće kako su povišene vrijednosti Sklerostina vezane uz veću mineralnu gustoću kostiju u nizu studija na različitim populacijama ispitanika (116-119), te su čak niže u bolesnica s osteporozom u

odnosu na one bez osteoporoze (120). Moguće je da su stoga povišene vrijednosti Sklerostina dijelom i odraz povećanog broja osteocita/veće koštane mase.

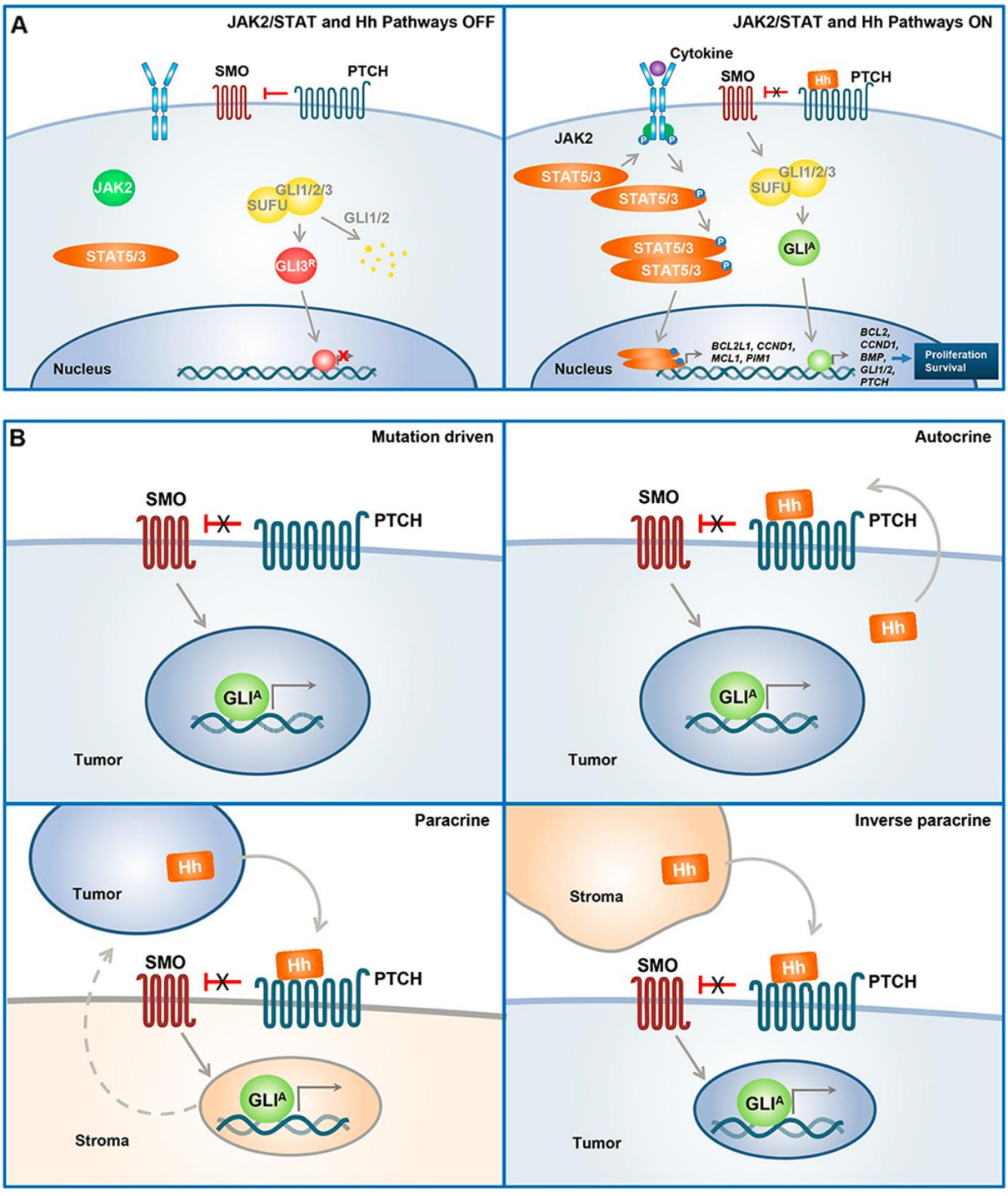
Pokazano je da stanice multiplog mijeloma mogu ektopično proizvoditi Sklerostin i negativno utjecati na izgradnju kosti (121-123), vrijednosti Sklerostina koreliraju s uznapredovalim stadijem mijeloma, a povišene vrijednosti povezane su s kraćim preživljenjem oboljelih (122,124). Uloga Sklerostina u mijeloproliferativnim bolestima nije detaljno istraživana, a pokazano je tek da mezenhimalne matične stanice izolirane iz bolesnika s PMF pokazuju transkripcijsku aktivaciju gena uključenih u metabolizam kosti (uključujući *SOST*) što je shvaćeno u sklopu TGF-β stimulacije (26).

1.6. Sonic Hedgehog signalni put

Sonic Hedgehog (SHH) jedan je od tri homologna liganda Hedgehog signalnog puta (Sonic, Desert i Indian Hedgehog) i najbolje je proučen u odnosu na ostale Hedgehog ligande. S obzirom na centralnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja i u homeostazi HSC, poremećaji SHH signalnog puta povezani su s razvojnim anomalijama, malignom preobrazbom stanica, poticanjem fibroze i neoangiogeneze. Prepoznati su kanonski SHH signalni put koji je ovisan o Onkogen-povezan-s-gliblastomom (GLI prema eng. Glioblastoma associated oncogene) transkripcijskom čimbeniku i ne-kanonski SHH signalni put koji je neovisan o GLI transkripcijskom čimbeniku (125).

Pregled kanonskog SHH signalnog puta prikazan je na Slici 13A. Bez SHH stimulacije, GLI proteini se nalaze u citoplazmatskom kompleksu s inhibitornom molekulom Supresorom-Fused-proteina (SUFU prema eng. Supressor-of-Fused), nespecifično su fosforilirani djelovanjem CK1, GSK3 i Protein-kinaze-A (PKA prema eng. Protein-kinase-A) te potom ubikvitinirani i razgrađeni (125,126). Kanonski SHH signalni put aktivira se vezanjem SHH liganda na receptor Patched. To dovodi do internalizacije receptora i prestanka inhibicije proteina Smoothened koja postoji bez SHH stimulacije. Oslobođeni Smoothend protein akumulira se u području primarnih cilija na membrani stanica i još ne potpuno razjašnjenom serijom molekularnih interakcija oslobađa i aktivira obitelj GLI proteina koji se akumuliraju u staničnoj jezgri i dovode do transkripcije ciljnih gena (GLI1 ima ulogu aktivotora, GLI3 represora transkripcije, a GLI2 pokazuje oba svojstva). GLI1 je glavni transkripcijski efektor kanonskog SHH signalnog puta. SHH ciljni geni potiču proliferaciju stanica (*MYC*, *CCND1*), preživljavanje stanica kočenjem apoptoze (*BCL2*) te promoviraju fibrozu (*TGF-β*) i neoangiogenezu (*VEGF*) (127). Prepoznata je sposobnost malignih stanica da autokrino i parakrino aktiviraju SHH signalnu kaskadu proizvodnjom SHH liganda čime održavaju za tumor stimulativni mikrookoliš (126) (Slika 13B).

SHH signaling ima centralnu ulogu u metabolizmu kosti. SHH inhibitorno djeluje na diferenciranje mezenhimalnih matičnih stanica u osteoblaste (128), a njegova pojačana aktivnost promovira proizvodnju Ligand-receptora-koji-aktivira-jezgreni-čimbenik-kappa-B (RANKL prema eng. Receptor-activator-of-nuclear-factor-kappa-B-ligand) čime indirektno inducira sazrijevanje osteoklasta s neto učinkom gubitka koštane mase (129).



Slika 13: A) Shematski prikaz SHH signalnog puta i JAK signalnog puta u zdravim stanicama. **B)** Prikaz mogućih načina njegove aktivacije u mijeloproliferativnim bolestima. Preuzeto iz Tibes, 2014. (130).

Uloga aktiviranog SHH signalnog puta prepoznata je u nizu fibrotskih poremećaja (131) kao npr. u cirozi jetre, fibroznim poremećajima bubrega i idiopatskoj plućnoj fibrozi.

Hedgehog signaling je aktiviran i u nizu malignih bolesti (125) kao npr. u karcinomu gušterače, karcinomu pluća, bazocelularnom karcinomu, mijeloidnim i limfatičkim hematopoetskim tumorima i važan je za opstanak tumorskih matičnih stanica. Npr, pojačana aktivnost SHH signalnog puta prisutna je u CML tumorskim matičnim stanicama u usporedbi sa zrelijim oblicima tumorskih stanica, a tijekom progresije bolesti prema nezrelijim oblicima stanica nalazi se sve snažnija aktivnost ovog signalnog puta (132-136). Aktivacija SHH u AML vezana je uz rezistenciju na kemoterapiju i lošu prognozu bolesti (137,138).

Spoznaje o SHH signalnom putu u PMF su oskudne. U temeljnom radu (koji je objavljen samo kao sažetak na kongresu) opisan je klinički učinak Sonidegiba (Smoothend inhibitora) u kombinaciji s JAK inhibitorom u mišjem modelu bolesti (139). U istom je sažetku opisana 20-100 puta veća ekspresija SHH ciljnih gena uključujući GLI1 i Patched1 u ljudi oboljelih od MPN u odnosu na zdrave kontrole. Unatoč oskudnim predkliničkim iskustvima, više spojeva koji inhibiraju ovaj put uključeno je u rane faze kliničkih istraživanja u oboljelih od mijelofibroze (130) (za sada s različitom učinkovitošću (140,141)).

2. HIPOTEZA

Budući da dosadašnje spoznaje ukazuju na moguću ulogu WNT i SHH signalnih putova u patogenezi PMF (povezanost sa staničnom proliferacijom, malignom preobrazbom, metabolizmom kosti, neoangiogenezom i poticanjem fibroze), naša je **hipoteza** kako u tumorskom tkivu PMF i SMF postoji narušena ravnoteža izraženosti gena i proteina WNT i SHH signalnih puteva u usporedbi s kontrolnom skupinom.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj istraživanja je ispitati promjene WNT i SHH signalnih puteva na uzorcima koštane srži bolesnika oboljelih od PMF i SMF i pojasniti njihovu ulogu u patogenezi ovih bolesti.

3.2. Specifični ciljevi

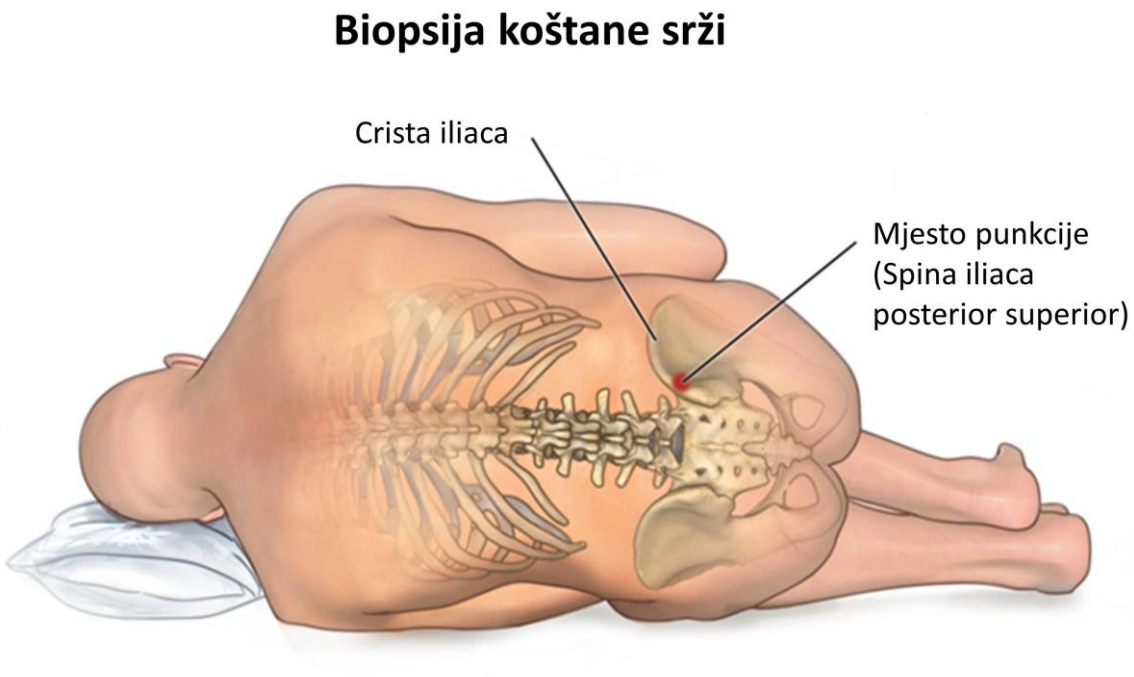
- Analizom izraženosti gena *WNT3a*, *β-katenin*, *SHH*, *GLI1* i *SOST* u uzorcima PMF i SMF dopuniti genetički profil ovih bolesti.
- Imunohistokemijski analizirati proteinske produkte WNT3a, β-katenin, SHH, GLI1 i Sklerostin u tumorskom tkivu ovih bolesti.
- Usporedbom rezultata dobivenih genetičkim i imunohistokemijskim analizama, te kliničkih pokazatelja, prikazati međuodnos ova dva signalna puta i njihovu moguću ulogu u patogenezi PMF i SMF.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici i materijal

U ovo su istraživanje uključeni bolesnici oboljeli od PMF i SMF i kontrolni ispitanici s limitiranim stadijem agresivnog Non Hodgkinovog limfoma (NHL prema eng. Non Hodgkin lymphoma) bez zahvaćanja koštane srži koji su u razdoblju od studenog 2006. do listopada 2016. bili evaluirani uz uzorkovanje koštane srži u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb. Svi ispitanici su ispunili odgovarajući informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava.

Materijal korišten za analize je tkivo koštane srži oboljelih od PMF i SMF, odnosno kontrolnih ispitanika. Materijal je dobiven biopsijom kosti/aspiracijom koštane srži u području spine ilijake posterior superior prilikom rutinske obrade osnovne bolesti (Slika 14).



Slika 14: Lokacija odabira za uzorkovanje koštane srži (spina ilijaka superior posterior) i položaj bolesnika prilikom uzorkovanja koštane srži. Preuzeto i adaptirano prema www.pinnaclehealth.com (142).

Bioptat kosti je nakon zahvata fiksiran u formalinu, potom dekalciniran i uklopljen u parafin te su učinjena standardna bojenja. Dijagnoza bolesti postavljena je prema WHO (22), odnosno IWG-MRT kriterijima (39). Stupanj fibroze koštane srži procijenjen je prema Europskom konsenzusu (37).

Aspirat koštane srži je nakon uzorkavanja centrifugiran na fikolu (Histopaque, Sigma, St Louis, MO; density 1.077 g/mL) čime je izdvojen sloj mononukleranih stanica. Mononuklearne stanice koštane srži su do postupka izolacije nukleinskih kiselina pohranjene u tekućem dušiku uz dimetilsulfoksid (DMSO prema eng. dymethilsulfoxide).

4.2. Metode

4.2.1. Klinički parametri i laboratorijski testovi

Bolesnici su prilikom evaluacije pregledani na standardni način uz uzimanje anamneze i fizikalni pregled. Veličina jetre i slezene procijenjene su palpacijom. Bolesnici su nadalje redovito praćeni u vremenskim razmacima ovisnim o agresivnosti/dinamici bolesti. Podaci sa zadnje dostupne kontrole odnosno informacija o datumu smrti korišteni su radi procjene preživljenja (dužina praćenja i status 1=preminuo, 0=živ/izgubljen iz praćenja).

Prilikom inicijalne evaluacije kad je uzorkovana koštana srž zabilježeni su osnovni demografski podaci (dob i spol), osnovne karakteristike bolesti (prisutnost B simptoma, ovisnost o transfuziji, veličina jetre i slezene, *JAK2* V617F mutacijski status, stupanj fibroze koštane srži, prisutnost leukemijske transformacije bolesti, IPSS i DIPSS skor/kategorija rizika) i sljedeći laboratorijski parametri: hemoglobin, MCV, RDW, broj leukocita, postotak cirkulirajućih blasta, broj trombocita, LDH, CRP, serumsko željezo, ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC prema eng. total iron binding capacity), saturacija transferina, feritin.

4.2.2. Izolacija RNA i RT-PCR

Iz pohranjenih mononuklearnih stanica učinjena je izolacija ukupne RNA koristeći guanidinij izotiocijanat-fenol (TRI Reagent®, SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany), kloroform te precipitaciju vodene faze homogenata stanica izopropanolom i centrifugiranjem te taloženjem RNA etanolom. Osušeni talog RNA otopljen je u 20 ul sterilne vode. Dalje se uzima 1 ug RNA za postupak reverzne transkripcije u komplementarnu deoksiribonukleinsku kiselinu (cDNA prema eng. complementary deoxyribonucleic acid) (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, MA). Uzorci ispitanika su umnoženi u lančanoj reakciji polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR) u uređaju ABI Prism 7300 Sequence Detection system (Thermo Fisher SCIENTIFIC) koristeći sljedeće eseje za ispitivane gene:

- WNT3a: WNT3a Hs00263977_m1 Thermo Fischer Scientific
- β-katenin: CTNNB1 Hs00355049_m1 Thermo Fischer Scientific
- SOST: SOST Hs00228830_m1 Thermo Fischer Scientific
- SHH: SHH Hs03454385_m1 Thermo Fischer Scientific
- GLI1: GLI1 Hs01110766_m1 Thermo Fischer Scientific

RT-PCR je učinjen u duplikatu za svaki uzorak. Relativna ekspresija je izračunata i prikazana kao razlika u ciklusima praga detekcije (ΔCT prema eng. difference in threshold cycles) između ciljnog gena i referentnog gena ABL ($CT_{CILJNI\ GEN} - CT_{ABL}$). Niža vrijednost ukazuje na višu ekspresiju ciljnog gena (niža ΔCT vrijednost za ciljni gen sugerira da je prisutna veća početna količina RNA ciljnog gena te njenim umnažanjem ranije dolazi do oslobađanja kritične količine fluorofora kojeg detektira uređaj).

4.2.3. Imunohistokemijska analiza

Nakon deparafiniranja i rehidracije uzoraka učinjeno je razotkrivanje antigena (citratni pufer pH 6, mikrovalna pećnica 2x10 min/600 W). Zatim je blokirana endogena aktivnost peroksidaze (3% vodikov peroksid/5min) te su uzorci inkubirani s primarnim antitijelima.

- Za analizu WNT3a ekspresije korišteno je WNT-3a AHP2188, rabbit polyclonal, BIO-RAD primarno antitijelo u razrijeđenju 1:400, vrijeme inkubacije 1 sat na sobnoj temperaturi.
- Za analizu β-katenin ekspresije korišteno je Beta catenin, monoclonal mouse clone β-catenin-1, Dako primarno antitijelo u razrijeđenju 1:100, vrijeme inkubacije 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- Za analizu Sklerostin ekspresije korišteno je Sclerostin 21933-1-AP, rabbit polyclonal, Proteintech primarno antitijelo u razrijeđenju 1:50, vrijeme inkubacije 1 sat na sobnoj temeperaturi.
- Za analizu SHH ekspresije korišteno je Shh (H-160) sc-9024, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology primarno antitijelo u razrijeđenju 1:100, vrijeme inkubacije preko noći na 4°C.
- Za analizu GLI1 ekspresije korišteno je Anti GLI-1 NB600-600, rabbit polyclonal, Novus biologicals primarno antitijelo u razrijeđenju 1:600, vrijeme inkubacije preko noći na 4°C.

Kao vizualizacijski sustav korišten je Envision Flex, K8000 HRP, rabbit/mouse Dako. Kao sekundarno antitijelo korišteno je EnVision FLEX, inkubacija 30 min na sobnoj temperaturi, te diaminobenzidin (DAB prema eng. diaminobenzidine) kao kromogen, inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon svakog koraka uzorci su ispirani „Wash buffer“ puferom 2-3 minute. Uzorci su nakon provedenog postupka kontrastirani hematoksilinom. Kao pozitivne kontrole korišteni su uzorci tkiva kolorektalnog karcinoma (WNT3a, SHH, GLI1), tkivni mikropostroj od uzoraka tkiva apendiksa, tonzile, pankreasa i jetre (β-katenin), odnosno osteociti u analiziranim uzorcima koštane srži (Sklerostin).

