Kliničko značenje bjelančevine 1 slične hitinazi-3 i hitotriozidaze u bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama

Krečak, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:105:134991

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

Ivan Krečak

Kliničko značenje bjelančevine 1 slične hitinazi-3 i hitotriozidaze u bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Krečak

Kliničko značenje bjelančevine 1 slične hitinazi-3 i hitotriozidaze u bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF MEDICINE

Ivan Krečak

Clinical significance of chitinase-3-like protein 1 and chitotriosidase in Philadephia-negative myeloproliferative neoplasms

DISERTATION

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Odjelu interne medicine Opće bolnice Šibensko-kninske županije, Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih poremećaja Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Nadira Duraković, dr. med.

Zahvala

Posebno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Nadiri Duraković, dr. med, na velikoj podršci, motivaciji i pruženom povjerenju prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegicama i kolegama koji su prijateljskim savjetima, motivacijom, te stručnom i znanstvenom pomoći doprinijeli izradi ove disertacije, prof. dr. sc. Radovanu Vrhovcu, dr. med, prof. dr. sc. Rajku Kušecu, dr. med, prof. dr. sc. Slavku Gašparovu, dr. med, prof. prim. dr. sc. Igoru Aureru, Pavlu Rončeviću, dr. med, prim. Sandri Bašić-Kindi, dr. med, Alenu Ostojiću, dr. med, Neni Peran, mag. med. biochem, te osoblju Zavoda za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Odjela interne medicine Opće bolnice Šibensko-kninske županije.

Zahvaljujem se i osoblju Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih poremećaja Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, prof. dr. sc. Kseniji Fumić, mag. med. biochem, Ivani Lapić, mag. med. biochem i Josipi Gulin, ing. na svesrdnoj podršci prilikom izrade ove disertacije.

Posebna hvala supruzi Mariji i kćerkama Evi i Riti na svemu lijepom što su unijeli u moj život, kao i roditeljima Velki i Anti koji su uvijek uz mene.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 ESENCIJALNA TROMBOCITEMIJA 4
1.2 POLICITEMIJA VERA 7
1.3 PRIMARNA I SEKUNDARNA MIJELOFIBROZA 11
1.4 MPN KAO UPALNE BOLESTI 16
1.4.1 Epidemiološki dokazi 16
1.4.2 Klinički dokazi 17
1.4.3 Eksperimentalni dokazi 18
1.5 HITINAZE I HITINAZAMA SLIČNE BJELANČEVINE 23
1.5.1 Bjelančevina 1 slična hitinazi-3 (YKL-40) 24
1.5.2 Hitotriozidaza (CHIT1) 28
2. HIPOTEZA 34
3. CILJEVI RADA 35
3.1 OPĆI CILJ 35
3.2 SPECIFIČNI CILJEVI 35
4. ISPITANICI I METODE 36
4.1 ISPITANICI 36
4.2 METODE 36
4.3 LABORATORIJSKE ANALIZE 37
4.4 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 39
4.5 ETIČKA NAČELA 40
5. REZULTATI 41
5.1 KARAKTERISTIKE ISPITANIKA 41
5.2 YKL-40 42
5.3 CHIT1 57
6. RASPRAVA 67
6.1 CIRKULIRAJUĆI YKL-40 U MPN 67
6.2 AKTIVNOST CHIT1 U MPN 72
6.3 OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA 77
6.4 PUBLIKACIJE PROIZAŠLE IZ ISTRAŽIVANJA 78
7. ZAKLJUČCI 79
8. SAŽETAK 81
9. SUMMARY 82
10. LITERATURA 83
11. ŽIVOTOPIS 107

POPIS KRATICA I OZNAKA

ABL (eng. Abelson) – Abelsonova tirozin kinaza
AMCase (eng. Acidic mammalian chitinase) – Kisela humana hitinaza
Analiza ROC krivulje (eng. Receiver operating characteristic curve analysis) – analiza krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika
ASK – acetilsalicilna kiselina
BCR (eng. Breakpoint cluster region) – regija u kojoj se grupiraju prijelomi
BCR-ABL1 – 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)
CALR (eng. Calreticulin) - Kalretikulin
CHI3L1 (eng. Chitinase-3-like protein-1) – Bjelančevina 1 slična hitinazi-3
CHIT1 (eng. Chitotriosidase) – Hitotriozidaza
CLPs (eng. Chitinase-like proteins) – hitinazama slične bjelančevine
CRP – serumski C-reaktivni protein
CYTO-PV (eng. CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera) – citoreduktivna terapija za prevenciju kardiovaskularnih događaja u bolesnika s policitemijom verom
DIPSS (eng. Dynamic International Prognostic Scoring System) – Dinamički internacionalni prognostički sistemski skor
ECLAP (eng. European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera) – Europska kolaboracija o uporabi niskih doza acetilsalicilne kiseline u policitemiji veri
ELISA (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) – kvantitatitivni imunoenzimski test
ERK (eng. Extracellular signal-regulated kinase) – Vanstaničnim signalom-regulirane kinaze
ET – esencijalna trombocitemija
GB – Gaucherova bolest
G-CSF (eng. Granulocyte colony stimulating-factor) – Faktor stimulacije granulocitnih kolonija
GM-CSF (eng. Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) – Faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija
gp38k (eng. 38-kDa heparin-binding glycoprotein) – Heparin-vežući glikoprotein mase 38-kDa
HC-gp39 (eng. Human cartilage glycoprotein-39) – Ljudski hrskavični glikoprotein-39
IFI27 (eng. Interferon-inducible gene 27) – Interferon-inducibilni gen 27
IGF-1 (eng. Insulin-like growth factor 1) – Inzulinu-sličan faktor rasta 1

IL (eng. Interleukin) – Interleukin

IPSS (eng. International Prognostic Scoring System) – Internacionalni prognostički sistemski skor

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. Janus kinase 2) – Janus kinaza 2

KML – kronična mijeloična leukemija

KS – koštana srž

KV – kardiovaskularni

LDH – serumska laktat dehidrogenaza

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

MCP-1 (eng. Monocyte chemotactic protein-1) – Monocitni kemotaktički protein-1

MIP-1α (eng. Macrophage inflammatory protein 1alpha) – Makrofagni inflamatorni protein 1alfa

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

MPN (eng. Myeloproliferative neoplasms) – mijeloproliferativne neoplazme

NF-κB (eng. Nuclear factor-κB) – Nuklearni čimbenik – kapa B

OS (eng. overall survival) – ukupno preživljenje

OVGP (eng. Oviduct-specific glycoprotein) – Jajovodu-specifična bjelančevina

PDGF (eng. Platelet-derived growth factor) –Trombocitni čimbenik rasta

PI3K (eng. Phosphoinoside-3 kinase) – Fosfatidilinozitol-3 kinaza

PKB (eng. Protein kinase B) – Proteinska kinaza B

PMF – primarna mijelofibroza

Post-ET MF – sekundarna mijelofibroza nakon esencijalne trombocitemije

Post-PV MF– sekundarna mijelofibroza nakon policitemije vere

Pre-PMF – prefibrotička mijelofibroza

PV – policitemija vera

REVEAL (eng. The Prospective Observational Study of Patients with Polycythemia Vera in US Clinical Practices) – prospektivna opservacijska studija kod bolesnika s policitemijom verom u kliničkoj praksi u Sjedinjenim Američkim Državama

ROS (eng. Reactive Oxygen Species) – slobodni kisikovi radikali

SI-CLP (eng. Stabilin-I-interacting chitinase-like protein) - Hitinazi-slična bjelančevina koji komunicira sa stabilinom-1

SMF – sekundarna mijelofibroza

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

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TAMs (eng. Tumor-associated macrophages) – makrofazi pridruženi tumoru

TFS (eng. thrombosis-free survival) – preživljenje bez znakova tromboze

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

TNF-α (eng. Tumor necrosis factor-α) – Faktor nekroze tumora-alfa

VEGF (eng. Vascular endothelial growth factor) – Vaskularni endotelni čimbenik rasta

VSMC (eng. Vascular smooth muscle cells) – Vaskularne glatke mišićne stanice

YKL-39 – Bjelančevina 2 slična hitinazi-3

YKL-40 – Bjelančevina 1 slična hitinazi-3

1. UVOD

Klasične mijeloproliferativne neoplazme, esencijalna trombocitemija (ET), policitemija vera (PV), primarna mijelofibroza (PMF) i kronična mijeloična leukemija (KML), klonalne su bolesti krvotvorne matične stanice koje karakterizira pretjerano stvaranje granulocita, eritrocita i trombocita. Kliničke slike su im prepoznate već u 19. stoljeću (1-7). William Dameshek ih je 1951. godine grupirao, zajedno s eritroleukemijom, pod termin „mijeloproliferativne bolesti“ kako bi istaknuo njihove slične kliničke značajke, te trilinijsku mijeloproliferaciju porijeklom iz koštane srži (KS). Smatrao je kako su te „mijeloproliferativne bolesti“ varijabilne kliničke manifestacije uzrokovane nekim do tada neotkrivenim „mijelostimulirajućim čimbenikom“ (8).

Kroz naredno stoljeće dogodio se značajan napredak u razumijevanju molekularnih zbivanja u patogenezi ovih bolesti. Prvo se otkrićem specifičnog molekularnog markera, fuzijskog BCR-ABL1 prijepisa, uzrokovanog recipročnom translokacijom dužeg kraka 9 kromosoma (ABL, prema eng. Abelson gen) na ostatak dugog kraka 22 kromosoma (BCR, prema eng. Breakpoint cluster region), KML izdvojila iz ove skupine bolesti kao zaseban entitet. Navedenu translokaciju otkrili su Peter Nowell i David Hungerford 1960. godine, a u čast sveučilišta gdje je otkriven nazvan je Philadelphia kromosomom (9-11). KML se tada vrlo teško liječila, brzo se transformirala u akutnu leukemiju i često je završavala smrću. Jedina mogućnost izliječenja je bila transplantacija alogenim krvotvornim matičnim stanicama. Prva prava prekretnica u liječenju KML bilo je otkriće imatiniba, lijeka koji selektivno inhibira tirozin-kinaznu aktivnost BCR-ABL1 gena (12) čijom se primjenom život oboljelih značajno produžio (13,14).

Kasnije, 2005. godine, četiri su nezavisne istraživačke grupe otkrile aktivacijsku mutaciju V617F u egzonu 14 gena za Janus kinazu 2 (JAK2, prema eng. Janus kinase 2), odgovornu za biološke i kliničke karakteristike Philadelphia negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN). Navedena mutacija je stečena, nastaje u hematopoetskim matičnim stanicama i uzrokuje konstitutivnu aktivaciju JAK/Prijenosnik signala i aktivator transkripcije (STAT, prema eng. Signal transducer

and activator of transcription) signalne osovine s posljedičnom autonomnom proliferacijom eritroidnih stanica, a prisutna je u više od 95% bolesnika s PV, u oko 50% bolesnika s ET i u preko 50% bolesnika s PMF (15-20).

Mutacije u genu za kalretikulin (CALR, prema eng. Calreticulin) otkrivene su 2013. godine od strane dviju nezavisnih istraživačkih grupa kao druge najčešće molekularne promjene koje se mogu pronaći u 67% do 88% JAK2-V617F-negativnih bolesnika s ET i PMF (21,22). Treća mutacija koja se u toj podskupini bolesnika može pronaći jest mutacija gena Virus mijeloproliferativne leukemije (MPL, prema eng. Myeloproliferative leukemia virus) koji kodira trombopoetinski receptor (23,24). U malom postotku bolesnika (5-10%) se ne može pronaći mutacija („trostruko-negativni“ bolesnici) (20). Navedene mutacije u MPN su međusobno isključujuće što nam u svakodnevnom kliničkom radu pomaže razlučiti puno češća reaktivna stanja od autonomnog tumorskog rasta, ali i preciznije definirati pojedine entitete unutar MPN spektra (25).

Usporedno s napretkom u molekularnom razumijevanju MPN, značajniji pomaci su se dogodili i u terapijskom pristupu ovim bolesnicima. Ranije su se ovi bolesnici liječili uglavnom venepunkcijama, acetilsalicilnom kiselinom (ASK), citoredukcijom kemoterapeuticima, te u bolesnika s PMF i transfuzijama krvnih pripravka, androgenima, zračenjem slezene i splenektomijom. Relativno novi lijek, ruksolitinib, selektivni inhibitor JAK2-kinaza, smanjuje neregulirano JAK-STAT stanično signaliziranje, a u bolesnika s PMF i veličinu slezene, poboljšava simptome povezane s bolešću i popravlja kvalitetu života, uz naznake utjecaja i na ukupno preživljenje (26-28). Kod bolesnika s PV refraktornih ili intolerantnih na hidroksiureju, primjena ruksolitiniba smanjuje potrebu za venepunkcijama i veličinu slezene, dobro kontrolira hematokrit i simptome povezane s bolešću (29,30). Vrlo recentno, primjenom pegiliranih oblika interferona alfa dobiveni su obećavajući rezultati liječenja MPN (31), a kako bi se dodatno poboljšali ishodi pokušava ih se kombinirati s ruksolitinibom, čini se bez značajnije toksičnosti (32,33).

Slično drugim tumorima, MPN su klonalno heterogene bolesti, što reflektira odnose između somatskih mutacija, kao i selekciju subklonova i adaptaciju na uvjete u mikrookolišu (20,34). Tip stečene mutacije odgovoran je za klinički fenotip bolesti, no inicijalni događaj koji uzrokuje mutacije u hematopoetskim matičnim stanicama još uvijek nije otkriven. Posljednjih godina sve je više zagovornika teorije kako bi eventualno kronična (subklinička) upala mogla biti začetnik i promotor MPN, s obzirom na to da oboljeli u cirkulaciji imaju značajno povišenu razinu upalnih citokina koji potpomažu klonsku ekspanziju, izraženu aterosklerozu, opterećeni su štetnim kardiovaskularnim (KV) događajima, a često ih prate autoimune i druge zloćudne bolesti (35,36). Nadalje, složena komunikacija između tumorskog klona, mikrookoliša KS, te različitih faktora rasta i citokina, odgovorna je za određene simptome bolesti, progresiju bolesti i promociju fibroze KS, no te interakcije još uvijek nisu sasvim istražene (37,38).

Zaključno, posljednjih se godina prati značajan napredak u razumijevanju patogeneze, dijagnostike i liječenja MPN, stoga željno isčekujemo koje će nam nove spoznaje napredak medicine donijeti.

1.1 ESENCIJALNA TROMBOCITEMIJA

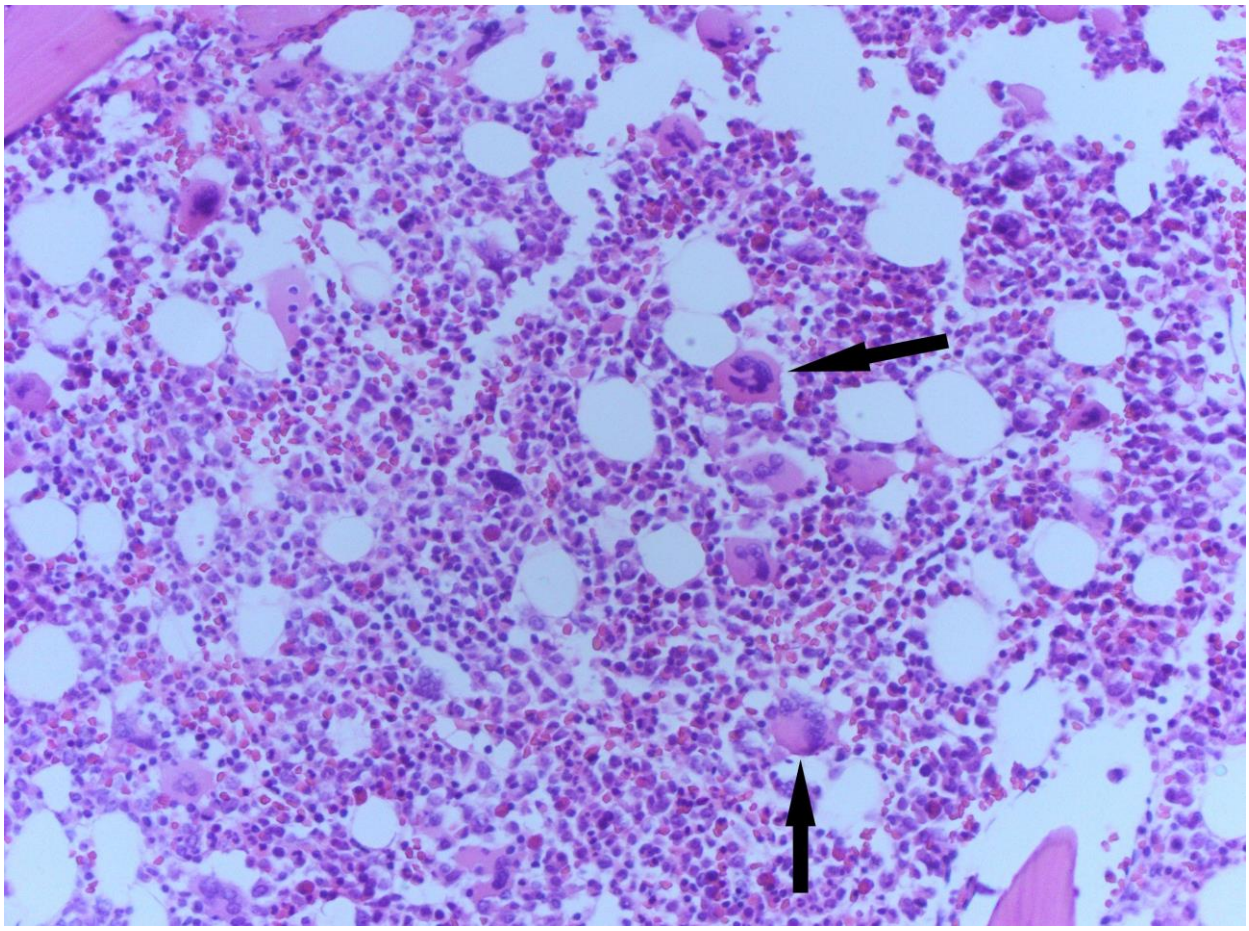
Esencijalna trombocitemija (ET) manifestira se se ponajprije povećanom megakariocitopoezom i trombocitozom. To je rijetka bolest, a procijenjena incidencija ET je 0.38 do 1.7 na 100 000 ljudi godišnje (39). Ovi bolesnici imaju skraćeni životni vijek naspram zdravoj populaciji, a medijan preživljenja kod bolesnika starijih od 60 godina je oko 20 godina, dok je kod mlađih, 33 godine (40). Bolest se češće pojavljuje u starijoj životnoj dobi (medijan pojavnosti je od 60-65 godine života) i treba je razlikovati od reaktivnih stanja sa sekundarnom trombocitozom, npr. infekcija, kroničnih gubitaka krvi ili drugih zloćudnih tumora koji su relativno češći u toj dobi. U usporedbi s drugim MPN, rjeđe se nalaze splenomegalija i konstitucijski simptomi. Često se otkrije rutinskim pregledom krvne slike u kojoj dominira trombocitoza.

U oko 55% bolesnika se nalazi JAK2-V617F, u oko 15-25% CALR, a u oko 5% bolesnika mutacije MPL gena. Preostali bolesnici (oko 20%) su „trostruko-negativni“ (15-24). Nosioci CALR mutacije su, za razliku od onih s mutiranim JAK2 genom, češće mlađi muškarci, s višim brojem trombocita, nižim hemoglobinom, a rjeđe imaju tromboze i skloniji su krvarenju. Preživljavanje je slično JAK2-V617F mutiranim bolesnicima (21,22,41). Biopsija kosti nije obvezna za postavljanje dijagnoze (25), a u KS se nalaze zreli i hiperlobulirani megakariociti koji mjestimično mogu raditi blaže nakupine (Slika 1). Ipak, treba naglasiti važnost biopsije KS jer je u svakodnevnom kliničkom radu potrebno razlikovati ET od tzv. „prefibrotičke“ MF (pre-PMF) koja ima značajno lošiju prognozu. Kod pre-PMF se u KS, za razliku od ET, nalazi atipija megakariocita, često hipercelularnost, proliferacija granulocita i smanjena eritropoeza, a klinički anemija, splenomegalija, leukocitoza i povišena serumska laktat dehidrogenaza (LDH) (25,42-46). Dijagnostički kriteriji za ET (25) prikazani su u Tablici 1.

Rizični čimbenici lošijeg preživljenja bolesnika s ET su pre-PMF morfologija KS, starija životna dob, ranija tromboza, leukocitoza i anemija, za leukemijsku transformaciju starija, pre-PMF morfologija KS, ranija tromboza i ekstremna trombocitoza (>1000x10^9/L), dok su pre-PMF

morfologija KS, starija životna dob i anemija rizični čimbenici za fibrotičnu transformaciju. Čini se da su bolesnici s JAK-V617F mutacijom rjeđe skloni potonjoj komplikaciji. Tip mutacije (JAK2-V617F, CALR ili MPL) nema utjecaja na preživljenje (40,47). Dodatno, sekvencioniranjem gena sljedeće generacije u oko 50% bolesnika s ET pronađene su dodatne mutacije ili varijante različitih gena, a manji udio njih (oko 15%) pokazuje i negativan utjecaj na preživljenje (47,48).

Liječenje ET primarno je usmjereno na spriječavanje trombotskih komplikacija bolesti, rjeđe na patološka krvarenja uzrokovana povišenim brojem trombocita (>1000x10^9/L) i stečenim nedostatkom von Willebrandova faktora. Druge, potencijalno fatalne komplikacije bolesti su transformacija u sekundarnu mijelofibrozu (SMF) i akutnu leukemiju (u oko 5% bolesnika) (40,47). Trenutna klasifikacija trombotskog rizika u bolesnika s ET uključuje četiri kategorije, ovisno o dobi bolesnika, ranijoj trombozi i prisutnosti JAK2-V617F mutacije. Bolesnicima niskog, srednjeg i visokog rizika preporuča se primjena niskih doza acetilsalicilne kiseline, kao i bolesnicima vrlo niskog rizika koji imaju KV rizične čimbenike. Citoredukcijsko liječenje hidroksiurejom potrebno je u visokorizičnih bolesnika (ranija tromboza ili bolesnici stariji od 60 godina s prisutnom JAK2-V617F mutacijom), nije obvezno u vrlo nisko-, nisko-, i srednje rizičnih bolesnika, a može se razmotriti kod bolesnika s ekstremnom trombocitozom i stečenim nedostatkom von Willebrandova faktora (47,49,50-51). Kod bolesnika koji ne toleriraju hidroksiureju ili su refraktorni na liječenje, u obzir dolazi primjena anagrelida, lijeka koji inhibiranjem fosfodiesteraze spriječava sazrijevanje trombocita iz megakariocita (47,49,52,53), te različitih oblika interferona alfa (47,49,54-56), dok se ruksolitinib u ovom kliničkom kontekstu nije pokazao boljim od drugih dostupnih lijekova (57).



Slika 1: Blaže hipercelularna koštana srž u bolesnika s esencijalnom trombocitemijom (bojenje hemalaun-eozin, povećanje x200)**.** Strelice označuju hiperlobulirane megakariocite koji mjestimično rade blaže nakupine.

Tablica 1: Dijagnostički kriteriji za ET prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (25).

Dijagnoza zahtijeva sva četiri velika ili tri velika i jedan mali kriterij
Veliki kriteriji 1. Povišen broj trombocita ≥ $450x10^9$/L 2. Bioptat koštane srži pokazuje uglavnom proliferaciju megakariocita s umnoženim brojem uvećanih, zrelih i hiperlobuliranih megakariocita. Nema značajnijeg umnažanja granulopoeze ili eritropoeze i vrlo rijetko je prisutna retikulinska fibroza 3. Ne zadovoljava kriterije za policitemiju veru, primarnu mijelofibrozu, BCR-ABL1 pozitivnu kroničnu mijeloičnu leukemiju, mijelodisplastični sindrom ili drugu mijeloidnu neoplazmu 4. Prisutnost JAK2-V617F, CALR ili MPL mutacije **Mali kriterij** 1. Prisutnost drugog klonalnog markera, ili u odsutnosti istog, bez dokaza za reaktivnu trombocitozu

1.2 POLICITEMIJA VERA

Policitemiju veru (PV) se najčešće prepoznaje pretjeranom produkcijom eritrocita, a može se naći i umjerena leukocitoza i trombocitoza. Za razliku od ET, bolesnici s PV su nešto mlađi (medijan pojavnosti je od 50-60 godina života), a procijenjena incidencija je 0.4 do 2.8 na 100 000 ljudi (39). Slično ET, bolesnici s PV imaju skraćen životni vijek naspram zdravoj populaciji, a medijan preživljenja kod bolesnika starijih od 60 godina je oko 14 godina, dok je kod mlađih, 24 godine (40). U usporedbi s ET, ovi bolesnici češće imaju simptome bolesti, ponajprije glavobolju, vrtoglavicu, pojačano znojenje, akvageni svrbež, a lako se primjećuje crvenilo kože i sluznica (pletora). Rjeđe prvi znak bolesti može biti tromboza, najčešće u središnjem živčanom sustavu, a može se razviti i srčani infarkt (47). Zanimljivo, MPN mogu biti i uzrokom tromboze splanhničkih vena, stoga u dijagnostičkom pretraživanju treba misliti i na ove bolesti, iako krvna slika ne mora pokazivati značajnijih odstupanja (58). Manje česta su patološka krvarenja uzrokovana „prepunjenošću“ sluznica, uglavnom iz gastrointestinalnog trakta.

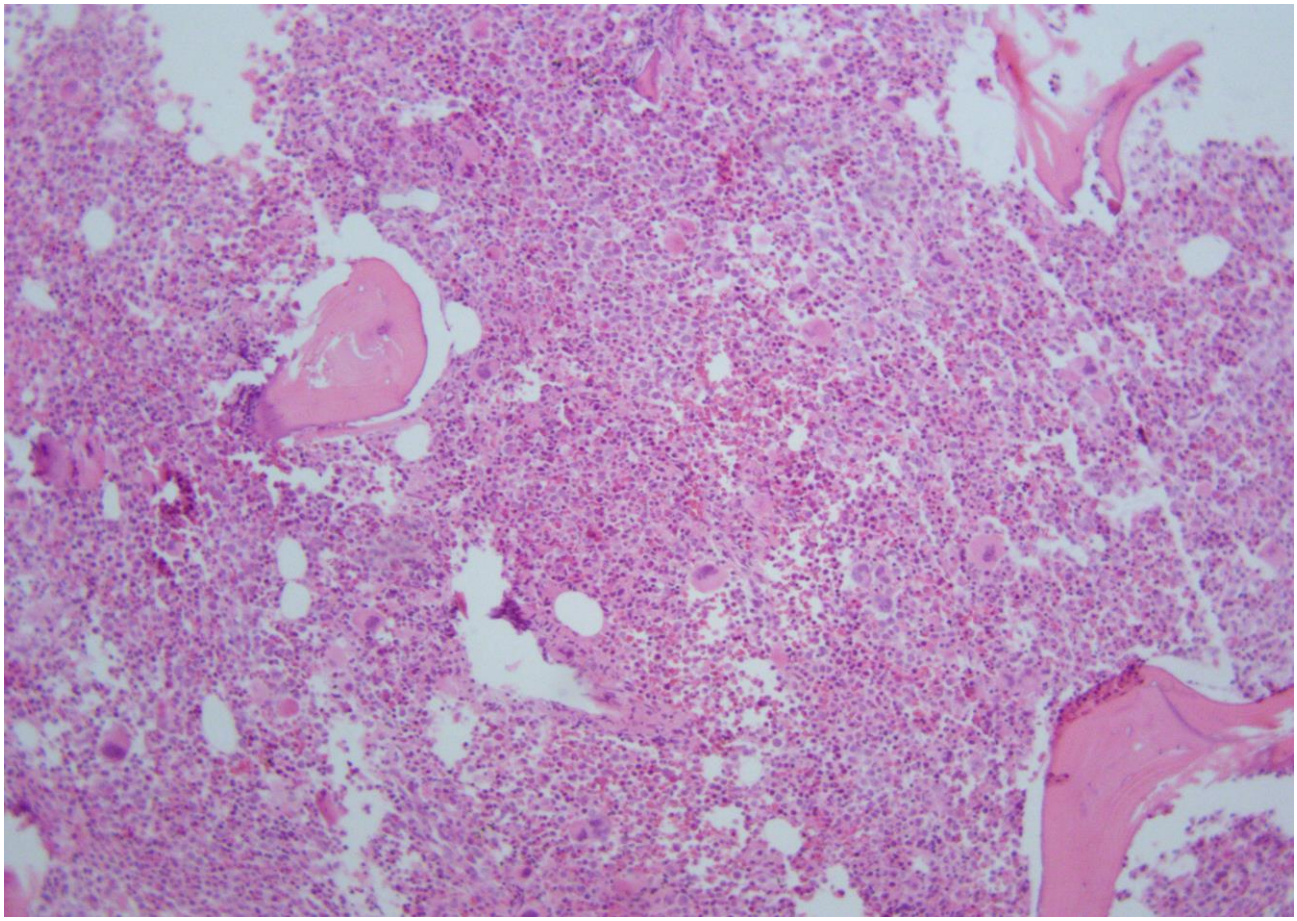
Gotovo su svi bolesnici s PV nosioci JAK2-V617F mutacije, oko 95% ima somatske mutacije u egzonu 14, a u oko 3% bolesnika se pronađu mutacije u egzonu 12 (15-19,59). Navedenim molekularnim testom možemo s gotovo stopostotnom sigurnošću isključiti druge uzroke povišenog hematokrita. KS ovih bolesnika pokazuje trilinijsku proliferaciju (panmijelozu) s pleomorfnim, zrelim megakariocitima (Slika 2). Dodatno, autonoman rast eritrocita negativnom povratnom spregom uzrokuje sniženu serumsku koncentraciju eritropoetina što se može naći u oko 85% bolesnika (60). Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), nizak serumski eritropoetin u kombinaciji s JAK2-V617F mutacijom može biti dovoljan za dijagnozu PV (25). Dijagnostički kriteriji za PV prikazani su u Tablici 2.

Rizični čimbenici lošijeg preživljenja bolesnika s PV su starija životna dob, leukocitoza, abnormalan kariotip i venska tromboza, a za leukemijsku transformaciju starija životna dob, leukocitoza i abnormalan kariotip, dok je opterećenje JAK2 alelom >50% dodatan čimbenik rizika

za transformaciju u SMF. Također, oko 50% bolesnika ima dodatne mutacije ili varijante različitih gena od kojih dio njih (oko 15%) ima i negativan utjecaj na preživljenje (40,47,61).

