

LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI

HEMATO – ONKOLOGICKÁ KLINIKA

**VYBRANÉ RIZIKOVÉ FAKTORY CHRONICKÉ
MYELOPROLIFERATIVNÍ NEMOCI TYPU MYELOFIBRÓZY**

MUDr. Miroslava PALOVÁ

Doktorská dizertační práce

Olomouc, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a všechny zdroje informací, které jsem použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne 12. 4. 2019

Miroslava Palová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli s vypracováním dizertační práce.

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Tomáši Szotkowskému, Ph.D. za odborné vedení při zpracování dizertační práce a poskytnuté rady. Mé poděkování náleží také panu prof. MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc. a prim. MUDr. Antonínu Hlušimu, Ph.D. za cenné připomínky, rady a velmi vstřícný přístup.

Za podporu a umožnění postgraduálního studia bych chtěla poděkovat panu prof. MUDr. Tomáši Papajíkovi, CSc., přednostovi kliniky.

Za pomoc se zpracováním a interpretací laboratorních výsledků chci poděkovat doc. Mgr. Ludku Slavíkovi, Ph.D. a Mgr. Janě Navrátilové.

Za významnou pomoc při statistickém zpracování mé práce patří mé poděkování RNDr. Tomáši Fůrstovi, Ph.D. z katedry matematické analýzy a aplikací matematiky Přírodovědecké fakulty UP Olomouc.

Největší díky však náleží všem mým blízkým za podporu, trpělivost a toleranci mé časové vytíženosti.

Některé části mé dizertační práce vznikly s podporou grantových projektů IGA_LF_2017_007 a IGA_LF_2018_004.

OBSAH

strana

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Přehled použitých zkratk | 7 |
| 2. Souhrn dizertační práce | 9 |
| 3. Přehled klíčových slov | 14 |
| 4. Úvod | 15 |
| 4.1. Epidemiologie | 15 |
| 4.2. Etiologie | 15 |
| 4.3. Patogeneze | 15 |
| 4.4. Klinické symptomy | 16 |
| 4.5. Laboratorní nálezy a diagnostika | 17 |
| 4.6. Riziková stratifikace | 21 |
| 4.7. Východiska a dosavadní léčebná strategie na Hemato-onkologické klinice | 25 |
| 4.7.1. Pacienti s nízkým a středním rizikem-1 dle DIPSS/ DIPSS Plus skóre | 25 |
| 4.7.2. Pacienti se středním rizikem-2 a vysokým rizikem dle DIPSS/ DIPSS Plus skóre | 26 |
| 4.7.3. Symptomatická terapie | 28 |
| 4.7.4. Extramedulární hematopoéza | 31 |
| 5. Vlastní práce | |
| 5.1. Podstudie 1: Hodnocení mutačního profilu nemocných s MF | 32 |
| 5.1.1. Úvod | 32 |
| 5.1.2. Cíle práce | 33 |
| 5.1.3. Výskyt a vliv <i>driver</i> mutací | 33 |
| 5.1.4. Výskyt a vliv sekvenčních variant kandidátních genů | 44 |
| 5.1.5. Multivariační analýza prognostických faktorů | 58 |
| 5.2. Podstudie 2: Hodnocení generace trombinu u nemocných s MF | 62 |
| 5.2.1. Úvod | 62 |
| 5.2.2. Cíle práce | 64 |
| 5.2.3. Stanovení a vyhodnocení generace trombinu | 65 |
| 5.3. Podstudie 3: Hodnocení kostního obratu a metabolismu pacientů s MF | 78 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| 5.3.1. Úvod | 78 |
| 5.3.2. Cíle práce | 79 |
| 5.3.3. Vyhodnocení kostního obratu | 79 |
| 6. Shrnutí | 88 |
| 7. Seznam tabulek, grafů, obrázků | 91 |
| 8. Seznam literatury | 94 |
| 9. Seznam publikací autora | 112 |

1. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------|
| Ph- MPN | Ph (Philadelphia) negativní myeloproliferativní nemoc |
| PV | pravá polycytémie |
| ET | esenciální trombocytémie |
| MF/ PMF | myelofibróza/ primární myelofibróza |
| prePMF | prefibrotická fáze primární myelofibrózy |
| CML | chronická myeloidní leukemie |
| MDS | myelodysplastický syndrom |
| AML | akutní myeloidní leukemie |
| TEN | tromboembolická nemoc |
| SVT | trombóza splanchnických žil |
| PVT | trombóza portální žíly |
| BCS | Budd-Chiariho syndrom |
| <i>JAK2</i> | Janusova kináza 2 |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| <i>JAK2 V617F</i> | mutace genu pro Janusovu kinázu 2 v pozici 617 |
| <i>MPL</i> | Myeloproliferative leukemia virus oncogene |
| <i>CALR</i> | kalretikulin |
| <i>ASXL1</i> | ASXL transcriptional regulator 1 |
| <i>SRSF2</i> | serine/arginine-rich splicing factor 2 |
| <i>IDH1/2</i> | isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 1 cytosolic |
| <i>EZH2</i> | enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit |
| <i>TET2</i> | tet methylcytosine dioxygenase 2 |
| <i>DNMT3A</i> | DNA methyltransferase 3A |
| <i>CBL</i> | Cbl proto-oncogene C |
| <i>RUNX1</i> | runt related transcription factor 1 |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| AS-PCR | alelově specifická polymerázová řetězová reakce |
| Q-PCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce |
| RT-PCR | real-time polymerázová řetězová reakce |
| NGS | sekvenování nové generace |
| VAF | frekvence variantní alely |

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| VUS | varianta nejasného významu |
| IPSS | International Prognostic Scoring System |
| DIPSS | Dynamic International Prognostic Scoring System |
| OS | celkové přežití |
| HR | poměr rizik (hazard ratio) |
| allo-SCT | alogenní transplantace krvetvorných buněk |
| RIC | režim s redukovanou intenzitou |
| GvHD | reakce štěpu proti hostiteli |
| INF | interferon |
| HU | hydroxyurea |
| EPO | erytropoetin |
| ASA | kyselina acetylsalicylová |
| LDH | laktátdehydrogenáza |
| Hct | hematokrit |
| Hb | hemoglobin |
| IL-2 | interleukin 2 |
| OPG | osteoprotegerin |
| RANK/ RANKL | receptor activator of NF-κB/ receptor activator of NF-κB ligand |
| P1NP | N-terminální propeptid prokolagenu typu 1 |
| ICTP | karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I |
| bALP | kostní izoenzym alkalické fosfatázy |
| 25HOD | 25- hydroxyvitamin D |
| TSH | tyreotropní hormon hypofýzy |
| Ca ²⁺ | kalcium |
| CB | celková bílkovina |
| PT | protrombinový čas |
| TT | trombinový čas |
| aPTT | aktivovaný parciální tromboplastinový čas |
| vWF | von Willebrandův faktor |
| APC | aktivovaný protein C |
| TGT/TG | trombin generační test/ generace trombinu |
| ETP | endogenní potenciál trombinu |
| Cmax | maximální koncentrace trombinu |

| | |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| PPP | plasma chudá na destičky |
| PRP | plasma bohatá na destičky |
| K3EDTA | draselná sůl kyseliny etylen diamin tetraoctové |
| ADP | adenosindifosfát |
| ARA | kyselina arachidonová |
| TRAP | peptid aktivující trombinový receptor |
| WHO | World health organization |
| IGW-MRT | International Working Group – Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment |
| ELN | European Leukemia Net |
| EBMT | European Society for Blood nad Marrow Transplantation |
| CIBMRT | Center for International Blood and Marrow Transplant Research |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| EMA | Evropská léková agentura |
| CZEMP | Česká skupina pro Ph- myeloproliferativní nemoci |
| CVR | kardiovaskulární rizikové faktory |
| LOŽ | levý oblouk žeberní |

2. SOUHRN DIZERTAČNÍ PRÁCE

Úvod

Primární myelofibróza (PMF) je chronickým klonálním onemocněním krve tvorby. Spolu s pravou polycytémií a esenciální trombocytémií patří do skupiny Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií (Ph-MPN). Taktéž pravá polycytémie a esenciální trombocytémie mohou ve svém průběhu přecházet do stádia myelofibrózy (MF). PMF je sice onemocněním vzácným, nicméně díky vysoké morbiditě a významně kratšímu přežívání nezanedbatelné části pacientů, se v rámci Ph-MPN jedná o jednotku prognosticky nejhorší.

V naší analýze jsme hodnotili vybrané rizikové faktory u myelofibrózy. Pro lepší přehlednost byla naše práce rozdělena do tří částí (podstudii).

Podstudie 1: S ohledem na špatnou prognózu části nemocných s myelofibrózou, kteří vyžadují intenzivní léčbu včetně alogenní transplantace krvetvorných buněk, jsou intenzivně studovány klinické a laboratorní rizikové faktory, důležité pro posouzení vývoje onemocnění. Dosavadní riziková stratifikace byla založena zejména na demografických, klinických, hematologických a cytogenetických parametrech, které umožňují odhadnout prognózu nemocných. Jejich znalost pomáhá ve volbě optimálního terapeutického postupu. V poslední době, v souvislosti s rozvojem molekulárně biologických vyšetřovacích metod, nabývá stále více na významu hodnocení mutačního stavu nemocných. U myelofibróz bylo identifikováno množství mutací, jež se dělí na *driver* (řídící) a *passenger* (přídavné). Přestože žádná z dosud popsaných mutací není považována za kauzální, řada z nich významně ovlivňuje projevy a průběh nemoci. Cílem naší práce bylo zhodnocení výskytu a vlivu *driver* mutací a vyšetření přítomnosti přídavných sekvenčních variant kandidátních genů s jejich dopadem na průběh onemocnění.

Podstudie 2 se zabývá vyšetřením možných poruch hemostatické rovnováhy u nemocných s myelofibrózou. Jelikož trombózy patří k nejzávažnějším komplikacím nepříznivě ovlivňujícím kvalitu i délku života, posuzovali jsme eventuální dysbalanci hemostázy měřením individuálního potenciálu pro generaci trombinu. V klinické praxi představuje vyhodnocení rizika trombózy u daného jedince nezřídka značný problém, v důsledku časté koexistence rizikových faktorů trombózy i krvácení.

Komplexní metoda trombin generačního testu (TGT) monitoruje koncentraci trombinu v čase, která odráží celkový stav hemostatického systému a je schopna reflektovat všechny pro- a antikoagulační reakce, zejména možný efekt aktivovaných trombocytů a dalších krevních buněk. Míra generace trombinu může korelovat s hyper- nebo hypokoagulačním stavem. Hlavním cílem této analýzy bylo stanovení generace trombinu u nemocných s MF, posouzení schopnosti testu detekovat odchylky hemostatické rovnováhy a identifikovat pacienty s vysokým rizikem trombózy.

Podstudie 3 pojednává o kostním obratu a metabolismu pacientů s MF. Hlubší poznání patogeneze fibrózy kostní dřeně by mohlo zpřesnit klasifikaci Ph-MPN, zlepšit monitorování nemocných, popřípadě identifikovat nový terapeutický cíl. Zatímco objevy poslední let přinesly značný posun v pochopení významu aktivace JAK/STAT signální dráhy vedoucí k proliferaci nádorového klonu, mechanismus samotné fibrogenese a osteosklerózy dřeně zůstává stále nejasný. Hodnotili jsme biochemické markery kostní remodelace (ALP, P1NP, ICTP), kostní metabolismus a produkci osteoprotegerinu pro jeho vliv na funkci osteoklastů, endoteliální růst a neoangiogenezi. Cílem bylo nalezení vhodného parametru pro neinvazivní monitorování stupně fibrózy kostní dřeně v průběhu nemoci a laboratorní zhodnocení kostního obratu.

Jednotlivé analýzy byly realizovány na dlouhodobě sledovaném souboru 73 pacientů s MF léčených na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc v období let 2011-2017 s diagnózou stanovenou v rozmezí let 1998-2017.

Výsledky

Podstudie 1: Typ *driver* mutace signifikantně ovlivňuje klinický fenotyp a průběh nemoci. Nemocní s *CALR* mutací měli v době diagnózy oproti *CALR* nemutovaným významně nižší věk, vyšší hodnoty trombocytů, menší splenomegalii a nižší výskyt B-symptomů. Subanalýza *JAK2* V617F mutovaných MF prokázala také vliv alelické nálože mutované alely na odlišný klinický a laboratorní projev choroby (významně větší splenomegalie a vyšší počty leukocytů v době diagnózy u nemocných s alelickou náloží *JAK2* V617F ≥ 50 %). Lze říci, že typ *driver* mutace definuje různou biologickou povahu a klinické projevy nemoci.

Sekvenováním nové generace byl vyšetřen výskyt přídatných sekvenčních variant 14 kandidátních genů v době diagnózy. Sekvenční varianty genů jsme detekovali u 44 % myelofibróz se srovnatelnou frekvencí výskytu u *JAK2*, *CALR* a *MPL* mutovaných. Nejčastěji postiženými geny byly *ASXL1* (27 %), *TET2* (11 %) a *SF3B1* (6 %). Četnost přídatných variant genů byla nejvyšší u PMF (59 %), nejnižší u prefibrotické fáze PMF (21 %). Pacienti s myelofibrózou a přídatnými alelami byli v době diagnózy významně starší. Rozbor skupiny nemocných s nejčastějšími *ASXL1* variantními alelami nepotvrdil významné rozdíly ve věku či laboratorním fenotypu choroby ve srovnání s *ASXL1 wild type* jedinci. Další maligní onemocnění se vyskytovala výhradně u pacientů s přídatnými variantami genů. Nemocní s prognosticky nepříznivými sekvenčními variantami genů měli významně kratší celkové přežití. Pomocí multivariační analýzy jsme sledovali vliv jednotlivých prognostických faktorů na celkové přežití. Nejprve jsme vybrané rizikové faktory testovali univariálně, významně vycházely následující: DIPSS skóre, věk, hodnota Hb, cirkulující blasty ≥ 1 %, konstituční symptomy, počet trombocytů, přítomnost palpačně hmatné splenomegalie a přítomnost alespoň jedné nepříznivé genové varianty. V mnohorozměrném modelu bylo jediným významným prognostickým faktorem přežití DIPSS skóre.

Vyšetření sekvenčních variant genů při diagnóze může pomoci přesněji identifikovat rizikové nemocné a zřejmě je relevantní pro zpřesnění predikce celkového přežití nemocných. Nálezy ale ještě vyžadují analýzy větších sestav nemocných s delší dobou sledování.

Podstudie 2: Pro zcela klíčovou roli trombinu v hemostáze bylo použito měření jeho generace k detekci dysbalancí hemokoagulační rovnováhy. Generace trombinu byla rozdílná ve skupinách pacientů a zdravých jedinců. Při vyšetření prováděném v plasmě bohaté na destičky významně korelovaly parametry trombin generačního testu s aktuálními počty trombocytů. Pacienti s trombocytémií $> 400 \times 10^9/l$ měli signifikantně vyšší generaci trombinu. Pacienti s méně pokročilou chorobou a v prefibrotické fázi PMF se vyznačovali vyšší generací trombinu. Lze tedy předpokládat, že právě tato část nemocných může být ohrožena vyšším rizikem trombózy. Naopak trend k nižší generaci trombinu byl pozorován u *CALR* mutovaných MF.

Podstudie 3: Vyšetřením markerů kostní remodelace nebylo zjištěno zvýšení bALP. P1NP byl zvýšen u 18 %, ICTP u 32 % nemocných s myelofibrózou. Hodnoty nekorelovaly s pokročilostí fibrózy, nevykazovaly významný rozdíl oproti prefibrotické fázi primární myelofibrózy ani ostatním Ph-MPN. Osteoprotegerin byl zvýšen u 53 % myelofibróz, hodnoty korelovaly s pokročilostí nemoci, nicméně nebyly signifikantně rozdílné ve srovnání s prefibrotickou fází primární myelofibrózy či ostatními Ph-MPN. Testování parametrů kostního metabolismu prokázalo významné rozdíly jen v hladinách vitamínu D. Deficit vitamínu D byl častěji zjištěn ve skupině myelofibróz, u nichž jeho sérové koncentrace korelovaly s pokročilostí choroby.

Závěr

Podstudie 1: Důsledná riziková stratifikace pacientů má velký význam pro správné terapeutické rozhodnutí a pomáhá selektovat vysoce rizikové nemocné vhodné k alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Ta i nadále zůstává jedinou léčebnou modalitou s kurativním potenciálem. Vyšetření mutačního profilu nemocných napomáhá identifikovat rizikové jedince a je relevantní pro zpřesnění predikce celkového přežití. Různý mutační status taktéž odpovídá za variabilní klinický obraz nemoci. Studium výskytu a významu přídatných molekulárních variant genů je u MF stále aktuální. Jejich začleňování do prognostických modelů však vyžaduje dostatečnou validaci.

Podstudie 2: Výskyt trombotických a krvácivých komplikací stále představuje terapeutický problém, který nepříznivě ovlivňuje délku i kvalitu života nemocných. Potřeba identifikace laboratorních ukazatelů přesněji reflektujících sklon k trombóze či krvácení proto zůstává stále aktuální. Nálezy TGT svědčí pro rozdílnou generaci trombinu u nemocných s MF v porovnání se zdravou populací. Tvorba trombinu u MF byla ovlivněna zejména počtem trombocytů, dále pak mutačním stavem či pokročilostí choroby.

Podstudie 3: Testované plasmatické markery nebyly dostatečně citlivé pro neinvazivní monitorování fibrózy kostní dřeně v rutinní klinické praxi a nenahrazují trepanobiopsii. Potvrzená zvýšená exprese osteoprotegerinu zřejmě hraje roli v patogenezi myelofibrózy, nicméně není vhodným markerem reflektujícím stupeň

fibrózy. Z parametrů kostního metabolismu byly zaznamenány rozdíly jen v sérových koncentracích vitamínu D, s nižšími hladinami u vyjádřené myelofibrózy ve srovnání s ostatními Ph-MPN bez verifikované fibrózy dřeně. Tíže jeho deficitu korelovala s pokročilostí choroby. S ohledem na skutečnost, že se vitamín D spolupodílí na inhibici JAK/STAT signální dráhy, vyvstává otázka významu jeho substituce v éře JAK inhibitorů.

3. KLÍČOVÁ SLOVA

Myeloproliferativní nemoc – myelofibróza - kalretikulin (*CALR*) - *JAK2* V617F – sekvenování nové generace – *ASXL1* gen - přežití - generace trombinu – kostní obrat - osteoprotegerin – vitamin D

4. ÚVOD

4.1. Epidemiologie

Revidovaná WHO klasifikace myeloidních malignit z roku 2016 rozeznává několik hlavních kategorií, včetně akutní myeloidní leukemie (AML) a příbuzných neoplázií, myelodysplastického syndromu (MDS), myeloproliferativních neoplázií (MPN), překryvného MDS/MPN syndromu, mastocytózy, s eozinofilií asociovaných myeloidních/lymfoidních neoplázií s rekurentními mutacemi *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* a *PMC1-JAK2* a myeloidních neoplázií s germinální predispozicí [1]. Primární myelofibróza je řazena do skupiny chronických Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií (Ph-MPN) spolu s esenciální trombocytémií a pravou polycytémií, které ve svém průběhu taktéž mohou přecházet do fibrózy kostní dřeně [2]. Incidence PMF je 1,5 případu na 100 000 obyvatel za rok, medián věku při diagnóze je 67 let. Přibližně 17 % pacientů je diagnostikováno před 50. rokem života [3,4]. Incidence PV je vyšší u mužů než u žen, a to 2,8 versus 1,3 případu na 100 000 obyvatel za rok. Kumulativní riziko přechodu do post-polycytemické myelofibrózy je 6 % po 10 letech a 26 % po 20 letech trvání nemoci [5,6]. Incidence ET je 2,5 případu na 100 000 obyvatel za rok, kumulativní riziko transformace do post-trombocytemické myelofibrózy je 9 % po 15 letech trvání choroby [7,8].

4.2. Etiologie

Přesná vyvolávající příčina MF není známa. Postuluje se, že rozvoj nádorového klonu je asociován se somatickými mutacemi pluripotentních progenitorových buněk a změnami mikroprostředí kostní dřeně [9]. V menšině případů je výskyt PMF spojován s expozicí oxidu thoričitému, toluenu, benzenu a ionizujícímu záření [10]. Vysoká incidence PMF byla zaznamenána u přeživších výbuch atomové bomby v Hirošimě.

4.3. Patogeneze

Pro vznik Ph-MPN je zásadní konstitutivní aktivace JAK/STAT signální dráhy, jež vede k permanentní autofosforylaci JAK2 kinázy a následně i samotných STAT proteinů (Signal transducer and activator of transcription) v cytoplasmě. Fosforylované formy STAT proteinů translokují do buněčného jádra, kde se podílejí na aktivaci exprese genů regulujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu.

Výsledkem je na cytokinech nezávislá nadměrná proliferace hemopoetických buněk a myeloidních progenitorů a aktivace dalších signálních drah zahrnujících STAT3, STAT5, MAPK, ERK, PI3K-AKT [11-13]. Důsledkem aktivace signálních drah je klonální proliferace atypických megakaryocytů s intenzivnější produkcí cytokinů a růstových faktorů. To vede ke zvýšené tvorbě neklonálních fibroblastů s následnou fibrotizací dřeně. Fibroblasty nesdílejí chromozomální abnormality nalezené u hemopoetických buněk. Fibróza kostní dřeně je zřejmě sekundární reakcí na klonální hematopoézu [14]. V konečném důsledku zapříčiňuje rozvoj cytopenie, extramedulární hematopoézy, hepatosplenomegalie a vznik konstitučních symptomů (zvýšení tělesné teploty, noční poty, váhový úbytek, únavu). Mechanismus zodpovědný za rozvoj extramedulární hematopoézy není objasněn. Předpokládá se abnormální uvolňování prekurzorových buněk dřeně do sinusoid a krevního oběhu. Extramedulární hematopoézou mohou být zasaženy téměř všechny orgány, serózní povrchy, tělní dutiny, kůže, centrální nervový systém [15,16].

4.4. Klinické symptomy

- Asi 15 – 30 % pacientů je asymptomatických.
- Mezi nejčastěji udávané potíže patří únava (50 – 70 % případů) a symptomatická splenomegalie (20 – 50 % případů) provázená abdominální bolestí, pocitem plnosti břicha, kachektizací, zhoršením fyzické aktivity, rozvojem portální hypertenze a zhoršením cytopenie sekvestrací buněk periferní krve ve zvětšené slezině. Dále hepatomegalie (40 – 70 % případů), konstituční symptomy (hubnutí, bolesti kostí, zvýšená teplota, noční poty v 5 – 20 % případů) a pruritus (16 %) [4,10,17].
- Incidence arteriálních a žilních trombóz je 2 na 100 paciento-roků [18]. Ve 13 % případů předcházela trombóza diagnóze PMF [19].
- Plicní hypertenze, definovaná zvýšením středního tlaku v a. pulmonalis ≥ 25 mm Hg, je u MF asociovaná s kratším celkovým přežitím. Roli při rozvoji tohoto syndromu může hrát myeloidní infiltrace plicního parenchymu, tromboembolismus, portální hypertenze a trombocytémie. Přesný mechanismus působení zvýšeného počtu trombocytů v patogenezi plicní hypertenze není znám. Předpokládá se, že trombocytární růstové faktory a

transformující růstový faktor (TGF) stimulují fibroblasty, jež se pak podílejí na vzniku plicní fibrózy s následnou plicní hypertenzí [20].

- Portální hypertenze, tzn. zvýšený tlak krve v povodí v. portae nad 5 mm Hg, se u MF může rozvinout v důsledku zvýšeného průtoku krve splachnickým řečištěm při splenomegalii, intrahepatální obstrukce asociované s extramedulární hematopoézou nebo trombózy v. portae, v. lienalis či vv. hepaticae [21].
- Orgánové poškození extramedulární hematopoézou se může projevovat splenomegalii, hepatomegalii, lymfadenomegalii, pleurálními či perikardiálními výpotky, dysurií, dušností, neurologickými projevy, kožními eflorescencemi [15].

4.5. Laboratorní nálezy a diagnostika

Hodnoty hemoglobinu – pokles hodnot hemoglobinu < 100 g/l je popisován asi u 50 % PMF. Rozvoj anemie se vysvětluje následujícími mechanismy: redukcí erytropoézy v kostní dřeni postupující fibrózou, neefektivní erytropoézou spojenou s extramedulární produkcí erytrocytů, diluční anemií či zvýšenou sekvestrací a destrukcí cirkulujících erytrocytů ve zvětšené slezině, autoimunitní hemolýzou, důsledkem krvácení při trombocytopenii nebo portální hypertenzi. U pacientů se může vyskytovat jedna nebo kombinace uvedených příčin [4]. Charakteristickým morfologickým nálezem v nátěru periferní krve je poikilocytóza, přítomnost dakryocytů (obr. 1 a 2) a normoblastů v periferní krvi.

Hodnoty trombocytů – zvýšené počty trombocytů > $500 \times 10^9/l$ v době diagnózy jsou pozorovány u 13 % nemocných s PMF, snížené hodnoty krevních destiček u 26 % [4,22]. Trombocytopenie častěji provází progresi choroby. U pravé polycytémie a esenciální trombocytémie bylo identifikováno také množství kvalitativních změn trombocytů. Nicméně korelace mezi žádnou z těchto abnormalit a rizikem trombotických či krvácivých komplikací nebyla jednoznačně prokázána [23]. Samotné MF jsou v tomto ohledu prostudovány ještě méně.

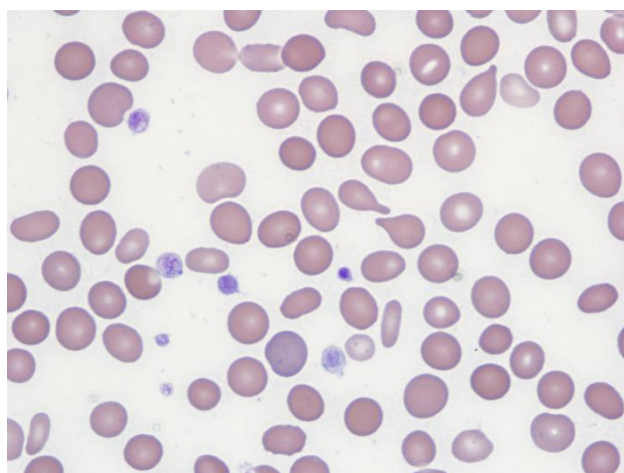
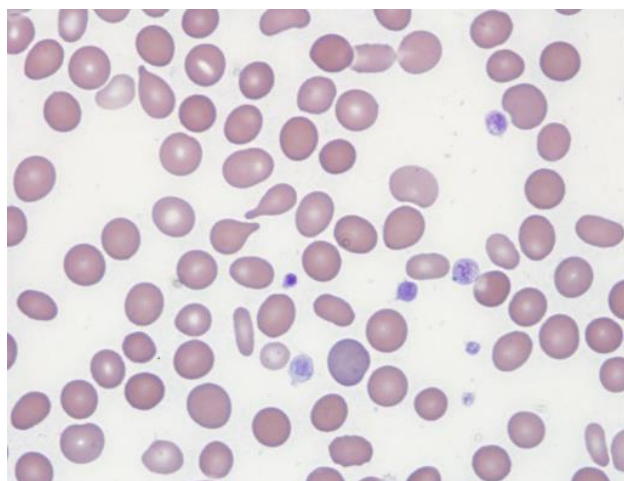
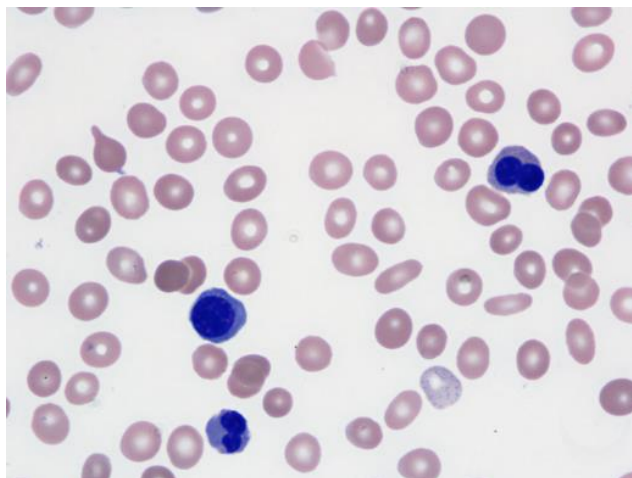
Hodnoty leukocytů – zvýšené počty leukocytů $> 30 \times 10^9/l$ se v době diagnózy objevují přibližně u 11 % pacientů, leukopenie u 8 % [4,22]. Typickým nálezem v diferenciálním rozpočtu leukocytů je tzv. posun doleva (leukoerytroblastóza) s vyplavením nezralých forem neutrofilní řady (např. metamyelocytů, myelocytů, promyelocytů, resp. i blastů) do periferní krve.

Aspirace kostní dřeně - je u pacientů s MF často obtížná, může být i „suchá“. Aspiranční biopsie není diagnostickou metodou. Běžným nálezem je hyperplazie neutrofilní granulopoézy a morfoloicky abnormální megakaryopoézy.

