Analiza Aurora kinaza A / Polo kinaza 1 signalnog puta u oboljelih od mijelofibroze

Galušić, Davor

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:821922

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

DAVOR GALUŠIĆ

ANALIZA AURORA KINAZA A / POLO KINAZA 1 SIGNALNOG PUTA U OBOLJELIH OD MIJELOFIBROZE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021.

Doktorska disertacija sadrži rezultate znanstvenog istraživanja provedenog na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split te na Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku KB Dubrava u Zagrebu, a izrađena je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Rajko Kušec

Nemoguće je na jednom mjestu nabrojati sve osobe kojima sam zahvalan. Želim da se u ovoj posveti prepoznaju svi oni koji su me nekada nešto naučili, učinili me mudrijom i kritičnijom osobom, poticali me na upornost i marljivost, ukazivali na moje mane i vrline te od mene stvarali bolju osobu.

Zahvaljujem se roditeljima na stvorenim radnim navikama i osiguravanju školovanja. Beskrajno sam zahvalan svim svojim učiteljima, nastavnicima i profesorima koji su svoje znanje i vještine nesebično prenosili na mene te svim znanstvenicima koji su svoja otkrića učinili javno dostupnim. Zahvaljujem se svojim kolegama na Zavodu za hematologiju bez čijeg kolektiva ne bi bio moguć niti moj znanstveni razvoj, kao i našim bolesnicima koji su nam dali svoje beskrajno povjerenje.

Počašćen sam i neizmjerno zahvalan svom mentoru na ukazanom povjerenju i na svoj pomoći i vremenu koje je izdvojio za mene i realizaciju ovog projekta. Zahvalan sam prijatelju Marku koji je svojim znanstvenim entuzijazmom zarazio i mene te bio mi ogromna podrška i pomoć od samih začetaka ovog istraživanja.

Bez razumijevanja i podrške obitelji, nijedan uspjeh nije potpun. Draga Dobrila i dragi Filipe, hvala vam za sve radosti u životu, svu ljubav koju ste mi dali i za sva odricanja koja ste morali podnijeti kad nisam bio uz vas. Neka vam ova disertacija bude jedna skromna zahvala za sve.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Kronične mijeloproliferativne bolesti 1

1.2. Primarna i sekundarna mijelofibroza 3

1.3. JAK signalni put 14

1.4. AURKA i BORA 16

1.5. PLK1 18

1.6. CDC25c 20

2. Ciljevi i hipoteza 22

3. Metode i materijali 23

3.1. Ispitanici 23

3.2. Materijali i postupci 24

3.3. Statistička obrada podataka 24

4. Rezultati 26

4.1. Karakteristike ispitanika 26

4.2. *AURKA* 31

4.3. *BORA* 39

4.4. *PLK1* 47

4.5. *CDC25c* 53

4.7. Analiza dodatne kontrolne skupine 64

5. Rasprava 70

6. Zaključci 74

7. Sažetak 75

8. Summary 76

9. Popis literature 77

10. Životopis 91

Popis oznaka i kratica

ABL	(*eng. Abelson tyrosine kinase*) - Abelsonova tirozin kinaza
AML	akutna mijeločna leukemija
APC	(eng. *anaphase-promoting complex*)
AURKA	Aurora kinaza A
BCR	(*eng. breakpoint cluster region*)
bFGF	(*eng. basic fibroblast growth factor*) - čimbenik rasta fibroblasta
BORA	protein *aurora borealis*
CALR	(*eng. calreticulin*) - kalretikulin
CD	(*eng. cluster of differentiation*)
CDC25c	(*eng. Cell Division Cycle 25C*)
CDK1	(*eng. cyclin-dependent kinase 1*) - ciklin ovisna kinaza 1
CML	(*eng. chronic myelogenous leukemia*) – kronična mijeloična leukenmija
CRP	C reaktivni protein
CXCR4	(eng. C-X-C chemokine receptor type 4)
DIPSS	(*eng. dynamic international prognostic scoring system*)
DNA	(*eng. deoxyribonucleic acid*) - deoksiribonukleinska kiselina
ET	esencijalna trombocitemija
FISH	(*eng. fluorescence in situ hybridization*) - fluorescentna in situ hibridizacija
FPD	(*eng. familiar platelet disorder*)
HE	hematoksilin-eozin
HR	(*eng. hazard ratio*) - omjer rizika
IPSS	(*eng. international prognostic scoring system*)
JAK2	Janus kinaza 2
LDH	laktička dehidrogenaza
MCV	(*eng. mean corpuscular volume*) - prosječni volumen eritrocita
MDS	mijelodisplastični sindrom
MF	mijelofibroza
MPL	(*eng. myeloproliferative leukemia virus*) - trombopoetinski receptor
MPN	(*eng. myeloproliferative neoplasms*) - kronične mijeloproliferativne bolesti
MPV	(*eng. mean platelet volume*) – prosječni volumen trombocita
MRI	(*eng. magnetic resonance imaging*) - magnetska rezonancija

mRNA	(*eng. messenger ribonucleic acid*) - glasnička ribonukleinska kiselina
MSCT	višeslojna (*eng. multi-slice)* kompjutorizirana tomografija
NHL	non Hodgkinov limfom
NOS	(eng. *not otherwise specified*) – neklasificiran oblik
PCR	(*eng. polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimeraze
PDGF	(*eng. platelet-derived growth factor*) - čimbenik rasta izveden iz trombocita
Ph	*Philadelphia* kromosom
PI3K	(*eng. phosphatidyl inositol 3 kinase*) - fosfatidil inozitol 3 kinaza
PLK1	Polo-*like* kinaza 1
PMF	primarna mijelofibroza
PV	policitemija vera
RDW	(*eng. red cell distribution width*) - širina distribucije volumena erirocita
RNA	(*eng. ribonucleic acid*) - ribonukleinska kiselina
ROC	(eng. *receiver operating characteristic curve analysis*)
SMF	sekundarna mijelofibroza
STAT	(*eng. signal transducer and activator of transcription*)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (*eng. WHO - World Health Organization*)szo
TET2	(*eng. Tet methylcytosine dioxygenase 2*)
TGF-β	(*eng. transforming growth factor-β*) - transformirajući čimbenik rasta beta
TIBC	(*eng. total iron binding capacity*) - ukupni kapacitet vezanja željeza
UZV	ultrazvuk
WT1	Wilms-ov tumor protein 1
ΔCT	(*eng. difference in threshold cycles*)

1. Uvod

1.1. Kronične mijeloproliferativne bolesti

Kronične mijeloproliferativne bolesti su karakterizirane klonalnim poremećajem matične hematopoetske stanice i prezentirane prekomjernom proliferacijom eritrocita, granulocita i trombocita (1). Klonalno umnožene stanice prvenstveno se nakupljaju u koštanoj srži i cirkuliraju u perifernoj krvi, a mogu infiltrirati bilo koji organski sustav. Američki hematolog William Dameshek prvi je dao koncept i klasifikaciju kroničnih mijeoproliferativnih bolesti (slika 1) (2). Najnovija revidirana klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) objavljena je 2016. godine i ima sedam entiteta (3).

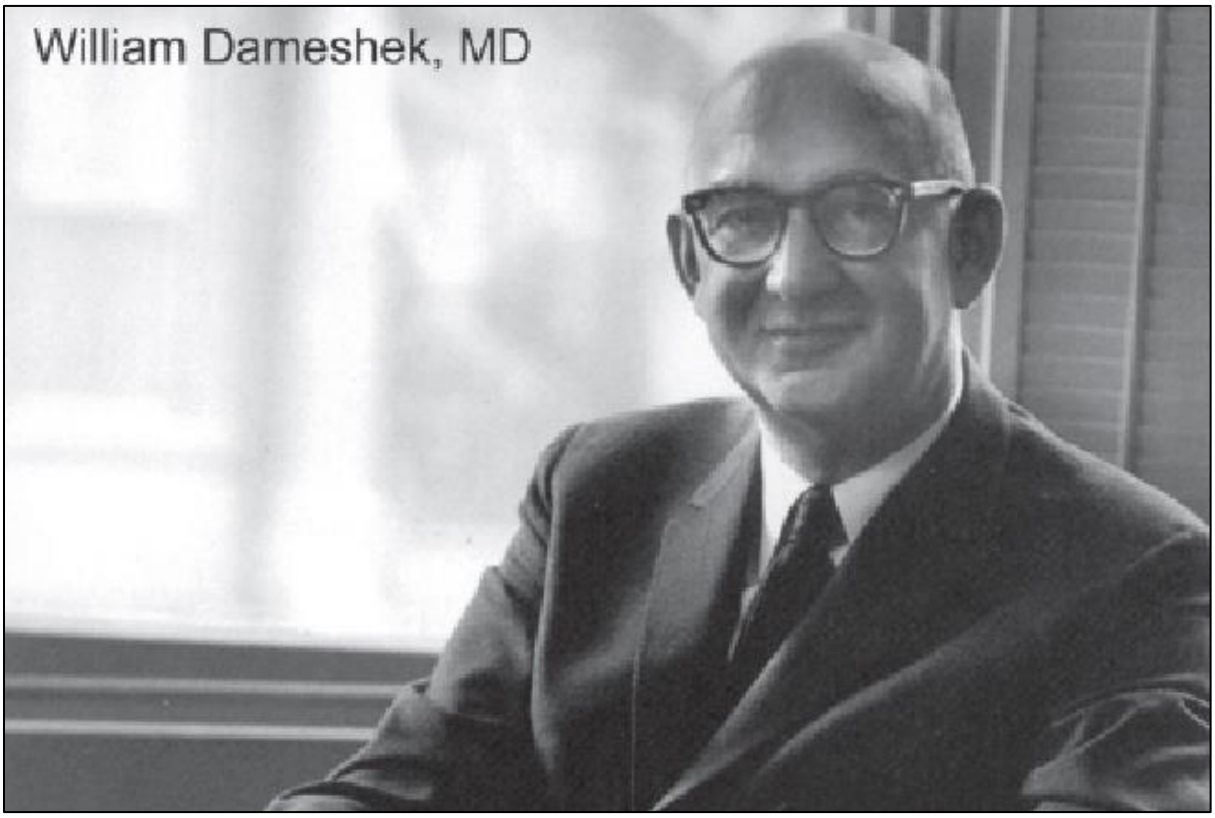
Tablica 1: revidirana SZO klasifikacija kroničnih mijeloproliferativnih bolesti.

Kronična mijeloična leukemija, *BCR-ABL1* pozitivna
Policitemija vera
Esencijalna trombocitemija
Primarna mijelofibroza*
Kronična eozinofilna leukemija
Kronična neutrofilna leukemija
Mijeloproliferativna neoplazma – neklasificirana (NOS)

* u PMF kao podtip svrstan je i rani stadij bolesti, tzv. prefibrotička faza mijelofibroze

Navedene bolesti mogu, osobito u ranim stadijima, imati sličnu prezentaciju, što je dijagnostički problem. Unatoč sličnostima, njihov klinički tijek i prognoza jako su varijabilni. Moderna terapija promijenila je prirodni tijek i ishod pojedinih entiteta, npr. kronične mijeloične leukemije (CML od engl. *chronic myelocytic leukemia*). Nekoć je CML bila neizlječiva i progresivna bolest, ali je pronalaskom ciljanog lijeka imatiniba, specifičnog tirozin kinaznog inhibitora, postala kronična bolest s ukupnim preživljenjem koje je usporedivo s općom populacijom (4). S druge strane, policitemija vera (PV) i esencijalna trombocitemija (ET) prirodno imaju kroničan i sporo progredirajući tijek pa je ukupno preživljenje tek nešto manje od opće populacije, a u manjine, zbog klonalne evolucije, bolest progredira u akutnu leukemiju ili mijelofibrozu (MF) (5). PV i ET liječe se redukcijom klonalne populacije što smanjuje rizik od tromboembolijskih incidenata kao najčešće komplikacije (6, 7). Najčešće se primjenjuju

venepunkcija i citoreduktivna terapija hidroksiurejom ili anagrelidom (8-10). U bolesnika koji u tumorskim stanicama imaju mutaciju gena za *Janus kinazu 2* (*JAK2*), djelotvorni su JAK inhibitori, prvenstveno u smanjenju konstitucijskih simptoma i veličine slezene (11). Za bolesnike koji imaju klonalnu evoluciju bolesti s razvojem sekundarne MF ili akutne leukemije, nema puno terapijskih opcija. Agresivno liječenje i alogenična transplantacija matičnih hematopoetskih stanica su visoko rizični, ali u nekih bolesnika mogu dovesti do izlječenja. Rijetki entiteti koji spadaju u kronične mijeloproliferativne bolesti su: kronična eozinofilna leukemija, kronična neutrofilna leukemija i neklasificirani tip kronične mijeloproliferative bolesti koja je rezultat preklapanja pojedinih podtipova.



Slika 1: William Dameshek, utemeljitelj časopisa Blood, tvorac prvog koncepta i klasifikacije kroničnih mijeloproliferativnih bolesti. Preuzeto sa *www.semanticscholar.org*

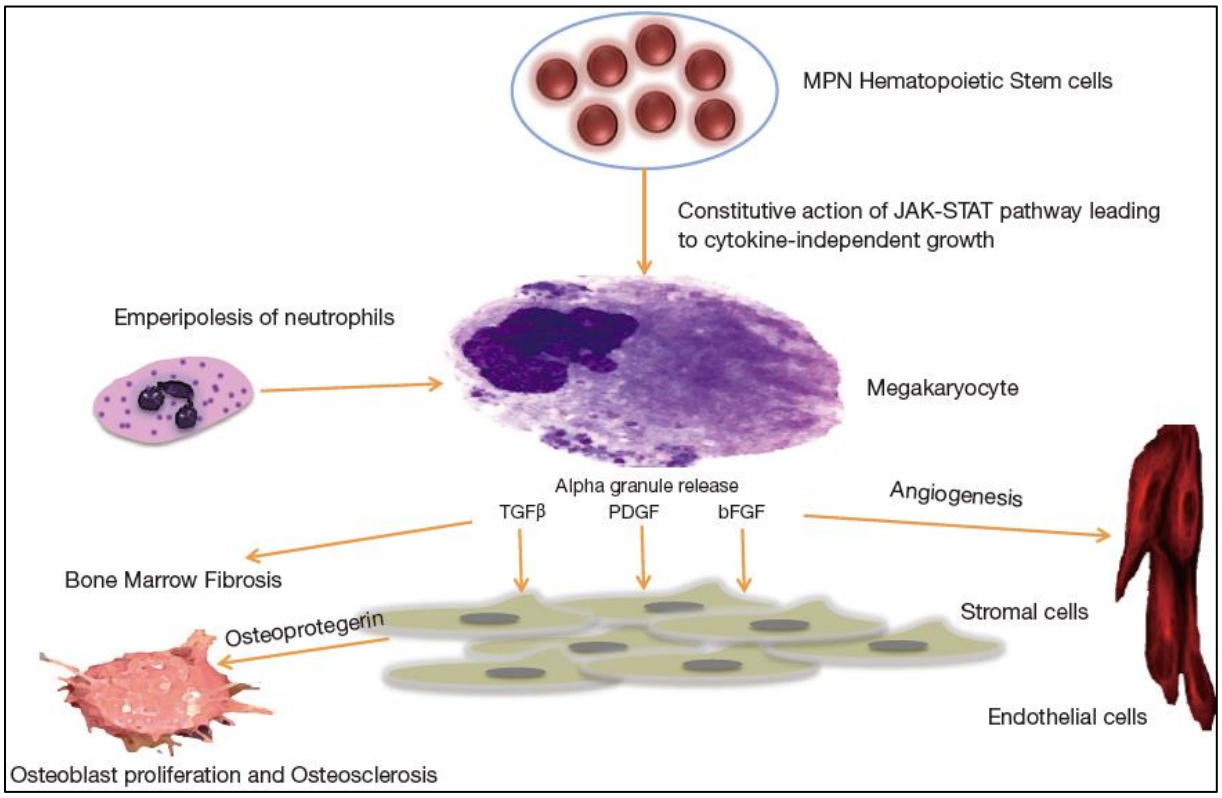
1.2. Primarna i sekundarna mijelofibroza

Primarna mijelofibroza (PMF) klonalna je bolest matične hematopoetske stanice i spada u tzv. *Philadelphia* kromosom negativne kronične mijeloproliferativne bolesti (3). Karakterizirana je ekstramedularnom hematopoezom prvenstveno u slezeni i razvojem fibroze koštane srži (12). *N*astaje *de novo*, za razliku od sekundarne mijelofibroze (SMF) koja nastaje iz PV ili ET (13). Prvi opis bolesti iz 1879. godine prikaz je slučaja bolesnika s leukemijom uz posebne nalaze periferne krvi i koštane srži (14). U novoj SZO klasifikaciji kao podtip mijelofibroze naveden je rani stadij bolesti, tzv. prefibrotička faza mijelofibroze (3). Bolest se obično prezentira različitim stupnjem anemije, trombocitozom ili trombocitopenijom, splenomegalijom i izraženim konstitucijskim simptomima (15-17). Javlja se obično u starijih, u dobi između 65 i 70 godina, a podjednako su zastupljena oba spola (18, 19). U krvnim stanicama većine bolesnika može se utvrditi mutacija *JAK2,* gena za kalretikulin (*CALR*) ili gena za trombopoetinski receptor (*MPL*), a oko 5 - 10% tzv. trostruko negativnih bolesnika nema ni jednu od navedenih mutacija (20). Ove mutacije odgovorne su za proupalni mikrookoliš u koštanoj srži i aberantnu megakariocitopoezu, koje su glavna patogenetska karakteristike mijelofibroze (21, 22).

Epidemiologija. Mijelofibroza je rijetka bolest s incidencijom oko 1 na 100 000 stanovnika (17, 23). Uglavnom se javlja nakon 50. godine (medijan 67 godina), ali mogu oboljeti i mlađi ljudi te djeca (19, 24, 25). Ravnomjerno je zastupljena među spolovima i pokazuje pojačanu obiteljsku sklonost. Relativni rizik za oboljenje je 5 do 7 puta veći ako u obitelji netko boluje od mijeloproliferativne bolesti (19, 26-28). U dječjoj dobi može se javiti iznimno rijetka familijarna MF koja se prenosi autosomno-recesivno (29).

Etiologija i patogeneza. Nedovoljno se zna o etiološkim čimbenicima izravno povezanim s razvojem MF. Izlaganje visokim koncentracijama benzena ili ionizirajućeg zračenja povezivalo se s razvojem MF u nekih bolesnika, ali to nije potvrđeno u epidemiološkim studijama (30-33). 2005. godine je postignut značajan napredak u razumijevanju patogeneze MF i to otkrićem točkaste mutacije *V617F* u genu za *JAK2* (34). Osim $JAK2^{V617F}$ mutacije koja se nađe u oko 50% bolesnika s MF, prisutne su i mutacije *CALR* u oko 35% bolesnika i *MPL* gena u 4% (35, 36). Navedene mutacije doprinose proupalnom mikrookolišu i povišenoj razini proupalnih citokina kao što su TGF-β (*transforming growth factor-β*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) i drugi (37, 38). Fibroza koštane srži dominantan je nalaz, ali fibroblasti nisu dio zloćudnog klona već proliferiraju zbog prekomjerne stimulacije proupalnim citokinima (39). Ključni su element aberantni megakariociti koji sintetiziraju i

otpuštaju proupalne citokine (slika 2) (40, 41). Nezrele stanice granulocitne loze (CD34+) proliferiraju i migriraju u perifernu krv. CD34+ stanice u staničnoj kulturi otporne su na apoptozu, pretjerano izražavaju antiapotpotske proteine BCL-XL i FKBP51, protoonkogene *CXCR4, WT1* i druge te proizvode dvadesetak puta veću količinu megakariocita nego CD34+ stanice normalne koštane srži (42-44). Displastični umnoženi megakariociti povezani su sa stupnjem fibroze koštane srži i sintezom kolagena, angiogenezom te osteogenezom (45, 46).



Slika 2: Patogeneza mijelofibroze. Izvor: *Agarwal et al. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-beta. Stem Cell Investig. 2016;3:5.*

Neefektivna hematopoeza posljedica je poremećaja građe i mikrookoliša koštane srži. Anemija je pokazatelj uznapredovale bolesti, a njen uzrok je, osim dishematopoeze, skraćeni životni vijek eritrocita i redistribucija krvi u povećanoj slezeni koja postaje glavno sijelo ekstramedularne hematopoeze. Cirkulirajuće progenitorske stanice infiltriraju različite organe s posljedičnim započimanjem hematopoeze izvan koštane srži. Splenomegalija je patognomonična, drugo često sijelo je jetra, a nerijetko su zahvaćeni i drugi organski sustavi (47).

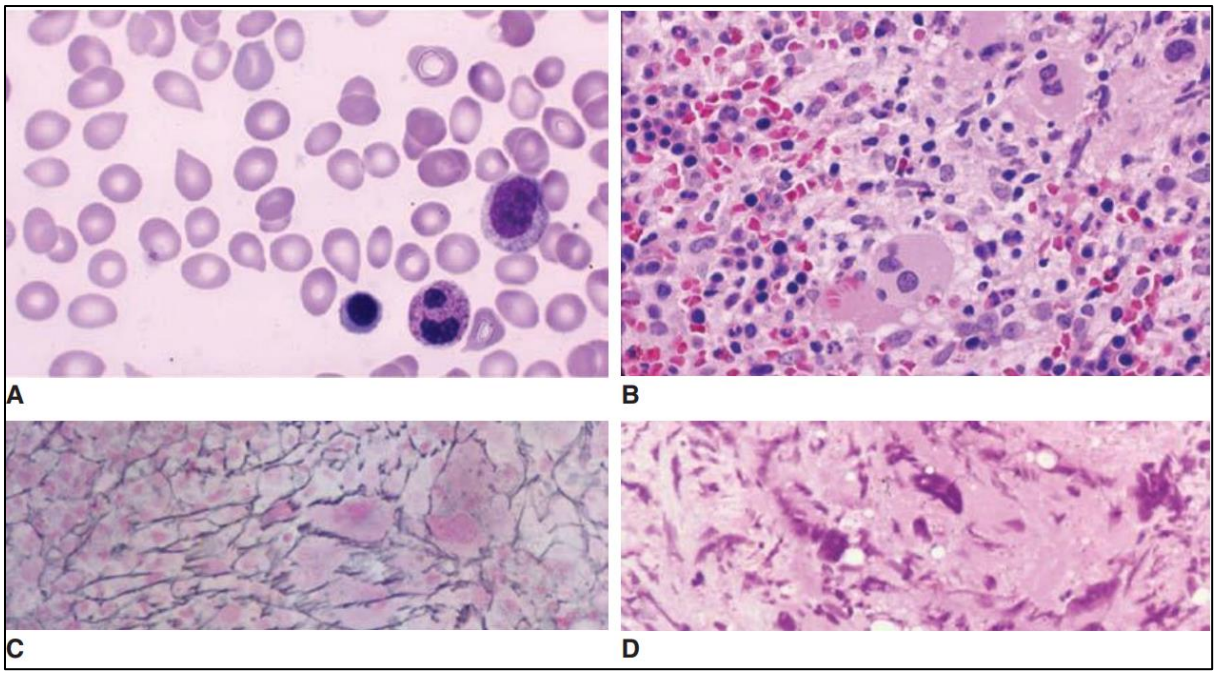
Klinička slika. Većina bolesnika s MF ima tipičnu kliničku sliku, a u manjeg broja se bolest otkrije slučajno, u sklopu druge kliničke obrade. Vodeći simptomi su opća slabost i malaksalost.

Izraženi su konstitucijski simptomi - gubitak tjelesne mase, povišena tjelesna temperatura i profuzno noćno znojenje (16). Ovisno o stupnju anemije, prisutni su zaduha, palpitacije i nepodnošenje tjelesnog napora. Splenomegaliju imaju gotovo svi bolesnici, a trećina masivnu simptomatsku splenomegaliju (slika 3). Bolesnik se žali na nadutost i bol pod lijevim rebrenim lukom, nerijetko vrlo intenzivnu, što upućuje na infarkt slezene. Često je prisutna hepatomegalija zbog ekstramedularne hamatopoeze. Ovisno o zahvaćenosti drugih organskih sustava, spektar simptoma se širi. Svaki organski sustav može biti infiltriran te se nerijetko nađu kožni infiltrati (tzv. neutrofilna dermatoza), pleuralni izljev ili uvećani limfni čvorovi (48-50). Zbog infiltracije središnjeg živčanog sustava mogu nastupiti ozbiljne komplikacije poput kompresije kralježnične moždine, krvarenja ili povećanja intrakranijalnog tlaka (51, 52). Masivna splenomegalija uzrokuje portalnu hipertenziju pa može doći do stvaranja ascitesa, varikoziteta jednjaka, portalne gastropatije, krvarenja iz probavnog sustava ili tromboze lijenalnih i hepatalnih vena (53-55). U uznapredovalom stadiju bolesti javljaju se kaheksija, bolovi u kostima zbog osteoskleroze i u određenog broja bolesnika blastična kriza s nastankom akutne mijeloične leukemije i često fatalnim ishodom (56, 57). Abnormalnosti u humoralnom imunosnom odgovoru ima 50% bolesnika s MF, zbog čega su skloni infekcijama i stvaranju autoprotutijela (58-60). Bolesnici s MF skloni su tromboembolijskom incidentu, ali u manjoj mjeri nego bolesnici s ET ili PV (61). Tromboembolijski incidenti javljaju se u 10% bolesnika s MF, a rizični su čimbenici životna dob i broj leukocita (62, 63).



Slika 3: Bolesnik s masivnom splenomegalijom. Preuzeto sa *www.slideshare.net*

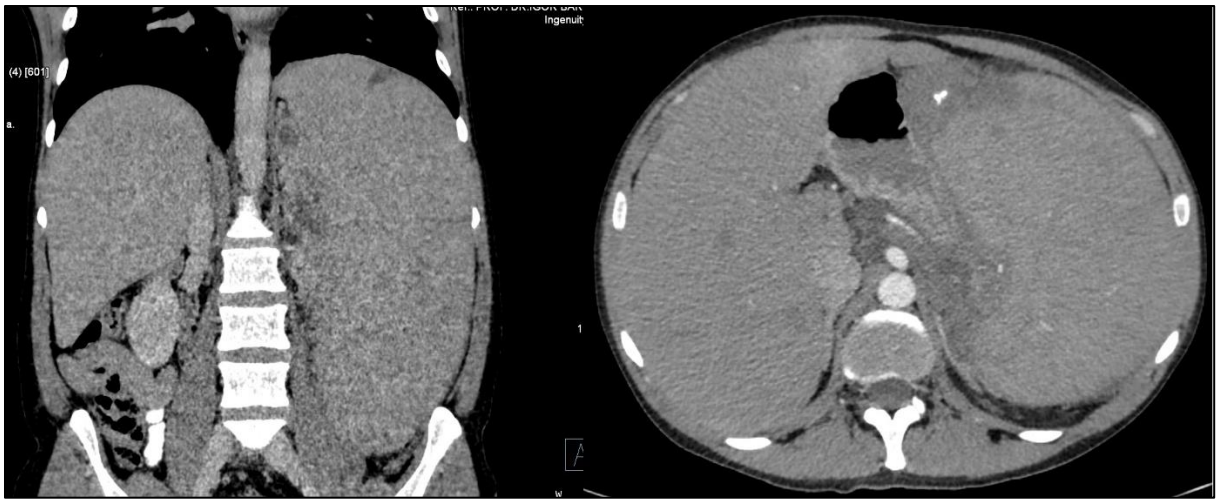
Dijagnoza. U perifernoj krvi najčešće se nalazi normocitna normokromna anemija uz anizocitozu, poikilocitozu, cirkulirajuće eritroblaste i dakriocite (slika 4A) (64, 65). U većine bolesnika prisutna je blaga leukocitoza s neutrofilijom i skretanjem u lijevo, a cirkulirajući blasti loš su prognostički znak (66). Trombocitozu ima 40% bolesnika, a nije rijetka ni trombocitopenija (67). U bolesnika s masivnom splenomegalijom često se nalazi pancitopenija. Vrijednost neutrofilne alkalne fosfataze nije bitan dijagnostički pokazatelj jer varira (68, 69). Nalazi se povišena vrijednost laktične dehidrogenaze, mokraćne kiseline i alkalne fosfataze, a serumski albumini i kolesterol su sniženi, što je nepovoljan prognostički čimbenik (70-72).



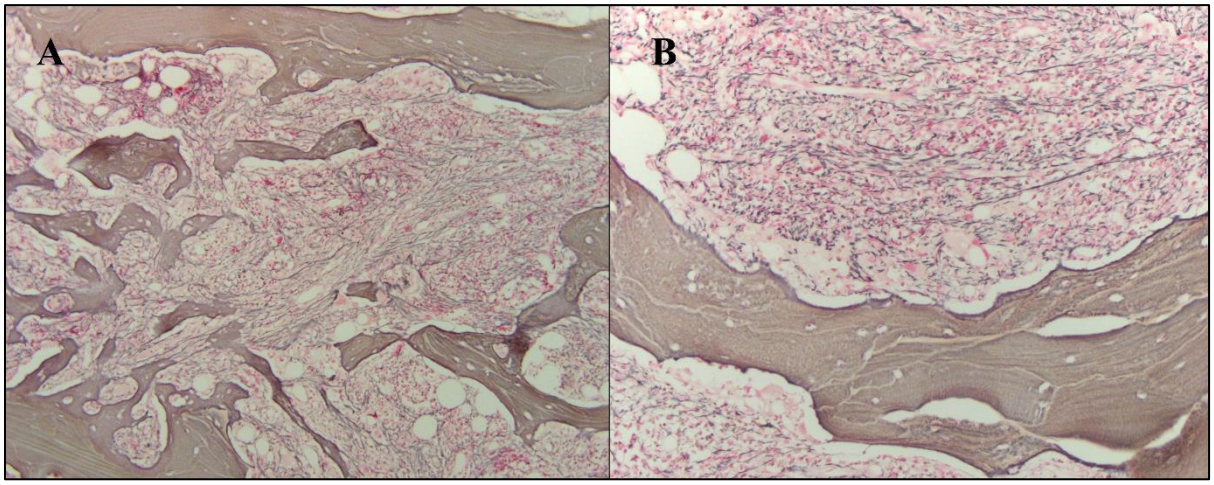
Slika 4: periferni krvni razmaz i koštana srž bolesnika s mijelofibrozom. A: karakeristični eritrociti poput suze (dakriociti) u perifernom krvnom razmazu. B: hipolobulirani megakariociti u razmazu punktata koštane srži. C: umnožena retikulinska vlakna u bioptičkom uzorku koštane srži. D: fibroza koštane srži s ekstenzivnim odlaganjem kolagena u bioptičkom uzorku koštane srži. Preuzeto iz *Lichtman's Atlas of Hematology, www.accessmedicine.com*

Za razliku od limfoproliferativnih bolesti, slikovna dijagnostika nije nužna za postavljanje dijagnoze i određivanje stupnja proširenosti bolesti. Ultrazvučni ili MSCT nalaz slezene služi za procjenu učinka liječenja (slika 5), a magnetska rezonancija može pokazati tipične promjene u koštanoj srži (73).

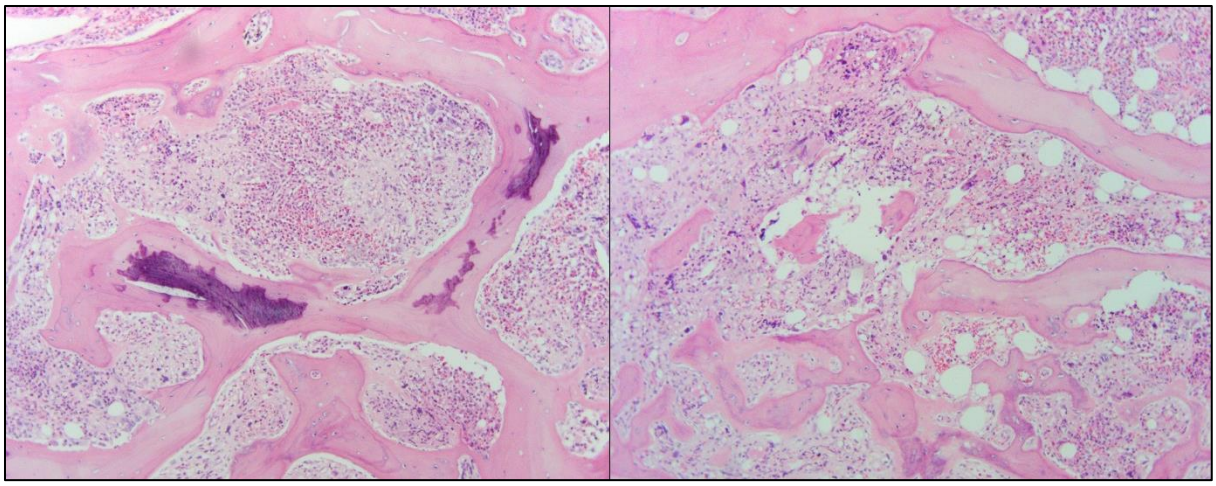
Za postavljanje dijagnoze MF nužna je morfološka analiza koštane srži. Pokušaj aspiracije koštane srži obično nije zadovoljavajući. U citološkom razmazu dominiraju displastični, često hipolobulirani, megakariociti različite veličine i oblika (slika 4B) (74). U bioptičkom uzorku prisutna je hiperplazija granulocitne i megakariocitne loze uz suprimiranu eritropoezu i aberante megakariocite (75, 76). Umnožena retikulinska vlakna i odlaganje kolagena (slike 4C, 4D, 6, 7 i 8) predstavljaju karakterističnu promjenu prema kojoj se određuje stupanj fibroze koštane srži (0 do 3) (77). U uznapredovaloj bolesti često se nalazi osteoskleroza. U klasifikaciji SZO definiran je rani stadij bolesti, tzv. prefibrotička faza mijelofibroze. Koštana srž je u prefibrotičkoj fazi hipercelularna s proliferacijom atipičnih megakariocita, a odlaganje retikulinskih vlakana je diskretno ili se ne nalazi. Atipija megakariocita je ključna u razlikovanju MF od ET, tim više jer se obje u perifernoj krvi prezentiraju trombocitozom (78).



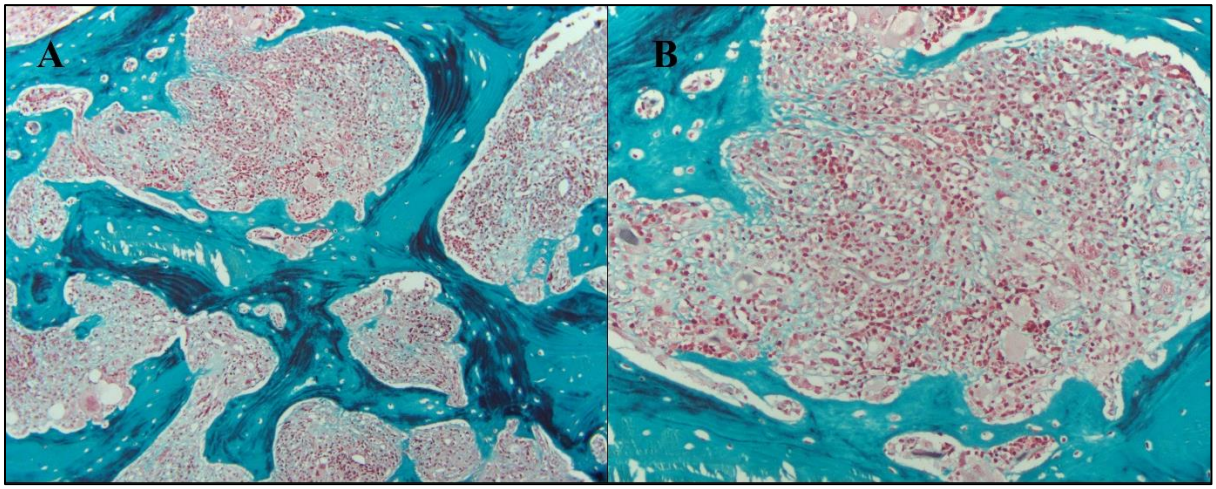
Slika 5: MSCT prikaz masivne splenomegalije (32 x 31 x 22 cm) s dva mala infarkta u 52-godišnjeg bolesnika s mijelofibrozom.