Slično ET, liječenje bolesnika s PV temeljeno je na sprječavanju trombotskih komplikacija. Dob viša od 60 godina i ranija tromboza prepoznati su kao dva najvažnija rizična čimbenika za razvoj novog trombotskog događaja, stoga prisutnost bilo kojeg od tih čimbenika identificira visokorizične bolesnike. Neovisno o stupnju rizika, svim bolesnicima preporuča se primjena malih doza acetilsalicilne kiseline koja je u randomiziranoj studiji (ECLAP, prema eng. European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera) utjecala na smanjenje kombiniranog krajnjeg ishoda koji je uključivao nefatalni infarkt miokarda, nefatalni moždani udar, plućnu emboliju, veliku vensku trombozu ili KV smrt, u usporedbi s placebom (62). Dodatno, primjena acetilsalicilne kiseline u bolesnika s PV može i umanjiti vazomotorne smetnje: eritromelalgiju, glavobolju, smetnje vida, tinitus ili smetnje ravnoteže (47,49). Svim bolesnicima s PV treba raditi venepunkcije (flebotomije) s ciljem održavanja hematokrita < 45%, obzirom kako je randomizirana klinička studija (CYTO-PV, prema eng. CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera) pokazala da takav pristup smanjuje učestalost velikih tromboza i KV smrtnost (63). Visokorizičnim bolesnicima treba preporučiti hidroksiureju ili interferon alfa, kao i onima sa simptomima bolesti, simptomatskom ili progresivnom splenomegalijom, ekstremnom trombocitozom (>1500x10^9/L) i/ili leukocitozom >15x10^9/L (47,49,64-66). Kod bolesnika refraktornih ili intolerantnih na hidroksiureju, primjena ruksolitiniba može smanjiti potrebu za venepunkcijama, veličinu slezene i simptome povezane s bolešću (29,30). Druge opcije liječenja uključuju primjenu interferona alfa-2a, a u novije vrijeme, i njegovih pegiliranih („dugodjelujućih“) oblika (54,56,67). Preliminarni rezultati randomizirane studije koja je uspoređivala učinke hidroksureje i pegiliranog inteferona alfa-2a kod bolesnika s visokorizičnom ET i PV pokazala je podjednake kliničke ishode iako se završne analize studije očekuju (68). Suprotno, nedavno su objavljeni vrlo uzbudljivi rezultati randomizirane studije u kojoj se uspoređivao učinak ropeginferferona alfa-2b u bolesnika s PV, a koji su pokazali kako

ropeginterferon alfa-2b može dovesti do veće stope hematoloških i molekularnih remisija s vrlo povoljnim sigurnosnim profilom, u usporedbi s hidroksiurejom, što ropeginterferon alfa-2b čini novom terapijskom opcijom u ovih bolesnika (31). U novije vrijeme, pokušava se kombinirati ruksolitinib s pegiliranim interferonom, a čini se da navedena kombinacija nema značajnijih toksičnosti (32,33).



Slika 2: Izrazito hipercelularna koštana srž s trilinijskom proliferacijom (panmijelozom) u bolesnika s policitemijom verom (bojenje hemalaun-eozin, povećanje x100).

Tablica 2: Dijagnostički kriteriji za PV prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (25).

Dijagnoza zahtijeva prisutnost tri velika ili prva dva velika i jedan mali kriterij**
Veliki kriteriji 1. Hemoglobin > 165 g/L u muškaraca, 160 g/L u žena, ili Htc > 49% u muškaraca, 48% u žena, ili povećana masa eritrocita* 2. Bioptat koštane srži pokazuje hipercelularnost za dob s trilinijskom proliferacijom (panmijelozom) i prominentnom eritroidnom, granulocitnom i megakariocitnom proliferacijom s pleomorfnim, zrelim megakariocitima (različiti u veličini) 3. Prisutnost JAK2-V617F ili mutacije u egzonu 12 gena za JAK2 **Mali kriterij** 1. Subnormalna razina serumskog eritropoetina
** masa eritrocita >25% od srednje predviđene vrijednosti* ***Biopsija kosti nije potrebna ako postoji trajna eritrocitoza; hemoglobin > 185 g/L u muškaraca (hematokrit, 55%) ili 165 g/L u žena (hematokrit, 49.5%, ako su zadovoljeni treći veliki i mali kriterij*

1.3 PRIMARNA I SEKUNDARNA MIJELOFIBROZA

Primarna mijelofibroza (PMF) je najrjeđa MPN, pojavljuje se uglavnom poslije 50. godine života (medijan dobi je oko 65 godina), a procijenjena incidencija joj je 0.1 do 1 na 100 000 ljudi (39).

PMF pokazuje najagresivniji klinički tijek s medijanom preživljenja od 5-6 godina, a karakterizirana je klonalnom mijeloproliferacijom, varijabilnim stupnjem fibroze KS, ekstramedularnom hematopoezom s posljedičnom hepatosplenomegalijom, izrazitim konstitucijskim simptomima i abnormalnim citokinskim profilom, leukoeritroblastozom, anemijom, kaheksijom i čestom transformacijom u akutnu leukemiju (69). Druge komplikacije bolesti uključuju infarkte slezene, sklonost trombozama i krvarenjima, te razvoj portalne hipertenzije. Mutacije JAK2-V617F, CALR ili MPL gena nalaze se u oko 90% bolesnika (15-24,69), a dio bolesnika može imati i druge mutacije za koje se čini da pridonose progresiji bolesti i leukemijskoj transformaciji (69-71). Dijagnoza bolesti temeljena je na morfologiji KS u kojoj dominira različiti stupanj fibroze i proliferacija megakariocita s abnormalnim sazrijevanjem i hiperkromatskim, iregularnim nukleolima (Slika 3). Stupanj fibroze KS utječe na preživljenje bolesnika (42-46,72-74), a stupnjuje se prema trenutno važećem Europskom konsenzusu (75) (Tablica 3.). Dijagnostički kriteriji za PMF (25) prikazani su u Tablici 4.

Kako tumorske matične stanice u PMF imaju sklonost sazrijevanja u atipične megakariocite s posljedičnom trombocitozom, u ranoj fazi bolesti je ponekad teško razlučiti ET od PMF. Već ranije smo naveli kako je vrlo važno diferencirati ET i od pre-PMF, s obzirom na to da potonju prati značajno lošija prognoza (42-46,49,69), što je od strane SZO prepoznato i revidirano u posljednjoj klasifikaciji MPN (25). Slično, bolesnici s ET i PV mogu tijekom vremena početi pokazivati određene kliničke značajke PMF (anemiju, hepatosplenomegaliju, konstitucijske simptome, leukoeritroblastozu ili povišen LDH) i tada govorimo o transformaciji bolesti u SMF (post-ET mijelofibrozu (post-ET MF) i post-PV mijelofibrozu (post-PV MF)). Klinički tijek i preživljenje SMF jednak je PMF, i ako je prilikom dijagnoze prisutna histološka slika fibroze KS, a ranije nije

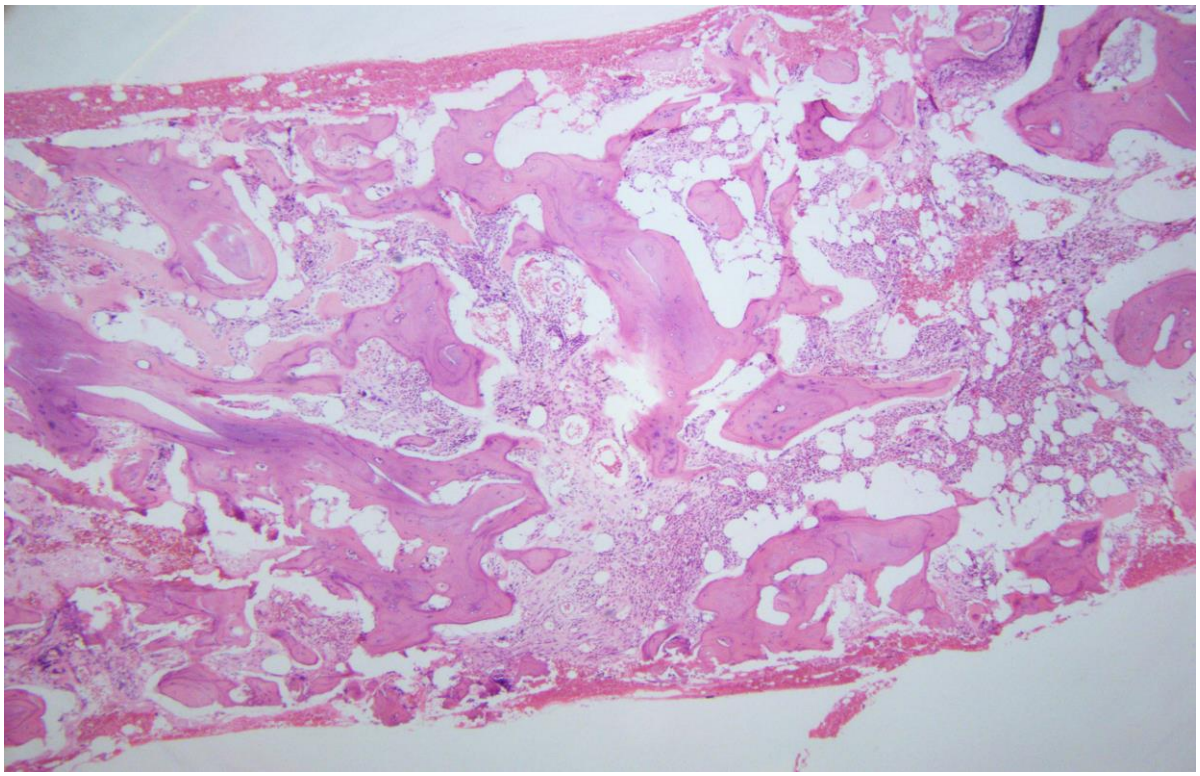
postojala dijagnoza MPN, ponekad može biti vrlo teško reći radi li se o PMF ili SMF (69,76,77). Kriteriji Međunarodne radne grupe za istraživanje i liječenje mijeloproliferativnih neoplazmi (IWG-MRT prema eng. International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment) (77) za dijagnozu post-ET i post-PV MF prikazani su u Tablici 5.

Slično kao kod ET, mutacijski status u PMF i SMF značajno utječe na klinički fenotip i prognozu. Bolesnici s JAK2-V617F mutacijom pokazuju veći mijeloproliferativni potencijal, imaju više vrijednosti leukocita i hemoglobina, dok su oni s CALR mutacijom mlađi, češće s trombocitozom i boljom prognozom, što je moguće vezano samo za tip 1 mutacije. Suprotno, bolesnici s mutiranim MPL genom su stariji, češće imaju konstitucijske simptome, a prognoza im je slična JAK2-V617F mutiranim bolesnicima (21,22,69,78).

Najčešće korišteni modeli za procjenu rizika od smrti kod bolesnika s PMF i SMF su Internacionalni prognostički sistemski skor (IPPS, prema eng. International Prognostic Scoring System) koji prilikom dijagnoze u obzir uzima dob bolesnika, leukocite, hemoglobin, broj cirkulirajućih blasta i prisutnost konstitucijskih simptoma (79), te Dinamički internacionalni prognostički sistemski skor (DIPSS, prema eng. Dynamic International Prognostic Scoring System) koji evaluira iste parametre i boduje ih u bilo kojem trenutku tijekom praćenja, a bolesnici s progresijom bolesti i akumulacijom novih rizičnih čimbenika imaju lošiju prognozu (80). Potonji bodovni sustav prikazan je u Tablici 6. Treći prognostički model koji se može koristiti tijekom praćenja jest DIPPS-plus, a on dodatno boduje i trombocitopeniju, kariotip i potrebu za transfuzijama eritrocita (81). U novije su vrijeme razvijeni možda i precizniji prognostički modeli, temeljeni dominantno na molekularno-genetičkoj stratifikaciji rizika, a koji se, s obzirom na cijenu i dostupnost, u svakodnevnoj kliničkoj praksi ipak rjeđe koriste (82,83).

Jedini modalitet liječenja kojim se može poboljšati preživljenje i izliječenje bolesnika s PMF i SMF jest transplantacija alogenih krvotvornih matičnih stanica. Nažalost, taj postupak prati visoka smrtnost (barem oko 50%), kao i značajan morbiditet i komplikacije samog transplantacijskog postupka (npr. reakcija presatka protiv primaoca) (52,69,84), stoga je kod svakog bolesnika

potrebno pažljivo odvagati rizik od same transplantacije i potencijalnu korist u smislu preživljenja. Nasuprot tome, svi trenutno dostupni lijekovi, uključujući ruksolitinib, imaju uglavnom palijativnu ulogu i nisu pokazali da mogu značajno promijeniti tijek bolesti, smanjiti fibrozu KS ili dovesti do citogenetske/molekularne remisije, ali zato mogu olakšati simptome povezane s bolešću i smanjiti veličinu slezene (26-28,49,69,85,86). Bolesnike srednjeg-2 i visokog rizika treba pokušati alotransplantirati, a ako nisu pogodni za transplantaciju, terapiju treba usmjeriti na dominantne simptome bolesti. U svih rizičnih skupina, ukoliko postoji simptomatska anemija, mogu se koristiti androgeni, prednizon, talidomid ili lenalidomid (potonja dva mogu biti posebno učinkoviti kad je prisutna citogenetska promjena delecija 5q31). Bolesnici srednjeg-1, srednjeg-2 i visokog rizika koji imaju simptomatsku splenomegaliju liječe se ruksolitinibom i hidroksiurejom. Drugi se modaliteti liječenja poput splenektomije i zračenja slezene rijetko koriste. Bolesnike niskog i srednjeg-1 rizika bez značajnih simptoma, može se samo opservirati, a ako je potrebna citoredukcija, preporuča se primjena hidroksiureje (49,69).



Slika 3: Hipocelularna koštana srž uz odlaganje kolagenih vlakana u bolesnika s primarnom mijelofibrozom (bojenje hemalaun-eozin, povećanje x40).

Tablica 3: Trenutno važeći Europski konsenzus o stupnjevanju fibroze koštane srži (75).

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 retikulinskih vlakana s opsežnim presijecanjima uz povremene fokalne nakupine kolagena ili fokalnu osteosklerozu
Stupanj 3	Difuzna i gusta retikulinska mreža s opsežnim presijecanjima uz grube depozite kolagena i često udružena s znatnom osteosklerozom

Tablica 4: Dijagnostički kriteriji za PMF prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (30).

Dijagnoza zahtijeva sva tri velika kriterija i barem jedan mali kriterij
Veliki kriteriji 1. Prisutnost megakariocitne proliferacije i atipije, praćene retikulinskom i/ili kolagenom fibrozom stupnja 2 ili 3 2. Ne zadovoljava kriterije za esencijalnu trombocitemiju, policitemiju veru, BCR-ABL1 pozitivnu kroničnu mijeloičnu leukemiju, mijelodisplastični sindrom ili drugu mijeloidnu neoplazmu 3. Prisutnost JAK2-V617F, CALR ili MPL mutacije, ili u odsutnosti istih, drugog klonalnog markera*, ili bez dokaza reaktivne fibroze**
Mali kriteriji 1. Anemija koja nije uzrokovana drugim komorbidnim stanjem 2. Leukocitoza ≥ $11x10^9$/L 3. Palpabilna splenomegalija 4. Povišen LDH 5. Leukoeritroblastoza
** npr. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B.* ***Fibroza KS uzrokovana autoimunom bolešću ili drugim upalnim bolestima, leukemijom vlasastih stanica ili drugom limfoproliferativnom bolešću, metastaskim karcinomom ili toksičnom mijelopatijom*

Tablica 5: IWG-MRT kriteriji za dijagnozu post-ET MF i post-PV MF (77). U oba slučaja su za dijagnozu potrebna 2 glavna kriterija i 2 dodatna kriterija.

Post-ET MF	Post-PV MF
Glavni kriteriji 1. Ranije dokumentirana ET 2. Fibroza koštane srži stupanj 2 ili 3	**Glavni kriteriji** 1. Ranije dokumentirana PV 2. Fibroza koštane srži stupanj 2 ili 3
Dodatni kriteriji 1. Razvoj anemije i pad hemoglobina ≥20 g/L 2. Leukoeritroblastoza 3. Pojava palpabilne splenomegalije ili porast ranije palpabilne slezene ≥5 cm 4. Povišen LDH 5. Pojava jednog ili više konstitucijskih simptoma (gubitak na tjelesnoj težini >10% u šest mjeseci, noćna znojenja, neobjašnjeni (sup)febriliteti >37,5°C)	**Dodatni kriteriji** 1. Razvoj anemije ili gubitak potrebe za venepunkcijama ako je bolesnik bez citoreduktivne terapije 2. Leukoeritroblastoza 3. Pojava palpabilne splenomegalije ili porast ranije palpabilne slezene ≥5 cm 4. Pojava jednog ili više konstitucijskih simptoma (gubitak na tjelesnoj težini >10% u šest mjeseci, noćna znojenja, neobjašnjeni (sup)febriliteti >37,5°C)

Tablica 6: Prikaz Dinamičkog internacionalnog prognostičkog sistemskog skora (DIPSS, prema eng. Dynamic international prognostic scoring system) koji se najčešće koristi prilikom praćenja bolesnika s PMF i SMF (85).

Varijabla	**Bod**
Dob > 65 godina	1
Prisutnost konstitucijskih simptoma	1
Hemoglobin < 100 g/L	2
Leukociti > $25x10^9$/L	1
Cirkulirajući blasti ≥ 1%	1
*0 bodova=**niski rizik**, medijan preživljenja nije postignut* *1-2 boda=**srednji-1 rizik**, medijan preživljenja 14,2 godine* *3-4 boda=**srednji-2 rizik**, medijan preživljenja 4 godine* *5-6 bodova=**visoki rizik**, medijan preživljenja 1,5 godina*	

1.4 MPN KAO UPALNE BOLESTI

Kronična upala je vrlo važan čimbenik u patogenezi zloćudnih bolesti, a određeni su molekularni i stanični signalni putevi identificirani kao moguća poveznica između upale, razvoja, rasta i širenja tumora (87). Već je u 19. stoljeću Virchow ukazao na moguću ulogu kronične upale na razvoj zloćudnih bolesti (88), a 1986. godine je Dvorak karcinome opisao kao „rane koje ne cijele“ (89). Kasnije je koncept „onkoinflamacije“ prepoznat kao sedma tipična značajka zloćudnih tumora (90,91). Uistinu, hematološke zloćudne bolesti su kroz prošlost često etiološki bile povezivane s kroničnom upalom, a u novije se vrijeme pojavio i koncept MPN kao „Humanog upalnog modela za razvoj tumora“ (35,36). U narednim odlomcima ćemo iznijeti trenutno dostupne epidemiološke, kliničke i eksperimentalne dokaze o ulozi kronične upale u patogenezi MPN.

1.4.1 Epidemiološki dokazi

Velike Švedske epidemiološke studije su pokazale kako u bolesnika oboljelih u mijeloidnih neoplazmi (akutne mijeloične leukemije i mijelodisplastičnog sindroma) postoji povećan rizik od razvoja autoimunih i drugih upalnih bolesti. U slučaju MPN, kronične upalne bolesti se često javljaju prije same dijagnoze ili tijekom perioda praćenja. Najčešće se radi o polimijalgiji reumatici i/ili temporalnom arteritisu, Crohnovoj bolesti i imunoj trombocitopeniji. U tim studijama, autoimune i upalne bolesti su bile statistički značajno povezane s rizikom od kasnijeg razvoja MPN, što nam indirektno ukazuje kako bi kronična imuna stimulacija mogla poslužiti kao jedan od „okidača“ MPN (92-94). Nadalje, pokazano je kako se haplotip 46/1 gena za JAK2, rizičnog čimbenika za razvoj MPN (95-97), često može naći i u kroničnim upalnim stanjima, uključujući Crohnovu bolest (98,99).

Naposljetku, velika Danska epidemiološka studija s 49 488 ispitanika koja je istraživala rizične čimbenike za razvoj ateroskleroze, kronične upalne bolesti arterija, pokazala jest kako su ispitanici s dokazanom JAK2-V617F mutacijom pod povećanim rizikom od razvoja ishemijske bolesti srca

(100). Slično, u drugoj su populacijskoj studiji bolesnici s MPN imali značajno višu učestalost fraktura u usporedbi sa zdravom populacijom, što upućuje na mogući upalom stimulirani razvoj osteopenije i osteoporoze (101).

1.4.2 Klinički dokazi

MPN karakteriziraju značajan KV morbiditet i mortalitet, s trombozama arterija i vena kao tipičnim komplikacijama bolesti. Uz zahvaćanje arterija i vena, ovi su bolesnici dodatno skloni i mikrocirkulacijskim smetnjama, poput eritromelalgije, glavobolje, vrtoglavice ili gubitka vida (47,69,102). Patofiziologija tromboze u MPN je vrlo kompleksna, a osim hiperviskoznosti, uključuje i abnormalnu aktivaciju krvnih stanica klonalnog porijekla s pojačanim stvaranjem leukocit-trombocit kompleksa, te aktivaciju endotela kroničnim upalnim zbivanjem (102,103). Nadalje, u ovih bolesnika se može naći i poremećena koagulacijska osovina, s povišenim razinama protrombina, D-dimera, trombin-antitrombin kompleksa, trombomodulina i von Willebrandova faktora, koagulacijskih čimbenika često povezivanih s kroničnim upalnim zbivanjima, a čiji utjecaj na razvoj tromboze je prepoznat (102-104). Kronična upala ima i važnu ulogu u promoviranju ateroskleroze (105), a godinama je poznato kako su autoimune bolesti (npr. reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus) sklone preuranjenoj aterosklerozi i znatnom KV morbiditetu (106,107). Isto tako, kronično upalno stanje utječe i na razvoj inzulinske rezistencije i šećerne bolesti, značajnih rizičnih čimbenika za razvoj KV bolesti (108). Naposljetku, kronična upala i posljedična ateroskleroza mogu utjecati i na razvoj venskih tromboza (109).

Nedavno objavljena meta-analiza je pokazala kako povišena koncentracija serumskog C-reaktivnog proteina (CRP), vrlo osjetljivog biljega upale, koagulacije, fibrinolize, endotelne disfunkcije, oksidacije masnih čestica i stabilnosti aterosklerotskog plaka, u općoj populaciji ima kontinuiranu povezanost s ishemijskom bolesti srca, moždanim udarom i ukupnom KV smrtnošću (110). Slično, u studijama Barbuia i sur, više serumske koncentracije CRP-a u bolesnika s ET i PV su korelirale sa

štetnim KV događajima i većim opterećenjem JAK2 alelom, a u bolesnika s PMF i s transformacijom u akutnu leukemiju (111,112). U ovom bi kontekstu konstitutivno JAK-STAT signaliziranje i prateće upalno zbivanje moglo utjecati na „preuranjenu“ aterosklerozu i trombotske događaje u MPN, ali i na progresiju bolesti i sekundarnu leukemijsku transformaciju.

Osim promoviranja KV morbiditeta, sistemska upala ima utjecaj i na razvoj splenomegalije i različitih konstitucijskih simptoma koji su prisutni u oko 50%-70% bolesnika s MPN. Najčešće se radi o umoru (81%), svrbežu (52%), noćnom znojenju (49%), bolovima u kostima (44%), vrućici (14%) i gubitku na tjelesnoj masi (13%) (113,114). Prisutnost konstitucijskih simptoma značajno umanjuje kvalitetu života bolesnika s MPN, ali i svakodnevnu aktivnost i produktivnost na poslu (114). Primjena steroida, ruksolitiniba ili interferona alfa, lijekova za koje je pokazano da svojim antiupalnim učinkom snižavaju razinu upalnih citokina u cirkulaciji, brzo dovodi do poboljšanja općih simptoma i regresije splenomegalije (26-34,47,49,54-56,67,69). Zanimljivo, rezultati prospektivne opservacijske studije REVEAL (prema eng. The Prospective Observational Study of Patients with Polycythemia Vera in US Clinical Practices) pokazali su kako prisutnost konstitucijskih simptoma u bolesnika s PV, osim svrbeža i noćnog znojenja, ne korelira s uspješnošću citoreduktivne terapije pri kontroli krvnih nalaza, što indirektno implicira ulogu upalnog miljea na razvoj simptoma u bolesnika s PV (115). Slično je primjećeno i prilikom naglog prestanka uzimanja ruksolitiniba, kada se u dijela bolesnika može javiti „sindrom ustezanja“, s naglim povratkom simptoma bolesti, porastom veličine slezene, citopenijama, a u najtežim slučajevima i s hemodinamskom nestabilnošću uz kliničku sliku nalik sepsi (116).

Naposljetku, nekontrolirana sistemska upala u kroničnim upalnim i autoimunim bolestima često dovodi do disfunkcije i fibroze organa (117), što je prepoznato i u MPN, gdje je primjećen povećan rizik od razvoja progresivnog kroničnog bubrežnog zatajenja (118), nezavisnog rizičnog čimbenika za razvoj KV bolesti (119). Termin „MPN nefropatija“ sugeriran je kako bi se okarakterizirale nespecifične glomerulopatije povezane s MPN (120). Kliničke posljedice kronične upale u MPN slikovito su prikazane na Slici 4.

1.4.3 Eksperimentalni dokazi

Velik dio bolesnika s MPN, poglavito PMF i SMF, u cirkulaciji ima povišene razine različitih proupalnih citokina i faktora rasta, od kojih su najznačajniji monocitni kemotaktički protein-1 (MCP-1, prema eng. Monocyte chemotactic protein-1), makrofagni inflamatorni protein 1alfa (MIP-1α, prema eng. Macrophage inflammatory protein 1alpha), interferon-γ, interleukini (IL)-1, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-15 i IL-17, faktor nekroze tumora-alfa (TNF-α, prema eng. Tumor necrosis factor-α), transformirajući faktor rasta-beta (TGF-β, prema eng. Transforming growth factor-β), faktor stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF, prema eng. Granulocyte colony stimulating-factor), faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF, prema eng. Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor), vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, prema eng. Vascular endothelial growth factor) i trombocitni čimbenik rasta (PDGF, prema eng. Platelet-derived growth factor) (35,36,121-125). Za pojedine citokine pokazano je kako mogu utjecati na vrijednosti krvne slike, splenomegaliju i određene simptome bolesti, a jedan dio njih ima i negativan utjecaj na preživljenje (121-126).

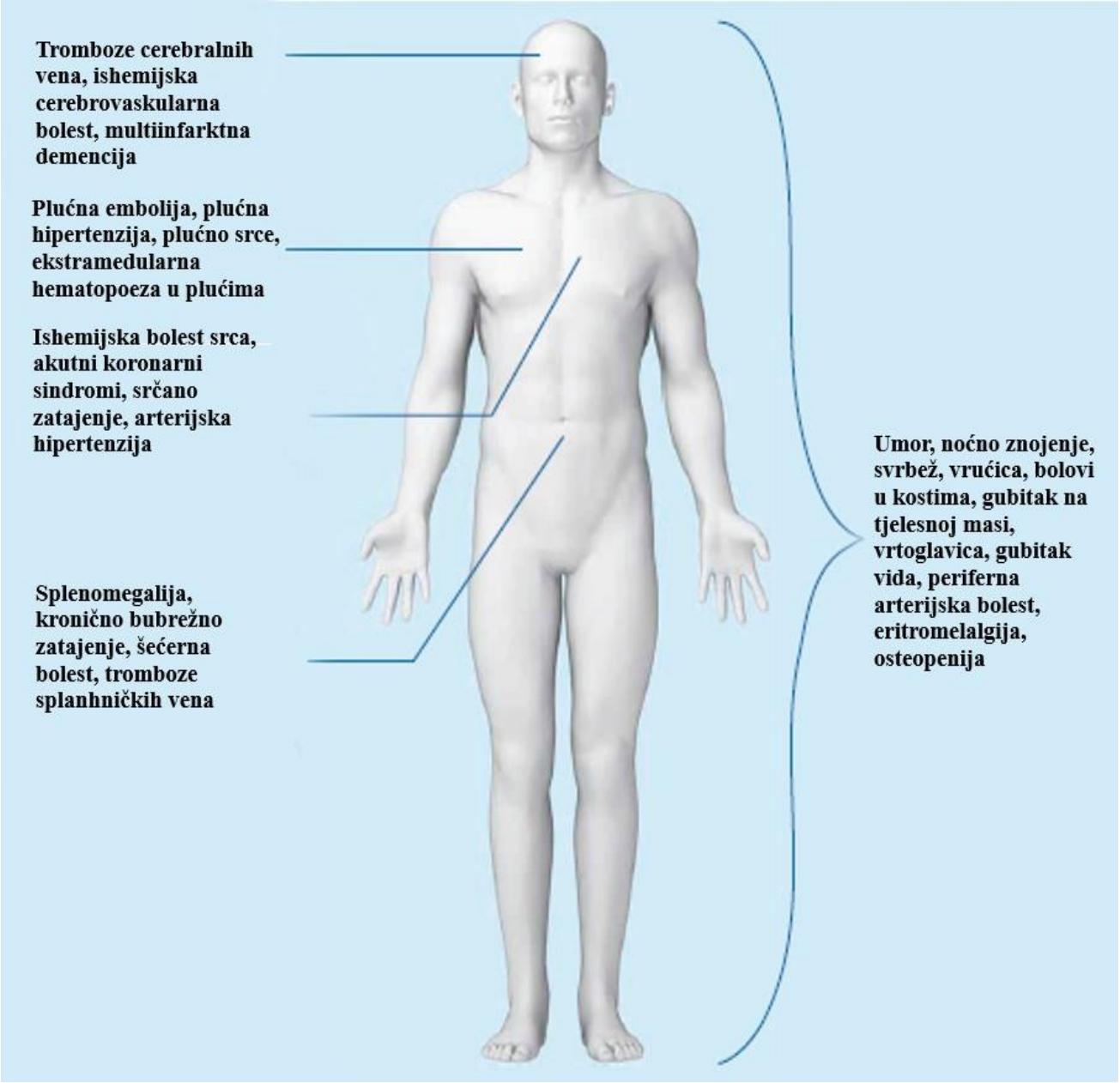
Bolesnici s MPN imaju i značajno disregulirane gene povezane s upalnim odgovorom. Pomoću genskog ekpresijskog profila analizirani su geni u imunokompetentnim stanicama bolesnika s MPN (granulociti, monociti, B- i T-limfociti) i pokazano je kako je u tih bolesnika snažno eksprimirana aktivnost gena povezanih s interferonom, poglavito interferon-inducibilnim genom 27 (IFI27, prema eng. interferon-inducible gene 27), čija je aktivnost bila izraženija osam, 16 i 30 puta u bolesnika s ET, PV i PMF. Ovaj„interferonski potpis“ u MPN mogao bi zrcaliti hiperstimulirani, ali i neefikasni imunosni sustav u MPN, najizraženije u PMF kao „terminalnoj“ fazi MPN (35,36,127).