Biopsie kostní dřeně – histologické vyšetření kostní dřeně je nezbytné pro potvrzení diagnózy. Typicky pozorujeme zmnožení retikulárních a následně kolagenních vláken, rozšíření dřeňových sinusoid s intravaskulární hematopoézou a zmnožení atypických megakaryocytů (obr. 3). Snížené zastoupení až absence osteoklastů a neoangiogeneze jsou dominujícími znaky pokročilé myelofibrózy [24-26]. Prefibrotická fáze PMF (prePMF) se vyznačuje zvýšenou celularitou dřeně s proliferací atypických megakaryocytů, zmnoženou granulopoézou, redukovanou erytropoézou a absencí retikulární fibrózy vyšší než grade 1 (obr. 4) [26]. Rozlišení prePMF od PMF a ostatních Ph-MPN má význam pro odlišný klinický fenotyp, molekulární profil a celkové přežití pacientů [27].

Vyšetření mutací – mutace vyskytující se u MF dělíme na *driver* (řídící) a *passenger* (přídavné). Mezi *driver* mutace, jež vedou ke konstitutivní aktivaci JAK/STAT signální dráhy, řadíme mutaci *JAK2* V617F, mutaci v genu kódujícím trombopoetinový receptor (*MPL*) a kalretikulín (*CALR*). Lze je označit za diagnostické. Jejich udávaný výskyt u PMF je následující: *JAK2* mutace u 60 – 65 %, *CALR* mutace u 20 – 25 % a *MPL* mutace u 5 % případů [28-31]. Pacienti, u nichž není zjištěna ani jedna ze tří *driver* mutací, se označují jako triple negativní. Nejčastěji popisované *passenger* mutace jsou v genech *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *TET2*, *DNMT3A*, *SF3B1* a *CBL* (blíže bude rozvedeno v příslušné kapitole) [32-35].

Obrázek 1 - 3: Poikilocytóza a dakryocyty



Nátěry periferní krve, barvení May-Grünwald, Geimsa-Romanowsky

Tabulka 1: WHO diagnostická kritéria PMF 2016.

| Hlavní kritéria |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Proliferace atypických megakaryocytů spolu s přítomností retikulární a/nebo kolagenní fibrózy grade 2-3. |
| 2. Nesplněna WHO diagnostická kritéria pro ET, PV, <i>BCR-ABL+</i> CML, MDS a další myeloidní neoplázie. |
| 3. Přítomnost <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> nebo <i>MPL</i> mutace, v případě jejich negativity přítomnost jiného markeru klonality* nebo absence reaktivní myelofibrózy**. |
| Malá kritéria |
| 1. Anémie |
| 2. Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/l$ |
| 3. Hmatná splenomegalie |
| 4. Zvýšení laktátdehydrogenázy |
| 5. Leukoerytroblastóza |
| <i>Diagnóza PMF vyžaduje splnění všech 3 hlavních a alespoň 1 malého kritéria (potvrzeného ve dvou měřeních).</i> |

Tabulka 2: WHO diagnostická kritéria pre-PMF 2016.

| Hlavní kritéria |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Zvýšená celularita s proliferací atypických megakaryocytů, zmnoženou granulopoézou, často redukovanou erytropoézou a absencí retikulární fibrózy vyšší než grade 1. |
| 2. Nesplněna WHO diagnostická kritéria pro ET, PV, <i>BCR-ABL+</i> CML, MDS a další myeloidní neoplázie. |
| 3. Přítomnost <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> nebo <i>MPL</i> mutace, v případě jejich negativity přítomnost jiného markeru klonality* nebo absence reaktivní myelofibrózy**. |
| Malá kritéria |
| 1. Anémie |
| 2. Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/l$ |
| 3. Hmatná splenomegalie |
| 4. Zvýšená hodnota laktátdehydrogenázy |
| <i>Diagnóza PMF vyžaduje splnění všech 3 hlavních a alespoň 1 malého kritéria (potvrzeného ve dvou měřeních).</i> |

*Nejčastěji vyskytující se passenger mutace (např. *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*) mohou pomoci k potvrzení klonality choroby.

**Reaktivní fibróza kostní dřeně v souvislosti s infekcí, autoimunní chorobou, chronickým zánětlivým stavem, vlasatobuněčnou leukémií, lymfoidní neoplazií, metastazující malignitou nebo toxickou myelopatií [1].

Tabulka 3: IWG-MRT diagnostická kritéria post-polycytemické myelofibrózy.

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hlavní kritéria |
| 1. Předchozí diagnóza WHO definované PV. |
| 2. Fibróza kostní dřeně grade 2-3 (na škále 0-3) nebo grade 3-4 (na škále 0-4). |
| Malá kritéria |
| 1. Rozvoj anémie, ztráta potřeby venepunkcí při absenci cytoredukční terapie. |
| 2. Leukoerytroblastóza v periferní krvi. |
| 3. Nárůst hmatné splenomegalie ≥ 5 cm pod levý oblouk žeberní nebo nově vzniklá hmatná splenomegalie. |
| 4. Vznik ≥ 1 konstitučního symptomu*. |
| <i>Diagnóza vyžaduje splnění obou hlavních a alespoň 2 malých kritérií.</i> |

Tabulka 4: IWG-MRT diagnostická kritéria post-trombocytemické myelofibrózy.

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hlavní kritéria |
| 1. Předchozí diagnóza WHO definované ET. |
| 2. Fibróza kostní dřeně grade 2-3 (na škále 0-3) nebo grade 3-4 (na škále 0-4). |
| Malá kritéria |
| 1. Anémie, pokles hemoglobinu ≥ 20 g/l z původní hodnoty. |
| 2. Leukoerytroblastóza v periferní krvi. |
| 3. Nárůst hmatné splenomegalie ≥ 5 cm pod levý oblouk žeberní nebo nově vzniklá hmatná splenomegalie. |
| 4. Zvýšení laktátdehydrogenázy. |
| 5. Vznik ≥ 1 konstitučního symptomu*. |
| <i>Diagnóza vyžaduje splnění obou hlavních a alespoň 2 malých kritérií.</i> |

IWG-MRT - International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment

**Konstituční symptomy: ztráta hmotnosti (o více než 10 % za 6 měsíců), zvýšení tělesné teploty $> 37,5^{\circ}\text{C}$ (bez průkazu infekce) a noční poty (s noční výměnou prádla) trvajících déle než 1 měsíc [23,36-38].*

4.6. Riziková stratifikace

Riziková stratifikace pacientů má velký význam pro správné terapeutické rozhodnutí a pomáhá nám selektovat vysoce rizikové nemocné vhodné k alogenní transplantaci krvetvorných buněk (allo-SCT), která i nadále zůstává jedinou kurativní léčebnou modalitou myelofibrózy. Transplantační přístup je však i přes dosažené pokroky zatížen významnou mortalitou a morbiditou.

IPSS (*the International Prognostic Scoring System*) vyvinutý pracovní skupinou pro výzkum a léčbu myelofibrózy IWG-MRT v roce 2009 byl jedním z prvních prognostických modelů užívaných u pacientů s myelofibrózou. Je aplikovatelný v době diagnózy a hodnotí pět nezávislých prognostických faktorů: věk nad 65 let, hemoglobin pod 100 g/l, počet leukocytů nad $25 \times 10^9/l$, počet cirkulujících blastů v periferní krvi $\geq 1\%$ a přítomnost konstitučních symptomů, tabulka 5 [39].

DIPSS (*the Dynamic International Prognostic Scoring System*) byl následně vypracován na základě výsledků studie s prodlouženým sledováním kohorty 525 pacientů s PMF. Hodnotí stejné faktory jako výše zmíněný model, ale reflektuje větší prognostický význam vzniklé anémie. Ta ovlivňuje přežití nemocných se zhruba dvojnásobným poměrným rizikem ve srovnání s dalšími parametry. Je použitelný ke zhodnocení rizika choroby nejen v době diagnózy, ale kdykoliv v průběhu nemoci, proto dynamické prognostické skóre, tabulka 5 [40].

DIPSS-plus skóre (*the Dynamic International Prognostic Scoring System-plus*) je modifikovaným DIPSS skóre. Zahrnuje nezávislé rizikové faktory ovlivňující přežití pacientů: věk nad 65 let, hemoglobin pod 100 g/l, počet leukocytů nad $25 \times 10^9/l$, počet cirkulujících blastů v periferní krvi $\geq 1\%$, konstituční symptomy, transfuzní závislost, trombocytopenii pod $100 \times 10^9/l$ a nepříznivý karyotyp (tj. komplexní karyotyp, +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 přestavba), tabulka 5 [41].

Mezi vysoce rizikovými pacienty dle DIPSS-plus skóre byla dále vyčleněna skupina nemocných „velmi vysokého“ rizika s více než 80 % mortalitou ve dvou letech predikovanou monosomálním karyotypem, inv(3)/i(17q) či přítomností dvou z následujících faktorů: počet cirkulujících blastů v periferní krvi nad 9 %, leukocytóza $\geq 40 \times 10^9/l$ nebo jiný nepříznivý karyotyp [42].

V literatuře je dále uváděna asociace mezi horším celkovým přežitím u PMF a nízkou alelickou náloží *JAK2* V617F [43,44]. Špatnou prognózu s mediánem celkového přežití 2,5 roku mají také triple negativní pacienti [45].

Tabulka 5: IPSS, DIPSS a DIPSS Plus skóre

| |
|------------------------------------------------------|
| IPSS skóre hodnotí následující faktory: |
| 1. věk > 65 let (1 bod) |
| 2. počet leukocytů > 25x10 ⁹ /l (1 bod) |
| 3. hemoglobin < 100 g/l (1 bod) |
| 4. cirkulující blasty v periferní krvi ≥ 1 % (1 bod) |
| 5. konstituční symptomy* (1 bod) |
| Hodnocení IPSS skóre |
| 0 bodů: nízké riziko (OS 11,3 let) |
| 1 bod: střední riziko-1 (OS 7,9 let) |
| 2 body: střední riziko-2 (OS 4 roky) |
| ≥ 3 body: vysoké riziko (OS 2,3 let) |
| DIPSS skóre hodnotí následující faktory: |
| 1. věk > 65 let (1 bod) |
| 2. počet leukocytů > 25x10 ⁹ /l (1 bod) |
| 3. hemoglobin < 100 g/l (2 body) |
| 4. cirkulující blasty v periferní krvi ≥ 1 % (1 bod) |
| 5. konstituční symptomy* (1 bod) |
| Hodnocení DIPSS skóre |
| 0 bodů: nízké riziko (OS nedosaženo) |
| 1 – 2 body: střední riziko-1 (OS 14,2 let) |
| 3 – 4 body: střední riziko-2 (OS 4 roky) |
| ≥ 5 bodů: vysoké riziko (OS 1,5 let) |
| DIPSS Plus skóre hodnotí následující faktory: |
| 1. DIPSS nízké riziko (0 bodů) |
| 2. DIPSS střední riziko-1 (1 bod) |
| 3. DIPSS střední riziko-2 (2 body) |
| 4. DIPSS vysoké riziko (3 body) |
| 5. Nepříznivý karyotyp (1 bod) |
| 6. Počet trombocytů < 100x10 ⁹ /l (1 bod) |
| 7. Anémie vyžadující transfuze (1 bod) |
| Hodnocení DIPSS Plus skóre |
| 0 bodů: nízké riziko (OS 15,4 let) |
| 1 bod: střední riziko-1 (OS 6,5 let) |
| 2 – 3 body: střední riziko-2 (OS 2,9 let) |
| ≥ 4 body: vysoké riziko (OS 1,3 roky) |

Rozvoj molekulárních technik na bázi metod masivně paralelního sekvenování přinesl řadu nových, diagnosticky i prognosticky relevantních poznatků o molekulární podstatě Ph- MPN, které jsou v současné době intenzivně studovány. V posledních letech byla vyvinuta řada dalších prognostických modelů, které odrážejí snahu převést tato nová poznání do klinické praxe. Autoři prognostického skóre založeného na mutačním stavu *CALR* a *ASXL1* uvádějí nejdelší OS u pacientů *CALR*⁺/*ASXL1*⁻ s mediánem přežití 10,4 let a nejkratším přežitím u *CALR*⁻/*ASXL1*⁺ MF s mediánem přežití 2,3 roky. Nemocní *CALR*⁺/*ASXL1*⁺ a *CALR*⁻/*ASXL1*⁻ měli shodné přežití s mediánem 5,8 let [46].

Aktuálně publikovaná tři nová prognostická skóre u PMF (**MIPSS70**, **MIPSS70+ vision 2.0** a **GIPSS**) zohledňují nezávislý prognostický význam mutací, karyotypu a různý vliv anémie v závislosti na pohlaví. Zatím však nejsou dostatečně validovány v klinické praxi. Souhrnně je uvádí tabulka 6 [47-50].

Nejčastějšími příčinami smrti pacientů je progresse fibrózy s kachexií a komplikacemi vyplývajícími z cytopenie a transformace do akutní leukemie [51].

Tabulka 6: Nově navržené prognostické modely u PMF.

| MIPSS70 | MIPSS70+ vision 2.0 | GIPSS |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1 HR ¹ mutace (1 bod) | VHR ² karyotyp (4 body) | VHR ² karyotyp (2 body) |
| ≥ 2 HR ¹ mutace (2 body) | Nepříznivý ³ karyotyp (3 body) | Nepříznivý ³ karyotyp (1 bod) |
| Absence CALR typu 1 (1 bod) | ≥ 2 HR ¹ mutace (3 body) | Absence CALR typu 1 (1 bod) |
| Hemoglobin < 100 g/l (1 bod) | 1 HR ¹ mutace (2 body) | ASXL1 mutace (1 bod) |
| Leukocyty > 25x10 ⁹ /l (2 body) | Absence CALR typu 1 (2 body) | SRSF2 mutace (1 bod) |
| Trombocyty < 100x10 ⁹ /l (2 body) | Těžká anémie ⁴ (2 body) | U2AF1Q157 mutace (1 bod) |
| Cirkulující blasty ≥ 2 % (1 bod) | Mírná anémie ⁵ (1 bod) | |
| Konstituční symptomy (1 bod) | Cirkulující blasty ≥ 2 % (1bod) | |
| Fibróza dřeně grade ≥ 2 (1bod) | Konstituční symptomy (2 body) | |

¹HR (high risk) mutace: ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1/2, u MIPSS70+version 2.0 také U2AF1Q157.

²VHR (very high risk) karyotyp: -7/7q-, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23, +21, nebo další trisomie chromosomů nezahrnující +8/+9.

³nepříznivý karyotyp: všechny abnormality nespádající do VHR karyotypu ani do příznivého karyotypu (tj. normální karyotyp, 13q-, +9, 20q-, translokace/duplikace 1, abnormality Y).

⁴těžká anémie (Hb < 80 g/l u žen a Hb < 90 g/l u mužů).

⁵mírná anémie (Hb 80 – 99 g/l u žen a Hb 90 – 109 g/l u mužů).

MIPSS70 (Mutation-enhanced international prognostic scoring system for transplant-age patients) hodnotí 9 faktorů, stratifikuje pacienty do tří rizikových skupin: nízké riziko (0-1 bodů; OS nedosaženo), střední riziko (2-4 body; OS 7,1 let) a vysoké riziko (≥ 5 bodů; OS 3,1 let) [47].

MIPSS70+ vision 2.0 (*the Karyotype-enhanced MIPSS70*) hodnotí 9 faktorů, stratifikuje pacienty do pěti skupin: velmi nízké riziko (0 bodů; OS nedosaženo), nízké riziko (1-2 body; OS 16,4 let), střední riziko (3-4 body; OS 7,7 let), vysoké riziko (5-8 bodů; OS 4,1 let), velmi vysoké riziko (≥ 9 bodů; OS 1,8 let) [48].

GIPSS (*the Genetically inspired prognostic scoring system*) hodnotí 6 faktorů, stratifikuje pacienty do čtyř skupin: nízké riziko (0 bodů; OS 26,4 let), nižší-střední riziko (1 bod; OS 8 let), vyšší-střední riziko (2 body; OS 4,2 let), vysoké riziko (≥ 3 body; OS 2 roky) [49].

4.7. Východiska a dosavadní léčebná strategie na Hemato-onkologické klinice

Jedinou potencionálně kurativní metodou MF je i nadále alogenní transplantace kostní dřeně, provázená poměrně vysokou mortalitou a morbiditou. Proto by vždy měla být zvážena individuální rizika spojená s allo-SCT oproti předpokládanému přežití nemocného bez transplantace. Na druhou stranu žádná z dalších léčebných modalit nevede k dosažení dlouhodobých remisí.

Většina z aktuálně publikovaných doporučení je na úrovni „názoru expertů“. Řešení mnohých klinických situací proto zůstává stále nelehkou výzvou. V klinické praxi vycházíme převážně z výsledků kontrolovaných klinických studií nebo aktuálních ELN (European Leukemia Net) doporučení z roku 2018 [52].

4.7.1. Pacienti s nízkým a středním rizikem-1 dle DIPSS/ DIPSS Plus skóre

Ne všichni pacienti s MF vyžadují okamžité zahájení léčby. PMF je heterogenním onemocněním s různou délkou přežití. S výjimkou alogenní transplantace kostní dřeně není žádná ze současných léčebných možností kurativní. Také nemáme dostatek důkazů o přínosu specifické terapie u asymptomatických pacientů s nízkým a středním rizikem-1 dle DIPSS Plus skóre. Tito nemocní mohou být pouze observováni a zpravidla každých 6 měsíců zváni ke kontrole stavu choroby. Symptomatictí nemocní s anémií, splenomegalií, konstitučními symptomy jsou indikováni ke konvenční terapii, v případech významné leukocytózy či trombocytémie k cytoredukční léčbě (viz dále) [2]. Cílem terapie je kontrola symptomů, zlepšení kvality života při minimální toxicitě léčby.

Dle konsenzu ELN z roku 2018 je doporučováno zvážení allo-SCT u nemocných se středním rizikem-1 při objevení se transfuzní závislosti, > 2 % blastů v periferní krvi v alespoň dvou měřeních, nepříznivém cytogenetickém nález (tj. komplexní karyotyp, +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 přestavba), nebo přítomnosti vysoce rizikové mutace (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1/2*) [52]. Otázka allo-SCT je relevantní také u *CALR* negativních/ *ASXL1* pozitivních MF s celkovým přežitím < 5 let [46]. Zatím neexistuje jednoznačný konsenzus pro případy dalších *passenger* mutací (např. *TP53*, *TET2*, *CBL*). U těchto nemocných preferujeme v současné době pečlivé sledování se spíše časným zvážením allo-SCT v případě vývoje choroby.

4.7.2. Pacienti s vysokým a středním rizikem-2 dle DIPSS/DIPSS Plus skóre

U nemocných s vysokým a středním rizikem-2 je indikována allo-SCT. Rozhodnutí o transplantaci nezávisí pouze na rizikových faktorech MF, ale také na klinickém stavu pacienta (věku, performance stavu, portální hypertenzi, komorbiditách) a dostupnosti dárce. Myelofibróza jakožto onemocnění vyššího věku je spojená s nezanedbatelnou peritransplantační morbiditou a mortalitou, proto je pečlivý výběr vhodných pacientů zásadní. Dříve udávaná peritransplantační mortalita v 1. roce po standardních myeloablativních režimech se pohybovala od 30 % do 48 %, celkové přežití od 30 % do 60 % [53-58]. Jedna z největších studií s 289 pacienty s primární myelofibrózou transplantovanými po myeloablativních přípravných režimech uvádí s transplantací spojenou mortalitu 18 % u příbuzenských a 30 % u nepříbuzenských transplantací, 5-ti leté celkové přežití 37 % u transplantací od HLA-identického příbuzného a 30 % od HLA-identického nepříbuzného dárce [59]. Zavedení přípravných režimů s redukovanou intenzitou (RIC) snížilo vysokou mortalitu spojenou s transplantací a umožnilo indikovat i pacienty pokročilejšího věku. Nejnovější studie s 233 pacienty popisuje 5-ti leté celkové přežití po allo-SCT až 78 % u MF s nízkým a středním rizikem-1 dle DIPSS Plus skóre a 35 % v případech s vysokým rizikem. V mediánu doby sledování osmi let přežívalo 53 % transplantovaných [60]. Optimální přípravný režim s redukovanou intenzitou není stanoven, nejčastěji používané jsou fludarabin v kombinaci s busulfanem nebo melfalanem. Kröger *a kol.* popisují 5-ti leté celkové přežití po RIC 67 % a incidenci relapsů v 5-ti letech 29 % [61]. Velká retrospektivní analýza pacientů s PMF transplantovaných po režimech s redukovanou intenzitou prokázala 5-ti leté celkové

přežití 56 % u transplantací od HLA-identického příbuzného dárce a 48 % od HLA-identického nepříbuzného dárce [62]. Prospektivní studie srovnávající myeloablativní přípravné režimy s RIC u MF nejsou dostupné. Několik retrospektivních prací ale naznačuje podobné výsledky u obou typů přípravných režimů [53,56,63]. Obecně jsou myeloablativní režimy provázeny značnou toxicitou, proto pro starší nebo komorbidní pacienty je režimem volby RIC.

Předtransplantační nález významné splenomegalie je terapeutický problém pro zvýšené riziko protrahovaných cytopenií, krvácivých či infekčních komplikací. Splenomegalie větší než 22 cm patří mezi nepříznivé faktory přežití po allo-SCT nezávisle na IPSS skóre [64]. Optimální přístup k významné splenomegalii před allo-SCT je stále diskutován. Radioterapie sleziny navržená jako součást RIC režimů pro pacienty s masivní splenomegalii bývá komplikována cytopeniemi, infekcemi a krvácením [65,51]. Splenektomie zůstává výkonem se signifikantní peri- a postoperační morbiditou (komplikace ve 27 % případů) a mortalitou (5-10 %) [66-69]. Studie CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) navíc neprokázala vliv splenektomie či ozáření sleziny na přežití po transplantaci u nemocných s myeloidními malignitami, včetně MF [69]. V současnosti je v popředí zájmu vyhodnocení přínosu JAK-inhibitorů před allo-SCT. Dosud byly různými autory publikovány příznivé i nepříznivé výsledky. Předtransplantační terapie symptomatických nemocných JAK-inhibitorem ruxolitibem, vedoucí ke zlepšení jejich performance stavu a regresi splenomegalie, může mít příznivý vliv na peri- a posttransplantační průběh. Ve studii s ruxolitibem aplikovaným před allo-SCT měli lepší celkové přežití pacienti odpovídající na léčbu, ve srovnání s těmi rezistentními [70]. Jsou ale popsány i případy, kdy ukončení ruxolitibu před přípravným režimem vedlo k rozvoji závažných komplikací, včetně kardiogenního šoku a tumor lysis syndromu [71]. Současná EBMT/ELN doporučení preferují JAK-inhibitory k léčbě konstitučních symptomů anebo symptomatické splenomegalie před transplantací [72]. V souladu s nimi zvažujeme u symptomatických jedinců indikovaných k transplantaci ruxolitib, podávaný v maximálních tolerovaných dávkách. Pro minimalizaci rizika rebound fenoménu začínáme s postupnou redukcí dávky 5-7 dní před přípravným režimem, s ukončením ruxolitibu den před zahájením přípravného režimu [72]. Alternativně

volíme nízkou dávkovanou radioterapii sleziny. Splenektomii před transplantací standardně neprovádíme pro vysoké riziko perioperačních komplikací [66-68].

Nemáme dostatek údajů o vlivu terapie INF α na výsledek allo-SCT u Ph-myeloproliferativních nemocí. Avšak u chronické myeloidní leukemie (CML) Pigneux *a kol.* prokázal zvýšenou incidenci akutní GvHD u CML léčených INF α před alogenní transplantací [73]. Ianotto *a kol.* popisuje 7 pacientů léčených pegylovaným INF α , podstupujících allo-SCT. Všichni zemřeli v mediánu 10 měsíců po transplantaci, zejména v důsledku GvHD [74]. I přes limitovaná data nepodáváme INF α u pacientů s MF a vysokou pravděpodobností provedení allo-SCT v následujících měsících.

Nepříznivými faktory přežití po alogenní transplantaci krevetvorných buněk u pacientů s PMF jsou aplikace více než 20 transfuzních jednotek erytrocytů, velikost sleziny nad 22 cm a HLA-neshodný dárce. V přítomnosti alespoň dvou ze zmíněných faktorů bylo 5-ti leté přežití pacientů po transplantaci 8 % [64]. Tito nemocní nemusí profitovat z provedení alogenní transplantace kostní dřeně. Recentně publikovaný soubor transplantovaných MF uvádí jako nepříznivé faktory přežití pacientů po allo-SCT vysoké riziko dle DIPSS Plus skóre a index komorbidity ≥ 3 [60]. Pacientům s vysokým a středním rizikem-2, kteří nejsou vhodnými kandidáty alogenní transplantace krevetvorných buněk, by měla být v první řadě nabídnuta účast v klinických studiích, jelikož zatím žádný z konvenčních léků nemá kurativní potenciál.

4.7.3. Symptomatická terapie

Léčba anémie asociované s myelofibrózou

Nejčastěji jsou užívány kortikoidy (prednison 0,5 mg/kg/den), thalidomid (50 mg/den \pm prednison), danazol (600 mg/den), další možností jsou androgeny (např. fluoxymesterone 10 mg 3x denně nebo testosteron 400-600 mg i.m. týdně) [2,75-77]. Četnost léčebných odpovědí výše zmíněných preparátů se pohybuje mezi 15-25 % s průměrnou délkou trvání jeden až dva roky. U nemocných s prokázanou delecí 5q je doporučován lenalidomid (\pm prednison), přičemž úpravy anémie dosáhne 30 % pacientů a regrese splenomegalie 42 % pacientů [78,79]. Kontroverzní zůstává otázka aplikace rekombinantních erythropoetinů (EPO). Někteřími autory není jejich použití doporučováno pro zaznamenané případy

rychlého zvětšení sleziny a neúčinnost u transfuzně závislých pacientů [2,80]. Naproti tomu některé studie uvádějí léčebnou odpověď u 20-60 % pacientů s délkou trvání kratší než 1 rok [81]. Aplikaci rekombinantních EPO zvažujeme u anemických pacientů bez transfuzní závislosti, bez splenomegalie, s nižší hodnotou erythropoetinu (EPO) v séru. Z právě testovaných nových molekul se v léčbě anémie jeví nadějně JAK2 inhibitor momelotinib a inhibitor telomeráz imetelstat [82,83].

Léčba splenomegalie asociované s myelofibrózou

Lékem 1. volby je většinou hydroxyurea (HU), která je efektivní v redukci splenomegalie u zhruba 40 % pacientů s délkou trvání léčebné odpovědi průměrně 1 rok [84]. Byla prokázána signifikantní asociace mezi pozitivním mutačním stavem *JAK2* V617F a léčebnou odpovědí na HU [85]. V některých případech může vést ke zmenšení splenomegalie a trombocytopenie thalidomid [76,77]. V literatuře je redukce velikosti sleziny popisována u 8 – 19 % pacientů léčených thalidomidem, zaznamenána byla také při léčbě lenalidomidem v kombinaci s prednisonem [77,86].

Interferon alfa - předpokládá se, že $\text{INF}\alpha$ může svým přímým účinkem na nádorovou kmenovou buňku snížit její proliferaci [87]. V kontrastu s účinností $\text{INF}\alpha$ u pravé polycytémie a esenciální trombocytémie však nebyly jeho výsledky v léčbě PMF zpočátku až tak uspokojivé a ve více než 50 % případů byl špatně tolerován [88]. Zkušenosti s rekombinantním pegylovaným $\text{INF}\alpha$ -2a naznačují jeho terapeutické využití zejména v hypercelulární fázi choroby s akceptovatelným stupněm toxicity [89-92]. V případech časně PMF bylo léčbou $\text{INF}\alpha$ dosaženo klinického zlepšení či stabilního onemocnění u více než 80 % případů, zlepšení histologického nálezu v kostní dřeni (redukce fibrózy a atypické megakaryopoézy) u 26,7 % a regrese splenomegalie u většiny pacientů [90]. U pacientů s MF a celularitou dřene > 30 % byla terapie rekombinantním $\text{INF}\alpha$ spojena se snížením megakaryopoézy a granulopoézy, redukcí dřeňové fibrózy a úpravou dřeňové celularity [92]. Recentně bylo u nemocných s MF při léčbě pegylovaným $\text{INF}\alpha$ -2a pozorováno delší celkové přežití, než by odpovídalo jejich DIPSS skóre. Ukončení léčby bylo asociováno s horším celkovým přežitím, přičemž nejhorší prognózu měli nemocní rezistentní k $\text{INF}\alpha$ -2a. Zdá se, že rezistence k interferonu je znakem agresivity choroby [74]. Ačkoliv vede léčba INF alfa k poklesu alelické nálože *JAK2*

V617F, jeho vliv na klinický fenotyp, riziko transformace do akutní leukemie či celkové přežití zatím nebyl prokázán [74,93].

