

Splanhničke venske tromboze u kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama

Tolić, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:273905>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tina Tolić

**Splanhničke venske tromboze u kroničnim
mijeloproliferativnim neoplazmama**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

- ASXL1- protein regulator transkripcije, (*prema eng. additional sex combs like 1*)
- AT- antitrombin, (*prema eng. Antithrombin*)
- BCS- Budd-Chiari sindrom, (*prema eng. Budd-Chiari syndrome*)
- CARL- kalretikulin, (*prema eng. Calreticulin*)
- CBL- proto-onkogen, (*prema eng. Cbl proto-oncogene*)
- CD11b- diferencijacijski klaster (*prema eng. Cluster of differentiation*)
- CT- kompjutorizirana tomografija (*prema eng. Computed tomography*)
- DKS- diferencijalna krvna slika
- DNA- deoksiribonukleinska kiselina, (*prema eng. deoxyribonucleic acid*)
- DVT- duboka venska tromboza
- E-CFCs- stanice koje stvaraju endotelne kolonije, (*prema eng. Endothelial colony forming cells*)
- EHPVO- ekstrahepatalna venska opstrukcija, (*prema eng. Extrahepatic portal venous obstruction*)
- ELN- Europska mreža za leukemiju, (*prema eng. European LeukemiaNet*)
- EPO- eritropoetin, (*prema eng. Erythropoietin*)
- ET- esencijalna trombocitemija
- EZH2- podjedinica signalnog puta, (*prema eng. enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*)
- fV Leiden- Faktor V Leiden
- Hb- hemoglobin
- HYU- hidroksiureja, (*prema eng. Hydroxyurea*)
- IDH- izocitrat dehidrogenaza, (*prema eng. Isocitrate dehydrogenase*)
- IFN α - Interferon alfa, (*prema eng. Interferon alpha*)
- INR- internacionalni normalizirani omjer (*prema eng. international normalized ratio*)
- JAK1- Janus kinaza 1, (*prema eng. Janus kinase 1*)
- JAK2- Janus kinaza 2, (*prema eng. Janus kinase 2*)
- JAK3- Janus kinaza 3, (*prema eng. Janus kinase 3*)
- JH2- pseudokinazna domena u signalnom putu Janus kinaze

KKS- kompletna krvna slika

KML- kronična mijelogena leukemija

KV- kardiovaskularni

MDS- mijelodisplastični sindrom

MPL- trombopoetinski receptor, (*prema eng. thrombopoietin receptor*)

MPN- mijeloproliferativne neoplazme

MR- magnetska rezonancija, (*prema eng. Magnetic resonance*)

MSCT- višeslojna kompjutorizirana tomografija, (*prema eng. Multislice computed tomography*)

OLT- ortotopna transplantacija jetre, (*prema eng. orthotopic liver transplantation*)

pb- parovi baza

PC- protein C

PCR- lančana reakcija polimerazom, (*prema eng. polymerase chain reaction*)

PE- plućna embolija

Ph- negativne MPN- Philadelphia kromosom negativne mijeloproliferativne neoplazme, (*prema eng. Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms*)

PI3K fosfoinozimid 3-kinaza, (*prema engl. phosphoinositide 3-kinase*)

PMF- primarna mijelofibroza

PS- protein S

PT G20210A- protrombin G20210A

PTA- perkutana transluminalna angioplastika, (*prema eng. Percutaneous transluminal angioplasty*)

PV- policitemija vera

RT-PCR- lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, (*prema eng. Real- Time polymerase chain reaction*)

SLE- Sistemska eritematozni lupus

sMF- sekundarna mijelofibroza

STAT- prijenosnik signala i aktivator transkripcije, (*prema engl. signal transducer and activator of transcription*)

SVT- splahnjičke venske tromboze

SZO- Svjetska zdravstvena organizacija

TET2 – tet metilcitozin dioksigenaza 2, (*prema eng. tet methylcytosine dioxygenase 2*)

TIPS- transjugularni intrahepatički portosistemski spoj, (*prema eng. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt*)

TVL- tromboza vene lijenalis, (*prema lat. Vena Lienalis*)

TVM- tromboza vena mesenterika, (*prema lat. Venae Mesentericae*)

TVMS- tromboza vene mezenterike superior, (*prema lat. Vena Mesenterica Superior*)

TVP- tromboza vene porte, (*prema lat. Vena Portae*)

TYK2- tirozin kinaza 2, (*prema eng. Tyrosine kinaze 2*)

UZV- ultrazvuk

V617F- mutacija 617. kodona koja dovodi do zamjene valina fenilalaninom

VTE- venske tromboembolije

W515L- mutacija gena za trombopoetinski receptor

WBC- bijele krvne stanice, (*prema eng. White Blood Cells*)

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	I
SUMMARY.....	III
1. UVOD.....	1
2. EPIDEMIOLOGIJA.....	2
3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	2
3.1. JAK 2 V617F MUTACIJA.....	3
3.1.1. ULOGA JAK2 V617F MUTACIJE U MPN.....	4
3.1.2. DIJAGNOSTIČKI I TERAPIJSKI ZNAČAJ JAK 2 V617F MUTACIJE.....	4
3.2. MUTACIJA JAK2 U EKSONU 12.....	6
3.3. CALR MUTACIJA.....	6
3.4. MPL MUTACIJA.....	7
3.5. PROMJENE U ENDOTELNIM STANICAMA I LEUKOCITIMA.....	7
4. PREDIKTORI ZA RAZVOJ VENSKE TROMBOZE U MPN.....	8
5. KLINIČKA SLIKA SVT SA PODLEŽEĆOM MPN.....	10
6. DIJAGNOSTIČKI IZAZOVI.....	12
7. TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI.....	15
8. HIPOTEZA.....	17
9. CILJEVI RADA.....	18
10. ISPITANICI I METODE.....	19
11. REZULTATI.....	20
12. RASPRAVA.....	23
13. ZAKLJUČAK.....	25
14. ZAHVALE.....	26
15. LITERATURA.....	27
16. ŽIVOTOPIS.....	34

SAŽETAK

SPLANHNIČKE VENSKE TROMBOZE U KRONIČNIM MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZMAMA

Tina Tolić

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

UVOD: Kronične mijeloproliferativne neoplazme su skupina klonalnih poremećaja matične stanice koja se odlikuje abnormalnom proliferacijom jedne ili više mijeloidnih loza. PV,ET i PMF zajedničkim imenom nazivaju Philadelphia-negativne kronične mijeloproliferativne neoplazme. Splanhničke venske tromboze predstavljaju najznačanije komplikacije mijeloproliferativnih neoplazmi, ali i jedini neovisan čimbenik rizika za letalni ishod od ove skupine bolesti. Kod pacijenata sa MPN-om najčešće je zastupljen BCS sa učestalošću od 40,9% , zatim ga slijede TVP sa učestalošću od 31,5%, TVM i TVL su znatno rjeđe od prethodno navedenih. JAK2 V617F mutacija otkrivena 2005. godine ima veliku važnost u dijagnostici MPN. Mutacija JAK2 V617F prisutna je u oko 96% bolesnika s PV-om i u 55-65% bolesnika s ET-om i PMF-om. Iako je utvrđen dijagnostički značaj ove mutacije, njezina uloga u dugoročnom praćenju pacijenata sa MPN još uvijek nije jasna. Pacijente negativne na JAK2 V617F u dijagnostičkom algoritmu potrebno je testirati na rjeđe mutacije poput CARL i MPL.

ISPITANICI I METODE: Istraživanje je provedeno na 7 pacijenata dijagnosticiranih i praćenih u KB Dubrava od 2006.godine nadalje. Pacijenti obuhvaćeni ovom studijom bili su ženskog spola, a medijan dobi je iznosio 56g. Pacijentice su testirane na JAK2V617F mutaciju te im je provedena kvantitativna analiza opterećenosti mutiranim alelom. Ujedno su im analizirani laboratorijski i klinički parametri prisutni u vrijeme dijagnoze.

REZULTATI: Sve pacijentice u trenutku dijagnoze su se prezentirale sa TVP, 5 pacijentica je imalo i TVL, a 1 i TVMS. Analizirani laboratorijski i klinički parametri nisu pokazivali jasnu sliku mijeloproliferacije. Kvantitativnom analizom opterećenosti mutiranim JAK2 V617F alelom rađenom na 4 pacijenta dobili smo nisku opterećenost mutiranim alelom koja se kretala od 4,23%-16,43%. Šest pacijentica je ispunjavalo kriterije za ET, a jedna i za ET i za PMF. Od pridruženih čimbenika rizika za trombozu tri pacijentice su prilikom testiranja na trombofiliju bile pozitivne na PTG20210A, deficit proteina C, i FV Leiden.

RASPRAVA: U skladu sa prethodnim radovima naša studija je dokazala nisku opterećenost mutiranim alelom kod pacijenata sa ET. Također primjetili smo i predominaciju ženskog spola kod pacijenata sa ET koji se prezentiraju sa SVT kao i izostanak jasnih znakova mijeloproliferacije u perifernoj krvi.

ZAKLJUČAK: SVT često predstavljaju prvu manifestaciju podležeće MPN čak i prije nego se u krvnoj slici primijete znakovi mijeloproliferacije. Sukladno tome, pacijente koji se prezentiraju sa SVT, a prethodno smo isključili jetrenu patologiju potrebno je testirati na MPN. Kvantitativna analiza opterećenosti JAK2 V617F alelom mogla bi imati važnu ulogu u određivanju podentiteta MPN. Niska razina opterećenosti mutiranim alelom govori u prilog ET.

KLJUČNE RIJEČI: kronične mijeloproliferativne neoplazme, mutacija, JAK2 V617F, opterećenost mutiranim alelom

SUMMARY

SPLANCHNIC VEIN THROMBOSIS IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Tina Tolić

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

INTRODUCTION: Chronic myeloproliferative diseases are a group of clonal stem cell disorders characterized by abnormal proliferation of one or more myeloid cell lines. PV, ET and PMF are all known under the name of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Splanchnic vein thrombosis is one of the most significant complications of myeloproliferative neoplasms and also the only independent risk factor for a fatal outcome in this group of diseases. Patients with MPNs most commonly develop BCS that occurs in 40,9% of the cases, followed by TVP in 31,5% of the cases with TVL and TVM that are not so commonly present. JAK2 V617F mutation, discovered in 2005, is an important diagnostic tool for the detection of MPNs. This mutation is found in 96% of the patients with PV and in 55-65% of patients with ET and PMF. Although useful in diagnosing patients, the role in long term follow up of the patients with MPNs is still unclear. JAK2 V617F-negative patients must be tested for rare mutations like CARL and MPL.