Na primjeru TNF-α se može vrlo lako demonstrirati važnost upalne atmosfere u patogenezi MPN. U studiji Fleischman i sur. pokazano je kako povišena razina TNF-α u MPN korelira s opterećenjem JAK2 alelom. U toj su studiji *in vitro* pokusom JAK2-V617F pozitivne stanice tretirane JAK-inhibitorom, što je značajno smanjilo transkripciju TNF-α. S druge strane, miševi koji nisu

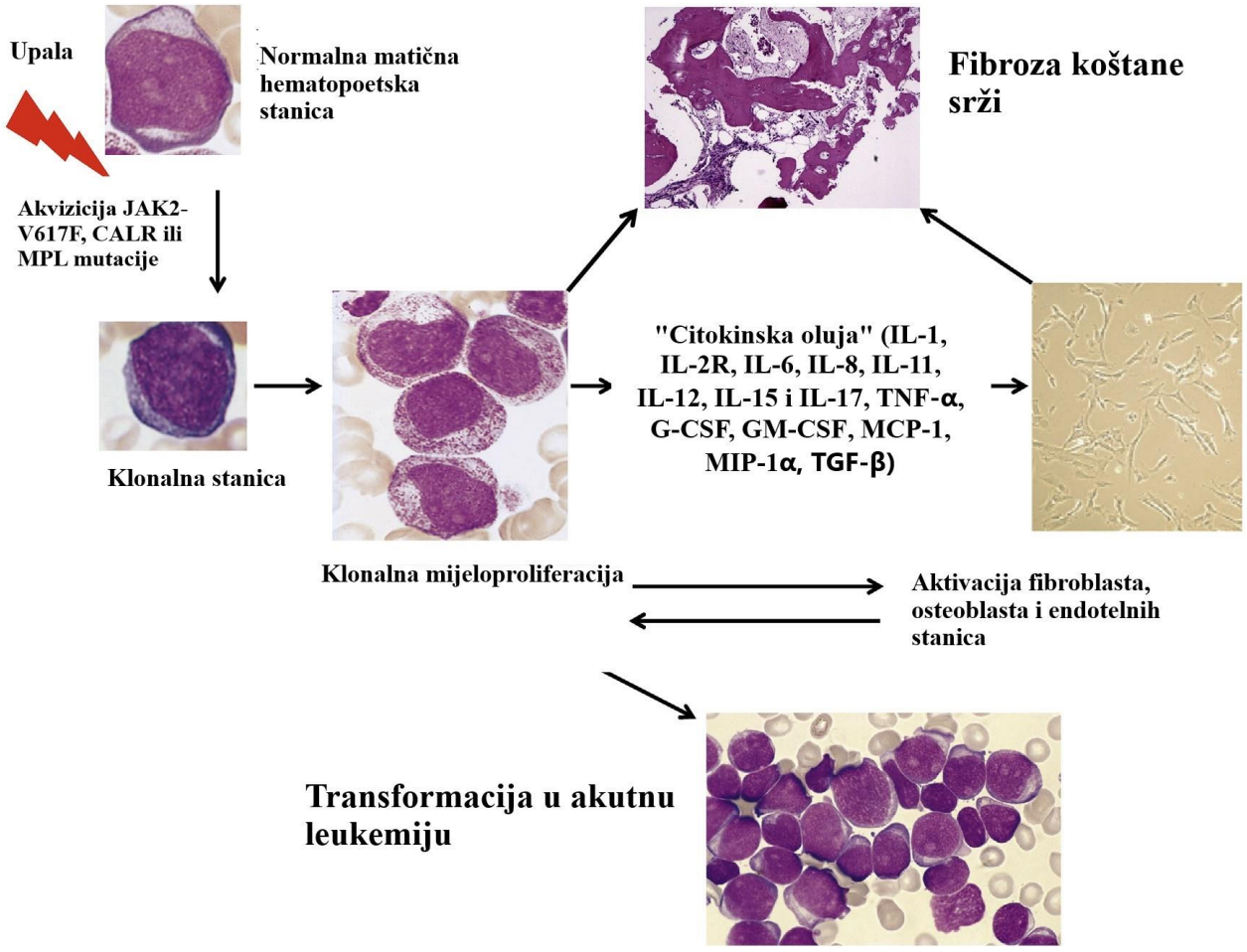
izražavali gen za TNF-α nisu mogli razviti kliničke značajke MPN. Još zanimljivije, JAK2-V617F pozitivne stanice, ali ne i one od zdravih kontrola, pokazivale su rezistenciju na supresiju rasta posredovane s TNF-α. Naposljetku, zdrave, JAK2-V617F negativne CD34+ stanice, suprimirane su s TNF-α, sugerirajući kako TNF-α i kronična upala mogu direktno poticati rast i razvoj zloćudnog klona, te inhibirati rast zdravih krvotvornih stanica (128).

Međutim, proizvodnja upalnih citokina u MPN nije ekskluzivno vezana samo za JAK2-V617F mutirane stanice. I zdrave stanice u mikrookolišu KS bolesnika s MPN mogu biti sekundarno „inducirane“ da prozvode proupalne citokine. Kleppe i sur. pokazali su kako zdrave hematopoetske stanice iz mišjih MPN modela, kao i one od bolesnika s MPN, aberantno sintetiziraju upalne citokine (129). Dodatno, hiperaktivacija signalnog puta nuklearnog čimbenika – kapa B(NF-κB, prema eng. nuclear factor-κB) pokazana je u bolesnika s PMF (130), a inhibicija NF-κB smanjila je rast CD34+ staničnih kultura u ovih bolesnika, direktno implicirajući ulogu NF-κB inhibitora kao potencijalnih terapijskih agensa u MPN (131).

Nadalje, iako postoje određeni dokazi da bi osteoklasti u bolesnika s PMF mogli biti klonalni i funkcionalno oštećeni (132), još uvijek se smatra kako su kronično upalno zbivanje, „citokinska oluja“ (ponajprije cirkulirajućih VEGF, PDGF, lipokalina-2 i IL-8) i vrlo složene interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša KS (fibroblasta, osteoblasta i endotelnih stanica), odgovorni za pretjeranu ekspresiju signalnog puta TGF-β, faktora rasta s centralnom ulogom u razvoju fibroze KS u MPN (37,38). Naposljetku, postoje dokazi da bi u upalnom miljeu KS i akumulirani slobodni kisikovi radikali (ROS, prema eng. reactive oxygene species) mogli dovesti do dodatne genske nestabilnosti, selekcioniranja subklonova, fibroze i disfunkcije KS, s posljedičnom granulocitopenijom, anemijom i trombocitopenijom. Pretjerana upalna aktivnost u KS mogla bi utjecati i na *in vivo* aktivaciju granulocita s oslobađanjem različitih proteolitičkih enzima i poticanjem efluksa CD34+ stanica iz KS u cirkulaciju, s razvojem ekstramedularne hematopoeze („metastaziranje“), što je tipična značajka PMF (35,36,124,125). Patofiziološka uloga kronične upale u promociji i progresiji MPN slikovito je prikazana na Slici 5.



Slika 4: Kronična upala u bolesnika s MPN značajno utječe na kardiovaskularni morbiditet i konstitutivne simptome. Preuzeto i modificirano prema Hasselbalch HC, 2015 (36).



Slika 5: Kronična upala kao začetnik i promotor MPN. Preuzeto i modificirano prema Lussana F, 2017 (124).

1.5 HITINAZE I HITINAZAMA SLIČNE BJELANČEVINE

Hitin je polimer β-1,4-N-acetyil-glukozamina i produkt je mnogih živih organizama, prvenstveno biljki, insekata, bakterija, virusa, gljivica i parazita. Biološka funkcija hitina je izgradnja stijenke biljki, egzoskeleta insekata, mikrofilamenata parazita, a igra i važnu ulogu u životnom ciklusu gljiva. Dugo se smatralo kako sisavci ne proizvode hitinaze, s obzirom na to da njihov organizam ne sadržava hitin, no prisutnost hitinaza i bjelančevina sličnih hitinazama (CLPs, prema eng. chitinase-like proteins) dokazana je i u ljudi. Hitinaze svojom enzimatskom aktivnošću razgrađuju hitin, dok se CLPs mogu vezati na hitin, no ne posjeduju katalitičku aktivnost. Glavna evolucijska uloga hitinaza je urođena obrana od organizama koji posjeduju hitin (npr. parazita i gljiva) (133-137).

Skupini hitinaza i CLPs pripadaju bjelančevina 1 slična hitinazi-3 (YKL-40), hitotriozidaza (CHIT1), bjelančevina 2 slična hitinazi-3 (YKL-39), kisela humana hitinaza (AMCase, prema eng. Acidic mammalian chitinase), YM1, jajovodu-specifična bjelančevina (OVGP, prema eng. oviduct-specific glycoprotein) i hitinazi-slična bjelančevina koji komunicira sa stabilinom-1 (SI-CLP, prema eng. stabilin-I-interacting chitinase-like protein). Ove se bjelančevine pojačano sintetiziraju u različitim patološkim stanjima, dok je u zdravom organizmu njihova ekspresija minimalna. Iako uloga hitinaza i CLPs u patogenezi ljudskih oboljenja još uvijek nije sasvim jasna, postoje brojni dokazi o važnosti ovih bjelančevina u patofiziologiji upale, ateroskleroze i zloćudnih bolesti (138-143). U naredna dva odlomka podrobnije ćemo se osvrnuti na YKL-40 i CHIT1.

1.5.1 Bjelančevina 1 slična hitinazi-3 (YKL-40)

Bjelančevina 1 slična hitinazi-3 (YKL-40) ima važnu ulogu u patogenezi upale, upalnog remodeliranja tkiva, ateroskleroze i zloćudnih bolesti. Gen za sintezu YKL-40 nalazi se na kromosomu 1q32.1 i sastoji se od 10 egzona. Skraćenica YKL-40 proizlazi iz prve tri N-terminalne aminokiseline, tirozina (Y), lizina (K) i leucina (L), te molekularne mase od 40 kDa (149). Drugi nazivi za ovaj glikoprotein su bjelančevina 1 slična hitinazi-3 (CHI3L1, prema eng. chitinase-3-like protein-1), ljudski hrskavični glikoprotein-39 (HC-gp39, prema eng. human cartilage glycoprotein-39), heparin-vežući glikoprotein mase 38-kDa (gp38, prema eng. 38-kDa heparin-binding glycoprotein) i chondrex (138-143). Plazmatska koncentracija YKL-40 u zdravoj populaciji korelira s dobi, nije ovisna o spolu ili dobi dana i godinama može biti stabilna (139).

Sintezu i sekreciju YKL-40 snažno potiču IL-6 i interferon-γ, a smanjuju IL-4 i deksametazon (147,148). YKL-40 se dominantno sintetizira u makrofazima (145,146), monocitima (149,150), granulocitima (151), megakariocitima (152), hondrocitima i sinovijalnim stanicama (153,154) i vaskularnim glatkim mišićnim stanicama (VSMC, prema eng. vascular smooth muscle cells) (155-159), ali i u različitim zloćudnim stanicama (138-141).

Biološke funkcije YKL-40 su vrlo raznolike. Tijekom infekcija, YKL-40 se ponaša kao reaktant akutne faze upale - luči se iz granulocita (151), veže za patogen (138-143) i potiče diferencijaciju monocita u makrofage (149,150), a povišene cirkulirajuće koncentracije YKL-40 opisane su kod bolesnika s meningitisom (160), upalom pluća (161) i kandidijazom (162).

YKL-40 ima i važnu ulogu u fibroznom remodeliranju tkiva. YKL-40 stimulira proliferaciju vezivnog tkiva (fibroblasta, hondrocita i sinovijalnih stanica), slično učinku inzulinu-sličnog faktora rasta (IGF-1, prema eng. Insulin-like growth factor 1), s kojim može djelovati sinergistički (150,153,154). Stimulirajući mitogenom-aktiviranu proteinsku kinazu (MAPK, prema eng. Mitogen-activated protein kinase) i fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI3K, prema eng. Phosphoinoside-3 kinase) preko fosforilacije vanstaničnim signalom-reguliranih kinaza 1 i 2 (ERK1/ERK2, prema

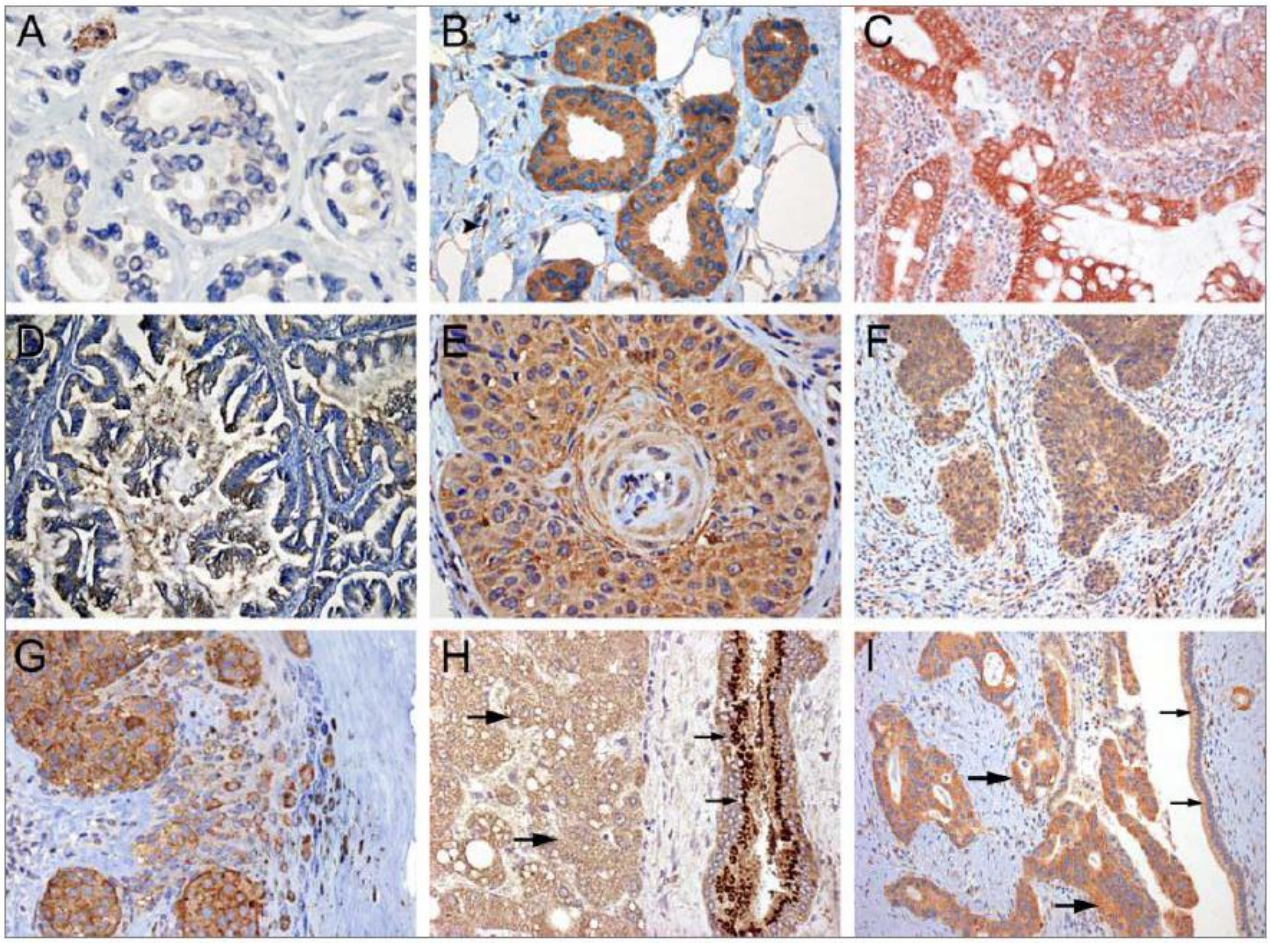
eng. Extracellular signal-regulated kinase-1 and 2) i proteinske kinaze B (PKB, prema eng. Protein kinase B) YKL-40 potiče stanice vezivnog tkiva da završe mitozu, potičući njihov rast i proliferaciju (153). Dodatno, čini se da se YKL-40 može i direktno vezati na kolagen tipa I, II i III (138,141). S obzirom na to da je je YKL-40 povezan s upalnim remodeliranjem tkiva, njegov izražaj je analiziran i u autoimunim bolestima, poput upalnih bolesti crijeva (163), reumatoidnog artritisa (164) i sarkoidoze (165), gdje se čini da serumska koncentracija YKL-40 dobro korelira s aktivnošću osnovne bolesti. Slično je primjećeno i na primjeru alkoholne fibroze jetre, gdje povišena serumska koncentracija YKL-40 vjerojatno zrcali pojačanu aktivnost Kupfferovih stanica (jetrenih makrofaga) (166).

Posljednjih godina akumulirani su i dokazi o ulozi YKL-40 u promicanju ateroskleroze. Nekoliko je *in vitro* studija sugeriralo ulogu YKL-40 u formiranju i progresiji aterosklerotskog plaka. Pokazano je kako YKL-40 potiče migraciju VSMC kroz intimu krvnih žila, ali i njihovu morfološku reorganizaciju, kao odgovor na egzogene signale (155,156). Dodatno, imunohistokemijskim i molekularnim metodama pronađena je pojačana ekspresija YKL-40 u VSMC i makrofazima unutar aterosklerotskog plaka, što implicira ulogu YKL-40 u neoangiogenezi i formiranju aterosklerotskog plaka, primarno potpomažući diferencijaciju monocita u "pjenušave" makrofage unutar plaka (157,158). Kasnije su *in vivo* studije pokazale kako serumska koncentracija YKL-40 dobro korelira s prisutnošću i proširenošću koronarne bolesti srca (167-169), ali i s povećanim rizikom od ukupne i KV smrtnosti (170). Slično, povišene cirkulirajuće vrijednosti YKL-40 opisane su i kod bolesnika s ishemijskom cerebrovaskularnom bolešću (171,172). Naposljetku, kod bolesnika sa šećernom bolesti, YKL-40 korelira s inzulinskom rezistencijom i prisutnošću albuminurije, što opet ukazuje na moguću patofiziološku ulogu YKL-40 u razvoju mikrovaskularnih komplikacija (173,174).

Budući da biološke funkcije YKL-40 uključuju regulaciju stanične proliferacije, adhezije, migracije, aktivacije i remodeliranja vanstaničnog matriksa, mnogi istraživači su povišenu ekspresiju YKL-40 dokazali i u različitim vrstama zloćudnih tumora, poput osteosarkoma, glioblastoma, melanoma, karcinoma dojke, bubrega, debelog crijeva, prostate i gušterače, a kod

većine njih, značajno povišene serumske koncentracije YKL-40 uglavnom ukazuju na diseminaciju bolesti s negativnim prognostičkim značajem (Slika 6). Ipak, pokazano je kako osjetljivost i specifičnost YKL-40 nije dovoljna za identifikaciju primarnog tumora, u smislu "univerzalnog" preglednog testa. Isto tako, ekspresija YKL-40 ne korelira s prisutnošću individualnih tumorskih antigena, što vjerojatno zrcali različite biologije tumora, u kojima neke zloćudne stanice luče YKL-40, a druge ne. Naposljetku, još uvijek nije sasvim jasno luče li YKL-40 samo tumorske stanice ili i peritumorski makrofazi (TAMs, prema eng. tumor-associated macrophages). Vrlo je moguće da cirkulirajuće vrijednosti YKL-40 integriraju zajedničku aktivnost primarnog tumora i TAMs (138-140).

U bolesnika s hematološkim zloćudnim bolestima, serumske koncentracije YKL-40 istražene su u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (175) i multiplom mijelomu (152), gdje se pokazalo kako su povišene koncentracije ovog biljega povezane s lošijim preživljenjem, te u Hodgkinovoj bolesti, u kojoj je cirkulirajući YKL-40 korelirao s uznapredovalom bolešću, općim simptomima i cirkulirajućim IL-6 (145). Dvije su studije analizirale serumsku koncentraciju YKL-40 u MPN. Prva je analizirala serumsku koncentraciju YKL-40 u 48 bolesnika s MPN i demonstrirala je povišenu vrijednost YKL-40 u bolesnika s PMF, no ne i u bolesnika s ET i PV. Ta je studija imala više nedostataka – nije uključivala bolesnike sa SMF, odnos između ET i PV prema PMF nije demonstriran, a kliničke korelacije vezane uz YKL-40 nisu pokazane (176). Druga studija je uključila 47 bolesnika s ET i PV liječenih vorinostatom, a pokazala je povišenu koncentraciju serumskog YKL-40 u bolesnika s PV u odnosu na zdrave kontrole i ET. Serumska je koncentracija YKL-40 u bolesnika s PV korelirala s opterećenjem JAK2 alelom, brojem granulocita i trombocita, razinom LDH i CRP-a, a niže vrijednosti zabilježene su u kontrolnom intervalu kod bolesnika koji su povoljno odgovorili na liječenje. Autori su stoga zaključili kako bi YKL-40 mogao biti novi cirkulirajući biljeg tumorskog opterećenja i progresije MPN (177).



Slika 6: Imunohistokemijska ekspresija YKL-40 u različitim solidnim tumorima. Preuzeto i modificirano prema Schultz NA, 2010 (139). A) normalan epitel dojke sa slabom ekspresijom YKL-40 uz pojačanu ekspresiju u upalnim stanicama, B) invazivni duktalni karcinom dojke, C) kolorektalni karcinom, D) karcinom ovarija, E) planocelularni karcinom glave i vrata, F) planocelularni karcinom cerviksa, G) melanom, H) hepatocelularni karcinom s niskom ekspresijom YKL-40 (velike strelice) i normalan epitel žučnih kanalića s pojačanom ekspresijom YKL-40 (male strelice), I) karcinom gušterače.

1.5.2 Hitotriozidaza (CHIT1)

Serumska hitotriozidaza (CHIT1) je prva otkrivena hitinaza, a gen za CHIT1 se nalazi na kromosomu 1q31-q32 i sastoji se od 12 egzona. Slično YKL-40, glavna evolucijska uloga CHIT1 je urođena zaštita od mikroorganizama koji sadržavaju hitin, čemu je dokaz i činjenica kako su bolesnici s defektnim genom za CHIT1 pojačano skloni infestacijama filarijom, malarijom, kriptokokom i kandidom (143,147,148,183-185).
Glavne stanice koje koje sintetiziraju, pohranjuju i otpuštaju CHIT1 su aktivirani makrofazi i granulociti, uglavnom stimulirani inteferonom-γ, TNF-α, GM-CSF i putem Toll-like receptora (186,187).

U svakodnevnom kliničkom radu, mjerenje serumske aktivnosti CHIT1 koristi se kao biljeg uspješnosti različitih terapijskih pristupa u liječenju Gaucherove bolesti (GB), nasljedne autosomno-recesivne bolesti uzrokovane manjkom lizosomalne glukocerebrozidaze s posljedičnim nakupljanjem glukocerebrozida u „pjenušavim“ tkivnim makrofazima, tzv. Gaucherovim stanicama (Slika 7). Prosječna serumska aktivnost CHIT1 u GB je više od 600 puta veća nego u zdravoj populaciji i predstavlja surogatni cirkulirajući biljeg prisutnosti tkivnih Gaucherovih stanica (188,189). Isto tako, praćenje serumske aktivnosti CHIT1 može se koristiti i tijekom liječenja drugih lizosomalnih bolesti, poput Niemann-Pickove bolesti (190,191).

Osim kod infekcija mikroorganizmima koji sadržavaju hitin (192), povišena serumska aktivnost CHIT1 se može naći i u drugim stanjima povezanim s nespecifičnom aktivacijom makrofagnog sustava, poput kroničnih autoimunih bolesti karakteriziranih stvaranjem granuloma. Tipični primjeri su Wegenerova granulomatoza (193), upalne bolesti crijeva (194) i sarkoidoza (195).
S druge strane, CHIT1 stimulira signalni put TGF-β i tako utječe na upalno remodeliranje tkiva. Na mišjem je modelu pokazano kako je fibroza pluća uzrokovana bleomicinom bila znatno manje izražena u CHIT1-defektnih miševa, naspram zdravim miševima (196). Povećana ekspresija CHIT1 opisana je i u bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti, gdje može pridonositi

opstrukciji dišnih puteva i fibroznom remodeliranju bronha i plućnog parenhima (197). Slično, CHIT1 otpušten iz Kupfferovih stanica može pridonositi razvoju jetrene ciroze (198).

Makrofazi imaju i vrlo važnu ulogu u reguliranju normalne i patološke eritropoeze. Eritroni u KS razvijaju se unutar posebne, specijalizirane niše, nazvanom „eritroblastni otok“ (Slika 8). Unutar „eritroblastnog otoka“, makrofazi stimuliraju proliferaciju i preživljavanje zrelih eritroblasta (199). Nakon sazrijevanja, eritrociti cirkuliraju u krvi oko 120 dana, a potom ih uklanjaju makrofazi jetre i slezene. Zanimljivo, povećana serumska aktivnost CHIT1 opisana je u β-talasemiji, bolesti u kojoj genski defekt za sintezu β-globinskog lanca dovodi do neproduktivne eritropoeze i ekspanzije makrofagnog sustava u jetri i slezeni, posljedično uklanjanju nefunkcionalnih eritrocita (200).

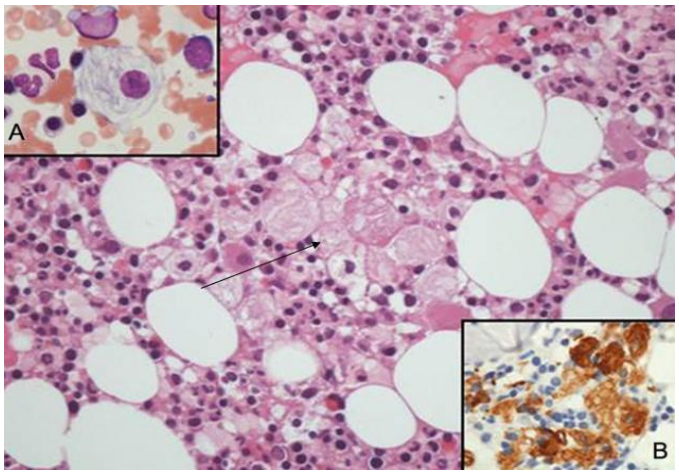
Vrlo zanimljivi rezultati proizašli su iz studije koja je istraživala važnost makrofaga u patofiziologiji PV. U toj je studiji, nakon deplecije makrofaga klodronatom, došlo do reverzije PV fenotipa u JAK2-V617F pozitivnih miševa. Nadalje, proliferacija JAK2-V617F pozitivnih stanica je u *in vitro* uvjetima bila značajno smanjena u kulturi stanica bez makrofaga, u usporedbi sa staničnom kulturom koja je sadržavala makrofage. Iz tih se rezultata da zaključiti kako je JAK2-V617F mutacija začetnik PV, no moguće je da potpuna klinička ekspresija PV dodatno ovisi i o mikrookolišu KS, prvenstveno makrofagnoj niši (201).

Slično kao i YKL-40, serumska aktivnost CHIT1 se pokazala osjetljivim upalnim biljegom ateroskleroze, a imunohistokemijskim i molekularnim tehnikama je *in vitro* dokazana njena prisutnost u različitim subpopulacijama makrofaga unutar aterosklerotskog plaka (163) (Slika 9). U *in vivo* studijama je pokazana povišena serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s ishemijskim moždanim udarom i koronarnom bolešću srca, gdje serumska aktivnost CHIT1 korelira s proširenošću aterosklerotske bolesti (202-204). Temeljem ovih rezultata, serumska aktivnost CHIT1 je prihvaćena kao jedan od biljega formacije aterosklerotskog plaka. Zanimljivo, primjena statina i fibrata, lijekova koji snižavaju razinu kolesterola i triglicerida, ne utječe na redukciju serumske aktivnost CHIT1 što upućuje kako CHIT1 nije optimalan biljeg za praćenje progresije ateroskleroze (204). Nadalje, povišena serumska aktivnost CHIT1 opisana je i kod novodijagnosticiranih

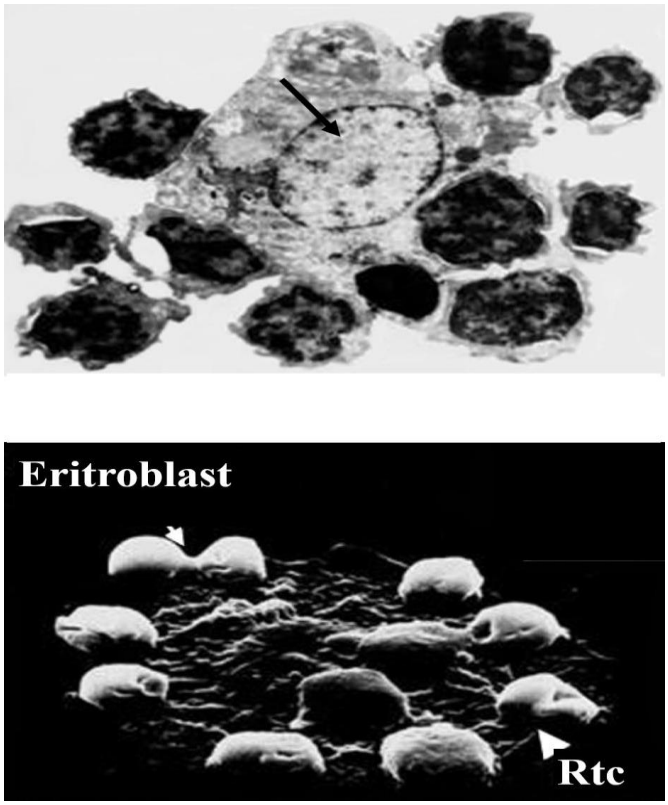
bolesnika sa šećernom bolešću, što se može tumačiti endotelnom disfunkcijom prisutnom u ovih bolesnika (205).

Serumska aktivnost CHIT1 je istražena i u zloćudnim bolestima. Blago je povišena u karcinomu pluća, gdje se u slučaju eksudativnog pleuralnog izljeva nije pokazala dovoljno osjetljivom za diferenciranje upale i tumora (206). Isto tako, povišena aktivnost CHIT1 demonstrirana je u bolesnika s karcinomom prostate i visokim Gleasonovim skorom, ali ne i u slučaju benigne hipertrofije prostate (207). Također, vrlo dobra dijagnostička osjetljivost i specifičnost serumske aktivnosti CHIT1 za detekciju tumora zabilježena je i u bolesnika s karcinomom dojke (208).

Serumska aktivnost CHIT1 do sada nije istraživana u MPN. Nekoliko je ranih studija pokazalo kako se u određenih bolesnika s KML u KS mogu vizualizirati Gaucherove stanice uz povećanu serumsku aktivnost CHIT1, vjerojatno posljedično nakupljanju glukocerebrozida uzrokovanim povećanom proliferacijom leukocita, a ne zbog nasljednog defekta enzima. Kliničko značenje Gaucherovih stanica u ovom kontekstu nije jasno (209,210). Budući da GB ponekad može klinički nalikovati primarnim hematološkim zloćudnim bolestima (npr. imati simptome splenomegalije, bolove u kostima, anemiju ili trombocitopeniju), ponekad nalaz Gaucherovih stanica u KS može kliničara uputiti na ispravnu dijagnozu (211). Stanično porijeklo YKL-40 i CHIT1, te njihova potencijalna uloga u patogenezi ljudskih bolesti sumarno je prikazana u Tablici 7.