Slika 6: Bioptički uzorak koštane srži u 54-ogodišnjeg bolesnika s mijelofibrozom. Gusta mreža retikulinskih vlakana ispunjava prostore između koštanih gredica. Bojanje po Gomory, povećanje 100x (A) i 200x (B).



Slika 7: Bioptički uzorak koštane srži u 54-ogodišnjeg bolesnika sa mijelofibrozom. Znatno reducirana hematopoeza. Bojanje po HE, povećanje 100x.



Slika 8: Odlaganje kolagena u koštanu srž 54-ogodišnjeg bolesnika sa mijelofibrozom. Bojanje po Mallory, povećanje 100x (A) i 200x (B).

Citogenetske promjene prisutne su u 40% bolesnika s mijelofibrozom, ali ni jedna karakteristična (79, 80). Najčešće su trisomija 1q i delecija 13q, ali nisu rijetke ni abnormalnosti drugih kromosoma (80, 81). Danas je molekularna analiza standardni dio dijagnostičkog postupka. *JAK2*^{V617F} mutacija nalazi se u koštanoj srži 50% bolesnika s mijelofibrozom, mutacija *CALR* gena u oko 35%, *MPL* gena u oko 4% bolesnika, a 10% bolesnika je trostruko negativno i imaju lošiju prognozu bolesti (20).

Kriteriji za postavljanje dijagnoze prikazani su na slici 9 (82). Potrebno je diferencijalno - dijagnostičkog isključiti druge mijeloproliferativne bolesti ili mijelodisplastični sindrom. U 15% bolesnika s PV ili ET nastaje progresija u sekundarnu mijelofibrozu (SMF) (5, 83). Klinički pokazatelji progresije u SMF su porast slezene i pojava konstitucijskih simptoma, a za

potvrdu je potrebna biopsija koštane srži (84). Fibroza koštane srži može nastati sekundarno u sklopu drugih bolesti, primjerice zbog infiltracije koštane srži nekom malignom bolešću ili nakon zraženja.

Primary myelofibrosis (PMF) [a]

Prefibrotic/early PMF (pre-PMF)	Overt PMF
Major criteria	
1 Megakaryocytic proliferation and atypia[b], without reticulin fibrosis > grade 1[c], accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Megakaryocyte proliferation and atypia[b] accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2 Not meeting WHO criteria for *BCR-ABL1* + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for *BCR-ABL1* + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3 Presence of *JAK2, CALR, or MPL* mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker[d] or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis[e]	Presence of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* mutation or in the absence, the presence of another clonal marker[d] or absence of evidence for reactive BM fibrosis[f]
Minor criteria	
1 Presence of one or more of the following, confirmed in two consecutive determinations:	Presence of one or more of the following confirmed in two consecutive determinations:
• Anemia not attributed to a comorbid condition	• Anemia not attributed to a comorbid condition
• Leukocytosis ≥ 11×10^9/L	• Leukocytosis ≥ 11×10^9/L
• Palpable splenomegaly	• Palpable splenomegaly
• LDH level above the upper limit of the institutional reference range	• LDH level above the upper limit of the institutional reference range
	• Leukoerythroblastosis

Table adapted from Barbui T et al. *Blood Cancer J.* 2015; 5:e337[103], and Arber et al. Blood 2016;127:2391–2405[2]

BM, bone marrow; *CML*, chronic myeloid leukemia; *MDS*, myelodysplastic syndrome; *LDH*, serum lactate dehydrogenase

[a]Diagnosis of prefibrotic/early PMF requires all three major criteria and at least one minor criterion. Diagnosis of overt PMF requires meeting all three major criteria and at least one minor criterion

[b]Small-to-large megakaryocytes with aberrant nuclear/cytoplasmic ratio and hyperchromatic and irregularly folded nuclei and dense clustering

[c]In cases with grade 1 reticulin fibrosis[87], the megakaryocyte changes must be accompanied by increased BM cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis (that is, pre-PMF)

[d]In the absence of any of the three major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations *(ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1)* are of help in determining the clonal nature of the disease

[e]Minor (grade 1) reticulin fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies

[f]BM fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder, or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia, or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy or toxic (chronic) myelopathies

Slika 9: SZO kriteriji postavljanja dijagnoze mijelofibroze. Izvor: *Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood Cancer J. 2018;8(2):15.*

Liječenje. Za razliku od PV i ET koje imaju kroničan sporo progredirajući tijek i KML koja se uspješno liječi tirozin kinaznim inhibitorom, liječenje MF veliki je klinički izazov zbog nedostatka terapijskih opcija, slabog kliničkog odgovora i progresivne bolesti. Dio bolesnika pri postavljanju dijagnoze nema izražene simptome bolesti, a time ni indikaciju za početak liječenja. Zbog prirodnog tijeka bolesti, prije ili kasnije treba započeti specifično liječenje. Glavne indikacije su prisutnost konstitucijskih simptoma, simptomatska splenomegalija, anemija ili trombocitopenija.

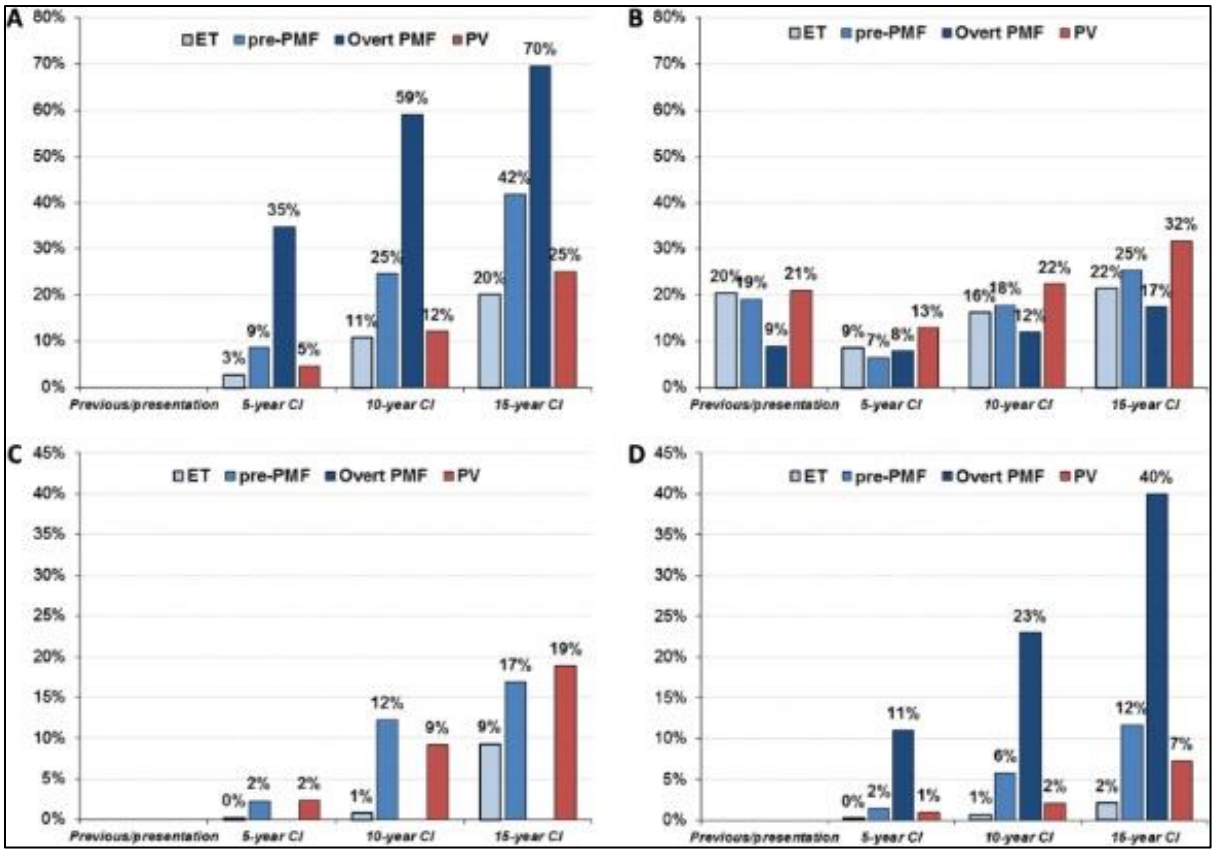
Otkriće $JAK2^{V617F}$ mutacije i njene uloge u patogenezi ove bolesti, dovelo je do razvoja specifičnih lijekova koji inhibiraju JAK-STAT signalni put (34, 85-87). JAK2 inhibitor ruksolitinib odobren je 2011. godine za liječenje bolesnika s mijelofibrozom intermedijarnog ili visokog rizika. Nakon šest mjeseci oralne terapije (2 puta po 20mg dnevno) 40% bolesnika ima značajno smanjenje veličine slezene i konstitucijskih simptoma (88). Glavni su terapijski problemi pogoršanje trombocitopenije i/ili anemije, zbog čega je često nužna redukcija doze

lijeka ili čak prekid terapije. U Sjedinjenim Američkim Državama odobren je i fedratiniba, a u kliničkim studijama učinkovitost su pokazali i drugi JAK inhibitori (pakritinib i momelotinib), pogotovo u bolesnika s refraktornom citopenijom (89-91).

Alogenična transplantacija matičnih hematopoetskih stanica jedina je terapijska opcija kojom se u određenog broja bolesnika može postići izlječenje bolesti. Međutim, zbog visoke periproceduralne smrtnosti, rezervirana je samo za mlađe bolesnike s lošim prognostičkim pokazateljima (92).

Ostali modaliteti liječenja usmjereni su ublažavanju simptoma. Nerijetko su bolesnici ovisni o učestaloj simptomatskoj potpori transfuzijskim pripravcima. Simptomatska splenomegalija često dovodi do smanjene kvalitete života. Splenektomija je indicirana u bolesnika s masivnom splenomegalijom refraktornom na JAK2 inhibitore, u bolesnika ovisnih o čestim transfuzijama ili u bolesnika u kojih se razvila portalna hipertenzija (93). Zbog visokog perioperativnog rizika (većina bolesnika ima i izraženu trombocitopeniju), potrebna je pažljiva individualna procjena rizika. Simptomi splenomegalije mogu se smanjiti palijativnim zračenjem (94). Citoreduktivna terapija hidroksiurejom učinkovita je u nekih bolesnika, ali je terapijski učinak djelomičan i kratkotrajan (95). U malog broja bolesnika korisni su imunomodulatorni lijekovi talidomid i lenalidomid, pogotovo ako je utvrđena delecija 5q, a androgen danazol može poboljšati anemiju (96-99). Određenu učinkovitost pokazali su interferon-α, ciklosporin i etanercept (100-102). U budućnosti će vjerojatno biti dostupni drugi lijekovi koji inhibiraju različite signalne puteve.

Prognoza. Bolesnici s mijelofibrozom imaju lošiju prognozu od bolesnika s PV, ET i CML. Medijan preživljenja je 5 - 6 godina, a 20% bolesnika u 10-godišnjem praćenju progredira u akutnu mijeloičnu leukemiju. Za usporedbu, samo 5% bolesnika s ET i 12% bolesnika s PV progredira u akutnu mijeloičnu leukemiju u 20-godišnjem praćenju (5). Jedan od razloga klasificiranja prefibrotičke faze mijelofibroze kao posebnog entiteta upravo je prognostički profil, koji ga jasno izdvaja od manje agresivnih bolesti PV i ET (slika 10) (82).



Slika 10: Prognostički parametri različitih mijeloproliferativnih poremećaja. A: ukupna smrtnost. B: ozbiljni tromboembolijski incidenti. C: progresija u mijelofibrozu. D: progresija u akutnu mijeloičnu leukemiju (blastična transformacija). Izvor: *Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood Cancer J. 2018;8(2):15.*

Nepovoljni prognostički čimbenici su životna dob bolesnika, stupanj anemije, leukocitoza ili leukopenija (> 25 x 10^9/L ili < 4 x 10^9/L), konstitucijski simptomi, prisutnost cirkulirajućih blasta (≥ 1%), muški spol, trombocitopenija, monocitoza, prisutnost *JAK2*^{V617F} mutacije ili „*trostruko negativni*" bolesnici, kompleksne citogenetske promjene i neke druge mutacije (*ASXL1, IDH, WT1*). Na osnovu nepovoljnih prognostičkih pokazatelja definirani su prognostički indeksi (tablica 2) (103, 104).

Tablica 2: Najčešće korišteni prognostički indeksi u mijelofibrozi i način bodovanja*.

	IPSS	DIPSS	DIPSS plus
Dob > 65 godina	1	1	1
Konstitucijski simptomi	1	2	2
Hemoglobin < 100 g/L	1	1	1
Leukociti > 25 x 10^9/L	1	1	1
Cirkulirajući blasti ≥ 1%	1	1	1
Trombociti < 100 x 10^9/L			1
Ovisnost o transfuzijama eritrocita			1
Nepovoljne citogenetske promjene			1

* IPSS *score*: 0 (niski rizik); 1 (intermedijarni-1 rizik); 2 (intermedijarni-2 rizik); ≥ 3 (visoki rizik). DIPSS *score*: 0 (niski rizik); 1 - 2 (intermedijarni-1 rizik); 3 - 4 (intermedijarni-2 rizik); ≥ 5 (visoki rizik). DIPSS plus *score*: 0 (niski rizik); 1 (intermedijarni-1 rizik); 2 - 3 (intermedijarni-2 rizik); ≥ 4 (visoki rizik).

1.3. JAK signalni put

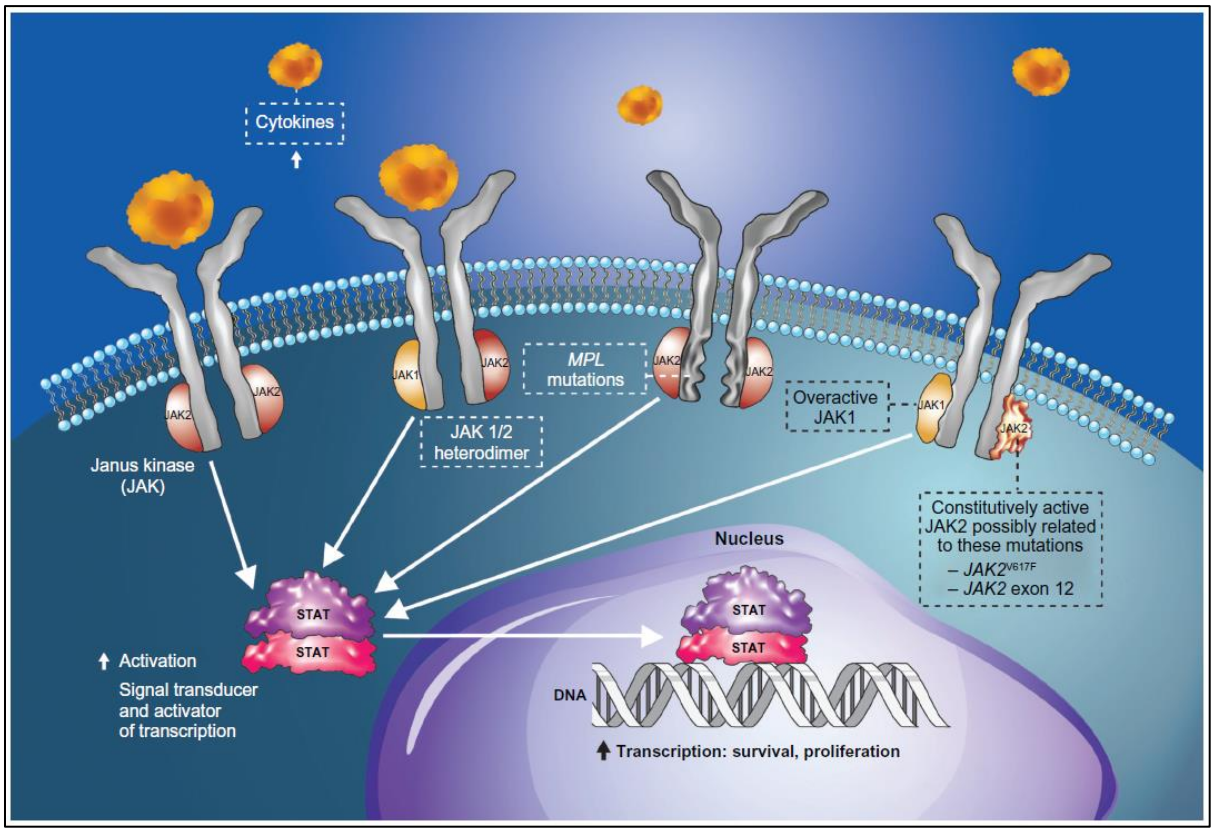
Janus kinaza (JAK) grupa je nereceptorskih intracelularnih tirozin kinaza odgovornih za prijenos citokinskog signala od receptora koji inače nemaju tirozin kinaznu aktivnost, poput eritropoetinskog (EPO), trombopoetinskog (TPO) ili receptora za granulocitno-monocitni faktor rasta (GM-CSF) (105). Naziv potječe od imena rimskog boga Janusa, zaštitnika kuća i puteva te simbola dvoličnosti (slika 11).



Slika 11: Janus, rimski bog, simbol dvoličnosti, zaštitnik kuća i puteva. Preuzeto sa www.*en.wikipedia.org/wiki/Janus*

Većina bolesnika koji boluju od *Philadelphia* kromosom negativnih kroničnih mijeloproliferativnih bolesti imaju mutaciju u genu za *JAK2*, a najčešća je $JAK2^{V617F}$ (zamjena valina fenilalaninom na poziciji 617 gena za *JAK2*) (106, 107). Navedena mutacija prisutna je u skoro svih bolesnika s policitemijom verom (PV) te u oko polovice bolesnika s esencijalnom trombocitemijom (ET) ili mijelofibrozom (MF) (20, 108). Nakon vezanja liganda za receptor (primjerice faktora rasta), Janus kinaze fosforiliraju transkripcijske faktore (STAT) koji potiču transkripciju određenih gena odgovornih za kontrolu stanične proliferacije, diferencijacije ili apoptoze (slika 12) (106). Mutacija tih gena dovodi do prekomjerne aktivacije navedenog

signalnog puta, pojačane osjetljivosti na čimbenike rasta ili čak do proliferacije stanica neovisne o receptorskoj stimulaciji (109-111). Manji broj bolesnika s mijelofibrozom ima mutaciju *MPL* gena (*MPLW515L*) koja također dovodi do prekomjerne aktivacije JAK2 signalnog puta i povezana je s trombocitozom i razvojem fibroze koštane srži (35, 112, 113).

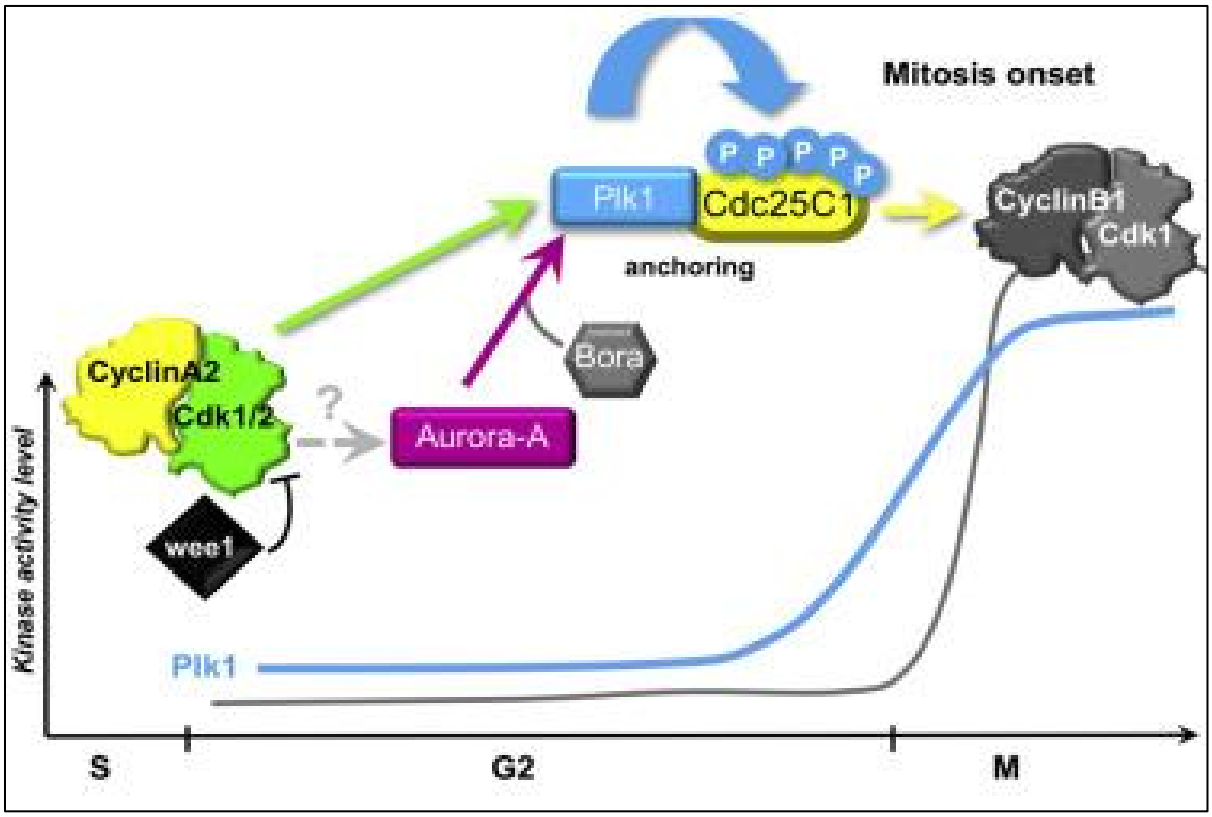


Slika 12: Shematski prikaz disregulacija JAK-STAT signalnog puta u mijeloproliferativnim bolestima. Izvor: *Vaddi K, Sarlis NJ, Gupta V. Ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. Expert Opin Pharmacother. 2012;13(16):2397-407.*

Iako je *JAK2*^{V617F} mutacija zajednička poveznica PV, ET i MF, zbog potpuno različite kliničke prezentacije i prognoze tih bolesti, drugi kofaktori igraju bitnu ulogu u modificiranju navedenog signalnog puta, s posljedičnom proliferacijom pojedinog klona. Razina genskog izražaja *JAK2*^{V617F} znatno je veća u mijelofibrozi. Druge modificirajuće mutacije poput *MPL*, *CALR, TET2*, *ASXL1* i drugih, te interakcije s drugim signalnim putevima, vjerojatno imaju udjela u patogenezi ovih kompleksnih poremećaja (114, 115).

1.4. AURKA i BORA

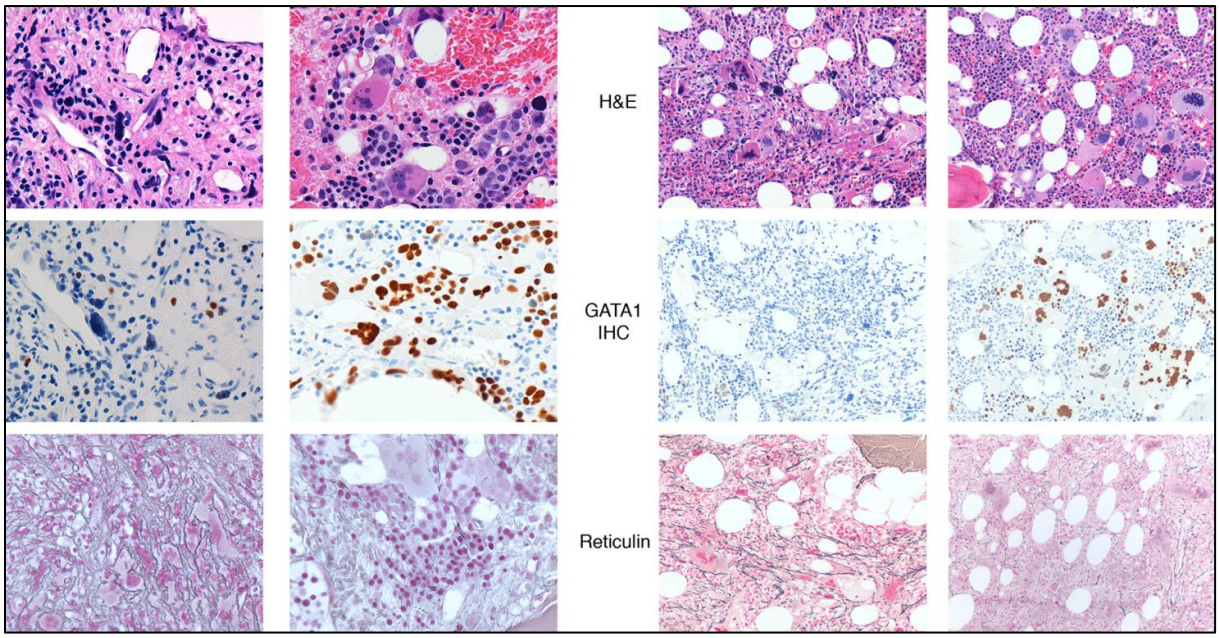
Aurora kinaza A (AURKA) proteinska je kinaza iz porodice serin/treoninskih kinaza koja ima značajnu ulogu u staničnom ciklusu, posebno u tranziciji iz G2 u M fazu staničnog ciklusa (116, 117). U kombinaciji sa svojim kofaktorom i aktivatorom (protein *aurora borealis* - BORA) aktivira polo kinazu 1 (PLK1) čija je aktivacija nužna za ulazak stanice u mitozu (slika 13) (118, 119). Pojačan izražaj *AURKA* rezultira abnormalnom kromosomskom separacijom, zbog čega nastaje aneuploidija (120).



Slika 13: Shematski prikaz aktivacije M faze staničnog cikusa. Izvor: *Gheghiani L, Loew D, Lombard B, Mansfeld J, Gavet O. PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis. Cell reports. 2017;19(10):2060-73.*

Disregulacija AURKA i BORA dokazana je u brojnim zloćudnim bolestima. Pretjerani izražaj *AURKA* povezan je s karcinomom dojke, debelog crijeva, prostate, jajnika i drugih tumora, a u nekih je povezan i s prognozom bolesti (121-124). *BORA* ima onkogenu ulogu u nekim zloćudnim bolestima. Pojačani izražaj korelira s prognozom i proliferacijskim indeksom (Ki-67) nekih tipova adenokarcinoma (125). Nakon kofaktorske uloge u kojoj BORA zajedno s AURKA aktivira PLK1, dolazi do degradacije BORA proteina nakon što započne M faza staničnog ciklusa (118, 126). Postoje saznanja o ulozi AURKA u patogenezi

mijeloproliferativnih poremećaja. AURKA se povezuje s aktivacijom JAK2 signalnog puta, a njene povišene vrijednosti utvrđene su u CD34+ stanicama bolesnika koji boluju od mijeloproliferativnih bolesti, s posljedičnim učinkom na upalni odgovor i razvoj fibroze koštane srži (116). Već ranije spomenuta abnormalna kromosomska separacija s posljedičnom aneuploidijom, po svemu sudeći igra bitnu ulogu u aberantnoj megakariocitopoezi u bolesnika s mijelofibrozom. Specifična inhibicija ove kinaze alisertibom dovodi do proliferacijskog aresta megakariocita, što potiče diferencijaciju i poliploidizaciju koja je normalna sastavnica zdrave megakariocitopoeze (116, 127). Na životinjskim modelima mijelofibroze AURKA inhibicijom dokazana je poliploidizacija megakariocita i redukcija fibroze koštane srži (128). Pozitivan klinički odgovor uočen je i u bolesnika s mijelofibrozom, a dio njih prethodno su neuspješno liječeni ruksolitinibom (slika 14 i 15) (129). Do sada nije istraživan izražaj *BORA* ni povezanost između izražaja *AURKA* i *BORA* s kliničkim pokazateljima i prognozom bolesnika s mijelofibrozom.



Slika 14: Normalizacija megakariocitopoeze i redukcija fibroze koštane srži u dva bolesnika nakon liječenja alisertibom. Izvor: *Gangat N, Marinaccio C, Swords R, et al. Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2019;25(16):4898-906.*

Type of response	Number evaluable	Number of responders (%)
Symptom response	22	7 (32)
Spleen response	14	4 (29)
Anemia response	19	2 (11)
Response in 13 patients with a minimum of 6 cycles		
Symptom response	13	6 (46)
Spleen response	7	4 (57)
Anemia response	5	1 (20)
Biomarker response		
Fibrosis response (one grade reduction)	7	5 (71)
Improvement in GATA1 staining	7	6 (86)

Slika 15: Dio rezultata iz kliničke studije s alisertibom u bolesnika s mijelofibrozom. Izvor: *Gangat N, Marinaccio C, Swords R, et al. Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2019;25(16):4898-906.*

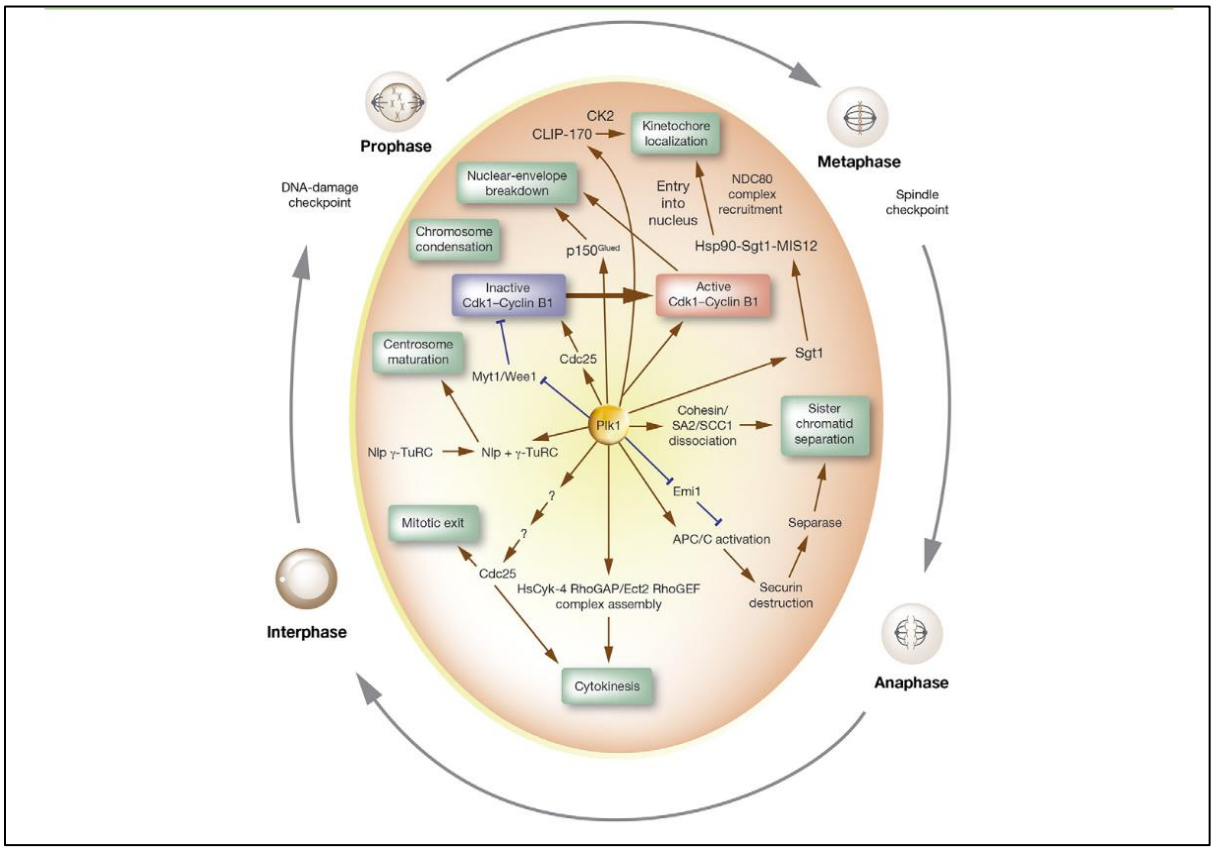
1.5. PLK1

Polo-*like* kinaza 1 (PLK1), još poznata kao serin/treoninska protein kinaza 13 (STPK13), proteinska je kinaza koju kodira istoimeni gen (130). Regulator je staničnog ciklusa, poznat kao rani okidač (*early trigger*) tranzicije G2 u M fazu staničnog ciklusa (119, 131). Jedan od glavnih puteva te aktivacije je fosforilacija i aktivacija CDC25c (*Cell Division Cycle* 25C), APC (*anaphase-promoting complex*) te CDK1/ciklin B1 kompleksa (132, 133). Uloga PLK1 u regulaciji staničnog ciklusa vrlo je složena, a njegova inhibicija dovodi do proapoptotičkog okoliša i supresije stanične diferencijacije (slika 16 i 17) (134).

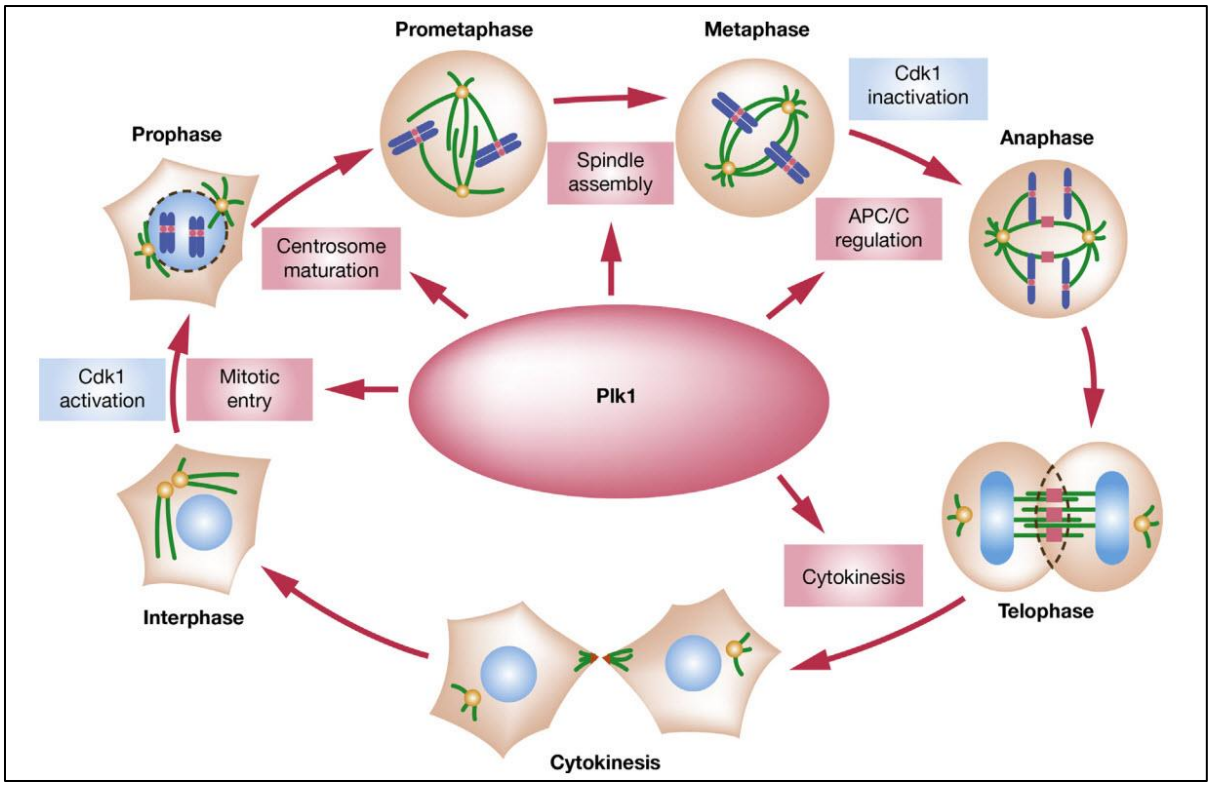
PLK1 je protoonkogen i njegov pretjerani izražaj nađen je u mnogim zloćudnim bolestima (135-139). Osim u solidnim tumorima, istraživan je u hematološkim poremećajima, npr. akutnoj mijeloičnoj leukemiji (AML) (140-142). PLK1 je u direktnim interakcijama s poznatim tumor-supresorskim signalnim putevima (p53, RB i drugi) gdje inhibira njihovu prirodnu proapoptotičku aktivnost (143, 144).