Dva iskusna hematopatologa procijenjivali su ekspresiju ciljnih proteina, nedoumice su rješene konsenzusom. Ekspresija je semikvantificirana na nekoliko načina. Radi procjene

ukupne ekspresije svakom uzorku dodijeljen je **imunohistokemijski postotni skor** stanica koje su izražavale ciljni protein i to na način da brojevi od 0 do 4 označavaju postotak pozitivnih stanica u odnosu na sve prisutne stanice s izuzetkom masnih stanica (0=0%, 1=1%-25%, 2=26%-50%; 3=51%-75%; 4=76%-100%). Zatim je procijenjena ekspresija na pojedinima karakterističnim tipovima stanica koje imaju ulogu u patogenezi bolesti (megakariociti, vaskularne endotelne stanice, mijeloloza) i to u obliku **imunoreaktivnog skora (IRS)** koji predstavlja umnožak intenziteta bojanja (0=negativno; 1=slabo; 2=umjereno; 3=jako) i postotka pozitivnih stanica određenog tipa (0=0%, 1=1%-25%, 2=26%-50%; 3=51%-75%; 4=76%-100%). Po svakom staklu analizirano je najmanje 2000 stanica i 20 megakariocita.

4.3. Statistička obrada podataka

Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Budući da rezultati kvantifikacije ekspresije testiranih gena i proteina, ali i većina drugih numeričkih parametara nisu bili normalno distribuirani, numeričke varijable prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon (IQR prema eng. interquartile range). Kategorijske varijable prikazane su kao broj i postotak. Za usporedbu kvantificirane ekspresije gena i proteina između dijagnoza korištena je Kruskal-Wallis ANOVA i odgovarajući naknadni test (Conoverov test). Mann Whitney U test, χ^2 test i Spearmanova rank korelacija korišteni su gdje je bilo prikladno.

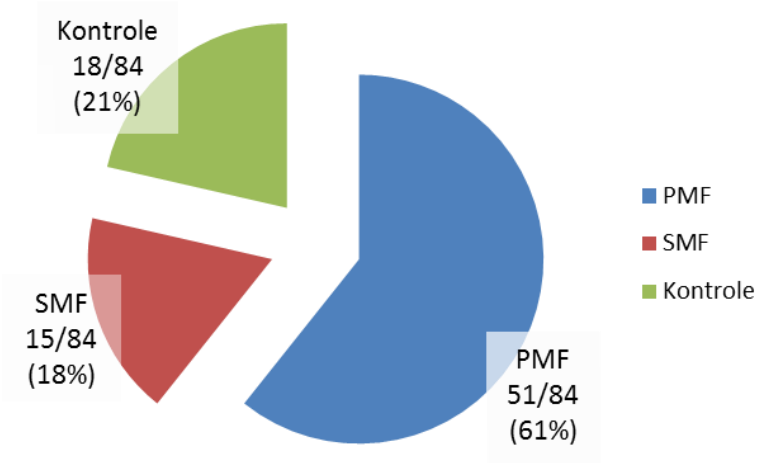
Analiza preživljenja bazirana je na metodi prema Kaplan i Meieru (143). Medijan praćenja izračunat je pomoću obrnutog Kaplan-Meier procjenitelja (144). Za usporedbu preživljenja između grupa bolesnika korištena je Cox-Mantel verzija log-rank testa (145). Za odabir vijednosti u kojoj će se prelomiti kvantificirana ekspresija ciljnog gena/proteina na dvije grupe bolesnika korištena je analiza ROC krivulje (prema eng. Receiver Operating Characteristic curve analysis), a status preživljenja korišten je kao klasifikacijska varijabla. Povezanost podataka s preživljenjem je skrinirana koristeći posebno prilagođenu MS Excel radnu knjigu (146), a rezultati su potvrđeni koristeći komercijalni statistički program MedCalc - MedCalc Statistical Software version 16.2.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Ostali statistički testovi također su učinjeni pomoću istog programa. P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima.

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

Analizirano je ukupno 84 ispitanika i to 51 (61%) bolesnik s PMF, 15 (18%) bolesnika sa SMF (8 bolesnika s post PRV SMF i 7 bolesnika s post ET SMF) i 18 (21%) kontrolnih ispitanika (Slika 15). Ukupno 59 (87%) bolesnika evaluirano je prilikom postavljanja dijagnoze, a 9 (13%) bolesnika je evaluirano u praćenju nakon prethodno postavljene dijagnoze. Pregled karakteristika svih bolesnika dan je u Tablici 6. Bolesnici s PMF i SMF su se statistički značajno razlikovali u udjelu bolesnika s leukemijskom transformacijom bolesti i prema stupnju fibroze koštane srži (što je posljedica dijagnostičkih kriterija za SMF). Bolesnici se nisu statistički značajno (n.z.) razlikovali po dobi ili spolu u odnosu na kontrolne ispitanike.

Imunohistokemijske analize rađene su na 69 ispitanika (41 bolesnik s PMF, 15 bolesnika sa SMF i 13 kontrolnih ispitanika). Genetičke analize rađene su na 49 ispitanika (29 bolesnika s PMF, 4 bolesnika sa SMF i 16 kontrolnih ispitanika). Razlike u broju bolesnika analiziranih pojedinih tehnikama su prouzrokovane različitom dostupnošću potrebnih vrsta tkiva. Npr. uzorci koštane srži potrebni za genetičke analize u pojedinim slučajevima nisu bili pohranjeni u odgovarajućem trenutku ili uzorkovanje nije uspjelo (suha punkcija ili uzorak s dominantno perifernom krvi) te je broj dostupnih uzoraka bio manji.



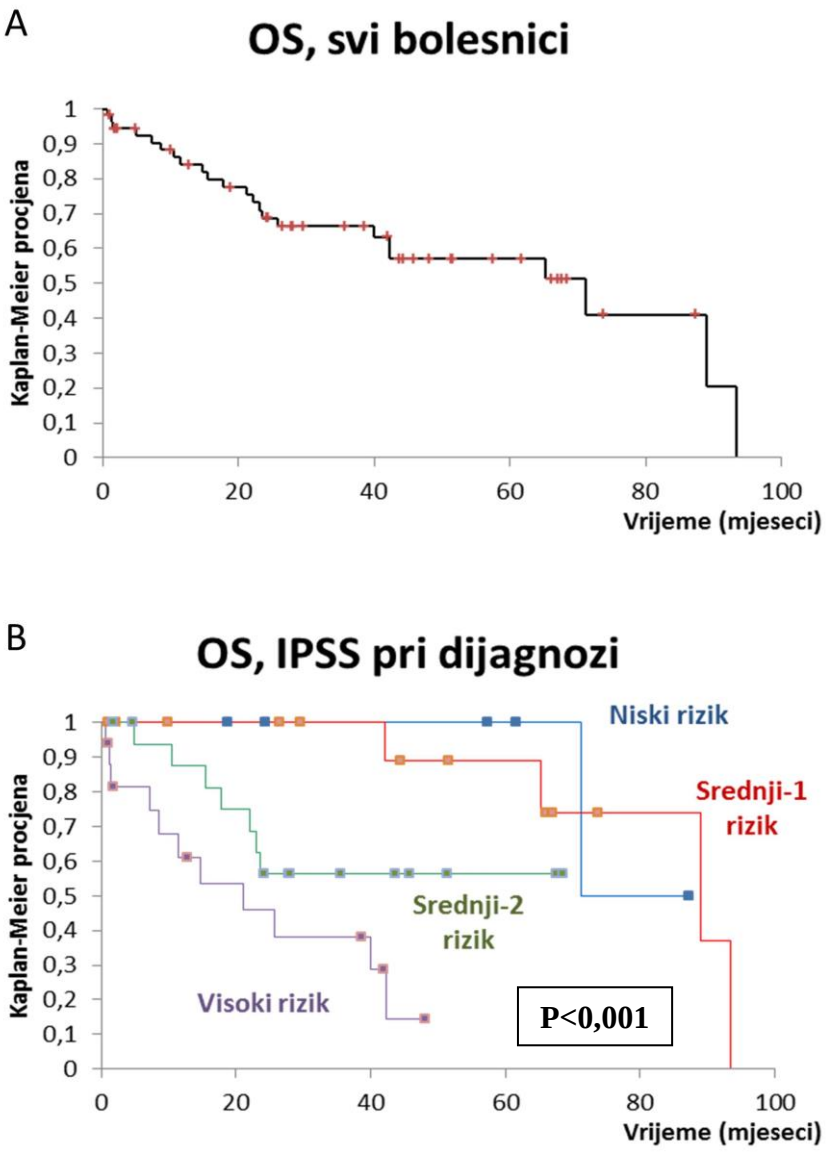
Slika 15: Prikaz udjela pojedinih dijagnoza u ukupnom uzorku od 84 ispitanika.

Tablica 6: Prikaz karakteristika bolesnika s PMF i SMF.

	PMF	**SMF**	**Mijelofibroze ukupno**
Ukupno bolesnika	51	15	66
Dob	69 IQR (60,5 - 74,5)	65 IQR (56 - 69,5)	67 IQR (60 - 73,8)
Muški spol	33 (65%)	7 (47%)	40 (61%)
Ženski spol	18 (35%)	8 (53%)	26 (39%)
***JAK2* V617F pozitivni**	35 (69%)	10 (67%)	45 (68%)
Hemoglobin (g/L)	107 IQR (95 - 125)	103 IQR (97,5 - 122,5)	105,5 IQR (96 - 126,3)
MCV (fL)	86,4 IQR (80,6 - 93,3)	87,2 IQR (83,3 - 98,2)	86,8 IQR (81,2 - 93,4)
RDW (%)	19,8 IQR (18,6 - 21)	19,3 IQR (18,5 - 20,8)	19,6 IQR (18,5 - 21)
Leukociti (x10^9/L)	10,5 IQR (7,1 - 13,8)	12,3 IQR (5,8 - 19,8)	10,7 IQR (6,8 - 15,9)
≥1% blasta u per. krvi	17 (35%)	9 (60%)	26 (41%)
Trombociti (x10^9/L)	355 IQR (199 - 574)	324 IQR (138 - 534)	336 IQR (179,3 - 546,5)
CRP (mg/L)	5,35 IQR (1,7 - 13,7)	5,05 IQR (2,3 - 14,3)	5,3 IQR (2 – 14,2)
LDH (U/L)	516 IQR (301 - 883)	636 IQR (415 - 804)	538,5 IQR (351,5 - 847)
Saturacija transferina	25% IQR (14% - 34%)	23% IQR (12% - 33%)	25% IQR (13% - 34%)
Feritin (µg/L)	152 IQR (69 - 338)	276 IQR (42,5 - 922,5)	159 IQR (62,5 - 390,3)
Stupanj mijelofibroze *			
Stupanj 1	19 (39%)	0 (0%)	19 (30%)
Stupanj 2	11 (22%)	7 (47%)	18 (28%)
Stupanj 3	19 (39%)	8 (53%)	27 (42%)
Leukemijska transform.*	1 (2%)	4 (27%)	5 (8%)
Ne palpabilna slezena	11 (24%)	3 (20%)	14 (23%)
Slezena <10cm	15 (33%)	8 (53%)	23 (38%)
Masivna splenomegalija	20 (43%)	4 (27%)	24 (39%)
Palpabilna jetra	27 (59%)	10 (67%)	37 (61%)
Prisutni B simptomi	17 (35%)	7 (47%)	24 (38%)
Ovisnost o transfuziji	8 (17%)	3 (20%)	11 (18%)
IPSS			
Niski rizik	5 (12%)	1 (8%)	6 (11%)
Srednji-1 rizik	12 (29%)	2 (15%)	14 (25%)
Srednji-2 rizik	12 (29%)	6 (46%)	18 (33%)
Visoki rizik	13 (31%)	4 (31%)	17 (31%)
DIPSS			
Niski rizik	6 (12%)	1 (7%)	7 (11%)
Srednji-1 rizik	21 (43%)	8 (53%)	29 (45%)
Srednji-2 rizik	19 (39%)	6 (40%)	25 (39%)
Visoki rizik	3 (6%)	0 (0%)	3 (5%)

*Razlika između PMF i SMF je statistički značajna (χ^2 test, P<0,05).

Medijan praćenja (median follow-up) analizirane kohorte bolesnika s PMF i SMF bio je 46,8 mjeseca, a medijan ukupnog preživljenja (OS) bio je 71,2 mjeseca (Slika 16A). Bolesnici s PMF i SMF nisu se statistički značajno razlikovali u OS. I IPSS (Slika 16B) i DIPSS su mogli statistički značajno razlučiti grupe bolesnika s različitim rizikom smrti (P<0,001 za oba skora).

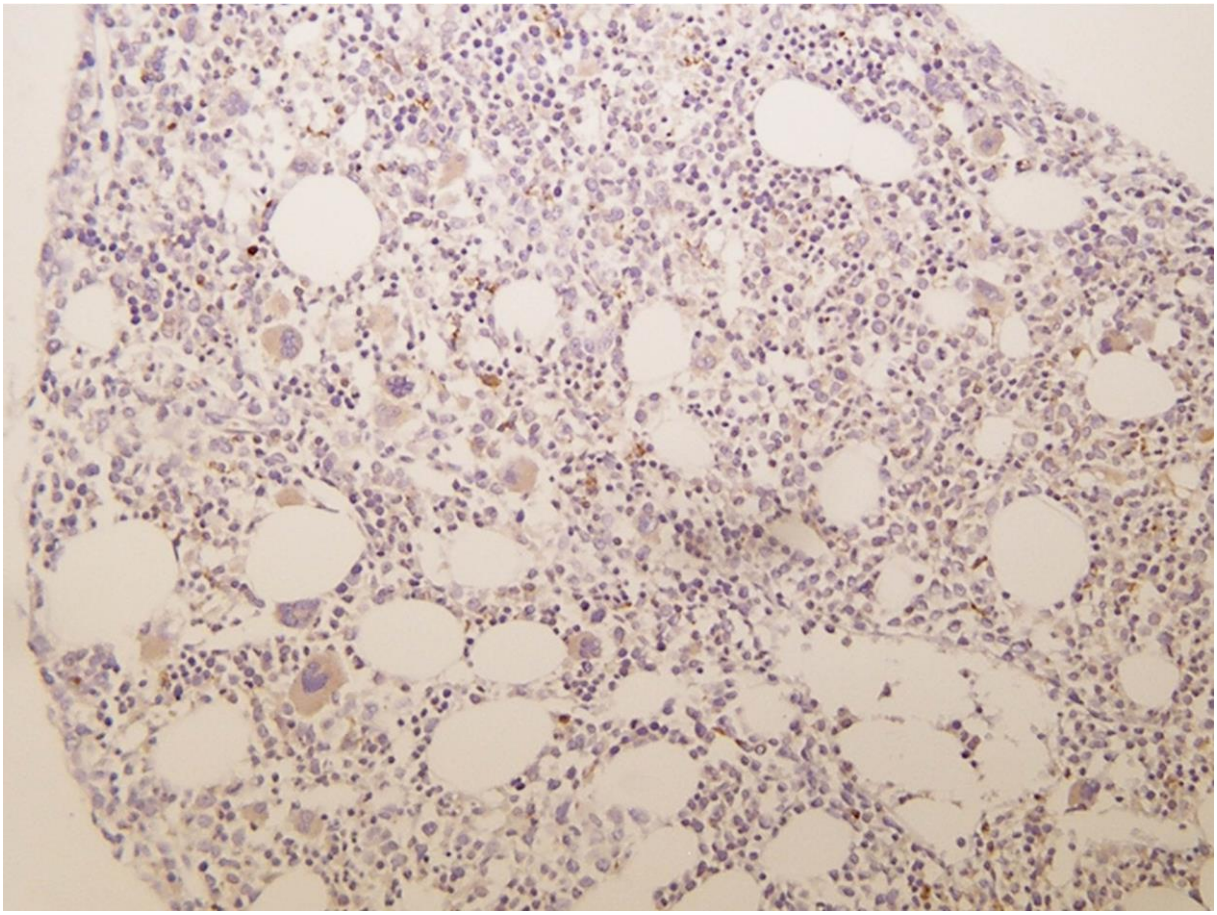


Slika 16: A) Prikaz krivulje OS za sve analizirane bolesnike. **B)** OS prema IPSS grupama rizika u bolesnika evaluiranih prilikom postavljanja dijagnoze.

5.2. Kanonski Wnt signalni put

5.2.1. WNT3a

I u bolesnih i u zdravih ispitanika detektirali smo ekspresiju WNT3a u koštanoj srži. Pozitivitet na WNT3a bio je prisutan dominantno u mijelolozi te u megakariocitima (Slika 17).



Slika 17: Prikaz imunohistokemijskog bojenja na WNT3a u koštanoj srži bolesnika oboljelog od PMF, povećanje x400.

Kvantifikacija ekspresije WNT3a u obliku imunohistokemijskog postotnog skora, IRS u megakariocitima, IRS u vaskularnim endotelnim stanicama i IRS u mijelolozi prikazana je u Tablici 7.

Detektirali smo statistički značajnu razliku u WNT3a imunohistokemijskom postotnom skoru između dijagnoza (P=0,029). PMF i SMF su imale statistički značajno viši WNT3a postotni

skor u odnosu na kontrole (P<0,05 za obje usporedbe), ali razlika nije bila statistički značajna između PMF i SMF (Slika 18A). Također je bila prisutna statistički značajna razlika u WNT3a IRS u megakariocitima između dijagnoza (P<0,001). PMF i SMF su imale statistički značajno viši WNT3a IRS u megakariocitima u odnosu na kontrole (P<0,05 za obje usporedbe), ali nije bilo statistički značajne razlike između PMF i SMF (Slika 18B). WNT3a RT-PCR signal nije bio adekvatan za tumačenje. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji WNT3a mjerenoj na ostale načine.

Tablica 7: Kvantifikacija WNT3a ekspresije.