Ruxolitinib, JAK1/2 inhibitor, molekula kompetitivně se vážící na vazebné místo pro ATP v kinázové doméně JAK2 proteinu, je prvním ze skupiny JAK-inhibitorů schválený FDA (Food and Drug Administration) a EMEA (European Medicines Agency) pro léčbu myelofibrózy. Vazebné místo ruxolitinibu se nachází mimo mutovanou oblast, proto je léčebná odpověď nezávislá na mutačním stavu JAK2 V617F. Registrován byl na základě výsledků dvou randomizovaných studií COMFORT I a COMFORT II, které potvrdily jeho efektivitu ve zmírnění konstitučních symptomů, redukci splenomegalie a zlepšení kvality života pacientů s vysokým a středním rizikem-2 dle IPSS/DIPSS skóre [94,95]. Dlouhodobé sledování randomizovaných pacientů také prokázalo prodloužení celkového přežití, nicméně význam tohoto pozorování je nejasný vzhledem ke cross-over designu studie a srovnávání s historickou kontrolou nemocných [96-99]. U MF nižších rizik zatím nemáme studie hodnotící vliv ruxolitinibu na celkové přežití oproti dalším léčebným modalitám. Ruxolitinib nesnižuje riziko leukemické transformace a vede pouze k malým změnám v histomorfologickém obraze kostní dřeně [96,100].

Dle ELN je ruxolitinib lékem volby pro nemocné vysokého a středního rizika-2 se symptomatickou splenomegalií anebo konstitučními symptomy. Ruxolitinib je taktéž indikován v případech MF středního rizika-1 s vysoce symptomatickou splenomegalií, nebo u jedinců se splenomegalií či konstitučními symptomy nereagujícími na předchozí léčbu [52,101-103]. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou trombocytopenie nebo anemie. Byly publikovány i případy závažného rebound fenoménu s rychlým nárůstem bolestivé splenomegalie, ojediněle i šokovým stavem po přerušení léčby [96,104,105]. Proto není-li nutné okamžité ukončení léčby, postupně snižujeme dávky, eventuálně s konkomitantní medikací kortikoidy. Ruxolitinib zřejmě svým vlivem na funkci T-lymfocytů a dendritických buněk zvyšuje riziko oportunních infekcí (hlášeny reaktivace TBC, herpes zoster, elevace titru HBV-DNA u pacientů s chronickou hepatitidou B, vzácně progresivní multifokální leukoencefalopatie) [106-110]. S ohledem na to nezahajujeme ruxolitinib u nemocných s aktivní infekcí. V případech zvýšeného rizika virových infekcí podáváme antivirotickou profylaxi acyklovirem.

U nemocných se symptomatickou splenomegalií neodpovídající na žádnou medikamentózní léčbu posuzujeme zařazení do klinické studie, radioterapii, případně splenektomii.

Splenektomie je alternativou pro nemocné v relativně dobrém performance stavu, zůstává ale výkonem se signifikantní peri- a postoperační morbiditou a mortalitou. Retrospektivní studie uvádějí perioperační komplikace u 27 % pacientů a 5-10 % mortalitu. Faktory spojené s horším přežitím po splenektomii jsou věk > 65 let, transfuzní závislost, leukocyty $\geq 25 \times 10^9/l$ a cirkulující blasty $\geq 5\%$. Mezi nejčastější komplikace splenektomie patří krvácení, trombózy, infekce a „myeloproliferativní“ reakce s trombocytózou, leukocytózou a dokonce i erytrocytózou. Jsou popsány i případy progresse velikosti jater po splenektomii v důsledku „migrace“ extramedulární hematopoézy [66-68,111]. Výraznou hepatomegalií proto považujeme za relativní kontraindikaci splenektomie. Další indikace ke splenektomii zahrnují symptomatickou portální hypertenzi, časté aplikace transfuzí erytrocytů a refrakterní cytopenii [2].

Radioterapii sleziny (v maximální celkové dávce 3 Gy) užíváme u vybraných refrakterních symptomatických pacientů. Efekt radioterapie je uváděn u 63 - 95 % pacientů s mediánem délky trvání odpovědi 3,5 až 6 měsíců [112]. Mezi závažné komplikace patří ty, spojené s rozvojem cytopenie.

Alkylační léky - dříve používaný busulfan vede u části nemocných k redukci masivní splenomegalie, avšak jeho dlouhodobé podávání bylo spojeno se zvýšenou incidencí leukemické transformace nebo protrahovanými cytopeniemi [113]. Měl by být terapeutickou alternativou jen pro starší symptomatické nemocné, kteří netolerují nebo jsou rezistentní k ostatním léčebným možnostem.

4.7.4. Extramedulární hematopoéza

Extramedulární hematopoéza může mimo sleziny a jater postihnout také peritoneum, plíce, lymfatické uzliny, torakolumbální páteř, kosti horních a dolních končetin. Klinicky se manifestuje ascitem, plicní hypertenzí, adenomegalií nebo refrakterními bolestmi kostí. Léčbou volby pro symptomatické pacienty je nízké dávkovaná radioterapie [2].

5. VLASTNÍ PRÁCE

5.1. Podstudie 1: Hodnocení mutačního profilu u nemocných s myelofibrózou.

5.1.1. Úvod

U pacientů s MF bylo identifikováno množství mutací a jednonukleotidových polymorfismů. Mutace se dělí na *driver* a *passenger*. Žádná z dosud popsaných mutací se nepovažuje za kauzální.

Driver mutace: v patogenezi Ph-MPN je zásadní konstitutivní aktivace JAK/STAT signální dráhy, jež vede k permanentní autofosforylaci JAK2 kinázy a následně i samotných STAT proteinů v cytoplasmě. Fosforylované formy STAT proteinů translokují do buněčného jádra, kde se podílejí na aktivaci exprese genů regulujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu [10,12]. Konstitutivní aktivace JAK/STAT dráhy může být způsobená buď přímo somatickou mutací genu *JAK2* v pozici V617F, nebo nepřímo mutacemi v genu s regulačním vlivem na tuto signální dráhu (*MPL*). Taktéž mutace v genu pro kalretikulin (*CALR*) je spojena s aktivací STAT proteinů [27-30].

V roce 2005 objevená somatická mutace *JAK2* V617F vedla k průlomům v klasifikaci, diagnostice a pochopení Ph-MPN [27]. Nicméně pouze u 50-60 % PMF je detekovaná mutace *JAK2* V617F, v dalších 5-8 % případů mutace v kodonu 515 nebo 505 genu kódujícím trombopoetinový receptor (*MPL*) [27,28].

Když v roce 2013 Klampfl *a kol.* a Nangalia *a kol.* popsali somatické rekurentní mutace postihující exon 9 v genu *CALR*, které se vyskytují u většiny *JAK2* a *MPL* nemutovaných pacientů s PMF, vzrostl počet nemocných se známým molekulárním markerem klonality na 80-85 %. Gen *CALR* kóduje protein kalretikulin, chaperon endoplasmatického retikula schopný vázat Ca^{2+} . Mutace v *CALR* genu jsou značně heterogenní skupinou čítající nejméně 50 různých mutací charakteru krátkých delecí či insercí. Většina z nich způsobuje posun čtecího rámce, přičemž alternativní čtecí rámec vede ke vzniku abnormálního proteinu [29,30]. Mutovaný kalretikulin pak preferenčně interaguje s trombopoetinovým receptorem, což vede k jeho aktivaci a následné stimulaci JAK/STAT signální dráhy [114]. Dvě nejčastěji se vyskytující (v 80 % případů) jsou 52-bp delece (typ 1) a 5-bp inserce (typ 2).

Zhruba 10–15 % pacientů s PMF se označuje jako triple negativní, tzn. že u nich není zjištěna ani jedna ze tří známých *driver* mutací [45].

Passenger mutace - pomocí celogenomového sekvenování byly identifikovány další mutace, nejčastěji v genech účastnících se epigenetických procesů (*ASXL1*, *IDH1/2*, *EZH2*, *TET2*), sestřihu RNA (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) a dalších procesů (*DNMT3A*, *CBL*) [32-35,115-123]. Tyto mutace se mohou vyskytovat současně s *driver* mutacemi, přičemž bývají prokázány již v době diagnózy Ph-MPN [123]. Na rozdíl od *driver* mutací nejsou pro Ph-MPN specifické a nacházejí se také u mnoha dalších myeloidních malignit, jako jsou akutní myeloidní leukemie či myelodysplastický syndrom [124,125]. Jejich role v patogenezi MF zatím nebyla dostatečně objasněna. Přítomnost *passenger* mutací v genech *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1/2*, dle některých autorů i v genech *TET2*, *TP53*, *KIT*, *RUNX1*, *CEPBA*, *SH2B3*, *CBL* a *U2AF1Q157* bývá spojována s horší prognózou nemocných [35,116,123,126]. Ukazuje se, že důležitý je také počet nepříznivých přídatných mutací s nejkratším celkovým přežitím nemocných se dvěma a více mutacemi [127].

5.1.2. Cíle práce:

1. Vyšetření výskytu a vlivu *driver* mutací na klinický a laboratorní fenotyp choroby u pacientů s histologicky verifikovanou myelofibrózou.
2. Vyšetření výskytu sekvenčních variant kandidátních genů v době diagnózy a sledování jejich vlivu na klinický průběh choroby u pacientů s histologicky verifikovanou myelofibrózou.

5.1.3. Výskyt a vliv *driver* mutací

Pacienti

Analyzováno bylo 66 pacientů diagnostikovaných v našem centru v období let 1998-2016. Jednalo se o 45 nemocných s diagnózou PMF, 10 s post-PV myelofibrózou a 11 s post-ET myelofibrózou. Šlo o 30 mužů, 36 žen, s mediánem věku 55,5 let (rozmezí 18-77).

Provedená vyšetření, materiál, metody a statistické zhodnocení

Vyšetření a materiál

U všech pacientů byla testována přítomnost mutací *JAK2* V617F, v genech *MPL* a *CALR*. Všechny analýzy byly provedeny s využitím genomické DNA (gDNA) izolované z leukocytů periferní krve. Zároveň byla vyloučena přítomnost fúzního genu *BCR/ABL1* pomocí nested RT-PCR na úrovni komplementární DNA (cDNA). Mutace v kodonu 617 genu *JAK2* byla vyšetřována alelově specifickou polymerázovou řetězovou reakcí (AS-PCR). V pozitivních případech byla alelická nálož kvantifikována pomocí qPCR s využitím kitu ipsogen *JAK2* MutaQuant kit (Qiagen). U všech subjektů se realizoval screening exonu 9 genu *CALR* pomocí fragmentační analýzy. V pozitivních případech byl přesný typ mutace identifikován Sangerovou metodou sekvenování. Mutace genu *MPL* (S505N a W515L/K/A) byly vyšetřeny s využitím multiplexní AS-PCR a fragmentační analýzy PCR produktů. Detekované mutace byly ověřeny Sangerovým sekvenováním.

Metody a statistika

Laboratorní a klinická data z doby diagnózy byla sbírána retrospektivně. Klinické a laboratorní parametry byly systematicky porovnány s mutačním stavem nemocných. Výsledky jsou prezentovány jako medián a rozmezí zjištěných hodnot u plynule proměnných, případně frekvence u kategoriálních proměnných.

Vztah mezi kategoriálními proměnnými byl analyzován pomocí chi kvadrát testu v kontingenčních tabulkách. Pokud byly četnosti malé, použili jsme exaktní Fisherův faktoriálový test. Rozdíl v hladině spojitých proměnných ve skupinách pacientů byl hodnocen pomocí Kruskal-Wallisova testu. Kruskal-Wallisův test je neparametrická analogie jednovýběrové ANOVY. Test zkoumá, zda obě datové sady pocházejí ze stejné distribuce (tedy z distribuce se stejným mediánem). Křivky přežití byly vyhotoveny s použitím Kaplan-Meierovy metodiky a porovnány pomocí log-rank testu. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Veškerá práce s daty, vizualizace a analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB and Statistics Toolbox Release 2013b, The MathWorks a STATISTICA 12, StatSoft.

Výsledky

Charakteristika souboru

Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době diagnózy v závislosti na typu *driver* mutace shrnuje tabulka 7.

Tabulka 7: Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době diagnózy v závislosti na typu *driver* mutace.

| | JAK2 V617F | CALR | MPL |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Výskyt mutace (%) | 54,5 | 34,8 | 6,1 |
| Muži/ ženy | 13/23 | 12/11 | 3/1 |
| Medián věku v letech (rozmezí) | 59 (18-77) | 49 (23-76) | 62,5 (44-68) |
| Medián hemoglobinu - g/l (rozmezí) | 127 (78/155) | 120 (86-148) | 99,5 (90-110) |
| Medián počtu leukocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 11,8 (4,5-37,7) | 8,3 (1,5-26,9) | 5,9 (1,8-19,2) |
| Medián počtu trombocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 312 (74-1233) | 445 (62-1093) | 179 (68-342) |
| Medián cirkulujících blastů (%) (rozmezí) | 0 (0-4) | 0 (0-4) | 1 (0-2) |
| Medián laktátdehydrogenázy - ukat/l (rozmezí) | 7 (3-30) | 5,78 (2,9-19,7) | 11,2 (7,9-20,1) |
| Velikost sleziny - medián cm pod LOŽ, (rozmezí) | 10 (0-30) | 2 (0-10) | 6,5 (3-10) |
| Přítomnost konstitučních symptomů* (% pacientů) | 56,5 | 4,5 | 0 |
| IPSS | počet pacientů | počet pacientů | počet pacientů |
| Nízké riziko | 11 | 12 | 0 |
| Střední riziko-1 | 17 | 7 | 4 |
| Střední riziko-2 | 8 | 4 | 0 |
| Vysoké riziko | 0 | 0 | 0 |

*Konstituční symptomy: zvýšení tělesné teploty > 37,5°C (bez průkazu infekce), ztráta hmotnosti (o více než 10 % za 6 měsíců) a noční poty (s noční výměnou prádla).

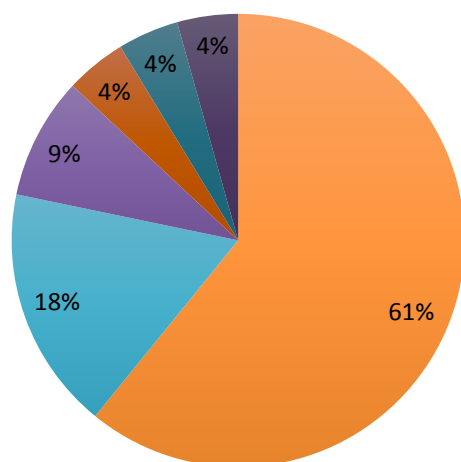
Výskyt *driver* mutací

Distribuce *driver* mutací ve vyšetřovaném souboru byla následující: *JAK2* V617F 36 případů (54,5 %), *CALR* (exon 9) 23 případů (34,8 %), *MPL* W515 4 případy (6,1 %). Distribuce *driver* mutací v podskupině PMF byla: *JAK2* V617F 24 případů (53,3 %), *CALR* (exon 9) 15 případů (33,3 %), *MPL* W515 4 případy (8,8 %). U jednoho

pacienta byla zjištěna současně mutace *JAK2* V617F s *CALR*, naopak u dvou pacientů triple negativita. Z *CALR* mutovaných nese 60,8 % mutaci typu 1 (14/23), 17,4 % mutaci typu 2 (4/23) a 21,8 % (5/23) další méně frekventní typy, znázorňuje graf 1.

Graf 1: Frekvence výskytu jednotlivých typů mutací v *CALR* genu.

■ del52 ■ ins5 ■ ins2 ■ del3 ■ del46 ■ del19



Trombotické komplikace se objevily u 27 % nemocných, z toho v 72 % případů se jednalo o žilní trombotické komplikace, ve zbylých případech o arteriální. Krvácivé komplikace byly dokumentovány u 1,5 % nemocných s konkomitantní středně těžkou trombocytopenií. U 46 % pacientů s žilní trombózou a u 60 % nemocných s trombózou arteriální byl zjištěn další přídatný rizikový faktor (deficit proteinu S, deficit proteinu C a přítomnost lupus antikoagulans). Distribuci driver mutací u pacientů s trombotickou komplikací zobrazuje tabulka 8.

Tabulka 8: Distribuce driver mutací u pacientů s trombotickou komplikací.

| | CALR | TN | JAK2 V617F | MPL |
|--------------------------------------|-------------|-----------|-------------------|------------|
| Žilní trombózy (počet pacientů) | 3 | 1 | 8 | 1 |
| Arteriální trombózy (počet pacientů) | 3 | 0 | 2 | 0 |

TN – triple negativní

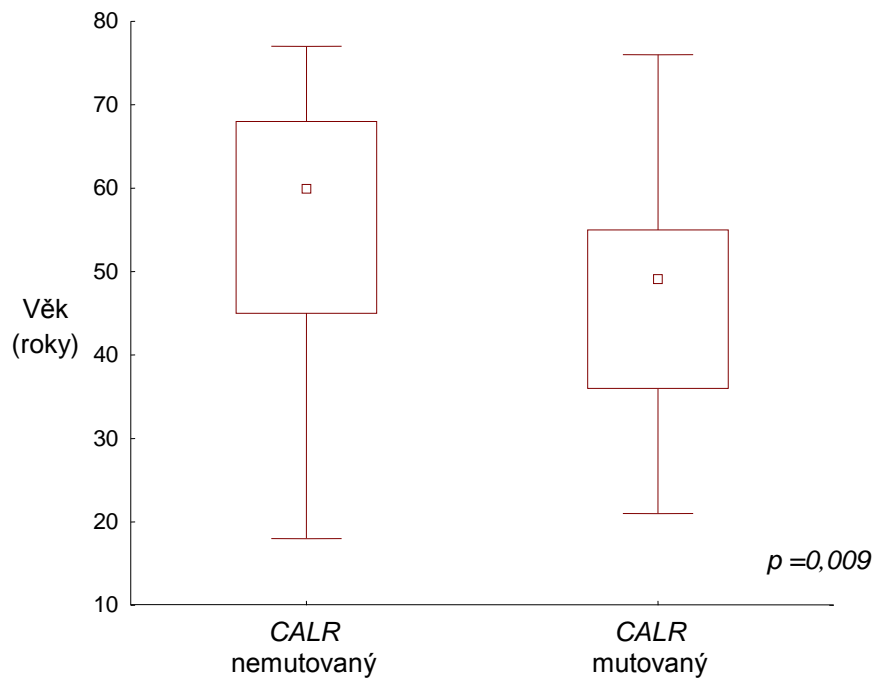
Zaznamenány byly objektivně verifikované trombotické a krvácivé komplikace, které se objevily v době diagnózy nebo v průběhu sledování. Trombotické komplikace zahrnovaly žilní trombózy (hluboká žilní trombóza, plicní embolie, trombóza splachnických žil nebo mozkových splavů) a arteriální trombózy (tranzitorní ischemická ataka, ischemická cévní mozková příhoda, akutní infarkt myokardu a periferní arteriální vaskulární komplikace), krvácivé komplikace (krvácení z gastrointestinálního traktu, hematurie, hemoragická cévní mozková příhoda, významné krvácení během operačních nebo stomatologických zákroků).

Efekt CALR mutace

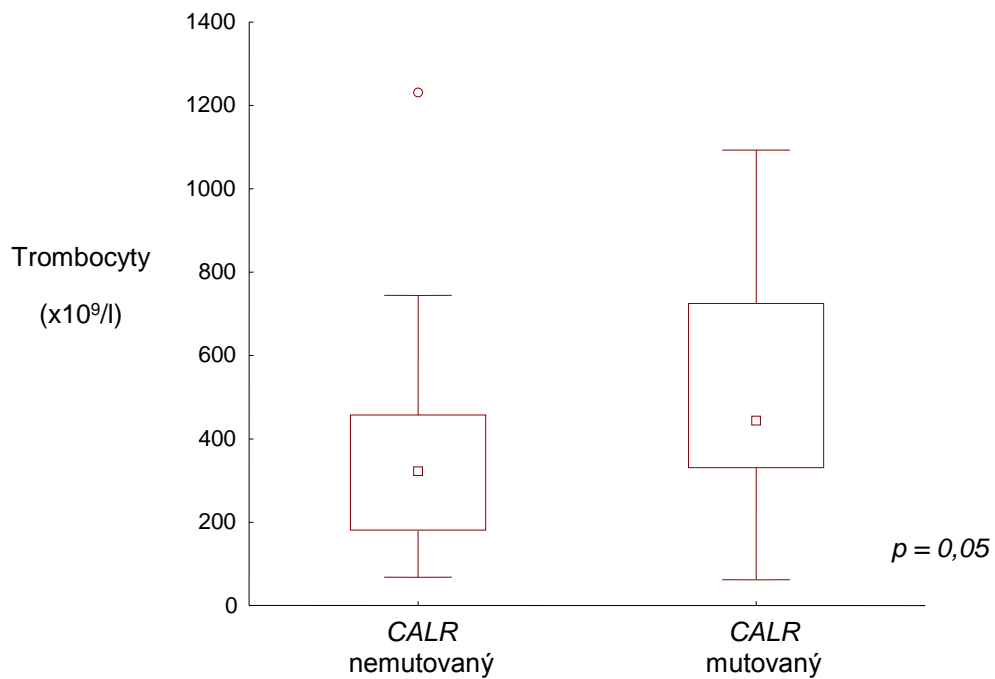
Ve skupině CALR mutovaných jsme prokázali signifikantně nižší věk nemocných (49 versus 59 let; $p=0,009$; graf 2), hraničně vyšší počty trombocytů ($445 \times 10^9/l$ versus $312 \times 10^9/l$; $p=0,05$; graf 3), výrazně menší splenomegalii (2 cm versus 10 cm pod levý oblouk žeberní; $p=0,005$; graf 4) a nižší výskyt konstitučních symptomů (4,5 % versus 56,5 %; $p=0,02$) v době diagnózy ve srovnání s CALR nemutovanými. Zaznamenali jsme nižší počet leukocytů v době diagnózy u CALR mutovaných, efekt ale nedosáhl statistické významnosti. Hodnoty hemoglobinu, hematokritu, cirkulujících blastů v periferní krvi a laktátdehydrogenázy nebyly významně rozdílné v obou skupinách.

U pacientů s CALR mutací typu 1 bylo vyšší zastoupení nemocných s nízkým a středním rizikem-1 dle DIPSS skóre, zatímco mezi MF s CALR mutací typu 2 převažovali pacienti s vysokým a středním rizikem-2, graf 5. Nicméně vzhledem k celkově relativně nízkému počtu CALR mutovaných pacientů nemůžeme statisticky relevantně zhodnotit vliv podtypu CALR mutace na fenotyp nemoci.

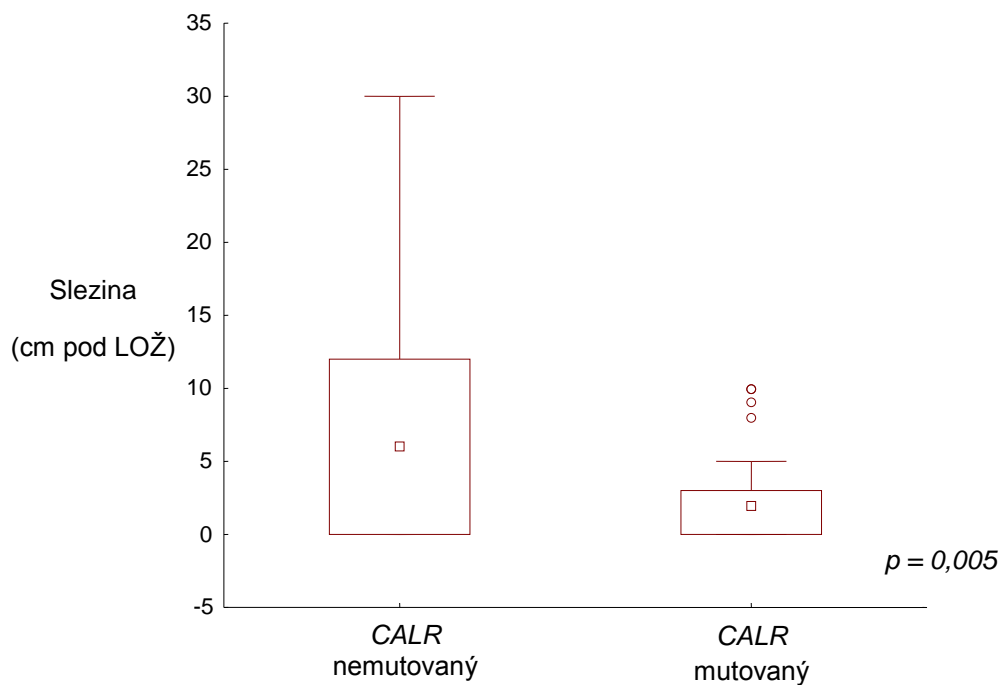
Graf 2: Věk při diagnóze myelofibrózy v závislosti na typu driver mutace.



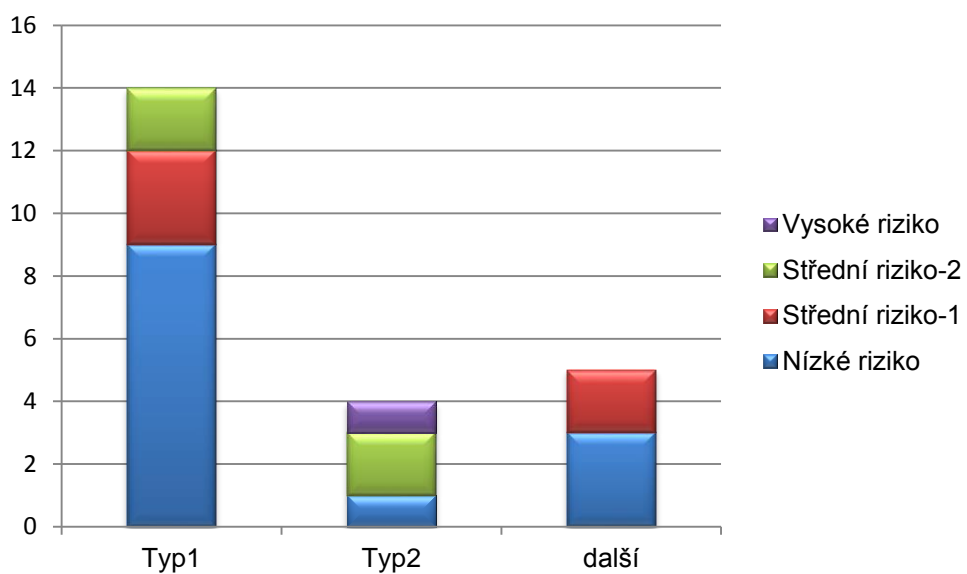
Graf 3: Hodnoty trombocytů při diagnóze v závislosti na typu driver mutace.



Graf 4: Přítomnost splenomegalie při diagnóze v závislosti na typu driver mutace.



Graf 5: Rozložení DIPSS skóre pacientů v době diagnózy dle typu CALR mutace.

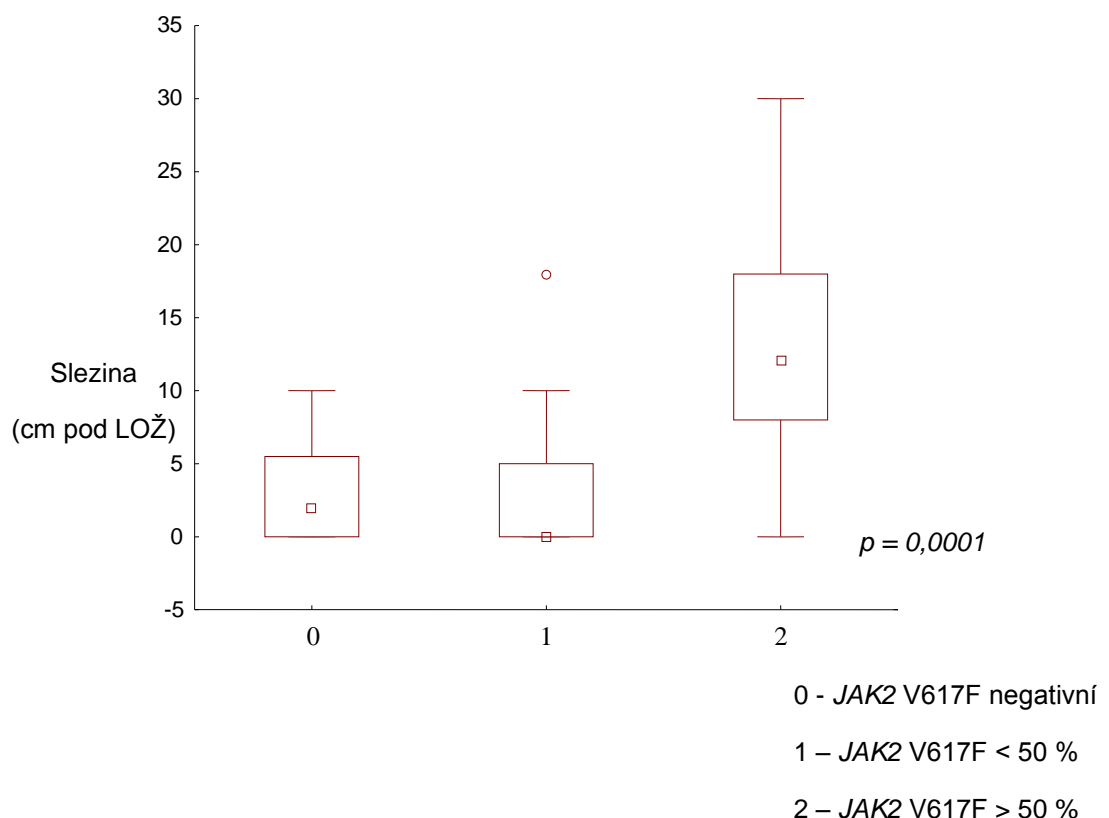


Vliv alelické nálože JAK2 V617F na klinický a laboratorní fenotyp choroby

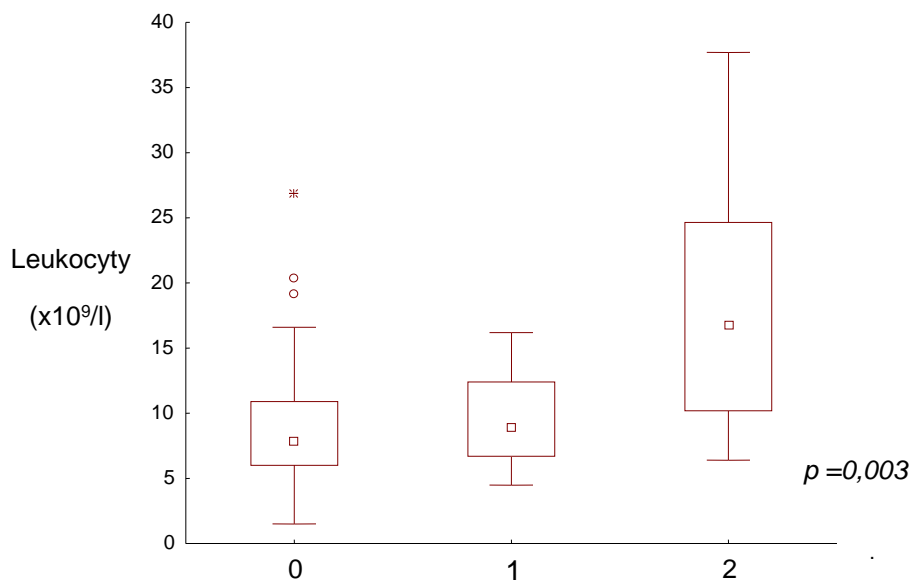
Medián velikosti alelické nálože byl 53 % (rozmezí 7,7- 99). Prokázali jsme významně větší splenomegalii (12 cm versus 0 cm pod levý oblouk žeberní; $p=0,0001$; graf 6) a vyšší hodnoty leukocytů ($16,7 \times 10^9/l$ versus $8,8 \times 10^9/l$; $p=0,003$; graf 7) v době diagnózy u pacientů s alelickou náloží JAK2 V617F nad 50 %.