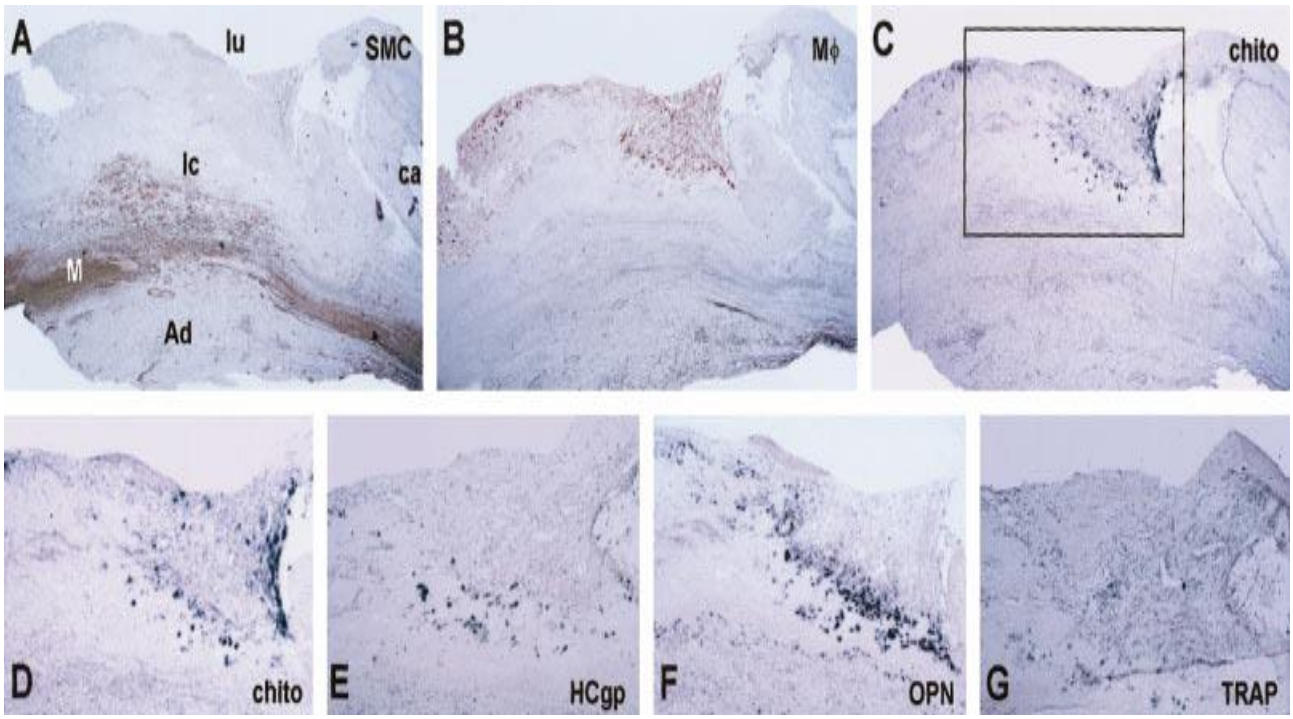
Slika 7: Gaucherove stanice u KS bolesnika s JAK2-V617F pozitivnom MPN. Nakupine Gaucherovih stanica (stanice poput „zgužvanog papira“) u hipercelularnoj KS (strelica, 40x). A) Gaucherova stanica na velikom povećanju (100x), B) imunohistokemijsko bojenje CD68 (100x). Preuzeto i modificrano prema Appiah-Cubi S, 2015 (206).



Slika 8: Prikaz „eritroblastnog otoka“, elektronska mikroskopija. Strelice označavaju centralno smještenog makrofaga okruženog eritroblastima i retikulocitima (Rtc). Preuzeto i modificirano prema Chasis JA, 2008 (194).

Tablica 7: Stanično porijeklo YKL-40 i CHIT1 i njihova uloga u patogenezi ljudskih bolesti.

Stanice porijekla	YKL-40	CHIT1
Makrofazi	Monociti kasnijih stadija diferencijacije, makrofazi potaknuti interferonom-γ, makrofazi povezani s tumorom, granulomi u sarkoidozi pluća, makrofazi aterosklerotskog plaka	Makrofazi, monociti, Gaucherove stanice, plućni makrofazi
Granulociti	Aktivirani i neaktivirani granulociti	Aktivirani i neaktivirani granulociti
T-limfociti	Ne	Ne
B-limfociti	Ne	Ne
Epitelne stanice	Ne	Ne
Sinovijalne stanice	Stanice sinovije nalik fibroblastima	Ne
Hondrociti	Hondrociti u reumatoidnom artritisu i osteoartritisu	Ne
Glatke mišićne stanice	Vaskularne glatke mišićne stanice	Ne
Infekcije	Meningitis, pneumonija, kandida	Malarija, filarijaza, kandida, kriptokok
Autoimune bolesti	Reumatoidni artritis, sarkoidoza, upalne bolesti crijeva	Wegenerova granulomatoza, sarkoidoza, upalne bolesti crijeva
Zloćudni tumori i tumorske stanične linije	Glioblastom, osteosarkom, melanom, karcinom gušterače, ovarija, dojke i prostate, multipli mijelom, Hodgkinova bolest, akutna mijeloična leukemija, Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme	Karcinom pluća, prostate i dojke



Slika 8: Pojačana mRNA ekspresija CHIT1, YKL-40 i osteopontina u aterosklerotskom plaku trbušne aorte. Detekcija VSMC (A) i makrofaga (B) pomoću imunohistokemijskog bojenja na SM α-aktin i HAM65. In situ hibridizacijom vidljiva je ekspresija CHIT1 (C i D), YKL-40 (HCgp) (E) i osteopontin (OPN) mRNA (F) u makrofazima unutar aterosklerotskog plaka. G) TRAP je eksprimiran u svim makrofazima. Preuzeto i modificirano prema Boot RG, 1999 (158).

2. HIPOTEZA

Serumska koncentracija YKL-40 i aktivnost CHIT1 više su u bolesnika s MPN u odnosu na zdrave dobrovoljce i neovisne o JAK2-V617F ili CALRETICULIN mutacijskom statusu.

3. CILJEVI RADA

3.1 OPĆI CILJ: Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1 u MPN i njihovu povezanost s kliničkim značajkama bolesti.

3.2 SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN i u zdravih dobrovoljaca.
2. Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s ET, PMF i SMF u odnosu na JAK2-V617F i CALRETICULIN mutacijski status.
3. Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s PMF i SMF.
4. Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN u odnosu na:

   -apsolutni broj leukocita, granulocita, trombocita i blasta u perifernoj krvi,

   -serumsku laktat dehidrogenazu,

   -stupanj splenomegalije,

   -konstitucijske simptome.

5. Analizirati serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnot CHIT1 u bolesnika s PMF i SMF u odnosu na:

   - stupanj anemije,
   - opće tjelesno stanje bolesnika,
   - stupanj fibroze koštane srži,
   - dinamički internacionalni prognostički sistemski skor.

4. ISPITANICI I METODE

4.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u dva hematološka centra u Republici Hrvatskoj, Odjelu za internu medicinu, Opće bolnice Šibensko-kninske županije i Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Bolesnici su uključivani u istraživanje u razdoblju od srpnja 2014. do veljače 2016. Dijagnoza ET, PV i PMF revidirana je prema kriterijima SZO iz 2016. (25), a bolesnici s post-ET MF i post-PV MF dijagnosticirani su prema kriterijima IWG-MRT (77). Kontrolnu skupinu činili su dobrovoljni darivatelji krvi. Iz istraživanja smo isključili bolesnike mlađe od 18 godina, trudnice, te bolesnike s akutnim infekcijama, autoimunim i drugim zloćudnim bolestima.

4.2 METODE

Studija je dizajnirana kao istraživanje parova (prema eng. case-control study). U trenutku uključivanja u studiju bilježeni su podaci o vrsti bolesti, dobi, spolu, duljini trajanja bolesti, JAK2-V617F i CALR mutacijskom statusu, općem tjelesnom stanju mjerenom prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (ECOG, prema eng. Eastern Cooperative Oncology Group) (Tablica 8.) (207), DIPSS prognostičkom stadiju bolesnika s PMF i SMF (85), prisutnosti konstitucijskih simptoma definiranih prema kriterijima IWG-MRT (vrućica ≥37.5C, noćno znojenje, gubitak na tjelesnoj masi >10% u proteklih šest mjeseci) (77) i KV rizičnih čimbenika (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija), ranije preboljeloj trombozi (arterijskoj ili venskoj), ovisnosti o transfuzijama krvnih pripravaka, te vrsti liječenja (hidroksiureja, ruksolitinib, ASK i varfarin). Duljina slezene mjerena je palpacijski u centimetrima (cm), počevši od lijevog rebranog luka. Stupanj fibroze KS stupnjevan je prema Europskom konsenzusu (75).

Tablica 8: Opće tjelesno stanje prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (ECOG, prema eng. Eastern Cooperative Oncology Group) (212).

Stupanj 0	Asimptomatski (potpuno aktivan, sposoban obavljati bez ikakvih poteškoća sve aktivnosti kojima se bavio i prije bolesti
Stupanj 1	Simptomatski, ali potpuno ambulatorni pacijent (ograničen u napornim fizičkim aktivnostima, ali sposoban nastaviti posao koji je sjedilački i nije pretjerano zahtjevan kao što su lagani kućanski poslovi ili uredski posao)
Stupanj 2	Simptomatski, < 50% vremena tijekom dana provodi u krevetu (ambulatorni pacijent koji je sposoban sam se brinuti za sebe, ali je nesposoban izvršavati bilo kakve radne aktivnosti; nije vezan za krevet i >50% vremena koje provodi budan nije ograničen na krevet ili stolac)
Stupanj 3	Simptomatski, >50% vremena provodi u krevetu, ali nije vezan za krevet (sposoban ograničeno brinuti se za sebe, ograničen na krevet ili stolac 50% ili više vremena koje provodi budan)
Stupanj 4	Vezan za krevet (potpuno onemogućen, uopće se ne može brinuti o sebi, u potpunosti ograničen na krevet ili stolac)
Stupanj 5	Mrtav

4.3 LABORATORIJSKE ANALIZE

Puna krv za određivanje kompletne krvne slike, LDH i CRP uzeta je bolesnicima na dan uključivanja u istraživanje. Centrifugirajući uzorke krvi (3500 okretaja u minuti, ukupno 10 minuta), serum je odvojen od staničnih elemenata. Sve uzorke seruma pohranili smo na -80ºC do vremena laboratorijskih analiza.

Serumska koncentracija YKL-40 određena je kvantitatitivnim imunoenzimskim testom (ELISA, prema eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) (Quantikine Human CHI3L1 Immunoassay, R&D Systems, Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo). Princip određivanja temelji se na dodavanju uzoraka seruma u mikrotitarsku pločicu koja je prethodno obložena specifičnim antitijelima usmjerenim na YKL-40, a koncentracija analita određuje se mjerenjem apsorpcije produkta enzimske reakcije, nakon dodavanja poliklonskog antitijela specifičnog za YKL-40 konjugiranog sa

enzimom i enzimskog supstrata. Serumske vrijednosti koncentracije YKL-40 izražene su u pikogramima po mililitru (pg/mL).

Katalitička aktivnost CHIT1 u uzorcima seruma određena je fluorimetrijski na fluorimetru Cary Eclipse (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države) mjerenjem produkta enzimatske hidrolize 4-metilumbeliferona pri odgovarajućim valnim duljinama ekscitacije (365 nm) i emisije (450 nm). Enzimatska aktivnost CHIT1 izražena je kao nanomol supstrata hidroliziranog po satu i mililitru inkubiranog seruma (μmol/L/h).

4.4 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statističke analize provedene su koristeći licencirani komercijalni statistički program MedCalc Statistical Software® (verzija 19.0.3., Ostend, Belgija). Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički parametri nisu bili normalno distribuirani stoga su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (IQR, prema eng. interquartile range). Kategorijske varijable prikazane su kao broj i postotak. Kategorijske varijable uspoređene su pomoću $\chi 2$ testa, a numeričke pomoću Mann-Whitney U i Kruskal-Wallis testova. Analiza krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika (ROC, prema eng. Receiver Operating Characteristic Curve analysis) korištena je za testiranja osjetljivosti i specifičnosti. Spearmanova rank korelacija korištena je za usporedbu vrijednosti YKL-40 i CHIT1 i različitih numeričkih varijabli. Kaplan i Meierova, log-rank test te Coxova multivarijatna regresijska metoda korištene su za usporedbu preživljenja između grupa bolesnika. Modeli binarne logističke regresije korišteni su kako bi analizirali da li dodatak viših vrijednosti serumskog YKL-40 ranije etabliranim rizičnim čimbenicima može bolje diskriminirati bolesnike s povišenim rizikom za razvoj tromboze. Ukupno preživljenje (OS, prema eng. overall survival) i preživljenje bez znakova tromboze (TFS, prema eng. thrombosis-free survival) mjereno je kao vrijeme od uzimanja uzorka krvi do smrti bilo kojeg uzroka ili tromboze (arterijske ili venske). Podaci o preživljenju i trombozi bilježeni su za vrijeme posljednjeg pregleda. Arterijske tromboze definirane su kao akutni infarkt miokarda, tranzitorna moždana ishemijska ataka, akutni ishemijski moždani udar i akutna periferna arterijska okluzija. Venske tromboze definirane su kao periferna duboka venska tromboza, plućna tromboembolija i tromboza splanhničkih vena. P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su značajnima u svim analizama.

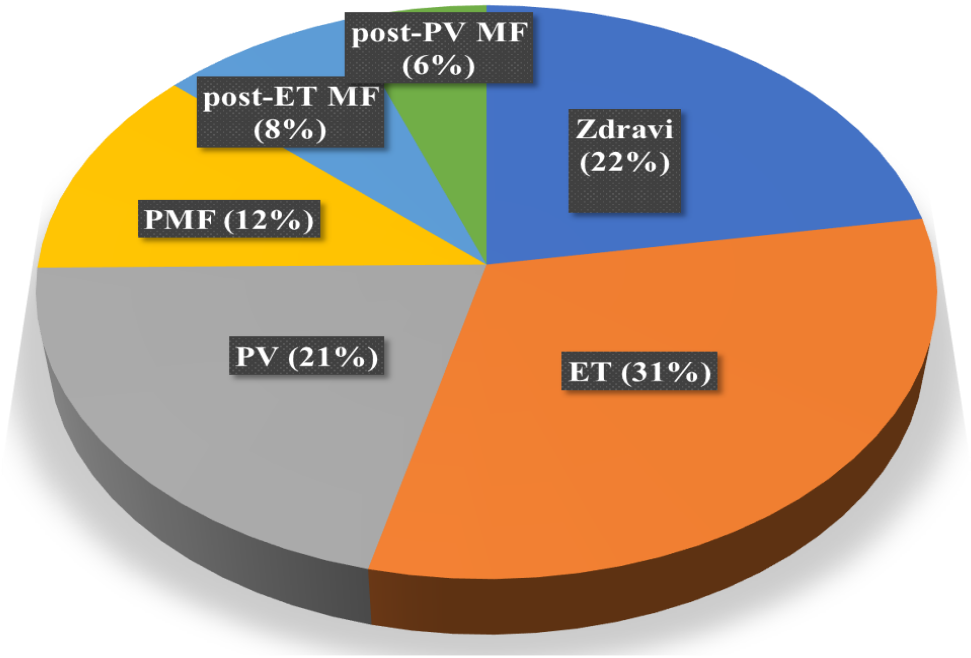
4.5 ETIČKA NAČELA

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i odobreno od strane Etičkih povjerenstava Opće bolnice Šibensko-kninske županije, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi sudionici potpisali su informirani pristanak.

5. REZULTATI:

5.1 KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

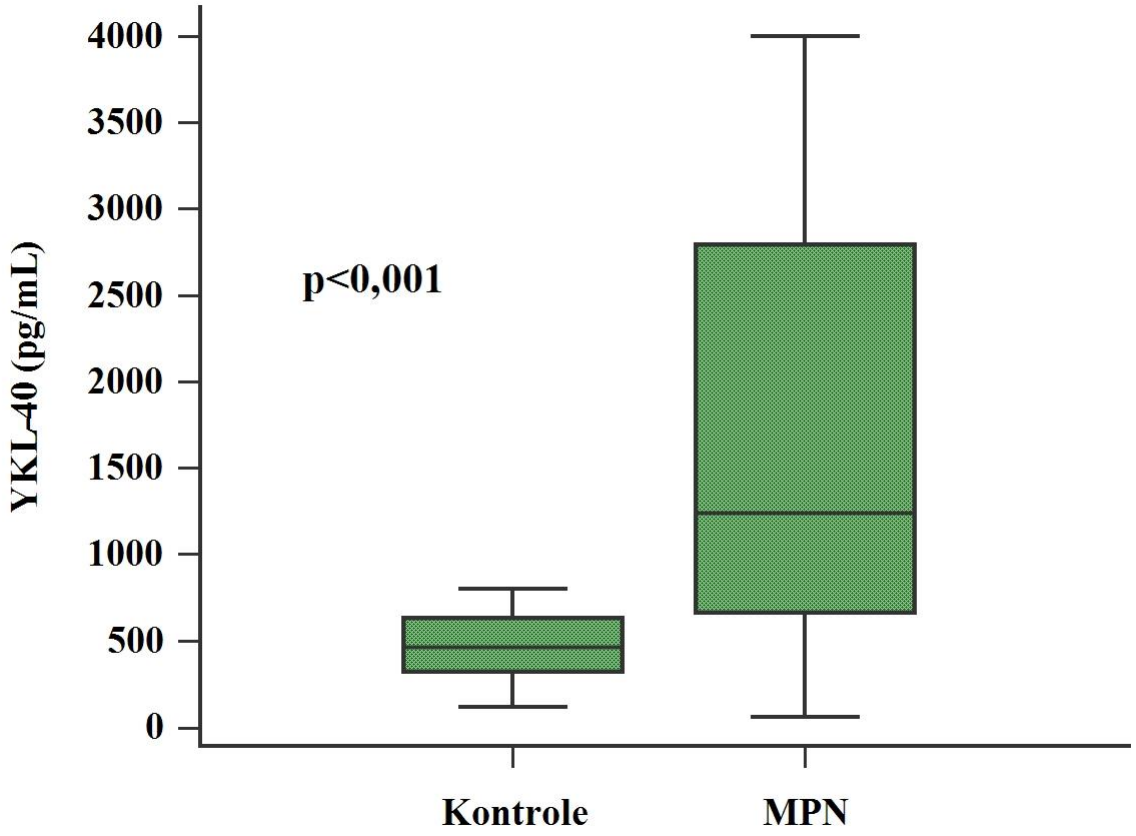
Serumska koncentracija YKL-40 i aktivnost CHIT1 analizirani su u ukupno 143 ispitanika. U istraživanje smo uključili 45 bolesnika s ET, 30 bolesnika s PV, 17 bolesnika s PMF, 19 bolesnika sa SMF i 32 kontrolna ispitanika (Slika 9). Od 19 bolesnika sa SMF, bilo je 11 bolesnika s post-ET MF i 8 bolesnika s post-PV MF. Četrdeset i šest (41,4%) bolesnika s MPN je bilo novodijagnosticirano, a preostali su dijagnosticirani ranije. Medijan praćenja bolesnika s ET i PV bio je 50 mjeseci (raspon 11-65), a živih bolesnika s PMF i SMF 39 mjeseci. Medijan dobi kontrola bio je 55.5 godina (raspon 42-68), a 19 (59%) ih je bilo muškog spola. Nije bilo statistički značajne razlike između bolesnika i kontrola ovisno o spolu (p=0,195) i dobi (p=0,099).



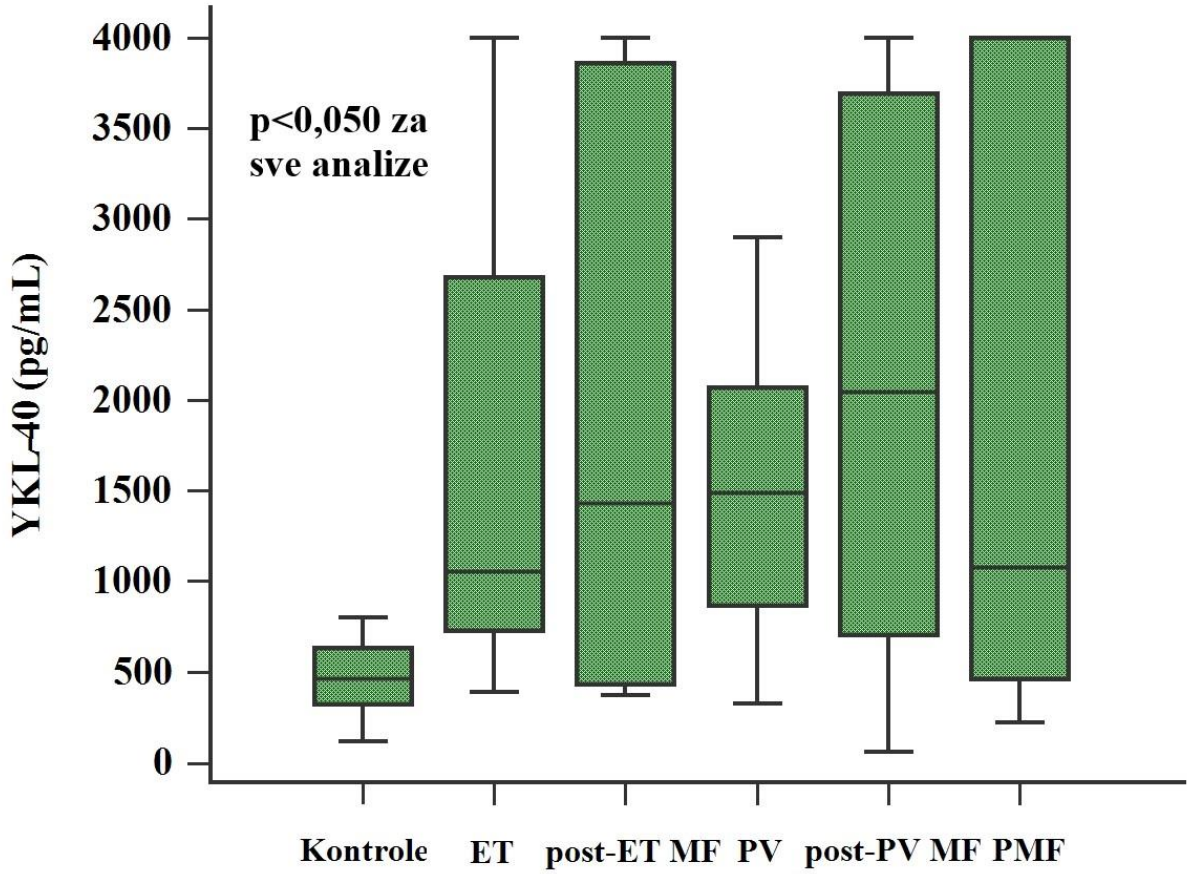
Slika 9: Prikaz udjela pojedinih dijagnoza u ukupnom uzorku od 143 ispitanika.

5.2 YKL-40

Više serumske koncentracije YKL-40 zabilježene su u bolesnika s MPN (medijan 1238,9 pg/mL, raspon 57,8-4000), u usporedbi s kontrolnom skupinom (medijan 466 pg/mL, raspon 117,3-801,7; p<0,001) (Slika 10). Štoviše, povišene serumske koncentracije YKL-40 u usporedbi s kontrolnom skupinom zabilježene su u svim entitetima unutar MPN spektra, kod bolesnika s ET (medijan 1053,2 pg/mL, raspon 728,9-4000), post-ET MF (medijan 1432,3 pg/mL, raspon 371,4-4000), PV (medijan 1489,9 pg/mL, raspon 324,7-4000), post-PV MF (medijan 2048,3 pg/mL, raspon 57,8-4000) i PMF (medijan 1079,1 pg/mL, raspon 220,1-4000) (ukupni p<0,001; p<0,050 za sve individualne analize) (Slika 11).



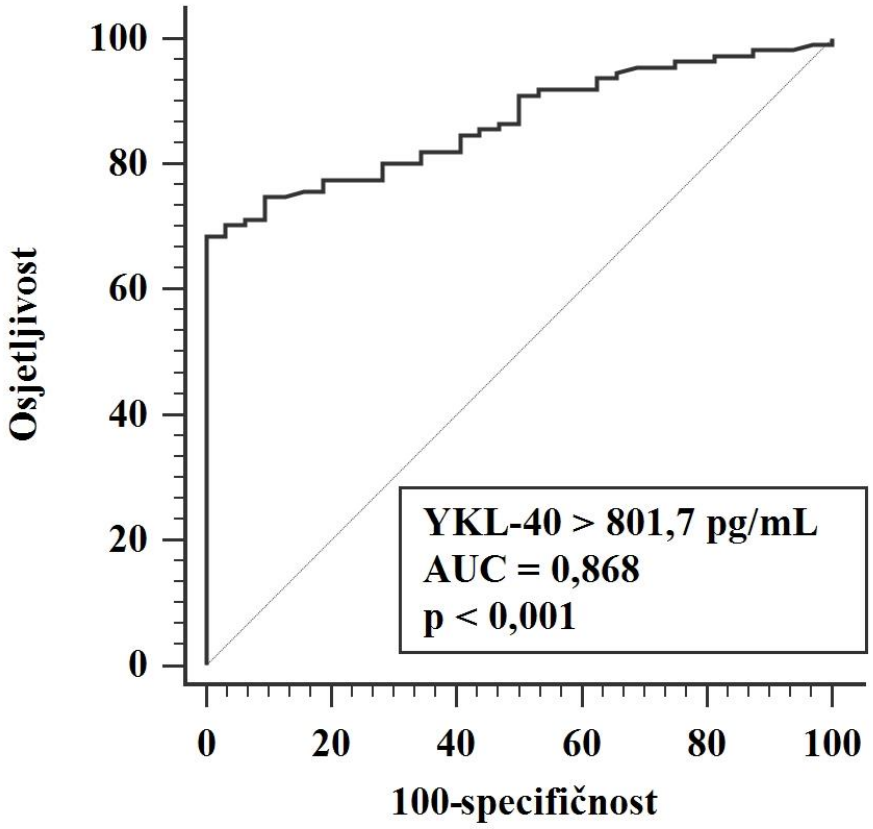
Slika 10: Više serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s MPN u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 11: Povišene serumske koncentracije YKL-40 zabilježene su u svim entitetima unutar MPN spektra**.**

Razlika u serumskim koncentracijama YKL-40 između bolesnika s ET, post-ET MF, PV, post-PV MF i PMF nije bila statistički značajna (p=0,989), kao niti razlika u serumskoj koncentraciji YKL-40 između bolesnika s PMF i SMF (medijan 1797,8 pg/mL, raspon 57,8-4000, p=0,884).

Potom smo ROC krivuljom testirali osjetljivost i specifičnost serumske koncentracije YKL-40 za detekciju bolesnika s MPN. Površina ispod ROC krivulje bila je 0,868 (STD±0,029, 95% CI 0,801-0,919, p<0,001). Prema ROC krivulji, serumska koncentracija YKL-40 >801,7 pg/mL ima osjetljivost od 68,47% i specifičnost od 100% prilikom detekcije bolesnika s MPN (Slika 12).



Slika 12: Serumska koncentracija YKL-40 > 801,7 pg/mL ima osjetljivost od 68,47% i specifičnost od 100% za detekciju bolesnika s MPN.

Budući da se klinički tijek, komplikacije, preživljenje i pristup liječenju značajno razlikuje između ET i PV naspram PMF i SMF, te dvije skupine bolesnika analizirali smo odvojeno. Karakteristike bolesnika s ET i PV prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9: Karakteristike bolesnika s ET i PV.

Broj bolesnika	75
ET (%) / PV (%)	45 (60%) / 30 (40%)
Novodijagnosticirani (%)	29 (39%)
Dob, godine	67 IQR (39-81)
Trajanje bolesti, godine	2 IQR (0-18)
Muško (%) / Žensko (%)	31 (41%) / 44 (59%)
JAK2-V617F (%) / CALR (%) / Negativan (%)	52 (69%) / 12 (16%) / 11 (15%)
Konstitucijski simptomi (%)	31 (41%)
ECOG: 0-1 (%) / 2-4 (%)	60 (80%) / 15 (20%)
Palpabilna splenomegalija (%)	28 (37%)
Kardiovaskularni rizični čimbenici (%)	56 (25%)
Ranija tromboza (%)	17 (23%)
Retikulinska fibroza (%)	25 (67%)
Hidroksiureja (%)	43 (57%)
Acetilsalicilna kiselina (%)	61 (82%)
Varfarin (%)	6 (8%)
Leukociti ($x10^9$/L)	8,1 IQR (3,2-17,6)
Granulociti ($x10^9$/L)	5,3 IQR (1,1-17,0)
Bazofili ($x10^9$/L)	0,1 IQR (0-2)
Eozinofili ($x10^9$/L)	0,2 IQR (0-8,1)
Eritrociti ($x10^{12}$/L)	4,7 IQR (3,0-7,9)
Hemoglobin, g/L	138 IQR (87-202)
Hematokrit (%)	0,4 IQR (0,3-0,6)
Trombociti ($x10^9$/L)	502 IQR (142-1413)
LDH (IU/L)	233 IQR (130-696)
CRP (mg/L)	2,6 IQR (0,2-8,9)

Korelacije YKL-40 s kliničkim parametrima kod bolesnika s ET i PV:

- U svih su bolesnika više serumske koncentracije YKL-40 korelirale sa starijom životnom dobi (rho=0,272, p=0,018), CRP-om (rho=0,712, p<0,001), konstitucijskim simptomima (p<0,001), lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG ≥2-4; p<0,001), KV rizičnim čimbenicima (p=0,012), retikulinskom fibrozom KS (p=0,002) i ranije preboljelom trombozom (p<0,001). Terapija s ASK je bila povezana s nižom koncentracijom serumskog YKL-40 (p=0,038), dok je liječenje varfarinom bilo povezano s višim koncentracijama YKL-40 (p=0,049). Novodijagnosticirani bolesnici su imali niže vrijednosti serumskog YKL-40, u odnosu na one dijagnosticirane ranije (p=0,018). Kod ranije dijagnosticiranih bolesnika, nije bilo statistički značajne povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i duljine trajanja bolesti (rho=-0,053, p=0,723).

- Kod bolesnika s ET, više serumske koncentracije YKL-40 su bile statistički značajno povezane sa starijom životnom dobi (rho=0,318, p=0,033), CRP-om (rho=0,745, p<0,001), konstitucijskim simptomima (p=0,007), lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG ≥2-4; p<0,001), KV rizičnim čimbenicima (p=0,021), retikulinskom fibrozom KS (p=0,008) i ranije preboljelom trombozom (p<0,001). Nije bilo statistički značajne povezanosti između vrijednosti serumskog YKL-40 i terapije s ASK (p=0,356) ili varfarinom (p=0,825). Novodijagnosticirani bolesnici su imali jednake vrijednosti serumskog YKL-40 u odnosu na one dijagnosticirane ranije (p=0,141).