SUBJECTS AND METHODS: Seven patients, diagnosed and followed up in a clinical hospital Dubrava since 2006, were recruited for this research. All of the subjects in this research were female and the mean age was 56 years. Subjects were tested for JAK2V617F mutations and a quantitative analysis of mutant allele burden was run. Their laboratory and clinical parameters, that were present when they were diagnosed, were also analysed.

RESULTS: Upon being diagnosed with MPNs all of the patients were presented with TVP, 5 of them had also have a TVL, while only one presented with both TVP and TVMS. No clear signs of myeloproliferation were found in an analysed laboratory and clinical data. The results of quantitative analysis of JAK2 V617F allele burden on samples of 4 patients were 4,23%-16,43% which indicates low mutant allele burden. Six of the patients met the criteria for ET and one for ET and PMF. During the testing for thrombophilia three patients were PTG20210A, deficit of protein C and FV Leiden positive, all of them being associated risk factors for thrombosis.

DISCUSSION: Our study showed that there is a low mutant allele burden in patients with ET which is in correlation with other studies. In addition, patients with ET that presented with SVT were mostly female and an absence of overt myeloproliferative signs was found in a peripheral blood.

CONCLUSION: SVT is often presented as a first manifestation of MPN even before notable signs of myeloproliferation in peripheral blood are shown. According to this, patients that present with SVT, and with previously excluded liver disease, should be tested for MPN. Quantitative analysis of JAK2 V617F allele could be an important diagnostic tool for detection of MPN's sub entities. Low mutant allele burden is connected with ET.

KEY WORDS: Chronic myeloproliferative neoplasms, mutation, JAK2 V617F, mutant allele burden

1. UVOD

Kronične mijeloproliferativne neoplazme su skupina klonalnih poremećaja matične stanice koja se odlikuje abnormalnom proliferacijom jedne ili više mijeloidnih loza (granulocitne, megakariocitne, mastocitne i eritroidne). Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine u ovu skupinu ubrajamo osam entiteta: kroničnu mijelogenu leukemiju (KML), policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET), primarnu mijelofibrozu (PMF), kroničnu neutrofilnu leukemiju, kroničnu eozinofilnu leukemiju, mastocitozu i neklasificiranu mijeloproliferativnu neoplazmu (1). Najranije otkriveni i najčešće dijagnosticirani entiteti iz ove skupine su KML, PV, ET i PMF te ih zajedničkim imenom nazivamo klasičnim mijeloproliferativnim neoplazmama (2). Danas se KML izdvaja kao zaseban entitet, dok se PVT, ET i PMF zajedničkim imenom nazivaju Philadelphia-negativne kronične mijeloproliferativne neoplazme. Kao najčešće komplikacije ove skupine neoplazmi javljaju se progresija PV i ET u sekundarnu mijelofibrozu (sMF) i akutnu leukemiju te trombohemoragični incidenti (3). Iako pacijenti s MPN imaju povećan rizik i za arterijske i za venske trombotske incidente, studije su pokazale da arterijski incidenti poput cerebrovaskularnog infarkta i akutne koronarne bolesti imaju veću učestalost (4). MPN ujedno zauzimaju drugo mjesto kao uzročnici splahnjičke venske tromboze (SVT) prema pojedinim sijelima neoplazmi, smjestivši se odmah iza neoplazme jetre (5).

Splahnjičke venske tromboze predstavljaju najznačajnije komplikacije mijeloproliferativnih neoplazmi, ali i jedini neovisan čimbenik rizika za letalni ishod od ove skupine bolesti (4). Ekstrahepatalne venske opstrukcije (EHVO) i Budd-Chiari sindrom (BCS) predstavljaju vrlo rijetke oblike splahnjičkih venskih tromboza (SVT) uzrokovanih aktivacijom hemostatskog sustava u okviru klonalnih poremećaja hematopoeze (6), za razliku od duboke venske tromboze (DVT) i plućne embolije (PE) te superficijalnog tromboflebitisa koji predstavljaju najčešće venske tromboembolije (VTE) u pacijenata sa MPN (4). SVT obuhvaćaju parcijalnu ili kompletnu trombotsku opstrukciju jedne, odnosno nekoliko glavnih vena splahnjičkog slijeva: v. portae, v. lienalis, v. mesentericae i v. hepatica (Budd-Chiarijev sindrom). Ono što SVT čini jednom od najvažnijih komplikacija MPN je činjenica da primjerice TVP posebice u mlađih ženskih osoba može biti ujedno i prva manifestacija podležeće mijeloproliferativne bolesti (7).

2. EPIDEMIOLOGIJA

Prevalencija SVT u općoj populaciji iznosi 1-2%, što se najvećim dijelom odnosi na trombozu vene porte TVP (40%), multisegmentalne SVT prisutne su kod 38% dijagnosticiranih, dok BCS zauzima svega 5% i time čini najrjeđi oblik SVT (4). Etiologija SVT je heterogena te obuhvaća lokalne i sistemske protrombotske čimbenike i stanja (7). Kao najčešće uzroke SVT studije navode cirozu jetre sa učestalošću od 24%, drugo mjesto zauzimaju tumori hepatobilijarnog sustava (jetra, pankreas) sa učestalošću od 27%. Izuzmemo li ove uzroke koje možemo nazvati lokalnim, i do 40% svih SVT-a nastaje kao posljedica mijeloproliferacije (8), zbog čega se MPN profiliraju kao najčešći sistemski uzrok splanhničnih venskih tromboza ostavljajući za sobom ostale uzroke kao što su hereditarna trombofilija, paroksizmalna noćna hemoglobinurija, Bechetova bolest i terapija oralnim kontraceptivima (9). Metaanalitička studija (8) pokazuje suprotnost kod učestalosti mjesta venske tromboze unutar splanhničkog sustava pacijenata s MPN-om u odnosu na opću populaciju. Kod pacijenata sa MPN-om najčešće je zastupljen BCS sa učestalošću od 40,9%, zatim ga slijedi TVP sa učestalošću od 31,5%. Multisegmentalne tromboze i tromboze vene lijenalis koje nisu uzete u ovu studiju su rjeđe od prethodno navedenih. PV je najučestaliji tip MPN-a povezan sa SVT (52,9% BCS, odnosno 27,5% EHPVO). ET je druga po učestalosti kao podležea bolest kod SVT, pronađena kod 24,6% pacijenata sa BCS, odnosno njih 26,2% sa EHPVO, dok je PMF pokazuje učestalost od 6,7% pacijenata sa BCS i 12,8% pacijenata sa EHPVO (10).

3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA

Patogeneza tromboze u pacijenata sa Ph-negativnim MPN je izrazito kompleksna. Riječ je o kombiniranim mehanizmima koji obuhvaćaju kliničke faktore rizika za trombozu općenito (dob, prethodna tromboza, pretilost, hipertenzija, hiperlipidemija), promjene u krvnoj slici poput povećanja broja trombocita, eritrocita i granulocita koji također utječu na sklonost trombotskim komplikacijama kod ovih pacijenata. Međutim, abnormalnosti krvnih stanica u ovim poremećajima nisu posljedica samo povećanja broja stanica kao rezultata klonalne proliferacije, nego i kvalitativnih promjena stanica koje doprinose eksprimiranju prokoagulantnog fenotipa (3). Strukturne promjene stanica cirkulirajuće krvi te endotelnih stanica u splanhničkom spletu primijećene su kod pacijenata sa SVT-om. Primjerice, kod

pacijenata sa ET i PV trombociti su pokazivali strukturne defekte, sklonost abnormalnoj agregaciji te poremećen metabolizam, posebice kod nosioca JAK2 (Janus kinaza 2) mutacije (11). Naime, u podlozi većine kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi možemo naći leziju jednog ili više gena koji kodiraju citoplazmatske ili receptorske protein tirozin kinaze (PTK). Riječ je o porodici proteina odgovornima za intracelularni prijenos signala, aktiviranim receptorima hematopoetskih faktora i citokina (12). Mutirana kinaza uzrokuje konstantnu aktivaciju signalnog puta hematopoeze, što rezultira nereguliranom proliferacijom malignog klona. U slučaju Ph-negativnih MPN, genske lezije ujedno čine i potvrdu postojanja neoplazmatskog procesa. Danas poznate lezije uključuju gene: JAK2 (ekson 14 i ekson 12), MPL (ekson 10), CALR (ekson 9) koje se sve više koriste u sklopu rutinske obrade pacijenata sa SVT-om suspektnim na MPN, dok ostale lezije poput TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, CBL i EZH2 su ipak puno rjeđe (13).

3.1. JAK 2 V617F MUTACIJA

Mutacija JAK2 V617F prisutna je u oko 96% bolesnika s PV-om i u 55-65% bolesnika s ET-om i PMF-om (14). Prevalencija mutiranog alela u SVT-u varira između pojedinih studija (7%-60%). Međutim, većina autora navodi vrijednosti koje se kreću između 20% i 40% (4). Također, JAK2 V617F mutacija je prisutna kod pacijenata sa SVT i bez kliničke slike koja bi sugerirala na mijeloproliferativni proces, dok je kod pacijenata sa MPN koji su razvili arterijsku trombozu ili vensku trombozu drugih mjesta vrlo rijetka (15). Primijećeno je češće pojavljivanje mutacije kod pacijenata sa BCS (45.2%) u usporedbi sa TVP (34.3%) (16). Uzimajući u obzir postotke u kojima JAK 2 V617F mutacija korelira sa podležućom MPN (posebice u slučaju PV) možemo zaključiti kako je ova mutacija vrlo senzitivna marker za MPN, posebice u njihovoj latentnoj fazi kada krvna slika još uvijek ne pokazuje znakove mijeloproliferacije. Međutim, trebamo spomenuti i da ova mutacija ima nisku negativnu prediktivnu vrijednost uzevši u obzir da može biti odsutna u značajnom broju (oko 40%) pacijenata sa ET ili PMF (14).