Rozdíly v ostatních sledovaných parametrech (hemoglobin, hematokrit, cirkulující blasty v periferní krvi, trombocyty, LDH) nebyly statisticky významné.

Graf 6: Přítomnost splenomegalie v závislosti na alelické náloži JAK2 V617F.



Graf 7: Hodnoty leukocytů při diagnóze v závislosti na alelické náloži JAK2 V617F.



0 - JAK2 V617F negativní

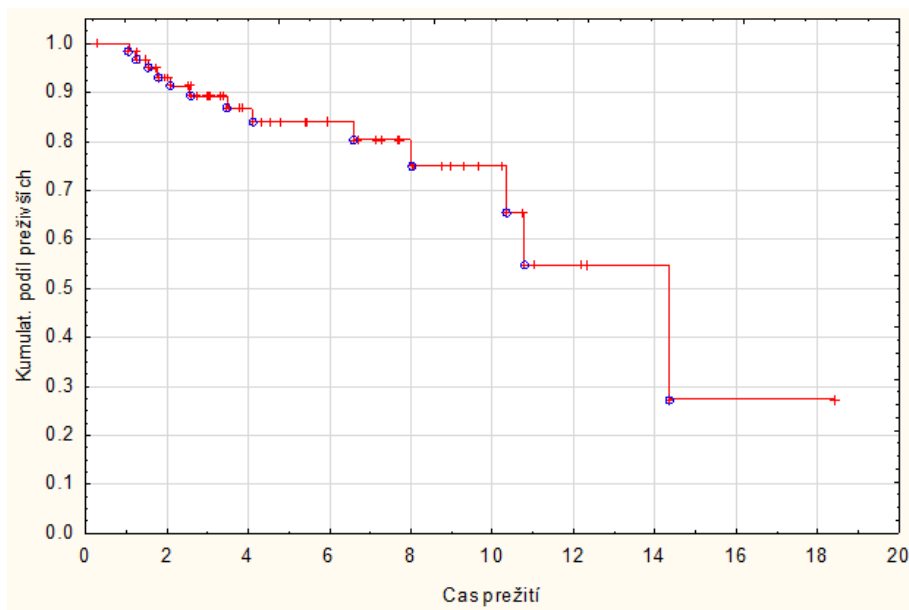
1 - JAK2 V617F < 50 %

2 - JAK2 V617F > 50 %

Celkové přežití nemocných s myelofibrózou

V době analýzy byl medián sledování souboru 46 měsíců (rozmezí 2-221), 13 (20,3 %) pacientů zemřelo v mediánu 42 měsíců (rozmezí 13-173) od diagnózy, graf 8. U tří pacientů došlo k progresi do akutní myeloidní leukemie v mediánu 24 měsíců od diagnózy, ve dvou případech byla příčinou smrti ischemická cévní mozková příhoda, v dalších pak komplikace v důsledku cytopenie spojené s progresí choroby. Medián celkového přežití (OS) u *CALR* mutovaných byl 47 měsíců, u *CALR* nemutovaných 45 měsíců. Rozdíl nebyl statisticky významný [128].

Graf 8: Křivka celkového přežití pacientů s myelofibrózou.



Křivka celkového přežití souboru nemocných s primární myelofibrózou, post-PV myelofibrózou a post-ET myelofibrózou.

Diskuze

Procentuální zastoupení *driver* mutací v naší sérii pacientů odpovídá publikovaným souborům. Taktéž jsme potvrdili srovnatelné rozložení variant *CALR* mutací s nejčastější mutací typu 1 (*CALR del52*) [29,30,115,129,130]. Pozorovali jsme rozdíly v klinickém průběhu choroby v závislosti na mutačním stavu, svědčící pro různou biologickou podstatu nemoci u jednotlivých typů mutací. Všechny *driver* mutace vedou k perzistentní aktivaci JAK/STAT signální dráhy, nicméně pravděpodobně se liší svým specifickým vlivem na další metabolické procesy [45]. Naše výsledky jsou v souladu s popisovaným příznivým efektem *CALR* mutace na klinický fenotyp choroby [35,129,131,132]. Kohortu *CALR* mutovaných MF charakterizoval významně nižší věk, vyšší počty trombocytů, menší splenomegalie a méně časté konstituční symptomy v době diagnózy. Taktéž hodnoty leukocytů byly nápadně nižší (nedosaženo statistické významnosti). V ostatních testovaných parametrech významné rozdíly nebyly. Další autoři identifikovali i nižší kumulativní incidenci anémie u *CALR* mutovaných [131]. V poslední době se ukazuje, že příznivější fenotyp a prognóza je spojena jen s *CALR* mutací typu 1, zatímco u MF

s *CALR* mutací typu 2 jsou častěji nalézány vyšší hodnoty leukocytů, vyšší procento cirkulujících blastů, větší splenomegalie a celkové přežití srovnatelné s *JAK2* V617F mutovanými. Za tyto rozdíly zřejmě odpovídá odlišný patogenetický mechanismus jednotlivých *CALR* mutací s relevantními strukturálními a funkčními rozdíly mezi proteiny kódovanými různými variantami genu *CALR* [114,115,129,133]. Relativně malé počty MF s *CALR* mutací typu 2 v dosud publikovaných souborech zatím brání hlubšímu poznání vlivu jednotlivých typů *CALR* mutace na celkové přežití. Vzácně se vyskytující konkomitantní přítomnost mutace v *JAK2* a *CALR* genu může reflektovat přítomnost dvou odlišných klonů u nemocného [134].

Trombotické komplikace jsme diagnostikovali u 27 % nemocných s častějším výskytem žilních trombóz. U 46 % pacientů s žilní trombózou a u 60 % s trombózou arteriální byl identifikován další rizikový faktor. Relativně nízký počet zaznamenaných událostí nám neumožňuje relevantně zhodnotit vliv *CALR* mutace na riziko trombóz.

Subanalýzou *JAK2* V617F mutovaných MF jsme potvrdili asociaci mezi alelickou náloží mutované alely nad 50 % a klinickým a laboratorním projevem choroby. Nemocní s vyšší alelickou náloží se vyznačovali významně větší splenomegalií a vyššími počty leukocytů v době diagnózy. Medián procentuálního zastoupení mutované alely byl 53 %. Je třeba zmínit, že v dostupné literatuře je i studie poukazující na korelaci mezi kratším celkovým přežitím u PMF a nižší alelickou náloží *JAK2* V617F. Přesná biologická příčina tohoto jevu není zatím objasněna, ale předpokládá se současná přítomnost druhého, V617F negativního klonu, odpovídajícího za agresivnější průběh choroby [43,44].

Mutace *CALR* je asociovaná s delším celkovým přežitím pacientů, a to nezávisle na IPSS/ DIPSS skóre [115,131]. Naproti tomu nejhorší prognózu s mediánem celkového přežití 2,5 roku mají triple negativní pacienti [45]. V našem souboru jsme nepotvrdili statisticky významný rozdíl v celkovém přežití mezi skupinou *CALR* mutovaných a nemutovaných, což je zřejmě dáno jen nízkým počtem zaznamenaných událostí. Navíc ve 39 % případů se nejednalo o mutaci typu 1. Analýza našeho souboru pacientů potvrzuje, že přítomnost *CALR* mutace významně ovlivňuje klinický fenotyp nemoci.

5.1.4 Výskyt a vliv sekvenčních variant kandidátních genů

Pacienti

Ze 73 sledovaných pacientů s MF bylo do analýzy zařazeno 63 nemocných diagnostikovaných v našem centru v období let 1998–2016, u nichž byl dostupný vzorek genetického materiálu z doby diagnózy. Jednalo se o 29 nemocných s diagnózou PMF, 14 v prefibrotické fázi PMF, 9 s post-PV MF a 11 s post-ET MF. Šlo o 28 mužů a 35 žen, s mediánem věku 56 let (rozmezí 18-77). U zbývajících 10 pacientů nebyl v osmi případech dostupný vzorek genetického materiálu, dva se přestěhovali a nebyli dále v našem centru sledováni.

Provedená vyšetření, materiál, metodika a statistické zhodnocení

Vyšetření a materiál

U všech pacientů byly analyzovány vzorky periferní krve z doby diagnózy. Genomická DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Puregene Blood Core kit B (Qiagen, Valencia, CA) nebo automaticky pomocí přístroje MagNa Pure Compact Instrument (Roche). Kvalita (purity) a koncentrace gDNA byla měřena na přístroji Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Genomická DNA pro přípravu NGS knihovny byla ředěna na finální koncentraci 1,8 ng/μl.

U všech pacientů byla testována přítomnost mutací *JAK2* V617F, *MPL* W515/S505 a mutací v 9. exonu genu *CALR*. Zároveň byla vyloučena přítomnost fúzního genu *BCR/ABL1* metodami popsány v části 5.1.3.

Sekvenování nové generace

Doposud standardní metoda sekvenování podle Sangera se vyznačuje časovou náročností. Proto je snaha ji nahradit metodami NGS, jež mají vyšší kapacitu a jsou rychlejší. Měly by tak představovat efektivnější variantu sekvenování. Od uvedení NGS na trh bylo vyvinuto několik různých přístupů přípravy knihovny a metod masivně paralelního sekvenování. Ačkoliv se jednotlivé metody liší svými technickými konfiguracemi a použitými reagensii, sdílejí stejný základ postavený na sekvenování klonově amplifikovaných templátů DNA.

Pomocí technologie sekvenování nové generace byla provedena analýza variant 14 genů (*JAK2*, *MPL*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *TET2*, *SF3B1*, *CBL*, *DNMT3A*, *FLT3*, *RUNX1*, *U2AF1*) zahrnutých v komerčním panelu ClearSeq AML (Agilent

Technologies, Inc.). Pro přípravu NGS knihoven pokrývajících vybrané exony, tzv. mutační *hot spots*, byla použita technologie HaloPlex^{HS} založená na principu amplikonů s molekulárními barkody (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Vyšetřovány byly geny: *ASXL1* (exon 12), *CBL* (exony 8, 9), *DNMT3A* (exony 4, 8, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23), *EZH2* (exony 8, 17, 18), *FLT3* (exony 14, 20), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *JAK2* (exony 12, 14), *MPL* (exon 10), *RUNX1* (exony 3, 4, 8), *SF3B1* (exony 13, 14, 15, 17), *SRSF2* (exon 1), *TET2* (exony 3, 9, 10, 11), *U2AF1* (exony 2, 6). Genomická DNA (50 ng/vzorek) byla štěpena restriktivními enzymy a následně hybridizována s próbami a indexy. Po streptavidin-biotinylové selekci fragmentů a jejich ligaci byla provedena amplifikace cílových úseků pomocí PCR. Kvalita sekvenačních knihoven byla ověřena pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Párová sekvenace poolovaných DNA knihoven (2x150 bp) probíhala na přístroji MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) užívající MiSeq Reagent Kit v2 (300 cyklů) s hloubkou čtení (coverage depth) 1000x.

Analýza sekvenačních dat byla realizována pomocí programu SureCall (verze 3.5.1.46; Agilent Technologies, Inc.), včetně ořezávání adaptorových sekvencí konců readů (read trimming) a mapování (alignment) na referenční sekvenci human GRCh37/hg19. K anotování detekovaných variant vybraných genů byly použity databáze COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.gov/projects/SNP>) a Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Přítomnost alel nalezených pomocí NGS s VAF (variant allele frequency) nad 20% byla validována pomocí Sangerova sekvenování (ABI Prism 3100, Applied Biosystems).

Metody a statistika

Laboratorní a klinická data z doby diagnózy byla sbírána retrospektivně. Výsledky jsou prezentovány jako medián a rozmezí zjištěných hodnot u plynule proměnných, případně frekvence u kategoriálních proměnných.

Vztah mezi kategoriálními proměnnými byl analyzován pomocí chi kvadrát testu v kontingenčních tabulkách. Pokud byly četnosti malé, použili jsme exaktní Fisherův faktoriálový test. Rozdíl v hladině spojitých proměnných ve skupinách pacientů byl hodnocen pomocí Kruskal-Wallisova testu. Kruskal-Wallisův test je neparametrická

analogie jednovýběrové ANOVY. Test zkoumá, zda obě datové sady pocházejí ze stejné distribuce (tedy z distribuce se stejným mediánem).

Přítomnost jakékoliv nepříznivé sekvenční genové varianty byla považována za jediný rizikový faktor. Nemocní s alespoň jednou nepříznivou sekvenční variantou genu byli označeni jako riziková skupina, ti bez nepříznivých sekvenčních variant genů jako kontrolní skupina. Přežití nemocných v obou skupinách jsme srovnávali pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik, hlavním ukazatelem je tzv. poměr rizik (HR – hazard ratio). Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Veškerá práce s daty, vizualizace a analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB a Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA.

Výsledky

Charakteristika souboru

Klinický fenotyp souboru v době diagnózy shrnuje tabulka 9. Pokročilost choroby byla u všech pacientů stanovena dle DIPSS skóre.

U všech subjektů bylo realizováno cytogenetické vyšetření, prognosticky nepříznivé cytogenetické změny se vyskytovaly pouze u 4 pacientů (6 %), zobrazuje tabulka 10. V kombinaci s přídatnými alelami pouze u dvou MF.

Výskyt driver mutací

Distribuce *driver* mutací ve vyšetřovaném souboru byla následující: *JAK2* V617F 35 případů (56 %), *CALR* (exon 9) 22 případů (35 %), *MPL*(W515) 4 případy (6 %), 2 pacienti triple negativní. U jednoho pacienta byly zjištěny současně mutace *JAK2* V617F a *CALR*. Z *CALR* mutovaných neslo 64 % mutaci typu 1 (14/22), 18 % mutaci typu 2 (4/22) a 18 % (4/22) další, méně frekventní typy.

Tabulka 9: Klinický a laboratorní fenotyp pacientů s MF v době diagnózy.

| Charakteristika | Pacienti | | |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | všichni (n = 63) | s přídatnými alelami (n = 28) | bez přídatných alel (n = 35) |
| Medián věku (roky) (rozmezí) | 56 (18-77) | 60 (32-77) | 53 (18-77) |
| Muži/ ženy | 28/35 | 12/16 | 16/19 |
| Medián hemoglobinu (g/l) (rozmezí) | 124 (78-155) | 115 (81-141) | 129 (78-155) |
| Medián leukocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 8,5 (1,5-37,7) | 9 (1,5-35,9) | 8,5 (1,8-37,7) |
| Medián trombocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 359 (62-1233) | 311 (62-1233) | 395 (68-1093) |
| Medián cirkulujících blastů (%) (rozmezí) | 0 (0-6) | 1 (0-4) | 0 (0-6) |
| Splenomegalie (% pacientů) medián vel. pod LOŽ v cm (rozmezí) | 65 8,5 (2-30) | 68 9,5 (2-30) | 63 6 (2-18) |
| Nepříznivý karyotyp ¹ (počet pacientů) | 4 | 2 | 2 |
| Medián LDH (μkat/l) (rozmezí) | 7,2 (2,41-3,1) | 7,08 (2,9-19,7) | 7,2 (2,41-3,1) |
| Konstituční symptomy ² (% pacientů) | 21 | 25 | 17 |
| DIPSS skóre | počet pacientů | počet pacientů | počet pacientů |
| Nízké riziko | 23 | 4 | 19 |
| Střední riziko-1 | 27 | 15 | 12 |
| Střední riziko-2 | 13 | 9 | 4 |
| Vysoké riziko | 0 | 0 | 0 |

¹nepříznivý karyotyp: komplexní karyotyp, +8,-7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 přestavba

²konstituční symptomy: zvýšení tělesné teploty > 37,5°C (bez průkazu infekce), ztráta hmotnosti (o více než 10 % za 6 měsíců) a noční poty (s noční výměnou prádla).

Tabulka č. 10: Cytogenetické nálezy v době diagnózy u pacientů s MF.

| Cytogenetické změny | počet pacientů |
|----------------------------------------------------|-----------------------|
| normální karyotyp | 50 |
| trisomie 9 | 2 |
| t(12;12) | 1 |
| t(9;18) | 1 |
| t(3;6) | 1 |
| del 13q | 1 |
| Prognosticky nepříznivé cytogenetické změny | počet pacientů |
| komplexní karyotyp | 1 |
| del 12p | 1 |
| trisomie 8 | 2 |
| <i>Nehodnotitelný nález</i> | 3 |

Nálezky NGS

Ověřili jsme přítomnost *driver* mutací (nálezy NGS přesně souhlasily s výsledky standardních vyšetřovacích molekulárních metod). Detailní seznam identifikovaných přídatných alel ukazuje tabulka 11. Přídatné varianty genů jsme detekovali u 28 pacientů (44 %) se srovnatelnou frekvencí výskytu u *JAK2*, *CALR* i *MPL* mutovaných (47 %, 45 %, 25 %). Všechny prokázané přídatné genové varianty detekované NGS se vyskytovaly v heterozygotní formě s VAF 6-55 %. Nejčastěji zasaženými geny byly *ASXL1* (27 %), *TET2* (11 %) a *SF3B1* (6 %). Celkem 75 %, 18 % a 7 % nemocných neslo 1, 2 nebo tři a více přídatných variant genů spolu s *driver* mutací, tabulka 12. Koincidenci *driver* mutací a přídatných alel zobrazuje tabulka 13. U *CALR* mutovaných MF se nejčastěji nacházely varianty genu *ASXL1* (82 %), ať už samostatně nebo v kombinaci s dalšími přídatnými alelami. Pozorovali jsme vyšší zastoupení přídatných alel u pacientů s non-1 typem *CALR* mutace ve srovnání s *CALR* mutací typu 1 (71 % versus 43 %), tabulka 13. Četnost přídatných alel byla vyšší u pacientů s PMF (59 %) a post-PV MF (55 %) oproti nemocným s prePMF (21 %) a post-ET MF (27 %), znázorňují grafy 9-12. Taktéž výskyt *ASXL1* variant byl nejvyšší u PMF ve srovnání s prePMF, post-PV MF a post-ET MF (64 %, 12 %, 12 % a 12 %).

Tabulka č. 11: Identifikované přídatné alely u pacientů s myelofibrózou.

| Gen | Varianta | | | |
|---------|----------|--------------|---------------|------------|
| ASXL1 | G652S | rs3746609 | bodová mutace | |
| | L1116F | VUS | bodová mutace | |
| | G646fs12 | COSM1411076 | inzerce G | |
| | T880fs2 | COSM4385699 | inzerce A | |
| | E802* | VUS | stop kodon | |
| | L764fs13 | VUS | inzerce 10bp | |
| | E1102D | rs139115934 | bodová mutace | |
| | E635fs15 | rs766433101 | delece 23bp | |
| | R693* | rs373221034 | stop kodon | |
| | N986S | rs145132837 | bodová mutace | |
| | G626fs5 | VUS | delece 11bp | |
| | R965* | rs397515401 | stop kodon | |
| | TET2 | Q744* | rs1363720470 | stop kodon |
| | | Q963* | VUS | stop kodon |
| Q1532* | | VUS | stop kodon | |
| Q114* | | VUS | stop kodon | |
| C973fs3 | | rs1446339712 | delece G | |
| N791fs2 | | VUS | delece A | |
| SF3B1 | K666N | rs377023736 | bodová mutace | |
| | R625C | rs775623976 | bodová mutace | |
| DNMT3A | D702fs10 | VUS | delece GA | |
| | R326H | rs758881009 | bodová mutace | |
| EZH2 | D681Y | VUS | bodová mutace | |
| CBL | R420Q | rs267606708 | bodová mutace | |
| U2AF1 | Q157R | rs371246226 | bodová mutace | |
| FLT3 | Y591* | VUS | stop kodon | |
| RUNX1 | L56S | rs111527738 | bodová mutace | |

*VUS – variant nejasného významu (variant of unknown significance)

Efekt přídatných alel na klinický fenotyp nemoci

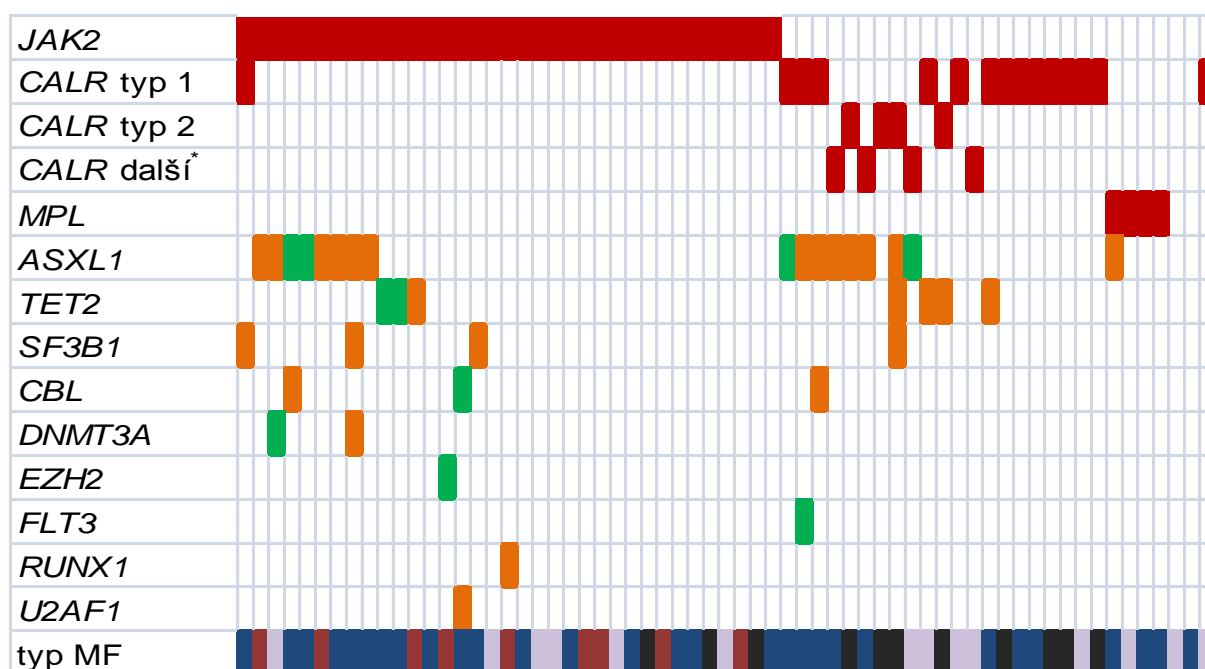
Obecně byli pacienti s přídatnými variantami testovaných genů starší (60 versus 53 let; $p=0,025$; graf 13). Zajímavé je, že to nebylo dáno přítomností nejčastěji se vyskytujících variant genu *ASXL1*, u kterých významný rozdíl ve věku zaznamenán nebyl, ale vlivem variant ostatních genů ($p=0,0017$; graf 14). Klinický a laboratorní fenotyp nemoci v době diagnózy u pacientů s nejčastěji postiženými geny (*ASXL1*, *TET2* and *SF3B1*) shrnuje tabulka 14.

Tabulka 12: Výskyt driver mutací a přídatných alel u myelofibrózy.

| Počet přídatných alel | Mutace | | | |
|-----------------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------------------|
| | JAK2 V617F (n = 35) | CALR (n = 22) | MPL (n = 4) | Triple negativní (n = 2) |
| | počet pacientů | | | |
| 0 | 19 | 11 | 3 | 2 |
| 1 | 12 | 8 | 1 | 0 |
| 2 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| ≥ 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Přídatné alely | počet pacientů | | | |
| ASXL1 | 8 | 8 | 1 | 0 |
| TET2 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| EZH2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| DNMT3A | 2 | 0 | 0 | 0 |
| CBL | 2 | 1 | 0 | 0 |
| FLT3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| SF3B1 | 3 | 2* | 0 | 0 |
| RUNX | 0 | 1 | 0 | 0 |
| U2AF | 1 | 0 | 0 | 0 |
| IDH1/2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SRSF2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Jeden pacient byl současně JAK2 V617F i CALR pozitivní.

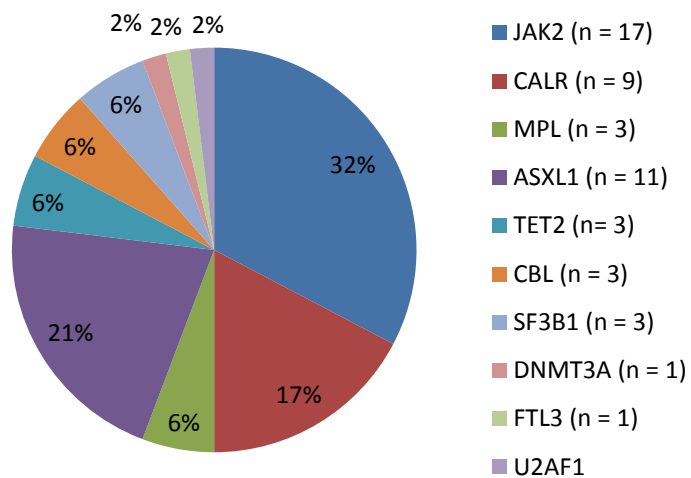
Tabulka 13: Distribuce driver mutací a přídatných alel u myelofibrózy.



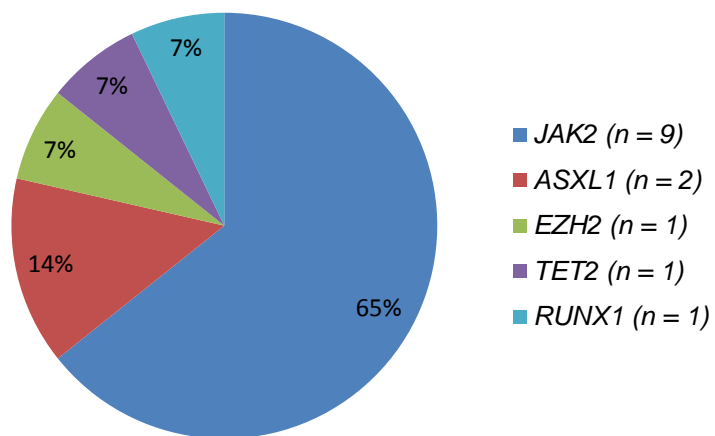
Koincidence driver mutací a přídatných variant studovaných genů u pacientů s myelofibrózou. Každý sloupec představuje jednoho pacienta. Přítomnost driver mutací a přídatných alel je znázorněna barevně: ■ somatické driver mutace ■ přídatné alely dříve popsané u hematologických malignit ■ přídatné alely dříve nepopsané. Typ myelofibrózy je vyznačen barevně: ■ PMF ■ pre-PMF ■ post-ET MF ■ post-PV MF

* Další typy CALR mutací: ins2, del3, del46, del19.