PLK1 je zanimljiv i kao terapijska opcija jer su razvijene molekule s inhibicijskim učinkom na PLK1 i pokazuju djelotvornost u različitim kombinacijama onkološkog liječenja (145). U kliničkim studijama ispituju se PLK1 inhibitor volasertib i RAS/PI3K/PLK1 inhibitor

rigosertib. U kombinaciji s citarabinom, volasertib je pokazao određenu učinkovitost u bolesnika s AML, a rigosertib u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom i AML (146-149). Iako se navedeni lijekovi intenzivno ispituju u brojnim hematološkim poremećajima, među ostalim u mijelofibrozi (u tijeku je studija s rigosertibom NCT02730884), ne postoje saznanja o izražaju *PLK1* i povezanosti s kliničkim pokazateljima i prognozom bolesnika s mijelofibrozom.



Slika 16: PLK1 kontrola staničnog ciklusa. Izvor: *Liu X. Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach. Transl Oncol. 2015;8(3):185-95.*

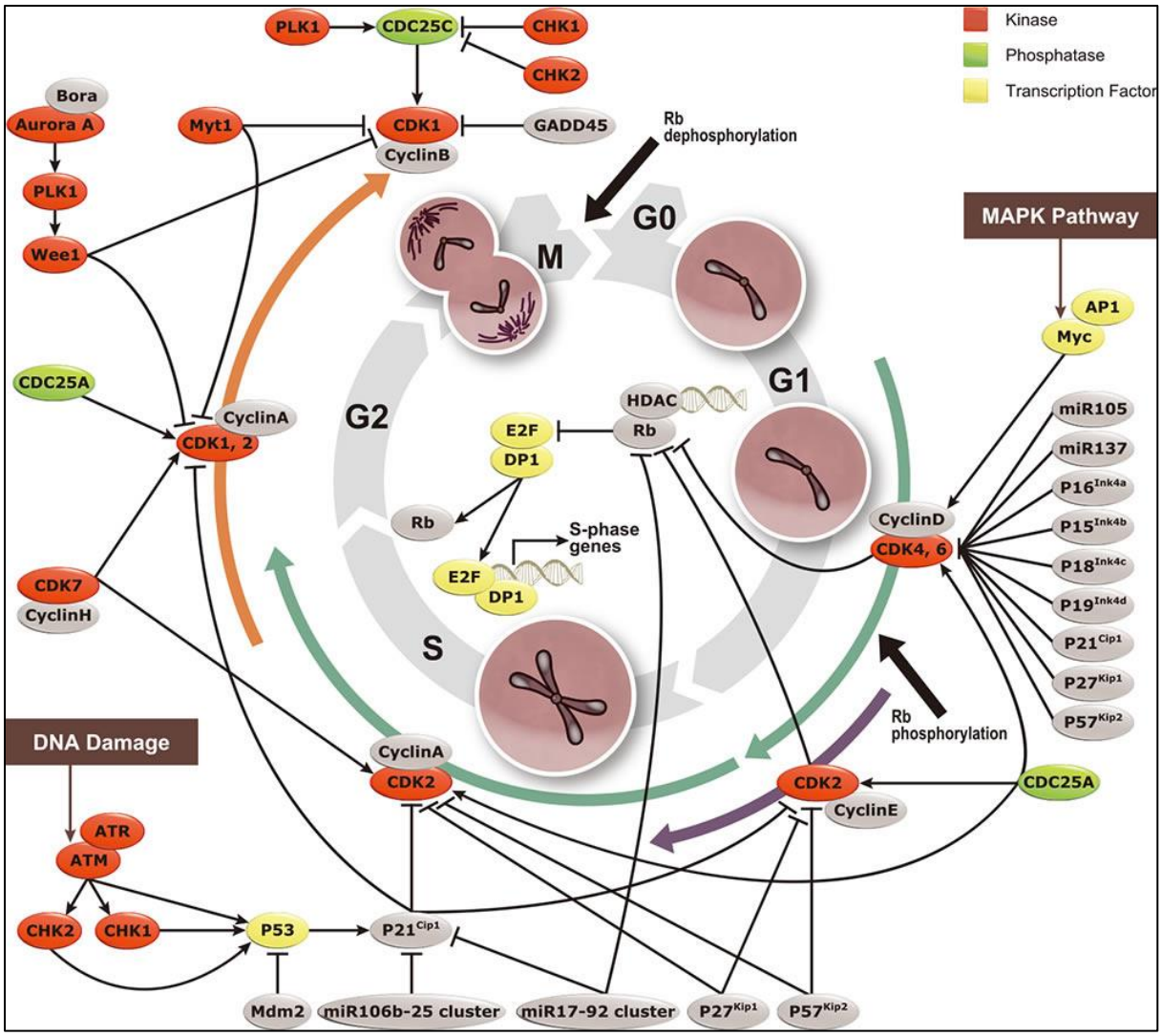


Slika 17: Višestruka uloga PLK1 u mitozi. Izvor: *Barr FA, et al. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(6):429-40.*

1.6. CDC25c

Cell Division Cycle 25C (CDC25c) bitan je enzim za regulaciju staničnog ciklusa (slika 18) (119). Jedan je od tri izoforme fosfataze (uz CDC25a i CDC25b) i vjerojatno ključni okidač aktivacije mitoze jer je jedan od glavnih aktivatora CDK1/ciklin B1 kompleksa (150, 151). Disregulacija gena koji kodira CDC25c dovodi se u vezu s malignom alteracijom i proliferacijom stanica (152-154). CDC25c inhibira p53 signalni put i tako izravno utječe na sprečavanje apoptoze (155). Karcinom dojke, jednjaka, prostate, debelog crijeva i ginekološki karcinomi neki su od solidnih tumora u kojima je dokazan abnormalni izražaj CDC25c (156-160). Malo je istraživanja o njegovoj ulozi u patogenezi hematoloških poremećaja. Utvrđena je povećana učestalost mutacija *CDC25* gena u rijetkim nasljednim trombocitopenijama (FPD – *familiar platelet disorder*) s mogućim utjecajem na transformaciju bolesti u akutnu mijeloičnu leukemiju (161). Izražaj *CDC25* i povezanost s kliničkim i prognostičkim pokazateljima nisu ispitivani u mijeloproliferativnim bolestima.

Kaskadni aktivacijski mehanizam između AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c koristan je predmet analize patogeneze zloćudnih bolesti i novih ciljanih terapijskih opcija.



Slika 18: CDC25c kontrola staničnog ciklusa. Preuzeto sa *www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/Cell_Cycle_Pathway*

2. Ciljevi i hipoteza

Ciljevi istraživanja:

- Ispitati postoji li razlika u mRNA ekspresiji *AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c* u stanicama koštane srži između ispitanika s mijelofibrozom i ispitanika u kontrolnoj skupini.
- Ispitati utječe li mRNA ekspresija *AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c* na ukupno preživljenje ispitanika s mijelofibrozom.
- Ispitati korelaciju mRNA ekspresije *AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c* s kliničkim i prognostičkim pokazateljima ispitanika s mijelofibrozom.

Hipoteza istraživanja:

- mRNA ekspresija *AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c* u stanicama koštane srži ispitanika s mijelofibrozom razlikuje se u odnosu na kontrole.
- mRNA ekspresija *AURKA, BORA, PLK1 i CDC25c* u stanicama koštane srži ispitanika s mijelofibrozom utječe na ukupno preživljenje.

3. Metode i materijali

3.1. Ispitanici

Analizirano je ukupno 43 bolesnika s mijelofibrozom i 12 kontrolnih ispitanika. Bolesnici s primarnom ili sekundarnom mijelofibrozom koji su uključeni u istraživanje novodijagnosticirani su bolesnici ili bolesnici s od ranije postavljenom dijagnozom i kojima je klinički indicirana kontrolna analiza koštane srži. Dijagnoza mijelofibroze postavljana je prema kriterijima SZO i Međunarodne radne skupine za istraživanje i liječenje mijelofibroze (3, 82, 84). U kontrolnu skupinu uvršteni su bolesnici s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma u kojih je inicijalnom obradom isključeno postojanje infiltracije koštane srži malignom bolešću. U sklopu standardne dijagnostičke obrade, infiltracija koštane srži limfomom u kontrolnoj skupini isključena je histološki, imunohistokemijski i, ovisno o dijagnozi, FISH i PCR analizom.

Veličina uzorka izračunata je na temelju pilot rezultata za izražaj *BORA*. Uz grešku tipa 1 od 0.05, snagu od 80%, prosječnu ekspresiju od 0.91 ΔCT vrijednosti i standardnu devijaciju od 1.25 u oboljelih i prosječnu ekspresiju od 0.01 ΔCT vrijednosti i standardnu devijaciju od 0.75 u kontrola, potrebno je uključiti ukupno 34 bolesnika s mijelofibrozom i 12 kontrola da bi rezultat bio statistički značajan. Pod istim pretpostavkama potrebno je uključiti 28 bolesnika i 10 kontrola da bi studija imala 80% snage da bi detektirala statistički značajnu razliku od 1 ΔCT vrijednosti (što odgovara dvostruko većoj/manjoj prosječnoj relativnoj ekspresiji gena između dvije skupine), ukoliko bi ista bila prisutna.

Ispitanici su prije punkcije koštane srži klinički pregledani i uzeti su anamnestički podaci. Veličina jetre i slezene određeni su palpacijski. Dokumentirani su demografski podaci, osnovne karakteristike bolesti (konstitucijski simptomi, mutacijski status, stupanj fibroze koštane srži, DIPSS *score*, ovisnost o transfuzijama) i laboratorijski pokazatelji. Podaci sa zadnje kontrole odnosno informacija o datumu smrti korišteni su za ocjenu statusa na kraju praćenja i izračun preživljenja.

U svrhu provjere prikladnosti odabira kontrolne skupine (ispitanici s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma bez infiltracije koštane srži), napravljena je i usporedba s dodatnom kontrolnom skupinom od 6 ispitanika koji nemaju dijagnozu zloćudne bolesti (četiri ispitanika s reaktivnom leukocitozom, ispitanik s anemijom u sklopu bubrežnog zatajenja te jedan ispitanik s reaktivnom trombocitozom).

Svi ispitanici ispunili su odgovarajući informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (klasa 500-03/19-01/01; Ur. br: 2181-147-01/06/M.S.-19-3). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije te je sukladno sa smjernicama i preporukama za pravilno ophođenje i rukovanje biološkim materijalima. Osobe koje su sudjelovale u ovom istraživanju jamče za sigurnost i tajnost svih podataka. Svi prikupljeni podaci korišteni su isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja bilo kakvih osobnih podataka o bolesnicima.

3.2. Materijali i postupci

Nakon iglene aspiracije koštane srži u području spine ilijake posterior superior (*Somatex, ASPI-CUT punkcijska igla 40 mm 15G / 1.8 mm, ref 181013*), mononuklearne stanice izdvojene su centrifugiranjem (*Histopaque, Sigma, St. Louis, MO, USA; density 1.077 g/mL*). Ukupna RNA izolirana je uz *Trizol* reagens (*TriPure; Roche Mannheim, Germany*) i reverzno transkribirana u komplementarnu deoksiribonukleinsku kiselinu - cDNA (*MuLV Reverse Transcriptase; Applied Biosystems, Foster City, CA*). Potom je učinjeno umnožavanje u lančanoj reakciji polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR) u uređaju *ABI Prism 7300 Sequence Detection system* (*Applied Biosystems*), koristeći eseje za ispitivane gene (*AURKA* Hs1582072_m1*, BORA* Hs0227229_m1*, PLK1* Hs0983227_m1 i *CDC25C* Hs00156411_m1, *Thermo Fischer Scientific TaqMan assays*). RT-PCR je učinjen u duplikatu za svaki uzorak. Ekspresija gena izražena je kao razlika u ciklusima praga detekcije (ΔCT - *difference in threshold cycles*) između ispitivanog i referentnog gena *ABL*. Viša vrijednost ΔCT ukazuje na nižu ekspresiju ispitivanog gena i obrnuto (niža ΔCT vrijednost sugerira da je prisutna veća početna količina RNA ciljnog gena te njenim umnažanjem ranije dolazi do oslobađanja fluorofora kojeg detektira uređaj). U brojnim publiciranim studijama o kvantitativnom RT-PCR analizi, npr. u analizama fuzijskih transkripata mijeloidnih neoplazmi, korištenje *ABL* kao kontrolnog gena pokazalo je adekvatne rezultate te je preporučen kao kontrolni gen (162-165). Gen *ABL* smatra se kvalitetnom kontrolom u analizi fuzijskih transkripata mijeloidnih neoplazmi, kako zbog stabilnosti ekspresije, tako i zbog nepostojanja pseudogena (162, 163).

3.3. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Normalno distribuirane numeričke varijable prikazane su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i uspoređene su između dvije skupine korištenjem t-testa za nezavisne uzorke. Ne-

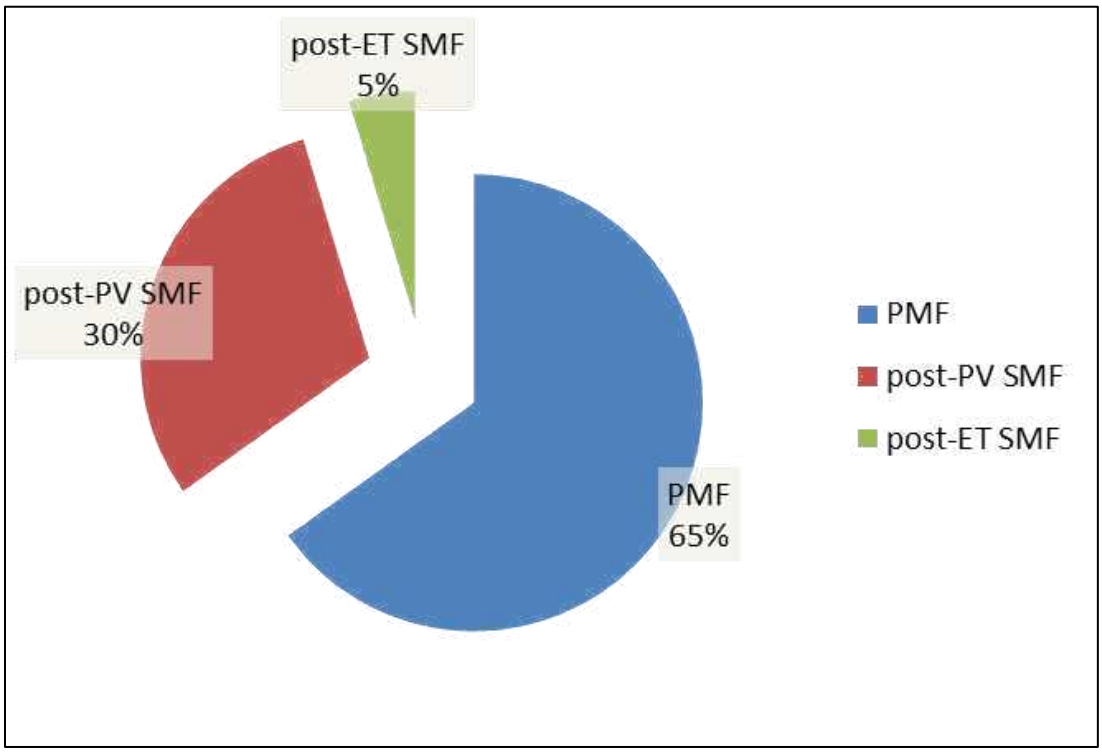
normalno distribuirane numeričke varijable prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon (IKR) i uspoređene su između dvije skupine korištenjem Mann-Whitney U testa, ili između više skupina korištenjem Kruskal-Wallis jednosmjerne analize varijance uz naknadni test po Conoveru (166). Dvije numeričke varijable međusobno su uspoređene korištenjem Spearmanove rank korelacije. Kategorijske varijable prikazane su kao omjer i postotak, i uspoređene su između skupina korištenjem χ^2 testa. Analiza preživljenja temeljena je na Kaplan-Meier metodi. Za usporedbu preživljenja između dvije skupine bolesnika korišten je log-rank test. Optimalne granične vrijednosti na kojima su dihotomizirane numeričke varijable odabrane su korištenjem analize ROC krivulje. Kao kriterijska varijabla korišten je status preživljenja ili status bolesti. P vrijednosti <0.05 smatrane su statistički značajnima. Sve analize rađene su u statističkom programu MedCalc ver. 19.0.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

4. Rezultati

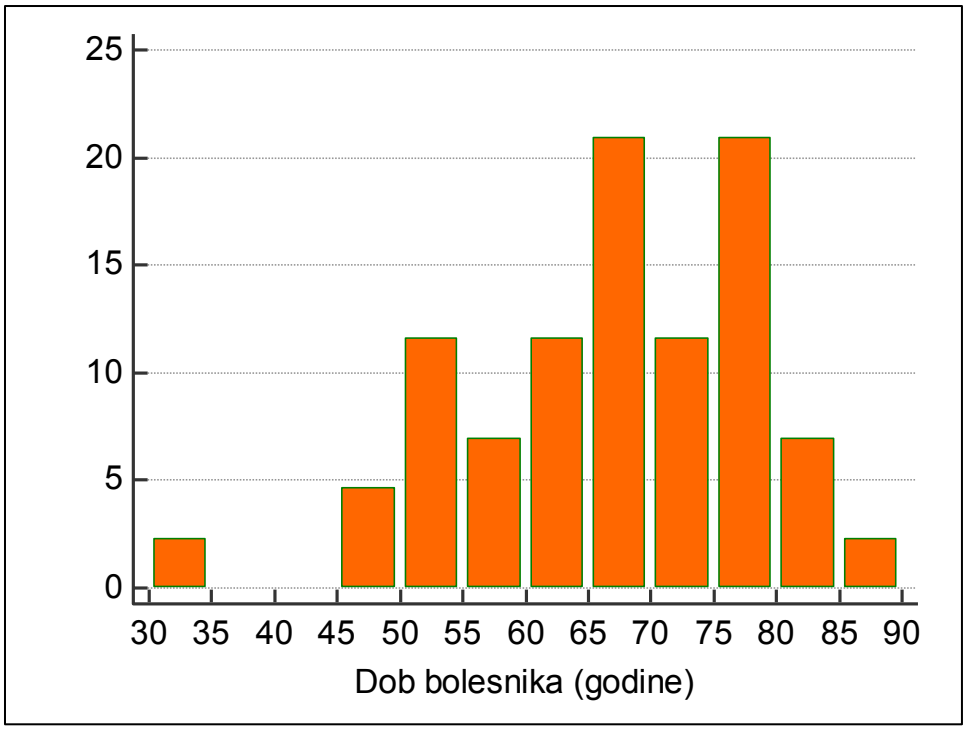
4.1. Karakteristike ispitanika

Analizirana su ukupno 43 ispitanika oboljela od mijelofibroze i 12 kontrolnih ispitanika. 28/43 (65.1%) ispitanika imalo je PMF, a 15/43 (34.9%) SMF i to 13/43 (30.2%) nakon PV i 2/43 (4.7%) nakon ET (slika 19).

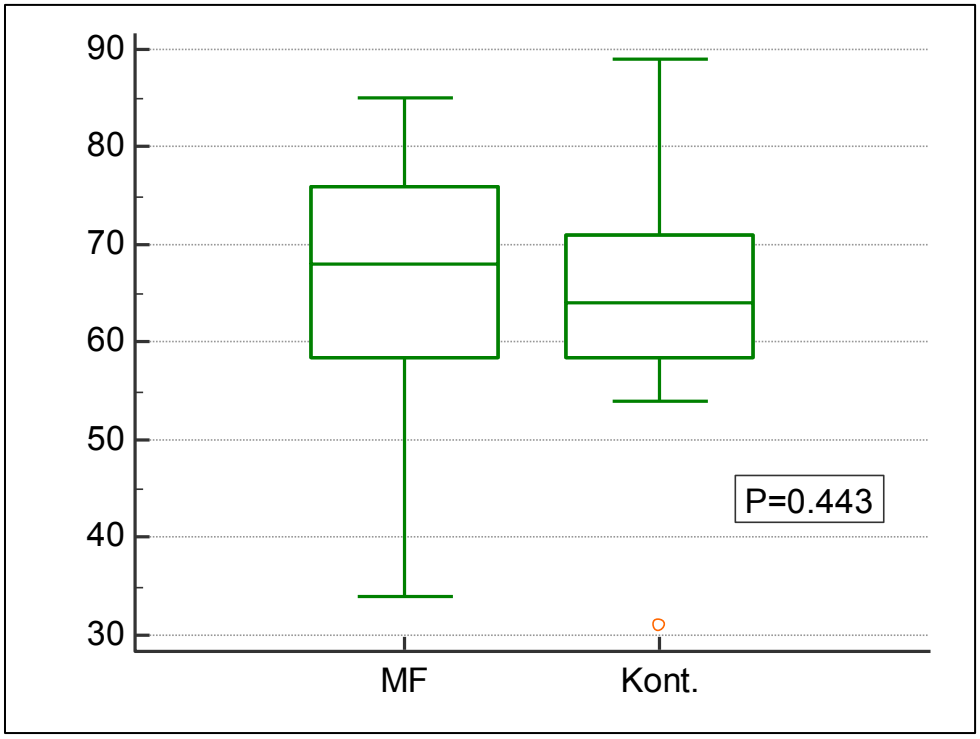
Prosječna dob ispitanika s mijelofibrozom bila je 66.1 ±11.9 godina. Raspodjela po dobi prikazana je na slici 20. Bilo je podjednako muškaraca [23/43 (53.5%)] i žena [20/43 (46.5%)]. Ispitanici i kontrole nisu se značajno razlikovali prema dobi (P=0.443, slika 21) i spolu (P=0.831). Karakteristike ispitanika stratificirane prema spolu prikazane su u tablici 3.



Slika 19: Udio bolesnika s različitom etiologijom mijelofibroze u ispitivanom uzorku.



Slika 20: Raspodjela bolesnika prema dobi.



Slika 21: Usporedba dobi između bolesnika i kontrola.

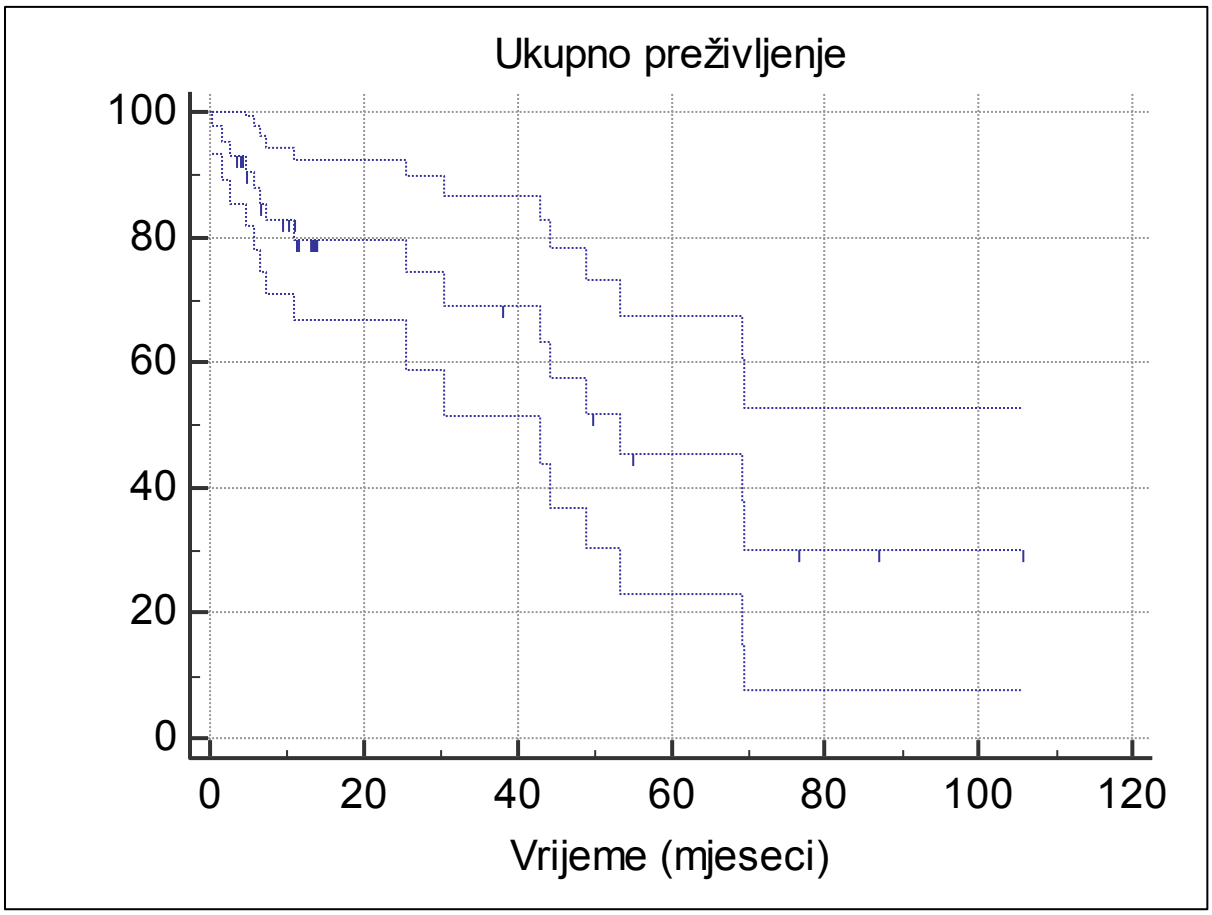
Tablica 3: Praćeni pokazatelji s obzirom na spol 43 ispitanika s mijelofibrozom.

	Ukupno	**Muškarci**	**Žene**	**P vrijednost**
Broj ispitanika	43	23	20	-
Dob (godine)	66.8 ±11.3	66.7 ±9.3	66.9 ±13.6	P=0.944
Spol Muški Ženski	 23/43 (53.5%) 20/43 (46.5%)	-	-	-
Tip mijelofibroze PMF Post-PV SMF Post-ET SMF	 28/43 (65.1%) 13/43 (30.2%) 2/43 (4.7%)	 18/23 (78.3%) 4/23 (17.4%) 1/23 (4.3%)	 10/20 (50%) 9/20 (45%) 1/20 (5%)	 P=0.134
Stupanj fibroze 0-1 2-3	 19/43 (44.2%) 24/43 (55.8%)	 12/23 (52.2%) 11/23 (47.8%)	 7/20 (35%) 13/20 (65%)	 P=0.258
JAK2 mutirani	34/43 (79.1%)	17/23 (73.9%)	17/20 (85%)	P=0.467
CALR mutirani	2/38 (5.3%)	2/20 (10%)	0/18 (0%)	P=0.488
MPL mutirani	1/38 (2.6%)	1/20 (5%)	0/18 (0%)	P=1.000
Leukemijska transformacija	3/43 (7%)	2/23 (8.7%)	1/20 (5%)	P=1.000
Status slezene Nepalpabilna <10 cm ≥10 cm	 7/39 (17.9%) 17/39 (43.6%) 15/39 (38.5%)	 3/21 (14.3%) 8/21 (38.1%) 10/21 (47.6%)	 4/18 (22.2%) 9/18 (50%) 5/18 (27.8%)	 P=0.439
Ovisnost o transfuzijama	19/42 (45.2%)	10/23 (43.5%)	9/19 (47.4%)	P=0.801
Konstitucijski simptomi	25/43 (58.1%)	13/23 (56.5%)	12/20 (60%)	P=0.818
Leukociti ($x10^9$/L)	10.9 IKR (6 - 18.4)	9.6 IKR (5.8 - 16.9)	10.9 IKR (9 - 19.5)	P=0.551
≥1% blasta u perifernoj krvi	10/43 (23.3%)	5/23 (21.7%)	5/20 (25%)	P=1.000
Hemoglobin (g/L)	112.6 ±23.1	114.9 ±25	109.9 ±21	P=0.489

	Ukupno	Muškarci	Žene	P vrijednost
Trombociti ($x10^9$/L)	276 IKR (144.5 - 475)	276 IKR (130 - 527)	261 IKR (145.3 - 340)	P=0.511
LDH (U/L)	520 IKR (326 - 799)	518 IKR (395.5 - 831.3)	537 IKR (320.5 - 687)	P=0.666
Feritin (µg/L)	160 IKR (65.5 - 614.3)	109 IKR (79.5 - 461.5)	211 IKR (27 - 1975)	P=0.751
Saturacija transferina (%)	23.6 ±13.2	26.5 ±13	16.1 ±11.5	P=0.140
CRP (mg/L)	6.8 IKR (1.2 - 13.5)	7.8 IKR (1.7 - 16.2)	5.3 IKR (1.2 - 8.7)	P=0.603
Albumin (g/L)	41.7 ±4.9	43 ±4.6	40.1 ±4.9	**P=0.049***
RDW (%)	19.6 IKR (18.3 - 21.4)	19.2 IKR (18.2 - 19.9)	20.3 IKR (19.5 - 21.8)	**P=0.017***
MCV (fL)	87.9 IKR (81.4 - 92.3)	87.2 IKR (82.4 - 92.2)	89.4 IKR (78.7 - 92.4)	P=0.764
DIPSS kategorije				
Niski rizik	6/43 (14%)	3/23 (13%)	3/20 (15%)	P=0.464
Int-1 rizik	12/43 (27.9%)	8/23 (34.8%)	4/20 (20%)	
Int-2 rizik	21/43 (48.8%)	9/23 (39.1%)	12/20 (60%)	
Visoki rizik	4/43 (9.3%)	3/23 (13%)	1/20 (5%)	

*statistički značajno na razini P<0.05

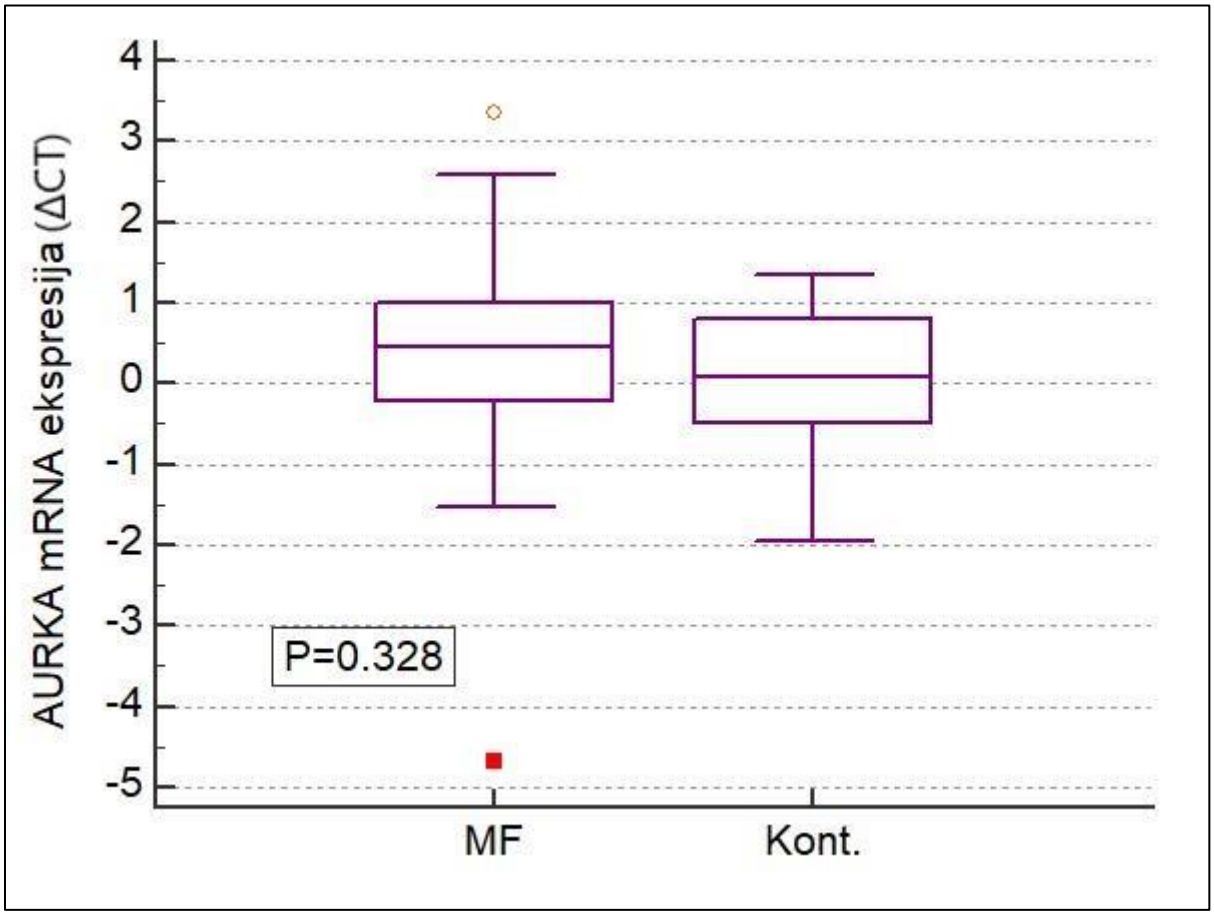
Ukupno 16 ispitanika umrlo je tijekom praćenja. Medijan preživljenja bio je 53 mjeseca, petogodišnja stopa preživljenja bila je 45%. Krivulja ukupnog preživljenja prikazana je na slici 22.