3.1.1. ULOGA JAK2 V617F MUTACIJE U MPN

Izuzetnu važnost u patogenezi Ph-negativnih MPN imaju stečene mutacije gena JAK2. Ovaj gen je smješten na kratkom kraju 9. kromosoma (9p24) (17). Njegov proteinski produkt član je porodice citoplazmatskih PTK-a kojima pripadaju JAK1, JAK3 i tirozin kinaza 2 (TYK2). JAK2 protein je nekovalentno vezan za membranski receptor i zauzima inaktivnu konformaciju. Vezanje liganda za receptor dovodi do strukturne promjene proteina, utječući tako na domenu JH2 te rezultira slabljenjem regulacije i aktivacijom kinazne aktivnosti. Istraživanja su pokazala da aktivirani JAK2 fosforilira tirozinske ostatke na vlastitoj molekuli i drugim proteinima, pokrećući tako signalnu kaskadu koja uključuje prijenos signala i aktivativaciju transkripcije putem STAT (prema eng. signal transducer and activator of transcription), mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) (18).

Najčešća mutacija gena JAK2 u mijeloproliferativnim neoplazmama je promjena gvanina u timin (G > T) na 1849. poziciji u eksonu 14 koja dovodi do zamjene valina fenilalaninom (V > T) u 617. kodonu (19, 20, 21, 22). Zamijenjena aminokiselina nalazi se na mjestu kontakta između katalitičke i pseudokinazne domene. Ova mutacija dovodi do popuštanja autoregulacije proteina JAK2 i njegove konstitutivne aktivacije (23,24). Mutirani protein hiperfosforilira i stabilizira druge proteine uključene u signalne putove što produljuje trajanje signala (24). V617F mutacija također utječe na ekspresiju gena modificirajući strukturu kromatina, uz to negativno utječe na apoptozu omogućujući preživljenje stanici sa oštećenom DNA te uzrokuje gensku nestabilnost.

3.1.2. DIJAGNOSTIČKI I TERAPIJSKI ZNAČAJ JAK 2 V617F MUTACIJE

Testiranje na mutaciju JAK2 V617F pomoću alel-specifične lančane reakcije polimerazom (PCR) danas je dio rutinske dijagnostike MPN-a koja se provodi u ranoj fazi obrade pacijenta. Nekolicina istraživanja pokazuje kako se pacijenti sa prisutnom JAK2V617F mutacijom razlikuju prema laboratorijskim parametrima od onih koji nemaju mutaciju. JAK2 V617F pozitivni bolesnici sa SVT-om prezentiraju se sa višim razinama hemoglobina i leukocita, a ujedno je u ovoj skupini pacijenata zabilježen i statistički značajan porast hematokrita i broja trombocita (16). Pacijenti koji su nositelji jednog ili dva mutirana alela razlikovali su se od pacijenata koji nisu imali mutaciju prema broju trombocita koji je iznosio u prosjeku

$386 \times 10^9/L$, u odnosu na pacijente bez mutacije kod kojih je bio $278 \times 10^9/L$. Broj leukocita također je imao veće vrijednosti kod prisutne mutacije ($10,3 \times 10^9/L$ naprema $8,1 \times 10^9/L$) kao i promjer slezene. Uz ove razlike prikazuje se i statistički značajna razlika u broju trombocita, WBC broju i promjeru slezene između heterozigota i homozigota za mutaciju (6). Unatoč ovim razlikama u laboratorijskim parametrima kod nositelja JAK2 mutacije u odnosu na pacijente koji nemaju mutaciju čini se kako JAK2 status ipak nema utjecaja na preživljenje u TVP-u. Sukladno navedenome, JAK2 V617F ima značajnu ulogu u rutinskoj dijagnostici pacijenata sa SVT kao marker podležće kronične mijeloproliferativne neoplazme, za razliku od trombotskih evenata drugih mjesta koja nisu pokazala značajnu povezanost sa ovom mutacijom (25).

Učestalost ove mutacije kod pacijenata sa MPN dovela je do pokušaja primjene JAK2 inhibitora u terapiji Ph-negativnih kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi koji se već primjenjuju u liječenju kronične mijelogene leukemije. No, za sada iskustvo sa JAK2 inhibitorima kod pacijenata koji nisu dijagnosticirani kao PMF, ili nisu u fazi sekundarne mijelofibroze je dosta ograničeno. Do danas je više inhibitora JAK2 razvijeno do razine kliničkih ispitivanja. Rezultati prvenstveno u kliničkim studijama PMF-a pokazuju kako poboljšavaju kliničku sliku bolesti reducirajući splenomegaliju i sistemske simptome (26). Ruxolitininib primjerice je postigao normalizaciju broja trombocita kod 49% pacijenata sa ET od čega je kod 82% broj trombocita pao ispod $600 \times 10^9/L$ unutar 15 mjeseci od primjene (27). U istraživanjima koja su uključivala pacijente sa PV pokazao je slično kao i kod PMF redukciju veličine slezene i poboljšanje simptoma poput pruritusa, noćnog znojenja i koštane boli te se pokazao učinkovitim kod pacijenata koji su se pokazali refraktornim ili netolerantnim na hidroksiureju (HYU). Također otvara se pitanje koliko je moguće da ovi učinci osim na redukciju veličine slezene mogu utjecati na druge komplikacije MPN-a kao što je hepatomegalija, splanhnička tromboza, ili pulmonalna hipertenzija (28). Ono što otežava primjenu JAK2 inhibitora općenito u tretmanu Ph-negativnih MPN pa tako i u njihovoj potencijalnoj učinkovitosti kod SVT je činjenica da pluripotentne krvotvorne matične stanice nisu ovisne isključivo o JAK2.

3.2. MUTACIJA JAK2 U EKSONU 12

Vrlo rijetka mutacija JAK 2 gena koja je zabilježena kod manje od 5 % pacijenata sa PV (16), a zabilježena je i kod manjeg broja pacijenata sa ET. Opisano je oko 27 različitih mutacija ovog gena koje uključuju delecije, duplikacije i supstitucije (29). Promjena u eksonu 12 uzrokuje pojačanu ekspresiju proteinskog produkta te aktivacijom signalne kaskade koja uključuje fosforilaciju JAK2 i STAT5 uzrokuje proliferaciju stanice i bez prisutnosti izvanstaničnog citokina. Osim ovog signalnog puta može se naći i aktivacija Ras-ERK signalnog puta. Promjene JAK2 gena u eksonu 12 uzrokuju pojačanu osjetljivost na faktore rasta te aktiviraju biokemijske puteve uključene u aktivaciju eritropoetina (30). U kliničkoj slici pacijenti sa mutacijom u eksonu 12 se tipično prezentiraju sa izoliranom eritrocitozom i niskim razinama eritropoetina za razliku od pacijenata sa JAK2 V617F kod kojih imamo trilinearnu proliferaciju. Nalaz koštane srži kod ovih pacijenata također upućuje na proliferaciju eritroidnog klona dok megakariocitna atipija i formiranje klastera često izostaje (29).

3.3. CALR MUTACIJA

CALR (calreticulin) mutacija prisutna je u polovici pacijenata kojima su temeljem molekularne dijagnostike isključene mutacije gena JAK2 i mutacija gena MPL (31). Riječ je najčešće o pacijentima sa ET kod kojih je mutacija prisutna u 15%- 30% pacijenata. CALR gen je lociran na kratkom kraju 19. kromosoma (19p13.2). Njegov proteinski produkt CALR je prisutan u endoplazmatskom retikulumu, iako se također može naći u nukleusu, staničnoj membrani i ekstracelularnom matriksu te predstavlja ključnu komponentu u mehanizmu kontrole kalcija, omogućuje normalno formiranje glikoproteina, sudjeluje u različitim procesima poput proliferacije, apoptoze ili fagocitoze potičući preživljenje tumorskih stanica (32). Do sada je zabilježeno 36 mutacija CALR gena kod pacijenata sa MPN-om. Najčešće su mutacije na području 9 eksona označene kao tip 1 odnosno tip 2 mutacija. U mutaciji tipa 1 imamo deleciju od 52 pb u području eksona 9, dok kod tipa 2 mutacije na istom području se nalazi insercija od 5 pb (33). Mutacije CALR gena prisutne na eksonu 9 pronađene su kod 2% pacijenata sa SVT i podležećom MPN. Uglavnom se radi o pacijentima sa ET-om i PMF-om. Iako u populaciji bolesnika sa SVT i podležećom MPN ova mutacija ima malu učestalost, određena istraživanja nam pokazuju kliničke karakteristike pacijenata sa navedenom

mutacijom, a ujedno i važnost ove mutacije. Naime, prema autorima (31) pacijenti sa CALR mutacijom su uglavnom mlađe životne dobi od pacijenata koji su nosioci JAK2 mutacije te ovi pacijenti češće spadaju u skupinu sa nižim, ili umjerenim rizikom za razvoj tromboze. Također, ovi pacijenti imaju niži WBC broj i razine Hb u usporedbi sa pacijentima sa JAK 2 mutacijom.

3.4. MPL MUTACIJA

MPL (thrombopoietin receptor) gen nalazi se na kratkom kraju 1.kromosoma (1p34). Njegov proteinski produkt je trombopoetinski receptor odgovoran za vezanje trombopoetina koji regulira diferencijaciju megakariocita i produkciju trombocita. Vezujući trombopoetin MPL aktivira JAK2 rezultirajući tako aktivacijom JAK2 i inicijacijom signalne kaskade koja negativno utječe na staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanice (29). Većina mutacija nalazi se u eksonu 10 od kojih je najčešća W515L mutacija. Mutacije MPL gena pronađene su kod 3-5% pacijenata sa MPN i to prvenstveno kod pacijenata sa PMF-om i ET-om (34). Ulogu ove mutacije kao prediktora tromboze kod pacijenata sa MPN je dosta teško objasniti zbog niske učestalosti same mutacije. No, MPL mutacija je dokazan rizičan čimbenik za razvoj mikrovaskularnih poremećaja, sugerirajući da hiperaktivnost, a samim time i pojačana agregacija trombocita bi mogla biti povezana sa aktivacijom mutiranog MPL gena (31). Iako je ova mutacija dokazana u vrlo malom broju slučajeva u usporedbi sa mutacijom JAK2 V617F, ona ima značaj kod bolesnika sa MPN koji su se temeljem molekularne dijagnostike pokazali negativnima na mutaciju JAK2 V617F.