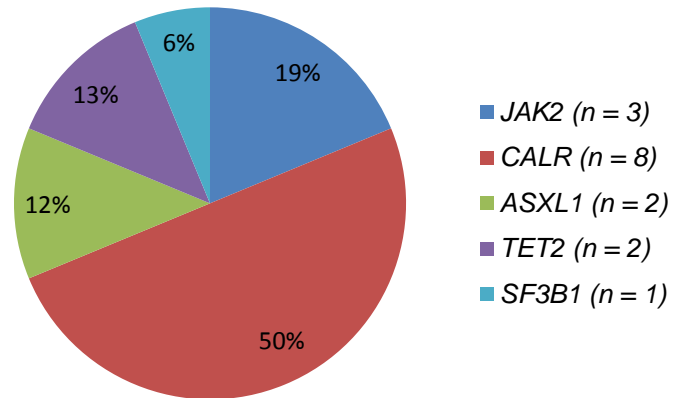
Graf 9: Výskyt driver mutací a přídavných alel u PMF.



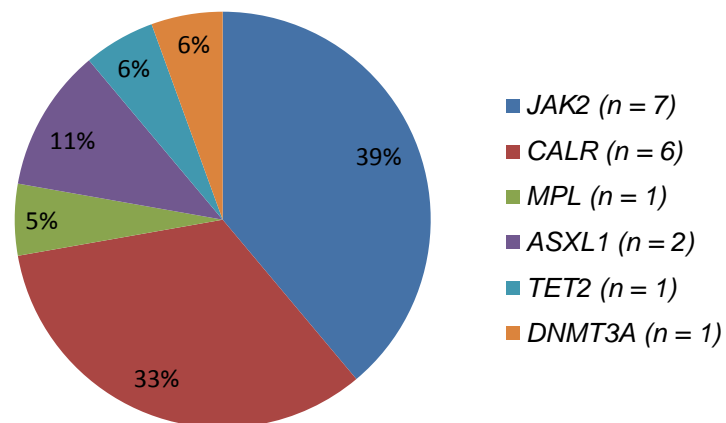
Graf 10: Výskyt driver mutací a přídavných alel u post-PV MF.



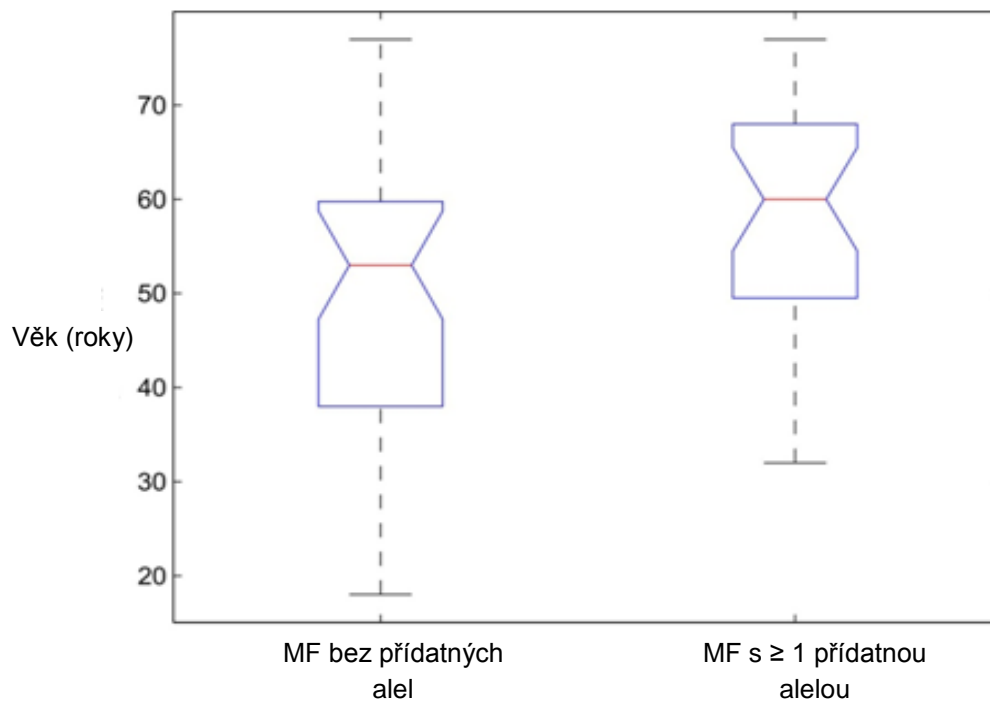
Graf 11: Výskyt driver mutací a přídavných alel u post-ET MF.



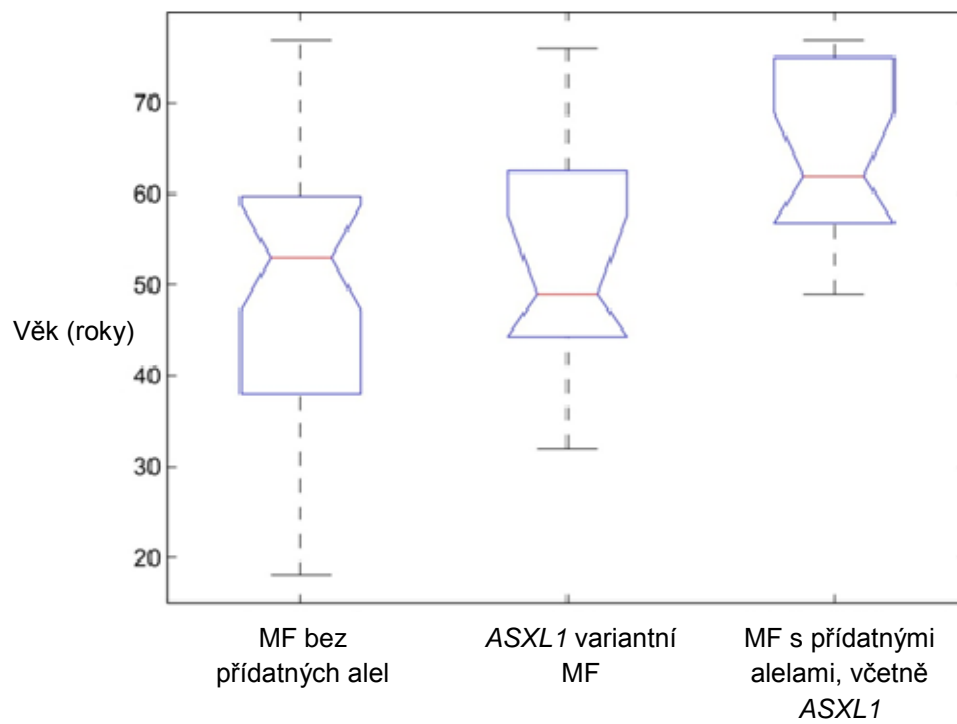
Graf 12: Výskyt driver mutací a přídavných alel u pre-PMF.



Graf 13: Věk nemocných při diagnóze v závislosti na výskytu přídatných alel.



Graf 14: Vliv ASXL1 mutace na věk nemocných v době diagnózy.



Tabulka 14: Klinický a laboratorní fenotyp v době diagnózy u pacientů s nejfrekventnějšími variantami genů ASXL1, TET2 a SF3B1.

| | ASXL1 | TET2 | SF3B1 |
|----------------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Medián hemoglobinu (g/l) (rozmezí) | 115 (87-141) | 117 (88-138) | 96,5 (81-132) |
| Medián leukocytů ×10 ⁹ /l (rozmezí) | 8,3 (3,5-31,5) | 8,4 (1,5-35,9) | 6,2 (4-16,2) |
| Medián trombocytů ×10 ⁹ /l (rozmezí) | 351 (62-912) | 139 (62-1233) | 123 (62-580) |
| Cirkulující blasty ≥ 1% (% pacientů) | 47 | 86 | 50 |
| Splenomegalie (% pacientů) | 65 | 71 | 50 |
| Medián velikosti pod LOŽ v cm (rozmezí) | 7 (0-19) | 5 (0-24) | 1 (0-5) |
| Medián LDH (μkat/l) (rozmezí) | 7,79 (2,9-19,7) | 7,26 (4,11-18,4) | 7,6 (3,01-12,1) |
| Konstituční symptomy* (% pacientů) | 23 | 28 | 0 |
| DIPSS skóre ≥ 3 (% pacientů) | 29 | 43 | 50 |
| JAK2 V617F mutace (% pacientů) | 47 | 43 | 75** |
| CALR mutace (% pacientů) | 47 | 57 | 50 |
| MPL mutace (% pacientů) | 6 | 0 | 0 |

*Konstituční symptomy: zvýšená teplota (> 37,5°C; bez průkazu infekce), hubnutí (více než 10 % během 6 měsíců) a noční poty (s výměnou prádla).

**Jeden pacient byl současně JAK2 V617F a CALR pozitivní.

Subanalýzou pacientů s variantními alelami ASXL1 jsme nepotvrdili statisticky významné rozdíly v ostatních sledovaných parametrech (hodnota hemoglobinu, LDH, počet leukocytů, trombocytů, přítomnost splenomegalie, blastů v periferní krvi a konstitučních symptomů) ve srovnání s *wild type* ASXL1 MF. Pozorovali jsme nápadně rostoucí podíl ASXL1 variant u zvyšujícího se DIPSS skóre (nedosaženo statistické významnosti).

Výskyt dalších maligních onemocnění

U 14 % MF došlo v průběhu sledování k rozvoji další malignity, shrnuje tabulka 15. Ve všech případech se jednalo o nemocné s alespoň jednou nepříznivou přídatnou alelou přítomnou v době diagnózy Ph-MPN, pouze jeden pacient užíval alkylační léčbu.

Tabulka 15: Přehled dalších maligních onemocnění u nemocných s MF.

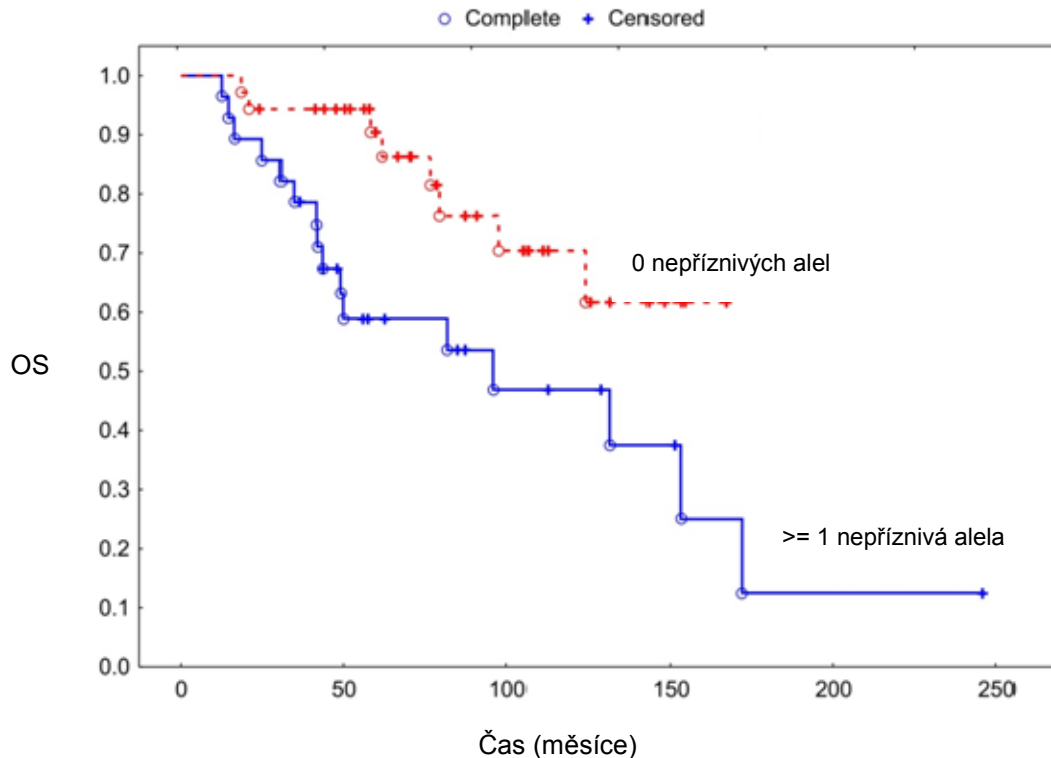
| Typ malignity | Počet pacientů | Počet přídatných alel |
|---------------------------|----------------|-----------------------|
| Karcinom prsu | 1 | 1 |
| Karcinom laryngu | 1 | 1 |
| Karcinom sigmoidu | 1 | 2 |
| Karcinom ledviny | 2 | 1 |
| Karcinom močového měchýře | 1 | 2 |
| Karcinom jazyka | 1 | 1 |
| Melanom | 1 | 1 |
| Mnohočetný myelom | 1 | 1 |

Efekt přídatných alel na celkové přežití nemocných s myelofibrózou

V době analýzy byl medián sledování souboru 67 měsíců (rozmezí 13-198), 24 (38 %) pacientů zemřelo v mediánu 49,5 měsíců (rozmezí 13-173) od diagnózy. U dvou pacientů došlo k progresi do AML v mediánu 96 měsíců od diagnózy. Ve dvou případech byla příčinou smrti ischemická cévní mozková příhoda, v 17 progrese MF s komplikacemi v důsledku cytopenie, v dalších dvou komplikace či relaps choroby po alogenní transplantaci, dva pacienti zemřeli v důsledku další malignity.

V souladu s recentní literaturou jsme z detekovaných subklonálních alel považovali za prognosticky nepříznivé varianty v genech *ASXL1*, *EZH2*, *CBL*, *RUNX1*, *U2AF1* a *TET2* (do analýzy jsme zařadili pouze ty varianty *TET2* genu, které měly predikovaný vliv na protein *in silico*) [35,116,123,126]. Alespoň jedna nepříznivá přídatná alela se nacházela u 41 % MF. Jejich přítomnost byla spojena s horším celkovým přežitím (53 versus 71 měsíců), respektive s téměř třikrát vyšší pravděpodobností úmrtí pacientů nesoucích variantní alely v daných genech (HR=2,77; 95 % CI 1,17-6,56; p=0,017; graf 15). Jelikož byli v našem souboru pouze 4 pacienti se 2 a více nepříznivými alelami, nemohli jsme statisticky relevantně vyšetřit vliv počtu přídatných variant testovaných genů na OS.

Graf 15: Celkové přežití nemocných s myelofibrózou a prokázanými prognosticky nepříznivými přídatnými alelami.



Diskuze

Sekvenční varianty kandidátních genů jsme našli u 44 % pacientů s obdobnou frekvencí ve skupinách *JAK2*, *MPL* i *CALR* mutovaných. Současné studie uvádějí výskyt *passenger* mutací u více než 80 % PMF [116,123]. V našem souboru jsme tedy zaznamenali nižší četnost přídatných alel, což lze vysvětlit jednak nižším počtem vyšetřovaných exonů vybraných genů (jednotlivé studie se liší počtem vyšetřovaných genů v různých NGS panelech) a zejména odlišným složením naší sestavy pacientů s vyšším zastoupením prefibrotické fáze PMF a post-PV/ET MF. Většina dosud publikovaných souborů zahrnovala pouze PMF [35,116,127]. V současné době je již popsán rozdílný výskyt *passenger* mutací u prePMF a PMF. Ačkoli rozložení *driver* mutací je mezi těmito jednotkami rovnoměrné, výskyt *passenger* mutací je častější u rozvinuté PMF. Ve zvýšené míře jsou tyto mutace detekovány v době transformace do akutní leukemie [26,35,119,135]. Stejně tak

post-PV/ET MF mohou představovat odlišné entity, u nichž zatím není výskyt a význam variant řady kandidátních genů dostatečně popsán. V naší kohortě jsme prokázali nejvyšší četnost přídatných alel u PMF, nejnižší u prePMF. Zatímco vliv *driver* mutací na klinický a laboratorní fenotyp nemoci je již poměrně dobře dokumentován, význam přídatných variant dalších genů není zcela jasný. Shodně s dalšími autory jsme prokázali signifikantně vyšší věk při diagnóze u MF s přítomností sekvenčních variant některého z testovaných genů [116,136]. Výjimkou byly nejčastější *ASXL1* varianty, které nebyly spojené s významně vyšším věkem nemocných. Současné studie uvádějí asociaci mezi přítomností *ASXL1* variant a častějším výskytem konstitučních symptomů, vyšším DIPSS Plus skóre či nižšími hodnotami hemoglobinu [116,123]. Subanalýzou *ASXL1* variantních MF jsme nepotvrdili statisticky významné rozdíly v klinickém a laboratorním fenotypu nemocných. Pozorovali jsme rostoucí podíl *ASXL1* variant se zvyšujícím se DIPSS skóre (efekt nebyl statistický významný, zřejmě pro limitovaný počet subjektů).

Vannucchi *a kol.* popsali asociaci mezi mutacemi v genech *ASXL1*, *SRSF2* a *EZH2* a horším celkovým přežitím, dále mezi mutacemi v genu *IDH1/2* a kratším leukemia-free přežitím u PMF [35]. Tefferi *a kol.* publikovali rizikovou stratifikaci pacientů na základě mutačního profilu *CALR/ASXL1* s prodlouženým celkovým přežitím u pacientů *CALR+/ASXL1-* ve srovnání s pacienty *CALR-/ASXL1+* [46]. Guglielmelli *a kol.* identifikovala prognostický význam počtu nepříznivých mutací, s nejkratším celkovým přežitím pacientů se dvěma a více nepříznivými mutacemi [127]. Následně Tefferi *a kol.* s využitím širšího panelu 27 genů prokázali, že i sekvenční varianty genů *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *CEPBA* a *SH2B3* jsou nepříznivým prognostickým faktorem, spojeným s horším celkovým nebo leukemie-free přežitím, a to nezávisle na DIPSS Plus skóre či typu *driver* mutace. Současně autoři poukazují na nejasný význam variant *EZH2* a *IDH1/2* genů. U některých přídatných variant genů označených autory za nepříznivé, zatím nebyl prokázán vliv na funkci proteinu [116]. Nově je označena za nepříznivou také mutace *U2AF1Q157* [126]. Závěry studií zabývajících se prognostickým významem *TET2* mutací jsou rozporuplné [123,137]. Lundberg *a kol.* ve své práci uvádějí, že mutace v *TP53* a *TET2* jsou spojeny s horším OS a vyšším rizikem leukemické transformace [123]. Další recentní studie poukazuje na prognostický význam pořadí vzniku somatických mutací v *JAK2* a *TET2* genu. Pacienti, u nichž předcházel vznik somatické mutace v *TET2* genu získání *JAK2* V617F mutace, byli starší s horší léčebnou odpovědí

k JAK inhibitorům [138]. I tato skutečnost může vysvětlovat rozdílná pozorování vlivu *TET2* mutací na přežití nemocných. Lundberg *a kol.* dále popisují, že četnost *passenger* mutací ve vzorcích odebraných v časně a pozdní fázi onemocnění se významně neliší. Během doby sledování se u 197 MPN pacientů objevily pouze dvě nové mutace [123]. Taktéž v naší kohortě MF jsme potvrdili významně kratší celkové přežití u MF s nepříznivými přídatnými variantami genů (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *CBL*, *U2AF1Q157* a *RUNX1*) v době diagnózy. Nicméně klinický dopad řady nově identifikovaných mutací je ještě třeba dostatečně ověřit v širší populaci pacientů.

Další malignity jsme diagnostikovali výhradně u MF s rizikovým molekulárním profilem, považujeme proto za důležité věnovat těmto nemocným zvýšenou pozornost stran rizika vzniku dalších nádorových onemocnění a důsledně provádět screeningová vyšetření.

Rozlišení germinálních variant studovaných genů od získaných somatických mutací nebylo v naší práci realizováno pro nedostupnost párových vzorků germinální DNA. Důvodem bylo retrospektivní vyšetřování vzorků odebraných v době diagnózy a úmrtí většiny pacientů s variantními alelami v době analýzy. Vyšetřovali jsme mutační *hot spots* v rámci predesignovaného panelu, nelze tedy vyloučit i přítomnost dalších nedetekovaných variant v jiných nezahrnutých exonech a regulačních oblastech studovaných genů.

5.1.5. Multivariační analýza prognostických faktorů

Úvod

Multivariační analýza byla provedena ve skupině 63 pacientů s MF, kteří měli vyšetřeny všechny zvažované proměnné. Z analýzy byli vyřazeni nemocní, u kterých nebyla provedena požadovaná vyšetření. Sledovali jsme vliv jednotlivých proměnných na celkové přežití nemocných. Ke stanovení rizika MF bylo stanoveno DIPSS skóre (DIPSS Plus skóre nebylo možno přesně určit u všech pacientů z důvodů chybějícího či nehodnotitelného cytogenetického nálezu).

Jako proměnné byly uvažovány:

- věk (roky)
- počet leukocytů ($\times 10^9/l$)
- počet trombocytů ($\times 10^9/l$)
- hodnota hemoglobinu (g/l)
- cirkulující blasty ≥ 1 %
- přítomnost konstitučních symptomů
- DIPSS skóre
- splenomegalie (velikost slezimy palpačně hmatné pod LOŽ, v cm)
- hodnota LDH ($\mu\text{kat/l}$)
- *CALR* mutace
- *JAK2* V617 F mutace
- přítomnost alespoň jedné nepříznivé sekvenční varianty

Soubor nemocných

Klinický, laboratorní fenotyp a distribuci *driver* mutací a sekvenčních variant kandidátních genů v souboru shrnují tabulky 9 a 13.

Metodika

Nejprve jsme jednotlivé faktory testovali univariálně, poté bylo provedeno hodnocení pomocí mnohorozměrného modelu. Vliv sledovaných proměnných byl hodnocen Coxovým regresním modelem proporcionálních rizik, který kvantifikuje poměr rizik (hazard ratio, HR) mezi danými skupinami pacientů.

Tabulka 16: Vliv sledovaných proměnných na celkové přežití u nemocných s MF, jednorozměrná analýza.

| | Coef | exp (coef) | se (coef) | Z | p-values |
|-------------------------------------|-------------|-------------------|------------------|----------|-----------------|
| Věk (roky) | 0,06271 | 1,06472 | 0,01664 | 3,768 | 0,000164 |
| Leukocyty x10⁹/l | 0,01401 | 1,01411 | 0,02483 | 0,564 | 0,573 |
| Hb (g/l) | -0,03273 | 0,96780 | 0,01052 | -3,11 | 0,00187 |
| Cirkulující blasty ≥ 1% | 1,832e+01 | 9,061e+07 | 9,131e+00 | 2,007 | 0,0448 |
| Konstituční symptomy | 1,0620 | 2,8923 | 0,4195 | 2,532 | 0,0114 |
| DIPSS skóre | 1,4882 | 4,4290 | 0,2821 | 5,275 | 1,33e-07 |
| Trombocyty x10⁹/l | -0,003358 | 0,996647 | 0,001102 | -3,047 | 0,00231 |
| Slezina (cm pod LOŽ) | 0,05203 | 1,05341 | 0,02482 | 2,097 | 0,036 |
| LDH (ukat/l) | 0,03707 | 1,03777 | 0,03794 | 0,977 | 0,328 |
| CALR | -0,6451 | 0,5246 | 0,4417 | -1,461 | 0,144 |
| JAK2 V617F | 0,7472 | 2,1110 | 0,4204 | 1,777 | 0,0755 |
| ≥1 nepříznivá alela | 0,8363 | 2,3079 | 0,4123 | 2,028 | 0,0425 |

Sloupec exp(coef) vyjadřuje poměr rizik mezi skupinami pacientů, kteří se v daném prediktoru liší o jednotku. Tedy např. hodnota 2,89 u konstitučních symptomů znamená, že pacient s přítomnými konstitučními symptomy má téměř třikrát větší riziko okamžitého úmrtí než pacient bez těchto symptomů (přičemž předpokládáme, že v ostatních prediktorech se tyto dva pacienti neliší).

V univariální analýze vycházejí významně následující prediktory: DIPSS skóre, věk, hodnota Hb, cirkulující blasty ≥ 1 %, konstituční symptomy, počet trombocytů, přítomnost splenomegalie (palpačně hmatné pod LOŽ) a přítomnost ≥ 1 nepříznivé sekvenční varienty vyšetřovaných genů. Vyšší DIPSS skóre, věk, cirkulující blasty, splenomegalie, přítomnost konstitučních symptomů a přítomnost ≥ 1 nepříznivé varianty riziko úmrtí zvyšuje. Naopak vyšší hodnoty Hb a trombocytů riziko úmrtí snižují.

Ve vícerozměrném modelu bylo DIPSS skóre jediným významným prognostickým faktorem přežití. To ukazuje, že DIPSS model je dobře konstruovaným prediktorem, který obsahuje všechny podstatné faktory. Ostatní faktory mimo DIPSS skóre významné nebyly. Pokud v modelu ponecháme jen významné prediktory OS, redukuje se mnohorozměrný model zpět na jednorozměrný model, kde jediným

prediktorem je DIPSS. (Poměr rizik okamžitého úmrtí u dvou pacientů, kteří se v DIPSS liší o jednu rizikovou skupinu je asi 4,4, což je velmi významný efekt, ($p < 0,0001$).

Závěr

Prokázali jsme rozdíly v klinickém průběhu choroby v závislosti na mutačním stavu. Všechny *driver* mutace vedou k perzistentní aktivaci JAK/STAT signální dráhy, pravděpodobně se ale liší svým specifickým vlivem na další metabolické procesy [45,139]. Analýza našeho souboru pacientů potvrdila pozorování, že přítomnost *CALR* mutace příznivě ovlivňuje klinický fenotyp a průběh nemoci.

Sekvenování nové generace dále zvyšuje podíl pacientů s MF a potvrzeným markerem klonality onemocnění. Zároveň ukazuje, že také typ a počet přídatných variant genů je spojen s rozdílným průběhem nemoci. Dosavadní riziková stratifikace MF je založena zejména na demografických, klinických a hematologických parametrech a zatím není pochyb o užitečnosti IPSS, DIPSS skóre při rozdělování pacientů do odlišných rizikových skupin při diagnóze nebo v průběhu choroby. DIPSS Plus skóre zohledňuje také cytogenetické riziko, jelikož některé změny karyotypu jsou spojeny s extrémně špatnou prognózou. Cytogenetické změny jsou však detekovány pouze u části pacientů. V poslední době nabývá na stále větší důležitosti hodnocení molekulárního profilu. Nicméně i v současné „éře molekulárních markerů“ jsme multivariační analýzou potvrdili význam DIPSS skóre, jako silného prediktoru přežití. Nově navrhované rizikové modely ještě vyžadují dostatečnou validaci v klinické praxi. Pro využití informací z molekulárně genetických analýz je nezbytná přesná identifikace prognosticky relevantních mutací a standardizace metod NGS. Mutační stav pacientů by měl být zohledněn nejen při jejich rizikové stratifikaci, ale také v klinických studiích testujících účinnost nových léčebných modalit.

5.2. Podstudie 2: Hodnocení generace trombinu u nemocných s MF.

5.2.1. Úvod

Epidemiologie

Trombózy jsou jedny z nejzávažnějších komplikací nemocných s MF, nepříznivě ovlivňující kvalitu i délku života. Reálný výskyt významných arteriálních trombóz a žilního tromboembolismu (TEN) nelze stanovit pro heterogenitu metodiky a výběru pacientů jednotlivých studií. Udávaná incidence arteriálních a žilních trombóz u PMF je 2 na 100 pacientů/roků [1]. Dle literárních dat byla v 13,2 % případů zjištěna trombotická komplikace před nebo v době diagnózy PMF a v 10,7 % případů v mediánu 31 měsíců od diagnózy [2]. Žilní trombózy se nezdá vyskytují v atypických lokalizacích. Významná je asociace mezi Ph-MPN a výskytem trombózy splachnických žil (SVT). U pacientů s SVT, u nichž byla vyloučena cirhóza či nehematologická malignita, se udává prevalence Ph-MPN 40 % u pacientů s Budd-Chiariho syndromem a 30 % u nemocných s trombózou portální žíly [3].

Patogeneze

Patogeneze trombóz je u pacientů s Ph-MPN komplexní. Souvisí nejen s kvantitativními, ale také s kvalitativními změnami klonálních buněk (např. zvýšená aktivace trombocytů vyúsťující ve vyšší expresi P selektinů, tkáňového faktoru, vyšší generaci trombinu a mikropartikulí – protrombogenních fragmentů buněčných membrán uvolněných po aktivaci buněk; dále zvýšené množství tzv. retikulárních (nezralých) trombocytů v periferní krvi nebo zvýšené uvolňování proteáz z aktivovaných neutrofilů štěpících proteiny C a S) [4]. Získaný trombofilní stav je multifaktoriální etiologie. Vyplývá nejen z protrombogenního fenotypu cirkulujících buněk MPN klonu, ale také z imunitní odpovědi hostitele na přítomnost nádorového klonu se zvýšenou produkcí inflamatorních cytokinů, vedoucí k aktivaci leukocytů a endotelu [4]. V případech atypických trombóz mohou hrát roli lokálně specifické patogenetické mechanismy. Nejlépe jsou zatím dokumentovány zejména v případech SVT (např. přítomnost mutace *JAK2* V617F v endoteliálních buňkách hepatálních venul, splenických venul a kapilár, vyšší zastoupení *JAK2* V617F pozitivních progenitorů entoteliálních buněk s vyšší adherencí k mononukleárním buňkám, pomalejší krevní proud v žilách splachnické oblasti umožňující

prolongovanou interakci mezi protrombogenně naladěnými klonálními buňkami a aberantním endotelem [5-7].