- U bolesnika s PV, više serumske koncentracije YKL-40 su bile statistički značajno povezane sa CRP-om (rho=0,687, p<0,001), konstitucijskim simptomima (p=0,002), lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG ≥2-4; p<0,001) i retikulinskom fibrozom KS (p=0,009). Bolesnici pod terapijom ASK su imali niže vrijednosti serumskog YKL-40 (p=0,006), dok su bolesnici tretirani varfarinom imali više vrijednosti serumskog YKL-40 (p=0,009). Nije bilo statistički značajne povezanosti između vrijednosti serumskog YKL-40 u odnosu na dob bolesnika

(rho=0,154, p=0,416), KV rizične čimbenike (p=0,248) i ranije preboljelu trombozu (p=0,123). Novodijagnosticirani bolesnici su imali više vrijednosti serumskog YKL-40 u odnosu na one dijagnosticirane ranije, no bez statističke značajnosti (p=0,075).

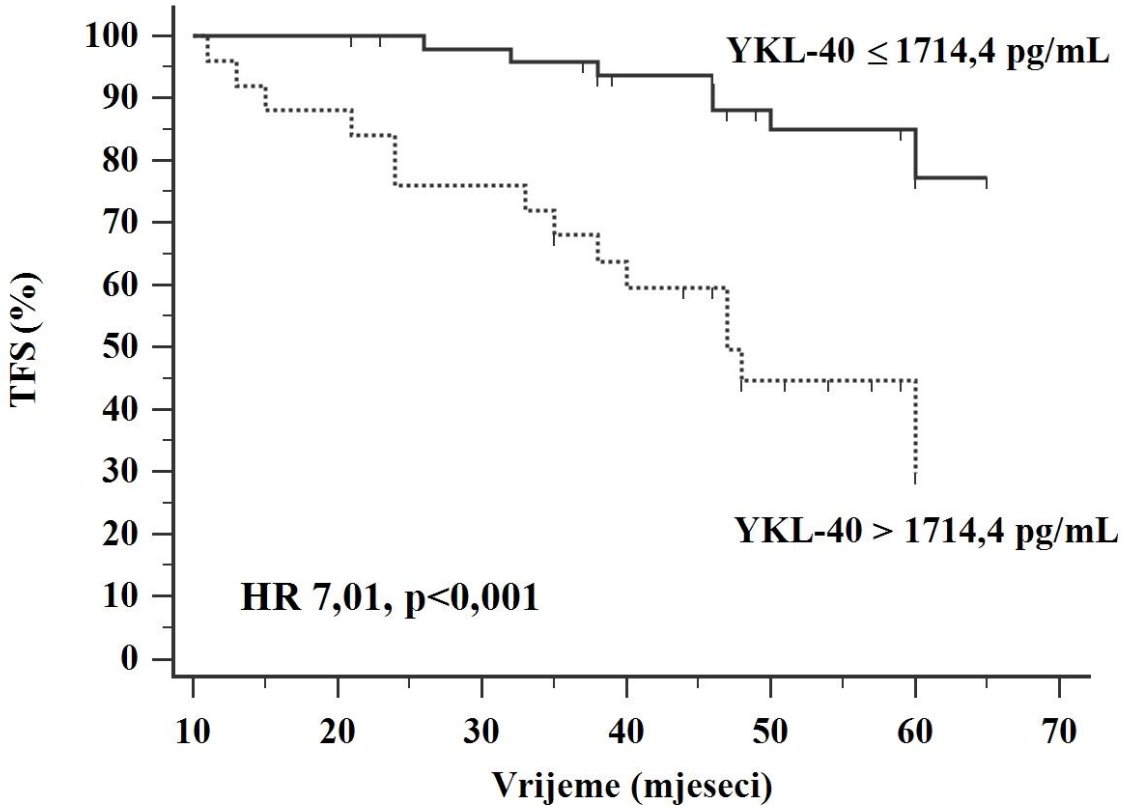
- U obje podskupine bolesnika nismo našli povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i spola bolesnika, mutacijskog statusa bolesnika, apsolutnog broja leukocita, granulocita, eozinofila, bazofila, eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina, vrijednosti hematokrita i serumskog LDH. Također, potreba za hidroksiurejom, prisutnost palpabilne splenomegalije i palpatorna duljina slezene nisu korelirali sa serumskim koncentracijama YKL-40 (p≥0,050 za sve analize).

- Dodatno smo analizirali kliničke karakteristike bolesnika s ET i PV koji su imali „normalnu“ serumsku koncentraciju YKL-40 (te smo bolesnike definirali kao one koji su imali serumsku koncentraciju YKL-40 jednaku zdravim kontrolama, tj. ≤801,7 pg/mL, što je prijelomna vrijednost dobivena ROC krivuljom). Tim smo pristupom identificirali 22 bolesnika (15 s ET i 7 s PV); sedam ih je bilo muškog spola, a 15 ženskog. U 16 bolesnika je dokazana JAK2-V617F, a u šest CALR mutacija. U usporedbi s bolesnicima koji su imali više serumske koncentracije YKL-40 (>801,7 pg/mL), nismo našli razlike u odnosu na fenotip bolesti, spol, mutacijski status, liječenje hidroksiurejom ili prisutnost KV rizičnih čimbenika (p≥0,050 za sve analize). Međutim, niže serumske koncentracije YKL-40 su bile povezane s mlađom životnom dobi (≤60 godina; p=0,006), a samo su četiri bolesnika imala konstitucijske simptome (p=0,039), jedan lošije opće tjelesno stanje (p=0,023), tri retikulinsku fibrozu KS (p=0,006), pet palpabilnu slezenu (p=0,050), a dva raniji trombotski događaj (p=0,072).

- Nadalje, budući da je viša serumska koncentracija YKL-40 bila povezana sa starijom dobi, KV rizičnim čimbenicima i ranije preboljelom trombozom, analizirali smo i mogući utjecaj viših serumskih koncentracija YKL-40 na razvoj tromboze u bolesnika s ET i PV. Dvadeset i

jednom bolesniku (28%) je tijekom praćenja dijagnosticirana tromboza. Ukupno je bilo 7 venskih (33,3%) i 14 arterijskih (66,7%) tromboza (p=0,126). Jedan je bolesnik imao trombozu splanhničkih vena. Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti tromboza između bolesnika s ET (16 bolesnika) i PV (5 bolesnika) (p=0,075). U svrhu analize TFS konstruirana je ROC krivulja s trombozom kao klasifikacijskom varijablom, a zbog definiranja optimalne prijelomne vrijednosti serumske koncentracije YKL-40 (>1714,4 pg/mL). U univarijatnim analizama preživljenja su više serumske koncentracije YKL-40 (HR 7,01, p<0,001) (Slika 13), ranije preboljela tromboza (HR 8,54, p<0,001), dob >60 godina (HR 3,50, p=0,004), prisutnost KV rizičnih čimbenika (HR 2,89, p=0,042) i PV fenotip (HR 2,98, p=0,017) bili povezani s povećanim rizikom od nastanka tromboze. U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi, više serumske koncentracije YKL-40 su zadržale svoj negativan prognostički značaj (Tablica 10.).

- Pomoću dva modela binarne logističke regresije s trombozom kao nezavisnom varijablom analizirali smo može li dodatak viših serumskih koncentracija YKL-40 (>1714,4 pg/mL) ranije poznatim rizičnim čimbenicima za razvoj tromboze u bolesnika s MPN (dob >60 godina, preboljela tromboza, PV fenotip i prisutnost JAK2-V617F mutacije) bolje diskriminirati bolesnike s povećanim rizikom od tromboze. Obzirom kako je tromboza vremenski ovisna varijabla, te kako bismo izbjegli pristranost, iz analize smo isključili bolesnike s vrlo kratkim praćenjem, tj. uključili smo samo one koji su praćeni kroz barem 12 mjeseci. Statistički model s dodatkom viših serumskih koncentracija YKL-40 (Model 2; AUC 0,850, STD± 0,051, 95% CI 0,747-0,922) mogao je bolje identificirati bolesnike s povećanim rizikom od razvoja tromboze u usporedbi s „klasičnim“ modelom bez YKL-40 (Model 1; AUC 0,800, STD±0,053, 95% CI 0,691-0,884; p=0,098) (Slika 14).

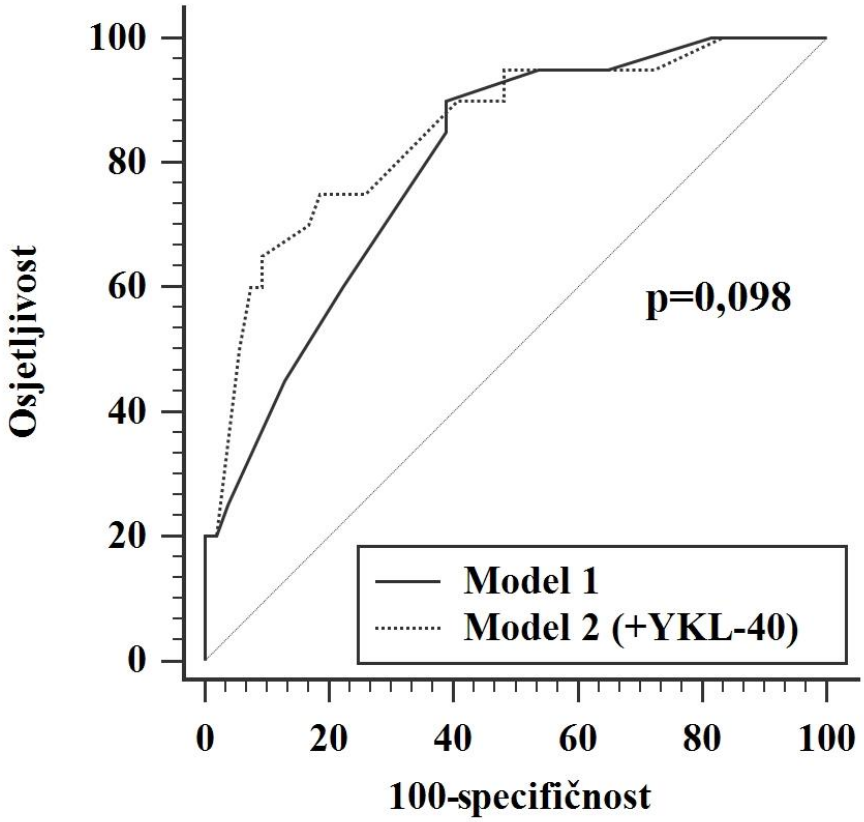


Slika 13: Više serumske koncentracije YKL-40 su povezane s povećanim rizikom od razvoja tromboze u bolesnika s ET i PV.

Tablica 10: U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi, više serumske koncentracije YKL-40 su zadržale negativan prognostički značaj na razvoj tromboze u bolesnika s ET i PV.

Varijabla	HR	95% CI	p
YKL >1714,4 pg/mL	3,89	[1,00-8,16]	***0,048***
KV rizični čimbenici	0,09	[0,16-11,84]	0,762
PV fenotip	6,78	[0,05-0,65]	***0,009***
Ranija tromboza	6,99	[1,40-10,01]	***0,008***
JAK2-V617F mutacija	0,01	[0,38-2,90]	0,909
Dob > 60 godina	3,99	[1,02-13,36]	***0,045***

HR=omjer ugroženosti (prema eng. hazard ratio), CI= interval pouzdanosti (prema eng. confidence interval), KV=kardiovaskularni, PV=policitemija vera.



Slika 14: Dodatak viših serumskih koncentracija YKL-40 (Model 2) „klasičnim“ rizičnim čimbenicima u MPN za razvoj tromboze (dob >60 godina, preboljela tromboza, PV fenotip i prisutnost JAK2-V617F mutacije) imao je sklonost ka boljoj diskriminaciji bolesnika s povećanim rizikom od tromboze u usporedbi s Modelom 1 (bez YKL-40).

Karakteristike bolesnika s PMF i SMF prikazane su u Tablici 8.

Tablica 11: Karakteristike bolesnika s PMF i SMF.

Broj bolesnika	36
PMF (%) / SMF (%)	19 (53%) / 17 (47%)
Novodijagnosticirani (%)	16 (44%)
Dob, godine	65 IQR (33-80)
Trajanje bolesti, godine	5 IQR (0-15)
Muško (%) / Žensko (%)	19 (53%) / 17 (47%)
JAK2-V617F (%) / CALR (%) / Negativan (%)	25 (70%) / 8 (22%) 3 (8%)
Konstitucijski simptomi(%)	21 (61%)
ECOG: 0-1 (%) / 2-4 (%)	16 (44%) / 20 (56%)
DIPSS: Nizak (%) / Srednji-1 (%) / Srednji-2 %) / Visoki (%)	6 (17%) / 9 (25%) 13 (36%) / 8 (22%)
Prisutnost blasta, %	18 (50%)
Stupanj fibroze koštane srži: MF-2 (%) / MF-3 (%)	6 (17%) / 30 (83%)
Duljina slezene, cm	7 IQR (0-26)
Ovisnost o transfuzijama eritrocita i/ili trombocita, %	12 (33%)
Kardiovaskularni rizični čimbenici (%)	21 (58%)
Hidroksiureja (%)	17 (47%)
Ruksolitinib (%)	10 (28%)
Acetilsalicilina kiselina (%)	8 (22%)
Varfarin (%)	0
Leukociti ($x10^9$/L)	10,8 IQR (2,1-91,0)
Granulociti ($x10^9$/L)	9,5 IQR (0,8-49,1)
Bazofili ($x10^9$/L)	0,6 IQR (0-4,7)
Eozinofili ($x10^9$/L)	0,3 IQR (0-8,0)
Eritrociti ($x10^{12}$/L)	3,4 IQR (2,2-7,2)
Hemoglobin, g/L	97 IQR (69-198)
Hematokrit (%)	0,3 IQR (0,21-0,53)
Trombociti ($x10^9$/L)	145 IQR (5-1120)
LDH, (IU/L)	452 IQR (164-1987)
CRP (mg/L)	3,2 IQR (0,8-17,9)

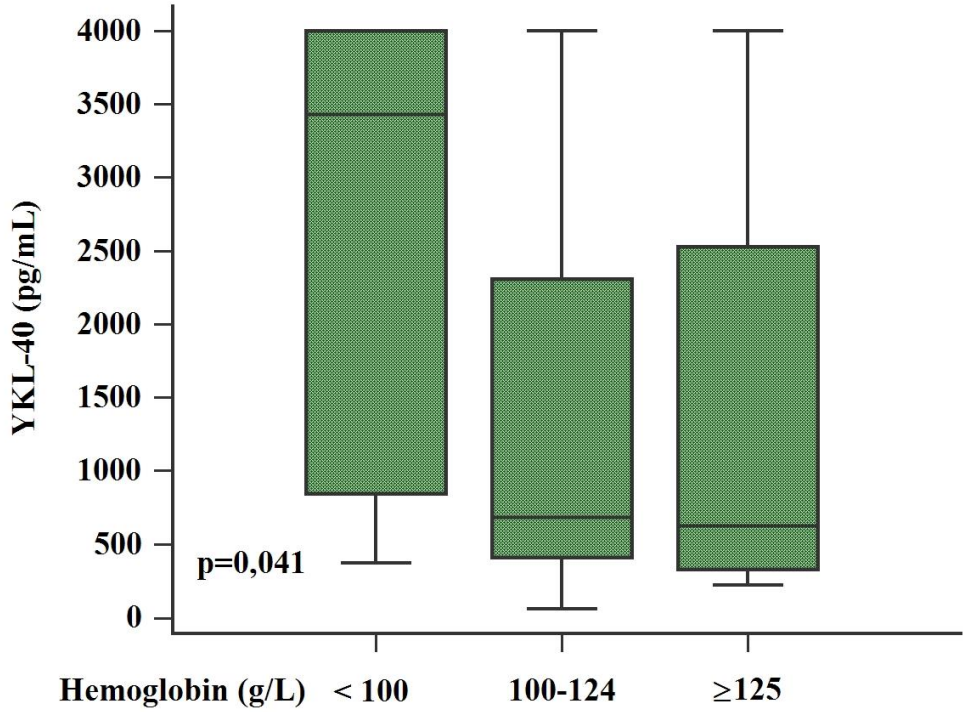
Korelacije s kliničkim parametrima u bolesnika s PMF i SMF:

- Više serumske koncentracije YKL-40 su bile statistički značajno povezane sa starijom životnom dobi (rho=0,362, p=0,029), CRP-om (rho=0,673, p<0,001), blastnom fazi bolesti (p=0,003), višim postotkom cirkulirajućih blasta (rho=0,387, p=0,021), težim stupnjem anemije (p=0,041) (Slika 15), lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG≥2-4; p=0,028), konstitucijskim simptomima (p<0,001) i KV rizičnim čimbenicima (p=0,045). Primjetan je bio i trend viših serumskih koncentracija YKL-40 u bolesnika s rizičnijim DIPSS kategorijama (p<0,001) (Slika 16). Također, više serumske koncentracije YKL-40 zabilježene su u bolesnika liječenih hidroksiurejom (p<0,001), dok je primjena ruksolitiniba bila povezana s nižim serumskim YKL-40 (p=0,002).

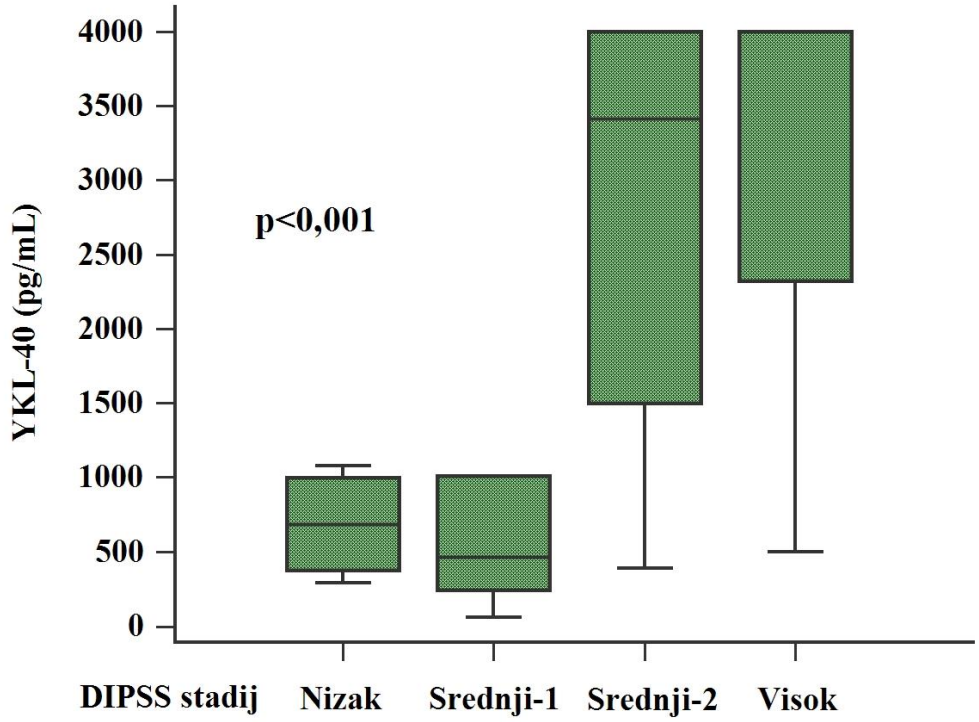
- Nije bilo povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i spola bolesnika, mutacijskog statusa bolesti, apsolutnog broja leukocita granulocita, eozinofila, bazofila i eritrocita, koncentracije hemoglobina, vrijednosti hematokrita i LDH (p≥0,050 za sve analize). Serumska koncentracija YKL-40 je bila jednaka kod bolesnika koji su bili ovisni o transfuzijama eritrocita i trombocita, u odnosu na one koji to nisu bili (p=0,495). Bolesnici s višim stupnjem fibroze KS (MF-3) imali su jednake vrijednosti serumskog YKL-40 kao bolesnici s nižim stupnjem fibroze KS (MF-2) (p=0,477). Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama YKL-40 između bolesnika liječenih s ASK, u odnosu na one koji tu terapiju nisu primali (p=0,113). Serumska koncentracija YKL-40 nije korelirala s prisutnošću palpabilne splenomegalije (p=0,573), niti s palpatornom duljinom slezene (rho=-0,032, p=0,850). Novodijagnosticirani bolesnici imali su jednake vrijednosti serumskog YKL-40 u odnosu na bolesnike dijagnosticirane ranije (p=0,674). Kod ranije dijagnosticiranih bolesnika, nije bilo statistički značajne povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i duljine trajanja bolesti (rho=-0,237, p=0,313).

- Dodatno smo analizirali karakteristike bolesnika s PMF i SMF koji su imali serumsku koncentraciju YKL-40 jednaku zdravim kontrolama (te smo bolesnike, kako je prije rečeno, definirali kao one sa serumskom koncentracijom YKL-40 ≤801,7 pg/mL). Takvih je bolesnika bilo 15; osam muškog, a sedam ženskog spola. U devet bolesnika je dokazana JAK2-V617F, u pet CALR, a posljednjem bolesniku nije dokazana mutacija. U usporedbi s bolesnicima koji su imali više serumske koncentracije YKL-40 (>801,7 pg/mL), nije bilo razlike u odnosu na spol, dob, mutacijski status, broj leukocita i trombocita, opće tjelesno stanje, KV rizične čimbenike, stupanj fibroze KS ili transfuzijsku ovisnost. Suprotno, samo su dva bolesnika s niskom serumskom koncentracijom YKL-40 imala konstitucijske simptome ($p<0,001$), pet anemiju (hemoglobin<100 g/L; $p=0,025$), četiri blaste u perifernoj krvi ($p=0,019$), jedan je trebao liječenje hidroksiurejom ($p<0,001$), a osam ih je primalo ruksolitinib ($p=0,004$).

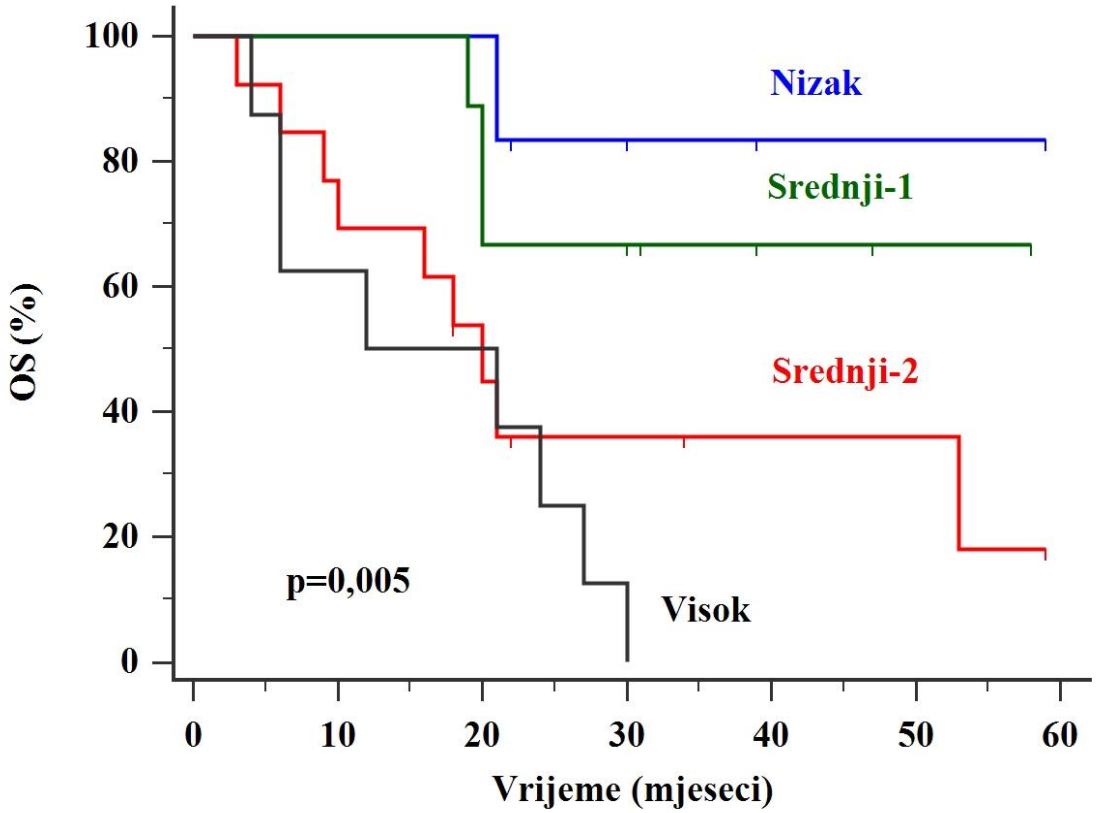
- Budući da su više serumske koncentracije YKL-40 bile statistički značajno povezane s kliničkim i laboratorijskim parametrima indikativnim za agresivniju bolest (npr. viši DIPSS skor, blastna faza bolesti, teži stupanj anemije i prisutnost konstitucijskih simptoma), dodatno smo analizirali prognostički utjecaj viših serumskih koncentracija YKL-40 na OS. Medijan OS bolesnika s PMF i SMF bio je 19 mjeseci. Usprkos manjem broju uključenih bolesnika, DIPSS ih je mogao vrlo dobro prognostički diskriminirati ($p=0,005$) (Slika 17). U svrhu OS analize, konstruirali smo ROC krivulju sa smrću kao klasifikacijskom varijablom, kako bi definirali optimalnu prijelomnu vrijednost serumske koncentracije YKL-40 (>1523,2 pg/mL). U univarijatnoj analizi preživljenja, više (>1532,2 pg/mL) serumske koncentracije YKL-40 bile su povezane s lošijim OS (HR 5,35, $p<0,001$) (Slika 18), a u multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi, zadržale su svoj prognostički značaj, nakon korekcije za DIPSS i spol bolesnika (Tablica 12.).



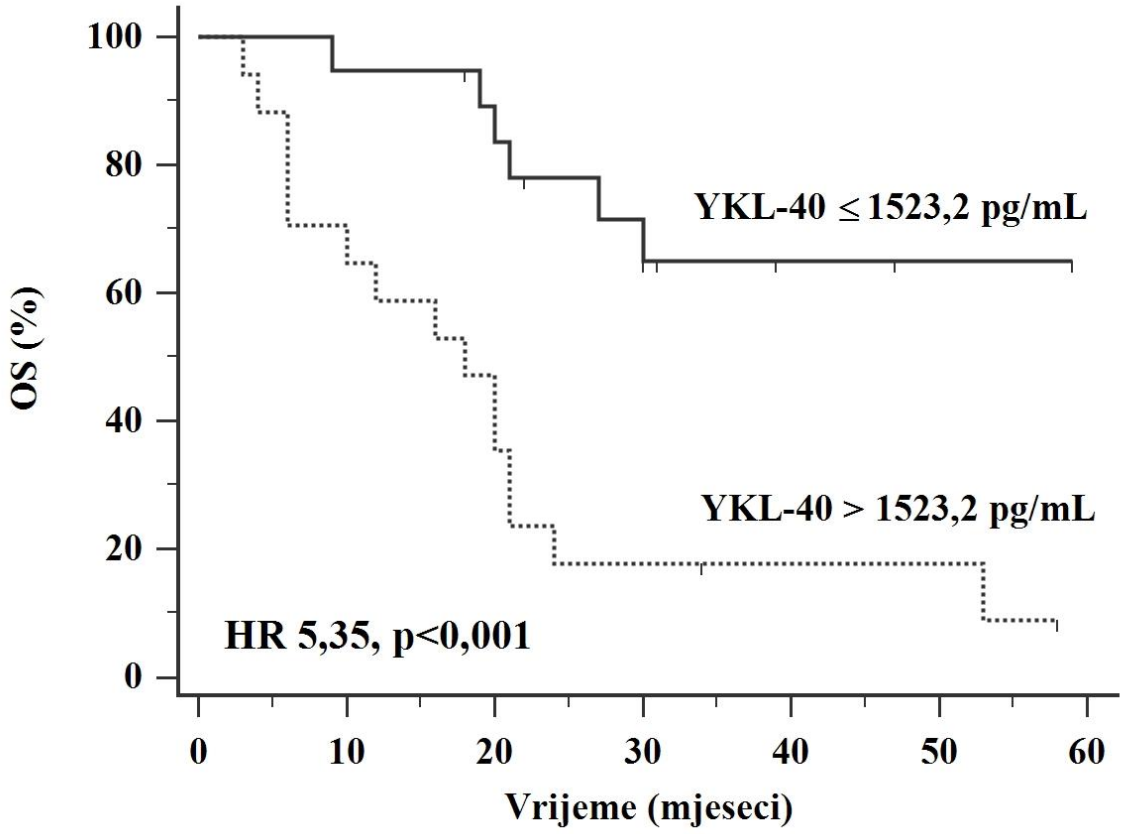
Slika 15: Više serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s PMF i SMF korelirale su s težim stupnjem anemije.



Slika 16: Više serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s PMF i SMF korelirale su s rizičnijim DIPSS stadijem.



Slika 17: DIPSS je u našoj skupini bolesnika s PMF i SMF mogao vrlo dobro prognostički diskriminirati bolesnike.



Slika 18: Bolesnici s PMF i SMF koji su se prezentirali s višim serumskim koncentracijama YKL-40 su imali lošiji OS.

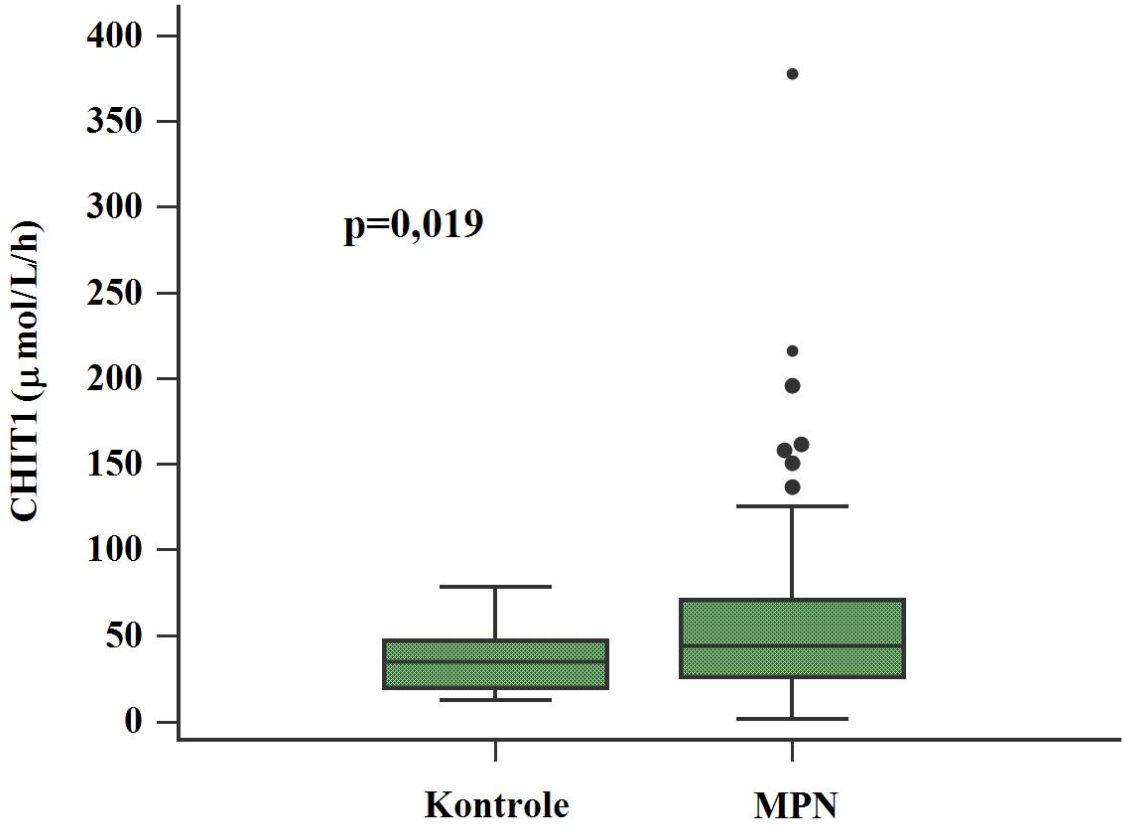
Tablica 12: U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi su više serumske koncentracije YKL-40 zadržale svoj negativan prognostički utjecaj na OS.