3.5. PROMJENE U ENDOTELNIM STANICAMA I LEUKOCITIMA

Unatoč brojnim opisanim slučajevima SVT i dokazanom povezanosti sa MPN, još uvijek nije poznat točan uzrok zbog čega je splahnhički venski splet jedno od češćih mjesta tromboze kao prve manifestacije same mijeloproliferativne bolesti. Kvalitativni poremećaji pronađeni u krvnim stanicama, mikročesticama i plazmatskim proteinima čine se značajnim čimbenikom u nastanku SVT iako njihova uloga još uvijek nije u potpunosti jasna, ali baca novo svjetlo na dodatne mehanizme koji bi mogli biti uključeni u nastanak tromboze na ovim mjestima (4). Istražuje se i značaj poremećaja u endotelnim stanicama i cirkulirajućim leukocitima (neutrofili i monociti) koji bi mogli utjecati na hiperkoagulabilnost i povećanu agregaciju

trombocita te stvaranje leukocitno-trombocitnih agregata. Specifičnost SVT u pacijenata sa MPN mogla bi biti uzrokovana specifičnošću endotela u portalnoj i hepatalnoj cirkulaciji (35). E-CFCs (prema eng. Endothelial colony forming cells) pokazuju određene abnormalnosti u MPN. Primjerice, E-CFCs koje su eksprimirale JAK2 V617F su pokazale veću adherentnost za cirkulirajuće monocite (36). Naime, autori ove studije su došli do spoznaje o postojanju zajedničke progenitorne hematopoetske i endotelne bilinearne stanice u Ph-negativnim MPN. Ova spoznaja bi mogla podupirati hipotezu da patogeneza tromboze u MPN može biti rezultat i disfunkcije endotelnih stanica koje eksprimiraju JAK2 mutaciju, aktivirajući JAK/STAT signalni put u endotelnim stanicama, regulirajući tako odgovor endotelnih stanica na ozljedu. Osim endotelnih stanica koje mogu imati odlučujuću ulogu u patogenezi tromboze studije su pokazale i mogućnost utjecaja ostalih stanica cirkulirajuće krvi. Povećan broj neutrofila i njihova aktivacija te formiranje trombocitno-neutrofilnih agregata također bi moglo imati važnu ulogu u nastanku SVT. Studija (37) pronalazi povećanu ekspresiju CD11b antigena na membranama cirkulirajućih neutrofila kod pacijenata s PV, posebice kod pacijenata sa TVP i BCS u usporedbi sa zdravim kontrolama i pacijentima sa TVP/BCS, ali bez podležeće PV kao i kod pacijenata sa PV, ali bez klinički dokazane SVT. CD11b pripada porodici beta2 integrina odgovoran za prijanjanje neutrofila za receptore endotelnih stanica, proteina izvanstaničnog matriksa, i trombocitnih glikoproteina. Ovaj antigen se koristi kao marker aktivacije neutrofila. Iako nalazi ovih dvaju studija sugeriraju da kompleksnost SVT kao kliničke manifestacije MPN-a uključuje i dodatne patogenetske mehanizme, još uvijek nije moguće razjasniti zbog čega se MPN manifestira baš kao BCS ili TVP i zašto je ovo područje sklono nastanku tromboze kao prve manifestacije MPN-a.

4. PREDIKTORI ZA RAZVOJ VENSKE TROMBOZE U MPN

Osim već opisane sklonosti razvoja venske tromboze kod pacijenata sa mutacijom JAK 2 V617F, brojni drugi čimbenici kako endogeni tako i egzogeni ukoliko postoje kod pacijenata sa MPN-om povećavaju rizik za razvoj tromboze.

Od endogenih faktora kao rizični čimbenici uzeta su trombofilijaska stanja poput deficita antitrombina (AT), deficita proteina C (PC), deficita proteina S (PS), Faktor V Leiden (fV Leiden), protrombin G20210A (PT G20210A), autoimune bolesti poput sistemskog eritematoznog lupusa (SLE) te paroksizmalna noćna hemoglobinurija. Egzogeni čimbenici koji potiču nastanak tromboze su korištenje oralnih kontraceptiva i nadomjesna hormonska

terapija estrogenom (38). Određene studije (16) su pokušale doći do zaključka postoji li veća prevalencija trombofilijских stanja kod pacijenata sa MPN-om koji su nositelji JAK2 V617F mutacije, što bi moglo utjecati na veću učestalost pojave SVT kod ovih pacijenata, no čini se da ipak ne postoji direktna povezanost, jer rezultati pokazuju podjednaku prevalenciju trombofilijских stanja kod pacijenata sa prisutnom mutacijom kao i kod onih bez mutacije. Ovakav rezultat nas navodi na zaključak da je ipak riječ o aditivnom učinku, odnosno o kombiniranom učinku više različitih patogenetskih mehanizama.

Dob pacijenta predstavlja neovisan rizični čimbenik za razvoj kako arterijske tako i venske tromboze (39). Iako učestalost tromboze kao i ponovnog javljanja iste je veća kod pacijenata iznad 60g (40), brojne studije na pacijentima sa SVT-om pokazuju upravo suprotno. Splanhničke venske tromboze imaju veću tendenciju pojavljivanja među mlađim dobnim skupinama (41,42), a čini se kako važnu ulogu ima i spol pacijenata. Naime, veća prevalencija SVT je utvrđena kod mlađih ženskih osoba generativne dobi, a posebice kod nositeljica JAK2 V617F mutacije (43). Primjerice, studija (7) navodi da je prilikom dijagnoze TVP 70% pacijenata bilo ženskog spola, a medijan dobi pacijentica iznosio je 48g. Podaci za BCS pokazuju još nižu životnu dob prilikom dijagnoze (oko 41g) (44). Ono što još uvijek ostaje nejasno je razlog zbog kojeg se SVT pojavljuju kod mlađih ženskih osoba, vrlo često kao prva manifestacija bolesti. O mogućim uzrocima za sad postoje samo nagađanja, ali smatra se da bi upravo ovi pridruženi čimbenici poput trombofilijских stanja, ili uzimanja oralnih kontraceptiva, kao i trudnoća te postpartalno razdoblje mogli imati važnu ulogu.

Sumarno, možemo reći da najveći utjecaj u riziku pacijenata sa podležećom MPN za razvoj tromboze imaju dob, prisutnost JAK2 V617F mutacije, prethodna tromboza te prisutnost kardiovaskularnih (KV) čimbenika rizika. Tako ove pacijente možemo svrstati u tri skupine:

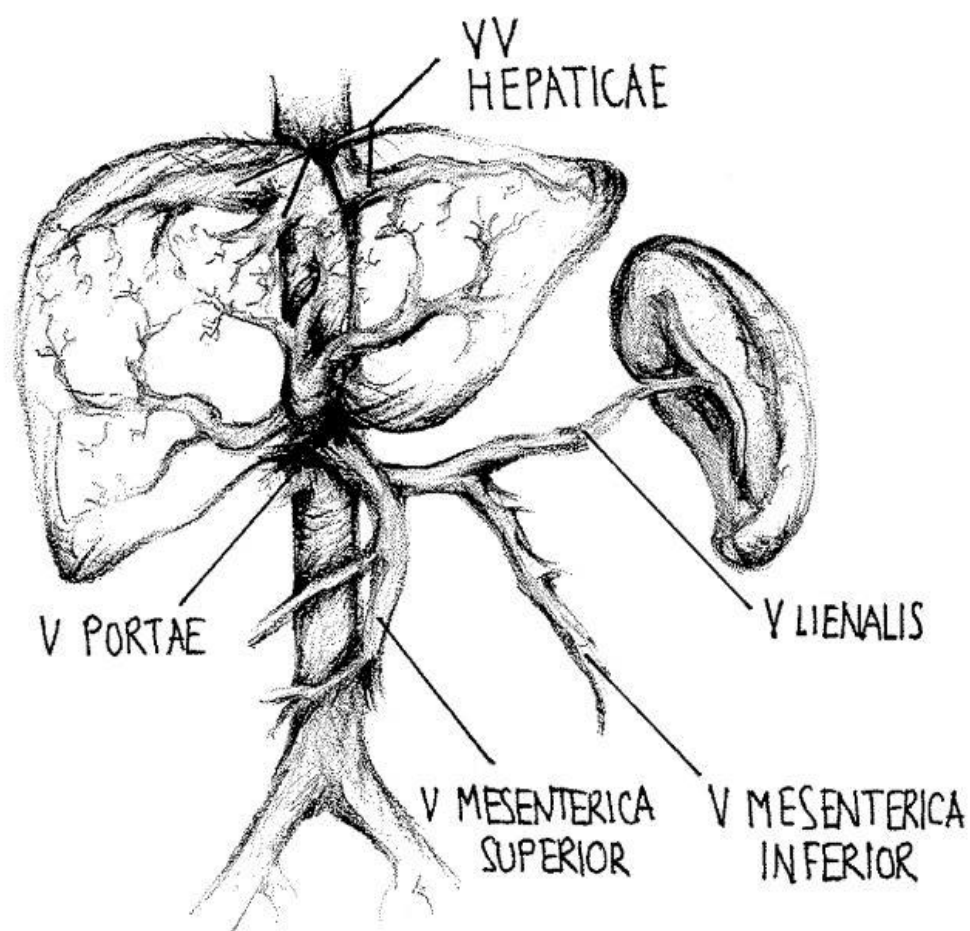
Pacijenti s niskim rizikom za razvoj tromboze su JAK2 V617F negativni, nemaju od prije poznatu trombozu, mlađi su od 60g i nemaju KV rizične čimbenike. U skupinu sa umjerenim rizikom svrstavamo pacijente koji nisu imali prethodnu trombozu, mlađi su od 60g, ali imaju prisutne kardiovaskularne čimbenike rizika ili prisutnu JAK2V617F mutaciju. Skupinu visokog rizika odlikuje dob veća od 60g /osobna anamneza trombotskog eventa i JAK2 V617F mutacija/ KV rizični čimbenici (3, 31).

5. KLINIČKA SLIKA SVT SA PODLEŽEĆOM MPN

Splanhnički venski sustav obuhvaća vene portalnog slijeva te hepatičke vene kako je prikazano na slici 1. Najveće vene portalnog sustava su v. portae, v. mesenterica superior, v. lienalis koje formiraju deblo v. porte te v. mesenterica inferior koja se ulijeva u v. lienalis.

SLIKA 1.