Rizikové faktory

Obecně u Ph-MPN považuje Evropská leukemická síť za hlavní rizikové faktory trombózy věk nad 60 let a pozitivní anamnézu TEN [8]. Tefferi v roce 2015 revidoval systém stratifikace pacientů založený na míře rizika trombózy podle věku, prodělané TEN, přítomnosti *JAK2 V617F* a obecných kardiovaskulárních rizik (kouření, diabetes mellitus, hypertenze) [9]. Dle některých autorů je prokázaným rizikovým faktorem také leukocytóza [10]. Pro hodnocení trombocytémie jako rizikového faktoru nejsou v publikovaných pracích posledních let jednotné závěry. Práce českých autorů ukázala, že v momentě před trombózou mají Ph-MPN pacienti v průměru vyšší počty trombocytů [11]. Česká pracovní skupina pro Ph-myeloproliferativní onemocnění (CZEMP) stratifikuje pacienty s Ph-MPN a trombocytémií podle vlastních modifikovaných doporučení a uznává jako rizikové faktory také trombocytémii a přítomnost vrozených či získaných trombofilních stavů (deficit proteinu C, deficit proteinu S, mutaci genu faktoru V (G1691A) „Leiden“, mutaci protrombinového genu (G20210A) a deficit antitrombinu) [12]. Naproti tomu extrémní trombocytóza (nad 1000 až 1500x10⁹/l) je spojována s vyšším rizikem krvácení, zejména při současné medikaci kyselinou acetylsalicylovou (ASA). Tento fenomén je vysvětlován získaným vonWillebrandovým syndromem [13]. Atypicky lokalizované trombózy mohou být asociovány s odlišnými rizikovými faktory, dosud potvrzené jsou u trombóz splanchnických žil (např. mladší věk, ženské pohlaví) [14-16].

Prací, jež hodnotí výskyt a rizikové faktory trombóz u subpopulace pacientů s MF, není mnoho. Výskyt trombotických komplikací u PMF je srovnatelný jako u ET. Zatímco u PV a ET tvoří arteriální trombózy dvě třetiny všech případů, u PMF se objevují žilní trombózy se stejnou nebo vyšší frekvencí než arteriální [1,2]. Publikovaná analýza 205 PMF prokázala, že jediným nezávislým prediktivním faktorem trombóz je pozitivní anamnéza TEN. Většina (71 %) žilních trombóz byla asociována s přítomností dalšího získaného rizikového faktoru (např. chirurgický výkon, centrální žilní kanyla, hormonální terapie) [2]. Studie 707 pacientů s PMF identifikovala jako rizikové faktory trombóz věk nad 60 let a mutaci *JAK2 V617F* [1].

U pacientů s MF může představovat zhodnocení individuálního rizika trombózy značný problém. Důvodem je častá koexistence dalších získaných rizikových faktorů TEN, ale také krvácivých komplikací (např. trombocytopenie, portální hypertenze, konkomitativní medikace).

Výsledky základních koagulačních testů (protrombinový čas – PT a aktivovaný parciální tromboplastinový čas – aPTT) se u většiny pacientů pohybují v normálním rozmezí. Tyto testy nejsou schopny reflektovat všechny pro- a antikoagulační reakce ovlivňující výslednou generaci trombinu, zejména možný efekt aktivovaných trombocytů a dalších krevních buněk. Předpokládáme, že trombin generační test (TGT) nabízí lepší způsob posouzení individuální generace trombinu u pacientů s MF. Právě přesná identifikace, důsledná prevence a léčba rizikových nemocných může snížit jejich morbiditu a mortalitu.

Trombin generační test

Trombin (aktivní forma protrombinu) je multifunkční proteolytický enzym koagulační kaskády, měnící cirkulující fibrinogen na fibrin, jenž dává vznik fibrinovým vláknům tvořícím základ krevní sraženiny. Současně působí na řadu dalších buněk (např. krevní destičky, endoteliální buňky, fibroblasty), podílí se také na inhibici koagulačních procesů a ovlivňuje fibrinolýzu. TGT měří generaci trombinu ve vzorcích plasmy po *in vitro* aktivaci tkáňovým faktorem nebo jiným triggerem a monitoruje jeho koncentraci v čase, která odráží celkový stav hemostatického systému. Test je možné provádět v plasmě chudé na destičky (PPP) nebo v plasmě bohaté na destičky (PRP). Míra generace trombinu může korelovat s hyper- nebo hypokoagulačním stavem [8].

5.2.2. Cíle práce

1. Stanovení generace trombinu u nemocných s MF, analýza hlavních parametrů trombin generačního testu.
2. Schopnost TGT detekovat odchylky hemostatické rovnováhy, vyhodnocení vztahu mezi generací trombinu a hematologickým fenotypem nemoci.

5.2.3. Stanovení a vyhodnocení generace trombinu

Pacienti

Analyzováno bylo 36 pacientů s MF diagnostikovaných v našem centru v období let 2004-2016. Jednalo se o 24 nemocných s diagnózou PMF (z toho 11 v prefibrotické fázi myelofibrózy), pět s post-PV MF a sedm s post-ET MF. Šlo o 13 mužů a 23 žen s mediánem věku 56 let (rozmezí 25-78), všichni splňovali WHO diagnostická kritéria 2008.

Provedená vyšetření, materiál, metody a statistické zhodnocení

Vyšetření a materiál

Odběry krevních vzorků byly prováděny v ranních hodinách nalačno, standardním postupem z kubitální žíly s minimálním zatažením turniketu. Vzorky pro agregometrii trombocytů byly odebírány do speciální zkumavky s hirudinem a zkumavky s K3EDTA. Vzorek odebraný do 0,5 ml 3,2 % citrátu sodného byl centrifugován při 1000 g po dobu 10 minut v pokojové teplotě. Získaná vrchní frakce (plasma bohatá na destičky - PRP) byla okamžitě použita k měření TG. Další vzorek v 0,5 ml 3,2 % citrátu sodném byl centrifugován při 3000 g po dobu 10 minut v pokojové teplotě. Získaná vrchní frakce (plasma chudá na destičky - PPP) sloužila k provedení dalších koagulačních testů. Koagulační testy jsme vyšetřovali systémem ACL TOP 750 CTS (Werfen, Barcelona, Španělsko).

Funkce trombocytů byla hodnocena do jedné hodiny od odběru krve impedanční agregometrií přístrojem Multiplate® (Roche Diagnostics GmbH, Basilej, Švýcarsko), v plné krvi dle doporučení výrobce. Pro komplexní posouzení funkce trombocytů a různých drah jejich aktivace jsme ke stimulaci agregace krevních destiček použili několik induktorů – adenosindifosfát (ADP), kyselinu arachidonovou (ARA), kolagen, ristocetin a peptid aktivující trombinový receptor (TRAP). Po aktivaci trombocytů dochází k jejich agregaci na povrchu elektrod. Analyzátor Multiplate® pak po dobu šesti minut zaznamenává impedanci mezi dvěma elektrodami reflektující míru agregace trombocytů. Výsledky jsou znázorněny jako plocha pod křivkou (AUC), vyjádřeny v AU/min [17,18].

Pro vyšetření **trombin generačního testu** byl použit plně automatizovaný koagulační analyzátor s fluorescenční detekcí Ceveron® alpha (Technoclone GmbH, Vídeň, Rakousko) a vyšetřovací kit TECHNOTHROMBIN® TGA (Technoclone). Popsaná laboratorní metoda měří koagulaci z hlediska celé koagulační kaskády a vychází z dříve publikovaných prací [19,20,21]. Principem metody je *in vitro* monitorování vzniku trombinu v plazmě. Generace trombinu ve vzorku byla iniciovaná přidáním 7,16 pM rekombinantního tkáňového faktoru (rTF) resuspendovaného v 3,2 µM fosfolipidových micel (obsahujících 2,56 µM fosfatidylcholinu a 0,64 µM fosfatidylserinu).

Samotný test byl realizován následovně: k 40 µl vzorku PRP bylo přidáno 20 µl TRIS pufru a 15 µl 7,16 pM rTF s 3,2 µM fosfolipidových micel. Poté bylo přidáno 25 µl fluorogenního substrátu Z-GGR-AMC a samotná reakce byla zahájena 35 µl 25 mM CaCl₂. Vzniklý trombin štěpí fluorogenní substrát, fluorescenčním detektorem pak měříme fluorescenci vzniklého produktu při vlnové délce 360/465 nm (excitace/emise). Primárně naměřené referenční fluorescenční jednotky jsou pomocí kalibrační křivky převáděny na aktuální koncentrace trombinu ve vzorku. Kalibrační křivka je získána měřením zředěných vzorků trombinového kalibrátoru (koncentrační body byly definovány koncentracemi ~200, ~400 a ~800 nmol, z každého koncentračního bodu trombinového kalibrátoru bylo pro stanovení odebráno 90 µl standardu trombinu). Detekce fluorescence byla prováděna v jednodominutových intervalech po dobu 60 minut při 37 °C. Naměřené hodnoty byly analyzovány Ceveron PC-SW 1.4 softwarem, výsledkem je křivka charakterizovaná třemi hlavními parametry: Lag fáze (doba do nástupu generace trombinu), Cmax (maximální koncentrace trombinu) a ETP – endogenní potenciál trombinu (plocha pod křivkou odrážející celkové množství vzniklého trombinu).

Trombin generační test byl vyšetřen u nemocných s myelofibrózou s výjimkou těch, kteří užívali nebo recentně ukončili (< 4 týdny) antikoagulační terapii, antiagregační léčba byla přerušena 7 dní před provedením testu. Kontrolní skupina zahrnovala zdravé dárce krve.

Metody a statistika

Objektivně potvrzené trombotické komplikace byly zaznamenány v případě, že se objevily v době diagnózy nebo v průběhu sledování. Trombotické komplikace zahrnovaly žilní trombózy (hluboká žilní trombóza, plicní embolie, trombózy

splanchnických žil a mozkových splavů) a arteriální trombózy (transitorní ischemická ataka, ischemická cévní mozková příhoda, akutní infarkt myokardu a periferní arteriální cévní nemoc).

Vyloučení byli všichni pacienti medikující warfarin nebo nová antikoagulancia. Antiagregační léčba byla přerušena 7 dní před provedením TGT a intaktní funkce trombocytů ověřena agregačními testy. Všichni nemocní s anamnézou kardiovaskulárních rizikových faktorů (arteriální hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidemie) byli kompenzováni antihypertenzní, antidiabetickou a hypolipidemickou léčbou.

Kontrolní skupina zahrnovala 20 zdravých dobrovolných dárců krve (15 mužů a 5 žen) bez anamnézy trombózy či krvácení, bez symptomů akutní infekce nebo chronických zánětlivých onemocnění, bez antiagregační či antikoagulační terapie. Žádná z žen neužívala v době odběru hormonální antikoncepci nebo hormonální substituční léčbu. Pre-analytické zpracování vzorků a měření byla v obou skupinách prováděna stejným způsobem.

Vztah mezi sledovanými proměnnými a TGT parametry byl testován pomocí univariální analýzy. Rozdíly v TGT parametrech ve skupinách byly hodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu, což je neparametrická analogie jednovýběrové ANOVY. Test zkoumá, zda obě datové sady pocházejí ze stejné distribuce. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Veškerá práce s daty, vizualizace a analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB a Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.

Charakteristika souboru

V době analýzy užívalo 61 % nemocných specifickou léčbu MF, a to hydroxyureu (54 %), ruxolitinib (27 %), anagrelid (9 %), interferon alfa (4,5 %) a busulfan (4,5 %). Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době analýzy trombin generačního testu shrnuje tabulka 1, léčbu MF tabulka 2.

Rozložení *driver* mutací bylo následující: *JAK2* V617F 19 případů (53 %), *CALR* (exon 9) 11 případů (31 %) a *MPL*(W515) pět případů (14 %); jeden pacient byl triple negativní. Z *CALR* mutovaných neslo 72 % mutaci typu 1, 27 % další typy, mutace typu 2 nebyla v této kohortě identifikována. Venózní a arteriální trombózy

byly dokumentovány u 30,5 % MF, 57 % venózních trombóz v atypické lokalizaci (trombóza splachnických žil). Krvácivé komplikace se objevily u 5,5 % nemocných, graf 1. V době analýzy mělo 67 % nemocných splenomegalii s mediánem velikosti 10 cm pod levý oblouk žeberní. Ve 14 % případů byl identifikován vrozený trombofilní stav, viz tabulka 1.

Tabulka č. 1: Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době analýzy TGT.

| | prePMF n=11 | PMF n=13 | post-ET MF n=7 | post-PV MF n=5 |
|----------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Muži / ženy | 5/6 | 7/6 | 1/6 | 5/5 |
| Medián věku (roky) | 53 | 63 | 51 | 51 |
| Splenomegalie (% pac.) | 40 | 92 | 57 | 80 |
| Medián vel. pod LOŽ | (11,5 cm) | (9,5 cm) | (2 cm) | (21 cm) |
| Trombofilní stavy ¹ (% pacientů) | 0 | 15 | 28 | 0 |
| CVR ² (% pacientů) | 54,5 | 53 | 42 | 20 |
| Anamnéza TEN (% pacientů) | 27 | 7 | 14,2 | 80 |
| CALR (% pacientů) | 54,5 | 15 | 42,8 | 0 |
| JAK2 V617F (% pac.) | 36,3 | 54 | 42 | 100 |
| MPL (% pacientů) | 0 | 30,7 | 14,2 | 0 |
| Medián Hb (g/l) (rozmezí) | 136 (112-161) | 110 (78-134) | 122 (102-133) | 107 (93-140) |
| Medián leukocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 10,9 (7,2 - 12,5) | 7,3 (3,5-37,7) | 7,3 (4,93-15,5) | 17,3 (7,04-21,4) |
| Medián trombocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 947 (184-1527) | 230 (115-652) | 721 (119-1089) | 232 (96-585) |
| Medián LDH (μkat/l) (rozmezí) | 4,8 (2,41-6,9) | 8,7 (5,36-30) | 5,27 (3,42-8,6) | 7,11 (6,32-10,4) |
| Cirkulující blasty ≥ 1% (% pacientů) | 9 | 62 | 14 | 40 |
| Konstituční symptomy ³ (% pacientů) | 0 | 31 | 14 | 40 |
| DIPSS skóre | počet pacientů | počet pacientů | počet pacientů | počet pacientů |
| Nízké riziko | 10 | 3 | 3 | 1 |
| Střední riziko-1 | 1 | 4 | 3 | 2 |
| Střední riziko-2 | 0 | 6 | 1 | 2 |
| Vysoké riziko | 0 | 0 | 0 | 0 |

¹Vrozené trombofilní stavy – mutace genu faktoru V (Leiden) a faktoru II

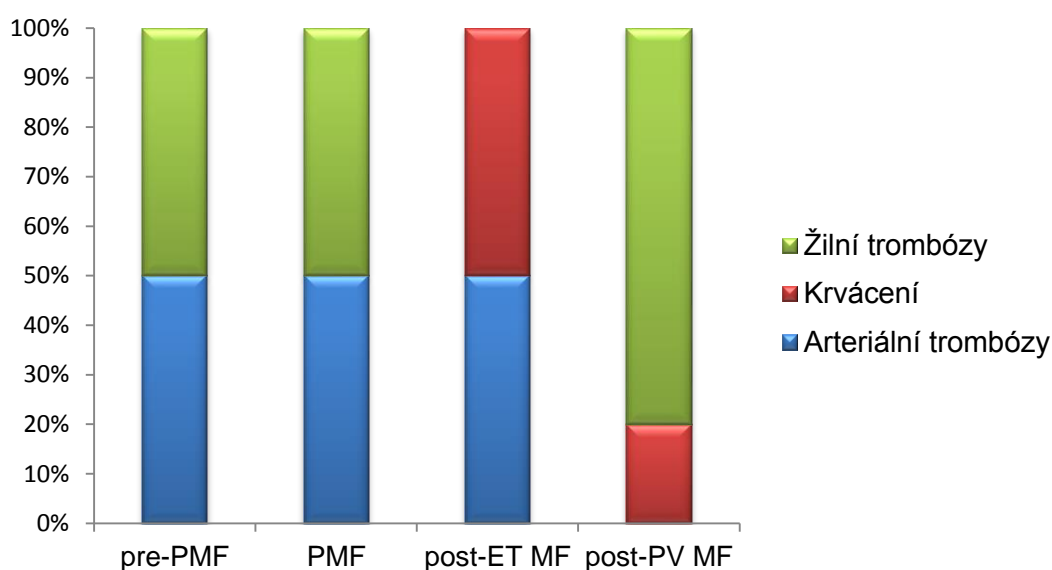
²CVR – kardiovaskulární rizikové faktory (hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidemie, kouření, obezita)

³Konstituční symptomy: zvýšená teplota (> 37,5°C; bez průkazu infekce), hubnutí (více než 10 % během 6 měsíců) a noční poty (s výměnou prádla).

Tabulka 2: Léčba pacientů v době analýzy TGT.

| Typ léčby | prePMF n = 11 | PMF n = 13 | post-ET MF n = 7 | post-PV MF n = 5 |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | <i>počet pacientů</i> | <i>počet pacientů</i> | <i>počet pacientů</i> | <i>počet pacientů</i> |
| Interferon alfa | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hydroxyurea | 5 | 6 | 1 | 0 |
| Anagrelid | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Ruxolitinib | 0 | 2 | 0 | 4 |
| Busulfan | 0 | 0 | 0 | 1 |

Graf č. 1: Trombotické a krvácivé komplikace u pacientů s MF.



Výsledky

Generaci trombinu jsme monitorovali ve vzorcích plazmy bohaté na trombocyty (PRP) od pacientů s myelofibrózou a zdravých kontrol. Hodnotili jsme tři parametry výsledné křivky: Lag fázi (doba do nástupu generace trombinu), Cmax (maximální koncentraci trombinu) a ETP (celkové množství vzniklého trombinu).

Impedanční agregometrie Multiplate® byla použita k identifikaci potencionálních s chorobou spojených funkčních abnormalit trombocytů.

Vyšetření agregace trombocytů neprokázalo signifikantní rozdíl v žádném z provedených testů (ARA, ADP, TRAP, kolagen, ristocetin) mezi kontrolní skupinou a pacienty s myelofibrózou. Nenalezli jsme významné rozdíly v žádném z agregačních testů mezi skupinou myelofibróz s normálními počty trombocytů a zdravými jedinci. Nemocní s MF a trombocytémií > 400x10⁹/l měli ve srovnání s MF a normálními počty trombocytů či kontrolní skupinou zvýšenou agregaci trombocytů indukovanou ADP (320 AU/min vs 384 AU/min vs 650 AU/min), ARA (465 AU/min vs 472 AU/min vs 588 AU/min), kolagenem (157 AU/min vs 135 AU/min vs 436 AU/min) a ristocetinem (579 AU/min vs 652 AU/min vs 1239 AU/min). Výsledky TRAP testu nebyly signifikantně rozdílné (577 AU/min vs 740 AU/min vs 609 AU/min). V kohortě pacientů korelovaly počty trombocytů s agregací indukovanou ADP (p < 0,0001), kolagenem (p < 0,0001), ristocetinem (p < 0,05) a ARA (p < 0,05). Mezi TRAP indukovanou agregací trombocytů a jejich počtem korelace potvrzena nebyla. Naše měření prokázaly, že je agregace trombocytů po běžných induktorech (ADP, kolagen, ristocetin, ARA) ovlivněna počtem trombocytů. Naměřené hodnoty agregace trombocytů a dalších laboratorních parametrů uvádějí tabulky 3 a 4, hodnoty TGT a jejich rozložení zobrazují tabulka 5 a grafy 2-4.

Tabulka 3: Vyšetření agregace trombocytů pacientů a kontrolní skupiny.

| | MF | MF s Tr v normě | MF s Tr > 400x10 ⁹ /l | Kontroly |
|------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| ADP (AU/min) medián (rozmezí) | 461 (72-1203) [†] | 320 (132-948) [*] | 650 (310-859) ^{**} | 384,5 (191-804) |
| Kolagen (AU/min) medián (rozmezí) | 230 (29-740) [†] | 157 (35-456) [*] | 436 (59-740) ^{**} | 135 (58-420) |
| Ristocetin(AU/min) medián (rozmezí) | 673 (55-2065) [†] | 579 (416-1830) [*] | 1239 (120-2065) ^{**} | 652 (300-1250) |
| AA (AU/min) medián (rozmezí) | 478 (32-1084) [†] | 465 (232-993) [*] | 588 (32-987) ^{**} | 472 (257-791) |
| TRAP (AU/min) medián (rozmezí) | 582 (83-1269) [†] | 577 (273-1269) [*] | 609 (83-1112) ^{††} | 740 (543-943) |

Srovnání agregace trombocytů všech pacientů s MF (n=36), MF a normálními počty trombocytů (n=11), MF a trombocytémií > 400x10⁹/l (n=19) a kontrolní skupiny zdravých jedinců (n=20).

[†]p > 0,05; MF versus kontrolní skupina

^{*}p > 0,05; MF s normálními počty trombocytů versus kontrolní skupina

^{**}p < 0,05; MF s trombocytémií > 400x10⁹/l versus kontrolní skupina

^{††}p > 0,05; MF s trombocytémií > 400x10⁹/l versus kontrolní skupina

Tabulka 4: Laboratorní nálezy pacientů s myelofibrózou a kontrolní skupiny.

| | MF medián (rozmezí) | Kontroly medián (rozmezí) | p - values |
|------------------|------------------------|------------------------------|------------|
| Quick INR | 1,1 (0,9-1,58) | 0,98 (0,92-1,05) | p < 0,05 |
| Quick (%) | 79 (44-100) | 97 (86-100) | p < 0,05 |
| aPTT (s) | 34,1 (26,8-57,6) | 27,8 (20,8-39) | p < 0,05 |
| TT (s) | 11,3 (10-15) | 12,3 (10,6-13,4) | p < 0,05 |
| Fibrinogen (g/l) | 3,46 (1,59-6,3) | 2,65 (2,11-4,35) | p = 0,06 |
| vWF Ag (%) | 126 (46-304) | 112 (70-156) | p = 0,19 |
| vWF aktivita (%) | 94,2 (35-265) | 100,5 (63-129) | p = 0,72 |

Všichni pacienti s myelofibrózou (n = 36), kontrolní skupina (n = 20).

Tabulka 5: Hodnoty TGT u pacientů s myelofibrózou a kontrolní skupiny.

| | Lag fáze (min) medián (rozmezí) | ETP (μmol) medián (rozmezí) | Cmax (μmol) medián (rozmezí) |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Kontroly (n=20) | 3,7 (2,9-4,3) | 1877 (1565-2220) | 177,5 (134-223) |
| Pacienti (n=36) | 3,4 (1,9-4,3) [*] | 1399 (753,7-2178) [*] | 171 (62-331,5) ^{**} |
| prePMF (n=11) | 3,4 (2,6-4,3) [‡] | 1387 (753,7-2178) [‡] | 165 (62-331,5) [‡] |
| MF (n=25) | 3,1 (2,4-3,9) | 1227 (1130-2041) | 149 (108,9-303) |
| CALR mutovaní (n=11) | 3,5 (2,9-4,3) [†] | 1708 (753,7-1987) [†] | 164 (62-282,9) [†] |
| CALR nemutovaní (n=25) | 3,4 (1,9-4,3) | 2168,4 (1127-876) | 173,5 (108-331) |
| DIPSS skóre 0 (n=17) | 3,4 (2,4-3,9) ^{††} | 1792 (1257-2178) ^{††} | 200 (114-331) ^{††} |
| DIPSS skóre 1-6 (n=19) | 3,3 (1,9-4,3) | 1383 (753,7-2028) | 142,4 (62-290,4) |

^{*}p < 0,05 všichni pacienti s MF versus kontrolní skupina

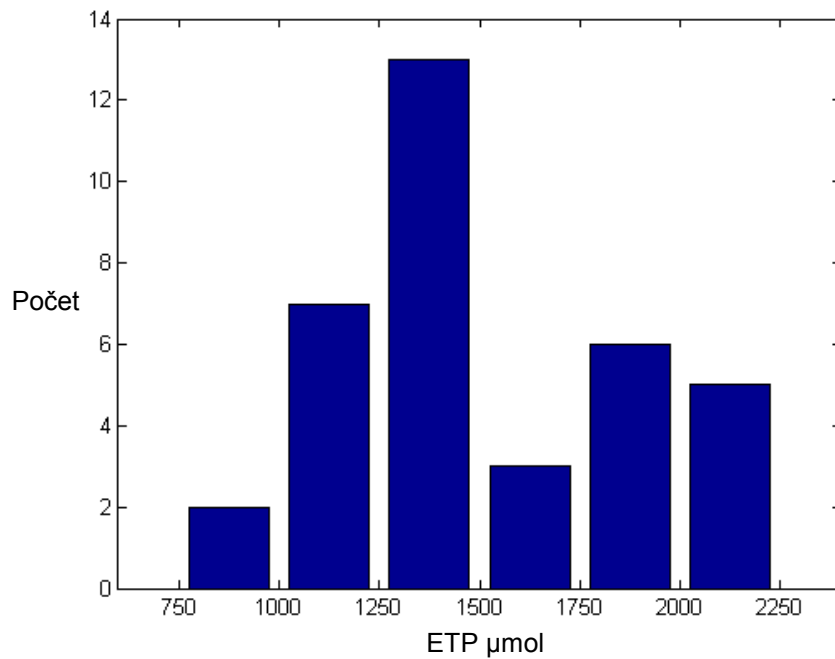
^{**}p > 0,05 všichni pacienti s MF versus kontrolní skupina

[‡]p > 0,05 pacienti v prefibrotické fázi PMF versus fibrotické fázi MF

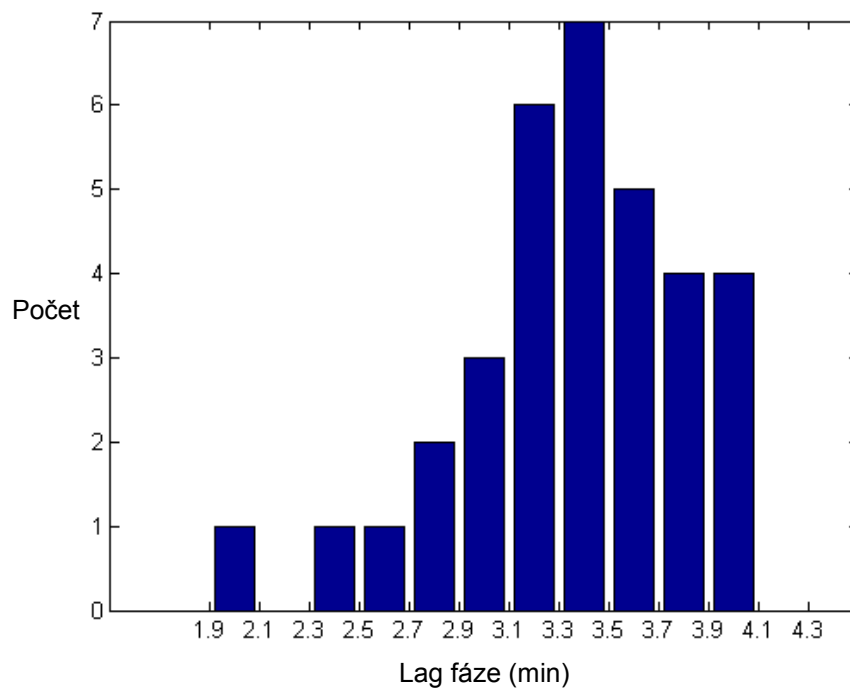
[†]p > 0,05 CALR mutovaní pacienti versus CALR nemutovaní

^{††}p > 0,05 pacienti s DIPSS skóre 0 versus pacienti s DIPSS skóre ≥ 1

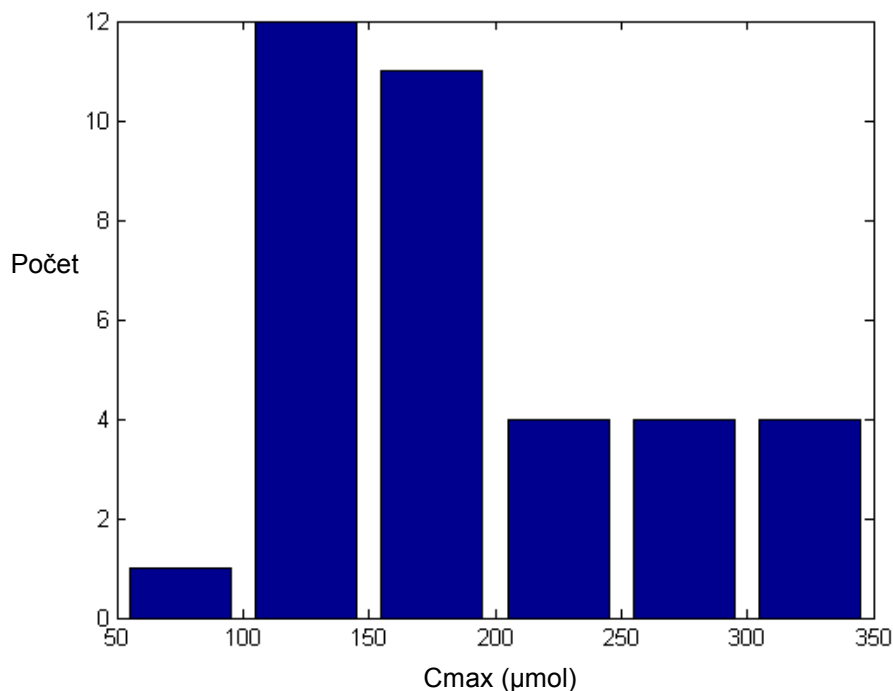
Graf 2: Distribuce hodnot ETP (μmol) u pacientů s myelofibrózou.