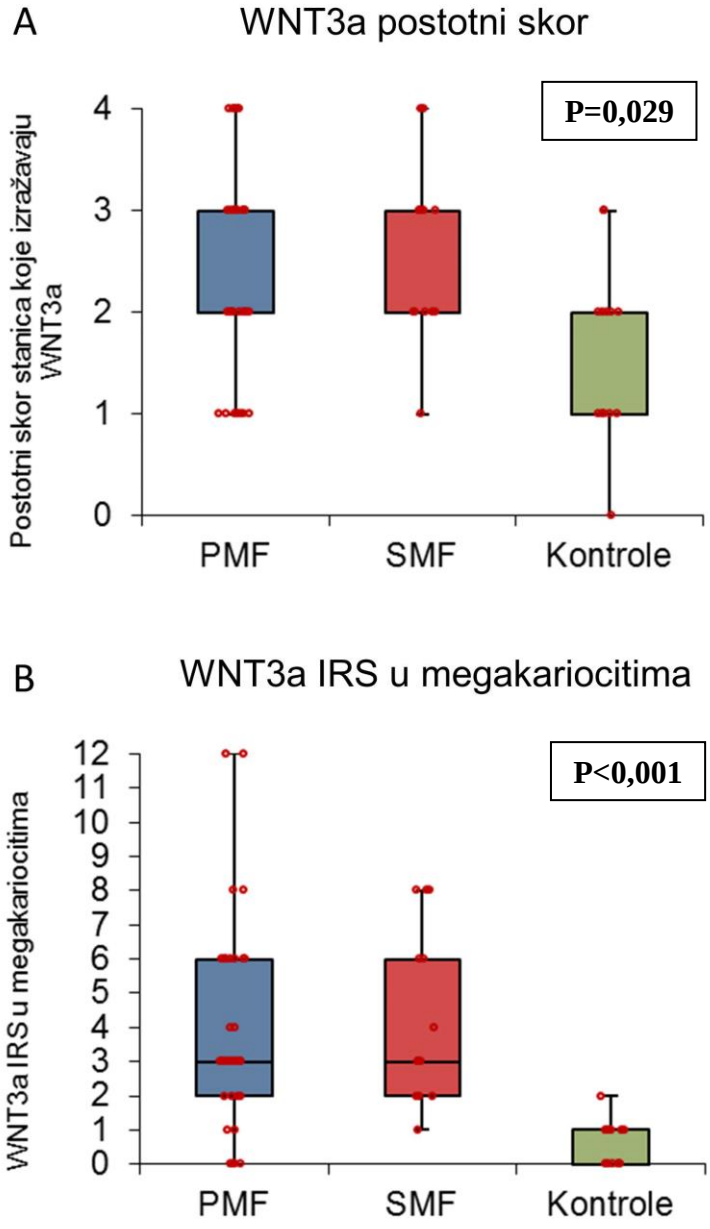
WNT3a	**Postotni skor***	**IRS Megakario.***	IRS Vask. endotel	IRS Mijeloloza
PMF	2 IQR (2 - 3)	3 IQR (2 - 6)	0 IQR (0 - 2)	3,5 IQR (2 - 6)
SMF	3 IQR (2 - 3)	3 IQR (2 - 6)	0 IQR (0 - 0)	6 IQR (3 - 6)
Kontrole	2 IQR (1 - 2)	1 IQR (0 - 1)	0 IQR (0 - 0)	3 IQR (1 - 4)
P vrijednost	**0,029**	**<0,001**	n.z.	n.z

*prisutna je statistički značajna razlika između dijagnoza (Kruskal-Wallis ANOVA, P<0,05)

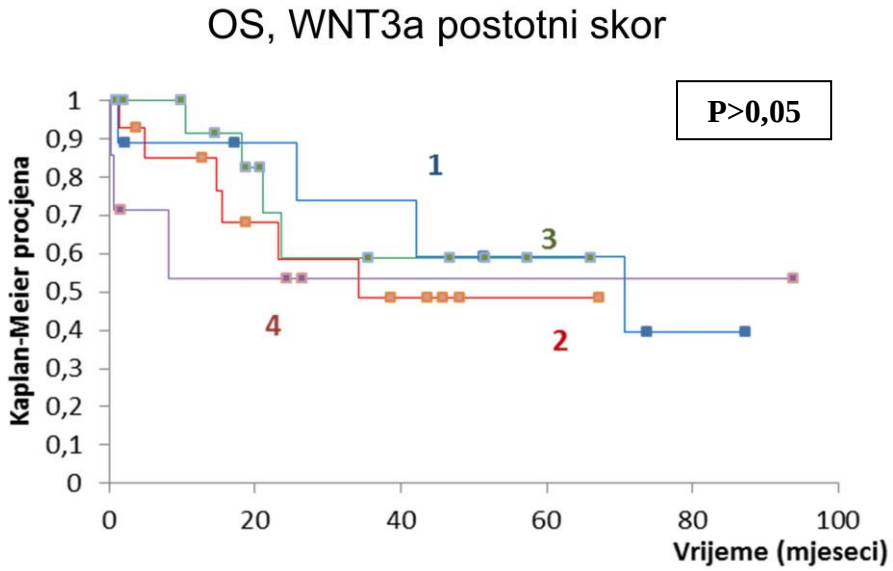
Korelacija s kliničkim parametrima:

- Viši WNT3a imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s višom razinom hemoglobina (P=0,026 za MF, n.z. za PMF, P=0,039 za SMF) i nižom razinom serumskog željeza (P=0,046 za MF, n.z. za PMF ili SMF zasebno). WNT3a imunohistokemijski postotni skor stanica nije bio statistički značajno povezan s OS (Slika 19).
- Viši WNT3a IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s većim stupnjem fibroze koštane srži (P=0,039 za MF, n.z. za PMF i SMF), nižim DIPSS skorom u SMF (P=0,019 za SMF, n.z. za PMF i MF), većim brojem leukocita (P=0,044 za MF, P=0,02 za PMF, n.z. za SMF), nižim MCVom (P=0,042 za MF, n.z. za PMF i SMF), nižom razinom serumskog željeza (P=0,027 za MF, n.z. za PMF i SMF) i nižom saturacijom tranferina (P=0,022 za MF, n.z. PMF, P=0,047 za SMF). WNT3a IRS u megakariocitima nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viši WNT3a IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s većim stupnjem fibroze koštane srži u PMF (P=0,013 za PMF, n.z. za MF i SMF) i nižim MCVom (P=0,039 za MF, P=0,014 za PMF, n.z. za SMF). WNT3a IRS u vaskularnim endotelnim stanicama nije bio statistički značajno povezan s OS.

- Viši WNT3a IRS u mijelolozi bio je statistički značajno povezan s većim stupnjem fibroze koštane srži (P=0,001 za MF, P=0,032 za PMF, P=0,004 za SMF). WNT3a IRS u mijelolozi nije bio statistički značajno povezan s OS.



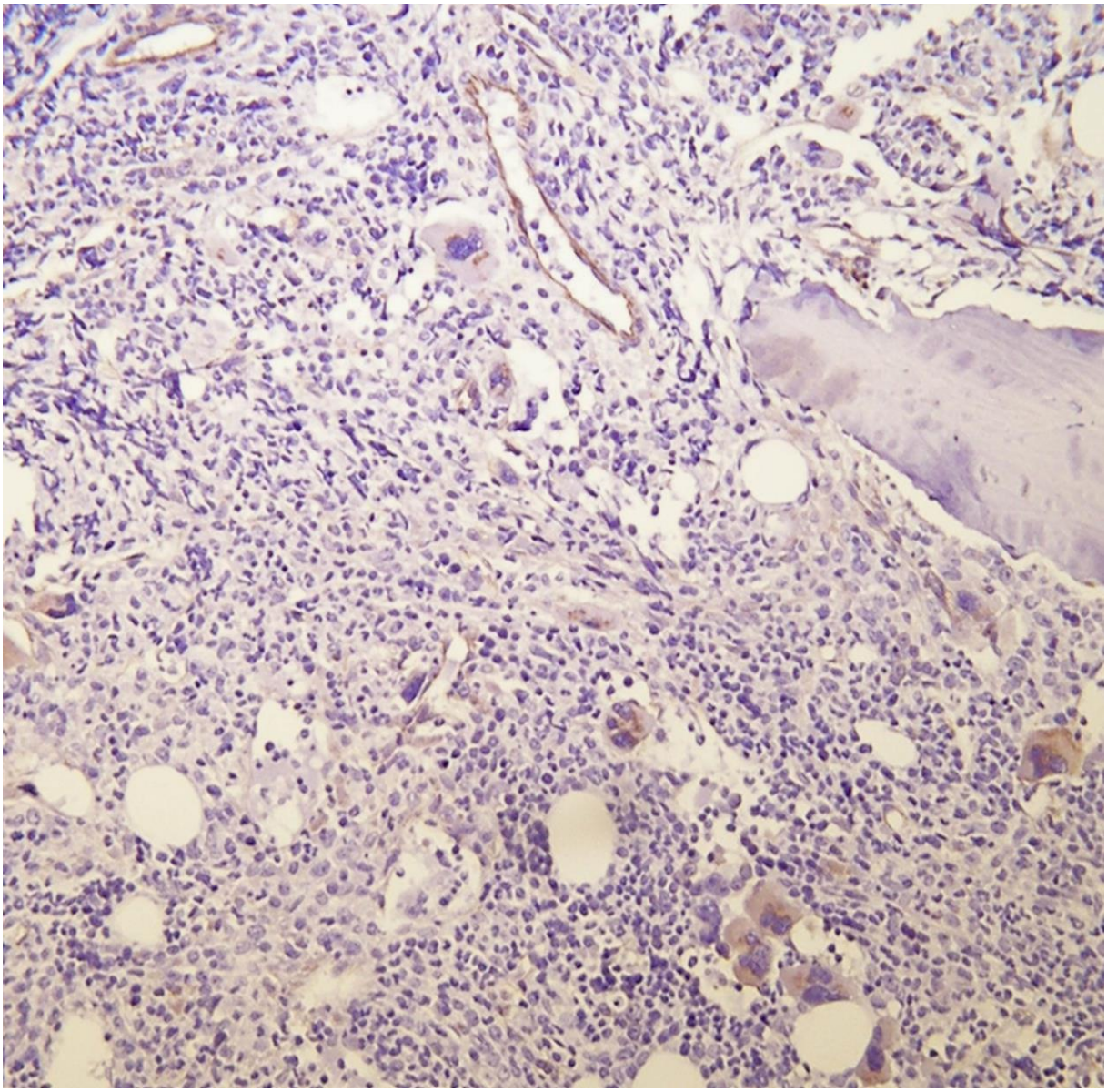
Slika 18: A) WNT3a imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno veći u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na kontrole. **B)** WNT3a IRS u megakariocitima bio je statistički značajno veći u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na kontrole.



Slika 19: WNT3a imunohistokemijski postotni skor nije bio statistički značajno povezan s OS, prikazane su kategorije postotnog skora.

5.2.2. β-katenin

I u bolesnih i u zdravih ispitanika detektirali smo ekspresiju β-katenina u koštanoj srži. Pozitivitet na β-katenin bio je prisutan dominantno u endotelu i u megakariocitima (Slika 20).



Slika 20: Prikaz imunohistokemijskog bojenja na β-katenin u koštanoj srži bolesnika oboljelog od PMF, povećanje x400.

Kvantifikacija ekspresije β-katenina u obliku imunohistokemijskog postotnog skora, IRS u megakariocitima, IRS u vaskularnim endotelnim stanicama, IRS u mijelolozi, te kao mRNA ekspresija prikazana je u Tablici 8.

Imunohistokemijski postotni skor stanica koje izražavaju β-katenin nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza, a zbog razloga što su megakariociti i vaskularne endotelne stanice (iako umnoženi u oboljelih od mijelofibroze) iznosili manje od 25% i u zdravim i u bolesnim koštanim sržima. Detektirali smo statistički značajnu razliku u β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama između dijagnoza (P=0,016). PMF i SMF imale su statistički značajno viši β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama u odnosu na kontrole (P<0,05 za obje usporedbe), ali nije bilo statistički značajne razlike između PMF i SMF (Slika 21A). *β-katenin* mRNA ekspresija se statistički značajno razlikovala između dijagnoza (P<0,001). PMF i SMF imale su statistički značajno višu *β-katenin* mRNA ekspresiju u odnosu na kontrole (P<0,05 za obje usporedbe), dok nije bilo statistički značajne razlike između PMF i SMF (Slika 21B). Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji β-katenina mjerenoj na ostale načine.

Tablica 8: Kvantifikacija ekspresije β-katenina.

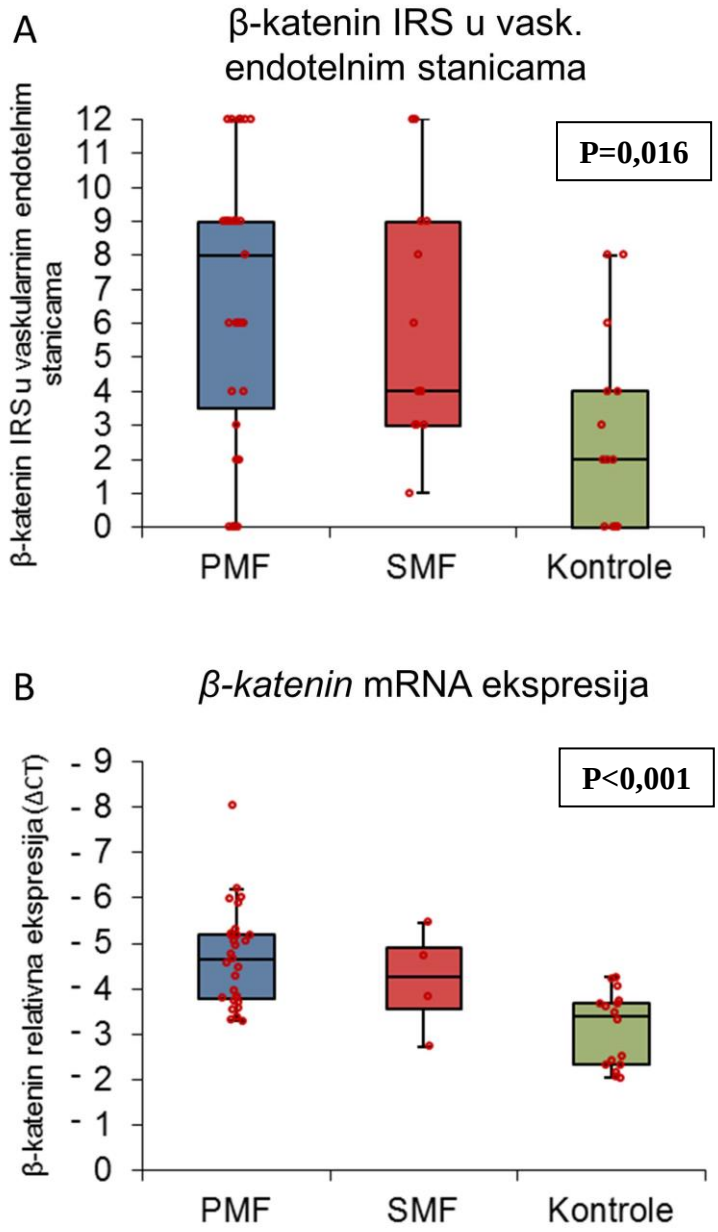
β-katenin	Postotni skor	IRS Megakario.	**IRS Vask. Endotel ***	IRS Mijeloloza	**mRNA ΔCT ***
PMF	1 IQR (1 - 1)	7 IQR (3,25 - 12)	8 IQR (3,5 - 9)	0 IQR (0 - 1)	-4,6 IQR (-5,2 - -3,8)
SMF	1 IQR (1 - 1)	8 IQR (8 - 12)	4 IQR (3 - 9)	0 IQR (0 - 0)	-4,3 IQR (-4,9 - -3,6)
Kontrole	1 IQR (1 - 1)	8 IQR (4 - 12)	2 IQR (0 - 4)	0 IQR (0 - 0)	-3,4 IQR (-3,7 - -2,3)
P vrijednost	n.z.	n.z.	**0,016**	n.z.	**<0,001**

*prisutna je statistički značajna razlika između dijagnoza (Kruskal-Wallis ANOVA, P<0,05)

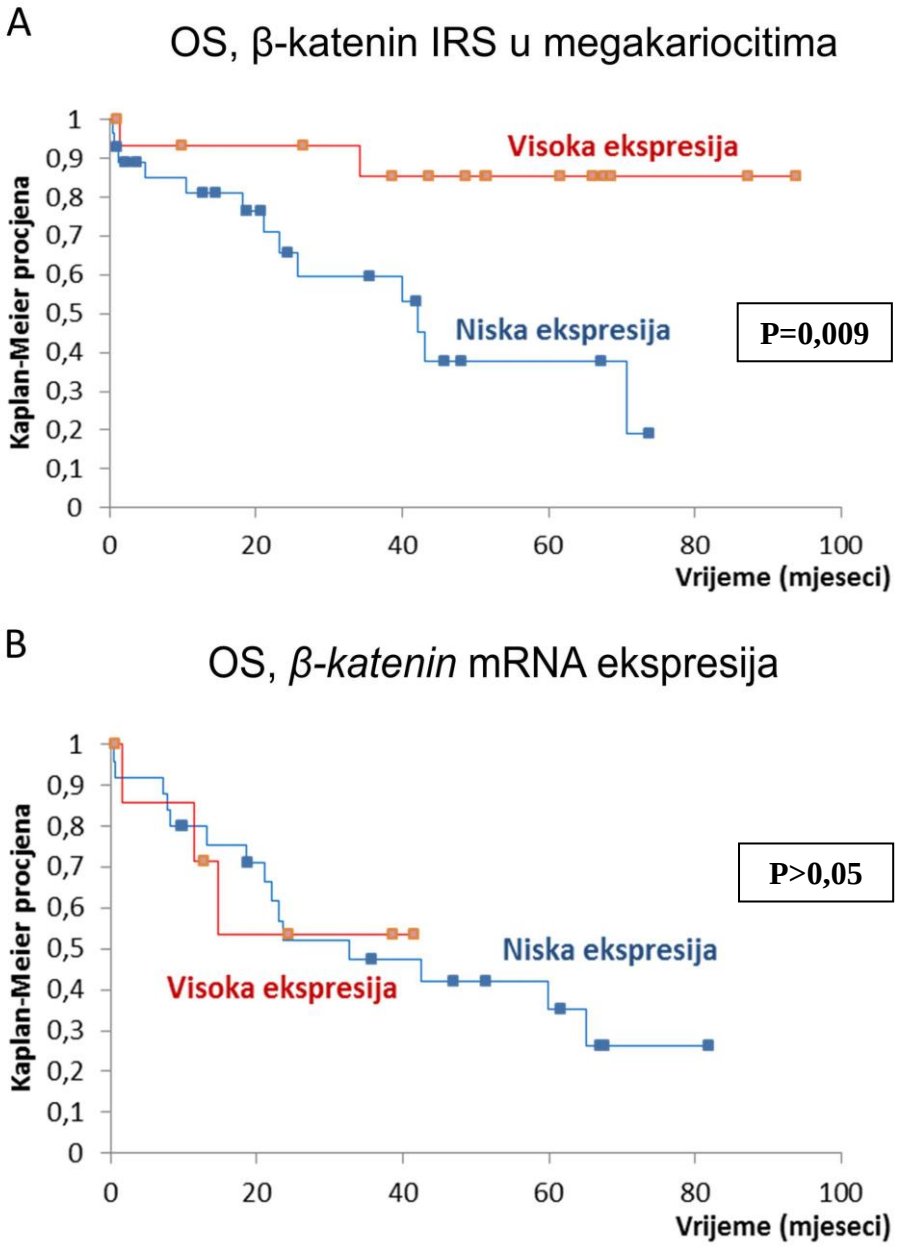
Korelacija s kliničkim parametrima:

- Viši β-katenin IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan sa ženskim spolom u SMF (P=0,036 za SMF, n.z. za PMF i MF) i većim RDWom u SMF (P=0,009 za SMF, n.z. za PMF i MF). Viši β-katenin IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s boljim OS (P=0,009 za MF, P=0,026 za PMF, n.z. za SMF) (Slika 22A).

- Viši β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan sa stupnjem fibroze koštane srži, ali u različitim smjerovima (pozitivna korelacija u PMF, P=0,011, negativna korelacija u SMF, P=0,028), višom dobi bolesnika u SMF (P=0,005 za SMF), višom razinom hemoglobina u SMF (P=0,022 za SMF, n.z. za PMF i MF), većim brojem leukocita u PMF (P=0,016 za PMF, n.z. za SMF i MF) i većom jetrom (P=0,046 za MF, n.z. za PMF i SMF). β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viši β-katenin IRS u mijelolozi bio je statistički značajno povezan s većim MCVom u SMF (P=0,035 za SMF, n.z. za PMF i MF). β-katenin IRS u mijelolozi nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viša *β-katenin* mRNA ekspresija statistički je značajno bila povezana s višim DIPSS skorom (P=0,021 za MF, n.z. za PMF i SMF) i nižom razinom hemoglobina (P=0,004 za MF, P=0,02 za PMF, n.z. za SMF – P=0,051). *β-katenin* mRNA ekspresija nije bila statistički značajno povezana s OS (Slika 22B).