Varijabla	HR	95% CI	p
YKL >1523,2 pg/mL	4,31	[1,06-7,93]	***0,037***
DIPSS	5,09	[1,10-4,10]	***0,024***
Spol	0,48	[0,23-1,95]	0,484

HR=omjer ugroženosti (prema eng. hazard ratio), CI= interval pouzdanosti (prema eng. confidence interval), DIPSS- Dynamic international prognostic scoring system.

5.3 CHIT1

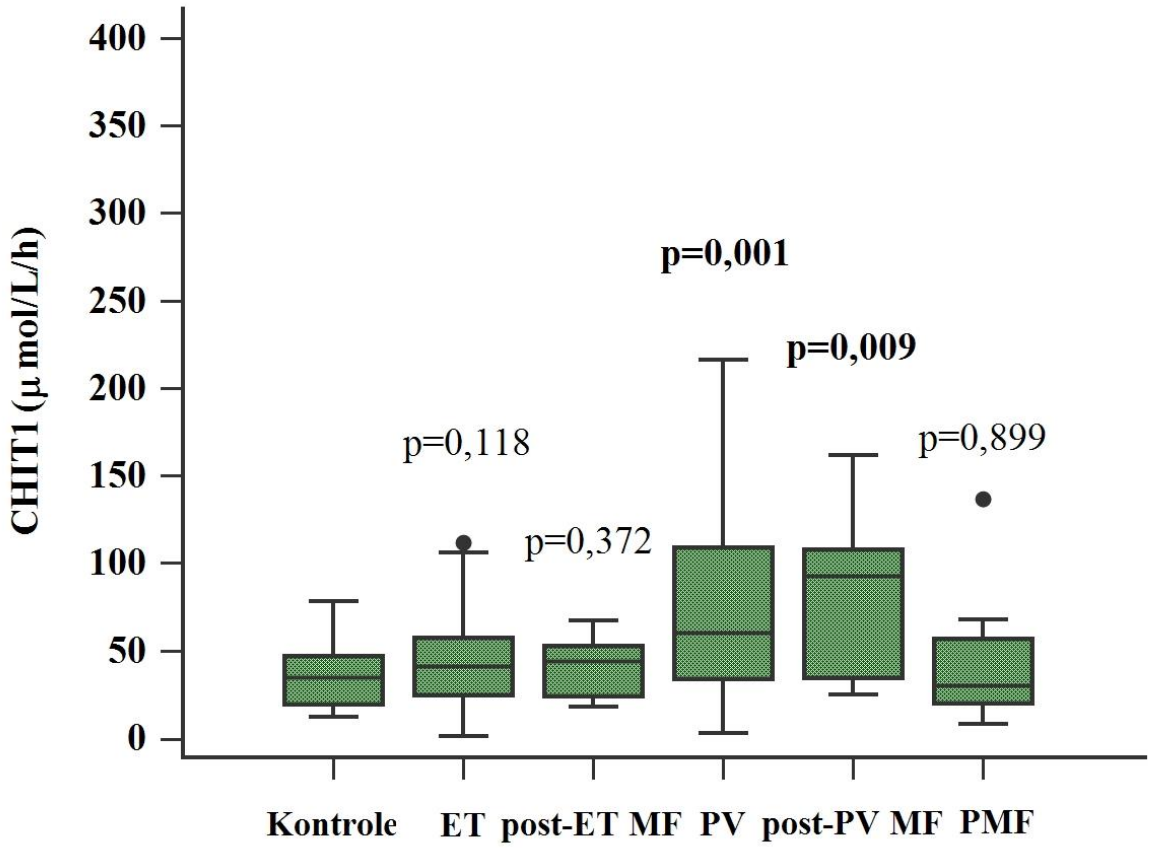
Bolesnici s MPN imali su statistički značajno višu serumsku aktivnost CHIT1 (medijan 44 μmol/L/h, raspon 1-378) nego kontrolna grupa (medijan 34,5 μmol/L/h, raspon 12-78; p=0,019) (Slika 19).



Slika 19: Viša serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN u usporedbi sa zdravim kontrolama.

Ipak, samo su serumske aktivnosti CHIT1 u bolesnika s PV (medijan 60,5 μmol/L/h, raspon 3-216; p=0,001) i post-PV MF (medijan 93 μmol/L/h, raspon 25-162; p=0,009) bile više u usporedbi sa zdravim kontrolama (Slika 20). Nismo našli statistički značajnu razliku u serumskoj aktivnosti CHIT1 u bolesnika s ET (medijan 41 μmol/L/h, raspon 1-57,2; p=0,118), post-ET MF (medijan 44 μmol/L/h, raspon 18-52,5; p=0,372) i PMF (medijan 30 μmol/L/h, raspon 8-378; p=0,899) naspram zdravih kontrola. Bolesnici s PV su imali statistički značajno višu serumsku aktivnost CHIT1 u

odnosu na bolesnike s ET (p=0,030) i PMF (p=0,028), dok razlika prema bolesnicima s post-PV MF i post-ET MF nije bila statistički značajna (p=0,566 i p=0,070). Slično, bolesnici s post-PV MF su imali višu serumsku aktivnost CHIT1 u odnosu na bolesnike s ET i PMF (p=0,049 i p=0,047). Bolesnici sa SMF su imali statistički značajno višu aktivnost CHIT1 (medijan 45 μmol/L/h, raspon 18-162) u odnosu na zdrave dobrovoljce (p=0,034), dok razlika u serumskoj aktivnosti CHIT1 između bolesnika sa SMF i PMF nije bila značajna (p=0,163).



Slika 20: Više serumske aktivnosti CHIT1 zabilježene su u bolesnika s PV i post-PV MF u usporedbi sa zdravim kontrolama.

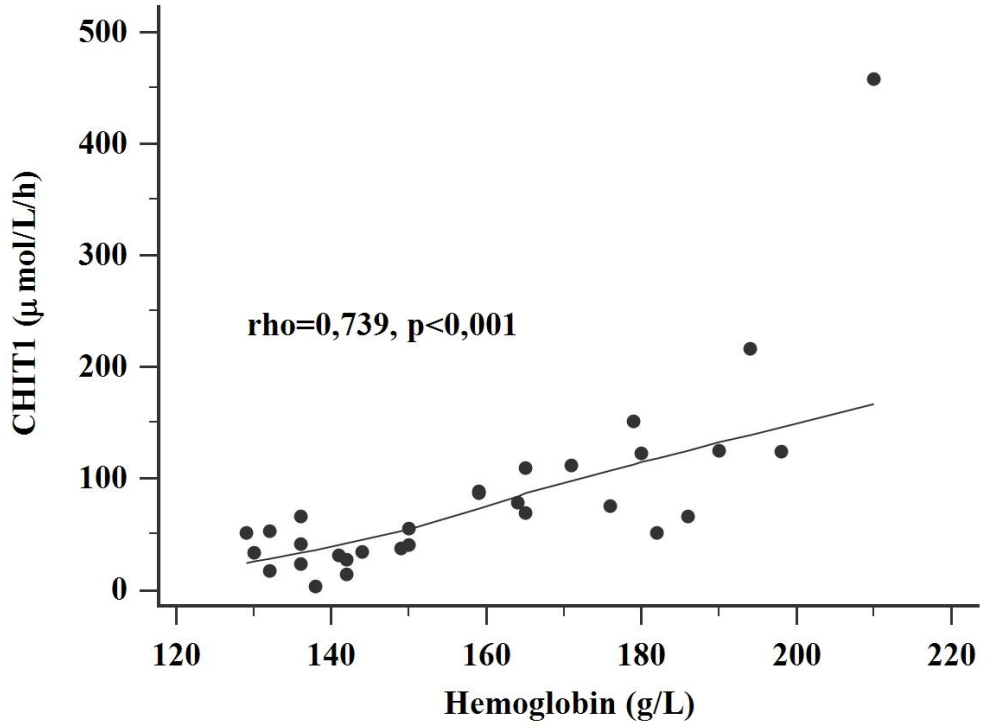
Korelacije s kliničkim parametrima u bolesnika s ET i PV:

- U svih je bolesnika serumska aktivnost CHIT1 korelirala s apsolutnim brojem leukocita (rho=0,473, p<0,001), granulocita (rho=0,473, p<0,001) i bazofila (rho=0,460, p<0,001), hemoglobinom (rho=0,519, p<0,001), hematokritom (rho=0,581, p<0,001), CRP-om (rho=0,382, p<0,001), YKL-40 (rho=0,248, p=0,031) i retikulinskom fibrozom KS (p=0,008). Bolesnici s konstitucijskim simptomima, lošijim općim tjelesnim stanjem, te oni liječeni varfarinom su imali više serumske aktivnosti CHIT1, no ove razlike ipak nisu bile statistički značajne (p=0,059, p=0,095 i p=0,077). Također, nije bilo razlike u serumskoj aktivnosti CHIT1 između novodijagnosticiranih bolesnika u odnosu na one dijagnosticirane ranije (p=0,386). Zanimljivo, viša serumska aktivnost CHIT1 korelirala je s kraćim trajanjem bolesti (rho=-0,257, p=0,025), kod ranije dijagnosticiranih (rho=-0,313, p=0,022), kao i kod novodijagnosticiranih bolesnika (rho=-0,337, p=0,078). Nismo zabilježili značajne korelacije s dobi, spolom, mutacijskim statusom, apsolutnim brojem eritrocita, eozinofila i trombocita, LDH, KV rizičnim čimbenicima, prisutnošću palpabilne splenomegalije, palpatornom duljinom slezene u cm, ranijom trombozom, potrebom za hidroksurejom ili liječenjem s ASK (p≥0,050 za sve analize).
- U bolesnika s ET, više serumske aktivnosti CHIT1 su korelirale sa starijom životnom dobi (rho=0,420, p=0,004), CRP-om (rho=0,604, p<0,001), YKL-40 (rho=0,443, p=0,002). lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG ≥2-4; p=0,004), KV rizičnim čimbenicima (p=0,049), te liječenjem s ASK (p=0,025). Bolesnici s preboljelom trombozom i konstitucijskim simptomima su imali sklonost višim vrijednostima CHIT1, no bez statističke značajnosti (p=0,079 i p=0,065). Spol, mutacijski status, apsolutni broj leukocita, granulocita, bazofila, eozinofila i trombocita, hemoglobin, hematokrit, LDH, prisutnost palpabilne splenomegalije, duljina slezene u cm, retikulinska fibroza KS, te primjena hidroksiureje ili varfarina nisu korelirali sa serumskom aktivnosti CHIT1 (p≥0,050 za sve analize).

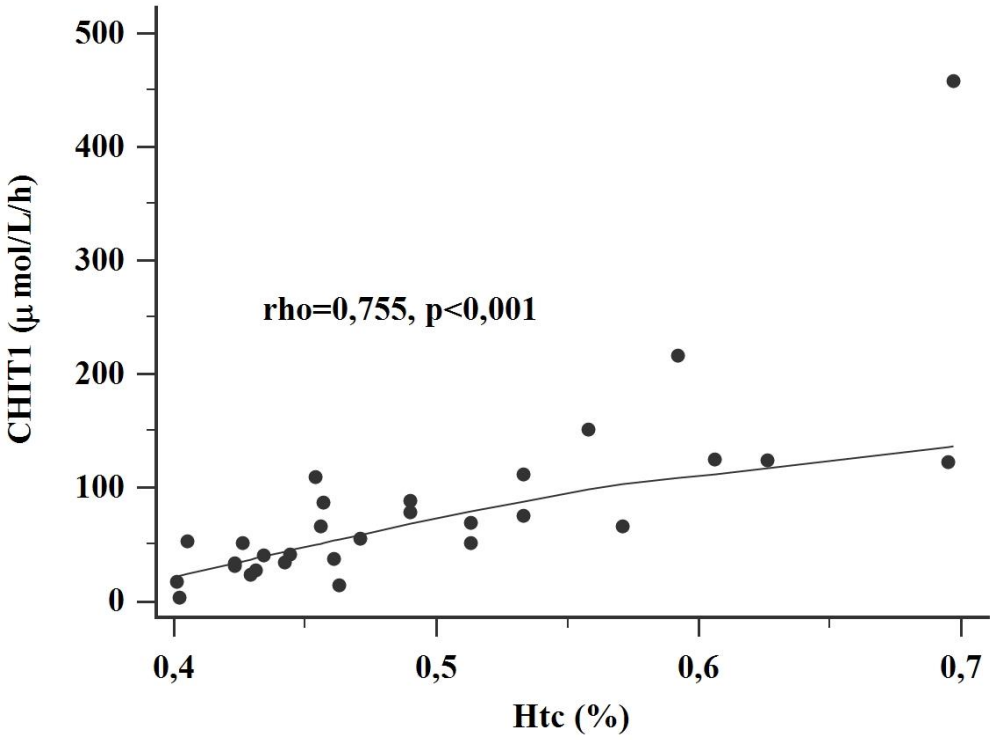
- Kod bolesnika s PV, više serumske aktivnosti CHIT1 su bile povezane s apsolutnim brojem leukocita (rho=0,403, p=0,026), granulocita (rho=0,607, p<0,001) i bazofila (rho=0,541, p=0,002), YKL-40 (rho=0,456, p=0,011), koncentracijom hemoglobina (rho=0,739, p<0,001) (Slika 21), razinom hematokrita (rho=0,755, p<0,001) (Slika 22) i retikulinskom fibrozom KS (p=0,023). Serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s PV nije korelirala s dobi, spolom, mutacijskim statusom, apsolutnim brojem eozinofila i trombocita, konstitucijskim simptomima, općim tjelesnim stanjem, KV rizičnim čimbenicima, ranijom trombozom, prisutnošću palpabilne splenomegalije, duljinom slezene u cm, niti s liječenjem hidroksiurejom, ASK ili varfarinom (p≥0,050 za sve analize).
- Dodatno smo analizirali karakteristike bolesnika s PV koji su imali serumsku aktivnost CHIT1 jednaku kontrolama (<49 μmol/L/h) i nismo našli razlika u spolu, dobi, mutacijskom statusu, konstitucijskim simptomima, općem tjelesnom stanju, KV rizičnim čimbenicima ili palpabilnoj slezeni, retikulinskoj fibrozi KS, ranijoj trombozi ili modalitetu liječenja, u odnosu na bolesnike s višim CHIT1 (p≥0,050 za sve analize).
- S obzirom na to da se povišena serumska aktivnost CHIT1 posebno isticala u bolesnika s PV, ROC krivuljom smo testirali osjetljivost i specifičnost serumske aktivnosti CHIT1 za dijagnozu PV. Površina ispod ROC krivulje je bila 0,739 (STD±0,065, 95% CI 0,611-0,842, p<0,001). Prema toj analizi, serumska aktivnost CHIT1 >49 μmol/L/h ima osjetljivost od 63,33 % i specifičnost od 87,50% za detekciju bolesnika s PV (Slika 23).
- Budući da su serumska koncentracija YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s ET i PV korelirali s prisutnošću retikulinske fibroze KS, testirali smo sposobnost ova dva biljega za detekciju ove komplikacije. Prema ROC analizama, serumska koncentracija YKL-40 >801,8 pg/mL ima osjetljivost od 92,86% i specifičnost od 40,43% (AUC 0,712, STD±0,060, 95% CI 0,595-0,810, p<0,001), a aktivnost CHIT1 >78 μmol/L/h osjetljivost od 44% i specifičnost od 88% za detekciju retikulinske fibroze KS (AUC 0,647, STD±0,071, 95% CI

0,482-0,713, p=0,038). Usporedbom dviju krivulja, oba su biljega imala podjednaku sposobnost za detekciju retikulinskih vlakana u KS (p=0,208) (Slika 24).

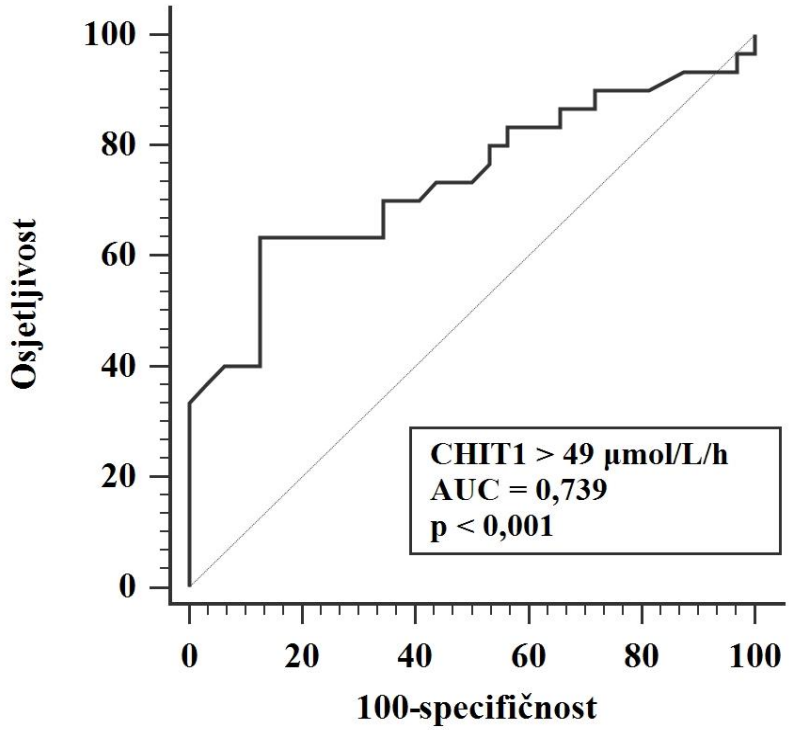
- U svrhu TFS analize, ROC krivuljom smo ustanovili optimalnu prijelomnu vrijednost serumske aktivnosti CHIT1 (>81 μmol/L/h). U univarijatnoj analizi preživljenja, bolesnici s višom serumskom aktivnosti CHIT1(>81 μmol/L/h) imali su lošiji TFS, no ova razlika ipak nije bila statistički značajna (HR 2,56, p=0,076) (Slika 25). Sličan rezultat je ostvaren i u multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi kada smo višoj serumskoj aktivnosti CHIT1 pridodali etablirane rizične čimbenike za razvoj tromboze u MPN (Tablica 13).



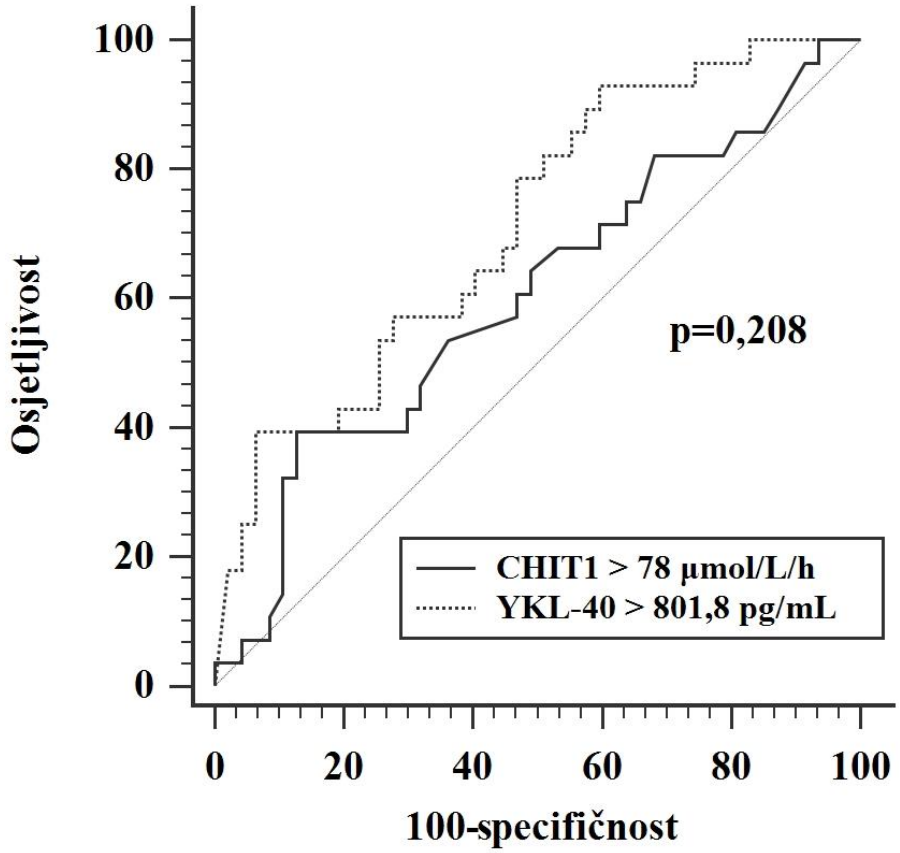
Slika 21: Pozitivna korelacija serumske aktivnosti CHIT1 s hemoglobinom u bolesnika s PV.



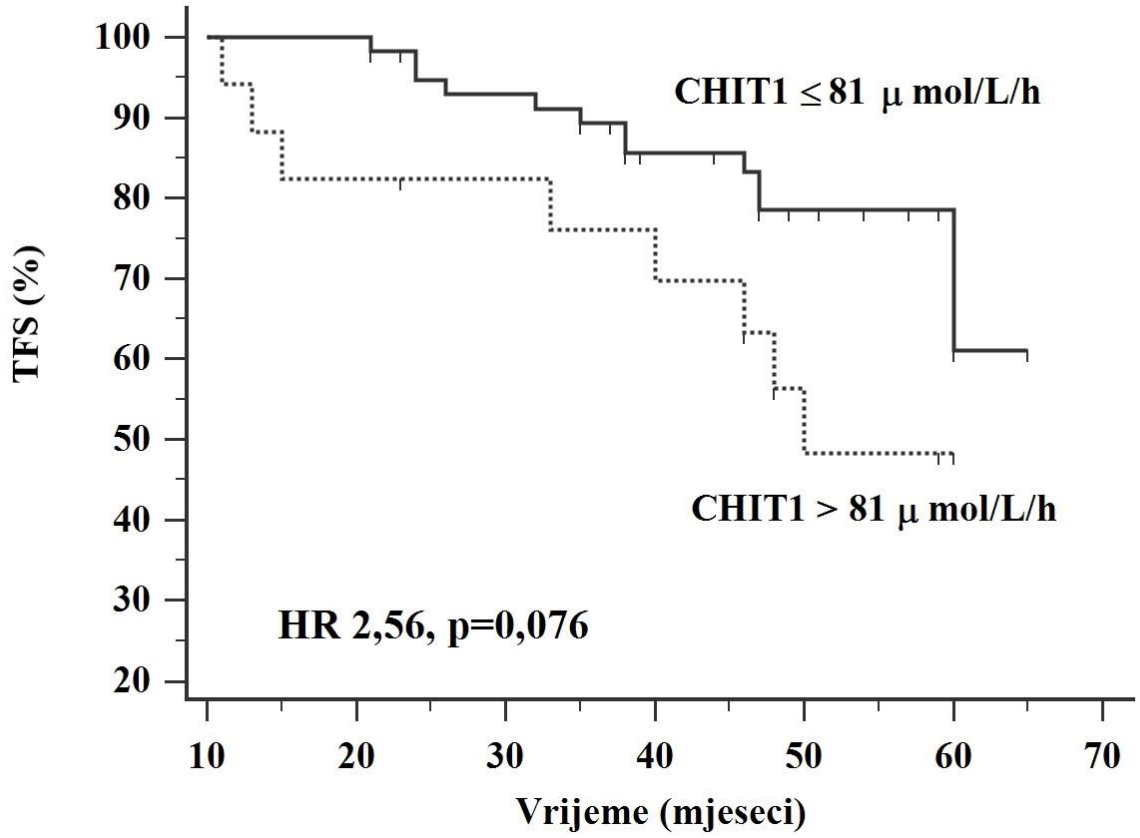
Slika 22: Pozitivna korelacija serumske aktivnosti CHIT1 s hematokritom u bolesnika s PV.



Slika 23: Serumska aktivnost CHIT1 >49 µmol/L/h ima osjetljivost od 63,33% i specifičnost od 87,50% za detekciju bolesnika s PV.



Slika 24: Serumska koncentracija YKL-40 i aktivnost CHIT1 imaju podjednaku sposobnost za detekciju retikulinske fibroze koštane srži u bolesnika s ET i PV. Serumska koncentracija YKL-40 >801,8 pg/mL ima osjetljivost od 92,86% i specifičnost od 40,43%, a aktivnost CHIT1 >78 µmol/L/h osjetljivost od 44% i specifičnost od 88%.



Slika 25: Bolesnici ET i PV koji su imali višu serumsku aktivnost CHIT1 imali su sklonost lošijem TFS.

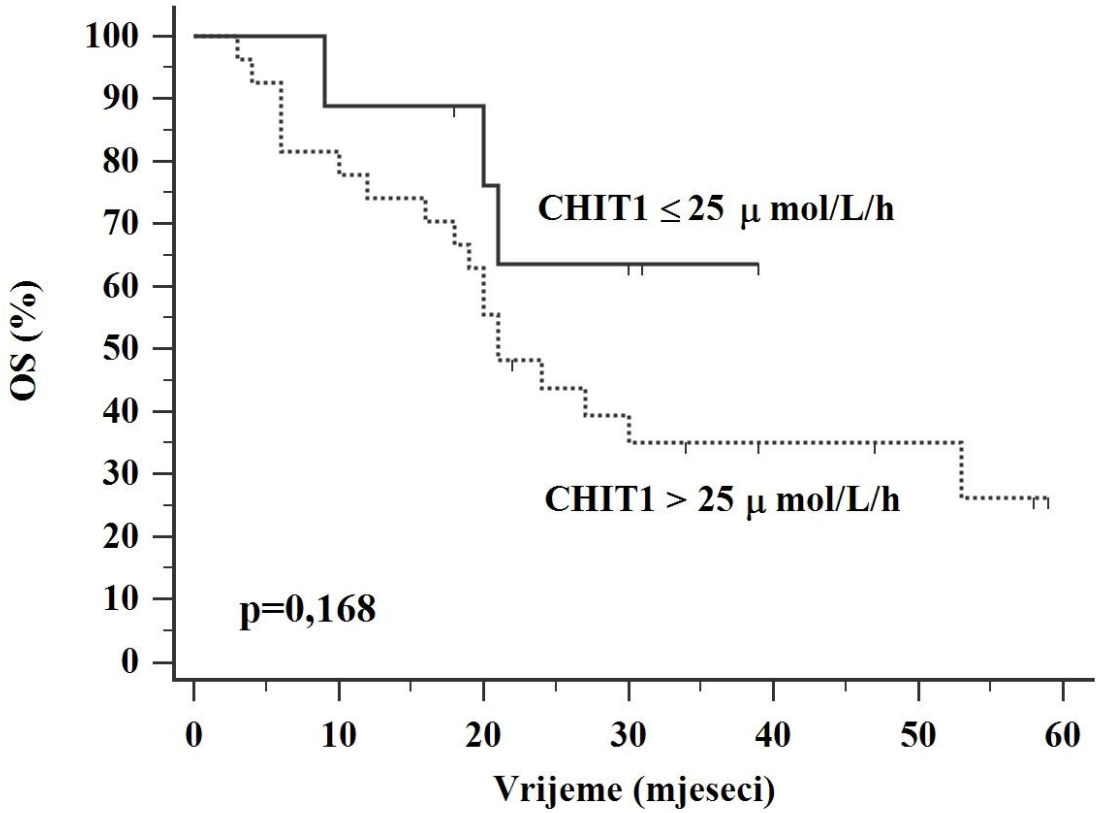
Tablica 13: U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi viša serumska aktivnost CHIT1 nije se pokazala prognostičkom za TFS kod bolesnika s ET i PV.

Varijabla	HR	95% CI	p
CHIT1 > 81 μmol/L/h	0,36	[0,45-4,47]	0,545
KV rizični čimbenici	0,01	[0,12-8,70]	0,979
PV fenotip	7,36	[0,03-0,58]	***0,006***
Ranija tromboza	7,89	[1,66-17,64]	***0,005***
JAK2-V617F mutacija	0,07	[0,34-4,17]	0,782
Dob > 60 godina	4,02	[1,05-72,65]	***0,044***

HR=omjer ugroženosti (engl. hazard ratio-HR), CI= interval pouzdanosti (engl. confidence interval-CI), KV=kardiovaskularni, PV=policitemija vera

Korelacije s kliničkim parametrima u bolesnika s PMF i SMF:

- Viša serumska aktivnost CHIT1 je bila povezana s apsolutnim brojem granulocita (rho=0,340, p=0,042), konstitucijskim simptomima (p=0,009), lošijim općim tjelesnim stanjem (ECOG≥2-4; p=0,004) i palpatornom duljinom slezene mjerenom u cm (rho=0,372, p=0,025). Bolesnici s višom serumskom aktivnosti CHIT1 su bili starije životne dobi i češće su imali KV rizične čimbenike, no ova povezanost ipak nije bila statistički značajna (p=0,060 u obje analize).
- Nije bilo statistički značajne povezanosti između serumske aktivnosti CHIT1 i spola, mutacijskog statusa, CRP-a, YKL-40, apsolutnog broja leukocita, eozinofila, bazofila, eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina, vrijednosti hematokrita i LDH (p≥0,050 za sve analize). Serumska aktivnost CHIT1 nije korelirala s DIPSS-om (p=0,704) ili blastnom fazom bolesti (p=0,326). Također, liječenje hidroksiurejom (p=0,310), ruksolitinibom (p=0,273) i ASK (p=0,755) nije imalo utjecaja na serumsku aktivnost CHIT1. Nadalje, nije bilo razlike u serumskoj aktivnosti CHIT1 kod bolesnika koji su bili ovisni o transfuzijama eritrocita i trombocita, u odnosu na one koji to nisu bili (p=0,382). Isto tako, serumska aktivnost CHIT1 se nije razlikovala ovisno o stupnju fibroze KS (p=0,631). Novodijagnosticirani bolesnici su imali iste vrijednosti CHIT1 u odnosu na one dijagnosticirane ranije (p=0,566). Kod bolesnika dijagnosticiranih ranije, nismo našli povezanost s duljinom trajanja bolesti (p=0,727).
- Za potrebe analize OS, ROC krivuljom smo ustanovili optimalnu prijelomnu vrijednost serumske aktivnosti CHIT1 (>25 μmol/L/h). Prema univarijatnoj analizi preživljenja, nije bilo razlike u OS između bolesnika s višom serumskom aktivnosti CHIT1 u usporedbi s onima koji su imali nižu aktivnost CHIT1 (p=0,168) (Slika 26).