Graf 3: Distribuce hodnot Lag fáze (min) u pacientů s myelofibrózou.



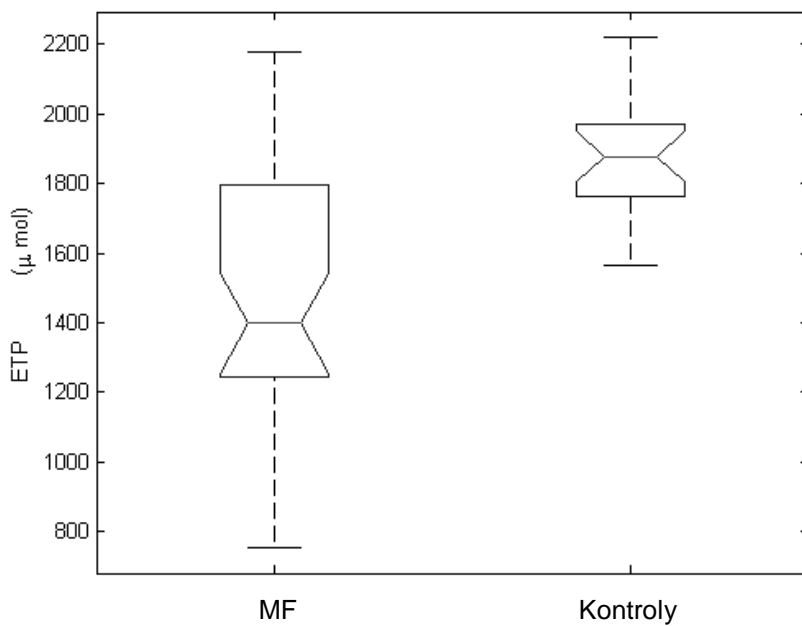
Graf 4: Distribuce hodnot Cmax (μmol) u pacientů s myelofibrózou.



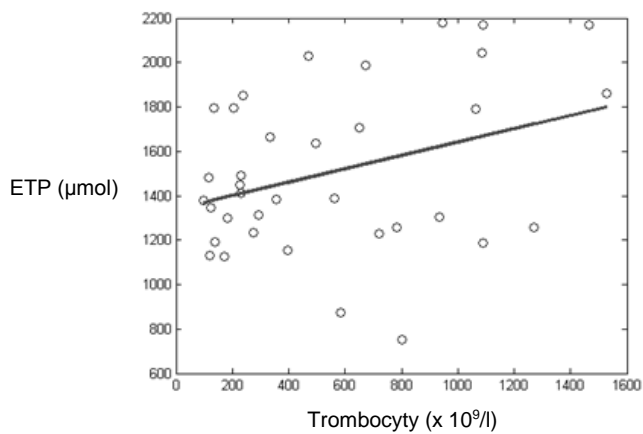
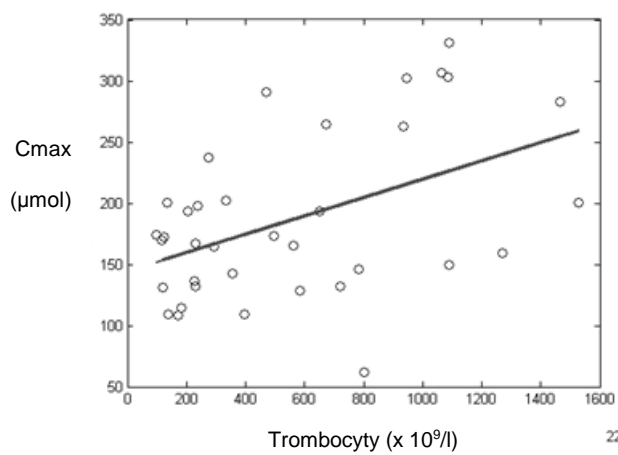
Naše studie prokázala signifikantní rozdíl v generaci trombinu mezi pacienty a kontrolní skupinou zdravých jedinců. Pacienti s MF měli kratší Lag fázi (3,4 minut vs 3,7 minut; $p=0,02$) a nižší ETP (1399,0 μmol vs 1876,5 μmol; $p=0,0003$), tabulka 5, graf 5.

Ve skupině nemocných koreloval počet trombocytů s ETP ($p=0,04$) a Cmax ($p=0,004$); nemocní s trombocytémií $> 400 \times 10^9/l$ měli významně vyšší ETP (1671,7 μmol vs 1381,5 μmol) a Cmax (196,9 μmol vs 166 μmol), graf 6 a 7.

Graf 5: Srovnání generace trombinu pacientů s MF a kontrolní skupiny.



Graf 6 a 7: Vliv počtu trombocytů na generaci trombinu u pacientů s MF.



Pozorovali jsme rozdílnou generaci trombinu v závislosti na pokročilosti choroby a podtypu MF. V prefibrotické fázi MF a post-ET MF jsme naměřili systematicky vyšší hodnoty ETP a Cmax, tabulka 5. Porovnáním generace trombinu pacientů stratifikovaných dle DIPSS skóre měli nemocní nízkého rizika (DIPSS skóre 0) vyšší ETP (1792 μmol vs 1383 μmol) a Cmax (200,0 μmol vs 142,4 μmol) než ti s pokročilejší chorobou (DIPSS skóre 1-6). Generace trombinu se lišila také u jednotlivých typů *driver* mutace. U *CALR* mutovaných MF byla zjištěna delší Lag fáze a nižší Cmax a ETP. Zmíněné efekty nedosáhly statistické významnosti zřejmě jen vlivem limitovaného počtu studovaných subjektů.

Pacienti s prodělanou žilní nebo arteriální trombózou nevykazovali významně vyšší TG oproti nemocným s negativní anamnézou TEN. Nepotvrdili jsme významnou korelaci mezi TG a hodnotami laktátdehydrogenázy, solubilního receptoru pro IL-2, hemoglobinu, počtem leukocytů. Věk, pohlaví, přítomnost vrozeného trombofilního stavu ani splenomegalie neměly v naší analýze významný vliv na hodnoty TGT. Generace trombinu se taktéž nelišila mezi pacienty stratifikovanými dle kardiovaskulárního rizika (hypertenze, diabetes, dyslipidemie, kouření a nadváha) [22].

Diskuze

Navzdory zvýšenému riziku trombotických komplikací u pacientů s MF nevykazují standardní koagulační testy ve většině případů žádné významné odchylky. Předpokládáme, že TGT je schopen přesněji reflektovat získanou dysbalanci v prokoagulačně a antikoagulačně působících faktorech.

K detekci možných funkčních abnormalit krevních destiček byl použit analyzátor Multiplate®. U pacientů s ET a PV bylo popsáno množství kvalitativních a kvantitativních změn, nicméně u žádné z nich nebyl potvrzen přímý vliv na riziko trombotických komplikací [23]. Ve shodě s literaturou jsme zjistili signifikantní korelaci mezi počtem trombocytů a agregací destiček indukovanou ADP, kolagenem, ristocetinem a kyselinou arachidonovou. Srovnáním nemocných s MF a zdravých jedinců nebyly mezi skupinami zaznamenány významné rozdíly agregace trombocytů po všech užitých induktorech (ADP, kolagen, ristocetin, kyselina arachidonová a TRAP) [17]. Analýza části pacientů s normálními počty krevních destiček neprokázala signifikantní rozdíl v žádném z provedených testů oproti kontrolní skupině. Na druhou stranu u pacientů s trombocytémií $> 400 \times 10^9/l$

jsme naměřili významně vyšší agregaci trombocytů než u MF bez trombocytémie či kontrolní skupiny.

Tyto nálezy naznačují, že v naší skupině MF je zvýšená agregace trombocytů výsledkem zvýšeného počtu trombocytů spíše než jejich dysfunkcí.

Aktivace krevních destiček vyúsťuje v expresi negativně nabitých fosfolipidů na jejich povrchu. Poskytnutím katalytického povrchu pro vazbu a aktivaci koagulačních faktorů se trombocyty významnou měrou podílejí na průběhu hemokoagulace a regulace produkce trombinu [24].

Pro zcela klíčovou roli trombinu v hemostáze, jsme pro její komplexní posouzení použili právě měření generace trombinu. Testovali jsme schopnost TGT detekovat dysbalanci v hemokoagulační rovnováze u nemocných s myelofibrózou. Protrombogenní stav je asociován s vyšším ETP, vyšším Cmax a zkrácenou Lag fází. Předchozí práce, které u MPN populace prokázaly vyšší TG, zahrnovaly většinou pacienty s PV a ET. V současné studii pacientů s MF jsme zjistili signifikantně nižší ETP ve srovnání s kontrolou ($p=0,0003$). Také Tripodi *a kol.* a Duchemin *a kol.* publikovali nižší ETP u MPN pacientů ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou. Po modifikaci testu přidáním trombomodulinu (aktivátoru proteinu C na povrchu endoteliálních buněk) naměřili autoři vyšší ETP u pacientů s Ph-MPN [20,21]. Stejně tak Marchetti *a kol.* popsali nižší ETP u MPN pacientů ve srovnání se zdravými. Vyšší ETP u MPN pacientů bylo detekováno až při provedení testu s přidáním exogenního aktivovaného proteinu C (APC). Tyto výsledky naznačují získanou APC-rezistenci v důsledku snížených hodnot volného proteinu S v plasmě pacientů. Přesto nepotvrdil Marchetti *a kol.* APC-rezistenci funkčním hodnocením antikoagulační kapacity systému proteinu C koagulačními metodami, které autoři v těchto případech nepovažují za dostatečně citlivé [25]. V našem souboru může být nižší ETP dáno limitacemi metodiky TGT, ačkoliv nelze vyloučit ani vliv specifické terapie MF většiny pacientů. Ve shodě s dřívějšími pracemi jsme při vyšetření prováděném v plasmě bohaté na destičky potvrdili významnou korelaci mezi aktuálními počty trombocytů a parametry TGT (ETP a Cmax) [21,26]. Pacienti s trombocytémií měli významně vyšší generaci trombinu. Výsledky svědčí pro zvýšený s trombocyty asociovaný potenciál generace trombinu u nemocných s MF. Naproti tomu Olteanu *a kol.* neprokázali korelaci mezi počtem trombocytů a TG při vyšetření realizovaném v plasmě chudé na destičky [27]. Zdá se, že PPP není médiem plně reprezentujícím hemostatickým systémem *in vivo*, kde při

regulací TG hrají důležitou roli nejen plasmatické koagulační faktory, ale také aktivované trombocyty a další buňky. Na základě výsledků nelze s jistotou určit, zda zvýšená TG pouze reflektuje vyšší počty trombocytů, nebo je známkou vyšší humorální aktivity nemoci, spojené mimo jiné i s trombocytémií.

Ve skupině MF jsme zjistili vyšší TG u pacientů s méně pokročilou chorobou (nízké riziko dle DIPSS skóre) a v prefibrotické fázi MF. Tento nálezn podporuje již publikovaný soubor MPN pacientů, v němž autoři popisují nejvyšší TG u nově diagnostikovaných osob [27]. Lze předpokládat, že právě tato část nemocných má vyšší riziko vzniku trombózy oproti těm s již pokročilejší chorobou. Pozorovali jsme trend k nižší TG u *CALR* mutovaných MF (delší Lag fázi, nižší ETP a Cmax, všechny vzájemně korelovaly). Výsledky jsou v souladu s dřívějším nálezem nižšího rizika trombotických komplikací u *CALR* mutovaných MF ve srovnání s *JAK2* V617F mutovanými. Riziko zůstává nízké jak u typu 1, tak typu 2 *CALR* mutace [28]. Zmíněné efekty nedosáhly statistické významnosti, zřejmě jen díky limitovanému počtu subjektů. Velikost našeho souboru nemá dostatečnou informační sílu k relevantnímu zhodnocení vlivu jednotlivých typů cytoredukční léčby na TG.

Marchetti *a kol.* uvádějí vyšší TG u MPN pacientů s pozitivní anamnézou TEN [25]. Práce autorů Olteau *a kol.* zmíněnou asociaci nepotvrdila, stejně jako naše analýza [27]. V naší kohortě MF neovlivnila přítomnost kardiovaskulárních rizikových faktorů parametry TGT, což lze vysvětlit účinnou (antihypertenzní, antidiabetickou, hypolipidemickou) terapií všech rizikových nemocných.

Závěr

Vzhledem k terapeutickým potížím je stále aktuální potřeba identifikace dalších laboratorních ukazatelů přesněji reflektujících sklon k trombóze nebo krvácení. V poslední době se analyzuje možný přínos trombin generačního testu. Zatím dostupné nálezy potvrzují rozdíly v generaci trombinu u nemocných s Ph-MPN oproti zdravé populaci. Ukazuje se, že typ Ph-MPN, pokročilost choroby, mutační stav a počty trombocytů mají vliv na míru generace trombinu. Zda ale rozdíly v parametrech TGT v uvedených stavech odrážejí výskyt trombotických nebo krvácivých komplikací v reálné praxi, není zatím zcela jasné. Pro přímé porovnávání výsledků jednotlivých laboratoří je však nezbytné sjednocení metodiky vyšetření (vyšetření prováděné v plasmě bohaté versus chudé na destičky, použité trigger).

5.3. Podstudie 3: Hodnocení kostního obratu a metabolismu u pacientů myelofibrózou.

5.3.1. Úvod

Zatímco objevy posledních let přinesly značný posun v pochopení významu aktivace JAK/STAT signální dráhy vedoucí k proliferaci nádorového klonu, mechanismus samotné fibrogenese a osteosklerózy dřeně zůstává stále nejasný. Zmnožení retikulárních a následně kolagenních vláken typu I, III, IV a V, snížené zastoupení až absence osteoklastů, osteoskleróza a neoangiogeneze jsou dominujícími znaky pokročilé myelofibrózy [1]. Již dřívější práce poukázaly na význam narušení cytokinové osy OPG (osteoprotegerin) – RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) – RANK (receptor activator of NF- κ B). RANKL, transmembránový protein produkovaný stromálními buňkami a osteoblasty, po vazbě na receptor RANK indukuje diferenciaci a formaci osteoklastů. OPG, solubilní glykoprotein uvolňovaný osteoblasty a stromálními buňkami, funguje jako decoy receptor pro RANKL, čímž blokuje interakci mezi RANK-RANKL a inhibuje osteoklastogenezi [2,3]. Dalším potenciálním zdrojem OPG jsou endoteliální buňky, pro jejichž proliferaci je OPG důležitý [4]. Vysoká produkce OPG proto může mít duální funkci v patogenezi progresu myelofibrózy, vedle poškození funkce osteoklastů se může podílet také na endoteliálním růstu a neoangiogenezi. Někteří autoři považují právě nadprodukcii OPG endoteliálními buňkami za jeden z důležitých momentů v procesu fibrotizace dřeně [5,6]. Kost je dynamickou tkání, v níž je složitými mechanismy udržovaná rovnováha mezi aktivitou osteoklastů a osteoblastů [7]. Osteoklasty, vycházející z hematopoetických progenitorů, kontinuálně resorbují kostní matrix. Naproti tomu osteoblasty, vycházející z mezenchymálních progenitorů, kostní matrix syntetizují [8]. Rychlost tvorby a resorpce kosti lze posoudit podle produktů, vznikajících v metabolismu organických složek kostní matrix. Dysbalance mezi těmito kompartmenty vede buď ke ztrátě, nebo akumulaci kostní matrix. V případě myelofibrózy postupně vyplňuje fibrotická tkáň prostory kostní dřeně, ovlivňuje mikroprostředí a destabilizuje normální hematopoézu [9]. Mezi markery novotvorby kostí řadíme kostní izoenzym alkalické fosfatázy (bALP) nebo prokolagen typu 1 (P1NP). P1NP je syntetizován fibroblasty a uvolňován do plasmy během syntézy kolagenu a je přímým markerem procesu osteoformace. Biochemickým markerem odbourávání kostí je koncová část

kolagenu typu I (ICTP), degradační produkt kolagenu vznikající vlivem osteoklastů [10,11].

Vitamin D, multifunkční pro-hormon, jehož hlavní funkcí je kontrola kalcium-fosfátového metabolismu, se také specificky podílí na regulaci aktivity osteoklastů a osteoblastů v procesu kostní remodelace. Vitamin D zahrnuje několik kalciferolů, pro potřeby lidského organismu jsou rozhodující cholekalciferol (D3) a ergokalciferol (D2), které jsou biologicky neaktivními prekurzory. V játrech se hydroxylací mění na 25-hydroxyvitamin D (25OHD), hlavní neaktivní formu hormonu v krvi. Další hydroxylací v ledvinách vzniká aktivní forma 1,25-hydroxyvitamin D (kalcitriol) [12]. Vzhledem k delšímu poločasu a vyšší sérové koncentraci je k monitorování koncentrací vitamínu D v těle používán 25OHD. V posledních letech se věnuje značná pozornost dalším úlohám vitamínu D v organismu. Jeho deficit je spojen s rizikem rozvoje kardiovaskulárních, metabolických a autoimunních chorob [12]. Jeho antitumorózní efekt se vysvětluje inhibicí buněčné proliferace, indukci diferenciací a apoptózy [13,14]. Byla prokázána negativní korelace mezi sérovou koncentrací vitamínu D a incidencí některých solidních tumorů [15]. Výsledky meta-analýzy zahrnující 2284 pacientů s hematologickou malignitou potvrdily asociaci mezi horším celkovým přežitím a nízkou sérovou koncentrací 25OHD [16]. Ačkoliv epidemiologické studie poukazují na možný prognostický význam vitamínu D a na korelaci mezi jeho deficitem a vyšším rizikem rozvoje malignity či horší prognózou nemocných, není jasné, zda jeho suplementace může u pacientů s nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním zlepšit léčebné výsledky.

5.3.2. Cíle práce

1. Hodnocení biochemických markerů kostní remodelace a OPG. Posouzení možnosti identifikace vhodného markeru využitelného k neinvazivnímu monitorování stupně fibrózy kostní dřeně.
2. Zhodnocení kostního metabolismu, významu vitamínu D.

5.3.3. Vyhodnocení kostního obratu

Pacienti

Z celkového počtu 73 pacientů s MF bylo do analýzy zařazeno 34 vhodných nemocných diagnostikovaných v našem centru v období let 2000-2017. Vyloučení

byli všichni v terminálním stavu choroby, po alogenní transplantaci kostní dřeně, s duplicitní malignitou a dalšími stavy, jež by mohly ovlivnit výsledky testovaných parametrů - hyperparathyreózou, renální insuficiencí, hepatopatií, užívající bisfosfonáty, hormonální substituční léčbu nebo glukokortikoidy v dávce vyšší než 10 mg/den déle než 3 měsíce a diabetem mellitem léčeným inzulínem. Všichni hodnocení jedinci měli normální funkci štítné žlázy a glykémii. Jednalo se o 34 nemocných: 22 s diagnózou PMF, tři s post-PV myelofibrózou a devět s post-ET myelofibrózou. Šlo o 13 mužů, 21 žen, medián věku 61 let (rozmezí 36-79 let).

Srovnávací soubory zahrnoval 41 pacientů: 13 v prefibrotické fázi PMF (3 muži, 10 žen, medián věku 53 let; rozmezí 25-72) a 28 nemocných s Ph-MPN bez histologicky potvrzené fibrózy kostní dřeně (23 s PV, 5 s ET, 16 mužů, 12 žen, medián věku 61 let; rozmezí 28-85). Všichni vyšetřovaní měli histologicky verifikovanou diagnózu MPN minimálně jednou biopsií kostní dřeně a splnili kritéria WHO klasifikace 2008 nebo 2016.

Provedená vyšetření, materiál, metody a statistické zhodnocení

Vyšetření a materiál

Kostní status byl hodnocen pomocí biochemických markerů kostní remodelace (bALP, P1NP, ICTP), kostního metabolismu (ionty Ca²⁺, fosfáty, hormony ovlivňující kostní metabolismus - parathormon a 25-hydroxyvitamin D) a OPG, pro jeho schopnost inhibice osteoklastů.

Pro hodnocení kostního obratu pomocí biochemických parametrů jsme vycházeli z doporučení International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in clinical studies [11]. V naší studii jsme vyšetřovali hladiny čtyř parametrů: bALP, P1NP, ICTP a OPG.

Biochemická analýza

P1NP (*N-terminální propeptid prokolagenu typu 1*) a 25OHD (*25-hydroxyvitamin D*) byly stanoveny soupravami Elecsys P1NP a Elecsys Vitamin D total (Roche) na analyzátoru Cobas 6000 modul e601 metodou elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA), ICTP (*karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I*) soupravou UniQ ICTP RIA (Orion) radioimunoanalýzou, bALP (*kostní izoenzym alkalické fosfatázy*) imunoradiometrickou analýzou s užitím kitu OsteaseIRMA (BeckmanCoulter). ICTP a bALP byly měřeny automatickým více detektorovým systémem Wizard 2 model 2470 (Perkin Elmer). OPG (*osteoprotegerin*) byl

vyšetřen automatickým analyzátozem mikrodestiček EVOLIS (Bio-Rad) pomocí soupravy Human Osteoprotegerin ELISA (Bio-Vendor), do doby vyšetření byly vzorky skladovány při teplotě -80°C. Ostatní parametry kostního metabolismu byly stanoveny soupravami firmy Roche na analyzátozech Cobas (Hitachi). Nevyšetřovali jsme RANK a RANKL z důvodu nepřítomnosti osteolytických lézí u hodnocených pacientů a také s ohledem na závěry všech zatím publikovaných analýz neprokazujících konkomitantní snížení RANKL a poměru RANKL/OPG u Ph-MPN [5,17].

Metody a statistika

U pacientů s MF jsme hodnotili vztah mezi hematologickým fenotypem, pokročilostí choroby a markery kostního metabolismu. Srovnávací soubor byl popsán výše. Preanalytické zpracování vzorků a všechna měření byla v obou skupinách prováděna identickým způsobem. Všechny vzorky krve byly sbírány ráno, nalačno.

Rozdíl v hladině spojitých prediktorů mezi MF pacienty a kontrolami byl hodnocen pomocí Kruskal-Wallisova testu. Kruskal-Wallisův test je neparametrická analogie jednovýběrové ANOVY. Test zkoumá, zda obě datové sady pocházejí ze stejné distribuce. Pro dva vzorky je Kruskal-Wallisův test ekvivalentní Mann-Whitneymu U testu. Všechny čtyři prediktory (OPG, P1NP, bALP a ICTP) jsme zkombinovali pomocí mnohorozměrné logistické regrese. Vzájemný vztah mezi spojitými prediktory jsme analyzovali pomocí neparametrické (Spearmanovy) korelace. Vztah mezi kategoričnými proměnnými byl analyzován pomocí chi kvadrát testu v kontingenčních tabulkách. Pokud byly četnosti v buňkách malé, použili jsme exaktní Fisherův faktoriálový test. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Veškerá práce s daty, vizualizace a analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB and Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.

Výsledky

Charakteristika souboru

Distribuce driver mutací ve vyšetřovaném souboru MF byla následující: *JAK2* V617F 18 případů (53 %), *CALR* (exon 9) 11 případů (32 %), *MPL*(W515) 5 případů (14 %). Z *CALR* mutovaných nese 69 % mutaci typu 1, 7 % mutaci typu 2 a 23 %

další méně frekventní typy. Palpačně hmatná splenomegalie byla v době analýzy přítomná u 68 % nemocných s mediánem velikosti 6,5 cm pod levý oblouk žeberní (rozmezí 2-24). Hlavní charakteristiky studiové populace a referenčních skupin shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Fenotyp pacientů s MF, prePMF a skupiny PV a ET v době analýzy.

| | MF (n=34) | prePMF (n=13) | PV+ET (n=28) |
|----------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|
| Muži / ženy | 13/21 | 3/10 | 16/12 |
| Medián věku (roky) (rozmezí) | 61 (36-79) | 53 (25-72) | 61 (28-85) |
| Splenomegalie (% pacientů), (medián velikosti pod LOŽ v cm) | 68 (6,5) | 38 (0) | 18 (0) |
| Medián hemoglobinu (g/l) (rozmezí) | 106,5 (76-143) | 119 (99-162) | 137,5 (97-166) |
| Medián leukocytů x10 ⁹ /l (rozmezí) | 8,28 (3,14-33,7) | 7,67 (3,3-15,2) | 8,95 (2,56-24,1) |
| Medián trombocytů x 10 ⁹ /l (rozmezí) | 307 (71-768) | 576 (142-882) | 484 (124-901) |
| Cirkulující blasty ≥1% (% pacientů) | 47 | 0 | 0 |
| <i>JAK2</i> V617F (% pacientů) | 52,9 | 46 | 92,8 |
| <i>MPL</i> (% pacientů) | 32,3 | 0 | 0 |
| <i>CALR</i> (% pacientů) | 14,7 | 46 | 2 |
| Konstituční symptomy (% pacientů) | 17,6 | 0 | 0 |
| Medián LDH (μkat/L) (rozmezí) | 8,1 (3,4-26,4) | 4,47 (2,7-3,17) | 3,8 (2,74-5,07) |
| Léčba | % pacientů | % pacientů | % pacientů |
| Interferon alfa | 0 | 8 | 7 |
| Hydroxyurea | 38 | 46 | 57 |
| Anagrelid | 9 | 15 | 11 |
| Ruxolitinib | 15 | 0 | 0 |
| Busulfan | 5,8 | 0 | 0 |

Naměřené hodnoty sledovaných markerů kostního metabolismu a další laboratorní výsledky uvádí tabulka 2. Výsledky TSH, parathormonu, ionizovaného vápníku (Ca), fosforu (P), kreatininu a kostní isoformy alkalické fosfatázy nepřekračovaly u hodnocených subjektů referenční meze.

Parametr P1NP byl elevován u 18 % MF a 15 % prePMF, ICTP u 32 % případů MF a 23 % prePMF. Hodnoty nekorelují s pokročilostí fibrózy ani dalšími laboratorními

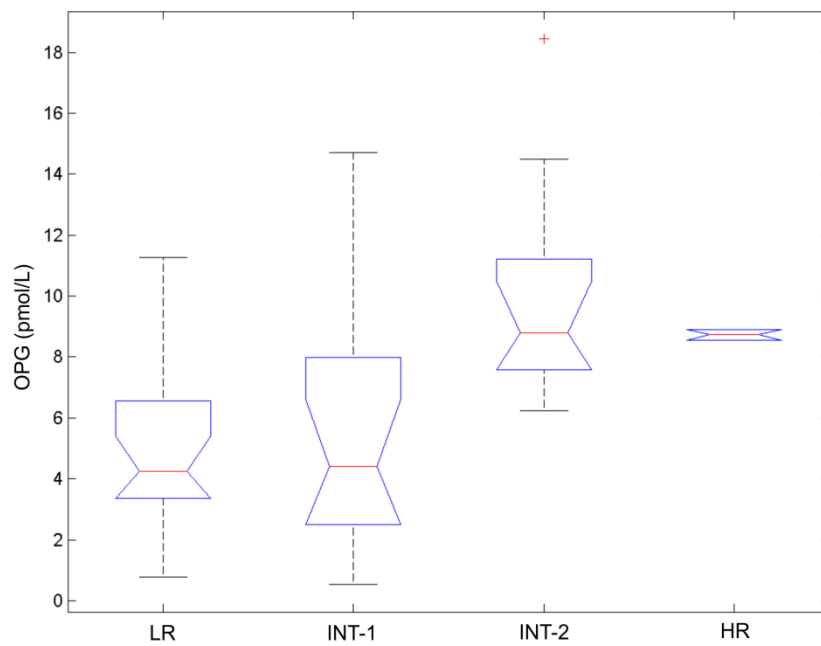
parametry, nevykazují statisticky významné rozdíly ve srovnání se skupinou PV a ET. OPG byl zvýšen u 53 % případů MF, 38 % prePMF a 65,5 % PV a ET, rozdíly mezi skupinami ale nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). U MF koreluje hodnota OPG s pokročilostí choroby hodnocenou dle DIPSS skóre, s významně vyšším OPG u nemocných s DIPSS skóre ≥ 3 (4,3 pmol/l vs 8,8 pmol/l; $p=0,0043$; graf 1). Nepotvrdili jsme významnou korelaci mezi studovanými parametry kostního statusu a hodnotami laktátdehydrogenázy, solubilního receptoru pro interleukin-2, pohlavím, mutačním stavem ani splenomegalii.

Tabulka 2: Laboratorní parametry pacientů s MF, prePMF a skupiny nemocných s PV nebo ET.