SPLANHNIČKI VENSKI SUSTAV



Autorica : Irma Tješić-Drinković

Budd-Chiari sindrom definira se kao opstrukcija bilo kojeg dijela hepatalnog slijeva, obuhvaćajući pri tome male hepatalne vene, hepatalne vene većeg promjera te donju šuplju venu sve do desnog atrij (38). Budd-Chiari sindrom se može klasificirati kao fulminantni, akutni i kronični (45). Fulminantni oblik je rijedak (9%) i dovodi do opsežne hepatocelularne nekroze te razvoja hepatalne encefalopatije (46). BCS se češće prezentira kao akutno zatajenje jetre sa razvojem ascitesa i jetrene nekroze bez razvoja kolateralne venske mreže i portalne hipertenzije (38). U kroničnom obliku prisutan je razvoj kolateralne venske cirkulacije te ostalih znakova portalne hipertenzije, ascites i hepatosplenomegalija. U 15% slučajeva BCS može biti asimptomatski (47).

Ekstrahepatalna venska opstrukcija (EHPVO) se definira kao opstrukcija ekstrahepatalnog dijela portalne vene. Opstrukcija može obuhvaćati venu porte (što je i najčešće), venu lijenalis te mezenteričke vene (38). Portalna venska tromboza kao najčešći oblik EHPVO-a se također može prezentirati u akutnom i kroničnom obliku te rjeđe asimptomatski. Znakovi portalne hipertenzije često su prisutni kod ovih pacijenata zbog učestalije kronične forme i razvoja kolateralne cirkulacije (47). U manjem broju slučajeva BCS i TVP se mogu javiti istovremeno.

Klinička slika prvenstveno ovisi o tome je li riječ o akutnom ili kroničnom zbivanju, a uključuje bol u području gornjeg desnog kvadranta, nespecifične simptome poput mučnine, povraćanja, proljeva, ili povišene tjelesne temperature. Od klinički vidljivih znakova pri pregledu pacijenata najčešće se zamjećuje ascites, palpabilna slezena i jetra, dok primjerice žutica kao znak jetrenog oštećenja je vrlo rijetka. Portalna hipertenzija se viđa u većine pacijenata kod kroničnog oblika. Kod dijela pacijenata su već prilikom dijagnoze prisutne venske kolaterale u vidu varikoziteta jednjaka, a ponekad i prva prezentacija bolesti može biti gastrointestinalno krvarenje iz istih (48). Unatoč vrlo čestom razvoju komplikacija portalne hipertenzije poput gastrointestinalnog krvarenja te rekurentnih trombotskih evenata (najčešće se spominje progresija TVP na v. lienalis i vv.mesentericae supp.) kod ovih pacijenata izgleda da sama SVT nema toliku ulogu u mortalitetu, jer u puno većem postotku uzrok smrti ovih pacijenata je bila terminalna faza same MPN (7).

6. DIJAGNOSTIČKI IZAZOVI

Kod pacijenata koji se prezentiraju sa ascitesom bilo kao akutno stanje bilo refraktorno, ili sa bolnom hepatomegalijom, a bez primarne jetrene bolesti i relativno urednim funkcionalnim jetrenim testovima treba pomišljati na mogućnost tromboze portalnog sustava ili hepatalnih vena. U većini slučajeva dijagnoza se može postići korištenjem neinvazivnih radioloških metoda poput Doppler UZV-a koji predstavlja prvu metodu izbora. Ova metoda se često koristi kao inicijalna zbog svoje visoke senzitivnosti i specifičnosti (49). Kao alternativa Doppler UZV, ili u nejasnim slučajevima dijagnoza se dobiva temeljem CT-a ili MR-a. Invazivne metode poput biopsije jetre koriste se u slučajevima kada na temelju neinvazivnih radioloških metoda ne možemo sa sigurnošću isključiti lokalni uzrok opstrukcije portalnog i hepatalnog venskog sustava (pitanje jetrene neoplazme). Od dodatnih gastroenteroloških pretraga gastroskopija može otkloniti sumnju postojanja patologije gornjeg probavnog trakta (neoplazma), ali i omogućiti uvid u postojanje komplikacija tromboze, odnosno varikoziteta jednjaka i želuca.

Nakon što se radiološkim metodama dokaže BCS odnosno TVP te isključi mogućnost neoplazmatskog procesa, potrebno je laboratorijskim metodama ispitati moguće sistemske uzroke tromboze. Skrining se obavlja za najčešće uzročnike trombofilije (AT,PC,PS,fv Leiden, PT G20210A) i postojanje antifosfolipidnih tjelešaca u sklopu SLE (50). Dijagnostička obrada za MPN kreće sa kompletnom krvnom slikom (KKS), diferencijalnom krvnom slikom (DKS), razinama serumskog eritropoetina (EPO) te molekularnom dijagnostikom JAK2 V617F mutacije (7). U krvnoj slici kod ovih pacijenata mogu izostajati tipični znakovi mijeloproliferacije (povišen Hb, povišene razine krvnih stanica). Kao razlog izostanka navodi se uglavnom hipersplenizam, odnosno druge komplikacije portalne hipertenzije (hemodilucija, smanjena razina Fe) (7,8). Molekularna dijagnostika na JAK2 V617F mutaciju provodi se analizom DNA iz periferne krvi (granulocitna loza). Testiranje na mutaciju JAK2 V617F pomoću alel-specifične lančane reakcije polimerazom (PCR) danas je dio rutinske dijagnostike MPN-a koja se provodi u ranoj fazi obrade. Senzitivnost ovog testa je visoka te sa sigurnošću upućuje na prisutnost maligne klonalne hematopoeze. Međutim, negativnim nalazom ne možemo isključiti prisutnost bolesti, a kako bismo potvrdili dijagnozu i identificirali pojedini podentitet unutar spektra MPN-a, detekcija mutacije treba biti dopunjena histološkim nalazima (51). Histološka dijagnoza MPN dobiva se biopsijom koštane srži. U ranim fazama koštana srž pokazuje hipercelularnost koja je trilinearna sa naglašenom eritropoezom, megakariopoezom i stvaranjem megakariocitnih klastera te u

manjoj mjeri granulopoezom u slučaju PV. ET u koštanoj srži ne pokazuje trilinearnu proliferaciju nego proliferaciju eritroidnog ili mijeloidnog klona. U slučajevima PMF u ranoj fazi koštana srž je hipercelularna sa predominacijom granulocitne loze te relativno smanjenom aktivnošću eritroidne i megakariocitne loze sa stvaranjem nezrelih i strukturno defektnih megakariocita što se vrlo rijetko viđa kod PV i ET. Kombinacija histološkog nalaza koštane srži sa nalazom mutacije JAK2 V617F je visoko specifična i senzitivna metoda za dijagnozu MPN-a (52). U slučaju da molekularnom dijagnostikom nismo dokazali prisutnost JAK2 V617F mutacije, a koštana srž sugerira na postojanje MPN potrebno je pacijenta testirati na prisutnost rjeđih mutacija (MPL, CALR, JAK2 ekson 12). Budući da je učestalost ovih mutacija znatno niža od mutacije JAK2 V617F molekularna dijagnostika na ove mutacije se ne koristi rutinski (14). Temeljem nalaza periferne krvi, koštane srži i molekularne dijagnostike na mutaciju JAK 2 gena i ostalih prethodno navedenih rjeđih mutacija etablirani su uniformni dijagnostički kriteriji SZO-a za Ph- kronične mijeloproliferativne neoplazme prikazani u tablici 1.

TABLICA 1.

SZO KRITERIJI ZA Philadelphia-negativne KRONIČNE MIJELOPRLIFERATIVNE NEOPLAZME; prema reviziji iz 2008.g (53)

MPN	KRITERIJI
<p>POLICITEMIJA VERA (PV)</p> <p>Veliki kriteriji</p> <p>Mali kriteriji</p>	<p>Potrebno ispuniti oba velika i 1 mali ili prvi veliki i 2 mala</p> <p>1. Hb >18,5 g/dL (muškarci) ; > 16,5 g/dL (žene)</p> <p>Ili drugi dokaz povećanog volumena eritrocita</p> <p>2. Nalaz JAK2 V617F ili JAK2 ekson 12 mutacije</p> <p>1. Hipercelularnost KS uz značajnu panmijelozu, eritrocitnu, granulocitnu ili megakariocitnu proliferaciju</p> <p>2. Serumski eritropoetin < od referentne vrijednosti</p> <p>3. Rast endogene eritroidne kolonije <i>in vitro</i></p>
<p>ESENCIJALNA TROMBOCITEMIJA (ET)</p>	<p>Potrebno ispuniti sva 4 kriterija</p> <p>1. Broj trombocita $\geq 450 \times 10^9/L$</p> <p>2. Proliferacija morfološki zrelih i velikih megakariocita u KS, bez značajne granulocitne / eritrocitne proliferacije</p> <p>3. Neispunjeni kriteriji za KML, MDS, i druge mijeloidne neoplazme</p> <p>4. Prisutnost JAK2 ili drugog klonalnog biljega, ili isključenje reaktivne trombocitoze</p>
<p>PRIMARNA MIJELOFIBROZA (PMF)</p> <p>Veliki kriteriji</p> <p>Mali kriteriji</p>	<p>Potrebno ispuniti 3 velika i 2 mala kriterija</p> <p>1. Proliferacija i atipija megakariocita u KS uz retikulinsku, ili kolagensku fibrozu, ili nalaz prefibrozne celularne faze bolesti</p> <p>2. Neispunjeni kriteriji za PV, KML, MDS i dr. mijeloidne bolesti</p> <p>3. Prisutnost JAK2 ili drugog klonalnog biljega, ili isključenje sekundarne mijelofibroze</p> <p>1. Leukoeritroblastoza</p> <p>2. povišene razine LDH</p> <p>3. Anemija</p> <p>4. Palpabilna splenomegalija</p>

7. TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI

Terapijski pristup pacijentima sa SVT i podležećom kroničnom mijeloproliferativnom neoplazmom bazira se na antikoagulantnoj i citoreduktivnoj terapiji (14). Glavni ciljevi terapije kod pacijenata sa PV i ET su izbjeći prvu pojavu, odnosno spriječiti ponovnu pojavu komplikacija poput tromboze i krvarenja te smanjiti rizik prelaska bolesti u sekundarnu mijelofibrozu i akutnu leukemiju. Ciljevi kod PMF osim ovih prethodno navedenih su produžiti period preživljenja bolesnika ukoliko je moguće, što se danas uglavnom postiže alogenom transplantacijom koštane srži (54). Kod niskorizičnih pacijenata sa PV-om liječenje se provodi venepunkcijom uz ciljane vrijednosti hematokrita od ispod 45% (55). U visokorizičnih bolesnika s PV-om i ET-om indicirana je citoreduktivna terapija. Citostatik prve linije je hidroksiureja (HYU). Studije su pokazale da tretman sa HYU smanjuje rizik od trombotskih komplikacija pacijenata u usporedbi s pacijentima bez terapije. Indikacije za uvođenje HYU u terapiju kod pacijenata sa PV-om su intolerancija na venepunkciju, progresivna splenomegalija, broj trombocita iznad $1500 \times 10^9/L$ i progresivna leukocitoza. HYU je citoreduktivna terapija prvog izbora bez obzira na dob pacijenta iako kod pacijenata niže životne dobi te kod pacijentica generativne dobi treba biti uvedena s oprezom (54). Zadovoljavajući odgovor na terapiju kod pacijenata na HYU postignut je kada su vrijednosti trombocita $< 400 \times 10^9/L$. Citostatici druge linije su interferon alfa ($IFN \alpha$) i anagrelid rezervirani za pacijente kod kojih se razvila netolerancija ili rezistencija na HYU. Anagrelid se posebno uzima u obzir kao drugi izbor kod mlađih pacijenata sa ET-om i visokim rizikom tromboze (3). Pipobroman, busulfan i fosfor-32 primjenjuju se samo kod bolesnika s kratkim očekivanim životnim vijekom, ili kod pacijenata koji su se pokazali nereaktivnima na terapiju citostaticima prvog i drugog izbora (54). Otkriće JAK2 V617F mutacije dovelo je do pokušaja uvođenja JAK2 inhibitora u terapiju Ph-negativnih MPN-a. Budući da je terapija JAK2 inhibitorima relativno nova za ovu indikaciju još uvijek se ne može sa sigurnošću ocjeniti učinak iste na MPN, ili na komplikacije poput SVT. Terapijske opcije kod SVT-a uključuju antikoagulaciju, trombolizu, perkutanu transluminalnu angioplastiku (PTA), transjugularni intrahepatički portosistemski spoj (TIPS) i ortotopnu transplantaciju jetre (56). Današnje preporuke za antikoagulantnu terapiju kod pacijenata sa PVT i BCS su slične onima kod VTE drugih mjesta (4). Trenutačne preporuke ELN-a (prema eng. European LeukemiaNet) za liječenje splanhničkih tromboza koje se javljaju u sklopu MPN-a na prvo mjesto stavljaju primjenu niskomolekularnog heparina uz korekciju podležećih mijeloproliferacijom uzrokovanih poremećaja, zatim se nadovezuje doživotna primjena peroralnih antikoagulansa

uz obavezno praćenje vrijednosti INR-a (prema eng. International normalized ratio), koji bi trebao biti između 2.0 i 3.0. (54). Dugotrajna peroralna antikoagulantna terapija preporuča se kod visokorizičnih pacijenata sa BCS ili TVP (4). Antikoagulantna terapija se pokazala iznimno uspješnom u rekanalizaciji kod pacijenata koji su se prezentirali kao akutna TVP. Nasuprot tome, utjecaj ove terapije na preživljenje kod pacijenata sa kroničnom TVP i razvijenim komplikacijama portalne hipertenzije je diskutabilan pa sukladno tome ne postoji jasan konsenzus o optimalnoj strategiji liječenja i prevencije tromboze u ovih pacijenata (7). U pacijenata kod kojih antikoagulantna terapija nije polučila očekivani rezultat prelazi se na invazivne oblike liječenja poput PTA i TIPS-a. PTA se može izvesti sa umetanjem stenta odnosno alternativno sa sistemskom ili lokalnom trombolizom. Indicirana je kod kratkih stenoza hepatalnih vena u BCS. Ukoliko ova metoda rekanalizacije nije bila uspješna u kontroli ascitesa i potralne hipertenzije prelazi se na proceduru postavljanja shunta. Danas se uglavnom koristi TIPS zbog manje invazivnosti metode i rjeđih komplikacija u odnosu na kiruršku proceduru. Uostalom, primijećeno je da kod visokorizičnih pacijenata ova procedura možda može utjecati i na dugoročno preživljenje (49). Posljednja mogućnost kod pacijenata sa SVT koji ne odgovaraju niti na jednu od prethodnih terapija, ili kod pogoršanja kliničke slike i nakon provedenih invazivnih zahvata ostavljena je ortotopna transplantacija jetre (OLT) (49).

8. HIPOTEZA

Ovaj rad se zasniva na dvije hipoteze:

Prva hipoteza je da opterećenost mutiranim alelom JAK2 V617F ima utjecaja na kliničku sliku i podentitet MPN kod pacijenata koji su heterozigoti za navedenu mutaciju.

Druga hipoteza je da pacijenti ženskog spola se češće manifestiraju sa slikom SVT koja se pojavljuje i prije nego se podležeća mijeloproliferativna bolest može evidentirati u perifernoj krvnoj slici.

9. CILJEVI RADA

Opći cilj rada je bio analizirati populaciju pacijenata oboljelih od ET dijagnosticiranih i praćenih u KB Dubrava kojima je prva manifestacija bolesti bila splahnjička venska tromboza te utvrditi kako spol i opterećenje mutiranim alelom utječe na kliničku sliku kod ovih pacijenata.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. Analizirati kliničke i laboratorijske parametre pacijenata sa SVT oboljelih od ET.
2. Analizirati ekspresiju mutiranog alela JAK2 V617F i njegov utjecaj na kliničku prezentaciju ET.
3. Istražiti utjecaj rizičnih čimbenika poput spola i trombofilijskih stanja na sklonost razvoju SVT kao prve manifestacije podležće ET.

10. ISPITANICI I METODE

U ovo istraživanje uključeno je sedam pacijenata sa trombozom vene porte, vene lijenalis ,ili trombozom mezenteričkih vena kojima je od 2006.g do kraja 2015.g godine u Kliničkoj bolnici Dubrava testiranjem na mutaciju gena JAK2 otkrivena podležea MPN. Svi pacijenti obuhvaćeni ovom studijom bili su ženskog spola. Dob pacijenata kretala se od 46-78g u vrijeme prve tromboze sa medijanom dobi od 56 godina. Kriterij za uključivanje pacijenata bila je dijagnoza pojedinog podentiteta MPN-a postavljena u skladu sa revidiranim kriterijima SZO-a iz 2008.g. (Tablica 1.)

Dijagnostička obrada pacijenata uključivala je dijagnozu SVT standardnim radiološkim metodama (duplex UZV ili MSCT abdomena), kompletnu krvnu sliku periferne krvi te analizu morfoloških i molekularno – citogenetskih karakteristika koštane srži.

Molekularna dijagnostika obuhvaćala je analizu mutacije V617F gena JAK2 učinjenu alel specifičnim PCR-om iz genomske DNA izolirane iz periferne krvi. Kvantifikacija mutiranog alela izvršila se temeljem kvantitativne lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (RT-PCR).

Svi pacijenti su liječeni u Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava.

Uzorci za mjerenje količine V617F mutiranih alela gena JAK2 bile su stanice periferne venske pacijenata s dijagnozom SVT. Za izolaciju DNA 100 mikrolitara pune krvi procesuirano je reagencijskim setom Qiagen - QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Spektrofotometrijski je izmjerena koncentracija i čistoća dobivene DNA te je 1 µg korišten za kvantitativni esej mutacije V617F JAK2 prema protokolu ELN/COST. Korištene su sljedeće početnice i probe : lijeva početnica (tw) 5'-CTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA-3', desna početnica (rev) JAK2-WT 5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAC-3', lijeva početnica (rev) za mutirani lokus JAK2-V617F 50-

GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA-30 , proba 6FAM-

TGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTT-TAMRA. Standardna krivulja za kvantifikaciju dobivena je dilucijama (x10) mutirane stanične linije HEL i nemutirane K562.

Osjetljivost testa je oko 0,5% mutiranih alela (57).

11. REZULTATI

Tablica 2. prikazuje osnovna obilježja pacijenata, tip SVT, podentitet MPN-a, komorbiditete koje pacijent ima te vrstu terapije koja je primijenjena.

TABLICA 2.

	PACIJENT GODIŠTE	SPOL	TIP TROMBOZE	TROMBOFIJA	MPN	KOMORBIDITETI	LIJEČENJE	STATUS
1.	1936.	Ž	TVP, TVL	NE	ET ili PMF	varikoziteti jednjaka CVI	HYU	umrla 2011.g
2.	1928.	Ž	TVP, DVT (ruka 2011.)	PROTROMBIN G20210A heterozigot	ET	hipotireoza	HYU martefarin	živa
3.	1954.	Ž	TVP, TVL, TVMS	NE	ET	varikoziteti jednjaka hipotireoza	HYU splenekt. (2008.)	živa
4.	1952.	Ž	TVP,TVL	deficit prot.C	ET	varikoziteti jednjaka	HYU splenekt. (2008.)	živa
5.	1967.	Ž	TVP	f V Leiden heterozigot	ET	-	martefarin	živa
6.	1956.	Ž	TVP,TVL	NE	ET	splenomegalija	heparin	umrla 2014.g
7.	1959.	Ž	TVP,TVL	NE	ET	varikoziteti jednjaka	martefarin	živa

Laboratorijski i klinički parametri pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3.

<i>PACIJENT</i>	<i>JAK2 V617F</i>	<i>HEMOGLOBIN g/L</i>	<i>TROMBOCITI X10⁹/L</i>	<i>LEUKOCITI X10⁹/L</i>	<i>VELIČINA SLEZENE</i>
1936. Ž	DA	124	370	17	21cm
1928. Ž	DA	129	726	9,8	uredna
1954. Ž	DA	106	161	3,8	20cm
1952. Ž	DA	136	485	8,9	20cm
1967. Ž	DA	139	412-430	8,2	uredna
1956. Ž	DA	131	793	15,2	19cm
1959. Ž	DA	128	178	3,8	uredna

Rezultati kvantifikacije opterećenosti mutacijom JAK2 V617F izraženi kroz postotak (%) prikazani su u tablici 4.

TABLICA 4.