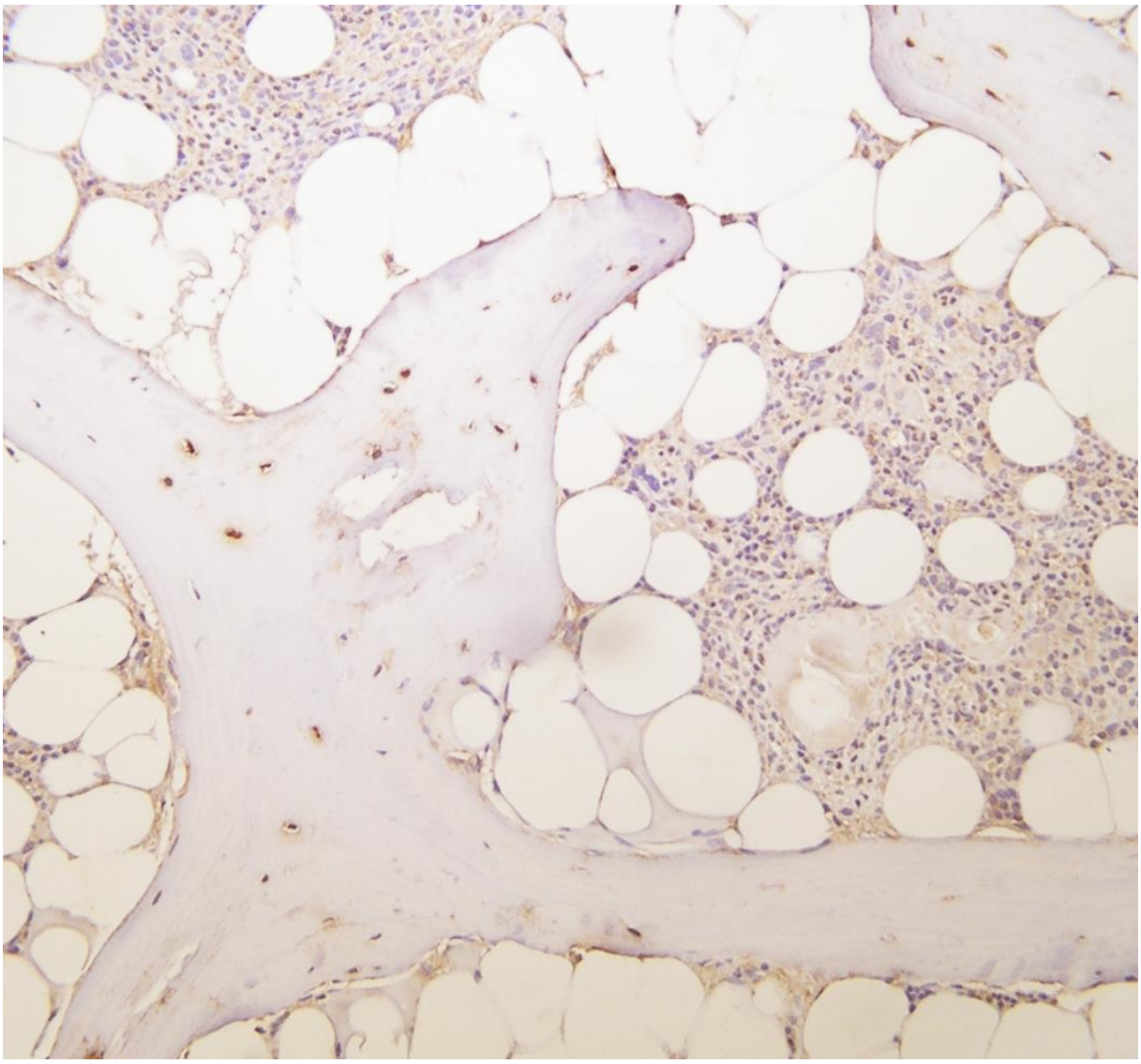
Slika 21: A) β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno veći u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na kontrole. **B)** *β-katenin* mRNA relativna ekspresija bila je statistički značajno veća u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na kontrole (ΔCT vrijednosti su prikazane u obrnutom smjeru tako da je viša ekspresija postavljena više na grafikonu).



Slika 22: A) Viši β-katenin IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s boljim OS. **B)** *β-katenin* mRNA ekspresija nije bila statistički značajno povezana s OS.

5.2.3. Sklerostin/*SOST*

I u bolesnih i u zdravih ispitanika detektirali smo ekspresiju Sklerostina u koštanoj srži. Sklerostin je bio eksprimiran u osteocitima, ali također u megakariocitima, mijelolozi te nešto slabije u endotelu (Slika 23).



Slika 23: Prikaz imunohistokemijskog bojenja na sklerostin u koštanoj srži bolesnika oboljelog od PMF, povećanje x400.

Kvantifikacija ekspresije Sklerostina/*SOSTa* u obliku imunohistokemijskog postotnog skora, IRS u megakariocitima, IRS u vaskularnim endotelnim stanicama, IRS u mijelolozi, te kao *SOST* mRNA ekspresija prikazana je u Tablici 9.

Nismo detektirali statistički značajnih razlika u ekspresiji Sklerostina/*SOSTa* mjerenoj na različite načine između dijagnoza (Slika 24).

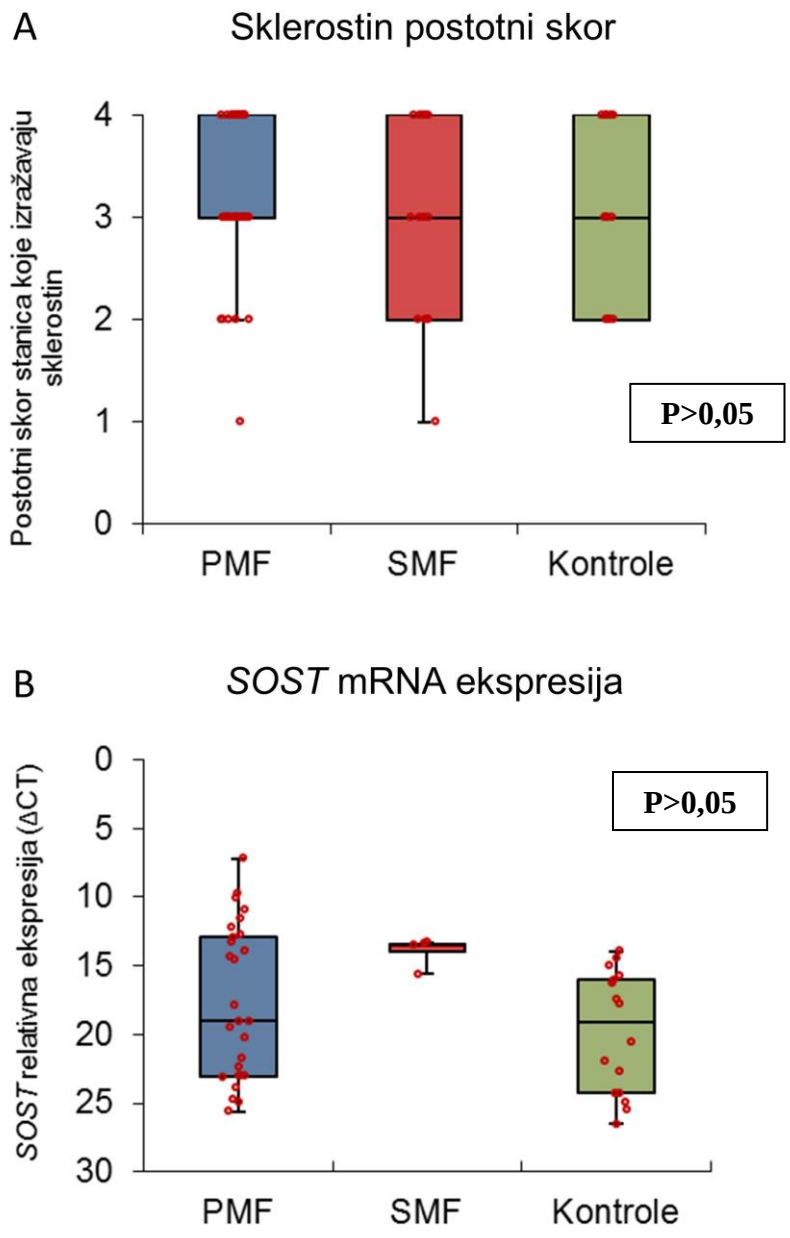
Tablica 9: Kvantifikacija ekspresije Sklerostina/*SOSTa*.

Sklerostin/ SOST	Postotni skor	IRS Megakario.	IRS Vask. endotel	IRS Mijeloloza	mRNA ΔCT
PMF	3 IQR (3 - 4)	8 IQR (4 - 8)	6 IQR (4 - 9)	8 IQR (6 - 9)	19 IQR (12,9 - 23,1)
SMF	3 IQR (2 - 4)	4 IQR (3 - 7,5)	6 IQR (3,75 - 8,75)	7 IQR (4,5 - 8)	13,4 IQR (13,4 - 14)
Kontrole	3 IQR (2 - 4)	8 IQR (4 - 8)	8 IQR (2 - 8)	8 IQR (6 - 12)	19,2 IQR (16 - 24,3)
P vrijednost	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.

Korelacija s kliničkim parametrima:

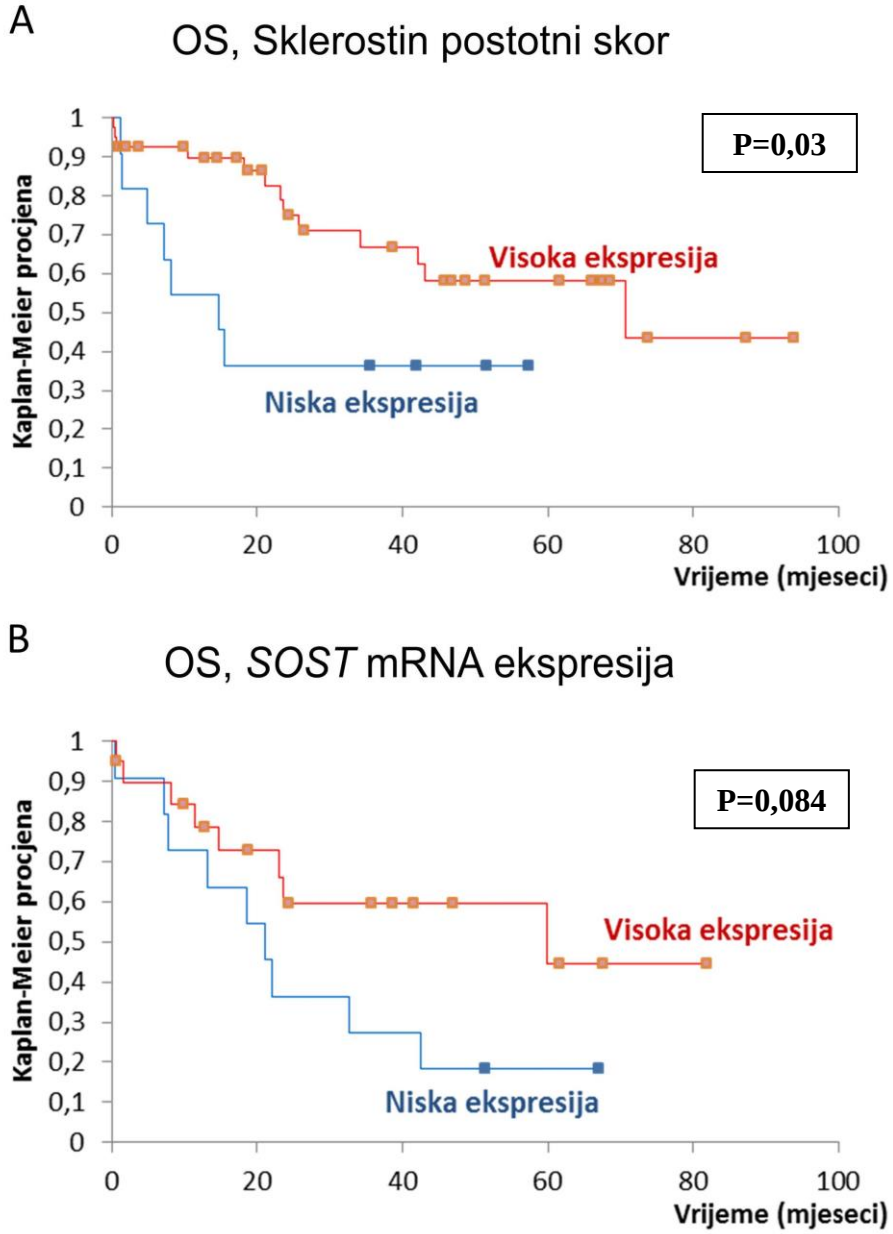
- Viši Sklerostin imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s ovisnošću o transfuziji (P=0,036 za MF, n.z. za PMF i SMF), manjim postotkom cirkulirajućih blasta (P=0,042 za MF, n.z. za PMF i SMF) i većom jetrom u SMF (P=0,033 za SMF, n.z. za PMF i MF). Viši Sklerostin imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s boljim OS (P=0,03 za MF, P=0,035 za PMF, n.z. za SMF) (Slika 25A).
- Viši Sklerostin IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s višim stupnjem fibroze koštane srži u PMF (P=0,029 za PMF, n.z. za SMF i MF), većom jetrom u SMF (P=0,026 za SMF, n.z. za PMF i MF) i nižim MCVom (P=0,036 za MF, n.z. za PMF i SMF). Viši Sklerostin IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s boljim OS u PMF (P=0,017 za PMF, n.z. za SMF i MF).
- Viši Sklerostin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s ovisnošću o transfuziji (P=0,036 za MF, n.z. za PMF i SMF) i višim stupnjem fibroze koštane srži u PMF (P=0,047 za PMF, n.z. za SMF i MF). Sklerostin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viši Sklerostin IRS u mijelolozi nija pokazivao statistički značajnih kliničkih korelacija.
- Viša *SOST* mRNA ekspresija bila je statistički značajno povezana s višom dobi bolesnika (P=0,005 za MF, P=0,001 za PMF, n.z. za SMF), manjim postotkom

cirkulirajućih blasta u PMF (P=0,012 za PMF, n.z. za SMF i MF), većim brojem trombocita (P=0,031 za MF, P=0,033 za PMF, n.z. za SMF) i manjom slezenom (P=0,001 za MF, P=0,001 za PMF, n.z. za SMF), a moguće i višom razinom hemoglobina u SMF (P=0,051 za SMF, n.z. za PMF i MF). *SOST* mRNA ekspresija nije bila statistički značajno povezana s OS (P=0,084 za MF, P=0,082 za PMF, n.z. za SMF), ali je uočljivo da se krivulje preživljenja razdvajaju u predviđenom smjeru (Slika 25B).



Slika 24: A) Sklerostin imunohistokemijski postotni skor nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza. **B)** *SOST* mRNA ekspresija nije se statistički značajno

razlikovala između dijagnoza (ΔCT vrijednosti su prikazane u obrnutom smjeru tako da je viša ekspresija postavljena više na grafikonu).

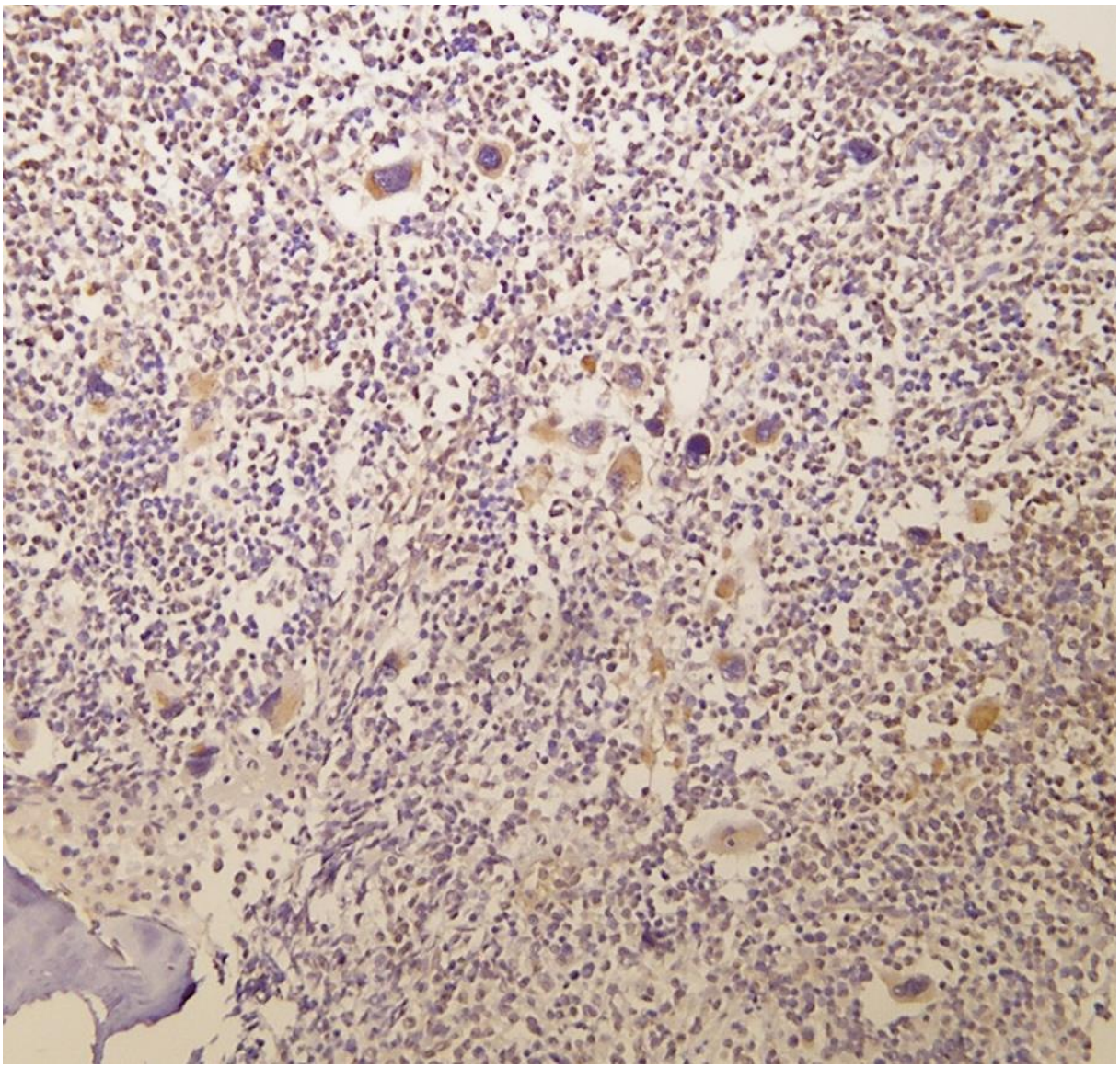


Slika 25: A) Viši Sklerostin imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s boljim OS. **B)** Ekspresija *SOST* mRNA nije bila statistički značajno povezana s OS, ali se krivulje preživljenja razdvajaju u očekivanom smjeru.

5.3. Sonic Hedgehog signalni put

5.3.1. SHH

I u bolesnih i u zdravih bolesnika detektirali smo ekspresiju SHH u koštanoj srži. Pozitivitet je bio prisutan u megakariocitima, te nešto slabije u endotelu i mijelolozi (Slika 26).



Slika 26: Prikaz imunohistokemijskog bojenja na SHH u koštanoj srži bolesnika oboljelog od PMF, povećanje x400.

Kvantifikacija ekspresije SHH u obliku imunohistokemijskog postotnog skora, IRS u megakariocitima, IRS u vaskularnim endotelnim stanicama i IRS u mijelolozi prikazana je u Tablici 10.

Imunohistokemijski postotni skor stanica koje izražavaju SHH nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza (Slika 27A). Detektirali smo statistički značajnu razliku u SHH IRS u megakariocitima između dijagnoza (P<0,001). SMF je imala statistički značajno viši SHH IRS u megakariocitima u odnosu na PMF i kontrole, PMF je imala statistički značajno niže vrijednosti od SMF i statistički značajno više vrijednosti od kontrola (P<0,05 za sve usporedbe) (Slika 27B). *SHH* mRNA ekspresija bila je ispod detektabilne razine ekspresije korištenog eseja u većine bolesnika. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji SHH mjerenoj na ostale načine.