Slika 26: Viša serumska aktivnost CHIT1 se nije pokazala prognostički značajnom za OS u bolesnika s PMF i SMF.

6. RASPRAVA

6.1 CIRKULIRAJUĆI YKL-40 U MPN

Dosadašnjim su istraživanjima demonstrirani proturječni rezultati vezani uz cirkulirajuće vrijednosti YKL-40 u bolesnika s MPN. U prvoj studiji koja je analizirala serumsku koncentraciju YKL-40 u 48 bolesnika s MPN (15 s ET, 16 s PV i 17 s PMF) nije pokazana razlika između bolesnika s ET i PV naspram zdravih kontrola, no demonstrirane su povišene koncentracije YKL-40 u bolesnika s PMF. Nažalost, autori nisu analizirali međusobni odnos između serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s ET i PV, niti odnos tih bolesnika prema PMF. Nadalje, ta studija nije uključivala bolesnike sa SMF, niti je analizirana povezanost serumske koncentracije YKL-40 s kliničkim i laboratorijskim značajkama MPN (176). Druga studija koja je uključivala 47 bolesnika s ET i PV liječenih vorinostatom, pokazala je povišenu koncentraciju serumskog YKL-40 u bolesnika s PV u odnosu na zdrave kontrole i bolesnike s ET, dok nije uočena razlika u serumskoj koncentraciji YKL-40 u bolesnika s ET naspram zdravih kontrola (177).

Iako ovo istraživanje nije prvo koje je analiziralo serumsku koncentraciju YKL-40 u bolesnika s MPN, ono uključuje značajno veći broj bolesnika s MPN (n=111), te dodatno i bolesnike sa SMF. Naspram gore navedenih studija, naše istraživanje je jasno pokazalo da svi entiteti unutar MPN spektra (ET, PV, post-ET MF, post-PV MF i PMF) imaju povišenu serumsku koncentraciju YKL-40 u odnosu na zdrave kontrole (Slika 11). Dodatno, prema našoj je ROC analizi prijelomna vrijednost serumske koncentracije YKL-40 >801,7 pg/mL imala odličnu specifičnost (100%) za dijagnostičko „uključenje“ bolesnika s MPN, što može ukazivati na potencijalnu ulogu YKL-40 kao novog cirkulirajućeg dijagnostičkog biljega u bolesnika s MPN (Slika 12). U svakodnevnom kliničkom radu bi povišena serumska koncentracija YKL-40 mogla pomoći kliničarima u situacijama kada je klinička prezentacija MPN nejasna. Tipičan primjer jest bolesnik s trombocitozom, negativnim mutacijskim testovima i ekvivokalnim nalazom bioptata kosti. U ovom slučaju, povišena serumska koncentracija YKL-40 bi mogla podržati MPN dijagnozu. Naravno, kako bi se pravilno tumačila

vrijednost ovog testa, prilikom dijagnostičkog postupka je potrebno isključiti postojanje autoimune ili druge zloćudne bolesti, što i jest uobičajena klinička praksa kod sumnje na MPN. S druge strane, nismo pronašli statistički značajnu razliku između serumske koncentracije YKL-40 u odnosu na različite entitete unutar MPN spektra, što govori da razinu serumskog YKL-40 ne možemo koristiti kao dijagnostički biljeg pojedinih bolesti unutar MPN spektra. Slično, nismo pronašli razlike u serumskoj koncentraciji YKL-40 između bolesnika s ET, PV i SMF što limitira YKL-40 kao mogući cirkulirajući biljeg fibrotične transformacije bolesti. Ipak, naši rezultati jasno pokazuju kako se YKL-40 može smatrati novim cirkulirajućim biljegom MPN.

Više vrijednosti serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s MPN su bile povezane s kliničkim i laboratorijskim parametrima indikativnim za veće tumorsko opterećenje i kronično upalno zbivanje (povišen CRP, lošije opće tjelesno stanje, prisutnost konstitucijskih simptoma i KV rizičnih čimbenika). Štoviše, vrlo mali udio bolesnika s ET i PV i niskim serumskim koncentracijama YKL-40 (tj. jednakim zdravim kontrolama) imao je konstitutivne simptome, lošije opće tjelesno stanje ili palpabilnu slezenu. Isto tako, bolesnici s PMF i SMF i niskim serumskim koncentracijama YKL-40 vrlo su rijetko imali konstitucijske simptome, anemiju, blaste u perifernoj krvi ili trebali liječenje hidroksiurejom. Zanimljivo, niže serumske koncentracije YKL-40 zabilježili smo u bolesnika liječenih ruksolitinibom ili ASK, što bi lako mogli objasniti protuupalnim učinkom navedenih lijekova. U studiji s vorinostatom primjenjenim kod bolesnika s ET i PV, početne serumske koncentracije YKL-40 korelirale su s većim opterećenjem JAK2-V617F alelom, apsolutnim brojem leukocita i trombocita, te serumskim CRP-om i LDH, a imale su trend pada kod bolesnika koji su odgovorili na navedeno liječenje (177). S druge strane, u našem istraživanju nismo pronašli značajne povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i parametara povezanih sa snažnijom mijeloproliferacijom (npr. brojem leukocita, granulocita ili trombocita, koncentracijom hemoglobina, povišenim LDH ili stupnjem splenomegalije). Ovi rezultati mogli bi se objasniti činjenicom da je većina naših bolesnika (njih oko 60%) bila ranije dijagnosticirana, a u istraživanje

su uključivani u različitim vremenskim trenucima njihove bolesti. Liječenje hidroksiurejom i ruksolitinibom sigurno je utjecalo na određene kliničke i laboratorijske varijable (npr. na veličinu slezene, konstitucijske simptome i krvne nalaze). Kako bismo umanjili mogući utjecaj liječenja, u istraživanje smo uključili samo ambulantne bolesnike na stabilnoj dozi hidroksiureje ili ruksolitiniba. No, bez obzira na heterogenost bolesnika, naši rezultati potvrđuju da bi povišene serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s MPN zaista mogle predstavljati uznapredovalo upalno zbivanje i veće tumorsko opterećenje.

Fibroza KS rezultat je složenih odnosa između klonalnih stanica, endotela, fibroblasta i upalnih citokina u mikrookolišu KS (37,38). Nekoliko studija je pokazalo da YKL-40, kao faktor rasta za fibroblaste, ima važnu ulogu u remodeliranju ekstracelularnog matriksa (138,141,150,153,154,166). U našem je istraživanju viša serumska koncentracija YKL-40 u bolesnika s ET i PV bila povezana s prisutnošću retikulinske fibroze KS. Još zanimljivije, samo su tri bolesnika s ET i PV i niskom serumskom koncentracijom YKL-40 imali retikulinsku fibrozu KS. S obzirom na to da je retikulinska fibroza jasno povezana sa sklonošću ka transformaciji u SMF (37,38), ovaj nalaz ukazuje na potencijalnu ulogu YKL-40 u progresiji bolesti i promoviranju fibroze KS. Suprotno, nije bilo povezanosti između serumske koncentracije YKL-40 i stupnja fibroze KS u bolesnika s PMF i SMF, što je vjerojatno posljedica malog broja bolesnika s PMF i SMF u našem istraživanju, ali i činjenicom da je u ovih bolesnika dominirala fibroza KS trećeg stupnja (83% bolesnika).

Posljednjih se godina YKL-40 nametnuo kao važan patofiziološki čimbenik u promociji aterosklerotske bolesti (155-157,167-174), što je i potvrđeno *in vivo* pronalaskom proteina i mRNA YKL-40 u makrofazima i VSMC unutar aterosklerotskog plaka (Slika 8) (158). U našem je istraživanju viša serumska koncentracija YKL-40 u bolesnika s MPN bila povezana s prisutnošću KV rizičnih čimbenika i povišenim CRP-om. Više su serumske koncentracije CRP-a, upalnog biljega koji utječe na funkciju endotela, koagulaciju, fibrinolizu, oksidaciju masnih čestica i razvoj aterosklerotskog plaka, u brojnim pretkliničkim, kliničkim i epidemiološkim studijama povezane s

povećanim rizikom za razvoj ishemijske koronarne bolesti srca, zatajenja srca, ishemijskog moždanog udara, ali i ukupnom vaskularnom smrtnošću (110). Slično, pokazano je kako u bolesnika s MPN više vrijednosti CRP-a koreliraju s povećanom učestalošću štetnih KV događaja (111). Zanimljivo, u našem smo istraživanju niže serumske koncentracije YKL-40 zabilježili kod bolesnika koji su primali ASK, što može indirektno ukazivati na ateroprotektivni i protuupalni učinak navedenog lijeka. Suprotno, primjena varfarina je bila povezana s višim serumskim YKL-40, što bi mogli objasniti činjenicom da su svi naši bolesnici pod terapijom varfarinom imali dodatno i atrijsku fibrilaciju kao indikaciju za antikoagulantno liječenje, a istu prate povišene cirkulirajuće vrijednosti YKL-40 (169,170). S obzirom na navedeno, povišena serumska koncentracija YKL-40 u bolesnika s MPN mogla bi zrcaliti i aterosklerotsko upalno zbivanje u podlozi razvoja KV bolesti. Štoviše, naši su rezultati pokazali i kako su povišene serumske koncentracije YKL-40 rizični čimbenik za razvoj tromboze u MPN, čak i uz korekciju za klasične rizične čimbenike u bolesnika s MPN (Slika 13, Tablica 10.). Naposljetku, logistička regresija je pokazala kako dodatak viših serumskih koncentracija YKL-40 „klasičnim“ rizičnim čimbenicima može bolje identificirati bolesnike s MPN pod povećanim rizikom za razvoj tromboze (Slika 14). Ovi rezultati pokazuju kako bi YKL-40 mogao imati patofiziološku ulogu u razvoju tromboze u MPN, a čini se da bi dodatak cirkulirajućeg YKL-40 ranije etabliranim rizičnim čimbenicima mogao unaprijediti trenutni prognostički model. Ipak, potrebne su dodatne prospektivne studije na većem broju bolesnika s MPN kako bi potvrdile naše rezultate.

Koliko nam je poznato, naše istraživanje je prvo koje je analiziralo izražaj serumskog YKL-40 u bolesnika sa SMF, kao i povezanost između cirkulirajućeg YKL-40 i različitih kliničkih značajki kod bolesnika s PMF i SMF. Tumačeći naše rezultate, čini se kako bi povišene serumske koncentracije YKL-40 kod ovih bolesnika mogle integrirati dva patofiziološka procesa, snažniju mijeloproliferaciju (lošije opće tjelesno stanje, blastna faza bolesti i veći postotak cirkulirajućih blasta) i uznapredovalo upalno zbivanje (viši CRP, prisutnost konstitucijskih simptoma, KV rizičnih

čimbenika i anemije). Dodatno, bolesnici unutar viših DIPSS rizičnih kategorija su imali i više serumske koncentracije YKL-40 (Slika 16). Sve navedeno nam ukazuje na moguću patofiziološku ulogu cirkulirajućeg YKL-40 u poticanju progresije MPN. Još važnije, povišene serumske koncentracije YKL-40 bile su povezane s lošijim preživljenjem bolesnika s PMF i SMF, neovisno o DIPSS-u (Slika 18 i Tablica 12.) Ti rezultati nam ukazuju da bi, uz DIPPS, određivanje cirkulirajućeg YKL-40 u bolesnika s PMF i SMF moglo dodatno pomoći u identifikaciji bolesnika s lošijom prognozom. Zanimljivo, niže serumske koncentracije YKL-40 zabilježili smo kod bolesnika koji su primali ruksolitinib, što bi se moglo objasniti učinkom ruksolitiniba na smanjenje produkcije upalnih citokina, uključujući YKL-40. Ipak, prognostički utjecaj YKL-40 treba potvrditi u većoj kohorti prospektivno praćenih i uniformno liječenih bolesnika s PMF i SMF. Također, dodatne studije su potrebne kako bi razjasnile stanično porijeklo cirkulirajućeg YKL-40, ali i patofiziološke procese kojima bi YKL-40 mogao utjecati na progresiju MPN.

Naposljetku, ovi rezultati pozivaju na dodatne studije koje bi mogle razjasniti potencijalnu ulogu YKL-40 kao nove terapijske mete u bolesnika s MPN. Ta istraživanja mogla bi nam odgovoriti da li terapijsko „blokiranje“ glikoproteina YKL-40 u bolesnika s MPN može dovesti do poboljšanih ishoda. Dobri rezultati takvim pristupom već su demonstrirani na primjeru glioblastoma, gdje je blokada YKL-40 monoklonskim protutijelom smanjila rast tumora i neoangiogenezu te poboljšala osjetljivost na radioterapijsko liječenje (208). S druge strane, uporaba monoklonskog protutijela protiv YKL-40 (doduše s različitim epitopom od protutijela korištenim na primjeru glioblastoma) u liječenju melanoma polučila je potpuno druge učinke, s rastom tumora i intratumorskom hemoragijom (vjerojatno zbog interakcije protutijela s vaskularnim endotelom u blizini tumora) (209). Ti nam podaci jasno sugeriraju kako je potreban dodatan oprez prilikom dizajniranja takvih kliničkih istraživanja u bolesnika s MPN. Dobro dizajnirane pretkliničke studije na životinjskim MPN modelima mogle bi nam dati odgovore na tražena pitanja.

6.2 AKTIVNOST CHIT1 U MPN

Naše je istraživanje prvo koje je analiziralo izražaj i kliničke korelacije serumske aktivnosti CHIT1 u bolesnika s MPN. Kako smo već naveli, mikrookoliš KS i makrofagna niša igraju važnu ulogu u reguliranju normalne (194), ali i patološke eritropoeze (npr. u PV), gdje aktivnost makrofaga unutar „eritroblastnog otoka“ dodatno stimulira konstitutivno aktivno JAK-STAT signaliziranje (196). Općenito su u našem istraživanju bolesnici s MPN imali povišenu serumsku aktivnost CHIT1 u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 19), no zapravo su prilikom zasebnih analiza jedino bolesnici s „policitemičnim“ fenotipom (PV i post-PV MF) imali povišenu serumsku aktivnost CHIT1 u odnosu na kontrole (Slika 20), ali i na ET i PMF.

Dodatno smo, u bolesnika s ET i PV, zabilježili i pozitivne korelacije između serumske aktivnosti CHIT1, hematokrita i hemoglobina (Slike 21 i 22). Zanimljivo, ti laboratorijski parametri pripadaju velikim dijagnostičkim kriterijima za dijagnozu PV prema klasifikaciji SZO (25). Isto tako, serumska aktivnost CHIT1 je u PV korelirala i s povišenim brojem leukocita, granulocita i bazofila, što ukazuje kako bi serumska aktivnost CHIT1 u ovih bolesnika mogla zrcaliti i klonalnu mijeloproliferaciju. Što se tiče bazofilije, ista je čest pratioc MPN, pogotovo u PV, gdje predstavlja dio zloćudnog klona i korelira s prisutnošću akvagenog svrbeža (čestog simptoma u ovih bolesnika) (210). Slično, u bolesnika s PMF i SMF povišen apsolutni broj bazofila povezan je s lošijim OS (211). Te su stanice opskrbljene velikim brojem proupalnih citokina, među ostalim i s GM-CSF, za koji je dokazano kako potiče sintezu makrofaga i njihovu aktivnost (212,213). Tumačeći naše rezultate, čini se kako bi povišena serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s PV mogla biti uzrokovana pojačanom aktivnošću makrofaga u neposrednoj blizini klonalne hematopoetske matične stanice i, barem dijelom, odgovorna za „policitemični“ fenotip ovih bolesnika. S druge strane, povišena serumska aktivnost CHIT1 mogla bi zrcaliti i povišenu makrofagnu aktivaciju u slezeni, prilikom uklanjanja starih i oštećenih eritrocita. Ipak, čini nam se kako je ova hipoteza manje vjerojatna, s obzirom na to da CHIT1 u naših bolesnika s ET i PV nije korelirao s brojem

eritrocita ili veličinom slezene. Naposljetku, prema našoj ROC analizi, serumska aktivnost CHIT1 > 49 μmol/L/h je imala vrlo dobru specifičnost (87,50%) za dijagnostičko „uključenje“ bolesnika s PV. Ipak, pri pogledu na ROC krivulju, ne čini nam se da je serumska aktivnost CHIT1 optimalan dijagnostički biljeg PV (Slika 23). Dodatne studije su potrebne kako bi potvrdile naše hipoteze, razjasnile stanice porijekla CHIT1 i patofiziološku ulogu CHIT1 u stimuliranju eritrocitne proliferacije u bolesnika s PV.

S druge strane, zabilježili smo i statistički značajnu povezanost između serumske aktivnosti CHIT1, CRP-a, YKL-40 i KV rizičnih čimbenika, uz sklonost konstitucijskim simptomima i lošijem općem tjelesnom stanju, što je bilo izraženije u bolesnika s ET, PMF i SMF. Iz ovih se rezultata nameće zaključak kako serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN može integrirati više patofizoloških procesa, s jedne strane snažniju mijeloproliferaciju i veće tumorsko opterećenje, a s druge kronično upalno zbivanje karakteristično za MPN.

Kako smo ranije naveli, CHIT1 ima važnu ulogu i u upalnom remodeliranju tkiva preko induciranja TGF-β signalnog puta (191-193), čija se pojačana aktivnost u bolesnika s PMF i SMF smatra patofiziološki ključnom za razvoj fibrotične transformacije KS (37,38). U bolesnika s MPN, pojačane ekspresije TNF-α i CHIT1 mogle bi zajednički, induciranjem TGF-β signalnog puta, promovirati upalno remodeliranje tkiva, tj. fibrozu KS (128,181). U našem su istraživanju bolesnici sa SMF, a pogotovo oni s post-PV MF, imali povišenu serumsku aktivnost CHIT1 u odnosu na zdrave kontrole, a dodatno smo u bolesnika s ET i PV pronašli i statistički značajnu povezanost između povišene serumske aktivnosti CHIT1 i retikulinske fibroze KS, što može ukazivati na potencijalnu ulogu CHIT1 u poticanju progresije bolesti i upalnog remodeliranja tkiva. S druge strane, bolesnici s PMF nisu imali povišenu serumsku aktivnost CHIT1 u odnosu na zdrave kontrole, a u bolesnika s PMF i SMF nije bilo niti povezanosti između serumske aktivnosti CHIT1 i stupnja fibroze KS. Moguće je da izostanak povezanosti između serumske aktivnosti CHIT1 i stupnja fibroze KS u bolesnika s PMF i SMF uzrokovan malim brojem ovih bolesnika uključenim u

istraživanje, ali i činjenicom da je u istih izrazito dominirala fibroza KS trećeg stupnja (83%). Isto tako, krajnji stupanj fibroze KS može ukazivati i na izrazito smanjenu celularnost KS s posljedično nižom serumskom aktivnosti CHIT1 („izgorena“ faza PMF i SMF). U tom smjeru je i opservacija kako je serumska aktivnost CHIT1 u naših bolesnika s PMF i SMF bila povezana s kraćim, a ne dužim trajanjem bolesti.

Retikulinska fibroza KS je povezana s lošijim kliničkim ishodima bolesnika s ET i PV, poglavito u smislu transformacije bolesti u SMF (37,38), stoga ju je vrlo važno pravodobno detektirati. U našem smo istraživanju pokazali kako cirkulirajući YKL-40 i CHIT1 imaju podjednaku sposobnost za detekciju ove komplikacije (Slika 24). Štoviše, serumska koncentracija YKL-40 je imala odličnu osjetljivost (92,86%), a aktivnost CHIT1 vrlo dobru specifičnost (88%) za identifikaciju bolesnika s retikulinskim vlaknima u KS. Kombiniranjem ova dva testa može se s vrlo visokom sigurnošću identificirati bolesnike s retikulinskom fibrozom KS. Navedeno bi moglo pomoći tijekom praćenja bolesnika s MPN, gdje bi ova dva jednostavna testa mogla usmjeriti kliničara na reevaluaciju KS. Naravno, naš rezultat nije definitivan i potrebno ga je potvrditi u studijama s većim brojem prospektivno praćenih bolesnika s ET i PV.

Pojačana ekspresija CHIT1 je povezana i s promoviranjem ateroskleroze. Smatra se kako makrofazi unutar aterosklerotskog plaka lučenjem CHIT1 i upalnim remodeliranjem tkiva uzrokuju fibrozu plaka, ali i njegovo pucanje, s posljedičnom trombozom (158,197-199). Kako su više vrijednosti CHIT1 u naših bolesnika s MPN korelirale s prisutnošću KV rizičnih čimbenika, povišenim CRP-om i YKL-40, a u bolesnika s ET i s odsustvom liječenja s ASK (kao ateroprotektivnog i protuupalnog lijeka), istražili smo potencijalnu ulogu CHIT1 u razvoju tromboze bolesnika s MPN. U univarijatnoj analizi, bolesnici s povišenom serumskom aktivnosti CHIT1 imali su sklonost ka razvoju tromboze (Slika 25), međutim, ova razlika se izgubila u multivarijatnoj analizi kada smo ju korigirali za klasične rizične čimbenike za razvoj tromboze u MPN (Tablica 13). Moguće je da je u toj analizi PV fenotip „integrirao“ serumsku aktivnost CHIT1 kao jedinistveni rizični čimbenik, a

koja je time izgubila na značaju. S druge strane, povišena bi serumska aktivnost CHIT1 u naših bolesnika mogla jednostavno biti odraz prisustva KV čimbenika i proširene aterosklerotske bolesti (197-199). Slično, u analizi preživljenja, serumska aktivnost CHIT1 u bolesnika s PMF i SMF nije imala prognostički utjecaj (Slika 26). Navedeni rezultati ograničavaju ulogu serumske aktivnosti CHIT1 kao potencijalnog prognostičkog biljega u bolesnika s MPN.

Zanimljivo, iako je u našem istraživanju postojala statistički značajna korelacija između serumske aktivnosti CHIT1 i YKL-40, liječenje hidroksiurejom ili ruksolitinibom nije utjecalo na serumsku aktivnost CHIT1, kao što je utjecala na cirkulirajuće vrijednosti YKL-40. Ovi podaci nam indirektno ukazuju kako bi stanice koje luče CHIT1 ipak mogle biti drukčijeg porijekla od onih koje luče YKL-40 (makrofazi ili granulociti), ali i na različite podležeće patofiziološke procese i učinke lijekova. Kako je objašnjeno ranije, *in vitro* deplecija makrofaga bifosfonatom (klodronatom) dovela je do reverzije PV fenotipa u miševa (196). No, u multicentričnoj prospektivnoj studiji faze II zoledronična kiselina u bolesnika s PMF nije pokazala učinka (214). Ipak, dokazano je kako statini svojim pleiotropnim učincima mogu inducirati apoptozu makrofaga unutar aterosklerotskog plaka i spriječiti njihovu aktivaciju, što se i koristi u svakodnevnom kliničkom radu kod bolesnika s aterosklerotskom bolešću (215-218). Ti lijekovi imaju i snažnu antiproliferativnu i proapoptotičku aktivnost s dodatnim potencijalnom da smanje klonalnu proliferaciju (219-223). Pokazano je kako statini inhibiraju rast JAK2-V617F-pozitivnih stanica, ali i JAK-STAT stanično signaliziranje (224). Zanimljiv je i prikaz bolesnika s PV koji je liječen samo simvastatinom i aledronatom (zbog hiperlipidemije i osteoporoze), s izvrsnim hematološkim i molekularnim odgovorom uz značajnu redukciju JAK2-V617F alela (225). Ipak, dodatna eksperimentalna i klinička istraživanja potrebna su kako bi se razjasnila uloga ovih relativno netoksičnih lijekova u liječenju bolesnika s MPN. Uzimajući u obzir rezultate zoledronične kiseline u bolesnika s PMF, možemo samo spekulirati kako bi se bolji učinak navedenim liječenjem mogao postići u „celularnoj“ fazi bolesti. S druge strane, inhibiranje CHIT1 monospecifičnim ili polispecifičnim antitijelima je u eksperimentalnim

animalnim modelima autoimunih bolesti smanjio upalu i fibrozu tkiva, vjerojatno redukcijom različitih citokina i faktora rasta (226). Ipak, sigurnost ovog pristupa u ljudi nije dokazana, s obzirom da postoji realna opasnost od sklonosti protozoalnim i parazitarnim infekcijama. Ako se ovaj pristup pokaže sigurnim, razvoj te ciljane terapije mogao bi biti vrijedna dodatna opcija u liječenju bolesnika s MPN, poglavito u PV.

6.3 OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA

Populacija bolesnika u našem istraživanju je bila relativno mala i heterogena, tj. bolesnici su uključivani u različitim vremenskim trenucima njihove bolesti, a manjina bolesnika (40%) je bila novodijagnosticirana. Isto tako, liječenje hidroksiurejom, ruksolitinibom i acetilsalicinom kiselinom, sigurno je utjecalo na određene kliničke i laboratorijske varijable (npr. na veličinu slezene, konstitucijske simptome i krvne nalaze), a vrlo moguće i na serumsku koncentraciju YKL-40 i aktivnost CHIT1. Iako bi bilo optimalno da smo uključili samo novodijagnosticirane bolesnike s MPN, to nismo bili u mogućnosti, s obzirom da se radi o bolestima s niskom pojavnosti, posebno kod bolesnika s PMF i SMF (44). Kako bismo umanjili utjecaj liječenja, u istraživanje smo uključili samo ambulantne bolesnike na stabilnoj dozi hidroksiureje ili ruksolitiniba, tj. bolesnike za koje smo pretpostavljali da su stvorili određenu ravnotežu između „stvaranja“ i „destrukcije“ krvnih stanica.

Drugi nedostatci studije predstavljaju kratak period praćenja bolesnika i relativno malen broj trombotskih događaja. No, s obzirom na to da se preživljenje bolesnika s ET i PV procjenjuje u desetljećima, a kod visokorizičnih bolesnika s PMF i SMF u mjesecima, smatramo kako bi period praćenja naših bolesnika ipak mogao biti dovoljan za procjenu analiziranih učinaka.

Nadalje, procjena prisutnosti palpabilne splenomegalije i njene duljine pomoću palpacije, a ne dodatnim radiološkim metodama (npr. ultrazvukom, kompjutoriziranom tomografijom ili magnetskom rezonancijom), također se može navesti kao jedan od nedostataka našeg istraživanja.

No, bez obzira na navedene nedostatke i činjenicu da prikazani rezultati naravno ne mogu biti definitivni, oni predstavljaju originalni znanstveni doprinos i potiču nove hipoteze koje treba istraživati u budućim studijama.

6.4 PUBLIKACIJE PROIZAŠLE IZ ISTRAŽIVANJA

1. Dio rezultata ovog istraživanja vezan uz cirkulirajući YKL-40 u bolesnika s MPN i njegove kliničke korelacije objavljen je časopisu *Acta Clinica Belgica* (indeksiran u *Current Contents,* IF 0,960).

2. Drugi dio rezultata ovog istraživanja vezan uz serumsku aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN i njene kliničke korelacije objavljen je u časopisu *Hematology* (indeksiran u *Current Contents*, IF 1,318).

3. Dio podataka iz ovog istraživanja iskorišten je za izradu rada u kojem je pokazano kako povišena serumska koncentracija urične kiseline u bolesnika s ET i PV ima negativan utjecaj na TFS. Rad je objavljen u časopisu *Leukemia and Lymphoma* (indeksiran u *Current Contents*, IF 2.674).

7. ZAKLJUČCI

1. Svi bolesnici s MPN, uključujući i one sa SMF, imaju značajno povišene serumske koncentracije YKL-40 u odnosu na zdrave kontrole, a bolesnici s PV i post-PV MF i značajno povišenu serumsku aktivnost CHIT1. Serumska koncentracija YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN nisu povezane s JAK2-V617F ili CALR mutacijskim statusom, što upućuje kako je upalna komponenta posljedica konstitutivno aktivnog JAK-STAT signalnog puta i neovisna o vrsti „odgovorne“ mutacije.

2. Povišene serumske koncentracije YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s MPN korelirale su s parametrima povezanim s većim tumorskim opterećenjem i snažnijim upalnim zbivanjem (CRP-om, prisutnošću konstitucijskih simptoma, lošijim općim tjelesnim stanjem i KV rizičnim čimbenicima).

3. Povišena serumska koncentracija YKL-40 je u bolesnika s PMF i SMF korelirala s agresivnijim biološkim ponašanjem (blastnom fazom bolesti, većim stupnjem anemije i višim DIPSS rizičnim stadijem), dok je liječenje ruksolitinibom bilo povezano s nižim serumskim koncentracijama YKL-40, što upućuje na antiupalni učinak lijeka. S druge strane, liječenje hidroksiurejom i ruksolitinibom nije imalo utjecaj na serumsku aktivnost CHIT1 što ukazuje kako bi stanice koje luče CHIT1 mogle biti drukčijeg porijekla od onih koje luče YKL-40, ali i na različite podležeće patofiziološke procese i učinke lijekova.

4. Serumska aktivnost CHIT1 je u bolesnika s MPN korelirala s „policitemičnim“ fenotipom bolesti, što upućuje kako bi pojačana aktivacija makrofaga iz neposredne blizine klonalne hematopoetske matične stanice i sinteza CHIT1 mogla, barem dijelom, biti odgovorna i za klinički fenotip PV.

5. Povišene serumske koncentracije YKL-40 i aktivnost CHIT1 u bolesnika s ET i PV korelirale su sa prisutnošću retikulinske fibroze KS što nam ukazuje na moguću ulogu ovih

proteina u progresiji bolesti i upalnom remodeliranju tkiva, tj. indukciji i promociji fibroze KS.

6. Povišena serumska koncentracija YKL-40 je u analizama preživljenja bila povezana s povećanim rizikom tromboze u bolesnika s ET i PV, a u bolesnika s PMF i SMF s lošijim preživljenjem. Nasuprot tome, serumska aktivnost CHIT1 nije imala prognostički utjecaj na razvoj tromboze u bolesnika s ET i PV, kao ni na preživljenje bolesnika s PMF i SMF.

7. Određivanje serumske koncentracije YKL-40 u bolesnika s ET i PV moglo bi pomoći prilikom identificiranja bolesnika s povećanim rizikom od štetnih KV događaja te identificirati bolesnike s PMF i SMF koji su pod povećanim rizikom od smrti.

8. Naši rezultati impliciraju patofiziološku ulogu hitinaza i hitinazama-sličnih proteina u patogenezi MPN, dominantno u smislu razvoja upalnih simptoma bolesti, te promoviranju trombotskih komplikacija i fibroze KS.