PACIJENT	JAK2 V617F % *
1936. Ž	— **
1928. Ž	8,4
1954. Ž	16,43
1952. Ž	13,57
1967. Ž	4,23
1956. Ž	— **
1959. Ž	— **

* PK DNA, RT- PCR

** Nije rađena kvantifikacija JAK2V617F mutiranog alela

Temeljem analize na JAK2 V617F rezultati su pokazali da su sve pacijentice bile pozitivne na mutirani alel. Sve pacijentice su se prezentirale kao TVP, 5 pacijentica je uz TVP imalo TVL, a 1 i TVMS. Kod većine pacijentica u trenutku dijagnoze bili su prisutni znakovi portalne hipertenzije. 4 od 7 pacijentica, odnosno 57,14 % je imalo razvijene varikozitete jednjaka, a njih također 4 od 7 (57,14%) je imalo splenomegaliju. Za sve njih je događaj splanhničke tromboze doveo do dijagnoze mijeloproliferativne neoplazme. Šest pacijentica je ispunjavalo kriterije za ET, a jedna pacijentica za prefibrotičku fazu PMF. Promjene u krvnoj slici (Tablica 3.) nisu jasno upućivale na MPN. 3 od 7 pacijentica je u perifernoj krvnoj slici imalo trombocitozu sa vrijednostima trombocita od $485 \times 10^9/L$, $723 \times 10^9/L$, odnosno $793 \times 10^9/L$. 2 od 7 se prezentiralo sa povišenim vrijednostima leukocita koje su iznosile $15,2 \times 10^9/L$, odnosno $17 \times 10^9/L$. 1 od 7 pacijentica imala je sniženu vrijednost hemoglobina koja je iznosila 106 g/L, dok su se kod ostalih 6 vrijednosti hemoglobina kretale unutar referentnih vrijednosti i iznosile su od 124-139 g/L. Od pacijentica koje su laboratorijske parametre imale izvan referentnih vrijednosti jedna pacijentica je imala i trombocitozu i leukocitozu što je sugeriralo na mijeloproliferaciju.

Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom V617F učinjena je kod 4 od 7 pacijentica. Sve pacijentice su bile heterozigoti sa vrijednostima koje su se kretale od 4,23%- 16,43%.

Prosječna opterećenost mutiranim alelom iznosila je 10,66%.

3 od 7 je osim JAK2 mutacije imalo i druge čimbenike koji povećavaju sklonost trombozi. Jedna pacijentica je bila heterozigot za mutaciju PT G20210A, jedna pacijentica je nositelj mutacije za deficit proteina C, dok je jedna heterozigot za mutaciju fV Leiden.

U kasnijem praćenju tijekom kojeg su pacijentice pretežito liječene hidroksiurejom i antikagulantnom terapijom, dvije su splenektomirane 2008.g tijekom kirurških intervencija zbog krvarenja iz varikoziteta jednjaka. 5 od 7 (71,42%) pacijentica je živo s praćenjem od 1-10 godina te su kontrolirane od strane gastroenterologa i hematologa. 2 pacijentice su umrle tijekom praćenja. Kod jedne pacijentice uzrok smrti je bilo intracerebralno, subarahnoidalno i intraventrikularno krvarenje nepovezano sa MPN, dok kod druge točan uzrok smrti nije poznat.

12. RASPRAVA

Mutacija V617F gena JAK2 otkrivena je 2005. godine. Otkriće ove mutacije pružilo je mogućnost boljeg razumijevanja biologije i kliničke prezentacije, a otvorilo je i mogućnost primjene novih lijekova u liječenju kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi. O važnosti ove mutacije govori i činjenica da ju je nepune tri godine nakon otkrića SZO uvrstila u skupinu velikih dijagnostičkih kriterija ove skupine bolesti. (Tablica 1.) Iako ova mutacija ima nedvojbenu važnost u dijagnozi prvenstveno PV kod koje je prisutna u oko 96% slučajeva (14) još uvijek postoje brojni prijepori o tome koliki utjecaj JAK2 V617F ima u određivanju pojedinog podentiteta MPN, kliničke prezentacije te koliko je relevantan kao prognostički čimbenik. Uzevši u obzir važnost mutacije u dijagnostici ove skupine bolesti posljednjih godina se sve više pridaje važnost kvantifikaciji mutiranog alela kako bi se utvrdio eventualni utjecaj na kliničku prezentaciju bolesti te praćenje odgovora na terapiju i u konačnici na sam ishod liječenja.

U našem istraživanju pokušali smo analizirati utjecaj ekspresije mutiranog alela na kliničke karakteristike i podentitet MPN. Sve naše pacijentice kojima je rađena kvantifikacija mutiranog alela su bile heterozigoti za JAK2 V617F mutaciju sa vrijednostima nižim od 50% koliko minimum za homozigotnost (58). Primijetili smo da su se sve pacijentice prezentirale prvenstveno kao TVP ili s njom udružena tromboza (TVL, TVM), ali sama mijeloproliferacija nije bila jasno izrežana u krvnoj slici te su 4 pacijentice imale splenomegaliju (Tablica 3.). Također analizirani pacijenti su dijagnosticirani kao ET (jedna pacijentica je zadovoljavala kriterije i za ET i za PMF) što postavlja pitanje povezanosti ekspresije mutiranog alela, podentiteta MPN i kliničke slike. Međutim, relevantnost ovih rezultata kompromitirana je činjenicom da je kvantifikacija rađena na izrazito malom broju pacijenta, njih svega 4 koji su imali DNA dostupnu za kvantitativnu analizu (Tablica 4.). Studije (58, 59, 60) rađene na većem broju ispitanika pokazale su povezanost između opterećenosti mutiranim JAK2 V617F alelom i podentiteom MPN. Naime, prema njihovim rezultatima pacijenti sa ET imali su nižu opterećenost mutiranim alelom čiji medijan je iznosio 7 % (58, 60) odnosno 24% (59) u usporedbi sa PV i PMF. Također, studija (58) zaključuje da je opterećenost mutiranim JAK2 V617F alelom ujedno i rizični čimbenik za razvoj venske tromboze.

Analizirajući laboratorijske i kliničke parametre 7 pacijenata u našoj studiji koji su se prezentirali sa SVT primijetili smo da u vrijeme dijagnoze ET pacijenti nisu imali jasne znakove koji bi govorili u prilog mijeloproliferaciji u perifernoj krvnoj slici osim u slučaju jedne pacijentice koja se u vrijeme dijagnoze MPN prezentirala sa povišenim razinama i

trombocita i leukocita te splenomegalijom. Autori (6,15,58,59) navode da pacijenti nositelji mutacije JAK2 V617F se prezentiraju sa višim razinama leukocita, trombocita, hemoglobina te većim promjerom slezene u usporedbi sa pacijentima koji nisu nositelji mutacije. Također, primjećuju da pacijenti homozigoti za mutaciju imaju statistički značajno više razine prethodno navedenih parametara od pacijenata koji su heterozigoti. Unatoč tome, čini se da još uvijek ne postoji jasna korelacija između razine mutiranog gena i kliničkih, odnosno laboratorijskih parametara.

Pacijenti obuhvaćeni ovom studijom testirani su na prisutnost drugih čimbenika koji bi mogli dovesti do nastanka tromboze. Prilikom testiranja tri pacijentice su uz podležeću ET imale i trombofiliju (Tablica 2.). No, kod njih klinički i laboratorijski parametri nisu se razlikovali od ostalih pacijentica obuhvaćenih studijom. Iako su trombofilijaska stanja prepoznata kao dodatni čimbenik rizika kod pacijenata sa MPN-om, čini se da prisutnost obje bolesti nema potencirajući učinak na trombozu kod pacijenata sa SVT-om (16).

U našoj studiji svih 7 pacijenata bilo ženskog spola s medijanom dobi od 56 godina te smo tako dobili 100% dominaciju ženskog spola (Tablica 2.). Ovaj rezultat može biti posljedica malog broja ispitanika. Studije su pokazale dominaciju ženskog spola među pacijentima sa ET i PV. U skupini pacijenata sa ET-om prema studiji (48) 61% ispitanika bilo je ženskog spola. Slični rezultati dobiveni su i kod pacijenata sa PV, dok pacijenti sa PMF u bili pretežito muškog spola. Ista studija, kao i studija (60) navodi razliku u opterećenosti mutiranim JAK2 V617F alelom koja je veća kod osoba muškog spola, no čini se kako u slučaju ET ta razlika nije statistički značajna. Još uvijek ostaje nejasno zbog čega SVT imaju veću učestalost javljanja kod osoba ženskog spola koje su pozitivne na JAK2 V617F mutaciju i koji patofiziološki mehanizmi su uključeni u kliničku prezentaciju bolesti kod ovih pacijenata.

13. ZAKLJUČAK

1. SVT često predstavljaju prvi znak podležeće kronične mijeloproliferativne bolesti te se pojavljuju prije nego se bolest manifestira u perifernoj krvnoj slici.
2. Opterećenje mutiranim JAK2 V617F može imati ulogu u podentitetu MPN. Nisko opterećenje mutiranim alelom upućuje na ET.
3. Sve pacijente koji se prezentiraju sa SVT-om, a isključena je jetrena patologija potrebno je testirati na MPN.

14. ZAHVALE

Zahvaljujem svom mentoru prof.dr sc. Rajku Kušecu, dr.med na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima i nadasve velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i članovima komisije za ocjenu diplomskog rada, prof.dr.sc. Jasenki Markeljević, dr.med. i prof.dr.sc.Vlatku Pejši, dr.med.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i ujaku na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su iskazivali tijekom ovih šest godina moga studija i sa mnom prolazili kroz svaki predmet, ispit i naposljetku ovaj diplomski rad.

Također želim se posebno zahvaliti svojoj sestri Ivi te prijateljicama Idi, Mateji i Ivani na podršci, hrabrenju i motivaciji kroz sve godine studija.

Hvala Irmi koja je izdvojila vrijeme i uložila trud u crtež splanhničkih venskih tromboza.