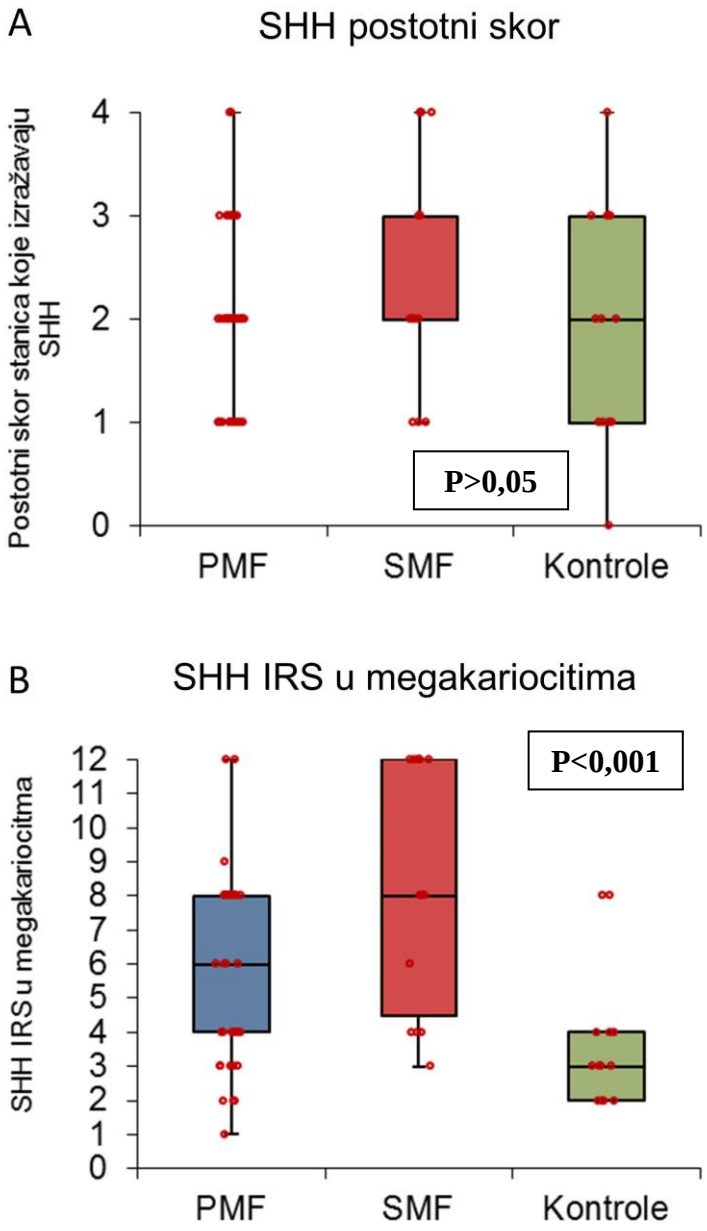
Tablica 10: Kvantifikacija ekspresije SHH.

SHH	Postotni skor	**IRS Megakario.***	IRS Vask. endotel	IRS Mijeloloza
PMF	2 IQR (2 - 2)	6 IQR (4 - 8)	4 IQR (2,5 - 5)	4 IQR (2 - 6)
SMF	2 IQR (2 - 3)	8 IQR (4,5 - 12)	4 IQR (4 - 4)	5 IQR (2 - 8)
Kontrole	2 IQR (1 - 3)	3 IQR (2 - 4)	4 IQR (0 - 7)	3 IQR (1 - 6)
P vrijednost	n.z.	**<0,001**	n.z.	n.z.

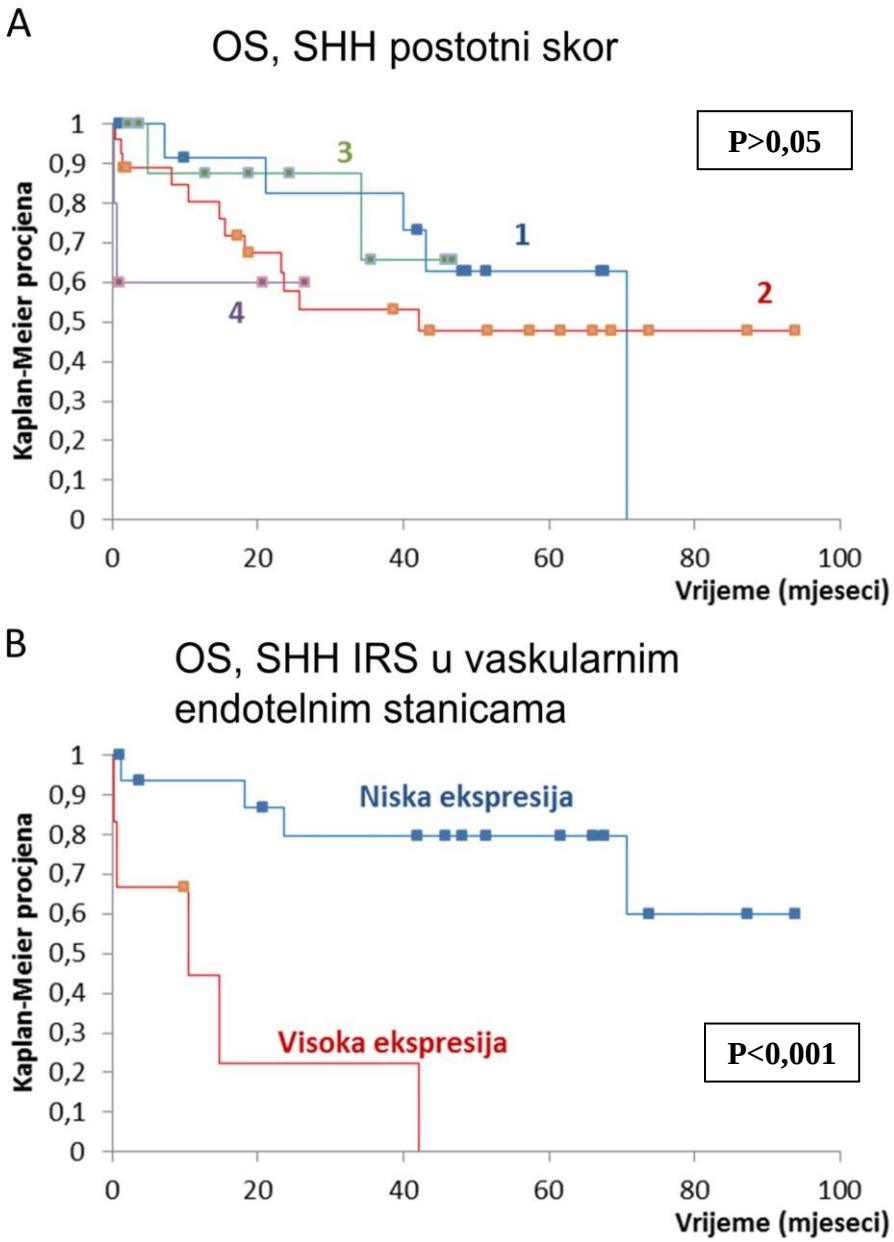
*prisutna je statistički značajna razlika između dijagnoza (Kruskal-Wallis ANOVA, P<0,05)

Korelacije s kliničkim parametrima:

- Viši SHH imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s nižim DIPSS skorom (P=0,039 za MF, P=0,038 za PMF, n.z. za SMF), leukemijskom transformacijom bolesti (P=0,039 za MF, n.z. za PMF i SMF), nižim postotkom cirkulirajućih blasta (P=0,016 za MF, P=0,003 za PMF, n.z. za SMF), većim brojem trombocita u PMF (P=0,016 za PMF, n.z. za MF i SMF) i manjom slezenom u PMF (P=0,024 za PMF, n.z. za SMF i MF). SHH imunohistokemijski postotni skor nije bio statistički značajno povezan s OS (Slika 28A).
- Viši SHH IRS u megakariocitima bio je statistički značajno povezan s nižim IPSS skorom (P=0,021 za MF, P=0,007 za PMF, n.z. za SMF), nižim DIPSS skorom (P=0,042 za MF, P=0,006 za PMF, n.z. za SMF), leukemijskom transformacijom bolesti (P=0,008 za MF, n.z. za PMF i SMF), nižim postotkom cirkulirajućih blasta u PMF (P=0,012 za PMF, n.z. za SMF i MF), nižim RDWom (P=0,021 za MF, 0,025 za PMF, n.z. za SMF), nižom razinom serumskog željeza u PMF (P=0,024 za PMF, n.z. za SMF i MF) i nižom saturacijom transferina u PMF (P=0,024 za PMF, n.z. za SMF i MF). SHH IRS u megakariocitima nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viši SHH IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s većim stupnjem fibroze koštane srži u SMF (P=0,046 za SMF, n.z. za PMF i MF), višim LDH u SMF (P=0,03 za SMF, n.z. za PMF i MF) i višim CRPom u SMF (P=0,034 za SMF, n.z. za PMF i MF). Viši SHH IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s lošijim OS (P<0,001 za MF, P=0,001 za PMF, P=0,014 za SMF) (Slika 28B).
- Viši SHH IRS u mijelolozi bio je statistički značajno povezan s leukemijskom transformacijom bolesti (P=0,029 za MF, n.z. za PMF, P=0,038 za SMF), nižim postotkom cirkulirajućih blasta u PMF (P=0,027 za PMF, n.z. za SMF i MF), s manjom slezenom u PMF (P=0,043 za PMF, n.z. za MF i SMF) i nižom razinom serumskog željeza u PMF (P=0,025 za PMF, n.z. za SMF i MF). Viši SHH IRS u mijelolozi u SMF bio je statistički značajno povezan s lošijim OS (P=0,032 za SMF, P=0,052 za MF, n.z. za PMF).



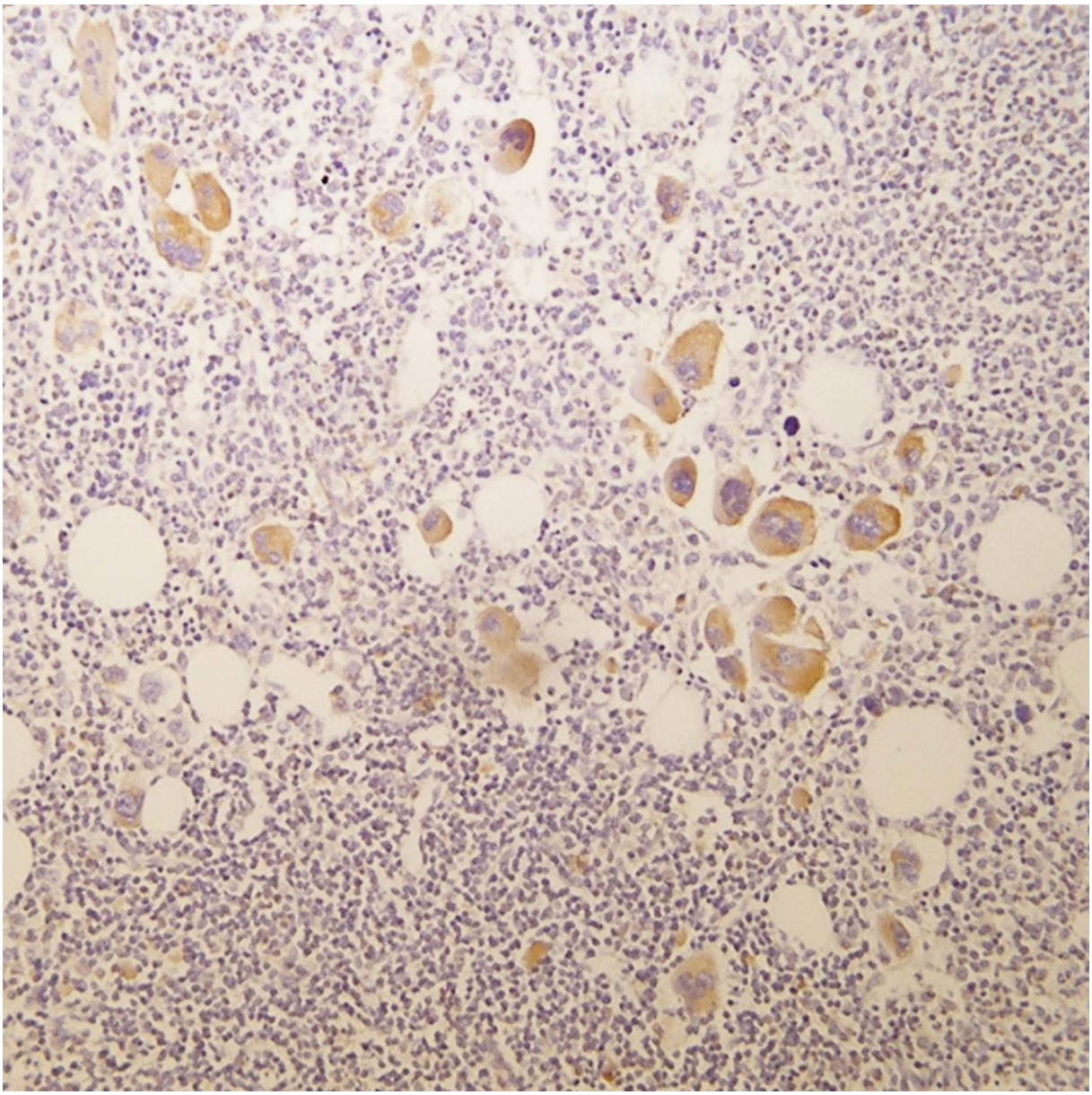
Slika 27: A) SHH imunohistokemijski postotni skor nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza. **B)** SHH IRS u megakariocitima bio je statistički značajno veći u bolesnika sa SMF u odnosu na PMF i kontrole, statistički značajno veći u bolesnika s PMF u odnosu na kontrole, a statistički značajno manji u PMF u odnosu na SMF.



Slika 28: A) SHH imunohistokemijski postotni skor nije statistički značajno utjecao na OS, prikazane su kategorije postotnog skora. **B)** Viši SHH IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s lošijim OS.

5.3.2. GLI1

I u bolesnih i u zdravih ispitanika detektirali smo ekspresiju GLI1 u koštanoj srži. Pozitivitet je bio prisutan u megakariocitima te mijelolozi. Endotel je pokazivao varijabilni pozitivitet (Slika 29).



Slika 29: Prikaz imunohistokemijskog bojenja na GLI1 u koštanoj srži bolesnika oboljelog od PMF, povećanje x400.

Kvantifikacija ekspresije GLI1 u obliku imunohistokemijskog postotnog skora, IRS u megakariocitima, IRS u vaskularnim endotelnim stanicama, IRS u mijelolozi, te kao mRNA ekspresija prikazana je u Tablici 11.

Imunohistokemijski postotni skor stanica koje izražavaju GLI1 nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza (Slika 30A). Detektirali smo statistički značajnu razliku u GLI1 IRS u megakariocitima između dijagnoza (P<0,036). PMF i SMF imali su statistički značajno viši GLI1 IRS u megakariocitima u odnosu na kontrole (P<0,05 za obje usporedbe) dok razlika između PMF i SMF nije bila statistički značajna. (Slika 30B). Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji GLI1 mjerenoj na ostale načine.

Tablica 11: Kvantifikacija ekspresije GLI1.

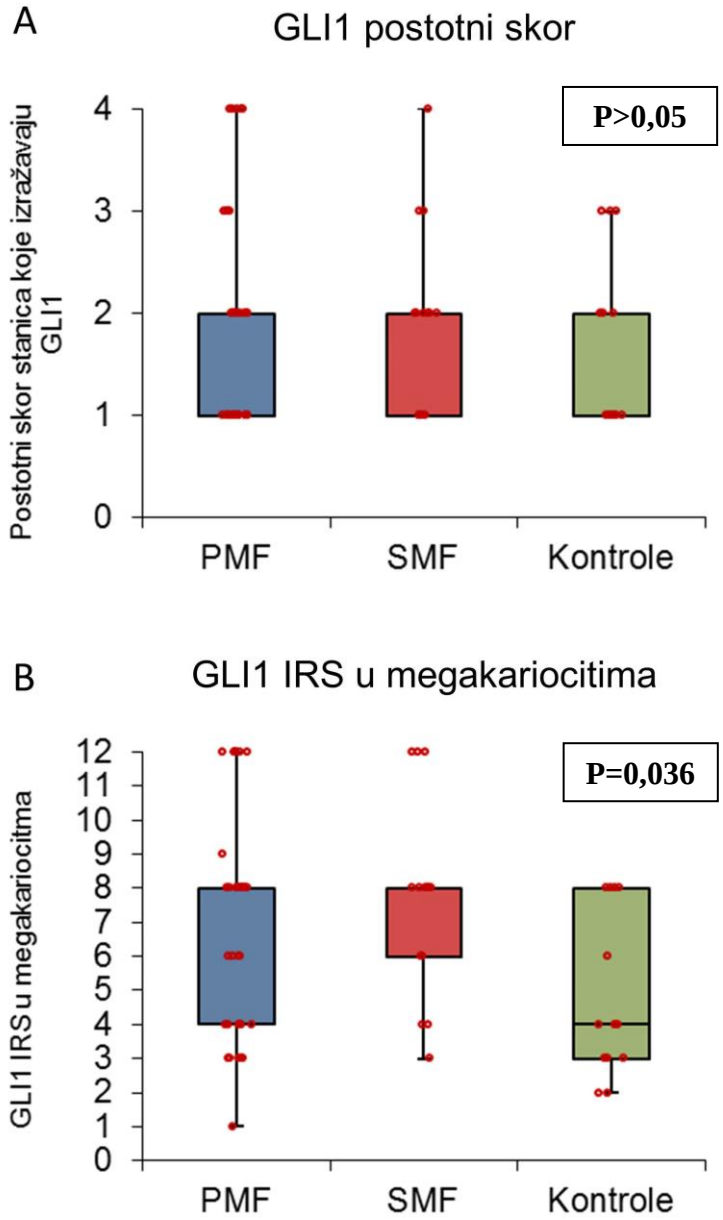
Gli1	Postotni skor	**IRS Megakario ***	IRS Vask. endotel	IRS Mijeloloza	mRNA ΔCT
PMF	2 IQR (1 - 2)	8 IQR (4 - 8)	4 IQR (0 - 6)	2,5 IQR (2 - 5,5)	7,2 IQR (6,4 - 8,2)
SMF	2 IQR (1 - 2)	8 IQR (6 - 8)	3 IQR (2 - 5,5)	2 IQR (1,25 - 4)	7,3 IQR (6,4 - 10,1)
Kontrole	1 IQR (1 - 2)	4 IQR (3 - 8)	2 IQR (0 - 6)	2 IQR (1 - 6)	6,9 IQR (6,4 - 8)
P vrijednost	n.z.	**P=0,036**	n.z.	n.z.	n.z.

*prisutna je statistički značajna razlika između dijagnoza (Kruskal-Wallis ANOVA, P<0,05)

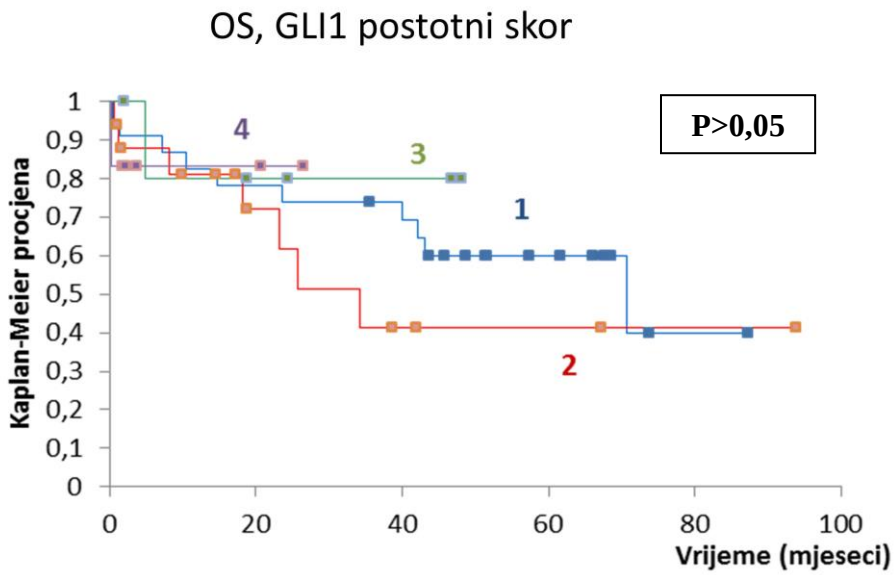
Korelacije s kliničkim parametrima:

- Viši GLI1 imunohistokemijski postotni skor bio je statistički značajno povezan s prisutnošću B simptoma u SMF (P=0,041 za SMF, n.z. za PMF i MF). GLI1 imunohistokemijski postotni skor nije bio statistički značajno povezan s OS (Slika 31).
- Viši GLI1 IRS u vaskularnim endotelnim stanicama bio je statistički značajno povezan s višim stupnje fibroze koštane srži u PMF (P=0,045 za PMF, n.z. za SMF i MF) i nižim CRPom (P=0,037 za MF, P=0,036 za PMF, n.z. za SMF). GLI1 IRS u vaskularnim endotelnim stanicama nije bio statistički značajno povezan s OS.
- Viši GLI1 IRS u megakariocitima i u mijelolozi nisu pokazivali statistički značajnih kliničkih korelacija.
- Viša *GLI1* mRNA ekspresija bila je povezana s višom razinom serumskog željeza u PMF (P=0,007 za PMF, n.z. za MF i SMF) i višom saturacijom transferina u PMF

(P=0,034 za PMF, n.z. za SMF i MF). *GLI1* mRNA ekspresija nije bila statistički značajno povezana s OS.