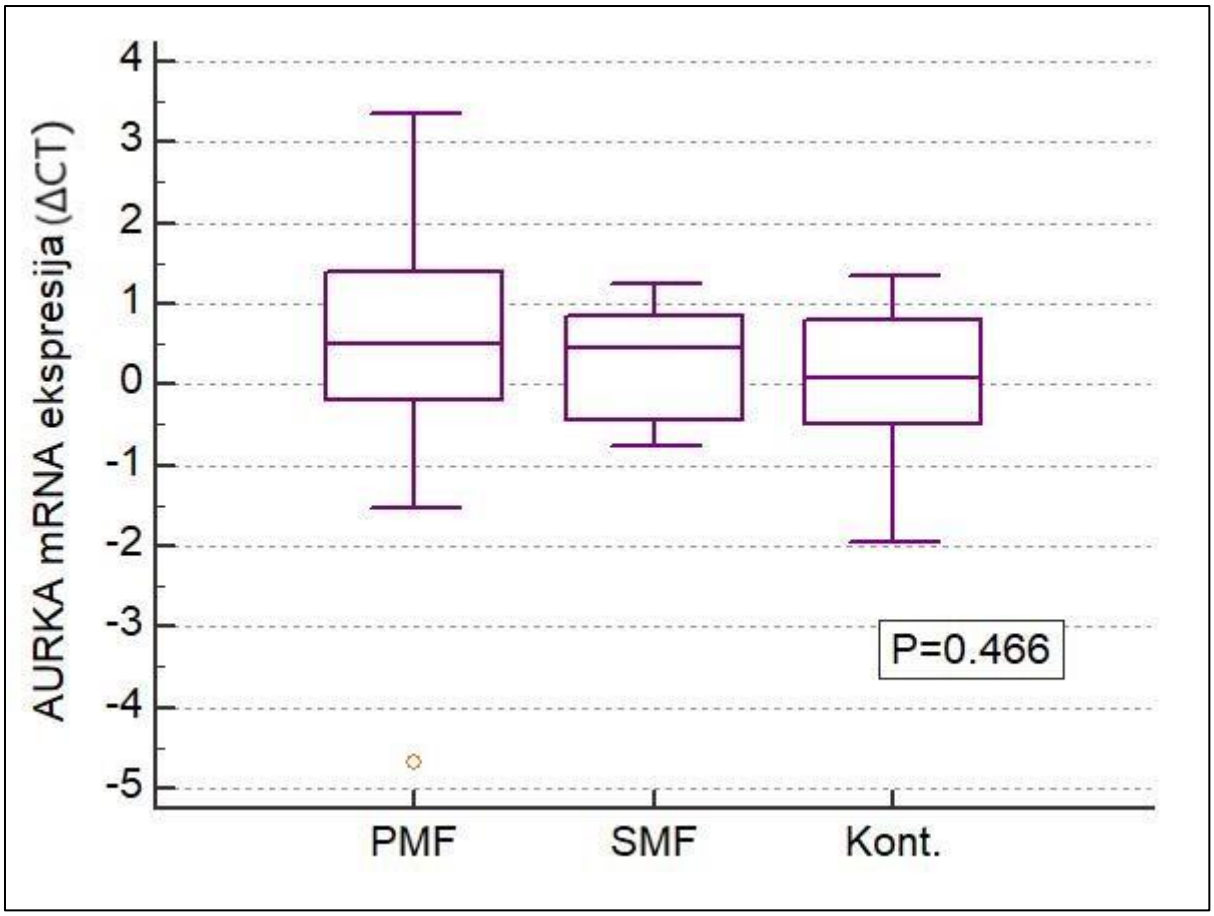
Slika 22: Krivulja ukupnog preživljenja s 95% intervalom pouzdanosti.

4.2. *AURKA*

Relativna ekspresija *AURKA* mRNA u koštanoj srži ispitanika s mijelofibrozom nije se razlikovala u odnosu na kontrolne ispitanike (medijan ΔCT 0.46 prema 0.07; P=0.328, slika 23). Nije bilo značajne razlike u *AURKA* mRNA ekspresiji između PMF, SMF i kontrolnih ispitanika (medijan ΔCT 0.49 prema 0.44 prema 0.07; P=0.466, slika 24).



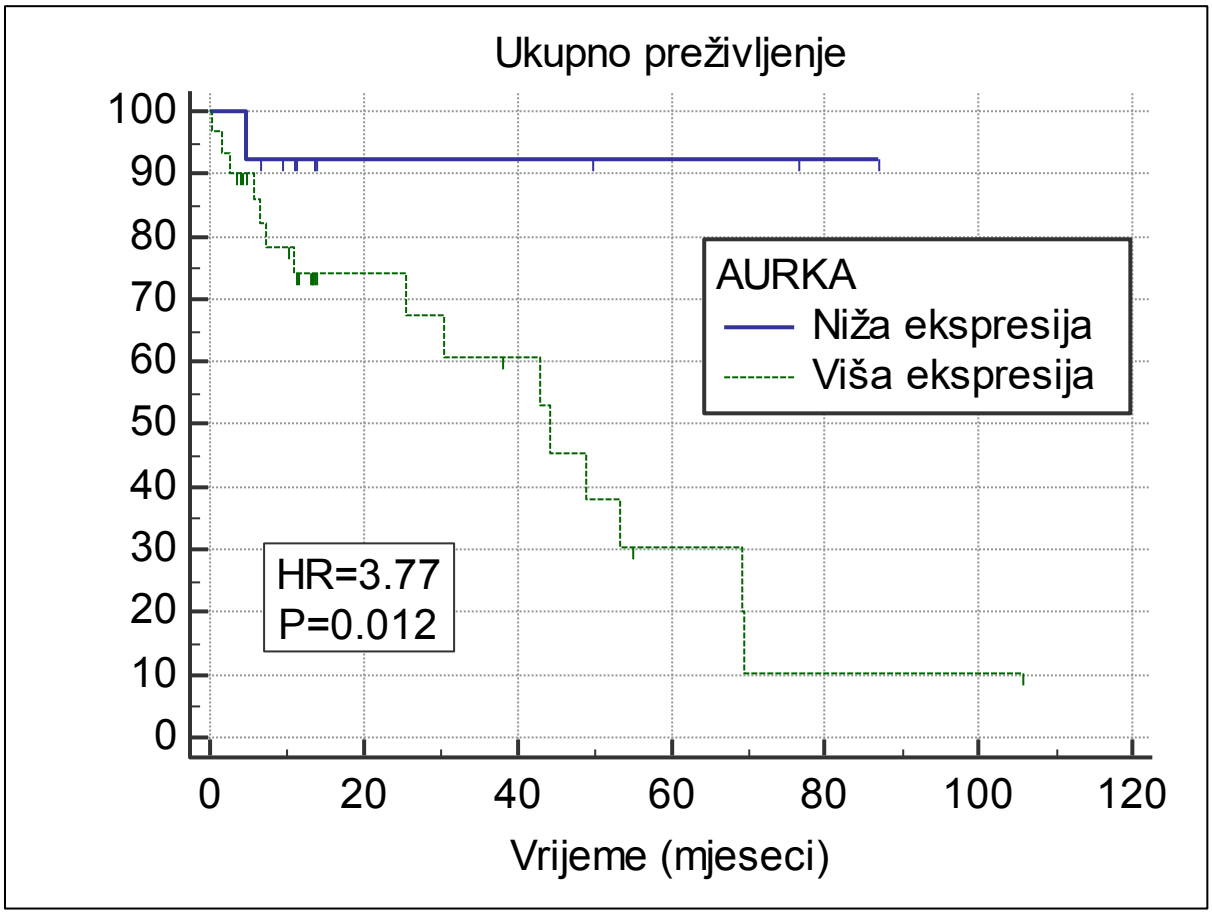
Slika 23: Relativna ekspresija *AURKA* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).



Slika 24: Relativna ekspresija *AURKA* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).

Analizom ROC krivulje određena je optimalna razina *AURKA* mRNA ekspresije za diskriminaciju preživljenja (kriterij ΔCT ≤0.9203). Ispitanika s višom *AURKA* mRNA ekspresijom (ΔCT ≤0.9203) bilo je 30/43 (69.8%), a ispitanika s nižom *AURKA* mRNA ekspresijom (ΔCT >0.9203) 13/43 (30.2%).

Ispitanici s višom *AURKA* ekspresijom imali su značajno kraće ukupno preživljenje nego ispitanici s nižom *AURKA* ekspresijom (HR=3.77; P=0.012, slika 25). Medijan preživljenja nije postignut u ispitanika s nižom, a bio je 44 mjeseca u ispitanika s višom *AURKA* mRNA ekspresijom. Petogodišnje stope preživljenja bile su 90% i 30% za ispitanike s nižom i višom *AURKA* mRNA ekspresijom.



Slika 25: Ukupno preživljenje u bolesnika s višom i nižom *AURKA* mRNA ekspresijom.

AURKA mRNA ekspresija mjerena kao kontinuirana varijabla nije se značajno razlikovala u odnosu na praćene pokazatelje: spol (P=0.981), stupanj fibroze koštane srži (P=0.899), *JAK2* status (P=0.633), *CALR* status (P=0.433), *MPL* status (P=0.132), DIPSS kategorije (P=0.960), prisustvo konstitucijskih simptoma (P=0.460), ovisnost o transfuzijama (P=0.411), blastnu transformaciju bolesti (P=0.962), prisustvo masivne splenomegalije (P=0.149), dob (P=0.483), razinu hemoglobina (P=0.619), broj leukocita (P=0.124), prisustvo cirkulirajućih blasta (P=0.931), broj trombocita (P=0.914), LDH (P=0.534), veličinu jetre (P=0.650), veličinu slezene (P=0.157), MCV (P=0.315), RDW (P=0.719), CRP (P=0.749), željezo u serumu (P=0.703), TIBC (P=0.897), saturaciju transferina (P=0.789), feritin (P=0.673), albumine (P=0.797), apsolutni broj neutrofila (P=0.213), apsolutni broj limfocita (P=0.792), apsolutni broj monocita (P=0.231), apsolutni broj bazofila (P=0.646), MPV (P=0.826) (tablica 4). *AURKA* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije prikazana je na slici 26.

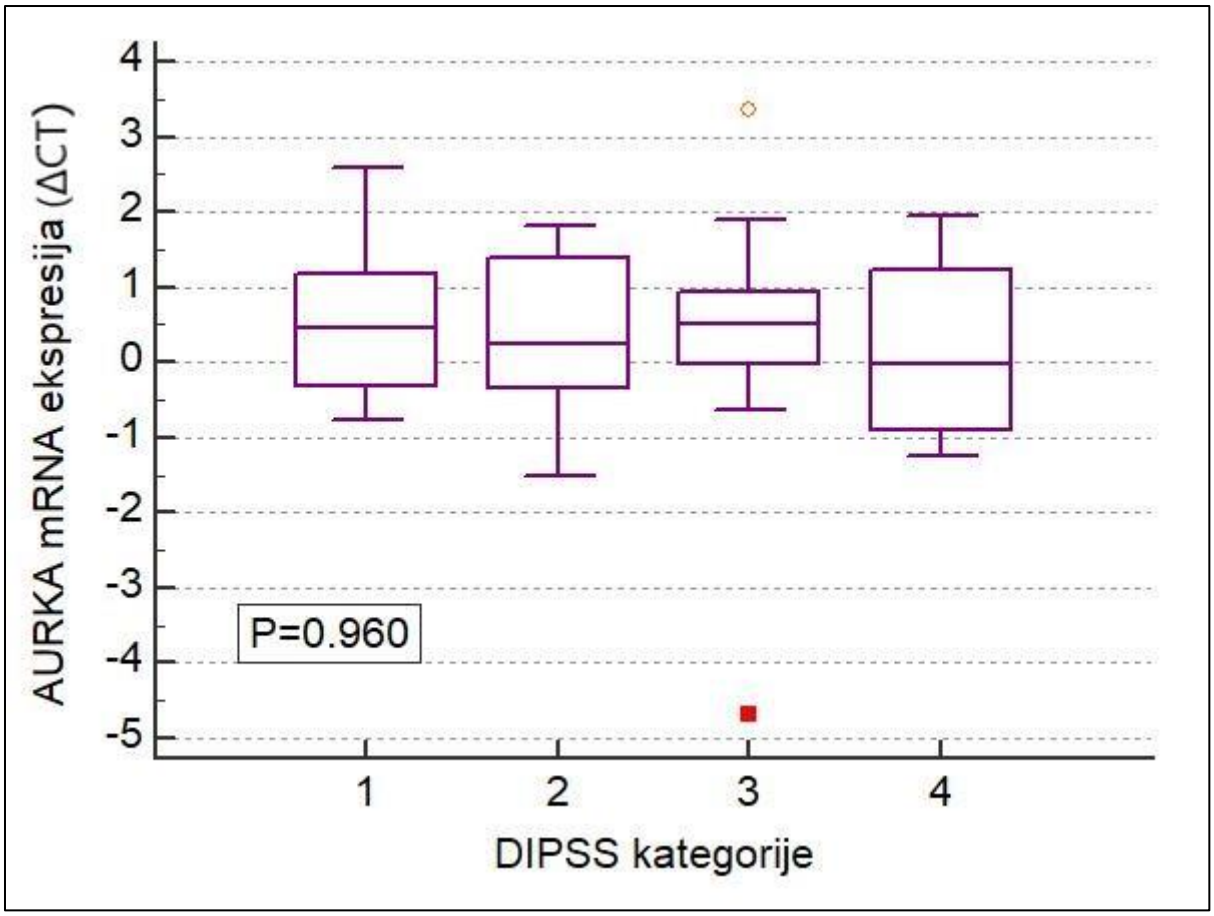
U usporedbi ispitanika s višom i nižom *AURKA* mRNA ekspresijom podijeljenih prema kriteriju za diskriminaciju preživljenja ($\Delta CT \leq 0.9203$ za višu ekspresiju) jedina statistički značajna razlika je u apsolutnom broj monocita (medijan 0.48 $x10^9$/L prema 0.21 $x10^9$/L; P=0.024, slika 27).

Tablica 4: povezanost *AURKA, BORA, PLK1* i *CDC25c* mRNA ekspresije mjerene kao kontinuirana varijabla s praćenim pokazateljima.

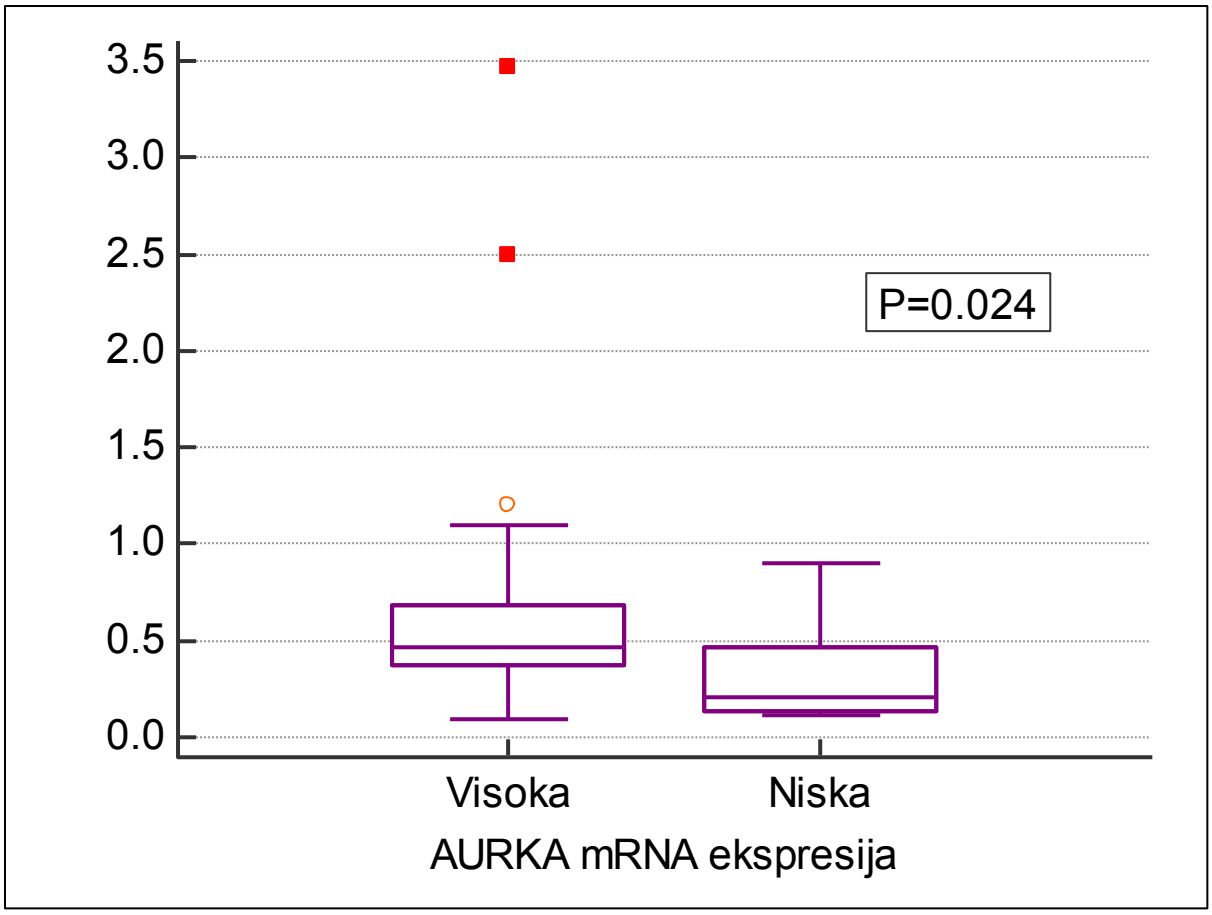
	AURKA	***BORA***	***PLK1***	***CDC25c***
Spol	P=0.981	P=0.408	P=0.559	P=0.420
Stupanj fibroze koštane srži	P=0.899	P=0.464	P=0.678	P=0.632
***JAK2* status**	P=0.633	P=0.765	P=0.438	P=0.915
***CALR* status**	P=0.433	P=0.296	P=0.327	P=0.140
***MPL* status**	P=0.132	P=0.158	P=0.111	P=0.399
DIPSS kategorije	P=0.960	P=0.922	P=0.942	P=0.703
Konstitucijski simptomi	P=0.460	**P=0.049 ↓**	P=0.658	P=0.127
Ovisnost o transfuzijama	P=0.411	P=0.126	P=0.411	P=0.229
Blastna transformacija	P=0.962	P=0.294	P=0.600	P=0.449
Dob	P=0.483	P=0.455	P=0.230	P=0.412
Masivna splenomegalija	P=0.149	P=0.840	P=0.083	P=0.917
Razina hemoglobina	P=0.619	P=0.884	P=0.879	P=0.427
Broj leukocita	P=0.124	P=0.388	P=0.073	**Rho=-0.37; P=0.017 ↑**
Cirkulirajući blasti	P=0.931	**P=0.047 ↓**	P=0.863	P=0.408
Broj trombocita	P=0.914	P=0.378	P=0.189	P=0.213
LDH	P=0.534	P=0.346	P=0.921	P=0.251
Veličina jetre	P=0.650	P=0.087	P=0.655	**Rho=-0.36; P=0.022 ↑**
Veličina slezene	P=0.157	P=0.559	P=0.203	P=0.821

MCV	P=0.315	P=0.359	P=0.101	P=0.722
RDW	P=0.719	P=0.602	P=0.306	P=0.539
CRP	P=0.749	P=0.378	P=0.952	P=0.406
Željezo u serumu	P=0.703	P=0.993	P=0.731	P=0.776
TIBC	P=0.897	P=0.960	P=0.410	P=0.543
Saturacija transferina	P=0.789	P=0.681	P=0.749	P=0.624
Feritin	P=0.673	P=0.574	P=0.928	P=0.547
Albumin	P=0.797	P=0.333	P=0.299	P=0.975
Apsolutni broj neutrofila	P=0.213	P=0.637	P=0.206	P=0.054
Apsolutni broj limfocita	P=0.792	P=0.360	P=0.895	P=0.946
Apsolutni broj monocita	P=0.231	P=0.106	P=0.492	P=0.083
Apsolutni broj bazofila	P=0.646	P=0.064	P=0.975	**Rho=-0.39; P=0.012 ↑**
Apsolutni broj eozinofila	P=0.492	P=0.637	P=0.768	**Rho=-0.38; P=0.013 ↑**
MPV	P=0.826	P=0.390	P=0.162	P=0.237

* ↑ - označava pozitivnu korelaciju; ↓ označava negativnu korelaciju.



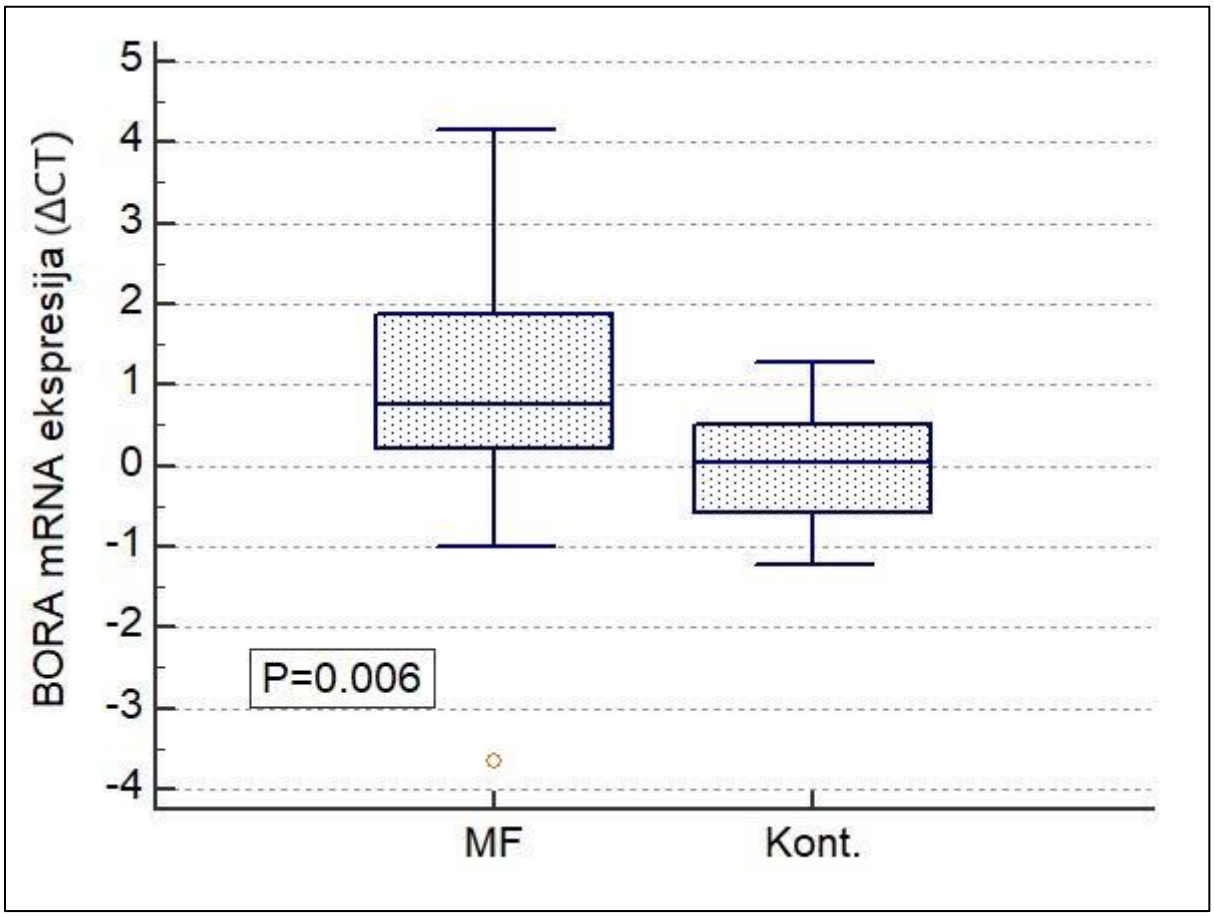
Slika 26: *AURKA* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije (1=niski rizik; 2=int-1 rizik; 3=int-2 rizik; 4=visoki rizik).



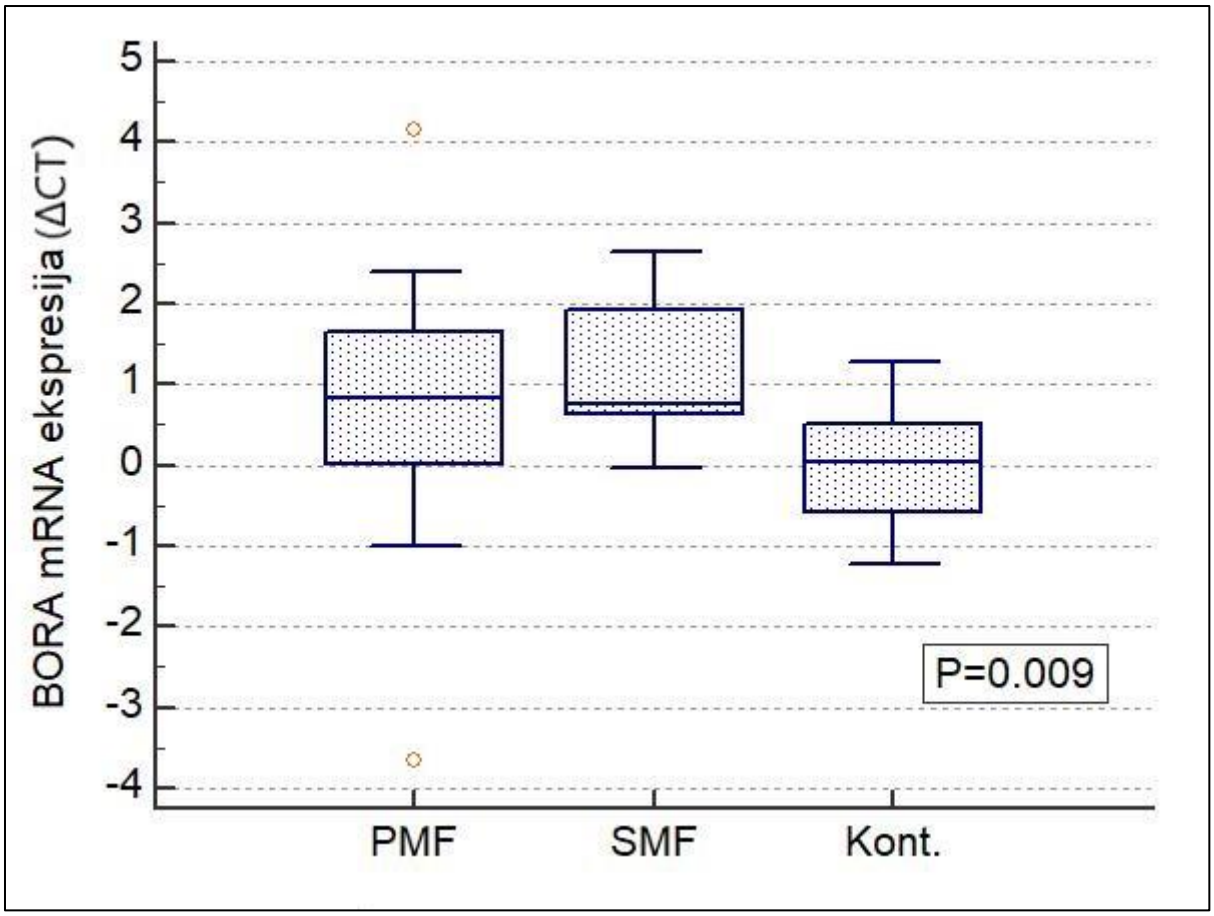
Slika 27: apsolutni broj monocita s obzirom na visoki ili niski izražaj *AURKA* mRNA.

4.3. *BORA*

Relativna ekspresija *BORA* mRNA u koštanoj srži ispitanika s mijelofibrozom bila je statistički značajno niža u odnosu na kontrolne ispitanike (medijan ΔCT 0.77 prema 0.04; P=0.006, slika 28). Ispitanici s PMF i SMF imali su nižu *BORA* mRNA ekspresiju u odnosu na kontrolne ispitanike, dok nije bilo statistički značajne razlike između PMF i SMF (medijan ΔCT 0.84 prema 0.77 prema 0.04; P=0.009, slika 29).

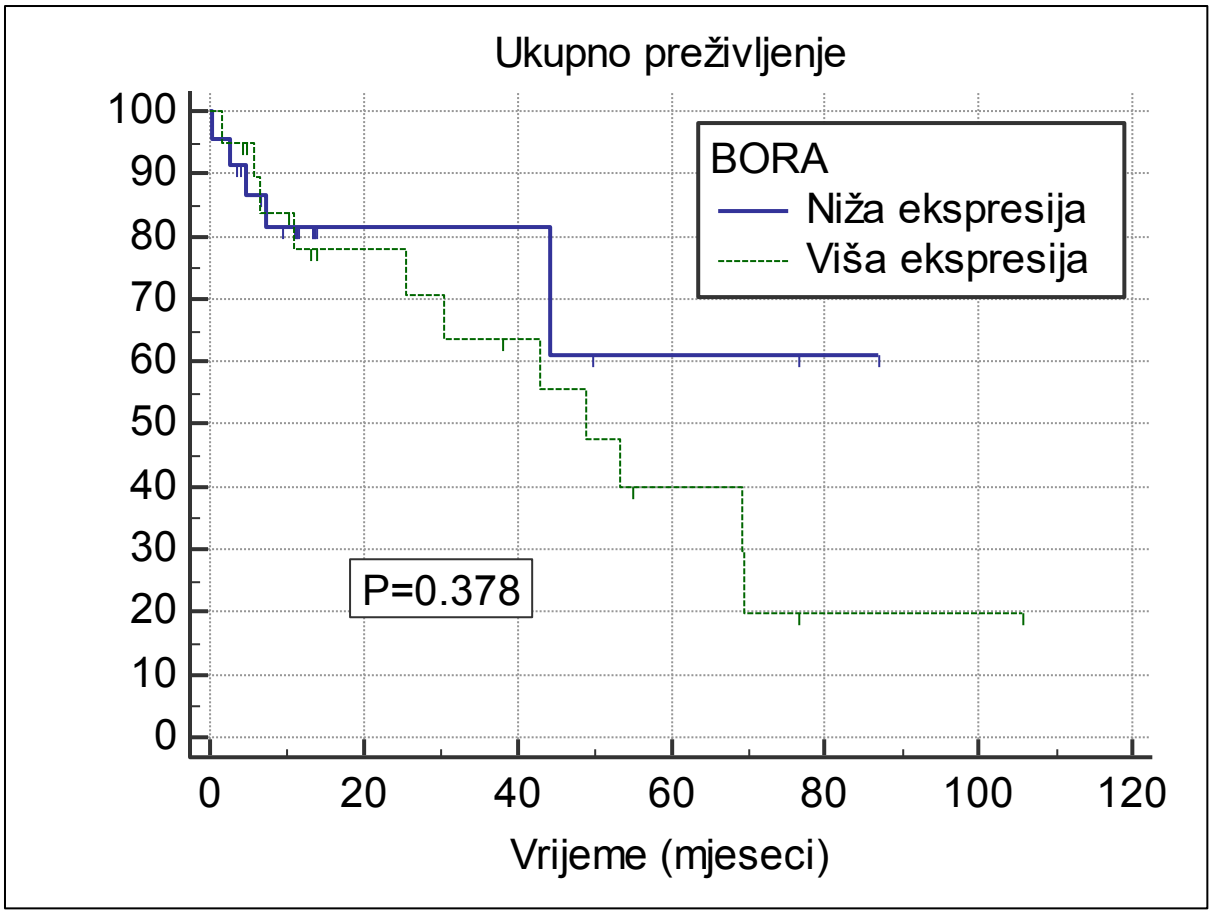


Slika 28: Relativna ekspresija *BORA* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).



Slika 29: Relativna ekspresija *BORA* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).

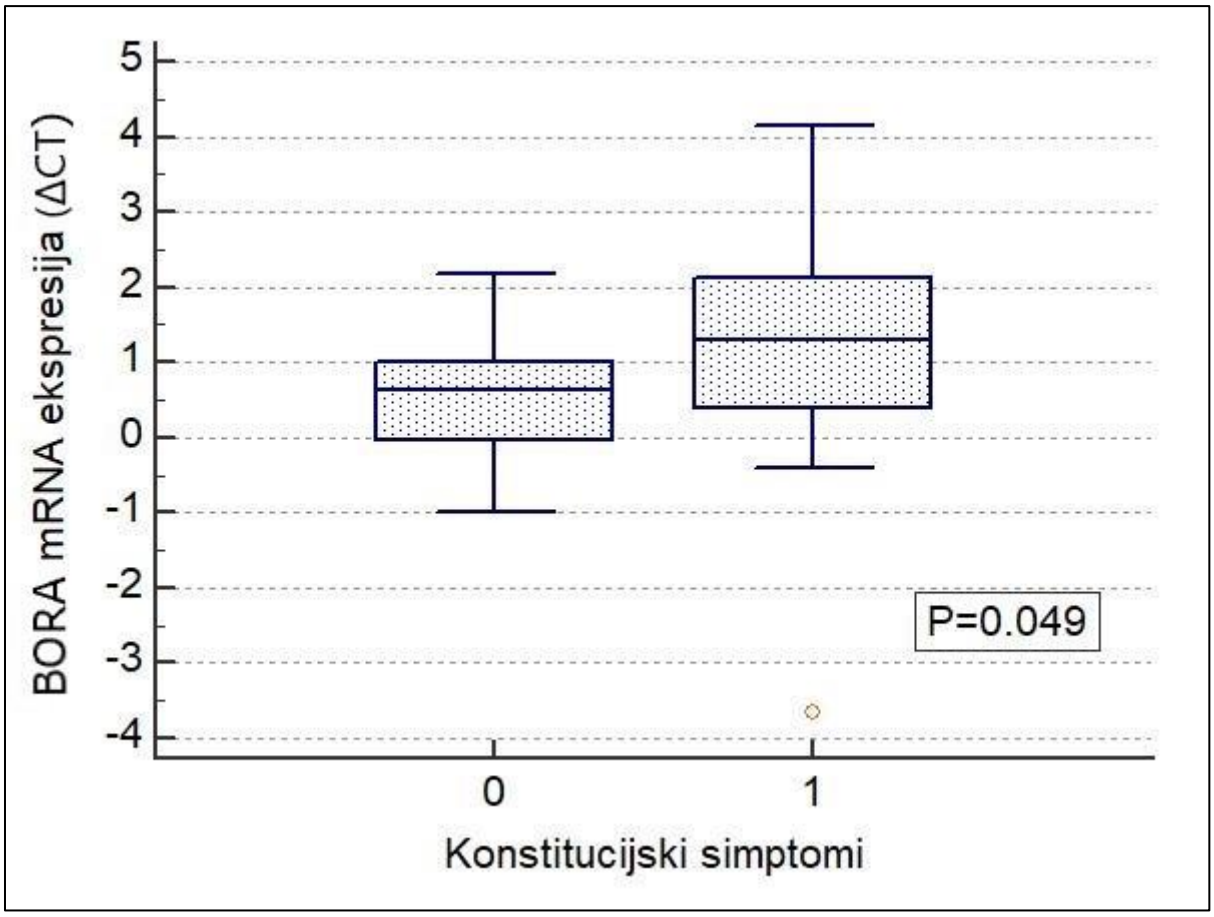
Analizom ROC krivulje određena je optimalna razina *BORA* mRNA ekspresije za diskriminaciju preživljenja (kriterij ΔCT ≤0.6861). Ispitanika s višom *BORA* mRNA ekspresijom (ΔCT ≤0.6861) bilo je 20/43 (46.5%), a ispitanika s nižom *BORA* mRNA ekspresijom (ΔCT >0.6861) 23/43 (53.5%). Nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju između ovih skupina bolesnika (P=0.378, slika 30). Nije bilo statistički značajne povezanosti s ukupnim preživljenjem ni na drugim testiranim graničnim vrijednostima *BORA* mRNA ekspresije [medijan *BORA* mRNA ekspresije u oboljelih od mijelofibroze (kriterij ΔCT >0.77); optimalna granična vrijednost *BORA* mRNA ekspresije za diskriminaciju oboljelih od kontrola (ΔCT >0.5835); P>0.05 za obje analize].