15. LITERATURA

1. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, Bloomfield CD, Thiele J (2008) Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Ur.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. Lyon: IARC, str. 18-30
2. Tefferi A, Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22:14-22.
3. Barbui T, Finazzi G, Falanga A (2013) Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood* 122(13):2176-2184
4. Sekhar M, Mc Vinnie K, Burroughs AK (2013) Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 162: 730-747
5. Sogaard KK, Farkas DK, Pedersen L, Sorensen HT (2015) Splanchnic venous thrombosis is a marker of cancer and a prognostic factor for cancer survival. *Blood* 126(8): 957-963.
6. Primagnini M, Martinelli I, Bucciarelli P, et al (2006) Risk factor for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology* 41(3): 603-608.
7. Hoekstra J, Bresseer EL, Smalberg JH, Spaander MCV, Leebeek FWG, Janssen HLA (2011) Long-term follow-up of patients with portal vein thrombosis and myeloproliferative neoplasms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9:2208-2214.
8. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian JJ, Lanssen HLA, Leebeek FWG (2012) Myeloproliferative neoplasms in Budd- Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta- analysis. *Blood* 120(25): 4921-4928.
9. Riva N, Donadini MP, Dentali F, Squizzato A, Ageno W (2012) Clinical approach to splanchnic vein thrombosis: risk factors and treatment. *Thrombosis Research* 130: S1-S3.
10. De Stefano V et al (2015) Recurrences after splanchnic venous thrombosis : risk factors and effect of different treatments in retrospective monocentre cohort of 154 patients. *Haematologica* 100 (Suppl.1): 621
11. Panova- Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, Finazzi G, Salmoiraghi S, Rambaldi A, Barbui T, Cate HT, Falanga A (2011) Platelet- induced thrombin

- generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocytemia and polycytemia vera. *Am. J. Hematol.* 86:337-342.
12. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Platanias LC (2003) Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22:423-434.
 13. Tefferi A (2010) Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24:1128-1138.
 14. De Stefano V, Qi X, Betti S, Rossi E (2016) Splanchnic vein thrombosis and myeloproliferative neoplasms: molecular- driven diagnosis and long term treatment. *Tromb Haemost* 115: 240-249.
 15. Guerra Xavier S, Gadelha T, Pimenta G, Eugenio AM, Ribeiro DD, Mendes Gomes F, Bonamino M, Renault Zalberg I, Spector N (2009) JAK2 V617F Mutation in Patients with Splanchnic Vein Thrombosis. *Dig Dis Sci* 55: 1770-1777.
 16. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, CazalsHatem D, Plessier A, Garcia-Pagan JC, Murad SD, Raffa S, Janssen HLA, Gardin C, Cereja S, Tonetti C, Giraudier S, Condat B, Casadevall N, Fenaux P, Valla DC (2008) The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 111:4922-4929.
 17. Oh ST, Gotlib J (2010) JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol* 3:323-337.
 18. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7:673-683.
 19. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054-1061.
 20. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434:1144-1148.
 21. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779-1790.

22. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska L, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387-397.
23. Ungureanu D, Wu JH, Pekkala T, Niranjani Y, Young C, Jensen ON, Xu CF, Neubert TA, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O (2011) The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *PLoS Biol* 9:971-U921.
24. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR (2012) Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* 19:754-759.
25. Dentali F, Squizzato A, Brivio L, Appio L, Camiotti L, Crowther M, Grandi AM, Ageno W (2009) JAK2V617F mutation for early diagnosis of Ph- myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Blood* 113: 5617-5623.
26. Santos FPS, Verstovsek S, (2011) JAK2 Inhibitors: What's the true therapeutic potential?. *Blood Rev.* 25(2): 53-63.
27. Cervantes F (2011) Management of Essential Thrombocythemia. *ASH Education Book* 1: 215-221.
28. Yacoub A, Odenike O, Verstovsek S (2014) Ruxolitinib: Long – Term Management of Patients with Myelofibrosis and Future Directions in the Treatment of Myeloproliferative Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* 9. 350-359.
29. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, Longtine JA, Sabath D, Lynn Wang Y (2013) Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Dig* 15: 733-744.
30. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin HF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007) JAK2 exon12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Eng J Med* 356:459-468.
31. Barbui T, Falanga A (2016) Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Thrombosis Research* 140S1: S71-S75.
32. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P,

- Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJP, Harrison CN, Cross NCP, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR (2013) Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 369(25): 2391–2405.
33. Ahmadzadeh A, Shirzad R, Golchin N, Saeid S, Mohammad Sh, Mohmmad Se, Najmaldin S (2015) Calreticulin and JAK2 V617F Mutations in Essential Thrombocythemia and Their Potential Role in Diagnosis and Prognosis. *iMedPub Journals [Internet]* Dec 16, 2015. (pristupljeno 06.05.2016.) Vol.1 No. 1:8. Dostupno na : cellular-molecular-medicine.imedpub.com
34. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzov MR, Gilliland DG, Tefferi A (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108: 3472-3476
35. Arid WC (2007) Vascular bed-specific thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5: 283-291.
36. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Torti L, Cenci T, Larocca LM, Leone G (2011) Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2 V617F mutation in a subset of thrombotic patients with Ph- negative myeloliferative neoplasms. *Blood* 117(9): 2700-2707.
37. Ivarez Larran A, Garcia Pagan JC, Abraldes JG, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, Cervantes F (2004) Increased CD11b neutropil expression in Budd- Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythaemia vera. *British Journal of Haematology* 124: 329-335.
38. De Stefano V, Za T, Ciminello A, Betti S, Rossi E (2011) Causes of Adult Splanchnic Vein Thrombosis in Mediterranean Area. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 3(1): e20110063.
39. Finazzi G, Barbui T (2005) Risk- adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blod Reviews* 19: 243-252.
40. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucci AM, Ruggeri M, Elli E, Mico C, Tieghi A, Cacciola RR, Santoro C, Gerli G, Vianelli N, Guglielmelli P, Pieri L, Scognamiglio F, Rodeghiero F, Pogliani EM, Rinazzi G, Gugliotta L, Marchioli R, Leone G, Barbui T (2008) Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential

- thrombocytopenia: incidence, risk factors and effect of treatments. *Haematologica* 93: 372-380.
41. Stein BL, Saraf S, Sobol U, Halpern A, Shammo J, Damiano R, Michaelis L, Odenike O, Rademaker A, Zakarija A, McMahon B, Spivak JL, Molitreno AR (2013) Age related differences in disease characteristics and clinical outcome in polycythemia vera. *Leukemia & Lymphoma* doi: 10.3191/10428194.2012.759656.
 42. Landolfi R, DiGennaro L, Falanga A (2008) Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 22: 2020-2028.
 43. Stein BL, Williams DM, Wang NY, Rogers O, Isaacs MA, Pemmeraju N, Spivak JL, Moliterno AR (2010) Sex differences in the Jak2V617F burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 95:1090-1097.
 44. Yonal I, Pinarbsi B, Hindilerden F, Hancer VS, Nalcaci M, Kaymakoglu S, Diz Kucukkaya R (2012) The clinical significance of JAK2 V617F mutation for Philadelphia – negative chronic myeloproliferative neoplasms in patients with splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 34: 388-396.
 45. Janssen HL, Garcia- Pagan JC, Elias E, Mentha G, Hadengue A, Valla DC (2003) Budd-Chiari syndrome: a review by an expert panel. *J Hepatol* 38: 364-71.
 46. Westbrook RH, et al. Prevalence and clinical outcomes of the 46/1 haplotype, Janus kinase 2 mutations, and ten-eleven translocation 2 mutations in BuddChiari syndrome and their impact on thrombotic complications post liver transplantation. *Liver Transpl* 2012; 18: 819–827.
 47. Ageno W, et al. Antithrombotic treatment of splanchnic vein thrombosis: results of an international registry. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 99–105.
 48. Rajesh S, Mukund A, Ankur A (2015) Imaging Diagnosis of Splanchnic Venous Thrombosis. *Gastroenterology Research and Practice* Vol.2015 [Internet] Apr 22, 2015. (pristupljeno 06.05.2016.) ID:101029. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/101029>.
 49. Hoekstra J, Janssen HLA (2008) Vascular liver disorders (I): diagnosis, treatment and prognosis of Budd-Chiari syndrome. *The Netherland Journal of Medicine* Vol.66 No.8 334-339.
 50. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, Sicca S, Leone G (2007) Incidence of the JAK2 V617F mutation among splanchnic or cerebral venous thrombosis without overt chronic myeloproliferative disorders. *J of Thrombosis and Haemostasis* 5: 708-714.

51. Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Bojesen SE (2013) Diagnostic value of JAK2 V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br J Haematol* 160:70-79.
52. Michiels JJ, Commandeur S, Hoogenboom GJ, Wegman JJ, Scholten L, VanRijssel RH, DeReave H (2007) JAK2V617F positive early stage myeloproliferative disease (essential thrombocythemia) as the cause of the portal vein thrombosis in two middle aged women: therapeutic implications in view of the literature. *Ann Hematol* 86: 793-800.
53. Vannucchi AM, Barbui T, Cervantes F, Harrison C, Kiladjian JJ, Kröger N, Thiele J, Buske C (2015) Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 26(Supplement 5): v85–v99.
54. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Hehlmann R, Hoffman R, Kiladjian JJ, Kroger N, Mesa R, McMullin MF, Pardanani A, Passamonti F, Vannucchi AM, Reiter A, Silver RT, Verstovsek S, Tefferi A (2011) Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 29:761-770.
55. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, De Stefano V, Elli E, Iurlo A, Latagliata R, Lunghi F, Lunghi M, Marfisi RM, Musto P, Masciulli A, Musolino C, Cascavilla N, Quarta G, Randi ML, Rapezzi D, Ruggeri M, Rumi E, Scortechini AR, Santini S, Scarano M, Siragusa S, Spadea A, Tieghi A, Angelucci E, Visani G, Vannucchi AM, Barbui T, Grp C-PC (2013) Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 368:22-33.
56. DeLeve LD, Valla DC, Garcia-Tsao G (2009) Vascular Disorders of the Liver. *Hepatology* 49:1729-1764.
57. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E. et al. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet-(COST action BM0902) study. *Leukemia* 2013;27: 2032–2039
58. Shixiang Z, Xiang Z, Yang X, Yufeng F, Wwenhong S, Jiannong C, Depei W, Yue H (2016) Impact of JAK2 V617F Mutation Burden on Disease Phenotype in Chinese Patients with JAK V617F- positive Polycythemia Vera (PV) an Essential Thrombocythemia (ET). *Int. J. Med. Sci.* 13(1): 85-91.

59. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM (2008) Influence of JAK2 V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 93(1): 41-48.
60. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC (2007) The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polychytemia vera and primary myelofibrosis- impact on disease phenotype. *European Journal of Haematology* 79: 508-515.

16. ŽIVOTOPIŠ

OSOBNİ PODACI:

- Ime i prezime: Tina Tolić
- Datum i mjesto rođenja: 05.10.1991. Doboj (Bosna i Hercegovina)

OBRAZOVANJE:

- 2013.-2016. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2010.-2013. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
- 2006.-2010. Opća gimnazija Matija Antun Reljković, Vinkovci
- 1998.-2006. Osnovna škola Mara Švel-Gamiršek, Vrbanja

POZNAVANJE STRANIH JEZIKA:

- Engleski jezik
- Njemački jezik