Slika 30: A) GLI1 imunohistokemijski postotni skor nije se statistički značajno razlikovao između dijagnoza. **B)** GLI1 IRS u megakariocitima bio je statistički značajno veći u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na kontrole.



Slika 31: GLI1 imunohistokemijski postotni skor nije statistički značajno utjecao na OS, prikazane su kategorije postotnog skora.

5.4. Povezanost između WNT i SHH signalnih puteva

Korelacije između globalne ekspresije pojedinih elemenata analiziranih signalnih puteva (izražene kao imunohistokemijski postotni skor i/ili mRNA ekspresija) prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12: Korelacije između globalne ekspresije elemenata pojedinih signalnih puteva (Spearmanova rank korelacija, Poz – pozitivna korelacija, Neg – negativna korelacija)

	WNT3a postotni skor	β-katenin postotni skor	*β-katenin* mRNA eks.	Sklerostin postotni skor	*SOST* mRNA eks.	SHH postotni skor	GLI1 postotni skor	*GLI1* mRNA eks.
WNT3a postotni skor	-	n.z.	**Poz P=0,015**	**n.z. (Poz P=0,104) ***	**n.z. (Poz P=0,111)**	**Poz P=0,032**	**Poz P=0,009**	n.z.
β-katenin postotni skor	n.z.	-	**Poz P=0,044**	**n.z. ***	n.z	n.z.	n.z.	n.z.
β-katenin mRNA eks.	**Poz P=0,015**	**Poz P=0,044**	-	n.z.	**n.z. (Poz P=0,053)**	**n.z. (Poz P=0,065)**	n.z.	n.z.
Sklerostin postotni skor	**n.z. (Poz P=0,104) ***	**n.z. ***	n.z.	-	n.z.	**n.z. ****	**n.z. ****	n.z.
SOST mRNA eks.	**n.z. (Poz P=0,111)**	n.z.	**n.z. (Poz P=0,053)**	n.z.	-	n.z.	n.z.	n.z.
SHH postotni skor	**Poz P=0,032**	n.z.	**n.z. (Poz P=0,065)**	**n.z. ****	n.z.	-	**Poz P<0,001**	**n.z. *****
GLI1 postotni skor	**Poz P=0,009**	n.z.	n.z.	**n.z. ****	n.z.	**Poz P<0,001**	-	**n.z. *****
GLI1 mRNA eks.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	**n.z. *****	**n.z. *****	-

*WNT3 imunohistokemijski postotni skor statistički je značajno korelirao sa Sklerostin IRS u mijelolozi (Poz, P=0,042). β-katenin imunohistokemijski skor statistički je značajno korelirao sa Sklerostin IRS u megakariocitima (Poz, P=0,015) i Sklerostin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,014).

**Sklerostin imunohistokemijski postotni skor statistički je značajno korelirao sa SHH IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,049). SHH imunohistokemijski postotni skor statistički je značajno korelirao sa Sklerostin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,02). GLI1 imunohistokemijski postotni skor statistički je značajno korelirao sa Sklerostin IRS u megakariocitima (Poz, P=0,008), Sklerostin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,001) i Sklerostin IRS u mijelolozi (Poz, P=0,005).

***_GLI1_ mRNA ekspresija statistički je značajno korelirala sa SHH IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,002) i GLI1 IRS u vaskularnim endotelnim stanicama (Poz, P=0,024).

6. RASPRAVA

Rezultati prikazanog istraživanja pokazuju da su WNT i SHH signalni putevi aktivirani u oboljelih od PMF i SMF i sudjeluju u patogenezi ovih bolesti. Elementi kanonskog WNT signalnog puta su evidentno ukupno jače eksprimirani (kao i u pojedinim vrstama stanica) u odnosu na kontrole, dok su elementi SHH signalnog puta pojačano eksprimirani samo u megakariocitima (koji predstavljaju tumorske stanice) u oboljelih od PMF i SMF u odnosu na kontrole. Aktivacija kanonskog WNT signalnog puta mogla bi imati ulogu u neoangiogenezi, a pojačana ekspresija SHH u progresiji bolesti. Ove spoznaje podupiru našu hipotezu da postoji narušena ravnoteža gena i proteina ovih puteva u PMF i SMF i u skladu su s dijelom do sada objavljenih rezultata drugih autora koje elaboriramo u sljedećim odjeljcima. Uz iznimku imunohistokemijski analiziranog ekspresijskog profila β-katenina u PMF u odnosu na kontrole (kojeg naši rezultati potvrđuju), sve drugo prikazano predstavlja nove i originalne spoznaje u PMF i SMF. U usporedbi s ranijim rezultatima zaključujumo kako je ekspresijski profil β-katenina u post PRV i post ET SMF puno sličniji PMF nego izvornim bolestima (PRV i ET).

Naši rezultati također ukazuju da ekspresija pojedinih elemenata kanonskog WNT i SHH signalnih puteva pozitivno korelira zajedno što je u skladu sa modelom u kojem ovi signalni putevi čine veću zajedničku mrežu međusobno isprepletenih signalnih puteva (76). Jedan od centralnih citokina važnih za patogenezu mijelofibroze, TGF-β (31,32,147,148), može pojačati ekspresiju molekula kanonskog WNT signalnog puta (β-katenin (149,150), Sklerostin (151,152)) i Sonic Hedgehog signalnog puta (SHH (153), GLI1 (154)) što je pokazano u različitim kontekstima. Pojačana aktivacija WNT i SHH signalnih puteva u PMF i post Ph-MPN SMF vjerojatno je odraz snažne upalne atmosfere prisutne u Ph- MPN koja formira mikrookoliš pogodan za preživljavanje i rast tumora. PMF i SMF značajno negativno utječu na kvalitetu života oboljelih (21), pokazuju agresivan klinički tijek (25), a trenutno dostupne terapijske opcije nisu zadovoljavajuće. Dokazi pojačane aktivacije kanonskog WNT i SHH signalnih puteva i kliničke korelacije koje smo pokazali mogu pomoći u identificiranju novih terapijskih pristupa u ovih bolesnika.

Osvrnut ćemo se na karakteristike bolesnika, WNT signalni put, SHH signalni put, ograničenja našeg istraživanja te na publikacije proizašle iz istraživanja.

6.1. Osvrt na karakteristike bolesnika

U usporedbi s jednom od većih publiciranih kohorti bolesnika s PMF (1000 bolesnika liječenih u Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) (155), karakteristike naših bolesnika odgovaraju prethodno objavljenima bez većih odstupanja. Medijan dobi naših bolesnika s mijelofibrozom bio je 67 godina. Drugim riječima preko pola bolesnika bilo je starije životne dobi (>65 godina) što ograničava moguće terapijske opcije i predstavlja bod više u sustavima procjene rizika smrti IPSS i DIPSS. Muškarci čine većinu bolesnika (61%) što je također u skladu s tuđim observacijama.

Učestalost *JAK2* V617F mutacije je iznosila 68% i bila je podjednaka u grupi bolesnika s PMF i SMF. „Relativno visoka“ učestalost *JAK2* V617F mutacije u grupi PMF bolesnika u odnosu na neke ranije observacije vjerojatno je odraz selekcijske pristranosti (eng. selection bias) prilikom postavljanja dijagnoze jer je dokaz *JAK2* V617F mutacije jedan od velikih dijagnostičkih kriterija za PMF (i druge Ph- MPN). Prijavljena učestalost *JAK2* V617F mutacije u PMF (156) razlikuje se od 35% (8) pa čak do 95% (157), te se u novijim kohortama bolesnika nalaze postoci znatno iznad 50% (između 60% i 70%) ovih bolesnika (48,155,158,159) kao i kod nas. Moguće je da je u ranijim kohortama gdje je niža učestalost *JAK2* mutiranih bolesnika riječ o većem udjelu reaktivnih fibroza koštane srži u sklopu drugih zbivanja (*JAK2* V617F mutacija otkrivena je tek 2005. godine).

Populacije naših bolesnika s PMF i SMF razlikovale su se u udjelu bolesnika s višim stupnjem fibroze koštane srži što je posljedica dijagnostičkih kriterija za post Ph- MPN SMF (39) koji zahtjevaju prisutnost barem stupnja 2 fibroze koštane srži, a bolesnici s PMF ne moraju uopće imati razvijenu fibrozu koštane srži da bi se postavila dijagnoza (22). Također, bolesnici sa SMF imali su veću učestalost leukemijske transformacije što govori u prilog tome da fibroza u ovih bolesnika predstavlja progresiju malignog klona uz akumulaciju dodatnih genetičkih abnormalnosti (38) te se isto manifestira agresivnijom biologijom bolesti. Isto može biti i posljedica činjenice da su klinički simptomi na osnovu kojih se postavlja sumnja na transformaciju PRV ili ET u sekundarnu mijelofibrozu i akutnu leukemiju jednaki. Evaluacija stanja zahtjeva biospiju kosti koja predstavlja znatan stupanj nelagode za bolesnike. Stoga simptomi/znakovi obično trebaju biti jasno izraženi kroz određeni vremenski period te je fibroza koštane srži moguće prethodila razvoju akutne leukemije u ovih bolesnika bez da je odmah prepoznata. Bolesnici s PMF i SMF nisu se statistički značajno razlikovali u

ostalim parametrima uključujući klinički ishod (preživljenje) što govori u prilog tome da je riječ o vrlo sličnim entitetima.

Preživljenje naših bolesnika bilo je u skladu s očekivanim medijanom preživljenja od 5-6 godina (64) i standardni prognostički bodovni sustavi (IPSS, DIPSS) mogli su uspješno razlučiti grupe bolesnika s različitim rizikom smrti. Ovo također potvrđuje da je populacija evaluirana u našem istraživanju prema glavnim odlikama bolesti u skladu s ranije objavljenim kohortama drugih autora.

6.2. Osvrt na kanonski WNT signalni put

Naši rezultati govore za pojačanu ukupnu ekspresiju WNT3a i β-katenina unutar koštanih srži oboljelih od PMF i SMF što pridonosi snažnoj upalnoj atmosferi koja se susreće u ovim bolestima. Uz navedeno, identificirali smo pojačanu ekspresiju kanonskog WNT liganda WNT3a u megakariocitima i kanonskog WNT efektora β-katenina unutar vaskularnih endotelnih stanica u oboljelih u odnosu na kontrole. Megakariociti predstavljaju dio malignog klona, a pojačana vaskularizacija je tipična za bolest i potpomaže maligni potencijal tumora. Time smo identificirali tumorske stanice kao jedan od izvora kanonskog WNT signala i pokazali da aktivacija kanonskog WNT puta ima moguću ulogu u neoangiogenezi u ovim bolestima.

Identificirali smo tri ranija rada koji su evaluirali ekspresiju β-katenina u bolesnika s PMF, ali u svim su radovima bolesnici s PMF bili evaluirani kao dio većih Ph- MPN kohorti i radovi nisu bili primarno fokusirani na njih. Niti jedan od tih radova nije evaluirao bolesnike sa SMF. **U prvom radu** su Serinsoz i sur. (97) analizirali *β-katenin* mRNA ekspresiju u bolesnika s različitim hematološkim neoplazmama (uključujući PRV, ET i PMF) i kontrolnih ispitanika koji su imali reaktivnu hiperplaziju megakariopoeze i/ili eritropoeze. Autori su utvrdili kako nije prisutna statistički značajna razlika u *β-katenin* mRNA ekspresiji između PRV, ET, PMF i kontrolne skupine. Naši rezultati su u suprotnosti s navedenima. Za napomenuti je kako su autori izolirali mRNA iz uzoraka koštanih srži uklopljenih u parafin i kao kontrola su korišteni ispitanici s reaktivno aktiviranom hematopoezom što je moguće uzrok razlike u njihovim i našim rezultatima (kod nas je mRNA izolirana iz mononuklearnih stanica aspirata koštane srži, a prisutna je statistički značajna razlika između PMF i kontrolnih ispitanika u kojih nije bila prisutna reaktivna hiperplazija koštane srži). U istom radu opisano je kako je imunohistokemijski u svim analiziranim uzorcima bio prisutan pozitivitet vaskularnih endotelnih stanica, a isti je bio jako izražen u Ph- MPN što je u skladu s našim observacijama. **U drugom radu** su Jauregui i sur. (98) imunohistokemijski analizirali ekspresiju β-katenina u megakariocitima oboljelih od CML, PRV, ET, PMF i kontrolnih ispitanika bez zahvaćanja koštane srži hematološkom bolesti. Autori su utvrdili slabu do odsutnu ekspresiju β-katenina u megakariocitima većine PMF bolesnika, razlika je bila statistički značajna u odnosu na PRV i ET koji su imali jače izraženu ekspresiju β-katenina. Iako nije opisano, iz prezentiranih se rezultata može zaključiti kako nije bilo statistički značajne razlike između PMF i kontrola. Iako rezultati nisu izraženi na jednak način, u našem

istraživanju nismo detektirali razliku između β-katenin IRS u megakariocitima u oboljelih od PMF, SMF i kontrola što je u skladu s navedenim radom. Post PRV SMF i post ET SMF nisu iste bolesti kao PRV i ET na što ćemo se osvrnuti kod trećeg rada. **U trećem radu** su Geduk i sur. (99) imunohistokemijski analizirali ekspresiju β-katenina u koštanim sržima oboljelih od PRV, ET, PMF i kontrolnih ispitanika bez zahvaćanja koštane srži hematološkom bolesti. Autori su rezultate prezentirali u obliku IRS u megakariocitima, mijelolozi i vaskularnim endotelnim stanicama kao i mi te su naši rezultati lakše usporedivi nego u prethodnom slučaju. Utvrdili su da je β-katenin IRS u megakariocitima oboljelih od PMF statistički značajno niži u odnosu na PRV i ET, ali nisu detektirali statistički značajnu razliku za PMF u odnosu na kontrole. Također su utvrdili kako je β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama u PMF statistički značajno viši u odnosu na PRV, ET i kontrole. Nisu našli razliku u β-katenin IRS u mijelolozi u odnosu na različite dijagnoze. Naše observacije o pojačanoj ekspresiji β-katenina u vaskularnim endotelnim stanicama u PMF u odnosu na kontrole, kao i podjednakoj ekspresiji β-katenina u megakariocitima i mijelolozi u PMF u odnosu na kontrole su u skladu s navedenima. Napominjemo vrlo zanimljivu observaciju da iako u našem istraživanju nije bila prisutna statistički značajna razlika u ekspresiji β-katenina mjerenoj na sve opisane načine između PMF i (post PRV, post ET) SMF, uočili smo da je medijan β-katenin IRS u megakariocitima oboljelih od SMF nešto viši, a medijan β-katenin IRS u vaskularnim endotelnim stanicama nešto niži u odnosu na PMF. Naši rezultati ipak jasno ukazuju da post PRV i post ET SMF nisu iste bolesti kao PRV i ET te da, iako možda nose neke odlike izvornih bolesti, pokazuju ekspresijski profil β-katenina koji je puno sličniji PMF nego izvornim bolestima. Također se može spekulirati kako je agresivnija biologija bolesti/sklonost razvoju fibroze (PMF i SMF u odnosu na PRV i ET) vezana sa slabije izraženom ekspresijom β-katenina **u megakariocitima** (ne i ukupno manjom ekspresijom unutar koštane srži). Tome u prilog govori i povezanost više ekspresije β-katenina u megakariocitima i boljeg preživljenja koju smo observirali u našoj kohorti bolesnika. Ovdje naglašavamo megakariocite jer je AML (koja predstavlja konačnu formu progresije ovih bolesti) karakterizirana visokom ukupnom ekspresijom β-katenina (97) i ista je vezana uz lošije preživljenje bolesnika s AML (160). Nismo detektirali drugih značajnih povezanosti ekspresije WNT3a ili β-katenina s preživljenjem bolesnika u našoj kohorti bolesnika. Sukladno tome, pojedini načini mjerenja ekspresije WNT3a i β-katenina korelirali su s različitim čimbenicima koji pozitivno i negativno mogu utjecati na preživljenje bolesnika, iako su to češće bili negativni prognostički čimbenici – veći broj leukocita, viši stupanj fibroze koštane srži.

Zanimljive i na prvi pogled proturječne observacije vezane su uz odnos pojačane ekspresije elemenata kanonskog WNT signalnog puta i razine hemoglobina. Viša ukupna ekspresija WNT3a bila je povezana s višom razinom hemoglobina, dok je viša ukupna *β-katenin* ekspresija bila povezana s nižim razinom hemoglobina gledano u cjelokupnoj kohorti bolesnika s mijelofibrozom. Ipak, uočavamo da je pozitivna korelacija WNT3a postotnog skora s višom razinom hemoglobina bila statistički značajna samo za grupu bolesnika sa SMF, a sličan fenomen pozitivne povezanosti s razinom hemoglobina vidjeli smo i kod *SOST* mRNA ekspresije također samo u grupi SMF (rezultat granične statističke značajnosti). S druge strane, povezanost više *β-katenin* ekspresije s nižom razinom hemoglobina vidljiva je i u PMF i u SMF bolesnika (gdje je rezultat granične statističke značajnosti).

Ovo tumačimo na dva načina. Prvo, grupa bolesnika sa SMF sastoji se većinom od bolesnika s post PRV SMF (PRV u prefibrotskoj fazi odlikuje snažna eritroidna proliferacija i visoke razine hemoglobina) te je moguće da je povezanost WNT3a s višom razinom hemoglobina u SMF odraz karakteristika izvorne bolesti. Prethodno citirani rad Geduka i sur. (99) utvrdio je pozitivnu korelaciju između **β-katenin ekspresije u megakariocitima** i razine hemoglobina u ukupnoj kohorti bolesnika s Ph- MPN (koja se sastojala od 43 bolesnika s ET, 7 bolesnika s PRV i samo 16 bolesnika s PMF). Temeljna razlika u biologiji ovih bolesti se manifestira upravo različitim razinama hemoglobina koje su vrlo visoke u PRV (koja je ujedno u radu pokazivala više vrijednosti β-katenin ekspresije u megakariocitima), a obično snižene u PMF (koja je u radu pokazivala niže vrijednosti β-katenin ekspresije u megakariocitima), a autor ih je analizirao zajedno. Spekuliramo da bi aktivacija kanonskog WNT signalnog puta (pa tako i WNT3a) u PRV bolesnika zaista mogla biti povezana s višim razinama hemoglobina, ali ove rezultate iz opisanih razloga ne može smatrati reprezentativnima i za PMF.

Drugo, samo u bolesnika sa SMF smo uočili da su pojačane ekspresija WNT3a (aktivator kanonskog WNT signalinga) i *SOSTa* (inhibitor kanonskog WNT signalinga) pozitivno korelirale s razinom hemoglobina. Stoga je neto učinak na aktivaciju β-katenina u sklopu rastućih vrijednosti hemoglobina bio bar dijelom uravnotežen. β-katenin je efektor kanonskog WNT signalnog puta na koji utječe i niz drugih čimbenika u sklopu mreže signalnih puteva (74). On može biti pojačano eksprimiran kao posljedica djelovanja više citokina bitnih za patogenezu PMF (TGF-β (149,150), FGF (161), PDGF (162,163)). Dakle, kanonski WNT signal moduliran je na više razina i prema našim je rezultatima njegova aktivnost kroz β-katenin ekspresiju u konačnici i u PMF i u SMF povezana s nižim razinama hemoglobina. Korelacija pojačane ekspresije β-katenina i niže razine hemoglobina može ukazivati na to da

β-katenin svojim djelovanjem potencira anemiju, ali i da su oboje pojačana β-katenin ekspresija i niža razina hemoglobina odraz aktivnije bolesti. Budući da su naše korelacije dobivene na čistoj kohorti bolesnika s PMF (isto vrijedi i za SMF), vjerujemo da pokazuju realnije stanje stvari u odnosu na citirane prethodno objavljene rezultate (99).