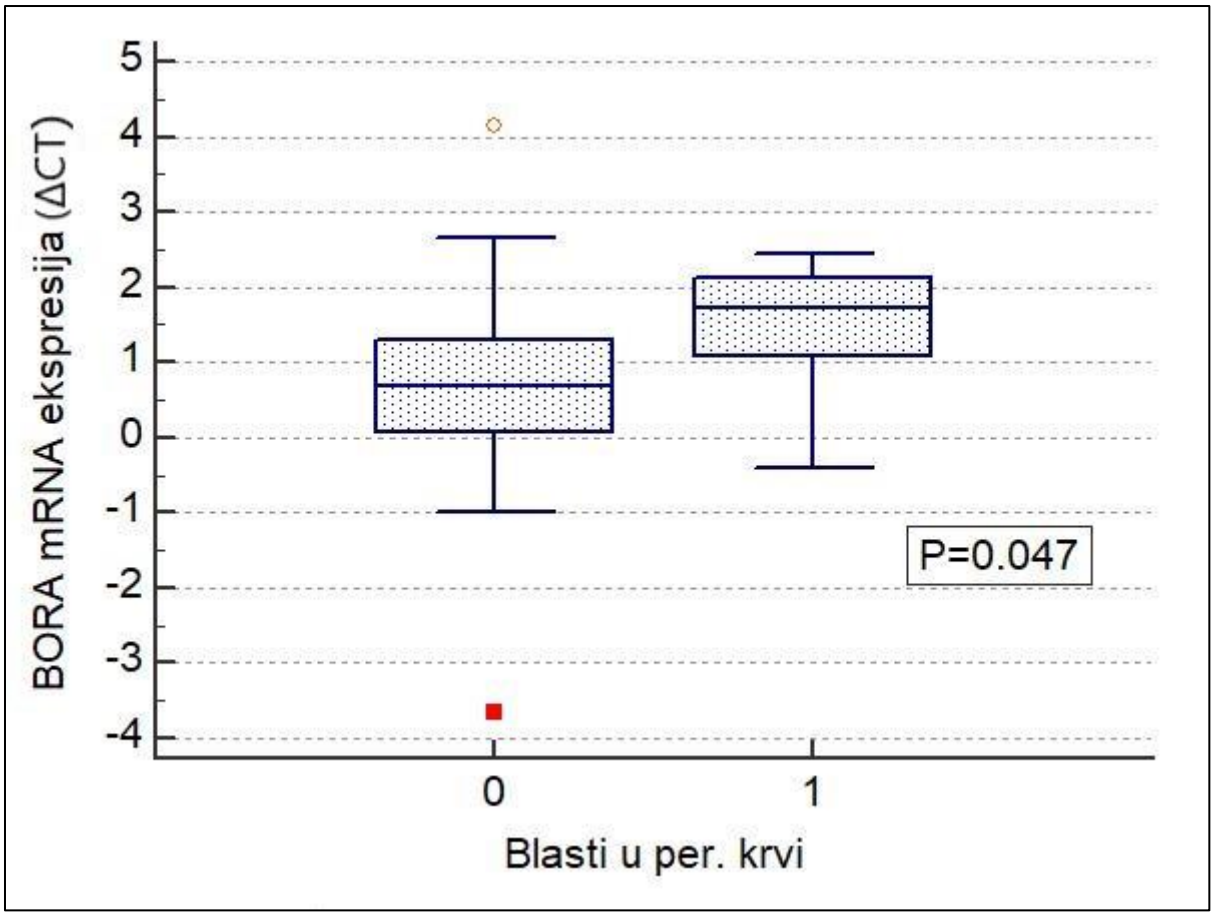
Slika 30: ukupno preživljenje u bolesnika s višom i nižom *BORA* mRNA ekspresijom.

Viša *BORA* mRNA ekspresija mjerena kao kontinuirana varijabla povezana je s odsustvom konstitucijskih simptoma (medijan ΔCT 1.29 prema 0.64; P=0.049, slika 31) i odsustvom cirkulirajućih blasta (medijan ΔCT 1.73 prema 0.69; P=0.047, slika 32). *BORA* mRNA ekspresija mjerena kao kontinuirana varijabla nije se značajno razlikovala u odnosu na praćene pokazatelje: blastnu transformaciju bolesti (P=0.294), spol (P=0.408), *JAK2* status (P=0.765), *CALR* status (P=0.296), *MPL* status (P=0.158), ovisnost o transfuzijama (P=0.126), prisustvo masivne splenomegalije (P=0.840), stupanj fibroze koštane srži (P=0.464), DIPSS kategorije (P=0.922), dob (P=0.455), hemoglobin (P=0.884), leukocite (P=0.388), trombocite (P=0.378), LDH (P=0.346), veličinu jetre (P=0.087), veličinu slezene (P=0.559), MCV (P=0.359), RDW (P=0.602), CRP (P=0.378), željezo u krvi (P=0.993), TIBC (P=0.960), saturaciju transferina (P=0.681), feritin (P=0.574), apsolutni broj neutrofila (P=0.637), apsolutni broj limfocita (P=0.360), apsolutni broj monocita (P=0.106), apsolutni broj bazofila (P=0.064), MPV (P=0.390), albumine (P=0.333) (tablica 4). *BORA* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije prikazana je na slici 33.

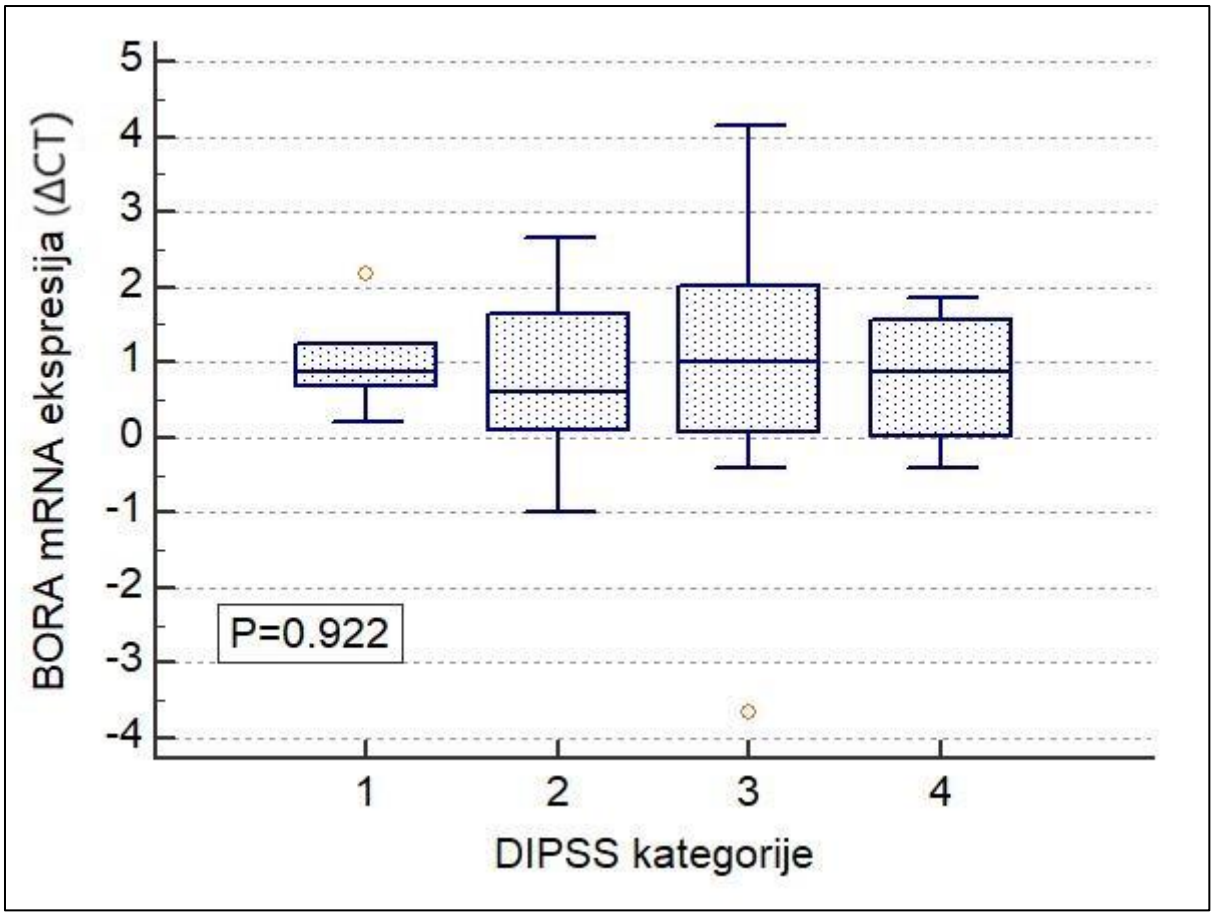
U usporedbi ispitanika s višom i nižom *BORA* mRNA ekspresijom podijeljenih prema kriteriju za diskriminaciju oboljelih od kontrola (ΔCT >0.5835 za nižu ekspresiju) statistički značajna razlika je u apsolutnom broju monocita (medijan 0.55 x10^9/L prema 0.38 x10^9/L; P=0.040, slika 34) i apsolutnom broju eozinofila (medijan 0.35 x10^9/L prema 0.1 x10^9/L; P=0.016, slika 35).



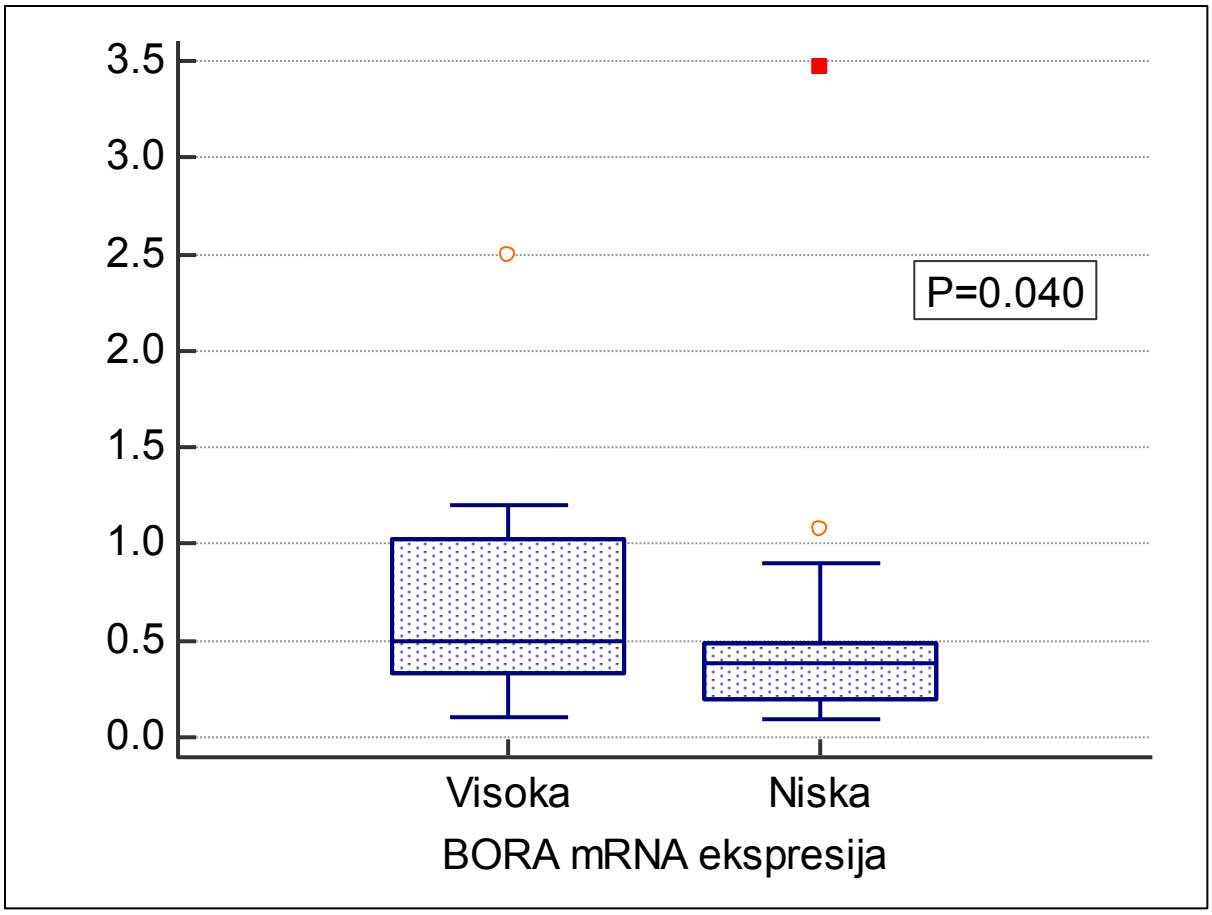
Slika 31: Relativna ekspresija *BORA* mRNA u odnosu na konstitucijske simptome.



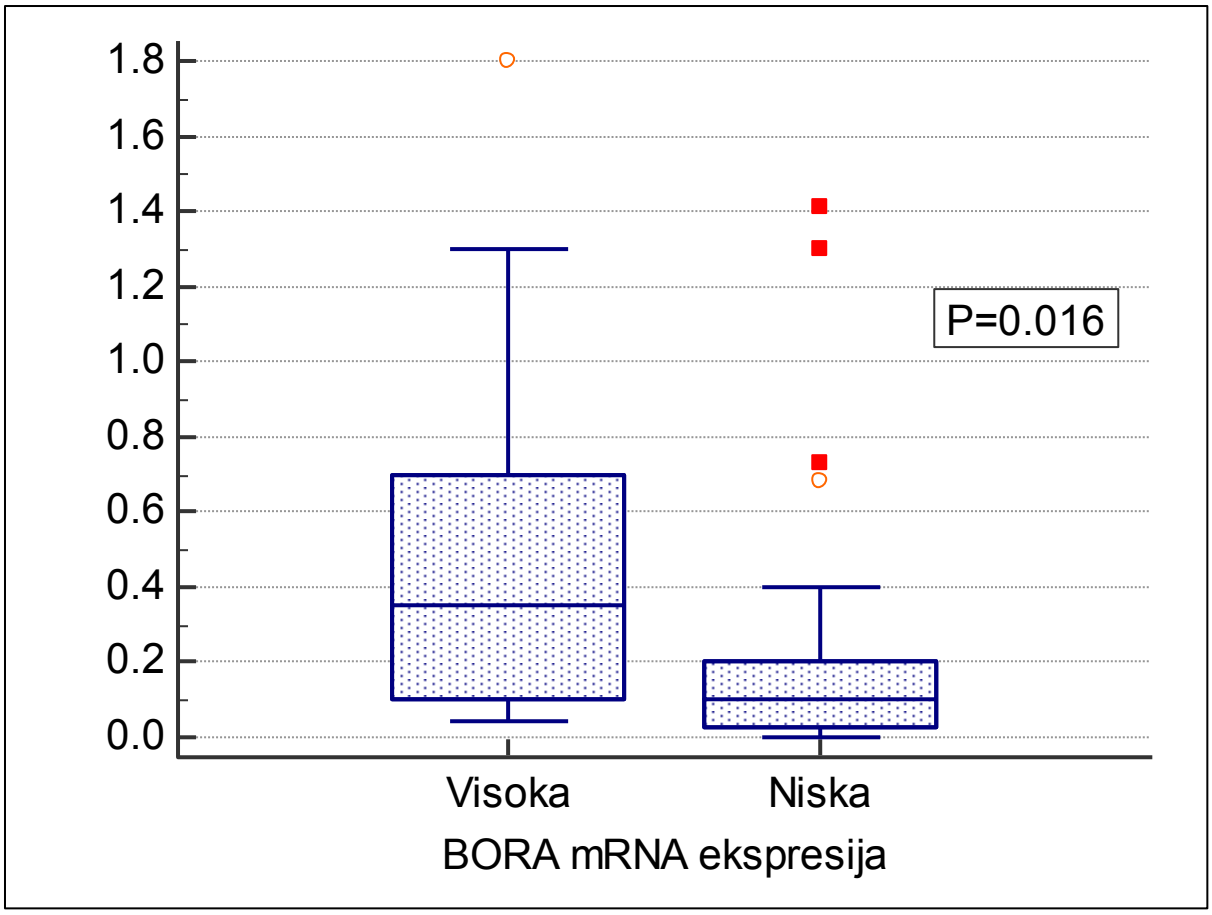
Slika 32: Relativna ekspresija *BORA* mRNA u odnosu na cirkulirajuće blaste.



Slika 33: *BORA* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije (1=niski rizik; 2=int-1 rizik; 3=int-2 rizik; 4=visoki rizik).



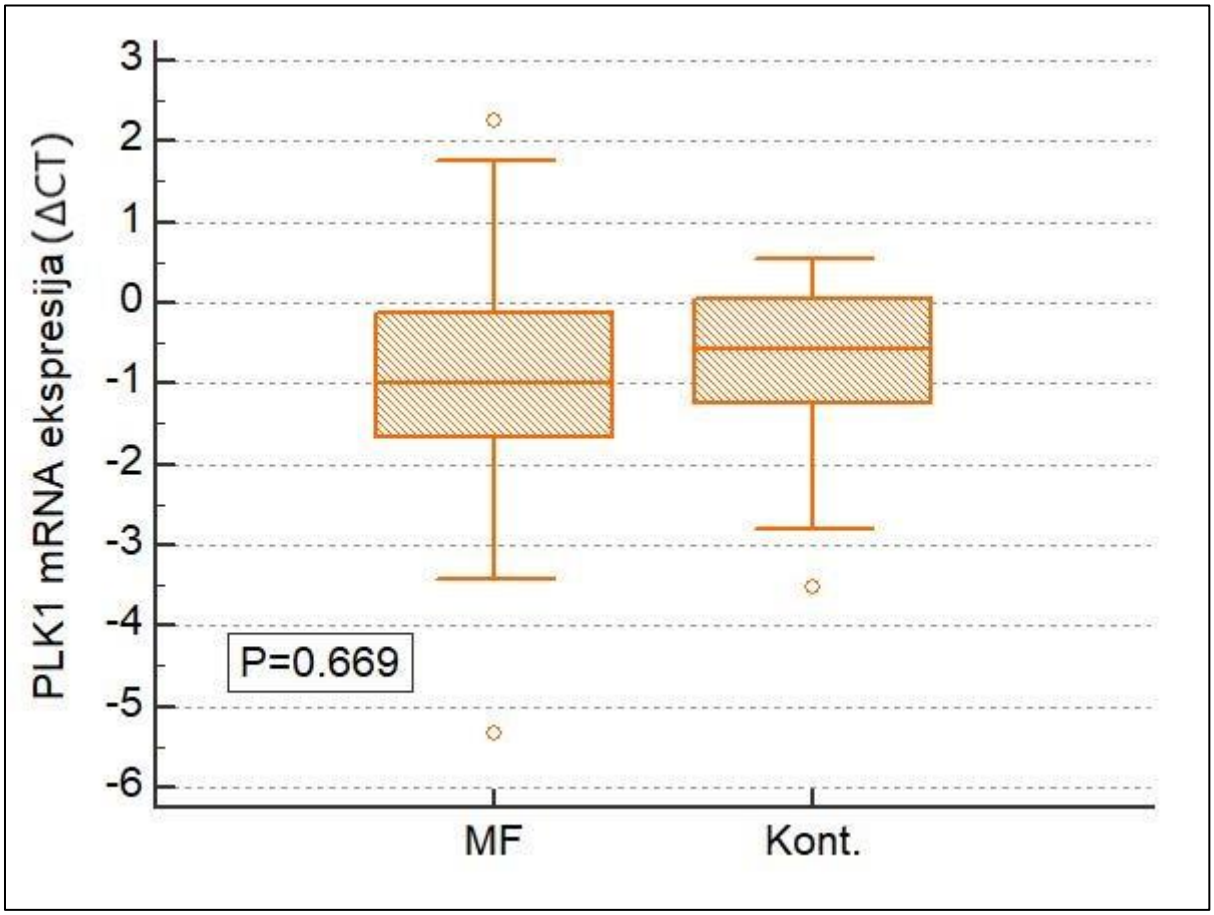
Slika 34: apsolutni broj monocita u odnosu na razinu *BORA* mRNA ekspresije.



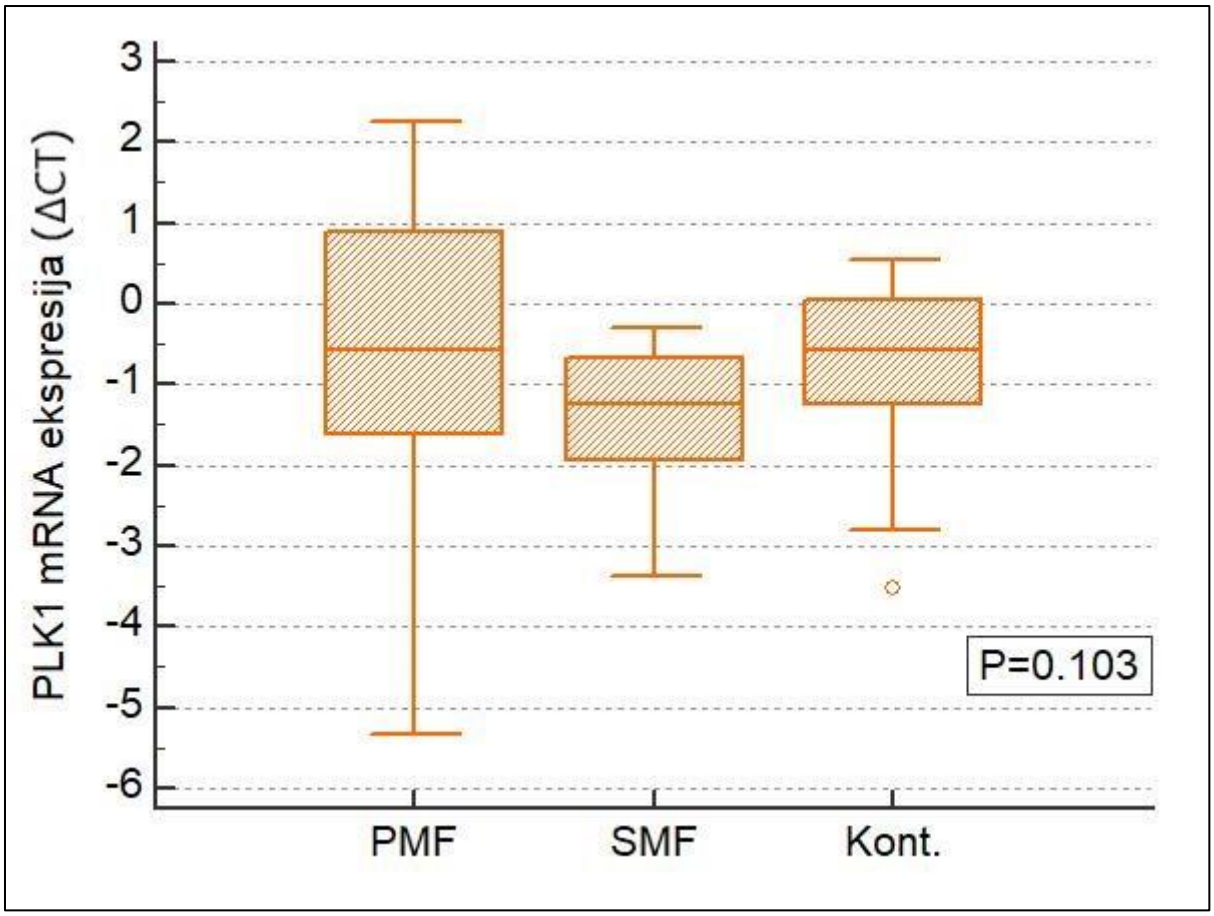
Slika 35: apsolutni broj eozinofila u odnosu na razinu *BORA* mRNA ekspresije.

4.4. *PLK1*

Relativna ekspresija *PLK1* mRNA u koštanoj srži ispitanika s mijelofibrozom nije se razlikovala u odnosu na kontrolne ispitanike (medijan ΔCT -0.98 prema -0.56; P=0.669, slika 36). Nije bilo značajne razlike u *PLK1* mRNA ekspresiji između PMF, SMF i kontrolnih ispitanika (medijan ΔCT -0.58 prema -1.23 prema -0.56; P=0.103, slika 37).



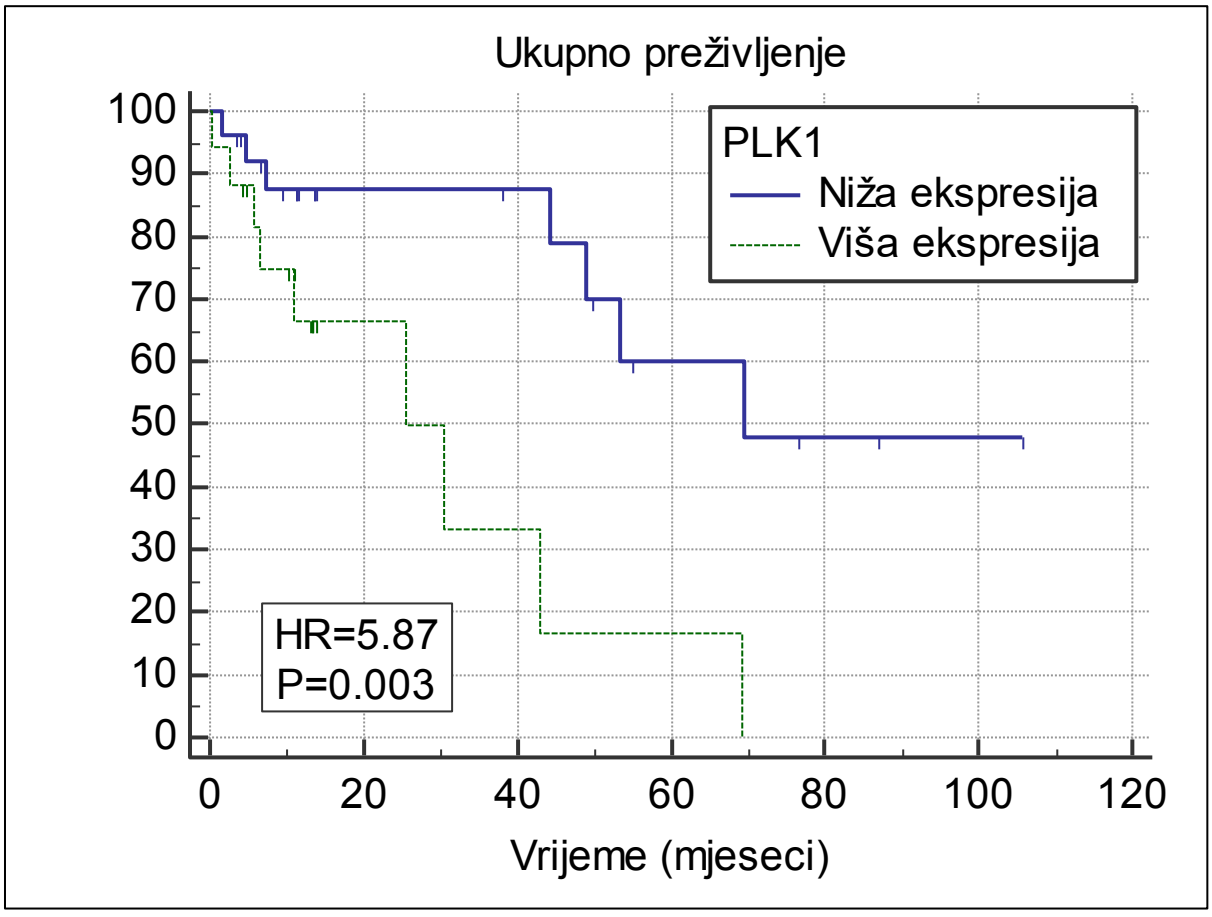
Slika 36: Relativna ekspresija *PLK1* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).



Slika 37: Relativna ekspresija *PLK1* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).

Analizom ROC krivulje određena je optimalna razina *PLK1* mRNA ekspresije za diskriminaciju preživljenja (kriterij ΔCT ≤-1.2342). Ispitanika s višom *PLK1* mRNA ekspresijom (ΔCT ≤-1.2342) bilo je 17/43 (39.5%), a ispitanika s nižom *PLK1* mRNA ekspresijom (ΔCT >-1.2342) 26/43 (60.5%).

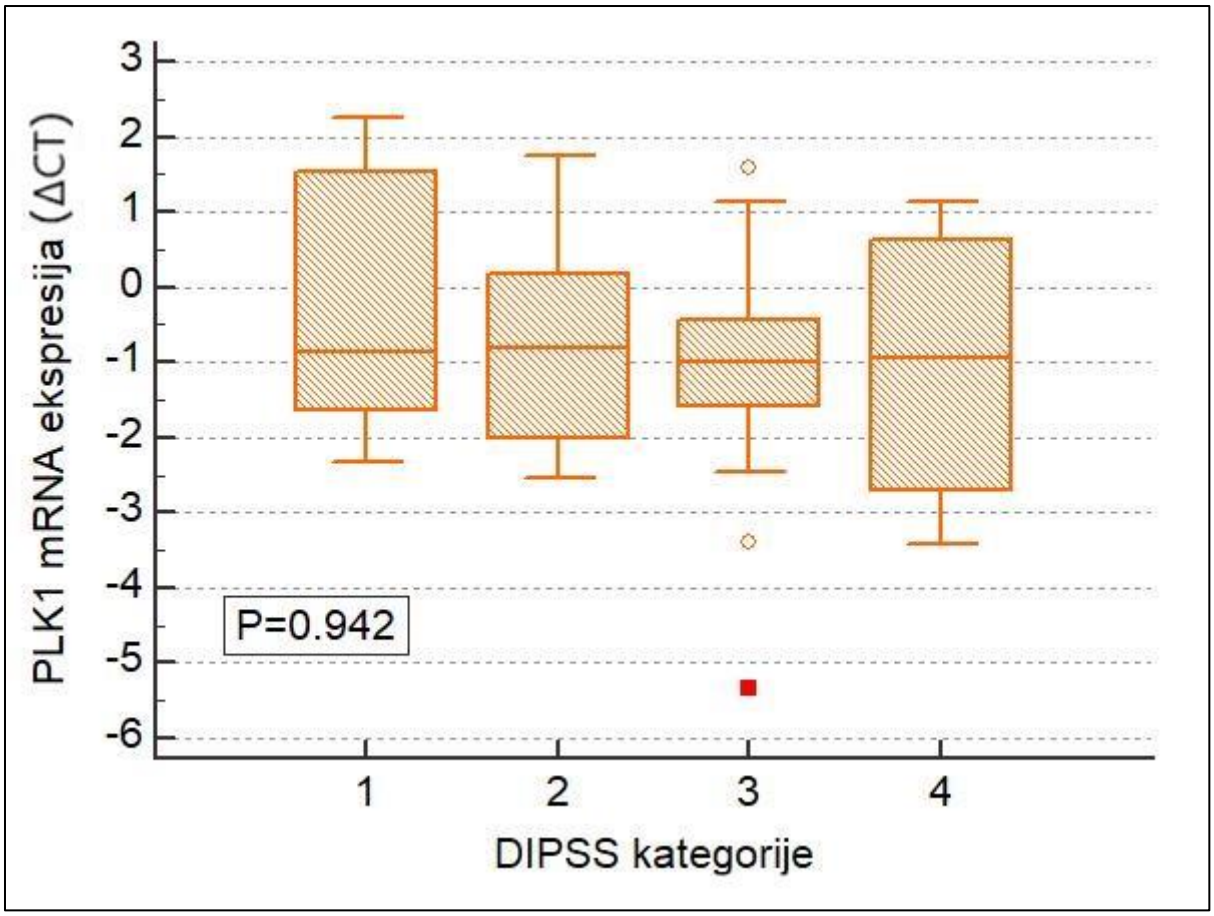
Ispitanici s višom *PLK1* ekspresijom imali su značajno kraće ukupno preživljenje nego ispitanici s nižom *PLK1* ekspresijom (HR=5.87; P=0.003, slika 38). Medijan preživljenja bio je 70 mjeseci u ispitanika s nižom, a 25 mjeseci u bolesnika s višom *PLK1* mRNA ekspresijom. Petogodišnje stope preživljenja bile su 60% i 17% za ispitanike s nižom i višom *PLK1* mRNA ekspresijom.



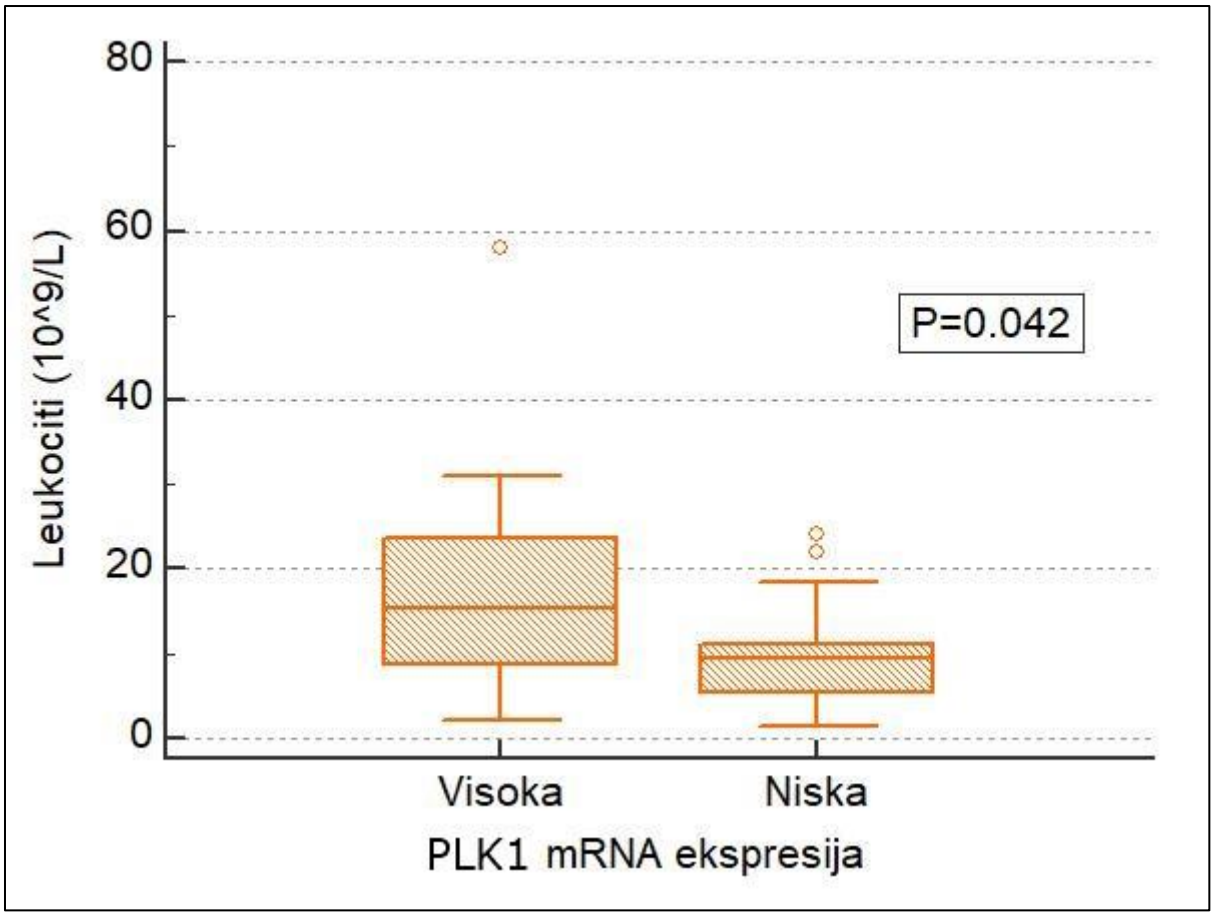
Slika 38: ukupno preživljenje u bolesnika s višom i nižom *PLK1* mRNA ekspresijom.