9. Potrebne su dodatne studije kako bi se razjasnila stanična podrijetla YKL-40 i CHIT1, ali i patofiziološki procesi odgovorni za navedene komplikacije.

10. Ovo istraživanje i kliničke korelacije koje smo dokazali mogli bi pomoći i u identificiranju novih terapijskih pristupa ovim bolesnicima.

8. SAŽETAK

Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme (MPN), esencijalna trombocitemija (ET), policitemija vera (PV) i mijelofibroza (MF), su bolesti karakterizirane klonalnom mijeloproliferacijom, snažnom upalnom atmosferom i povećanim rizikom od kardiovaskularnih (KV) događaja. YKL-40 i hitotriozidaza (CHIT1) imaju važnu ulogu u reguliranju upalnog odgovora i vanstaničnom remodeliranju tkiva. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati izražaj serumske koncentracije YKL-40 i aktivnosti CHIT1 u bolesnika s MPN te ga korelirati s kliničkim značajkama bolesti. Koristeći imunoenzimski test i fluorometrijsku metodu analizirali smo cirkulirajuće vrijednosti YKL-40 i CHIT1 u 111 bolesnika s MPN i u 32 zdrava dobrovoljca. Svi entiteti unutar MPN spektra su imali povišen YKL-40, dok su samo „policitemični“ bolesnici (PV i post-PV MF) imali i značajno povišen CHIT1. YKL-40 i CHIT1 su u bolesnika s MPN korelirali s parametrima povezanim s većim tumorskim opterećenjem i snažnijim upalnim zbivanjem (C-reaktivnim proteinom, prisutnošću konstitucijskih simptoma, lošijim općim tjelesnim stanjem i KV rizičnim čimbenicima). U multivarijatnim analizama preživljenja, povišen YKL-40 je u bolesnika s ET i PV bio rizični čimbenik za razvoj tromboze, a u bolesnika s MF i prediktor lošijeg preživljenja. Naši rezultati impliciraju patofiziološku ulogu hitinaza i hitinazama-sličnih proteina u patogenezi MPN, a mogli bi pomoći i u identificiranju novih terapijskih pristupa.

Ključne riječi: esencijalna trombocitemija; policitemija vera; mijelofibroza; YKL-40; hitotriozidaza

9. SUMMARY

Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs), essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and myelofibrosis (MF), are characterized by clonal myeloproliferation, strong inflammatory atmosphere, and an increased cardiovascular (CV) burden. YKL-40 and serum chitotriosidase activity (CHIT1) have an important role in atherosclerotic inflammation and tissue remodelling. The aim of this study was to investigate circulating YKL-40 and CHIT1 in patients with MPNs and to assess its clinical correlations. Enzyme-linked immunosorbent assay and flurometry were used to analyze serum YKL-40 concentrations and CHIT1 activity in 111 MPN patients and in 32 healthy controls, respectively. YKL-40 was higher in MPNs when compared to healthy controls, whereas CHIT1 was higher only in the "polycythemic" disorders (PV and post-PV MF). Higher circulating YKL-40 and CHIT1 were associated with parameters indicative of the increased inflammatory state (C-reactive protein, poor performance status, presence of constitutional symptoms and CV risk factors). Higher YKL-40 was associated with an increased risk of thrombosis in ET and PV, as well as with impaired survival in MF patients. These results implicate a role of chitinases and chitinase-like proteins in the pathogenesis of MPNs. Further studies are needed to elucidate if these circulating MPN biomarkers might be a novel therapeutic targets in MPNs.

Keywords: essential thrombocythemia; polycythemia vera; myelofibrosis; YKL-40; chitotriosidase

10. LITERATURA

1. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J*. 1845;64:413–423.

2. Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notzien*. 1845;36:151–156.

3. Craigie D. Case of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent matter in the blood. *Edinb Med Surg J*. 1845;64:400–413.

4. Vaquez H. Sur une forme speciale de cyanose s'accompanant d'hyperglobulie excessive et peristente (On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis). *Compt rend Soc de biol and suppl note, Bull et mem Soc med d'hop de Paris*, 3 ser 1895;12:60 1892;384–388.

5. Osler W. Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *Am J Med Sci.* 1903;126:187–201.

6. Heuck G. Zwei Falle von Leukamie mit eigenthumlichem Blutresp. Knochenmarksbefund (Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively). *Arch Pathol Anat Physiol Virchows*. 1879;78:475–496.

7. Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische thrombozythamie bei vascularer schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol.* 1934;293:233–248.

8. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6: 372–375.

9. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85–109.

10. Nowell PC. Progress with chronic myelogenous leukemia: a personal perspective over four decades. *Annu Rev Med*. 2002;53:1–13.

11. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36:93–99.

12. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S i sur. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561–566.

13. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, Höglund M, Lambert PC, Andersson TM. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol*. 2016;34(24):2851-2857.

14. Molica M, Colafigli G, Scalzulli E, Alunni Fegatelli D, Chiatamone Ranieri S, Rizzo L i sur. Ten-year outcome of chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib in real life. *Ann Hematol.* 2019;98(8):1891-1904.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR i sur. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790.

19. 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.

20. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2015;43(8):599– 608.

21. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD i sur. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379–2390.

22. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC i sur. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391–2405.

23. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A i sur. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103 (11):4198–4200.

24. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M i sur. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108 (10):3472–3476.

25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau M i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127:2391-2405.

26. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF i sur. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799–807.

27. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V i sur. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):787–798.

28. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA i sur. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1117–1127.

29. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rosen PJ, Rumi E i sur. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer.* 2014;120(4):513–520.

30. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti i sur. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2015;372(5):426-435.

31. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, Krochmalczyk D, Gercheva L, Egyed M i sur. Ropeginterferon Alfa-2b Induces High Rates of Clinical, Hematological and Molecular Responses in Polycythemia Vera: Two-Year Results from the First Prospective Randomized Controlled Trial. *Blood.* 2017;130:320.

32. Mikkelsen SU, Kjaer L, Bjørn ME, Knudsen TA, Sørensen AL, Andersen CBL i sur. Safety and efficacy of combination therapy of interferon-α2 and ruxolitinib in polycythemia vera and myelofibrosis. *Cancer Med.* 2018;7(8):3571-3581.

33. Kiladjian JJ, Dulphy JS, Resche-Rigon M, Boyer-Perrard F, Barraco F, Rolland-Neyre V i sur. Ruxopeg, a Multi-Center Bayesian Phase 1/2 Adaptive Randomized Trial of the Combination of Ruxolitinib and Pegylated Interferon Alpha 2a in Patients with Myeloproliferative Neoplasm (MPN)-Associated Myelofibrosis. *Blood.* 2018;132:581.

34. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2017;1:470-479.

35. 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; 119:3219-3225.

36. Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as Inflammatory Diseases: The Evidence, Consequences, and Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:102476.

37. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao ZJ, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-β. *Stem Cell Investig*. 2016;3:5.

38. 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.

39. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol.* 2014;92(4):289-297.

40. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L i sur. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124:2507-2513.

41. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L i sur Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood.* 2014;123(10):1552-1555.

42. Gisslinger H, Jeryczynski G, Gisslinger B, Wölfler A, Burgstaller S, Buxhofer-Ausch V i sur. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria. *Leukemia*. 2016;30:1126–1132.

43. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M i sur. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol.* 2011;29:3179–3184.

44. Rumi E, Boveri E, Bellini M, Pietra D, Ferretti VV, Sant'Antonio E i sur. Clinical course and outcome of essential thrombocythemia and prefibrotic myelofibrosis according to the revised WHO 2016 diagnostic criteria. *Oncotarget*. 2017;8:101735–101744.

45. Jeryczynski G, Thiele J, Gisslinger B, Wölfler A, Schalling M, Gleiß A i sur. Pre-fibrotic/early primary myelofibrosis vs. WHO-defined essential thrombocythemia: the impact of minor clinical diagnostic criteria on the outcome of the disease. *Am J Haematol*. 2017;92:885–891.

46. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F i sur. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood.* 2017;129:3227–3236.

47. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2019;94(1):133-143.

48. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y i sur. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv.* 2016;1:21-30.

49. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R i sur. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia.* 2018;32(5):1057-1069.

50. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F i sur. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med.* 1995;332:1132-1136.

51. Budde U, Schaefer G, Mueller N, Egli H, Dent J, Ruggeri Z i sur. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood*. 1984;64:981-985

52. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D i sur. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005;353:33-45.

53. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM i sur. Anagrelide compared to hydroxyurea in WHO classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood.* 2013; 121(10):1720-1728.

54. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce i sur. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol.* 2009;27:5418-5424.

55. Cassinat B, Verger E, Kiladjian JJ. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N Engl J Med.* 2014;371:188-189.

56. Mondello P, Di Mirto C, Pitini V, Mian M. Interferon Alpha, the New Old Disease Modifying Agent for Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*. 2018;132:3954.

57. Harrison CN, Mead AJ, Panchal A, Fox S, Yap C, Gbandi E i sur. Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide. *Blood*. 2017;130:1889-1897.

58. Finazzi G, De Stefano V, Barbui T. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018; 8(7):64.

59. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21:1960-1963.

60. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N i sur. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004;89:1194-1198.

61. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F i sur. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 2013;27:1874-1881.

62. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C i sur. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2004;350:114-124.

63. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D i sur. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2013;368:22-33.

64. Fruchtman SM, Mack K, Kaplan ME, Peterson P, Berk PD, Wasserman LR. From Efficacy to Safety - a Polycythemia Vera Study Group Report On Hydroxyurea in Patients With Polycythemia Vera. *Semin Hematol.* 1997;34:17-23.

65. West WO. Hydroxyurea in the treatment of polycythemia vera: a prospective study of 100 patients over a 20-year period. *South Med J.* 1987;80:323-327.

66. Tatarsky I, Sharon R. Management of Polycythemia Vera With Hydroxyurea. *Semin Hematol.* 1997;34:24-28.

67. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M i sur. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood.* 2008;112:3065- 3072.

68. Mascarenhas JO, Prchal JT, Rambaldi A, Mesa RA, Berenzon D, Yacoub A i sur. Interim Analysis of the Myeloproliferative Disorders Research Consortium (MPD-RC) 112 Global Phase III Trial of Front Line Pegylated Interferon Alpha-2a Vs. Hydroxyurea in High Risk Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. *Blood.* 2016;128:479-479.

69. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(12):1551-1560.

70. Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Szuber N i sur. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv*. 2018;2:370-380.

71. Tefferi A, Mudireddy M, Mannelli F, Begna KH, Patnaik MM, Hanson CA i sur. Blast phase myeloproliferative neoplasm: MayoAGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. *Leukemia*. 2018;32:1200-1210.

72. 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 Pathol*. 2012;25(9):1193-1202.

73. 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. *Med Oncol.* 2014;31(3):869.

74. 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.

75. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005;90:1128-1132.

76. Tefferi A, Saeed L, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Gangat N i sur. Application of current prognostic models for primary myelofibrosis in the setting of post-polycythemia vera or post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia.* 2017;31:2851-2852.

77. 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;22:437-438.

78. 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.

79. 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.

80. 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

81. 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. *J Clin Oncol.* 2011;29:392-397.

82. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A i sur. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36:1769-1770.

83. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N i sur. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32:1631-1642.

84. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ i sur. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:358-367.

85. Tefferi A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood*. 2012;119:2721-2730.

86. Tefferi A, Litzow MR, Pardanani A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2011;365:1455-1457.

87. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420 (6917):860–867.

88. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-45.

89. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med. 1986;315(26):1650-1659.

90. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.

91. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation,the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30 (7); 1073–1081.

92. Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Bjorkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2010;95(7):1216–1220.

93. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br J Cancer.* 2009;100(5):822–828.

94. Kristinsson SY, Bjorkholm M, Hultcrantz M, Derolf AR, Landgren O, Goldin LR. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2011;29 (21):2897–2903.

95. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(5):2785-2789.

96. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM i sur. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F) positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41(4):455-459.

97. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL i sur. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 2009;41(4):446-449.

98. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD i sur. Genomewide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40(8):955-962.

99. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR i sur. Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat Res*. 2010;690(1):108-115.

100. Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Diagnostic value of JAK2 V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br J Haematol*. 2013;160(1):70-79.

101. Farmer S, Horváth-Puhó E, Vestergaard H, Hermann AP, Frederiksen H. Chronic myeloproliferative neoplasms and risk of osteoporotic fractures; a nationwide population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2013;163(5):603-610.

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

103. Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2009;94(11):1484–1488.

104. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A i sur. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009;94(7):911-918.

105. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(2):99-106.

106. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Asanuma Y, Sokka T i sur. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61(11):1580-1585.

107. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus and accelerated atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2003;349(25):2379-2380.

108. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25(1):4-7.

109. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW i sur. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2003;348(15):1435–1441.

110. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G i sur. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet.* 2010;375(9709):132–140.

111. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Vannucchi AM, Barosi G, Antonioli E i sur. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011;96(2):315–318.

112. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Guglielmelli P, Salmoiraghi S, Rosti V i sur. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(10):2084-2086.

113. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM i sur. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood.* 2011;118(2):401-408.

114. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S i sur. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *BMC Cancer.* 2016;16(1):167.

115. Grunwald MR, Burke JM, Kuter DJ, Gerds AT, Stein B, Walshauser MA i sur. Symptom Burden and Blood Counts in Patients With Polycythemia Vera in the United States: An Analysis From the REVEAL Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019;19(9):579-584.e1.

116. Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(12):1188-1191.

117. Urban ML, Manenti L, Vaglio A. Fibrosis-A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):95-96.

118. Christensen AS, Møller JB, Hasselbalch HC. Chronic kidney disease in patients with the Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.* 2014;38(4):490-495.

119. Liu M, Li XC, Lu L, Cao Y, Sun RR, Chen S i sur. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(19):2918-2926.

120. Said SM, Leung N, Sethi S, Cornell LD, Fidler ME, Grande JP i sur. Myeloproliferative neoplasms cause glomerulopathy. *Kidney Int.* 2011;80(7):753-759.

121. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1356-1363.

122. Vaidya R, Gangat N, Jimma T, Finke CM, Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2012; 87(11):1003-1005.

123. Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, Bailly S, Toussaint B, Mossuz P. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp Hematol.* 2014; 42(5):360-368.

124. Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun.* 2017;85:58-63.

125. Koschmieder S, Mughal TI, Hasselbalch HC, Barosi G, Valent P, Kiladjian JJ i sur. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia.* 2016;30(5):1018-1024.

126. Geyer HL, Dueck AC, Scherber, Mesa RA. Impact of Inflammation on Myeloproliferative Neoplasm Symptom Development. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:284706.

127. Skov V, Larsen TS, Thomassen M, Riley CH, Jensen MK, Bjerrum OW i sur. Whole-blood transcriptional profiling of interferon-inducible genes identifies highly upregulated IFI27 in primary myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 2011;87(1):54-60.

128. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S i sur. Tumor necrosis factor-alpha facilitates clonal expansion of JAK2V617F-positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011;118(24):6392-6398.

129. Fisher DAC, Malkova O, Engle EK, Miner CA, Fulbright MC, Behbehani GK i sur. Mass cytometry analysis reveals hyperactive NF kappa B signaling in myelofibrosis and secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31(9):1962–1974

130. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, Riester M, Keller M, Bastian L i sur. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov.* 2015;5(3):316–331.

131. Kleppe M, Koche R, Zou L, van Galen P, Hill CE, Dong L i sur. Dual targeting of oncogenic activation and inflammatory signaling increases therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Cell.* 2018;33(4):785–787.

132. Veletic I, Manshouri T, Multani AS, Yin CC, Chen L, Verstovsek S i sur. Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *Blood.* 2019; 133(21):2320-2324.

133. Broekaert WF, Van Parijs J, Leyns F, Joos H, Peumans WJ. A chitin- binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science.* 1989;245:1100-1102.

134. Watanabe T, Suzuki K, Oyanagi W, Ohnishi K, Tanaka H. Gene cloning of chitinase a1 from bacillus circulans WL-12 revealed its evolutionary relationship to Serratia chitinase and to the type III homology units of fibronectin. *J Biol Chem*. 1990;265:15659-15665.

135. Hayes CK, Klemsdal S, Lorito M, Di Pietro A, Peterbauer C, Nakas JP i sur. Isolation and sequencing of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of trichoderma harzianum. *Gene (amst).* 1994;120:143-148.

136. Kramer KJ, Corpuz L, Choi HK, Muthukrishnan S. Sequence of a cDNa and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of Manduca sexta. *Insect Biochem Mol Biol*. 1993;23:691701.

137. Jekel PA, Hartman JBH, Beintema JJ. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from hevea brailiensis latex. *Eur J Biochem*. 1991;200:123-130.

138. Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdt S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights.* 2007;2:128-146.

139. Schultz NA, Johansen JS.YKL-40-A Protein in the Field of Translational Medicine: A Role as a Biomarker in Cancer Patients? *Cancers (Basel)*. 2010;2(3):1453-1491.

140. Johansen JS, Schultz NA, Jensen BV. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol*. 2009;5:1065-1082.

141. Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull.* 2006;53:172-209

142. Kawada M, HachiyaY, Arihiro A, Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med*. 2007;56(1):21-27.

143. Kanneganti M, Kamba A, Mizoguchi E. Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *J Epithel Biol Pharmacol*. 2012;5:1-9.

144. Hauschka PV, Mann KG, Price P, Termine JD. Report of the Ad Hoc Committee on Nomenclature and Standards for Bone Proteins and Growth Factors. *J Bone Miner Res*. 1986;1:485-486.

145. Biggar RJ, Johansen JS, Smedby KE, Rostgaard K, Chang ET, Adami HO i sur. Serum YKL-40 and interleukin 6 levels in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6974-6978.

146. Kirkpatrick RB, Matico RE, McNulty DE, Strickler JE, Rosenberg M. An abundantly secreted glycoprotein from Drosophila melanogaster is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene.* 1995;153:147-154.

147. Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, Krusell L i sur. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood.* 2006;107(8):3221–3228.

148. Nielsen AR, Plomgaard P, Krabbe KS, Johansen JS, Pedersen BK. IL-6, but not TNF-α, increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine.* 2011;55(1):152-155

149. Rehli M, Krause SW, Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39(CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*. 1997;43:221-225.

150. Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF i sur. Human cartilage gp-39+, CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1233-1243.

151. Volck B, Price PA, Johansen JS, Sorensen O, Benfield TL, Nielsen HJ. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110:351-360.

152. Mylin AK, Andersen NF, Johansen JS, Abildgaard N, Heickendorff L, Standal T i sur. Serum YKL-40 and bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Cancer*. 2009;124:1492-1494.

153. Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (hC-gp39) stimulates proliferation of human connective tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase - and protein kinase b-mediated signaling pathways. *Biochem J.* 2002;365:119-126.

154. Volck B, Ostergaard K, Johansen JS, Garbarsch C, Price PA. The distribution of YKL-40 in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Scand J Rheumatol*. 1999;28:171-179.

155. Shackelton LM, Mann DM, Millis AJ. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem.* 1995;270:13076-13083.

156. Nishikawa KC, Millis AJ. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res*. 2003;287:79-87.

157. Malinda KM, Ponce L, Kleinman HK, Shackelton LM, Millis AJ. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1999;250:168-173.

158. Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM i sur. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:687-694.

159. Johansen JS, Baslund B, Garbarsch C, Hansen M, Stoltenberg M, Lorenzen I i sur. YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:2624-2630.

160. Oostergaard C, Johansen JS, Benfield T, Price PA, Lundgren JD. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:598-604.

161. Nordenbaek C, Johansen JS, Junker P, Borregaard N, Sørensen O, Price PA. YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1722–1726.

162. Labadaridis J, Dimitriou E, Costalos C, Aerts J, van Weely S, Donker-Koopman W i sur. Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis. *Acta Pediatr.* 1998;87(5):605.

163. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(6):599-605.

164. Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Hørslev-Petersen K, Lorenzen I i sur. Price PA.Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(7):618-626.

165. Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Graudal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis--a potential marker of disease activity? *Respir Med.* 2005;99(4):396-402.

166. Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C i sur. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12:989-993.

167. Kucur M, Isman FK, Karadag B, Vural VA, Tavsanoglu S. Serum YKL40 levels in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2007;18:391-396.

168. Nojgaard C, Host NB, Christensen IJ, Poulsen SH, Egstrup K, Price PA i sur. Serum levels of YKL-40 increases in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2008;19:257-263.

169. Wang Y, Ripa RS, Johansen JS, Gabrielsen A, Steinbruchel DA, Friis T i sur. YKL-40 a new biomarker in patients with acute coronary syndrome or stable coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J.* 2008;42:295-302.

170. Kastrup J, Johansen JS, Winkel P, Hansen JF, Hildebrandt P, Jensen GB. High serum YKL-40 concentration is associated with cardiovascular and all-cause mortality in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2009;30:1066-1072.

171. Xu X, Ma H, Xu J, Huang H, Wu X, Xiong Y i sur. Elevation in circulating YKL-40 concentration in patients with cerebrovascular disease. *Bosn J Basic Med Sci.* 201414;14(3):120-124.

172. Kjaergaard AD, Bojesen SE, Johansen JS, Nordestgaard BG. Elevated plasma YKL-40 levels and ischemic stroke in the general population. *Ann Neurol.* 2010;68(5):672-680.

173. Rathcke CN, Johansen JS, Vestergaard H. YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflamm Res.* 2006;55(2):53-59.

174. Rathcke CN, Persson F, Tarnow L, Rossing P, Vestergaard H. YKL-40, a marker of inflammation and endothelial dysfunction, is elevated in patients with type 1 diabetes and increases with levels of albuminuria. *Diabetes Care.* 2009;32(2):323-328.

175. Bergmann OJ, Johansen JS, Klausen TW, Mylin AK, Kristensen JS, Kjeldsen E i sur. High serum concentration of YKL-40 is associated with short survival in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8644-8652.

176. Bjørn EM, Lykkegaard Andersen C, Jensen MK, Hasselbalch HC. Circulating YKL-40 in myelofibrosis a potential novel biomarker of disease activity and the inflammatory state. *Eur J Haematol.* 2014;93:224-228.

177. Andersen CL, Bjørn ME, McMullin MF, Harrison C, Samuelsson J, Ejerblad E i sur. Circulating YKL-40 in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera treated with the novel histone deacetylase inhibitor vorinostat. *Leuk Res*. 2014;38:816-821.

178. Kanneganti M, Kamba A, Mizoguchi E. Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *Epithel Biol Pharmacol.* 2012;5:1-9.

179. Boot RG, Renkema GH, Verhock M, Strijland A, Bliek J, de Meulemeester TM i sur. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25680-25685.

180. Malaguarnera L. Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(24):3018–3029.

181. Malaguarnera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scutu A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(3):128-132.

182. Van Eijk M, Scheij SS, Van Roomen CP, Speijer D, Boot RG, Aerts JM. TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocytespecific chitotriosidase. *FEBS Lett*. 2007;581(28):5389–5395.

183. Hollak CE, Weely SV, Oers MHV, Aerts HJM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1288–1292.

184. Aerts JM, Hollak CE. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1997;10(4):691–709.

185. Brinkman J, Wijburg FA, Hollak CE. Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann Pick disease. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28:13-20.

186. Sheth JJ, Sheth FJ, Oza NJ, Gambhir PS, Dave UP, Shah RC. Plasma chitotriosidase activity in children with lysosomal storage disorders. *Indian J Pediatr*. 2010;77:203-205.

187. Barone R, Simpore J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase activity in acute plasmodium falciparum malaria. *Clin Chim Acta*. 2003;331(1–2):79–85.

188. Koening CL, Gota C, Langford CA, Hoffman GS, Natowicz MR. Serum chitotriosidase activity and Wegener's granulomatosis. Clin Biochem. 2010;43(4–5):512-514.

189. Mizoguchi E. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 2006; 130: 398-411.

190. Boot RG, Hollak CEM, Verhoek M, Alberts C, Jonkers RE, Aerts JM. Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clin Chim Acta.* 2010;411(1–2):31-36.

191. Lee CG, Herzog EL, Ahangari F, Zhou Y, Gulati M, Lee CM i sur. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF- 1 signaling. *J Immunol*. 2012;189(5):2635–2644.

192. Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y i sur. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol*. 2010;176(2):638–649.

193. Malaguarnera L, Rosa MD, Zambito AM, dell'Ombra N, Nicoletti F, Malaguarnera M. Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2006;55(9):1313–1320.

194. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood.* 2008;112(3):470–478.

195. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schilirò G, Pavone L. Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(1):1-8.

196. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielaard BJ, Guy E i sur. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β-thalassemia. *Nat Med.* 2013;19(4):437–445.

197. Karadag B, Kucur M, Isman FK, Hacibekiroglu M, Vural VA. Serum chitotriosidase activity in patients with coronary artery disease. *Circ J.* 2008;72(1):71-75.

198. Yildiz BS, Barutcuoglu B, Alihanoglu YI, Alkan MB, Bilgin M, Gul I i sur. Serum chitotriosidase activity in acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(2):134-141.

199. Artieda M, Cenarro A, Ganan A, Jericó I, Gonzalvo C, Casado JM. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(9):1645-1652.

200. Gołab K, Passowicz-Muszyńska E, Jankowska R, Warwas M. Serum activity of chitotriosidase, lysozyme and cathepsin H in patients with lung cancer and patients with inflammatory exudate (preliminary report). *Pol Merkur Lekarski.* 2009; 26(153):194-197.

201. Sonmez A, Haymana C, Tapan S, Safer U, Celebi G, Ozturk O i sur. Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2010;37:455-459.

202. Kucur M, Isman FK, Balci C, Onal B, Hacibekiroglu M, Ozkan F, Ozkan A. Serum YKL-40 levels and chitotriosidase activity as potential biomarkers in primary prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Oncol.* 2008;26(1):47-52.

203. Thein MS, Kohli A, Ram R, Ingaramo MC, Jain A, Fedarko NS. Chitotriosidase, a marker of innate immunity,is elevated in patients with primary breast cancer.*Cancer Biomark.* 201 7;4;19(4):383-391.

204. Kelsey PR, Geary CG. Sea-blue histiocytes and Gaucher cells in bone marrow of patients with chronic myeloid leukaemia. *J Clin Pathol*. 1988;41(9):960–962.

205. Kattlove HE, Williams JC, Gaynor E, Spivack M, Bradley RM, Brady RO. Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood*. 1969;33(2):379-390.

206. Appiah-Cubi S, Wilkins BS, Harrison C. Positive JAK2-V617F leading to diagnosis of Gaucher's disease. *J Clin Pathol*. 2012;65(8):764-765.

207. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET i sur. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649-655.

208. Shao R, Francescone R, Ngernyuang N, Bentley B, Taylor SL, Moral L i sur. YKL40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and mal ignancy in glioblastoma. *Carcinogenesis.* 2014;35(2):373-382.

209. Salamon J, Hoffmann T, Elies E, Peldschus K, Johansen JS, Lüers G i sur. Antibody directed against human YKL-40 increases tumor volume in
a human melanoma xenograft model in scid mice. *Plos One.* 2014;9(4):e95822.

210. Pieri L, Bogani C, Guglielmelli P, Zingariello M, Rana RA, Bartalucci N i sur. The JAK2V617 mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera. *Haematologica.* 2009;94(11):1537–1545.

211. Lucijanic M, Livun A, Stoos-Veic T, Pejsa V, Jaksic O, Cicic D i sur. High absolute basophil count is a powerful independent predictor of inferior overall survival in patients with primary myelofibrosis. *Hematology.* 2017;14:1–7.

212. Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol.* 2001;77:93–122.

213. Valent P, Bettelheim P. The human basophil. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 1990;10(4):327–352.

214. Delforge M, Devos T, Rowe J, Español I, Durrant ST, Raddoux J i sur. Lack of clinical benefit of zoledronic acid in myelofibrosis: results of a prospective multi-center phase II trial. *Leuk Lymphoma.* 2016;57 (2):470–473.

215. Sakai M, Kobori S, Matsumura T, Biwa T, Sato Y, Takemura T i sur. HMG-CoA reductase inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 1997;133(1):51–59.

216. Corsini A, Mazzotti M, Raiteri M, Soma MR, Gabbiani G, Fumagalli R i sur. Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: in vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis.* 1993;101(1):117–125.

217. Croons V, De Meyer I, Houten SM, Martinet W, Bult H, Herman AG i sur. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(3):269–275.

218. Liang SL, Liu H, Zhou A. Lovastatin-induced apoptosis in macrophages through the Rac1/Cdc42/JNK pathway. *J Immunol.* 2006;177(1):651–656.

219. Hasselbalch HC, Riley CH. Statins in the treatment of polycythaemia vera and allied disorders: an antithrombotic and cytoreductive potential? *Leuk Res.* 2006;30 (10):1217–1225.

220. Newman A, Clutterbuck RD, Powles RL, Millar JL. Selective inhibition of primary acute myeloid leukaemia cell growth by simvastatin. *Leukemia.* 1994;8(11):2023–2029.

221. Newman A, Clutterbuck RD, Powles RL, Catovsky D, Millar JL i sur. A comparison of the effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) reductase inhibitors simvastatin, lovastatin, and pravastatin on leukaemic and normal bone marrow progenitors. *Leuk Lymphoma*. 1997;24(5–6):533–537.

222. Dimitroulakos J, Nohynek D, Backway KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH i sur. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin induced apoptosis: a potential therapeutic approach. *Blood.* 1999;93(4):1308–1318.

223. Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, Hedley DW, Minden MD, Penn LZ. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma.* 2000;40 (1):167–178.

224. Griner LN, McGraw KL, Johnson JO, List AF, Reuther GW i sur. JAK2-V617F mediated signalling is dependent on lipid rafts and statins inhibit JAK2-V617F-dependent cell growth. Br J *Haematol.* 2013;160(2):177–187.

225. Sørensen AE, Kallenbach K, Hasselbalch HC. A remarkable hematological and molecular response pattern in a patient with polycythemia vera during combination therapy with simvastatin and alendronate. *Leuk Res Rep*. 2016;6:20–23.

226. Sutherland TE, Maizels RM, Allen JE. Chitinases and chitinase-like proteins: potential therapeutic targets for the treatment of T-helper type 2 allergies. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(7):943–955.

11. ŽIVOTOPIS

Ivan Krečak rođen je u Šibeniku 1985. godine gdje je od 1999-2003. godine pohađao opću gimnaziju. 2003. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, a 2009. godine je diplomirao s vrlo dobrim uspjehom. U razdoblju od 2009-2010. godine radio je kao liječnik stažist u Domu zdravlja Šibenik, a nakon položenog državnog ispita i kao liječnik hitne medicinske pomoći pri Domu zdravlja Šibenik, ispostava Šibenik. Sa specijalizacijom iz hematologije u Odjelu interne medicine Opće bolnice Šibensko-kninske županije započeo je 2012. godine, a specijalistički ispit je položio 2018. godine. 2015. godine je upisao poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je odslušao i položio sve ispite. Oženjen je i otac dvije kćerke, Eve i Rite. U trenutku pisanja disertacije autor je devet radova, osam ih je indeksiranih u *Current Contentsu*, a jedan u drugim bibliografskim bazama (*Scopus*).