Iako se ekspresija Sklerostina/*SOSTa* nije statistički značajno razlikovala između PMF, SMF i kontrola, naše observacije ukazuju da je ona vrlo bitna za prognozu bolesnika s PMF. Viša ukupna ekspresija Sklerostina u koštanoj srži bila je povezana s boljim ukupnim preživljenjem. To tumačimo snažnijim inhibitornim djelovanjem na kanonski WNT signalni put unutar koštane srži što je glavna molekularna uloga Sklerostina (102). Viša ekspresija Sklerostina/*SOSTa* bila je povezana s manjim postotkom cirkulirajućih blasta i većim brojem trombocita, a oboje pridonosi povoljnijoj prognozi prema jednom od prognostičkih skorova (DIPSS plus) (164). S druge strane ovisnost o transfuziji i starija životna dob s kojima su također pozitivno korelirale vrijednosti Sklerostina/*SOSTa* vezane su uz lošiju prognozu (164), ali se isto nije manifestiralo kroz lošije preživljenje naših bolesnika. Prethodno je opisana pozitivna povezanost razine Sklerostina u serumu i dobi bolesnika (118,165). U više je kohorti ispitanika također opisano kako razina Sklerostina u serumu pozitivno korelira s mineralnom gustoćom kostiju (116,117,119) (vjerojatno kao odraz veće koštane mase i većeg broja osteocita) što je pomalo iznenađujuće s obzirom na učinkovitost Sklerostin inhibicije u liječenju osteoporoze (114). U našoj kohorti bolesnika nismo observirali statistički značajnu razliku u ekspresiji Sklerostina/*SOSTa* u bolesnika sa stupnjem 3 fibroze koštane srži (koji obično imaju razvijenu osteosklerozu) u odnosu na ostale.

Nismo identificirali razlike u ekspresiji elemenata kanonskog WNT signalnog puta u odnosu na *JAK2* V617F mutacijski status, što je u skladu s iskustvom Geduk i sur. (99) i sugerira da aktivacija β-katenina nezavisno doprinosi patogenezi PMF i SMF. Potencijalna veza između ova dva puta ipak postoji. Liu i sur. (166) su pokazali da JAK specifična blokada može smanjiti ekspresiju β-katenina u Jurkat stanicama (ljudska akutna T-stanična leukemija) i u HEL stanicama (ljudska eritroleukemija). Ovaj se učinak može oslabiti smanjenjem ekspresije Proteina-s-ponavljajućim-elementima-koji-sadržavaju-transducin-beta (β-TrCP prema eng. beta-Transducin-repeat-containing-protein) koristeći specifičnu kratku RNA poput ukosnice (shRNA prema eng. short hairpin RNA) što identificira β-TrCP kao scjecište ova dva signalna puta.

6.3. Osvrt na SHH signalni put

Naši rezultati govore za pojačanu ekspresiju SHH i GLI1 u megakariocitima oboljelih od PMF i SMF, iako nismo detektirali globalno veću ekspresiju elemenata SHH signalnog puta u koštanim sržima oboljelih od ovih bolesti u odnosu na kontrole. U slučaju SHH, ovaj je fenomen bio snažnije izražen u oboljelih od SMF u usporedbi s PMF što može biti odraz odlika izvornih bolesti (za koje nije poznato kakav ekspresijski profil SHH pokazuju). Megakariociti koji predstavljaju dio tumorskog klona su i glavni izvor Hedgehog liganda SHH i ciljna stanica kanonskog SHH efektora GLI1. Ovo ukazuje da je autokrini kanonski SHH signaling koji je prepoznat u drugim malignim bolestima (130) vjerojatno prisutan i u oboljelih od PMF i SMF. Nije bilo razlike u prosječnoj ekspresiji SHH u vaskularnim endotelnim stanicama i u mijelolozi (koja također predstavlja dio tumorskog klona) u bolesnih u odnosu na kontrole. Ipak, pojačana ekspresija SHH u ovim vrstama stanica odražavala se na lošiji klinički tijek oboljelih. To tumačimo na način da opsežnije prisutna produkcija SHH vjerojatno pridonosi održavanju za tumor pogodnog mikrookoliša što može utjecati na veću malignost i agresivnije ponašanje bolesti, time i na lošiju prognozu. GLI1 ekspresija nije pokazivala slične kliničke korelacije što pak sugerira da učinci pojačane SHH stimulacije nisu nužno vezani uz kanonski (GLI ovisni) SHH signaling već moguće uz aktivaciju drugih signalnih kaskada (PI3K/AKT, RAS/MAPK (167-169)). Nismo detektirali povezanost ukupne ekspresije SHH i GLI1 s preživljenjem bolesnika. Sukladno tome, ekspresija SHH i GLI1 izražena na različite načine korelirala je s čimbenicima koji mogu pozitivno i negativno utjecati na preživljenje bolesnika.

Dosadašnje spoznaje o SHH signalnom putu u PMF i SMF su oskudne i nisu jasno definirane. **Temeljni rad** na kojem su bazirane kasnije kliničke studije ispitivanja Hedghog inhibitora u bolesnika s PMF je objavljen samo kao kongresni sažetak. U njemu su Bhagwat i sur. (139) naveli 20 do 100 puta veću ekspresiju SHH ciljnih gena uključujući GLI1 i Patched1 u granulocitima izoliranim iz oboljelih od MPN u usporedbi s zdravim kontrolama koristeći RT-PCR. Autori nisu naveli o kojim je točno dijagnozama riječ, koliko je bilo bolesnika ukupno i s pojedinačnim dijagnozama (nije jasno koliko je bilo bolesnika s mijelofibrozom niti jesu li svi bolesnici bili Ph-), kao ni statističku značajnost rezultata. U istom radu je navedeno da je uočena aktivacija SHH signalnog puta u mišjem modelu bolesti (transplantacijski model PMF/ET) koristeći Gli-luciferaza izvjestiteljski sustav (eng. luciferase reporting system). Također su opisani učinci kombinacijske terapije selektivnog

Smoothend inhibitora (Sonidegib, LDE225) i JAK inhibitora (Ruxolitinib, INC424) u mišjem modelu bolesti i to smanjenje fibroze koštane srži, veličine slezene, broja leukocita, broja trombocita te opterećenja mutiranim *JAK2* alelom. U našem istraživanju nismo detektirali razliku u ukupnoj ekspresiji GLI1 unutar koštane srži u oboljelih od PMF ili SMF u odnosu na kontrole što je u suprotnosti s rezultatima citiranog rada. **U drugom radu** su Zingariello i sur. (170) u Gata1^{low} mišjem modelu mijelofibroze utvrdili pojačanu ekspresiju Hedgehog ciljnih gena u koštanoj srži i slezeni. Na osnovu ovih informacija nekoliko inhibitora SHH signalnog puta istražuje se **u ranim fazama kliničkih ispitivanja** u oboljelih od mijelofibroze kao pojedinačna ili kombinacijska terapija (42,141), ali za sada s različitom učinkovitošću (140,171,172). U skladu s dosadašnjim skromnim rezultatima inhibicije kanonskog SHH signalnog puta u oboljelih od mijelofibroze su i naše observacije kako se ukupna ekspresija GLI1 (efektora kanonskog SHH signalnog puta) nije razlikovala u odnosu na kontrole, kao i to da nije utjecala na preživljenje u kohorti naših bolesnika. Važno je napomenuti da je GLI1 ekspresija izražena na različite načine korelirala s prisutnošću B simptoma u SMF i većim stupnjem fibroze koštane srži u PMF što je oboje prepoznato kao negativni prognostički čimbenici.

Istaknut ćemo još posebno zanimljivu observaciju kako su bolesnici s leukemijskom transformacijom mijelofibroze imali statistički značajno višu ekspresiju SHH u odnosu na ostale bolesnike. Ovaj fenomen sugerira kako je veća agresivnost tumorskog klona povezana s većom ekspresijom SHH, odnosno da ovaj signalni puta ima ulogu u progresiji bolesti. Slično je ranije opisano u CML gdje je tijekom progresije bolesti prema nezrelijim oblicima stanica uočena sve snažnija aktivnost SHH signalnog puta (134,136). U ovoj je bolesti SHH signaling prepoznat kao važan za preživljenje tumorskih matičnih stanica, a sugerirano je kako SHH demonstrira svoje učinke kroz aktivaciju β-katenina (136). Nismo uočili statistički značajnu razliku u ekspresiji GLI1 ili drugih istraživanih gena/proteina u odnosu na leukemijsku transformaciju što je moguće zbog malog broja ovih bolesnika u uzorku.

Nismo utvrdili razliku u ekspresiji elemenata SHH signalnog puta u odnosu na *JAK2* V617F mutacijski status. Zanimljivo je spomenuti kako nekanoski SHH (GLI neovisni) signaling može aktivirati neke iste signalne kaskade kao i mutirani JAK2 (PI3K/AKT, RAS/MAPK (167)), te teoretski potencirati stimulaciju maligne stanice ovim putem.

6.4. Ograničenja istraživanja

Populacija analizirana u prikazanom istraživanju je relativno heterogena (u smislu različitih karakteristika bolesnika) i predstavlja spektar oboljelih od primarne i sekundarne mijelofibroze. Stoga smo svoje rezultate izražavali za PMF i SMF bolesnike zasebno, te za ukupnu populaciju bolesnika. Studija je retrospektivne naravi i predstavlja iskustvo jednog centra. Broj analiziranih ispitanika (66 bolesnika s mijelofibrozom, 51 bolesnik s PMF i 15 bolesnika sa SMF) je srednje veličine s obzirom na nisku učestalost ovih bolesti i omogućava nam da karakteriziramo poremećaje kanonskog WNT i SHH signalinga u ovim bolestima u odnosu na kontrole. Ipak, nije dovoljno velik za detaljnije analize zanimljivih kliničkih korelacija s obzirom na pojedine podgrupe bolesnika. Prikazani rezultati naravno ne mogu biti definitivni, ali predstavljaju originalni znanstveni doprinos i potiču nove hipoteze koje treba istraživati u budućim studijama.

6.5. Publikacije proizašle iz istraživanja

1. Dio rezultata ovog istraživanja vezan uz aktivaciju kanonskog WNT signalnog puta i njegove kliničke korelacije objavljen je u časopisu *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* (indeksiran u *Current Contents*, IF 2,559) (173).

2. Tijekom istraživanja uočili smo kako je viši stupanj anizocitoze (mjeren kao RDW) statistički značajno povezan s kliničkim parametrima u PMF koji odražavaju težu bolest višeg rizika, ali i lošijim ukupnim preživljenjem. Ove observacije objavljene su u časopisu *Acta Haematologica* (indeksiran u *Current Contents*, IF 1,053) (174).

3. Tijekom istraživanja uočili smo kako stupanj 3 fibroze koštane srži utječe na lošije preživljenje bolesnika s mijelofibrozom s različitom statističkom značajnošću ovisno koji se komercijalni statistički program koristi?! Analizom problema uočili smo da različiti statistički programi koriste matematički različite verzije log-rank testa, ali ga prijavljuju pod istim imenom. Ove observacije i prateći vlastiti statistički program koji služi za demonstraciju problema objavljeni su u časopisu *Biochemia Medica* (indeksiran u *Current Contents*, IF 3,051) (175).

4. Zbog potrebe redovitih analiza uslijed stalnog ažuriranja baze podataka razvijen je MS Excel statistički program koji omogućava brzi skrining čimbenika koji utječu na preživljenje koristeći log-rank test. Ovaj program je objavljen u sklopu članka vezanog uz opis log-rank testa u časopisu *Croatian Medical Journal* (indeksiran u *Current Contents*, IF 1,483) (146), a korišten je prilikom izrade finalne verzije disertacije.

7. ZAKLJUČCI

1. U koštanim sržima oboljelih od PMF i SMF prisutna je ukupno pojačana ekspresija elemenata kanonskog WNT signalnog puta (WNT3a, β-katenin) u odnosu na kontrole.

2. Ekspresija WNT3a bila je pojačana u megakariocitima oboljelih od PMF i SMF u odnosu na kontrole što identificira tumorske stanice kao izvor kanonskog WNT signala.

3. Ekspresija β-katenina bila je pojačana u vaskularnim endotelnim stanicama PMF i SMF u odnosu na kontrole što ukazuje na moguću ulogu kanonskog WNT puta u neoangiogenezi u ovim bolestima.

4. Viša ekspresija β-katenina bila je povezana s nižim vrijednostima hemoglobina te bi aktivacija kanonskog WNT puta mogla potencirati razvoj anemije.

5. U usporedbi s prethodno objavljenim iskustvima, ekspresijski profil β-katenina u post PRV i post ET SMF puno je sličniji PMF nego izvornim bolestima (PRV i ET). Niža ekspresija β-katenina u megakariocitima mogla bi ukazivati na veću agresivnost bolesti što se manifestira slabijim preživljenjem oboljelih.

6. Iako se ekspresija Sklerostina/*SOSTa* nije razlikovala između bolesnih i kontrola, bolesnici s višom ekspresijom imali su bolje preživljenje, a ovi su učinci vjerojatno posredovani kroz inhibiciju kanonskog WNT signalnog puta.

7. Ukupna ekspresija SHH i GLI1 u koštanim sržima nije se razlikovala između bolesnih i kontrolnih ispitanika.

8. Ekspresija SHH i GLI1 bila je povišena u megakariocitima oboljelih od PMF i SMF odnosu na kontrole. Megakariociti (tumorske stanice) su glavni izvor i glavni cilj kanonskog SHH signalnog puta što sugerira autokrinu stimulaciju.

9. Iako se ekspresija SHH u vaskularnim endotelnim stanicama i mijelolozi nije razlikovala između bolesnih i kontrola, pojačana ekspresija SHH u ovim vrstama stanica bila je povezana s lošijim preživljenjem oboljelih. Učinci pojačane SHH ekspresije nisu nužno vezani uz kanonski SHH signaling.

10. Bolesnici s leukemijskom transformacijom bolesti imali su značajno višu ekspresiju SHH u odnosu na ostale što ukazuje da bi ovaj signalni put mogao imati ulogu u progresiji bolesti.

11. Ekspresija pojedinih elemenata kanonskog WNT i SHH signalnih puteva pozitivno korelira zajedno što je u skladu s modelom u kojem ovi signalni putevi čine veću zajedničku mrežu međusobno isprepletenih signalnih puteva.

12. Ovi novoizneseni dokazi pojačane aktivacije kanonskog WNT i SHH signalnih puteva i kliničke korelacije koje smo pokazali mogu pomoći u identificiranju novih terapijskih pristupa u ovih bolesnika.

8. SAŽETAK

Primarna (PMF) i sekundarna mijelofibroza (SMF) su maligne bolesti hematopoetske matične stanice. WNT i SHH signalni putevi sudjeluju u procesima kontrole stanične diobe, fibroze i neoangiogeneze koji su tipično poremećeni u ovim bolesti.

Imunohistokemijski i lančanom-reakcijom-polimeraze-u-realnom-vremenu (RT-PCR) istražili smo ekspresiju WNT3a, β-katenina, Sklerostina/*SOSTa*, SHH i GLI1 u ukupno 66 bolesnih (51 PMF, 15 SMF) i 18 zdravih uzoraka koštane srži i korelirali je s kliničkim parametrima.

Elementi kanonskog WNT signalnog puta bili su ukupno jače eksprimirani u PMF i SMF u odnosu na kontrole i mogli bi potencirati anemiju. Ekspresijski profil β-katenina u SMF sličniji je PMF nego izvornim bolestima (PRV/ET). Ekspresija Sklerostina nije se razlikovala u odnosu na kontrole, ali je utjecala na bolje preživljenje bolesnika. Elementi SHH signalnog puta bili su pojačano eksprimirani u megakariocitima oboljelih, ali nisu bili ukupno jače eksprimirani u odnosu na kontrole. SHH ekspresija bila je pojačana u leukemijskoj transformaciji bolesti. Ekspresija pojedinih elemenata kanonskog WNT i SHH signalnih puteva pozitivno korelira zajedno što je u skladu s modelom u kojem ovi putevi čine veću međusobno povezanu mrežu signalnih puteva.

Naši rezultati ukazuju da kanonski WNT i SHH signalni putevi imaju ulogu u patogenezi PMF i SMF.

Ključne riječi: Philadephia kromosom negativna mijeloproliferatvna neoplazma; Mijelofibroza; WNT; Sklerostin; Hedgehog

9. SUMMARY

Primary (PMF) and secondary myelofibrosis (SMF) are malignant diseases originating from transformed hematopoietic stem cell. WNT and SHH signaling pathways are involved in processes of cell cycle regulation, fibrosis and neoangiogenesis that are typically deranged in these diseases.

Using immunohistochemistry and real-time-polymerase-chain-reaction (RT-PCR) we investigated WNT3a, β-catenin, Sclerostin/*SOST*, SHH and GLI1 expression in totally 66 diseased (51 PMF, 15 SMF) and 18 healthy bone marrow samples. Correlations with clinical parameters were made.

Canonical-WNT signaling pathway elements were globally higher expressed in PMF and SMF than in controls and might potentiate anemia. SMF β-catenin expression profile is more similar to PMF than to PRV/ET. Sclerostin expression did not differ between diseased and healthy patients, but positively affected overall survival in diseased patients. SHH signaling pathway elements were higher expressed in megakaryocytes of PMF and SMF than in controls, but were not globally higher expressed. SHH expression was higher in leukemic transformation of disease. Expression of particular elements of both signaling pathways positively correlated together which is in line with the model that these pathways are a part of larger interconnected network.

Our results suggest that canonical-WNT and SHH signaling pathways play a role in pathogenesis of PMF and SMF.

Keywords: Philadephia chromosome negative myeloproliferative neoplasm; Myelofibrosis; WNT, Sclerostin; Hedgehog

Analysis of genes and proteins of Wnt and Sonic Hedgehog signaling pathways in primary and secondary myelofibrosis (Marko Lucijanic, 2017)

10. LITERATURA

1. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute.* 1960;25:85-109.
2. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290-293.
3. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985;315(6020):550-554.
4. Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, de Klein A, Verma RS, Coleman M i sur. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *The New England journal of medicine.* 1985;313(23):1429-1433.
5. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM i sur. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine.* 2001;344(14):1031-1037.
6. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S i sur. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054-1061.
7. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C i sur. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144-1148.
8. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ i sur. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell.* 2005;7(4):387-397.
9. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR i sur. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England journal of medicine.* 2005;352(17):1779-1790.
10. Chen E, Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program.* 2014;2014(1):268-276.

11. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC i sur. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2006;107(5):2098-2100.
12. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Miyazawa K, Kimura Y i sur. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia.* 2005;19(12):2359-2360.
13. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in physiology.* 2014;5:3.
14. Crosbie OM, Reynolds M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology.* 1999;29(4):1193-1198.
15. Chen B, Mao B, Huang S, Zhou Y, Tsuji K, Ma F. *Human Embryonic Stem Cell-Derived Primitive and Definitive Hematopoiesis.* 2014.
16. Embryonic and Fetal Stages of Hematopoisis. http://www.digital-world-medical-school.net/01.%20Medical%20School/1.%201st/10.%20Organogenesis,%20Histology,%20and%20Physiology%20of%20Body%20Systems/03.%20Hematologic%20System/02.%20Bone%20marrow/01.%20Hematopoiesis/Hematopoesis%20by%20Age.PNG, 2016.
17. Del Fattore A, Capannolo M, Rucci N. Bone and bone marrow: the same organ. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2010;503(1):28-34.
18. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T i sur. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell stem cell.* 2013;13(3):285-299.
19. Buschle M, Janssen JW, Drexler H, Lyons J, Anger B, Bartram CR. Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia.* 1988;2(10):658-660.
20. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *European journal of haematology.* 2014;92(4):289-297.
21. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S i sur. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer.* 2007;109(1):68-76.

22. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA i sur. 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(4):1092-1097.
23. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Problems and pitfalls regarding WHO-defined diagnosis of early/prefibrotic primary myelofibrosis versus essential thrombocythemia. *Leukemia.* 2013;27(10):1953-1958.
24. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood cancer journal.* 2015;5:e366.
25. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Pierce S, Cortes J, Verstovsek S. Prognostic model to identify patients with myelofibrosis at the highest risk of transformation to acute myeloid leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2013;13(3):315-318 e312.
26. Martinaud C, Desterke C, Konopacki J, Pieri L, Torossian F, Golub R i sur. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Contributes to Primary Myelofibrosis. *Cancer research.* 2015;75(22):4753-4765.
27. Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of blood medicine.* 2010;1:13-19.
28. Kreipe H, Busche G, Bock O, Hussein K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2012;5 Suppl 1:S21.
29. Varricchio L, Mancini A, Migliaccio AR. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert review of hematology.* 2009;2(3):315-334.
30. Emadi S, Clay D, Desterke C, Guerton B, Maquarre E, Charpentier A i sur. IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood.* 2005;105(2):464-473.
31. Bock O, Loch G, Schade U, von Wasielewski R, Schlue J, Kreipe H. Aberrant expression of transforming growth factor beta-1 (TGF beta-1) per se does not discriminate fibrotic from non-fibrotic chronic myeloproliferative disorders. *The Journal of pathology.* 2005;205(5):548-557.