PLK1 mRNA mjerena kao kontinuirana varijabla nije se značajno razlikovala u odnosu na praćene pokazatelje: spol (P=0.559), blastnu transformaciju bolesti (P=0.600), *JAK2* status (P=0.438), *CALR* status (P=0.327), *MPL* status (P=0.111), prisustvo B simptoma (P=0.658), ovisnost o transfuziji (P=0.411), prisustvo masivne splenomegalije (P=0.083), stupanj fibroze koštane srži (P=0.678), DIPSS kategorije (P=0.942), prisustvo cirkulirajućih blasta (P=0.863), dob (P=0.230), hemoglobin (P=0.879), leukocite (P=0.073), trombocite (P=0.189), LDH (P=0.921), veličinu jetre (P=0.655), veličinu slezene (P=0.203), MCV (P=0.101), RDW (P=0.306), CRP (P=0.952), željezo u krvi (P=0.731), TIBC (P=0.410), saturaciju transferina (P=0.749), feritin (P=0.928), apsolutni broj neutrofila (P=0.206), apsolutni broj limfocita (P=0.895), apsolutni broj monocita (P=0.492), apsolutni broj bazofila (P=0.975), apsolutni broj eozinofila (P=0.768), MPV (P=0.162), albumine (P=0.299) (tablica 4). *PLK1* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije prikazana je na slici 39.

U usporedbi ispitanika s višom i nižom *PLK1* mRNA ekspresijom podijeljenih prema kriteriju za diskriminaciju preživljenja ($\Delta CT \leq -1.2342$ za višu ekspresiju) jedina statistički značajna razlika je u ukupnom broju leukocita (medijan 15.4 $x10^9$/L prema 9.5 $x10^9$/L; P=0.042, slika 40).



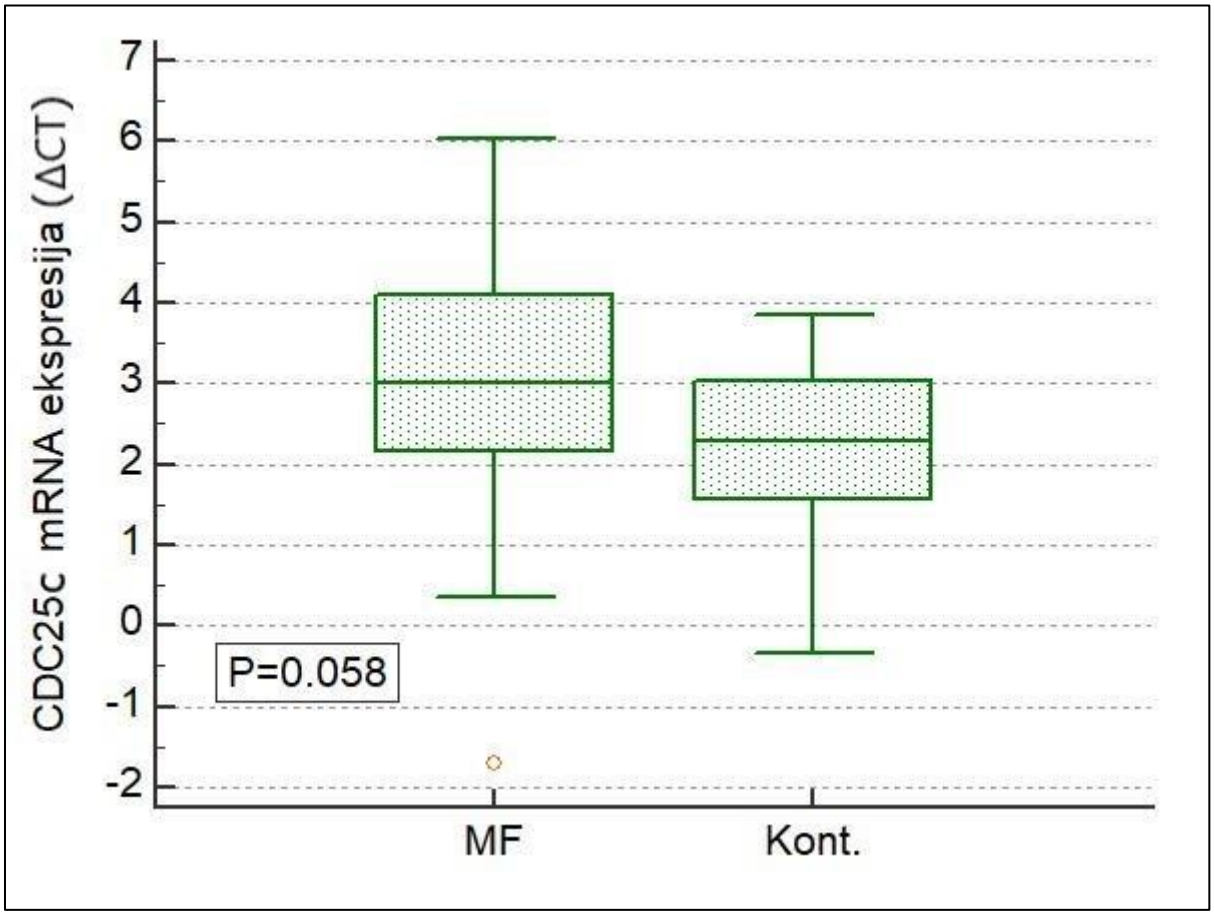
Slika 39: *PLK1* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije (1=niski rizik; 2=int-1 rizik; 3=int-2 rizik; 4=visoki rizik).



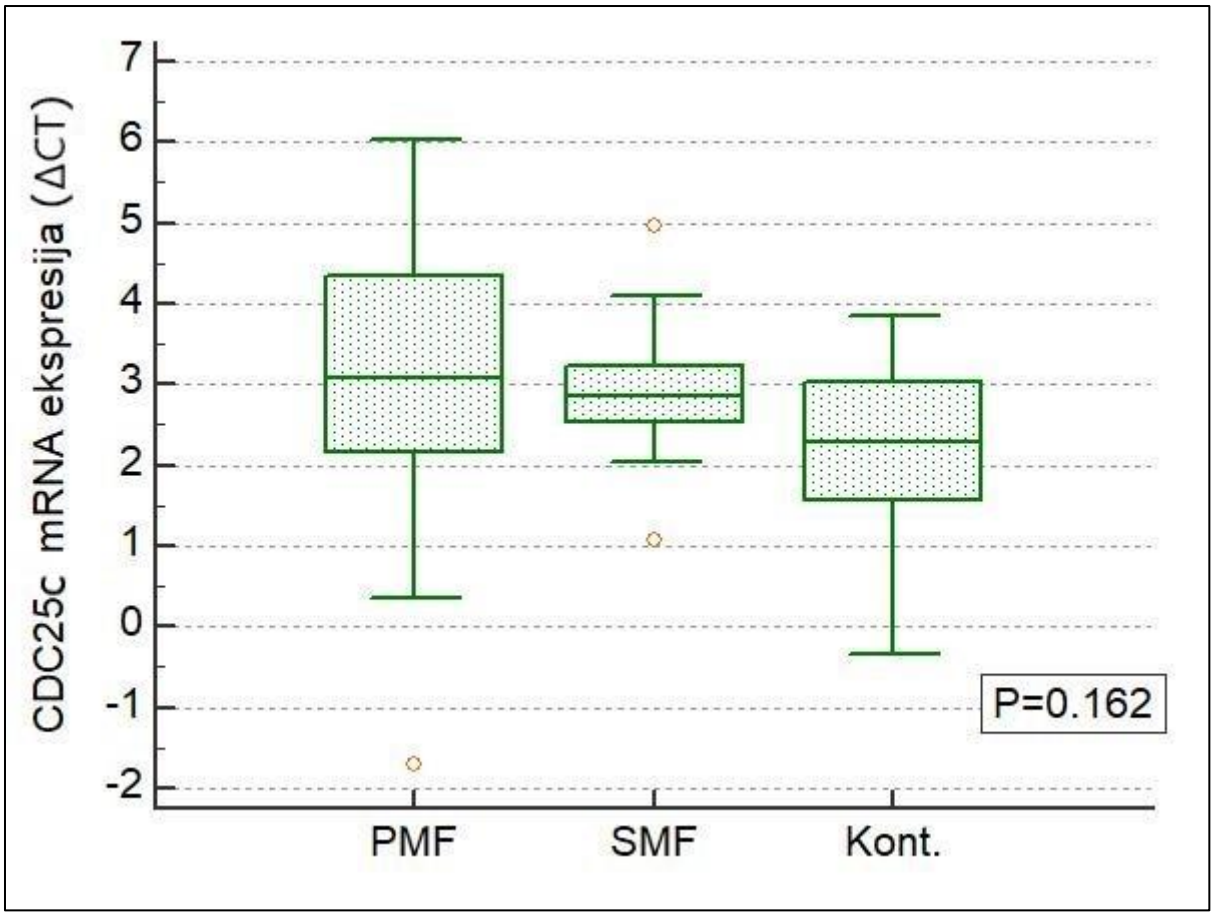
Slika 40: Broj leukocita u odnosu na razinu *PLK1* mRNA ekspresije.

4.5. *CDC25c*

Relativna ekspresija *CDC25c* mRNA u koštanoj srži ispitanika s mijelofibrozom nije se razlikovala u odnosu na kontrolne ispitanike (medijan ΔCT 3.0 prema 2.29; P=0.058, slika 41). Nije bilo značajne razlike u *CDC25c* mRNA ekspresiji između PMF, SMF i kontrolnih ispitanika (medijan ΔCT 3.08 prema 2.86 prema 2.29; P=0.162, slika 42).



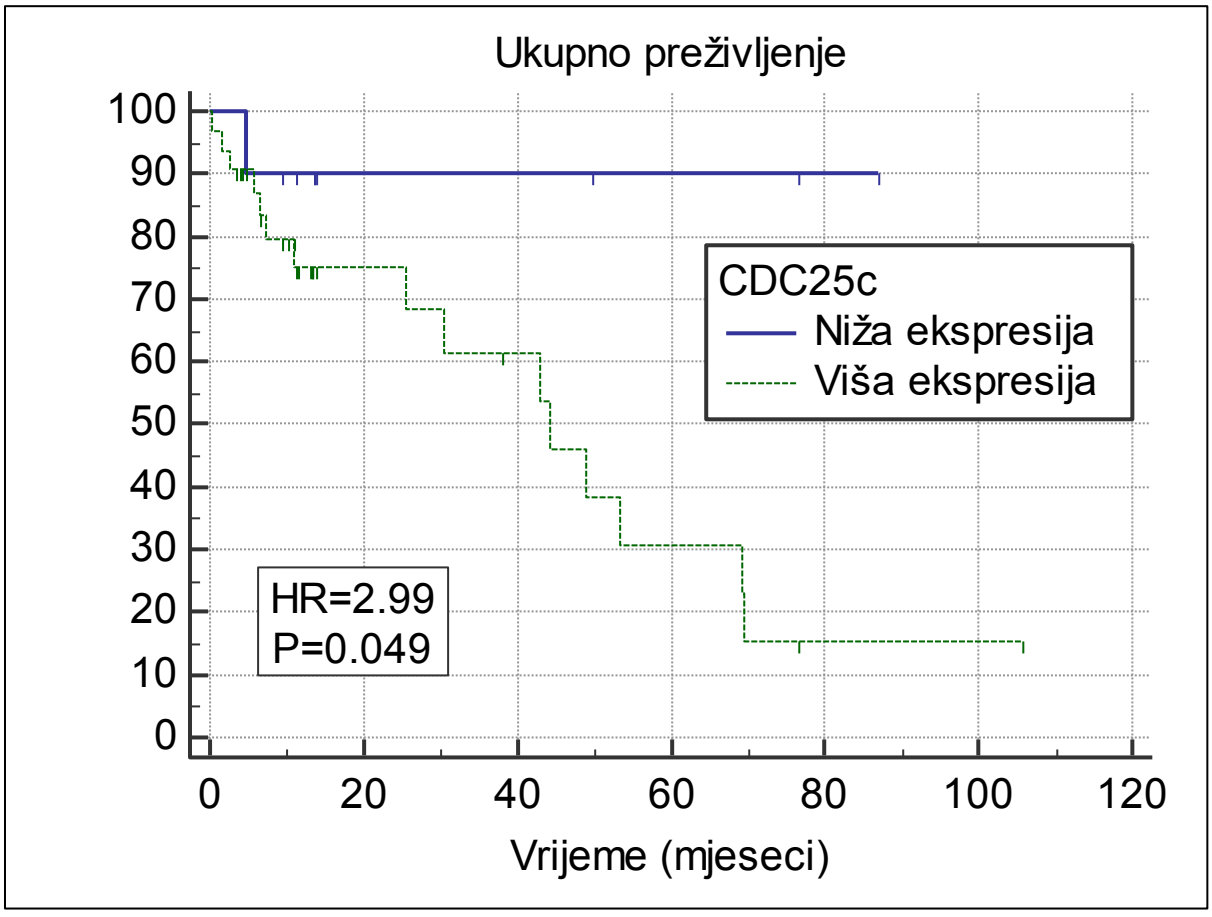
Slika 41: Relativna ekspresija *CDC25c* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).



Slika 42: Relativna ekspresija *CDC25c* mRNA u ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena).

Analizom ROC krivulje određena je optimalna razina *CDC25c* mRNA ekspresije za diskriminaciju preživljenja (kriterij ΔCT ≤4.1111). Ispitanika s višom *CDC25c* mRNA ekspresijom (ΔCT ≤4.1111) bilo je 33/43 76.7% bolesnika, a ispitanika s nižom *CDC25c* mRNA ekspresijom (ΔCT >4.1111) 10/43 (23.3%).

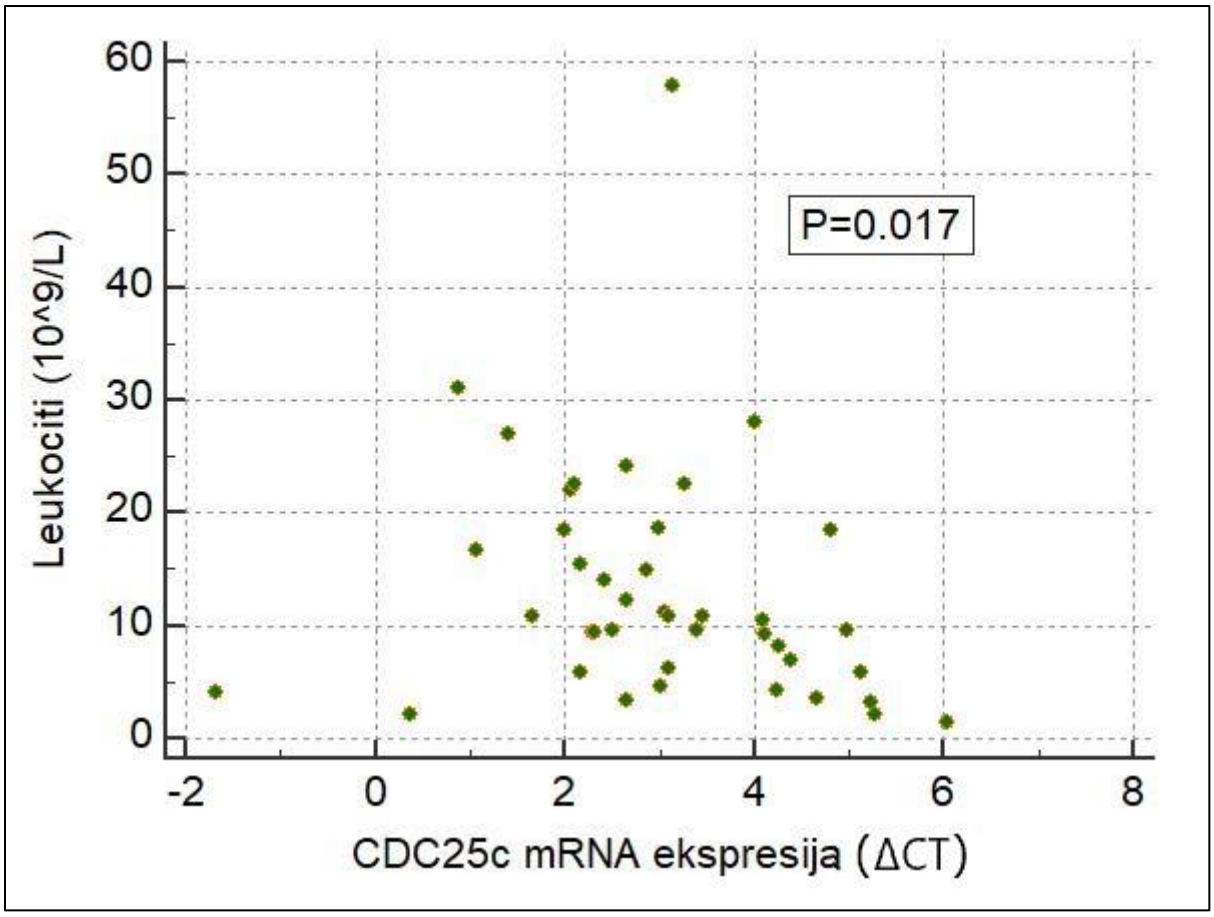
Ispitanici s višom *CDC25c* ekspresijom imali su značajno kraće ukupno preživljenje nego ispitanici s nižom *CDC25c* ekspresijom (HR=2.99; P=0.049, slika 43). Medijan preživljenja nije dostignut u bolesnika s nižom, a bio je 44 mjeseca u bolesnika s višom *CDC25c* mRNA ekspresijom. Petogodišnje stope preživljenja bile su 90% i 31% za bolesnike s nižom i višom *CDC25c* mRNA ekspresijom.



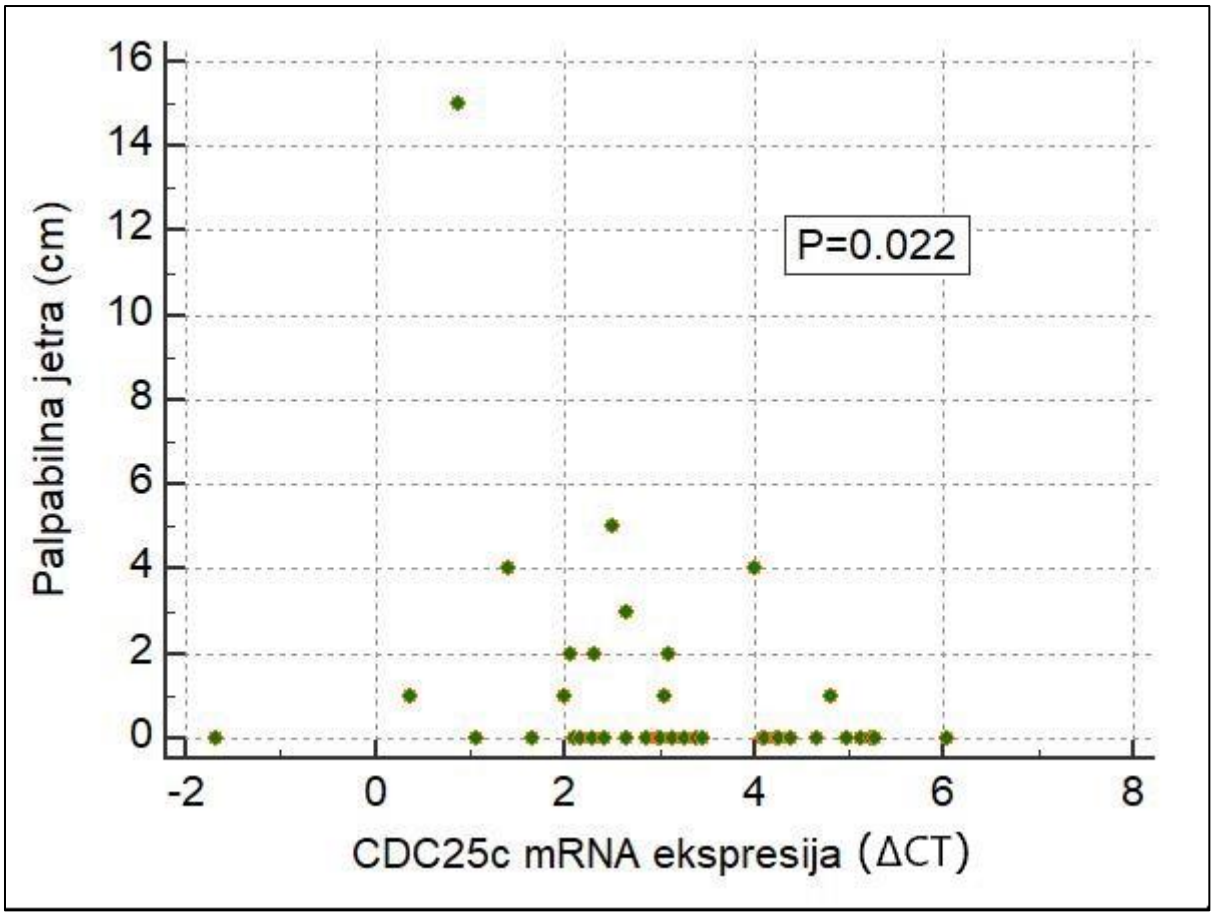
Slika 43: Ukupno preživljenje u bolesnika s višom i nižom *CDC25c* mRNA ekspresijom.

Viša *CDC25c* mRNA ekspresija mjerena kao kontinuirana varijabla povezana je s većim ukupnim brojem leukocita (Rho=-0.37; P=0.017, slika 44), većom jetrom (Rho=-0.36; P=0.022, slika 45), većim apsolutnim brojem bazofila (Rho=-0.39; P=0.012, slika 46) i većim apsolutnim brojem eozinofila (Rho=-0.38; P=0.013, slika 47). *CDC25c* mRNA ekspresija mjerena kao kontinuirana varijabla nije se značajno razlikovala u odnosu na praćene pokazatelje: spol (P=0.420), blastnu transformaciju bolesti (P=0.449), *JAK2* status (P=0.915), *CALR* status (P=0.140), *MPL* status (P=0.399), prisustvo konstitucijskih simptoma (P=0.127), ovisnost o transfuzijama (P=0.229), prisustvo cirkulirajućih blasta (P=0.408), masivnu splenomegaliju (P=0.917), stupanj fibroze koštane srži (P=0.632), DIPSS kategorije (P=0.703), dob (P=0.412), hemoglobin (P=0.427), trombocite (P=0.213), LDH (P=0.251), veličinu slezene (P=0.821), MCV (P=0.722), RDW (P=0.539), CRP (P=0.406), željezo u krvi (P=0.776), TIBC (P=0.543), saturaciju transferina (P=0.624), feritin (P=0.547), apsolutni broj neutrofila (P=0.054), apsolutni broj limfocita (P=0.946), apsolutni broj monocita (P=0.083), MPV (P=0.237), albumine (P=0.975) (tablica 4). *CDC25c* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije prikazana je na slici 48.

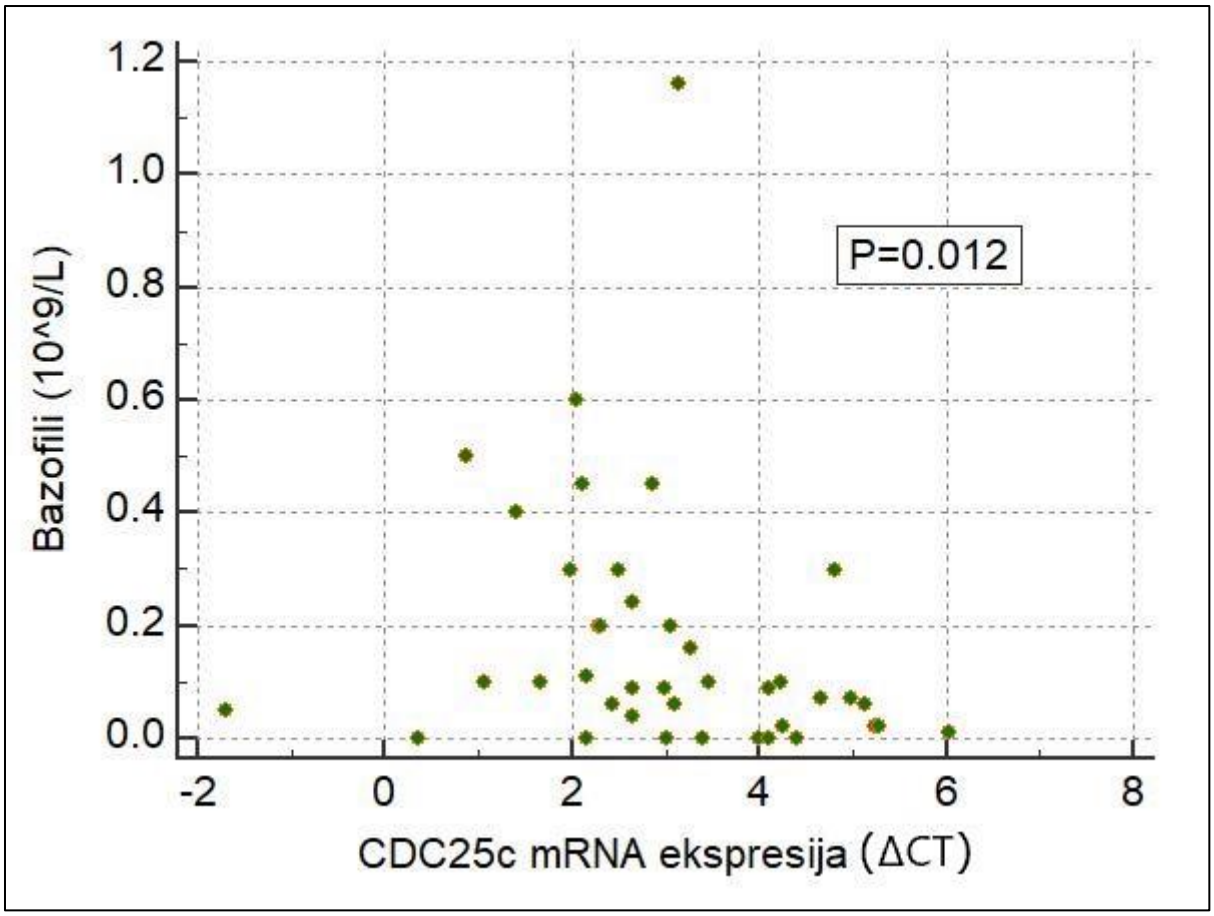
U usporedbi bolesnika s višom i nižom *CDC25c* mRNA ekspresijom podijeljenih prema kriteriju za diskriminaciju preživljenja ($\Delta CT \leq 4.1111$ za višu ekspresiju) utvrđena je statistički značajna razlika u dobi (medijan 69.5 prema 58.5; P=0.037, slika 49), ukupnom broju leukocita (medijan 11.7 $x10^9$/L prema 5 $x10^9$/L; P=0.002), apsolutnom broju neutrofila (medijan 9.3 $x10^9$/L prema 3.9 $x10^9$/L; P=0.010, slika 50) i apsolutnom broju monocita (medijan 0.45 $x10^9$/L prema 0.22 $x10^9$/L; P=0.050, slika 51).



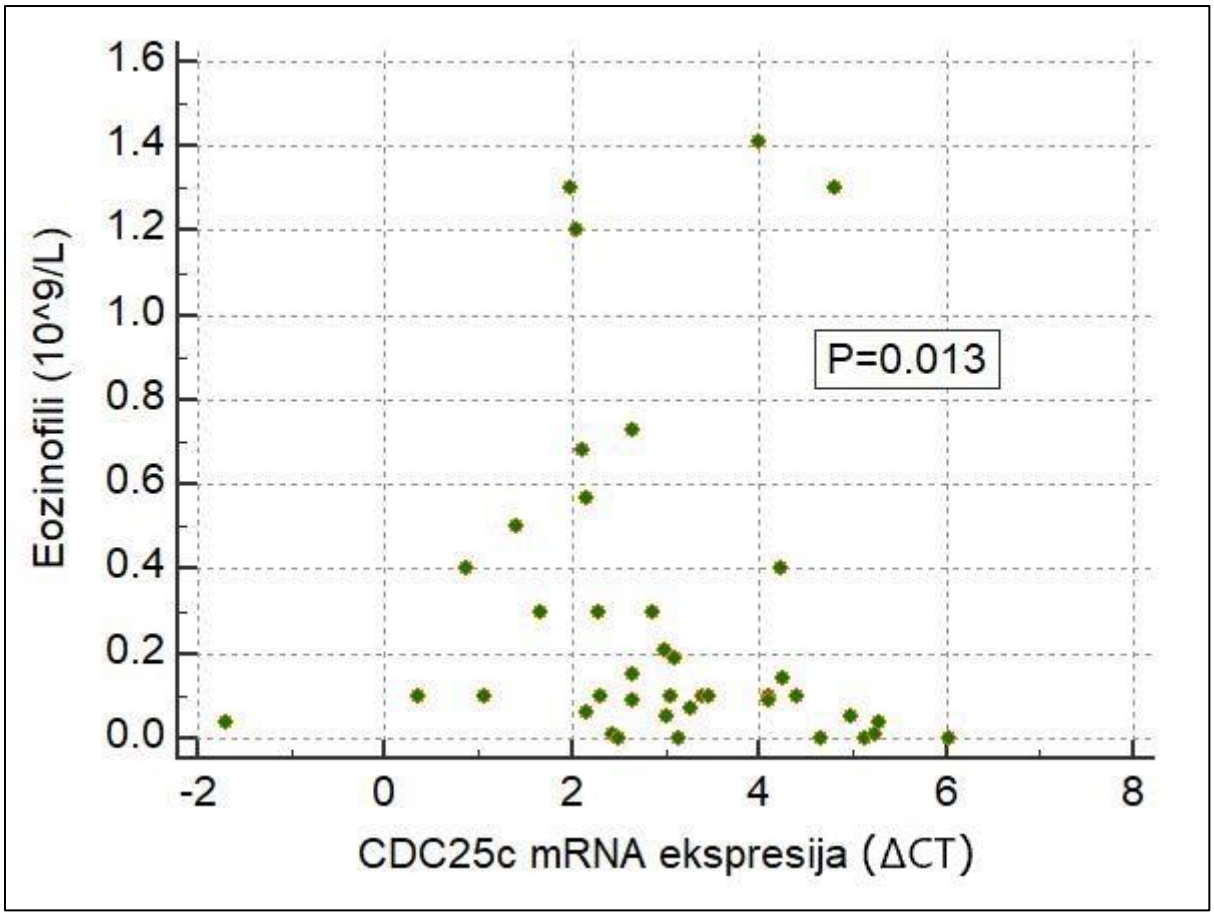
Slika 44: Povezanost *CDC25c* mRNA ekspresije i ukupnog broja leukocita.



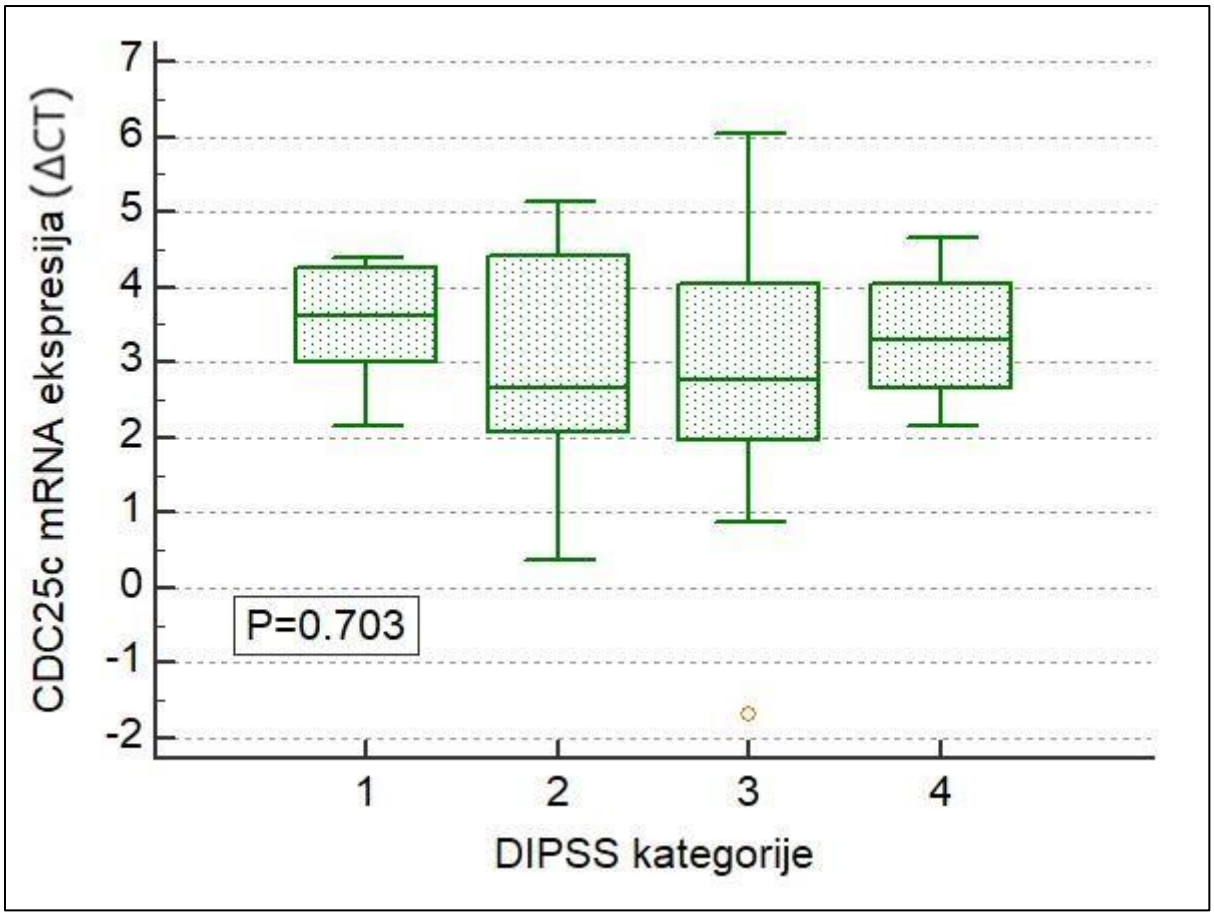
Slika 45: Povezanost *CDC25c* mRNA ekspresije i veličine jetre.