32. Le Bousse-Kerdiles MC, Martyre MC. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Annals of hematology.* 1999;78(10):437-444.
33. Barbui T, Thiele J, Carobbio A, Passamonti F, Rumi E, Randi ML i sur. Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. *Blood.* 2012;120(3):569-571.
34. Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS i sur. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2012;25(9):1193-1202.
35. Lekovic D, Gotic M, Perunicic-Jovanovic M, Vidovic A, Bogdanovic A, Jankovic G i sur. Contribution of comorbidities and grade of bone marrow fibrosis to the prognosis of survival in patients with primary myelofibrosis. *Medical oncology.* 2014;31(3):869.
36. Barosi G, Rosti V, Bonetti E, Campanelli R, Carolei A, Catarsi P i sur. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. *PloS one.* 2012;7(4):e35631.
37. 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(8):1128-1132.
38. Boiocchi L, Mathew S, Gianelli U, Iurlo A, Radice T, Barouk-Fox S i sur. Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(12):1577-1585.
39. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S i sur. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia.* 2008;22(2):437-438.
40. Su T, Zhang PH, Xu ZF, Chen HS, Qin TJ, Zhang Y i sur. [Analysis of clinical features and prognosis of primary myelodysplastic syndromes with myelofibrosis patients]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi.* 2012;33(5):378-382.

41. Paquette RL, Meshkinpour A, Rosen PJ. Autoimmune myelofibrosis. A steroid-responsive cause of bone marrow fibrosis associated with systemic lupus erythematosus. *Medicine.* 1994;73(3):145-152.
42. Zahr AA, Salama ME, Carreau N, Tremblay D, Verstovsek S, Mesa R i sur. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica.* 2016;101(6):660-671.
43. Lane SW, Mullally A. Hit the spleen, JAK! *Blood.* 2014;124(19):2898-2900.
44. Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Therapeutic advances in hematology.* 2011;2(1):21-32.
45. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M i sur. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS medicine.* 2006;3(7):e270.
46. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC i sur. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine.* 2013;369(25):2391-2405.
47. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH i sur. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* 2014.
48. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, Casetti I i sur. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062-1069.
49. Yonal I, Daglar Aday A, Akadam Teker B, Ceylan Y, Nalcaci M, Yavuz AS i sur. Impact of JAK2V617F Mutational Status on Phenotypic Features in Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology.* 2015.
50. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, Vannucchi AM i sur. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia.* 2011;25(12):1834-1839.
51. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E i sur. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood.* 2009;114(8):1477-1483.
52. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY i sur. 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(4):756-761.

53. Rozovski U, Manshouri T, Dembitz V, Bozinovic K, Pierce S, Kantarjian HM i sur. JAK2, Calr and MPL Mutation Status Predicts the Survival Outcome of Patients with Primary Myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(21):1829-1829.
54. Kim BH, Cho YU, Bae MH, Jang S, Seo EJ, Chi HS i sur. JAK2 V617F, MPL, and CALR Mutations in Korean Patients with Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. *Journal of Korean medical science.* 2015;30(7):882-888.
55. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M i sur. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica.* 2014;99(7):1184-1190.
56. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C i sur. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(2):431-438.
57. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA i sur. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood.* 2014;124(15):2465-2466.
58. Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adelaide J i sur. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica.* 2014;99(1):37-45.
59. Mills KI, McMullin MF. Mutational spectrum defines primary and secondary myelofibrosis. *Haematologica.* 2014;99(1):2-3.
60. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(17):2635-2642.
61. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood.* 2012;119(14):3219-3225.
62. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood.* 2013;122(13):2176-2184.
63. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program.* 2012;2012:571-581.

64. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E i sur. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895-2901.
65. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A i sur. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010;115(9):1703-1708.
66. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V i sur. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood.* 2013;122(25):4047-4053.
67. Kekre N, Ho VT. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis and chronic myelomonocytic leukemia. *American journal of hematology.* 2016;91(1):123-130.
68. Ballen K. How to manage the transplant question in myelofibrosis. *Blood cancer journal.* 2012;2(3):e59.
69. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ i sur. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2010;16(3):358-367.
70. Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, Isola M, Soldano F, Bruno B i sur. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica.* 2008;93(10):1514-1522.
71. Robin M, Tabrizi R, Mohty M, Furst S, Michallet M, Bay JO i sur. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: a report of the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC). *British journal of haematology.* 2011;152(3):331-339.
72. Kerbauy DMB, Gooley TA, Sale GE, Flowers MED, Doney KC, Georges GE i sur. Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Idiopathic Myelofibrosis, Advanced Polycythemia Vera, and Essential Thrombocythemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.*13(3):355-365.

73. Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C i sur. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood.* 2003;102(12):3912-3918.
74. Katoh M. Network of WNT and other regulatory signaling cascades in pluripotent stem cells and cancer stem cells. *Current pharmaceutical biotechnology.* 2011;12(2):160-170.
75. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem cell reviews.* 2007;3(1):30-38.
76. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(14):4042-4045.
77. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009;10(7):468-477.
78. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4(2):68-75.
79. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of cell science.* 1999;112 (Pt 8):1237-1245.
80. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development.* 2006;16(1):51-59.
81. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(2):a002915.
82. Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 2012;61(4):337-346.
83. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2016.
84. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *The Journal of cell biology.* 2003;162(5):899-908.
85. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1999;398(6726):422-426.

86. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT i sur. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281(5382):1509-1512.
87. Chen S, McLean S, Carter DE, Leask A. The gene expression profile induced by Wnt 3a in NIH 3T3 fibroblasts. *Journal of cell communication and signaling.* 2007;1(3-4):175-183.
88. Lam AP, Gottardi CJ. beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Current opinion in rheumatology.* 2011;23(6):562-567.
89. Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E i sur. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer research.* 2003;63(12):3145-3153.
90. Levy L, Neuveut C, Renard CA, Charneau P, Branchereau S, Gauthier F i sur. Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(44):42386-42393.
91. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *European cells & materials.* 2012;24:46-59.
92. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature.* 1984;307(5947):131-136.
93. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y i sur. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(8):4262-4266.
94. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Fan C, Perou CM, Naber S i sur. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer research.* 2009;69(13):5364-5373.
95. Nakamoto M, Hisaoka M. Clinicopathological Implications of Wingless/int1 (WNT) Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of UOEH.* 2016;38(1):1-8.
96. Liu LJ, Xie SX, Chen YT, Xue JL, Zhang CJ, Zhu F. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2016;22(33):7486-7499.

97. Serinsoz E, Neusch M, Busche G, Wasielewski R, Kreipe H, Bock O. Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology.* 2004;126(3):313-319.
98. Jauregui MP, Sanchez SR, Ewton AA, Rice L, Perkins SL, Dunphy CH i sur. The role of beta-catenin in chronic myeloproliferative disorders. *Human pathology.* 2008;39(10):1454-1458.
99. Geduk A, Atesoglu EB, Tarkun P, Mehtap O, Hacihanefioglu A, Demirsoy ET i sur. The Role of beta-Catenin in Bcr/Abl Negative Myeloproliferative Neoplasms: An Immunohistochemical Study. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2015;15(12):785-789.
100. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE i sur. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal.* 2003;22(23):6267-6276.
101. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M i sur. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine.* 2004;199(6):805-814.
102. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J i sur. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(20):19883-19887.
103. Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM i sur. BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development.* 2008;135(22):3801-3811.
104. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW i sur. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2005;19(13):1842-1844.
105. Roudier M, Li X, Niu QT, Pacheco E, Pretorius JK, Graham K i sur. Sclerostin is expressed in articular cartilage but loss or inhibition does not affect cartilage remodeling during aging or following mechanical injury. *Arthritis and rheumatism.* 2013;65(3):721-731.
106. Ota K, Quint P, Ruan M, Pederson L, Westendorf JJ, Khosla S i sur. Sclerostin is expressed in osteoclasts from aged mice and reduces osteoclast-mediated stimulation of mineralization. *Journal of cellular biochemistry.* 2013;114(8):1901-1907.

107. Bonewald LF. The Osteocyte Network as a Source and Reservoir of Signaling Factors. *Endocrinol Metab.* 2010;25(3):161-165.
108. van Lierop AH, Hamdy NA, Hamersma H, van Bezooijen RL, Power J, Loveridge N i sur. Patients with sclerosteosis and disease carriers: human models of the effect of sclerostin on bone turnover. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(12):2804-2811.
109. van Lierop AH, Hamdy NA, van Egmond ME, Bakker E, Dikkers FG, Papapoulos SE. Van Buchem disease: clinical, biochemical, and densitometric features of patients and disease carriers. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2013;28(4):848-854.
110. Worth HM, Wollin DG. Hyperostosis corticalis generalisata congenita. *Journal of the Canadian Association of Radiologists.* 1966;17(2):67-74.
111. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D i sur. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *American journal of human genetics.* 2003;72(3):763-771.
112. Kedlaya R, Veera S, Horan DJ, Moss RE, Ayturk UM, Jacobsen CM i sur. Sclerostin inhibition reverses skeletal fragility in an Lrp5-deficient mouse model of OPPG syndrome. *Science translational medicine.* 2013;5(211):211ra158.
113. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcified tissue international.* 2010;87(2):99-107.
114. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S i sur. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *The New England journal of medicine.* 2016;375(16):1532-1543.
115. Ardawi MS, Rouzi AA, Al-Sibiani SA, Al-Senani NS, Qari MH, Mousa SA. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women: the Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2012;27(12):2592-2602.
116. Garnero P, Sornay-Rendu E, Munoz F, Borel O, Chapurlat RD. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European*

Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2013;24(2):489-494.

117. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2012;23(3):1171-1176.
118. Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K i sur. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(1):148-154.
119. Cejka D, Jager-Lansky A, Kieweg H, Weber M, Bieglmayer C, Haider DG i sur. Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2012;27(1):226-230.
120. Xu XJ, Shen L, Yang YP, Lu FR, Zhu R, Shuai B i sur. Serum sclerostin levels associated with lumbar spine bone mineral density and bone turnover markers in patients with postmenopausal osteoporosis. *Chinese medical journal.* 2013;126(13):2480-2484.
121. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G i sur. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood cancer journal.* 2011;1(6):e27.
122. Wang XT, He YC, Zhou SY, Jiang JZ, Huang YM, Liang YZ i sur. Bone marrow plasma macrophage inflammatory protein protein-1 alpha(MIP-1 alpha) and sclerostin in multiple myeloma: Relationship with bone disease and clinical characteristics. *Leukemia research.* 2014;38(5):525-531.
123. Brunetti G, Oranger A, Mori G, Specchia G, Rinaldi E, Curci P i sur. Sclerostin is overexpressed by plasma cells from multiple myeloma patients. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2011;1237:19-23.
124. Terpos E, Christoulas D, Katodritou E, Bratengeier C, Gkotzamanidou M, Michalis E i sur. Elevated circulating sclerostin correlates with advanced disease features and abnormal bone remodeling in symptomatic myeloma: reduction post-bortezomib

monotherapy. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2012;131(6):1466-1471.

125. Campbell V, Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers. *Stem cells and cloning : advances and applications.* 2015;8:27-38.
126. Liu Z, Xu J, He J, Zheng Y, Li H, Lu Y i sur. A critical role of autocrine sonic hedgehog signaling in human CD138+ myeloma cell survival and drug resistance. *Blood.* 2014;124(13):2061-2071.
127. Jia Y, Wang Y, Xie J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Archives of toxicology.* 2015;89(2):179-191.
128. Plaisant M, Fontaine C, Cousin W, Rochet N, Dani C, Peraldi P. Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells.* 2009;27(3):703-713.
129. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M i sur. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Developmental cell.* 2008;14(5):674-688.
130. Tibes R, Mesa RA. Targeting hedgehog signaling in myelofibrosis and other hematologic malignancies. *Journal of hematology & oncology.* 2014;7:18.
131. Liping H, Xiangyang L, Hong L, Bicheng C, Yongheng B. An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis. *Molecular pharmacology.* 2015;87:174–182.
132. Liao HF, Su YC, Zheng ZY, Jhih Cai C, Hou MH, Chao KS i sur. Sonic hedgehog signaling regulates Bcr-Abl expression in human chronic myeloid leukemia cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2012;66(5):378-383.
133. Cai JQ, Huang YZ, Chen XH, Xie HL, Zhu HM, Tang L i sur. Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell biology international.* 2012;36(4):349-355.
134. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, Roy R i sur. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia.* 2007;21(5):949-955.
135. Long B, Zhu H, Zhu C, Liu T, Meng W. Activation of the Hedgehog pathway in chronic myelogeneous leukemia patients. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.* 2011;30:8.

136. Su W, Meng F, Huang L, Zheng M, Liu W, Sun H. Sonic hedgehog maintains survival and growth of chronic myeloid leukemia progenitor cells through beta-catenin signaling. *Experimental hematology.* 2012;40(5):418-427.
137. Zahreddine HA, Culjkovic-Kraljacic B, Assouline S, Gendron P, Romeo AA, Morris SJ i sur. The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature.* 2014;511(7507):90-93.
138. Campbell V, Tholouli E, Quigley MT, Keilty J, Kelly P, McGovern K i sur. Evidence That Activated Hedgehog Signaling Predicts for Poor Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2012;120(21):1441-1441.
139. Bhagwat N, Keller MD, Rampal RK, Shank KR, De Stanchina E, Rose K i sur. Improved efficacy of combination of JAK2 and hedgehog inhibitors in myelofibrosis (abstract); Blood. 2013, 122: s666-10.1182/blood-2012-10-461830. *ASH 55th annual meeting.* 2013.
140. Sasaki K, Gotlib JR, Mesa RA, Newberry KJ, Ravandi F, Cortes JE i sur. Phase II evaluation of IPI-926, an oral Hedgehog inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Leukemia & lymphoma.* 2015:1-6.
141. Khan AA, Harrison CN, McLornan DP. Targeting of the Hedgehog pathway in myeloid malignancies: still a worthy chase? *British journal of haematology.* 2015.
142. Bone Marrow Biopsy. http://www.pinnaclehealth.org/wellness-library/blog-and-staywell/health-resources/article/26551, 2017.
143. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53(282):457–481.
144. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled clinical trials.* 1996;17(4):343-346.
145. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer chemotherapy reports Part 1.* 1966;50(3):163-170.
146. Lucijanic M. Survival analysis in clinical practice: analyze your own data using an Excel workbook. *Croatian medical journal.* 2016;57(1):77-79.
147. Le Bousse-Kerdiles MC, Martyre MC, French IrnoIM. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Pathologie-biologie.* 2001;49(2):153-157.
148. Chou JM, Li CY, Tefferi A. Bone marrow immunohistochemical studies of angiogenic cytokines and their receptors in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia research.* 2003;27(6):499-504.

149. Zhou S. TGF-beta regulates beta-catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2011;112(6):1651-1660.
150. Guo L, Peng W, Tao J, Lan Z, Hei H, Tian L i sur. Hydrogen Sulfide Inhibits Transforming Growth Factor-beta1-Induced EMT via Wnt/Catenin Pathway. *PloS one.* 2016;11(1):e0147018.
151. Weivoda MM, Oursler MJ. Developments in sclerostin biology: regulation of gene expression, mechanisms of action, and physiological functions. *Current osteoporosis reports.* 2014;12(1):107-114.
152. Sun G, Reddy MA, Yuan H, Lanting L, Kato M, Natarajan R. Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2010;21(12):2069-2080.
153. Chung Y, Fu E. Crosstalk between Shh and TGF-beta signaling in cyclosporine-enhanced cell proliferation in human gingival fibroblasts. *PloS one.* 2013;8(7):e70128.
154. Dennler S, Andre J, Alexaki I, Li A, Magnaldo T, ten Dijke P i sur. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer research.* 2007;67(14):6981-6986.
155. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R i sur. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. *Mayo Clinic proceedings.* 2012;87(1):25-33.
156. Hussein K, Bock O, Kreipe H. Histological and molecular classification of chronic myeloproliferative disorders in the age of JAK2: persistence of old questions despite new answers. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology.* 2007;74(2):72-80.
157. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S i sur. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood.* 2005;106(10):3370-3373.
158. Guglielmelli P, Biamonte F, Spolverini A, Pieri L, Isgro A, Antonioli E i sur. Frequency and clinical correlates of JAK2 46/1 (GGCC) haplotype in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2010;24(8):1533-1537.

159. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, Pacilli A, Brogi G, Calabresi L i sur. Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. *Blood cancer journal.* 2015;5:e360.
160. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB i sur. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia.* 2006;20(7):1211-1216.
161. Lin WH, Xiang LJ, Shi HX, Zhang J, Jiang LP, Cai PT i sur. Fibroblast growth factors stimulate hair growth through beta-catenin and Shh expression in C57BL/6 mice. *BioMed research international.* 2015;2015:730139.
162. Yokoyama Y, Mori S, Hamada Y, Hieda M, Kawaguchi N, Shaker M i sur. Platelet-derived growth factor regulates breast cancer progression via beta-catenin expression. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology.* 2011;78(5):253-260.
163. Takahashi J, Orcholski M, Yuan K, de Jesus Perez V. PDGF-dependent beta-catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *FEBS letters.* 2016;590(1):101-109.
164. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S i sur. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(4):392-397.
165. Modder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL i sur. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(2):373-379.
166. Liu YC, Lai WC, Chuang KA, Shen YJ, Hu WS, Ho CH i sur. Blockade of JAK2 activity suppressed accumulation of beta-catenin in leukemic cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2010;111(2):402-411.
167. Aberger F, Kern D, Greil R, Hartmann TN. Canonical and noncanonical Hedgehog/GLI signaling in hematological malignancies. *Vitamins and hormones.* 2012;88:25-54.
168. Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitamins and hormones.* 2012;88:55-72.

169. Jenkins D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular signalling.* 2009;21(7):1023-1034.
170. Zingariello M, Martelli F, Ciaffoni F, Masiello F, Ghinassi B, D'Amore E i sur. Characterization of the TGF-beta1 signaling abnormalities in the Gata1low mouse model of myelofibrosis. *Blood.* 2013;121(17):3345-3363.
171. Jamieson C, Cortes JE, Oehler V, Baccarani M, Kantarjian HM, Papayannidis C i sur. Phase 1 Dose-Escalation Study of PF-04449913, An Oral Hedgehog (Hh) Inhibitor, in Patients with Select Hematologic Malignancies. *Blood.* 2011;118(21):424-424.
172. Gupta V, Koschmieder S, Harrison CN, Cervantes F, Heidel FH, Drummond M i sur. Phase 1b Dose-Escalation Study of Sonidegib (LDE225) in Combination with Ruxolitinib (INC424) in Patients with Myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(21):712-712.
173. Lucijanic M, Livun A, Tomasovic-Loncaric C, Stoos-Veic T, Pejsa V, Jaksic O i sur. Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway Is Dysregulated in Patients With Primary and Secondary Myelofibrosis. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2016;16(9):523-526.
174. Lucijanic M, Pejsa V, Jaksic O, Mitrovic Z, Tomasovic-Loncaric C, Stoos-Veic T i sur. The Degree of Anisocytosis Predicts Survival in Patients with Primary Myelofibrosis. *Acta haematologica.* 2016;136(2):98-100.
175. Lucijanic M, Skelin M, Lucijanic T. Survival analysis, more than meets the eye. *Biochem Med.* 2017;27(1):14–18.

11. ŽIVOTOPIS

Marko Lucijanić rođen je 1985. godine u Karlovcu gdje je od 2000.-2004. pohađao opću gimnaziju. 2004. upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirao 2010. Tijekom studija primao je državnu stipendiju grupe A za posebno nadarene studente. 2011. godine upisao je Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je odslušao i položio sve ispite. Od 2010.-2011. radio je kao liječnik stažist u KB Dubrava, Zagreb. 2011. nakon položenog državnog ispita stekao je odobrenje za samostalan rad. 2012. započeo je specijalizaciju iz Hematologije u KB Dubrava, Zagreb gdje trenutno radi kao specijalizant. U trenutku pisanja disertacije oženjen je, otac dvoje djece i autor 9 znanstvenih radova indeksiranih u Current Contents i 9 radova indeksiranih u drugim međunarodnim bibliografskim bazama (Web of Science i Scopus).