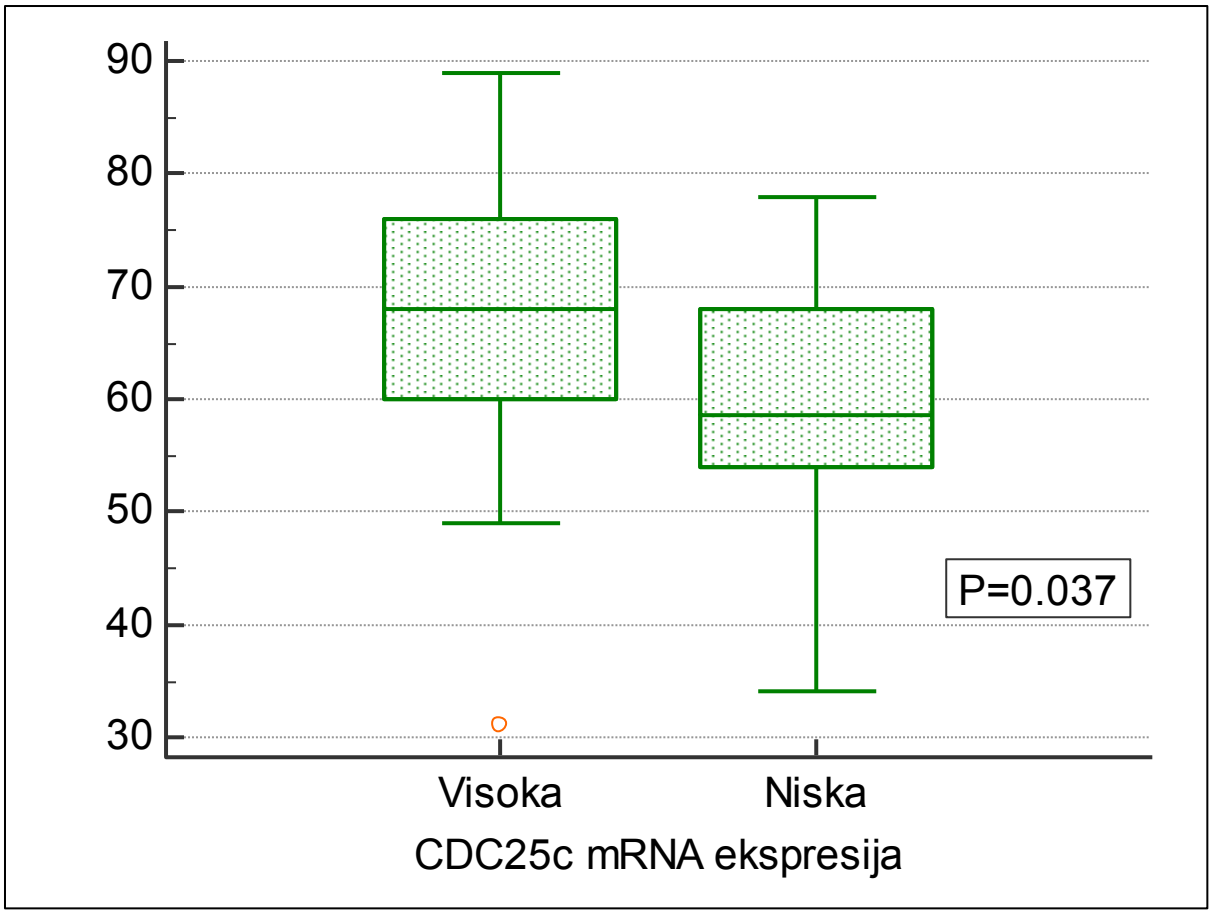
Slika 46: Povezanost *CDC25c* mRNA ekspresije i apsolutnog broja bazofila.



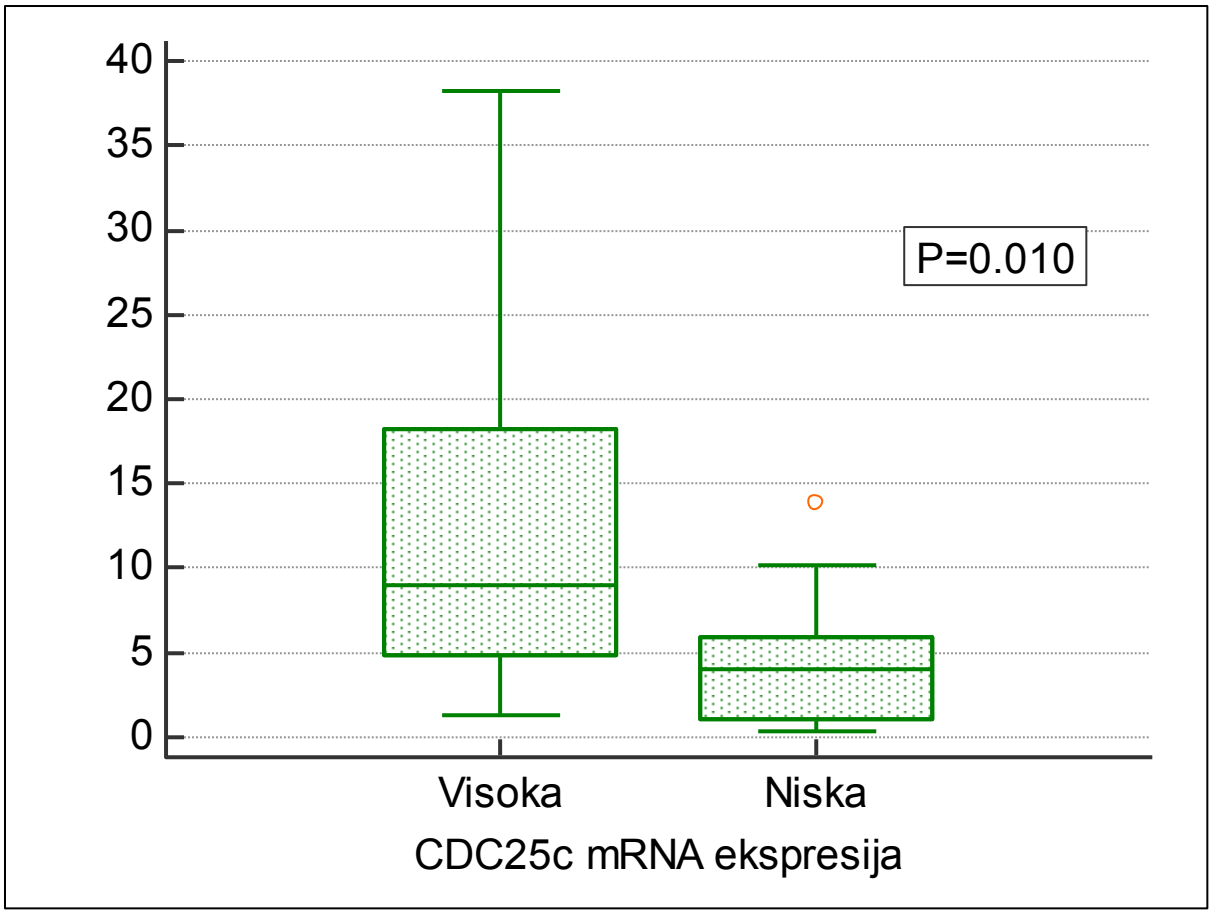
Slika 47: Povezanost *CDC25c* mRNA ekspresije i apsolutnog broja eozinofila.



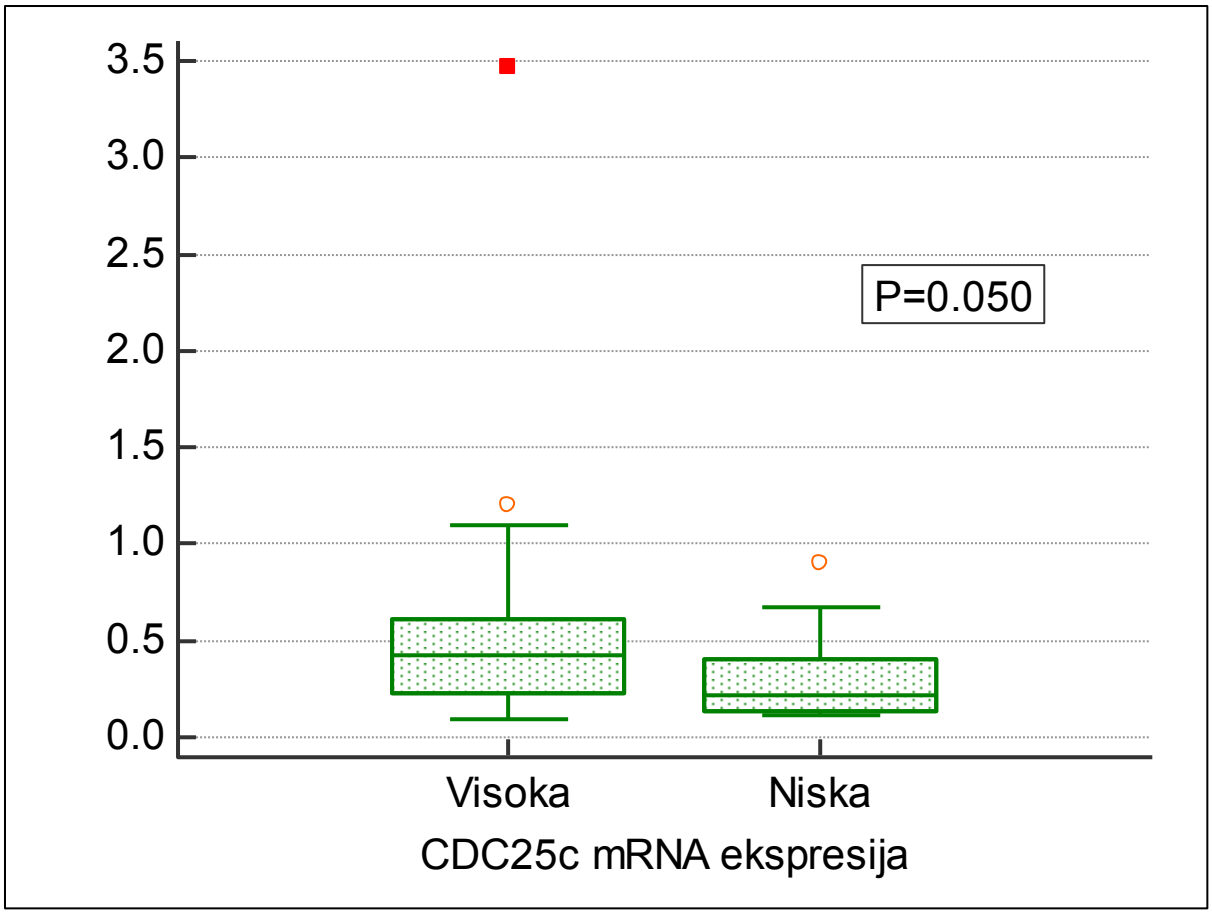
Slika 48: *CDC25c* mRNA ekspresija u odnosu na DIPSS kategorije (1=niski rizik; 2=int-1 rizik; 3=int-2 rizik; 4=visoki rizik).



Slika 49: Dob bolesnika u odnosu na razinu *CDC25c* mRNA ekspresije.



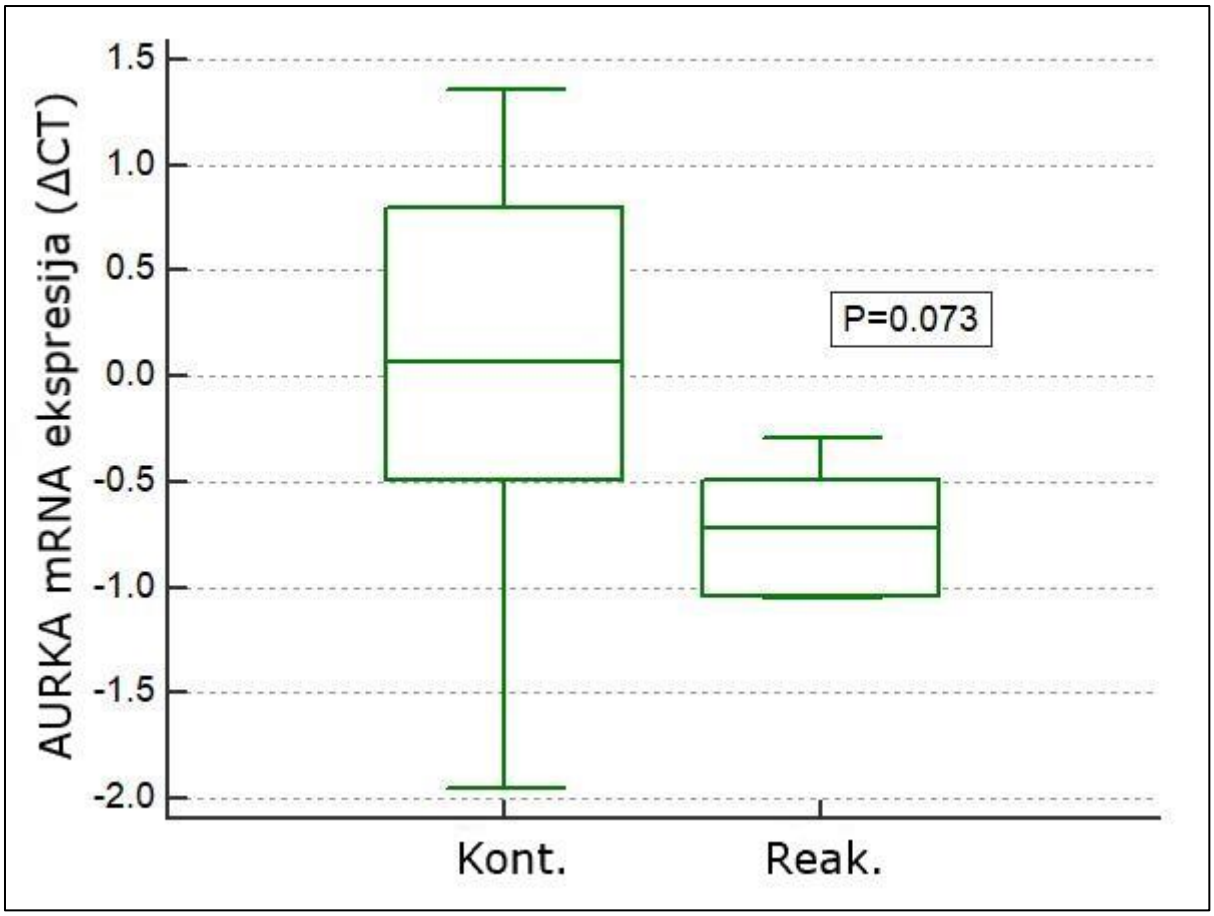
Slika 50: Apsolutni broj neutrofila u odnosu na razinu *CDC25c* mRNA ekspresije.



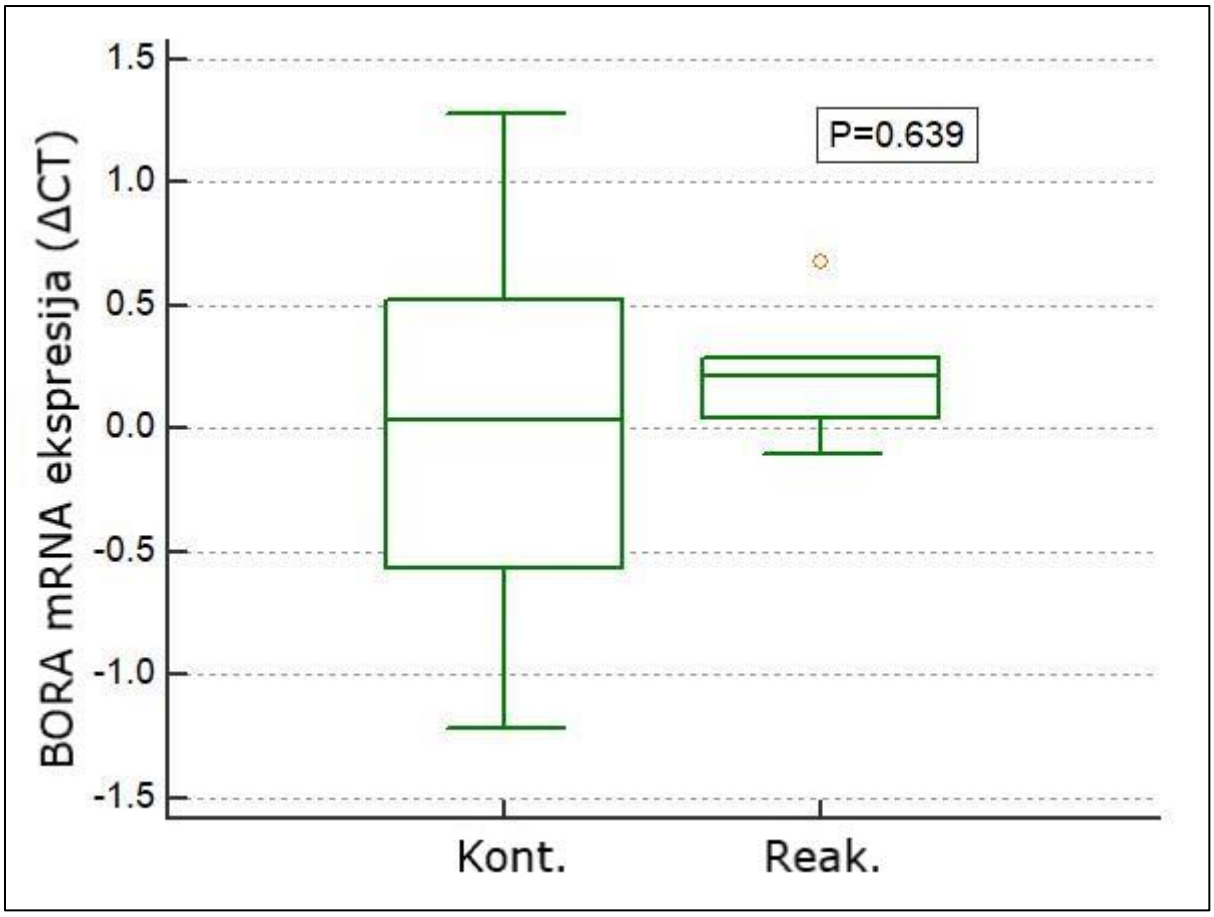
Slika 51: Apsolutni broj monocita u odnosu na razinu *CDC25c* mRNA ekspresije.

4.7. Analiza dodatne kontrolne skupine

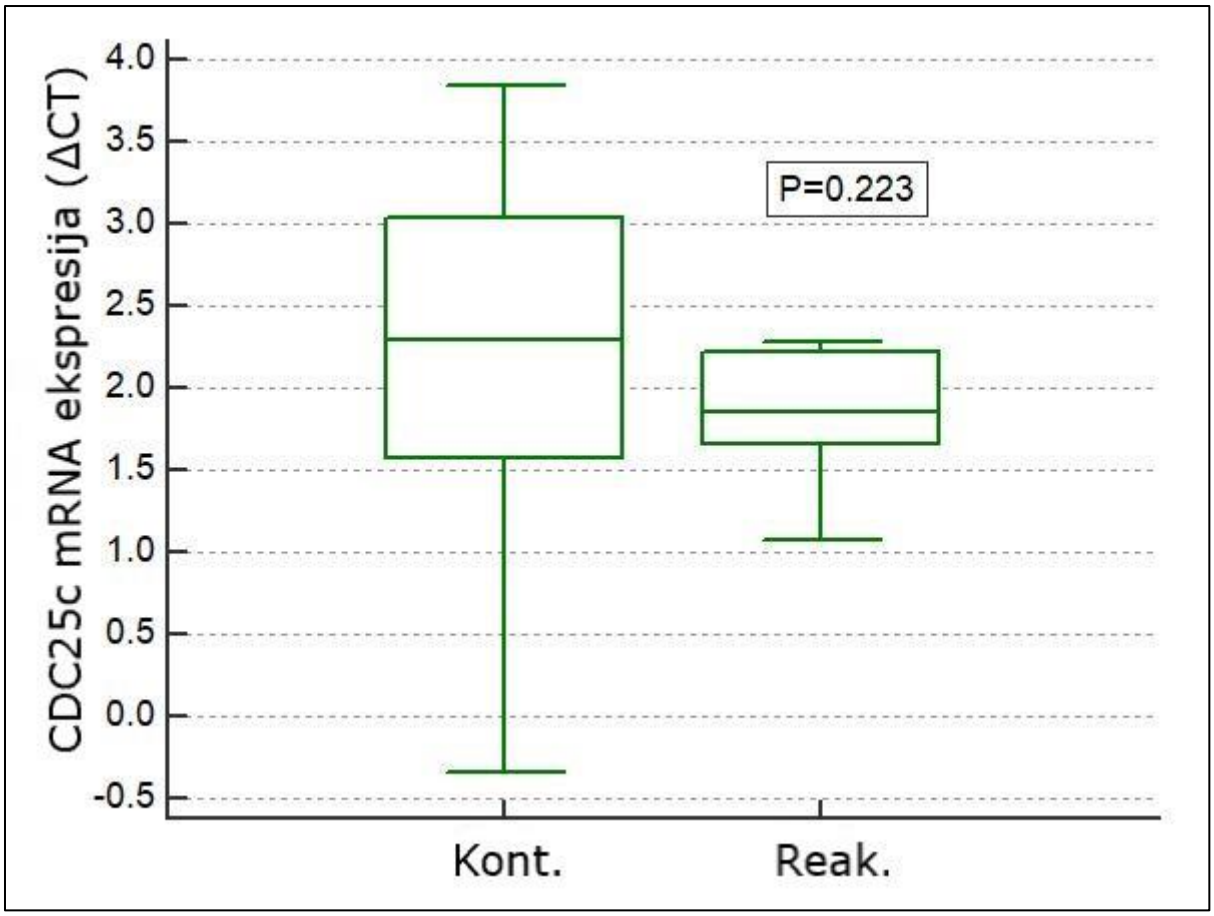
Nije nađeno statistički značajne razlike u relativnoj ekspresiji *AURKA* (P=0.073; slika 52), *BORA* (P=0.639; slika 53) i *CDC25c* mRNA (P=0.223; slika 54) u koštanoj srži između dvije kontrolne skupine ispitanika (ispitanici s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma bez infiltracije koštane srži prema ispitanici s reaktivnim promjenama hematopoeze bez zloćudne bolesti).



Slika 52: Relativna ekspresija *AURKA* mRNA (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena) u kontrolnih ispitanika u usporedbi s drugom skupinom kontrolnih ispitanika (reaktivne promjene hematopoeze bez zloćudne bolesti).

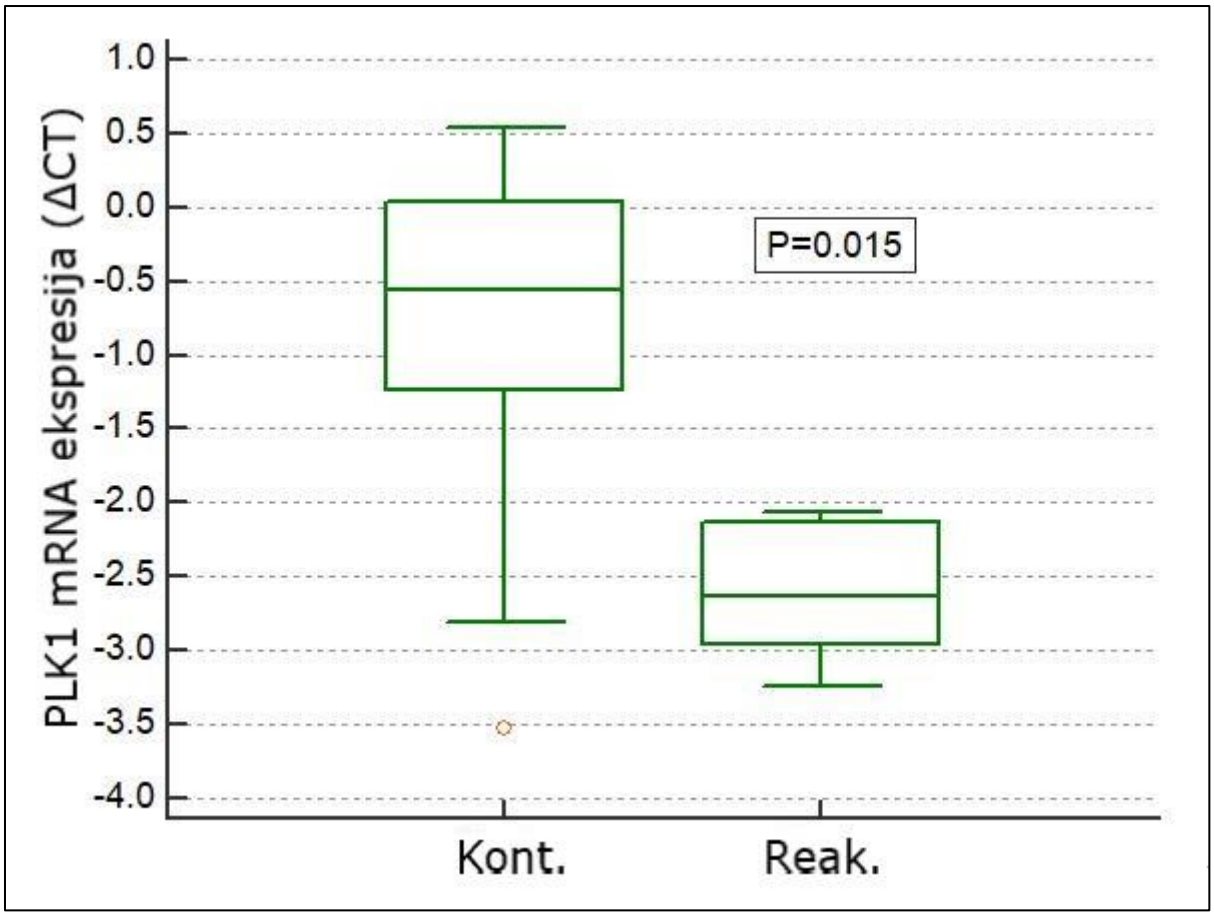


Slika 53: Relativna ekspresija *BORA* mRNA (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena) u kontrolnih ispitanika u usporedbi s drugom skupinom kontrolnih ispitanika (reaktivne promjene hematopoeze bez zloćudne bolesti).

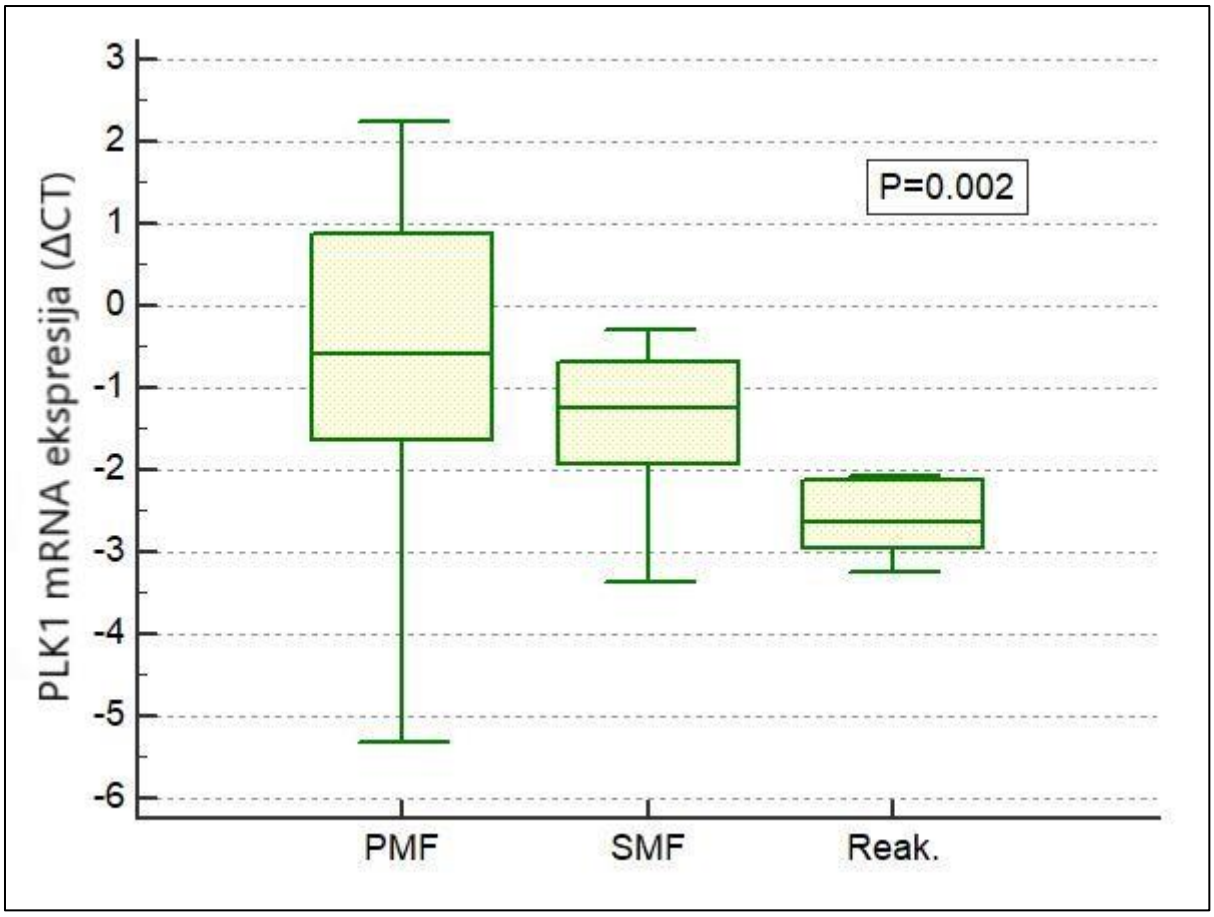


Slika 54: Relativna ekspresija *CDC25c* mRNA (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena) u kontrolnih ispitanika u usporedbi s drugom skupinom kontrolnih ispitanika (reaktivne promjene hematopoeze bez zloćudne bolesti).

Utvrđena je statistički značajno viša relativna ekspresija *PLK1* mRNA (P=0.015; slika 55) u koštanoj srži kontrolne skupine ispitanika s reaktivnim promjenama hematopoeze bez zloćudne bolesti u odnosu na kontrolne ispitanike s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma bez infiltracije koštane srži. Relativna ekspresija *PLK1* mRNA u koštanoj srži kontrolne skupine ispitanika s reaktivnim promjenama hematopoeze bez zloćudne bolesti također je statistički značajno viša i u usporedbi s ispitanicima oboljelim od mijelofibroze (P=0.002; slika 56).



Slika 55: Relativna ekspresija *PLK1* mRNA (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena) u kontrolnih ispitanika u usporedbi s drugom skupinom kontrolnih ispitanika (reaktivne promjene hematopoeze bez zloćudne bolesti).



Slika 56: Relativna ekspresija *PLK1* mRNA (ΔCT, viša vrijednost predstavlja nižu ekspresiju gena) u oboljelih od mijelofibroze u usporedbi s kontrolnim ispitanicima s reaktivnim promjenama hematopoeze bez zloćudne bolesti.

5. Rasprava

Nakon prvih spoznaja o izražaju *AURKA* gena u bolesnika s mijelofibrozom, ovo je po našem saznanju prvo istraživanje koje je obuhvatilo analizu izražaja *AURKA, PLK1, BORA* i *CDC25c* u ispitanika s mijelofibrozom i povezanost s kliničkim i prognostičkim pokazateljima. Rezultati istraživanja ukazuju na važnu ulogu AURKA / PLK1 signalnog puta u patogenezi mijelofibroze. Iako nije nađena značajna razlika u *AURKA, PLK1 i CDC25c* mRNA izražaju između ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika, utvrđena je povezanost razine mRNA izražaja sva tri navedena gena s ukupnim preživljenjem ispitanika s mijelofibrozom. Izražaj *BORA* mRNA značajno je niži u ispitanika s mijelofibrozom nego u kontrolnih ispitanika, moguće zbog supresije *BORA* nakon aktivacije AURKA / PLK1 signalnog puta.

Osvrt na karakteristike ispitanika

Opće karakteristike bolesnika s mijelofibrozom u našem uzorku usporedive su s drugima, poput velike studije Mayo klinike u kojoj je analizirano 1000 ispitanika s mijelofibrozom (167). Većina naših ispitanika starije su životne dobi (medijan 66 godina) i podjednako su zastupljena oba spola. U većine je dokazana $JAK2^{V617F}$ mutacija, inače jednog od glavnih kriterija za postavljanje ove dijagnoze. Petogodišnja stopa preživljenja od 45% i medijan nešto manji od 5 godina usporedivi su s drugim studijama (5, 168).

Problem odabira prikladnih kontrolnih ispitanika za kliničke studije u kojih se izvodi invazivni dijagnostički zahvat, kao što je to slučaj s analizama koštane srži, riješen je izborom dviju skupina, u kojoj su jedni imali agresivni ne-Hodgkinov limfom bez infiltracije koštane srži, a drugi reaktivnu promjenu koštane srži bez zloćudne bolesti. U sklopu standardne dijagnostičke obrade, infiltracija koštane srži limfomom u kontrolnih ispitanika isključena je s više dijagnostičkih postupaka (histološki, imunohistokemijski te ovisno o dijagnozi, FISH analizom i molekularnim analizama). Ovakve morfološki uredne koštane srži korištene su kao kontrole u nekolicini sličnih kliničkih studija (169-172). U literaturi postoje podaci o hiperekspresiji ispitivanih gena u limfnim čvorovima bolesnika koji boluju od ne-Hodgkinovog limfoma (173-177). Stoga smo dodatno provjerili prikladnost odabira kontrolne skupine usporedbom s kontrolnom skupinom od 6 ispitanika s reaktivnom promjenom koštane srži bez zloćudne bolesti. Za gene *AURKA*, *BORA* i *CDC25c* nije utvrđena statistički značajna razlika u relativnoj mRNA ekspresiji između ove dvije kontrolne skupine ispitanika te se odabir bolesnika s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma bez infiltracije koštane srži može

smatrati prikladnom kontrolnom skupinom prilikom ispitivanja ovih gena. Međutim, utvrđena je razlika u relativnoj ekpresiji *PLK1* gena između ove dvije kontrolne skupine, ali i u odnosu na ispitanike s mijelofibrozom, što upućuje na varijabilniju ekspresiju ovog gena. Taj je gen jedan od glavnih aktivatora staničnog ciklusa pa je teže odabrati kontrolnu skupinu i trebalo bi izbjegavati bolesnike s hematološkom malignom bolešću ili prolaznim reaktivnim promjenama hematopoeze.

AURKA

Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju *AURKA* mRNA između ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika. Međutim, viša vrijednost izražaja *AURKA* mRNA povezana je s kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika s mijelofibrozom (HR=3.77; P=0.012). Utvrđena je povezanost između višeg izražaja *AURKA* mRNA i većeg apsolutnog broja monocita, koji je negativni prognostički pokazatelj u bolesnika s mijelofibrozom (178). Postoje podaci o pojačanoj aktivnosti AURKA u CD34+ stanicama bolesnika s mijelofibrozom i ulozi u proupalnom mikrookolišu koji vodi u fibrozu koštane srži (116). Obavljene su studije s inhibicijom AURKA na animalnim modelima, a povoljan terapijski učinak te inhibicije dokazan je i u manjoj skupini bolesnika s mijelofibrozom (128, 129). Specifična inhibicija te kinaze prekida proliferaciju megakariocita, potiče njihovu diferencijaciju i poliploidizaciju kao proces normalne megakariocitopoeze (116, 179). Rezultati našeg istraživanja potvrđuju važnost AURKA u patogenezi mijelofibroze jer je dokazana povezanost *AURKA* mRNA izražaja s ukupnim preživljenjem. Pretpostavljamo da će u skoroj budućnosti biti još kliničkih istraživanja s AURKA inhibitorima, moguće i u kombinaciji s JAK inhibitorima zbog pozitivnog sinergističkog učinka koji je opisan na životinjskim modelima (128).

BORA

Izražaj *BORA* mRNA značajno je niži u ispitanika s mijelofibrozom u odnosu na kontrolne ispitanike. Razlika u odnosu na kontrole potvrđena je pojedinačno i za bolesnike s primarnom i one sa sekundarnom MF. Poznato je da BORA igra ulogu u aktivaciji AURKA i posljedičnoj fosforilaciji PLK1, a ta kaskada je, nakon aktivacije M faze staničnog ciklusa, regulirana degradacijom BORA po principu negativne povratne sprege (118, 126). Rezultati našeg istraživanja mogu se uklopiti u taj mogući supresivni efekt. Viši izražaj *BORA* mRNA povezan je s povoljnim prognostičkim pokazateljima kao što su odsutnost cirkulirajućih blasta i konstitucijskih simptoma. Međutim, povezanost s ukupnim preživljenjem nije nađena. Nužna

su daljnja istraživanja uloge BORA u hematološkim poremećajima s disregulacijom AURKA / PLK1 signalnog puta.

PLK1

Viša vrijednost *PLK1* mRNA izražaja povezana je s kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika s mijelofibrozom (HR=5.87; P=0.003). Utvrđena je i povezanost višeg izražaja ovog gena s većim ukupnim brojem leukocita koji je jedan od negativnih prognostičkih pokazatelja u bolesnika s mijelofibrozom prema prognostičkim indeksima IPSS, DIPSS i DIPSS plus. Također, leukocitoza je povezana s intenzivnijom mijeloproliferacijom što je u skladu s funkcijom PLK1 u kontroli staničnog ciklusa. Sukladnost rezultata *AURKA* i *PLK1* mRNA izražaja upućuje na zajedničku ulogu njihovih kinaza u patogenezi mijelofibroze. Inhibitori PLK1 volasertib i rigosertib intenzivno se istražuju u kliničkim studijama, među ostalim u AML i MF (u tijeku je studija s rigosertibom - NCT02730884) (146-149). Ostaje vidjeti kakvi će biti terapijski učinci navedenih lijekova u bolesnika s mijeloproliferativnim poremećajima. S obzirom na to da naši rezultati pokazuju povezanost s ukupnim preživljenjem, opravdana su daljnja istraživanja ovog i sličnih signalnih puteva te njihovih interakcija, zbog mogućih novih/sinergističkih terapijskih opcija. S druge strane, treba imati na umu varijabilnost mRNA izražaja ovog gena, o čemu svjedoče i razlike dobivene u našim analizama. Utvrđen je značajno viši relativni izražaj mRNA u koštanoj srži kontrolne skupine ispitanika s reaktivnim promjenama hematopoeze u odnosu na kontrolne ispitanike s ograničenim stadijem agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma i u odnosu na oboljele s mijelofibrozom. Taj rezultat nas obvezuje na daljnja istraživanja *PLK1* gena u različitim podskupinama ispitanika s hematološkim zloćudnim bolestima i u onih s reaktivnim i prolaznim promjenama hematopoeze.

CDC25c

Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju *CDC25c* mRNA između ispitanika s mijelofibrozom i kontrolnih ispitanika. Međutim, ispitanici s višom vrijednosti izražaja *CDC25c* mRNA imaju lošije ukupno preživljenje (HR=2.99; P=0.049), kao i ispitanici s višim izražajem *AURKA* i *PLK1* mRNA, što potvrđuje njihovu spregu u ovom signalnom putu i značaj u patogenezi mijelofibroze. Viši izražaj *CDC25c* mRNA povezan je s negativnim prognostičkim pokazateljima u bolesnika s mijelofibrozom kao što su hepatomegalija, veći ukupni broj leukocita, veći apsolutni broj neutrofila, monocita, bazofila i eozinofila. Leukocitoza, granulocitoza i monocitoza povezani su s intenzivnijom mijeloproliferacijom što je u skladu s funkcijom CDC25c u kontroli staničnog ciklusa. CDC25c je mogući glavni okidač

aktivacije mitoze i potrebna su daljnja istraživanja njegove uloge u zloćudnim hematološkim bolestima.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na jasnu spregu navedenih gena u patogenezi MF. Daljnja istraživanja ovog i sličnih signalnih puteva nužna su za dodatno razumijevanje patogeneze ove bolesti, što je važno za razvoj novih ciljanih terapijskih opcija.
Jedno od glavnih ograničenja istraživanja je to što su analizirane neselektirane stanice aspirata koštane srži. Bilo bi korisno analizirati izražaj ovih gena u ciljanim stanicama, prvenstveno u aberantnim megakariocitima. Također, ograničenje istraživanja je i relativno malen broj ispitanika u kontrolnim skupinama.

6. Zaključci

1. Više vrijednosti izražaja *AURKA, PLK1* i *CDC25c* mRNA značajno su povezane s kraćim ukupnim preživljenjem ispitanika s MF.

2. Izražaj *BORA* mRNA značajno je niži u ispitanika s MF u odnosu na kontrolne ispitanike.

3. Nije utvrđena značajna razlika u izražaju *AURKA, PLK1 i CDC25c* mRNA između ispitanika s MF i kontrolnih ispitanika.

4. Viša vrijednost izražaja *AURKA* mRNA značajno je povezana s većim apsolutnim brojem monocita.

5. Viša vrijednost izražaja *PLK1* mRNA značajno je povezana s većim ukupnim brojem leukocita.

6. Viša vrijednost izražaja *CDC25c* mRNA značajno je povezana s negativnim prognostičkim pokazateljima: većom jetrom, većim ukupnim brojem leukocita, većim apsolutnim brojem neutrofila, monocita, bazofila i eozinofila.

7. Viša vrijednost izražaja *BORA* mRNA značajno je povezana s povoljnim prognostičkim pokazateljima: odsutnošću cirkulirajućih blasta i konstitucijskih simptoma.

7. Sažetak

Aurora kinaza A (AURKA), protein *Aurora borealis* (BORA), Polo-*like* kinaza 1 (PLK1) i *Cell-division-cycle* 25c (CDC25c) kontroliraju stanični ciklus i ulazak stanice u mitozu, a njihova disregulacija opisana je u brojnim malignim bolestima. Cilj rada bio je ispitati do sad nedovoljno istražen izražaj njihovih mRNA u mijeloproliferativnoj bolesti, mijelofibrozi (MF). Iz citoloških punktata koštane srži urađena je PCR mRNA analiza navedenih gena u 43 bolesnika s mijelofibrozom, i to 28 s primarnom (PMF) i 15 sa sekundarnom mijelofibrozom (SMF). U kontrolnim skupinama bilo je 12 ispitanika s agresivnim ne-Hodgkinovim limfom bez infiltracije koštane srži i 6 ispitanika s reaktivnom promjenom koštane srži bez zloćudne bolesti. Optimalne granične vrijednosti izražaja mRNA za diskriminaciju preživljenja odabrane su korištenjem analize ROC krivulje. Nije bilo značajne razlike u izražaju *AURKA* mRNA između ispitanika s MF i kontrolnih ispitanika (P=0.466). Viša vrijednost izražaja *AURKA* mRNA značajno je povezana s većim apsolutnim brojem monocita (P=0.024) i kraćim ukupnim preživljenjem (HR=3.77; P=0.012). U bolesnika s PMF i SMF značajno je niži izražaj *BORA* mRNA u odnosu na kontrolne ispitanike (P=0.009). Viša vrijednost izražaja *BORA* mRNA značajno je povezana s povoljnim prognostičkim pokazateljima: odsutnošću konstitucijskih simptoma (P=0.049) i cirkulirajućih blasta (P=0.047), ali bez značajne povezanosti s ukupnim preživljenjem (P>0.05). Nije bilo značajne razlike u izražaju *PLK1* mRNA između ispitanika s MF i kontrolnih ispitanika (P=0.103). Viša vrijednost izražaja *PLK1* mRNA značajno je povezana s većim ukupnim brojem leukocita (P=0.042) i kraćim ukupnim preživljenjem (HR=5.87; P=0.003). Nije bilo značajne razlike u izražaju *CDC25c* mRNA između ispitanika s MF i kontrolnih ispitanika (P=0.162). Viša vrijednost izražaja *CDC25c* mRNA značajno je povezana s nepovoljnim prognostičkim pokazateljima: većom jetrom (P=0.022), većim ukupnim brojem leukocita (P=0.017), većim apsolutnim brojem neutrofila (P=0.010), monocita (P=0.050), bazofila (P=0.012) i eozinofila (P=0.013) te kraćim ukupnim preživljenjem (HR=2.99; P=0.049). Izražaj ovih gena ima utjecaj na ukupno preživljenje u mijelofibrozi te istraživanje treba proširiti na druge hematološke zloćudne bolesti i one s reaktivnim i prolaznim promjenama hematopoeze.

8. Summary

AURORA KINASE A / POLO-LIKE KINASE 1 SIGNALING PATHWAY ANALYSIS IN PATIENTS WITH MYELOFIBROSIS

Aurora kinase A (AURKA), Aurora borealis protein (BORA), Polo-like kinase 1 (PLK1) and Cell-division-cycle 25c (CDC25c) are required for cell cycle control and promotion of mitosis entry. Their dysregulation has been described in a number of malignant diseases. However, their role in pathogenesis of myelofibrosis is less known. We investigated *AURKA, BORA, PLK1* and *CDC25c* mRNA expression in bone marrow aspirates of 43 patients with myelofibrosis (28 primary - PMF, 15 secondary myelofibrosis - SMF) and 18 controls (the first control group of 12 with limited stage of aggressive non Hodgkin lymphoma without bone marrow involvement and the second group of 6 with nonmalignant reactive bone marrow). Optimal cut-off values for dichotomization of expression levels of investigated genes for the purpose of survival analysis were done using the ROC curve analysis with survival status as a classification variable. *AURKA* mRNA expression did not significantly differ between myelofibrosis and controls (P=0.466). Higher *AURKA* expression was significantly associated with higher absolute monocyte count (P=0.024) and shorter overall survival (HR=3.77; P=0.012). Patients with both PMF and SMF had lower *BORA* mRNA expression than controls (P=0.009). Higher *BORA* expression was significantly associated with favourable prognostic factors: absence of constitutional symptoms (P=0.049) and absence of circulatory blasts (P=0.047), but with neutral effect on survival (P>0.05). *PLK1* mRNA expression did not significantly differ between myelofibrosis and controls (P=0.103). Higher *PLK1* expression was significantly associated with higher white blood cell count (P=0.042) and inferior overall survival (HR=5.87; P=0.003). *CDC25c* mRNA expression did not significantly differ between myelofibrosis and controls (P=0.162). Higher CDC25c mRNA was significantly associated with unfavourable prognostic factors: higher white blood cells count (P=0.017), larger liver size (P=0.022), higher absolute neutrophil (P=0.010), monocyte (P=0.050), basophil (P=0.012) and eosinophil counts (P=0.013) and inferior overall survival (HR=2.99; P=0.049). In conclusion, these genes effects survival and seem to be involved in pathogenesis of myelofibrosis. Future studies investigating these genes in hematological malignancies, as well as in reactive disorders, are warranted.

9. Popis literature

1. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. J Clin Oncol. 2011;29(5):573-82.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood. 1951;6(4):372-5.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
4. Ganesan P, Ganesan TS, Radhakrishnan V, et al. Chronic Myeloid Leukemia: Long-Term Outcome Data in the Imatinib Era. Indian J Hematol Blood Transfus. 2019;35(1):37-42.
5. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood. 2014;124(16):2507-13; quiz 615.
6. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. J Clin Oncol. 2005;23(10):2224-32.
7. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Semin Thromb Hemost. 2014;40(3):348-58.
8. Dingli D, Tefferi A. Hydroxyurea: The drug of choice for polycythemia vera and essential thrombocythemia. Curr Hematol Malig Rep. 2006;1(2):69-74.
9. Barbui T, Finazzi G. Evidence-based management of polycythemia vera. Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(3):483-93.
10. Tefferi A. Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations. Mayo Clin Proc. 2003;78(2):174-94.
11. Mascarenhas JO, Cross NC, Mesa RA. The future of JAK inhibition in myelofibrosis and beyond. Blood Rev. 2014;28(5):189-96.
12. Kamiunten A, Shide K, Kameda T, et al. Early/prefibrotic primary myelofibrosis in patients who were initially diagnosed with essential thrombocythemia. International journal of hematology. 2018;108(4):411-5.
13. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? Blood. 2012;119(14):3219-25.

14. Heuck G. Zwei Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut-resp Knochenmarksbefund. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med. 1879;78:475.
15. Lucijanic M, Mitrovic Z, Cicic D, et al. Increased mean platelet volume (MPV) is an independent predictor of inferior survival in patients with primary and secondary myelofibrosis. International journal of hematology. 2018;107(2):166-72.
16. Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H. Primary chronic myelofibrosis: clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. International journal of hematology. 2001;73(2):194-8.
17. Mesa RA, Shields A, Hare T, et al. Progressive burden of myelofibrosis in untreated patients: assessment of patient-reported outcomes in patients randomized to placebo in the COMFORT-I study. Leukemia research. 2013;37(8):911-6.
18. Ozen S, Ferhanoglu B, Senocak M, Tuzuner N. Idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia): clinicopathological analysis of 32 patients. Leukemia research. 1997;21(2):125-31.
19. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Bjorkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. Blood. 2008;112(6):2199-204.
20. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia. 2014;28(7):1472-7.
21. Castro-Malaspina H. Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. Prog Clin Biol Res. 1984;154:427-54.
22. Lichtman MA. Is it chronic idiopathic myelofibrosis, myelofibrosis with myeloid metaplasia, chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis, or chronic megakaryocytic leukemia? Further thoughts on the nosology of the clonal myeloid disorders. Leukemia. 2005;19(7):1139-41.
23. Kutti J, Ridell B. Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. Pathol Biol (Paris). 2001;49(2):164-6.
24. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. Br J Haematol. 1998;102(3):684-90.

25. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. Am J Hematol. 1999;61(1):10-5.
26. Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. Hematol Oncol. 2008;26(3):131-8.
27. Kaufman S, Briere J, Bernard J. [Familial myeloproliferative syndromes. Study of 6 families and review of literature]. Nouv Rev Fr Hematol. 1978;20(1):1-15.
28. Perez-Encinas M, Bello JL, Perez-Crespo S, De Miguel R, Tome S. Familial myeloproliferative syndrome. Am J Hematol. 1994;46(3):225-9.
29. Sheikha A. Fatal familial infantile myelofibrosis. J Pediatr Hematol Oncol. 2004;26(3):164-8.
30. Aksoy M, Erdem S, Dincol G. Two rare complications of chronic benzene poisoning: myeloid metaplasia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Report of two cases. Blut. 1975;30(4):255-60.
31. Glass DC, Schnatter AR, Tang G, Irons RD, Rushton L. Risk of myeloproliferative disease and chronic myeloid leukaemia following exposure to low-level benzene in a nested case-control study of petroleum workers. Occup Environ Med. 2014;71(4):266-74.
32. Tondel M, Persson B, Carstensen J. Myelofibrosis and benzene exposure. Occup Med (Lond). 1995;45(1):51-2.
33. Anderson RE, Hoshino T, Yamamoto T. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia in Survivors of the Atomic Bomb in Hiroshima. Ann Intern Med. 1964;60:1-18.
34. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2005;352(17):1779-90.
35. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood. 2006;108(10):3472-6.
36. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013;369(25):2379-90.
37. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. Blood. 2002;100(10):3495-503.
38. 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-beta. Stem Cell Investig. 2016;3:5.

39. Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. Br J Haematol. 1992;80(2):184-8.

40. Schmitt A, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Shagraoui H, Cramer EM. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. Leuk Lymphoma. 2002;43(4):719-24.

41. Malara A, Abbonante V, Zingariello M, Migliaccio A, Balduini A. Megakaryocyte Contribution to Bone Marrow Fibrosis: many Arrows in the Quiver. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2018;10(1):e2018068.

42. Rosti V, Massa M, Vannucchi AM, et al. The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+ cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood Cells Mol Dis. 2007;38(3):280-6.

43. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. Blood. 2007;110(3):986-93.

44. Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, et al. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. Blood. 2002;100(8):2932-40.

45. Thiele J, Kvasnicka HM, Fischer R, Diehl V. Clinicopathological impact of the interaction between megakaryocytes and myeloid stroma in chronic myeloproliferative disorders: a concise update. Leuk Lymphoma. 1997;24(5-6):463-81.

46. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. J Clin Oncol. 2005;23(24):5688-95.

47. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. Hematol Oncol Clin North Am. 2003;17(5):1211-26.

48. Bartlett RP, Greipp PR, Tefferi A, Cupps RE, Mullan BP, Trastek VF. Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion. Mayo Clin Proc. 1995;70(12):1161-4.

49. Konca Degertekin C, Ozkurt ZN, Akyurek N, Yagci M. A Rare Presentation of Extramedullary Hematopoiesis in Post-polycythemic Myelofibrosis. Indian J Hematol Blood Transfus. 2014;30(Suppl 1):12-6.

50. Gibbins J, Pankhurst T, Murray J, et al. Extramedullary haematopoiesis in the kidney: a case report and review of literature. Clin Lab Haematol. 2005;27(6):391-4.

51. Brown JA, Gomez-Leon G. Subdural hemorrhage secondary to extramedullary hematopoiesis in postpolycythemic myeloid metaplasia. Neurosurgery. 1984;14(5):588-91.
52. Scott IC, Poynton CH. Polycythaemia rubra vera and myelofibrosis with spinal cord compression. J Clin Pathol. 2008;61(5):681-3.
53. Oishi N, Swisher SN, Stormont JM, Schwartz SI. Portal hypertension in myeloid metaplasia. Report of a case without apparent portal obstruction. Arch Surg. 1960;81:80-6.
54. Rosenbaum DL, Murphy GW, Swisher SN. Hemodynamic studies of the portal circulation in myeloid metaplasia. Am J Med. 1966;41(3):360-8.
55. Jacobs P, Maze S, Tayob F, Harries-Jones EP. Myelofibrosis, splenomegaly, and portal hypertension. Acta Haematol. 1985;74(1):45-8.
56. Thiele J, Hoeppner B, Zankovich R, Fischer R. Histomorphometry of bone marrow biopsies in primary osteomyelofibrosis/-sclerosis (agnogenic myeloid metaplasia)--correlations between clinical and morphological features. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1989;415(3):191-202.
57. Diamond T, Smith A, Schnier R, Manoharan A. Syndrome of myelofibrosis and osteosclerosis: a series of case reports and review of the literature. Bone. 2002;30(3):498-501.
58. Lang JM, Oberling F, Mayer S, Heid E. Auto-immunity in primary myelofibrosis. Biomedicine. 1976;25(1):39.
59. Gordon BR, Coleman M, Kohen P, Day NK. Immunologic abnormalities in myelofibrosis with activation of the complement system. Blood. 1981;58(5):904-10.
60. Vellenga E, Mulder NH, The TH, Nieweg HO. A study of the cellular and humoral immune response in patients with myelofibrosis. Clin Lab Haematol. 1982;4(3):239-46.
61. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. Leukemia. 2006;20(1):55-60.
62. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. Blood. 2010;115(4):778-82.
63. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger H, Thiele J, et al. Leukocytosis as an important risk factor for arterial thrombosis in WHO-defined early/prefibrotic myelofibrosis: an international study of 264 patients. Am J Hematol. 2012;87(7):669-72.
64. Barosi G, Cazzola M, Frassoni F, Orlandi E, Stefanelli M. Erythropoiesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia: recognition of different classes of patients by erythrokinetics. Br J Haematol. 1981;48(2):263-72.

65. Njoku OS, Lewis SM, Catovsky D, Gordon-Smith EC. Anaemia in myelofibrosis: its value in prognosis. Br J Haematol. 1983;54(1):79-89.
66. Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. Blood. 1996;88(3):1013-8.
67. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. Leuk Lymphoma. 1996;22(3-4):303-17.
68. Silverstein MN, Elveback LR. Letter: Leukocyte alkaline phosphatase in agnogenic myeloid metaplasia. Am J Clin Pathol. 1974;61(2):307.
69. Kondo T, Tasaka T, Tomioka N, et al. Low neutrophil alkaline phosphatase score is a new aspect of calreticulin-mutated myeloproliferative neoplasms. Springerplus. 2016;5(1):1146.
70. Rupoli S, Da Lio L, Sisti S, et al. Primary myelofibrosis: a detailed statistical analysis of the clinicopathological variables influencing survival. Ann Hematol. 1994;68(4):205-12.
71. Spanos G, Narasimhan P, Rosner F. Hypocholesterolemia in myelofibrosis. JAMA. 1981;245(3):235.
72. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. Br J Haematol. 1997;97(3):635-40.
73. Amano Y, Onda M, Amano M, Kumazaki T. Magnetic resonance imaging of myelofibrosis. STIR and gadolinium-enhanced MR images. Clin Imaging. 1997;21(4):264-8.
74. Bain BJ. Blood film features of primary myelofibrosis. Am J Hematol. 2009;84(3):187.
75. Lennert K, Nagai K, Schwarze EW. Patho-anatomical features of the bone marrow. Clin Haematol. 1975;4(2):331-51.
76. Pereira A, Cervantes F, Brugues R, Rozman C. Bone marrow histopathology in primary myelofibrosis: clinical and haematologic correlations and prognostic evaluation. Eur J Haematol. 1990;44(2):95-9.
77. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Haematologica. 2005;90(8):1128-32.
78. Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. Ann Hematol. 2003;82(3):148-52.

79. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. Eur J Haematol. 2009;82(5):329-38.
80. Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, et al. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. Blood. 2009;113(18):4171-8.
81. Reilly JT. Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis. Acta Haematol. 2002;108(3):113-9.
82. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood Cancer J. 2018;8(2):15.
83. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. Blood. 2005;105(7):2664-70.
84. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Leukemia. 2008;22(2):437-8.
85. Wilks AF. The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target. Semin Cell Dev Biol. 2008;19(4):319-28.
86. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med. 2010;363(12):1117-27.
87. Pardanani A, Hood J, Lasho T, et al. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. Leukemia. 2007;21(8):1658-68.
88. Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, et al. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Oncol. 2013;31(10):1285-92.
89. Harrison CN, Schaap N, Vannucchi AM, et al. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. Lancet Haematol. 2017;4(7):e317-e24.
90. Mesa RA, Vannucchi AM, Mead A, et al. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. Lancet Haematol. 2017;4(5):e225-e36.

91. Harrison CN, Vannucchi AM, Platzbecker U, et al. Momelotinib versus best available therapy in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (SIMPLIFY 2): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Haematol. 2018;5(2):e73-e81.
92. Mittal P, Saliba RM, Giralt SA, et al. Allogeneic transplantation: a therapeutic option for myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and Philadelphia-negative/BCR-ABL-negative chronic myelogenous leukemia. Bone Marrow Transplant. 2004;33(10):1005-9.
93. Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. Cancer. 2006;107(2):361-70.
94. Elliott MA, Tefferi A. Splenic irradiation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a review. Blood Rev. 1999;13(3):163-70.
95. Manoharan A. Management of myelofibrosis with intermittent hydroxyurea. Br J Haematol. 1991;77(2):252-4.
96. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2006;108(4):1158-64.
97. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. Leukemia. 2007;21(8):1827-8.
98. Santana-Davila R, Tefferi A, Holtan SG, et al. Primary myelofibrosis is the most frequent myeloproliferative neoplasm associated with del(5q): clinicopathologic comparison of del(5q)-positive and -negative cases. Leukemia research. 2008;32(12):1927-30.
99. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E. Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. Br J Haematol. 2005;129(6):771-5.
100. Centenara E, Guarnone R, Ippoliti G, Barosi G. Cyclosporin-A in severe refractory anemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: a preliminary report. Haematologica. 1998;83(7):622-6.
101. Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, et al. Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 1987;70(4):1014-9.

102. Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Gray L, Tefferi A. Etanercept, a soluble tumor necrosis factor receptor, palliates constitutional symptoms in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of a pilot study. Blood. 2002;99(6):2252-4.
103. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. 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(4):392-7.
104. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. 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):1703-8.
105. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. Annu Rev Immunol. 1995;13:369-98.
106. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005;365(9464):1054-61.
107. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005;7(4):387-97.
108. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood. 2005;106(6):2162-8.
109. Muxi PJ, Oliver AC. Jak-2 positive myeloproliferative neoplasms. Curr Treat Options Oncol. 2014;15(2):147-56.
110. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. JAKSTAT. 2012;1(3):184-90.
111. Garcon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. Blood. 2006;108(5):1551-4.
112. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 2006;3(7):e270.
113. Vaddi K, Sarlis NJ, Gupta V. Ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. Expert Opin Pharmacother. 2012;13(16):2397-407.
114. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood. 2014;123(14):2220-8.

115. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. Eur J Haematol. 2007;79(6):508-15.
116. Yang Q, Crispino JD, Wen QJ. Kinase signaling and targeted therapy for primary myelofibrosis. Experimental hematology. 2017;48:32-8.
117. Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of aurora-A in centrosome function. Oncogene. 2002;21(40):6175-83.
118. Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Jr., Golemis EA. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2013;70(4):661-87.
119. Gheghiani L, Loew D, Lombard B, Mansfeld J, Gavet O. PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis. Cell reports. 2017;19(10):2060-73.
120. Katayama H, Wang J, Treekitkarnmongkol W, et al. Aurora kinase-A inactivates DNA damage-induced apoptosis and spindle assembly checkpoint response functions of p73. Cancer Cell. 2012;21(2):196-211.
121. Nadler Y, Camp RL, Schwartz C, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y. Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(14):4455-62.
122. Dotan E, Meropol NJ, Zhu F, et al. Relationship of increased aurora kinase A gene copy number, prognosis and response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2012;106(4):748-55.
123. Hu W, Kavanagh JJ, Deaver M, et al. Frequent overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. Oncol Res. 2005;15(1):49-57.
124. Kivinummi K, Urbanucci A, Leinonen K, et al. The expression of AURKA is androgen regulated in castration-resistant prostate cancer. Sci Rep. 2017;7(1):17978.
125. Zhang QX, Gao R, Xiang J, et al. Cell cycle protein Bora serves as a novel poor prognostic factor in multiple adenocarcinomas. Oncotarget. 2017;8(27):43838-52.
126. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. Science. 2008;320(5883):1655-8.
127. Mehra R, Serebriiskii IG, Burtness B, Astsaturov I, Golemis EA. Aurora kinases in head and neck cancer. The Lancet Oncology. 2013;14(10):e425-35.

128. Wen QJ, Yang Q, Goldenson B, et al. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. Nature medicine. 2015;21(12):1473-80.
129. Gangat N, Marinaccio C, Swords R, et al. Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2019;25(16):4898-906.
130. Holtrich U, Wolf G, Brauninger A, et al. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(5):1736-40.
131. Barr FA, Sillje HH, Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(6):429-40.
132. van de Weerdt BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. Cell Cycle. 2006;5(8):853-64.
133. Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. Cell Signal. 2000;12(6):405-11.
134. Liu X. Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. Transl Oncol. 2015;8(3):185-95.
135. Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. Oncogene. 2005;24(2):267-76.
136. Takahashi T, Sano B, Nagata T, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. Cancer Sci. 2003;94(2):148-52.
137. Wolf G, Elez R, Doermer A, et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. Oncogene. 1997;14(5):543-9.
138. Ran Z, Chen W, Shang J, et al. Clinicopathological and prognostic implications of polo-like kinase 1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Gene. 2019:144097.
139. Chen JS, Yeh CN, Cheng CT, et al. Role of PLK1 signaling pathway genes in gastrointestinal stromal tumors. Oncology letters. 2018;16(3):3070-82.
140. Min KI, Park S, Shin SH, Kwon YR, Kim HJ, Kim YJ. Enhanced polo-like kinase 1 expression in myelodysplastic syndromes. Blood Res. 2019;54(2):102-7.
141. Munch C, Dragoi D, Frey AV, et al. Therapeutic polo-like kinase 1 inhibition results in mitotic arrest and subsequent cell death of blasts in the bone marrow of AML patients and has similar effects in non-neoplastic cell lines. Leukemia research. 2015;39(4):462-70.

142. Renner AG, Dos Santos C, Recher C, et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. Blood. 2009;114(3):659-62.
143. Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(10):5789-94.
144. Mukhopadhyay NK, Chand V, Pandey A, et al. Plk1 Regulates the Repressor Function of FoxM1b by inhibiting its Interaction with the Retinoblastoma Protein. Sci Rep. 2017;7:46017.
145. Elsayed I, Wang X. PLK1 inhibition in cancer therapy: potentials and challenges. Future Med Chem. 2019;11(12):1383-6.
146. Garcia-Manero G, Fenaux P, Al-Kali A, et al. Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): a randomised, controlled, phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2016;17(4):496-508.
147. Talati C, Griffiths EA, Wetzler M, Wang ES. Polo-like kinase inhibitors in hematologic malignancies. Critical reviews in oncology/hematology. 2016;98:200-10.
148. Dohner H, Lubbert M, Fiedler W, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. Blood. 2014;124(9):1426-33.
149. Navada SC, Fruchtman SM, Odchimar-Reissig R, et al. A phase 1/2 study of rigosertib in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS progressed to acute myeloid leukemia. Leukemia research. 2018;64:10-6.
150. Sur S, Agrawal DK. Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. Mol Cell Biochem. 2016;416(1-2):33-46.
151. Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D, et al. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. Nature. 1991;351(6323):242-5.
152. Aressy B, Ducommun B. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. Anticancer Agents Med Chem. 2008;8(8):818-24.
153. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat Rev Cancer. 2007;7(7):495-507.
154. Kristjansdottir K, Rudolph J. Cdc25 phosphatases and cancer. Chem Biol. 2004;11(8):1043-51.

155. Song L, Han X, Jia C, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits MARC-145 proliferation via inducing apoptosis and G2/M arrest by activation of Chk/Cdc25C and p53/p21 pathway. Virol J. 2018;15(1):169.
156. Broggini M, Buraggi G, Brenna A, et al. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. Anticancer Res. 2000;20(6C):4835-40.
157. Cangi MG, Cukor B, Soung P, et al. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. J Clin Invest. 2000;106(6):753-61.
158. Nishioka K, Doki Y, Shiozaki H, et al. Clinical significance of CDC25A and CDC25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus. Br J Cancer. 2001;85(3):412-21.
159. Ozen M, Ittmann M. Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(13):4701-6.
160. Wang Z, Trope CG, Florenes VA, Suo Z, Nesland JM, Holm R. Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. BMC Cancer. 2010;10:233.
161. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, et al. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. Nat Commun. 2014;5:4770.
162. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. Leukemia. 2001;15(7):1033-7.
163. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17(6):1013-34.
164. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003;17(12):2318-57.
165. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia. 2003;17(12):2474-86.
166. Lucijanic M. Survival analysis in clinical practice: analyze your own data using an Excel workbook. Croatian medical journal. 2016;57(1):77-9.

167. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. Mayo Clin Proc. 2012;87(1):25-33.
168. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. 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):2895-901.
169. Lucijanic M, Livun A, Tupek KM, et al. Heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1) expression is increased in patients with primary and secondary myelofibrosis and may be affecting their survival. Leuk Lymphoma. 2017;58(10):2497-500.
170. Lucijanic M, Livun A, Tomasovic-Loncaric C, et al. Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway Is Dysregulated in Patients With Primary and Secondary Myelofibrosis. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016;16(9):523-6.
171. Lucijanic M, Livun A, Tupek KM, Stoos-Veic T, Pejsa V, Kusec R. Higher Sclerostin/SOST expression is associated with lower percentage of circulatory blasts and better prognosis in patients with myelofibrosis. Ann Hematol. 2018;97(7):1293-4.
172. Lucijanic M, Livun A, Tupek KM, et al. Neutral effect of Glioma-associated oncogene-1 expression on survival in myelofibrosis. Wien Klin Wochenschr. 2019.
173. Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, et al. Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma. Lab Invest. 2009;89(12):1364-73.
174. Mito K, Kashima K, Kikuchi H, Daa T, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of Polo-Like Kinase (PLK1) in non-Hodgkin's lymphomas. Leuk Lymphoma. 2005;46(2):225-31.
175. Imai H, Sugimoto K, Isobe Y, et al. Absence of tumor-specific over-expression of Polo-like kinase 1 (Plk1) in major non-Hodgkin lymphoma and relatively low expression of Plk1 in nasal NK/T cell lymphoma. International journal of hematology. 2009;89(5):673-8.
176. Kanagal-Shamanna R, Lehman NL, O'Donnell JP, et al. Differential expression of aurora-A kinase in T-cell lymphomas. Mod Pathol. 2013;26(5):640-7.
177. Murga-Zamalloa C, Inamdar KV, Wilcox RA. The role of aurora A and polo-like kinases in high-risk lymphomas. Blood Adv. 2019;3(11):1778-87.
178. Lucijanic M, Livun A, Stoos-Veic T, et al. High absolute basophil count is a powerful independent predictor of inferior overall survival in patients with primary myelofibrosis. Hematology. 2018;23(4):201-7.
179. Wen Q, Goldenson B, Silver SJ, et al. Identification of regulators of polyploidization presents therapeutic targets for treatment of AMKL. Cell. 2012;150(3):575-89.

10. Životopis

Ime i prezime: Davor Galušić
Datum rođenja: 09. rujna 1982
Adresa: Ulica dr Franje Tuđmana 16, Trogir
email: davorgalusic@net.hr
mob: +385915137687

Školovanje:

1997 - 2001: Srednja škola „Ivan Lucić“ u Trogiru (opća gimnazija)
2001 - 2007: Medicinski fakultet sveučilišta u Splitu
2013 - 2020: Poslijediplomski studij „Klinička medicina utemeljena na dokazima“ (Evidence based medicine), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2017 - 2018: Stručni poslijediplomski studij „Hematologija“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo:

2008 – 2009: liječnik (obiteljska medicina i hitna medicinska pomoć), otok Lastovo
2009 – 2012: liječnik (obiteljska medicina i hitna medicinska pomoć), otok Korčula (Čara)
2012 – 2018: liječnik (specijalizant hematologije) na Zavodu za hematologiju KBC Split
2018 – : liječnik (specijalist hematolog) na Zavodu za hematologiju KBC Split
2021 – : asistent na Katedri za internu medicinu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Nagrade:

2001: za izvanredne rezultate postignute tijekom srednje škole
2006: dekanova nagrada za izvanredne rezultate postignute tijekom studiranja

Publikacije:

- Galusic D, Lucijanic M, Livun A, et al. Higher AURKA and PLK1 expression are associated with inferior overall survival in patients with myelofibrosis. Blood Cells Mol Dis. 2019;81:102396.

- Galusic D, Lucijanic M, Livun A, et al. CDC25c expression in patients with myelofibrosis is associated with stronger myeloproliferation and shorter overall survival. Wien Klin Wochenschr. 2020.
- Galusic D, Radic M, Lozic D, Breskovic T. Difference between presumed and perceived pain in bone marrow aspiration: pilot study. Intern Med J. 2017;47(6):712-4.
- Lucijanic M, Krecak I, Galusic D, et al. Higher serum uric acid is associated with higher risks of thrombosis and death in patients with primary myelofibrosis. Wien Klin Wochenschr. 2021.
- Lucijanic M, Galusic D, Krecak I, et al. C reactive protein to albumin ratio as prognostic marker in primary and secondary myelofibrosis. Leuk Lymphoma. 2020:1-6.
- Lucijanic M, Galusic D, Krecak I, et al. Reduced renal function strongly affects survival and thrombosis in patients with myelofibrosis. Ann Hematol. 2020.
- Lucijanic M, Galusic D, Soric E, et al. Ruxolitinib treatment improves muscle mass in patients with myelofibrosis. Ann Hematol. 2020.
- Maric A, Milicevic T, Vucak Loncar J, Galusic D, Radman M. Patterns of Glucose Fluctuation are Challenging in Patients Treated for Non-Hodgkin's Lymphoma. Int J Gen Med. 2020;13:131-40.
- Erceg M, Galusic D. [Has femoral neck fracture in older patients to be treated with reposition of fragments and osteosynthesis or with primary aloarthroplasty?]. Acta Med Croatica. 2008;62(5):493-500.
- Galusic D, Petric M, Vicelic CV, Miljak A, Blaslov V. Primary Prophylaxis of Chemotherapy-Induced Febrile Neutropenia in Adult Patients with Lymphoproliferative Disorders - Clinical Experience in University Hospital of Split. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia (Volume 19, Supplement 1, September 2019, Pages s242-s243).
- Izet Hozo i suradnici. Internistička propedeutika (hrvatska i engleska verzija). Izdavač: Hrvatsko gastroenterološko društvo, 2013.

Osobne vještine i kompetencije:

- ECDL (europska računalna diploma – poznavanje naprednog rada na računalu)
- iskustvo provođenja kliničkih studija
- licencirani predavač iz osnova pružanja prve pomoći
- rad sa studentima (vođenje vježbi i seminara na nekoliko kliničkih katedri)
- interes u istraživanju mijeloproliferativnih poremećaja
- strani jezici: engleski
- hobi: košarka, nogomet, skijanje, biljar