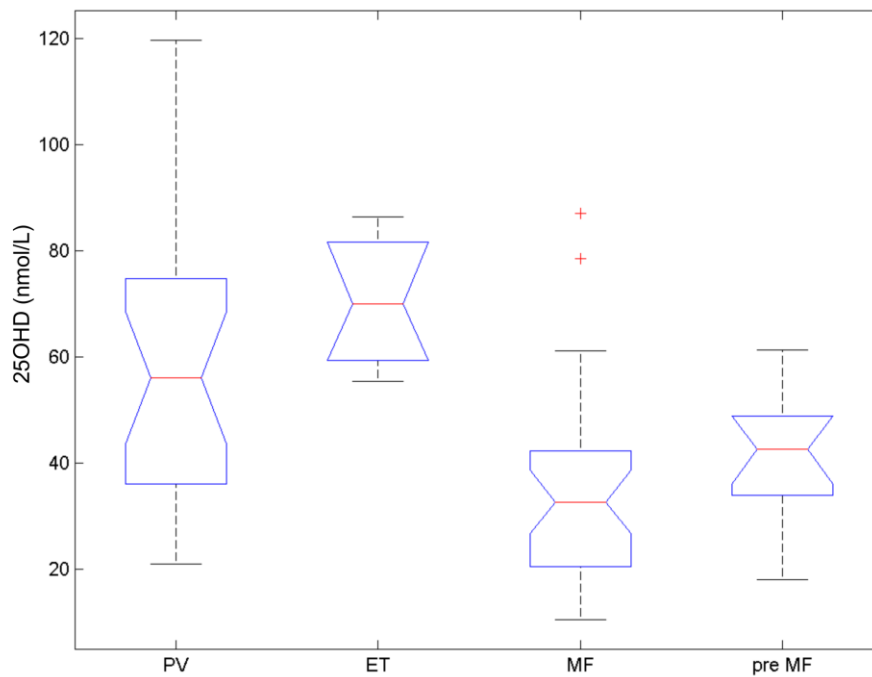
| | prePMF (n=13) | MF (n =34) | PV+ET (n =28) | <i>p-values</i> |
|-----------------------------------------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|
| Parathormon (pmol/l) medián (rozmezí) | 3,4 (2-6) | 4,1 (2,2-6) | 3,55 (1,6-5,5) | > 0,05 |
| Ca ²⁺ (mmol/l) medián (rozmezí) | 2,37 (2,16-2,5) | 2,3 (2,0-2,53) | 2,3 (2,15-2,54) | > 0,05 |
| Fosfáty (mmol/l) medián (rozmezí) | 1,08 (0,8-1,34) | 1,1 (0,8-1,45) | 1,16 (0,7-1,42) | > 0,05 |
| CB (g/l) medián (rozmezí) | 70,2 (63,4-83) | 67,5 (65-76) | 70 (64-77,5) | > 0,05 |
| bALP (µg/l) medián (rozmezí) | 7,9 (5-15,8) | 10,7 (5-22) | 9,55 (5,2-22,1) | > 0,05 |
| P1NP (µg/l) medián (rozmezí) | 41,8 (30-98,5) | 37 (19,6-239) | 33,5 (12,3-73) | > 0,05 |
| ICTP (µg/l) medián (rozmezí) | 3,82 (1,8-5,37) | 5,16 (1,8-17) | 4,65 (2,87-12) | > 0,05 |
| OPG (pmol/l) medián (rozmezí) | 4,15 (1,9-10,3) | 5,9 (0,5-18,5) | 5,2 (0,92-8,99) | > 0,05 |
| 25OHD (nmol/l) medián (rozmezí) | 42,6 (18-61,2) | 28 (10,4-87) | 59,6 (21-120) | 0,0003 |

Medián plasmatických koncentrací 25OHD byl následující: u MF 28 nmol/l (rozmezí 10,4-87), u pre-PMF 42,6 nmol/l (rozmezí 18-61,2), u PV a ET 59,6 nmol/l (rozmezí 21-120). Deficit 25OHD byl častěji zaznamenán ve skupině MF (v 96 %). Pacienti s MF mají také signifikantně nižší hladiny 25OHD ve srovnání s prePMF a skupinou PV a ET (28 nmol/l vs 42,6 nmol/l vs 59,6 nmol/l; $p=0,0003$; graf 2). U MF koreluje sérové koncentrace 25OHD s pokročilostí choroby, s významně nižší hladinou 25OHD u nemocných s DIPSS skóre ≥ 3 (24 nmol/l vs 38,4 nmol/l; $p=0,05$; graf 3).

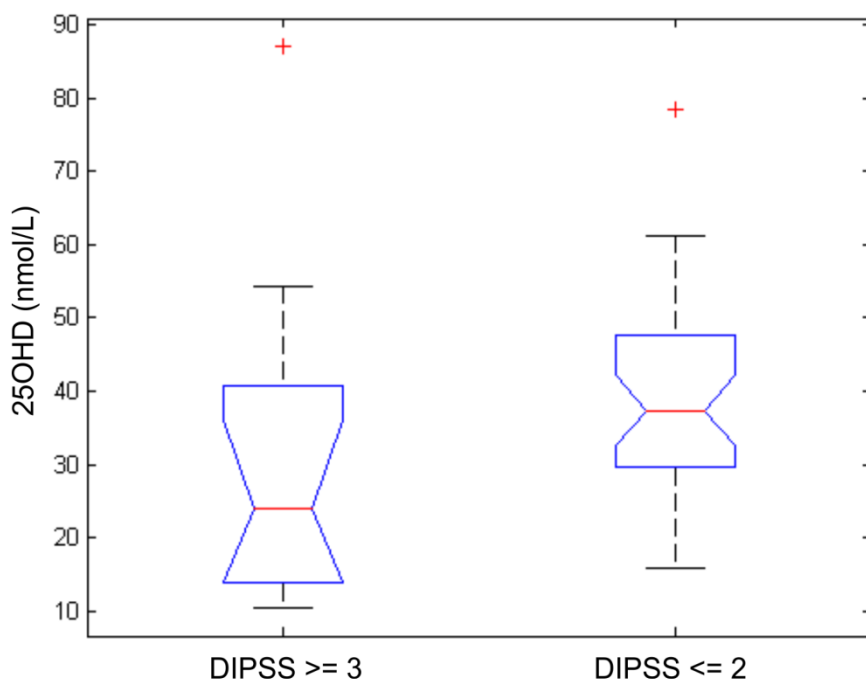
Graf 1: Hodnoty osteoprotegerinu u pacientů s myelofibrózou.



Graf 2: Tíže deficitu vitamínu D v závislosti na typu Ph-MPN.



Graf 3: Tíže deficitu vitamínu D v závislosti na pokročilosti MF.



Diskuze:

Kostní status u MF byl studován pouze na poměrně malých počtech pacientů a ve většině případů srovnáván se zdravou populací [5-6,10,17,18]. Závěry těchto studií navíc nejsou jednotné. V naší práci jsme vyšetřovali parametry kostního obratu ve větším souboru MF a hodnotili jejich přínos pro běžnou klinickou praxi. Výsledky jsme srovnávali s ostatními Ph-MPN. Diamond *a kol.* popisují zvýšení jak bALP (marker kostní formace), tak ICTP (marker kostní resorpce) na 4 kazuistických případech MF [19]. Další práce shodně prokazuje vyšší hodnoty ICTP u nemocných s MF [20]. Farmer *a kol.* ve svém souboru 18 pacientů s MF popsal signifikantní elevaci P1NP, ale nepotvrdil zvýšení hodnot bALP, ani markerů kostní resorpce [10]. V naší kohortě MF jsme také neprokázali zvýšení bALP. P1NP a ICTP byly zvýšeny jen u části nemocných, hodnoty nekorelovaly s pokročilostí choroby ani dalšími laboratorními či klinickými parametry, byly srovnatelné jako u prePMF nebo PV/ET. Testované plasmatické markery zřejmě nejsou dostatečně citlivé pro rutinní neinvazivní monitorování stupně fibrózy kostní dřeně.

Wang *a kol.* a Kreipe *a kol.* popisují vyšší expresi OPG (měřením sérové hladiny OPG a OPG mRNA v kulturách stromálních buněk kostní dřeně) u pokročilé MF oproti ostatním MPN a kontrolní skupině zdravých probandů [6,17]. Shodně s dříve publikovanými studii jsme potvrdili zvýšení OPG u většiny pacientů s MF, současně ale také u prePMF a PV/ET, rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné. U MF hodnoty OPG korelovaly s pokročilostí choroby hodnocenou dle DIPSS skóre, s významně vyšším OPG u pacientů s vysokým a středním rizikem-2 ($p=0,0043$). Naše výsledky podporují hypotézu, že zvýšená produkce osteoprotegerinu je důležitým faktorem pro rozvoj fibrózy kostní dřeně u Ph-MPN. Nicméně jako vhodný klinický prediktor, pomocí něhož bychom neinvazivně odlišili MF od prefibrotického stádia nebo ostatních Ph-MPN, se nejeví.

Limitací naší práce může být skutečnost, že biopsie kostní dřeně nebyly realizovány přesně v době odběrů vzorků krve k vyšetření kostního statusu a nelze vyloučit, že u některých pacientů od poslední biopsie mohlo dojít k progresi fibrózy. Také vliv jednotlivých typů specifické léčby MF na hodnoty indikátorů kostního statusu je neznámý.

Vitamin D – Pardanani uvádí častější výskyt deficitu vitamínu D u pacientů s PMF a PV, nepotvrdil ale korelaci mezi tíží deficitu a klinickými či laboratorními charakteristikami pacientů s Ph-MPN (věk, mutační stav, transfuzní závislost, DIPSS-Plus skóre, hodnoty hemoglobinu, leukocytů, trombocytů, cirkulujících blastů), ani vliv na OS [21]. Naproti tomu recentní práce hodnotící význam vitamínu D u myeloproliferativních chorob naznačují, že 25OHD může mít odlišný prognostický význam u pacientů léčených různými typy léčby. Radujkovic *a kol.* popisují u pacientů s myelodysplastickým syndromem a vyšším vitamínem D před zahájením terapie lepší celkové přežití po první linii hypometylační léčby 5-azacitidinem. Současně *in vitro* prokázali, že konkomitantní podávání vysokých dávek vitamínu D potencuje antiproliferační efekt 5-azacitidinu [22]. Dřívější studie s limitovaným počtem pacientů s MF nepotvrdily terapeutický efekt substituce vitamínem D, avšak aplikace adekvátních dávek vitamínu D byla u použitých preparátů limitována rozvojem hyperkalcémie [23]. Další studie na zvířecích modelech přinášejí důkazy o schopnosti vitamínu D snižovat aktivaci STAT 3 a STAT 1 proteinů a tím i produkci proinflammatorních cytokinů [24,25]. V našem souboru koreluje přítomnost fibrózy a stádium dle DIPSS skóre s hladinou vitamínu

D. Pozorovali jsme signifikantně nižší sérové koncentrace 25OHD u MF oproti prePMF a skupině PV a ET, dále nižší hodnoty 25OHD u pacientů s MF a DIPSS skóre ≥ 3 . S ohledem na tato zjištění a skutečnost, že se vitamin D spolupodílí na inhibici JAK/STAT signální dráhy, vyvstává otázka přínosu jeho suplementace v éře JAK-inhibitorů.

Závěr

Hlubší poznání patogeneze fibrózy kostní dřeně by mohlo zpřesnit klasifikaci Ph-MPN a zlepšit monitoraci nemocných. Ani jeden z testovaných parametrů reflektujících kostní status (bALP, ICTP, P1NP) se ale v běžné klinické praxi nejeví jako přínosný pro sledování rozvoje fibrózy u Ph-MPN populace. Zvýšená exprese osteoprotegerinu, podílející se na inhibici osteoklastů, endoteliální proliferaci a neoangiogenezi, zřejmě hraje podstatnou roli v patogenezi fibrózy kostní dřeně, ale také není vhodným markerem k neinvazivní monitoraci rozvoje a progresu fibrózy dřeně. Trepanobiopsie proto zůstává nezastupitelným vyšetřením v diagnostice a sledování vývoje MF. Vitamin D je multifunkční pro-hormon s širokým spektrem účinků, kterým se v posledních letech věnuje značná pozornost. Jeho deficit bývá spojován s vyšším rizikem vzniku maligních onemocnění a horší prognózou nemocných [12,14]. V našem souboru pozorujeme u pacientů s MF signifikantně nižší sérové koncentrace vitaminu D ve srovnání s prePMF a ostatními typy Ph-MPN. U MF koreluje tíže jeho deficitu s pokročilostí nemoci. S ohledem na možné synergistické působení vitaminu D s JAK-inhibitory, může hlubší poznání efektu kalcitriolu na nádorový klon determinovat jeho potenciální využití v léčbě.

6. SHRnutí

Doposud se myelofibróze i díky její vzácnosti, nedostatečné znalosti molekulárně-genetických mechanismů podílejících se na jejím vzniku a rozvoji, nevěnovala příliš velká pozornost. V poslední době jsme ale svědky značného obratu. S rozvojem nových vyšetřovacích metod rychle narůstá množství poznatků, které přispěly k lepšímu pochopení patogeneze nemoci a uvedení řady nových léčebných modalit. Zatím prvním a jediným schváleným je JAK1/2 inhibitor ruxolitiniib, který však nesplnil inciální očekávání a výsledky léčby ruxolitiniibem nejsou srovnatelné s výsledky TKI inhibitory u CML. Přesto významně zefektivnil léčbu symptomatických pacientů. Řada dalších nových molekul aktuálně prochází klinickým testováním, např. selektivní JAK inhibitory, imunomodulační či hypometylační léky, HDAC inhibitory, PI3K inhibitory, Hedgehog inhibitory, mTOR inhibitory, check-point inhibitory, látky s antifibrotickým účinkem, inhibitory Aurora kinázy A indukující megakaryocytární polyploidizaci a diferenciaci a MDM2 inhibitory, snižující degradaci proteinu TP53 a indukující TP53-dependentní apoptózu. V rutinní klinické praxi však stále nemáme k dispozici účinnou terapii trombocytopenie či anémie asociované s myelofibrózou, terapii vedoucí ke snížení rizika progresu do akutní leukémie či dosažení dlouhodobých kompletních remisí a prodloužení přežití. Jediným potencionálně kurativním přístupem zůstává alogenní transplantace krvetvorných buněk zatížená nemalým rizikem a její provedení je vzhledem k věkové distribuci nemocných často nemožné.

Stále expandující poznatky, týkající se molekulárních změn u myelofibrózy, nejsou zatím dostatečně validovány v klinické praxi. Cílem naší práce bylo zhodnocení mutačního profilu nemocných s využitím nových metod na bázi NGS. V naší sestavě pacientů jsme potvrdili vliv *driver* mutací na klinický a laboratorní fenotyp choroby, přičemž *CALR* mutovaní byli v době diagnózy významně mladší, s vyššími počty trombocytů, menší splenomegalíí a méně častými konstitučními symptomy. Subanalýzou *JAK2* V617F mutovaných jsme taktéž pozorovali vliv alelické nálože mutované alely na klinický a laboratorní projev nemoci. Pacienti s vyšší alelickou náloží se vyznačovali významně větší splenomegalíí a vyššími počty leukocytů v době diagnózy. Pomocí NGS jsme vyšetřili výskyt a distribuci přídatných sekvenčních variant 14 kandidátních genů. Dále jsme ověřili přítomnost *driver*

mutací, zjištěných klasickým Sangerovým sekvenováním. Přidatné alely byly detekovány u 44 % nemocných se srovnatelným výskytem u *JAK2*, *CALR* i *MPL* mutovaných. Nejčastěji zasaženými geny byly *ASXL1*, *TET2* a *SF3B1*. Četnost sekvenčních variant genů byla nejvyšší u PMF, nejnižší u prePMF. Alespoň jedna nepříznivá přídatná alela se nacházela u 41 % MF, jejich přítomnost byla spojena s téměř třikrát vyšší pravděpodobností úmrtí a častějším výskytem dalších malignit v průběhu sledování.

Ačkoliv přítomnost alespoň jedné nepříznivé sekvenční varianty vychází v univariační analýze významně, v mnohorozměrném modelu je jediným významným prediktorem DIPSS skóre. To potvrzuje, že DIPSS skóre je dobře konstruovaný prognostický model, platný i v současné době nových molekulárních markerů.

Analýza našeho souboru pacientů potvrdila pozorování, že mutační profil ovlivňuje klinický fenotyp a průběh nemoci. Jeho vyšetření v rutinní praxi může pomoci přesněji posoudit individuální riziko, zejména v hraničních případech. Nicméně je třeba ještě identifikovat a ověřit další relevantní genové varianty.

Závažnými komplikacemi spojenými s MF jsou trombózy. Součástí naší práce bylo také vyhodnocení hemostatického systému cestou měření generace trombinu v čase pomocí trombin generačního testu a zhodnocení jeho přínosu a limitací. Již opakovaně byly potvrzeny rozdíly v generaci trombinu u nemocných s Ph-MPN oproti zdravé populaci. Pozorovali jsme významně vyšší generaci trombinu u MF s trombocytémií. Průkaz, jestli tento nálezný koreluje s vyšším výskytem trombotických komplikací, vyžaduje validaci v čase s větší kohortou pacientů. Ukazuje se, že taktéž typ Ph-MPN, pokročilost choroby a mutační stav mají vliv na míru generace trombinu.

Pro komplexní posouzení choroby jsme hodnotili i laboratorní markery kostní remodelace a metabolismu, což je v případě myelofibrózy oblastí nejméně prozkoumanou. Ačkoli se žádný z dostupných markerů kostního obratu neosvědčil jako vhodný indikátor pro monitoraci rozvoje fibrózy, může hlubší poznání procesu fibrogenese přispět k lepšímu porozumění patogeneze choroby a identifikaci nových terapeutických cílů. Nejen studium molekulárního pozadí, ale také mechanismu fibrotizace dřeně, je cenné pro pokračující rozvoj nových terapeutických postupů.

Vzhledem k heterogenitě klinického průběhu, genetického a molekulárního pozadí choroby se jeví, že největší potenciál bude mít právě léčba personalizovaná a kombinovaná.

7. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ

TABULKY

Podstudie 1

- Tabulka 1. WHO diagnostická kritéria PMF 2016.
- Tabulka 2. WHO diagnostická kritéria pre-PMF 2016.
- Tabulka 3. IWG-MRT diagnostická kritéria post-polycytemické MF.
- Tabulka 4. IWG-MRT diagnostická kritéria post-trombocytémické MF.
- Tabulka 5. IPSS, DIPSS, DIPSS Plus skóre.
- Tabulka 6. Nově navržené prognostické modely u PMF.
- Tabulka 7. Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době diagnózy v závislosti na typu *driver* mutace.
- Tabulka 8. Distribuce *driver* mutací u pacientů s trombotickou komplikací.
- Tabulka 9. Klinický a laboratorní fenotyp pacientů s MF v době diagnózy v závislosti na přítomnosti přídatných alel.
- Tabulka 10. Cytogenetické nálezy v době diagnózy u pacientů s MF.
- Tabulka 11. Identifikované přídatné alely u pacientů s myelofibrózou.
- Tabulka 12. Výskyt *driver* mutací a přídatných alel u myelofibrózy.
- Tabulka 13. Distribuce *driver* mutací a přídatných alel u myelofibrózy.
- Tabulka 14. Klinický a laboratorní fenotyp v době diagnózy pacientů s nejfrekventnějšími přídatnými variantami genů *ASXL1*, *TET2* a *SF3B1*.
- Tabulka 15. Přehled dalších maligních onemocnění u nemocných s MF.
- Tabulka 16. Vliv sledovaných proměnných na celkové přežití u nemocných s MF, jednorozměrná analýza.

Podstudie 2

- Tabulka 1. Klinický a laboratorní fenotyp pacientů v době analýzy TGT.
- Tabulka 2. Léčba pacientů v době analýzy TGT.
- Tabulka 3. Vyšetření agregace trombocytů pacientů a kontrolní skupiny.

Tabulka 4. Laboratorní nálezy pacientů s myelofibrózou a kontrolní skupiny.

Tabulka 5. Hodnoty TGT u pacientů a kontrolní skupiny.

Podstudie 3

Tabulka 1. Fenotyp pacientů s MF, pre-PMF a skupiny PV a ET v době analýzy.

Tabulka 2. Laboratorní parametry pacientů s MF, pre-MF a skupiny PV a ET.

GRAFY

Podstudie 1

Graf 1. Frekvence výskytu jednotlivých typů mutací v *CALR* genu.

Graf 2. Věk při diagnóze myelofibrózy v závislosti na typu *driver* mutace.

Graf 3. Hodnoty trombocytů při diagnóze v závislosti na typu *driver* mutace.

Graf 4. Přítomnost splenomegalie při diagnóze v závislosti na typu *driver* mutace.

Graf 5. Rozložení DIPSS skóre pacientů v době diagnózy dle typu *CALR* mutace.

Graf 6. Přítomnost splenomegalie v závislosti na alelické náloži *JAK2* V617F.

Graf 7. Hodnoty leukocytů při diagnóze v závislosti na alelické náloži *JAK2* V617F.

Graf 8. Křivka celkového přežití pacientů s MF.

Graf 9. Výskyt *driver* mutací a přídatných alel u PMF.

Graf 10. Výskyt *driver* mutací a přídatných alel u post-PV MF.

Graf 11. Výskyt *driver* mutací a přídatných alel u post-ET MF.

Graf 12. Výskyt *driver* mutací a přídatných alel u pre-PMF.

Graf 13. Věk nemocných při diagnóze v závislosti na výskytu přídatných alel.

- Graf 14. Vliv *ASXL1* variant na věk nemocných v době diagnózy.
Graf 15. Celkové přežití nemocných s myelofibrózou a prokázanými prognosticky nepříznivými přídatnými alelami.

Podstudie 2

- Graf 1. Trombotické a krvácivé komplikace u pacientů s myelofibrózou.
Graf 2. Distribuce hodnot ETP (μmol) u pacientů s myelofibrózou.
Graf 3. Distribuce hodnot Lag fáze (min) u pacientů s myelofibrózou.
Graf 4. Distribuce hodnot C_{max} (μmol) u pacientů s myelofibrózou.
Graf 5. Srovnání generace trombinu pacientů s myelofibrózou a kontrolní skupiny.
Graf 6 a 7. Vliv počtu trombocytů na generaci trombinu u pacientů s myelofibrózou.

Podstudie 3

- Graf 1. Hodnoty osteoprotegerinu u pacientů s myelofibrózou.
Graf 2. Tíže deficitu vitamínu D v závislosti na typu Ph-MPN.
Graf 3. Tíže deficitu vitamínu D v závislosti na pokročilosti MF.

OBRÁZKY

- Obrázek 1 - 3. Poikilocytóza a dakryocyty. Obrázek zpracovala laborantka p. A. Lapčíková, HOK FNOL (zvětšení 1000x).

8. SEZNAM LITERATURY

Podstudie 1

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-2405.
2. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2016;91(12):1262-1271.
3. 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):10-15.
4. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti MC, Ricci P, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol* 1990;75(1):4-9.
5. Anía BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, et al. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994;47(2):89-93.
6. Bonicelli G, Abdulkarim K, Mounier M, Johansson P, Rossi C, et al. Leukocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: a population-based study of 327 patients. *Br J Haematol* 2013;160(2):251-254.
7. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal V, et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol* 2014;92(4):289-297.
8. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3179-3184.
9. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* 2008;112(8):3026-3035.
10. Smith RE, Chelmoski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and pathologic features and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990;10(4):305-314.

11. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7032):1144-1148.
12. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, et al. Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood* 2011;118(8):2069-2076.
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4): 387-397.
14. 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):184-188.
15. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8520-8530.
16. O'Keane JC, Wolf BC, Neiman RS. The pathogenesis of splenic extramedullary hematopoiesis in metastatic carcinoma. *Cancer* 1989;63:1539-1543.
17. Vaa BE, Wolanskyj AP, Roeker L, Pardanani A, Lasho TL, et al. Pruritus in primary myelofibrosis: clinical and laboratory correlates. *Am J Hematol* 2012;87:136-138.
18. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* 2010; 115(4):778-782.
19. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica* 2010;95(10):1788-1791.
20. García-Manero G, Schuster SJ, Patrick H, Martinez J. Pulmonary hypertension in patients with myelofibrosis secondary to myeloproliferative diseases. *Am J Hematol* 1999;60(2):130-135.
21. Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, et al. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology* 1990;12(5): 1166-1174.
22. 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; 88:1013-

23. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 2008;22(11):2020-2028.
24. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;90(8):1128-1132.
25. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2008;111(4):1862-1865.
26. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, et al. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: clinical and molecular advances. *Blood Rev* 2016;30(6):453-459.
27. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotuno G, Rumi E, Rosti V, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood* 2017;129(24):3227-3236.
28. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-1790.
29. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.
30. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369:2379-2390.
31. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369:2391-2405.
32. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia* 2012;26(3):475-480.
33. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* 2011;118(19):5227-5234.

34. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Patnaik M, Hanson CA, et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 2012;120(20):4168-4171.
35. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861-1869.
36. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, 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):437-438.
37. Manoharan A, Horsley R, Pitney WR. The reticulín content of bone marrow in acute leukaemia in adults. *Br J Haematol* 1979;43:185-190.
38. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: Critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2011;29(6):761-770.
39. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, 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):2895-2901.
40. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment). *Blood* 2010;115(9):1703-1708.
41. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna KH, 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):392-397.
42. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, et al. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood* 2011;118(17):4595-4598.
43. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008;22(4):756-761.

44. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi G, Lococo F, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009;114(8):1477-1483.
45. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling RP, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472-1477.
46. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;28(7):1494-1500.
47. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotuno G, Mudireddy M, Mannarelli C, et al. MIPSS70: mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2018;36: 310-318.
48. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, et al. MIPSS70+ version 2.0: mutation and karyotype-enhanced international prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2018;36:1769-1770.
49. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia* 2018;32:1631-1642.
50. Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Sex and degree of severity influence the prognostic impact of anemia in primary myelofibrosis: analysis based on 1109 consecutive patients. *Leukemia* 2018;32:1254-1258.
51. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: A single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105(3):973-977.
52. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* 2018;32:1057-1069.
53. Abelson J, Merup M, Birgegard G, Weisbjerrum O, Brinch L, et al. The outcome of allo-HSCT for 92 patients with myelofibrosis in the Nordic countries. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(3):380-386.
54. Kerbauy DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, et al. Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced

polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(3):355-365.

55. Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2003;102(12):3912-3918.

56. Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, Isola M, Soldano F, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica* 2008;93(10):1514-1522.

57. Stewart WA, Pearce R, Kirkland KE, Bloor A, Thomson K, et al. The role of allogeneic SCT in primary myelofibrosis: A British Society for Blood and Marrow Transplantation study. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(11):1587-1593.

58. Nivison-Smith I, Dodds AJ, Butler J, Bradstock KF, Ma DD, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelofibrosis in Australia and New Zealand: Older recipients receiving myeloablative conditioning at increased mortality risk. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18(2):302-308.

59. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(3):358-367.

60. Samuelson-Bannow BT, Salit RB, Storer BE, Stevens EA, Wu D, et al. Hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: the dynamic international prognostic scoring system plus risk predicts post-transplant outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24(2): 286-392.

61. Kröger N, Holler E, Kobbe G, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: A prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2009;114:5264-5270.

62. Gupta V, Malone AK, Hari PN, Ahn KW, Hu ZH, et al. Reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with primary myelofibrosis: A cohort analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(1):89-97.

63. Robin M, Tabrizi R, Mohty M, Furst S, Michallet M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: A report of the Société

Francaise de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). *Br J Haematol* 2011;152(3):331-339.

64. Bacigalupo A, Soraru M, Dominietto A, Pozzi S, Geroldi S, et al. Allogeneic hemopoietic SCT for patients with primary myelofibrosis: A predictive transplant score based on transfusion requirement, spleen size and donor type. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(3):458-463.

65. Ito T, Akagi K, Kondo T, Kawabata H, Ichinohe T, et al. Splenic irradiation as a component of a reduced-intensity conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis with massive splenomegaly. *Tohoku J Exp Med* 2012;228(4):295-299.

66. 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):361-370.

67. Rialon KL, Speicher PJ, Ceppa EP, Rendell VR, Vaslef SN, et al. Outcomes following splenectomy in patients with myeloid neoplasms. *J Surg Oncol* 2015;111(4):389-395.

68. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood* 2000;95(7):2226-2233.

69. Akpek G, Pasquini MC, Logan B, Agoui MA, Lazarus HM, et al. Effects of spleen status on early outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(6):825-831.

70. Stübiger T, Alchalby H, Ditschkowski M, Wolf D, Wulf G, et al. JAK inhibition with ruxolitinib as pretreatment for allogeneic stem cell transplantation in primary or post-ET/PV myelofibrosis. *Leukemia* 2014;28(8):1736-1738.

71. Ballinger TJ, Savani BN, Gupta V, Kröger N, Mohty M. How we manage JAK inhibition in allogeneic transplantation for myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2015;94:115-119.

72. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia* 2015; 29(11): 2126 – 2133.

73. Pigneux A, Tanguy MI, Michallet M, Jovet JP, Kventz M, et al; Société Française de Greffe de Moelle. Prior treatment with alpha interferon does not adversely affect the outcome of allogenic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116(1):193-201.
74. Ianotto JC, Chauveau A, Perrard FB, Gyan E, Laribi K, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica* 2018;103(3):438-446.
75. Cervantes F, Mesa R, Barosi G. New and old treatment modalities in primary myelofibrosis. *Cancer J* 2007;13(6):377-383.
76. Thomas DA, Giles FJ, Albitar M, Cortes JE, Verstovsek S, et al. Thalidomide therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer* 2006;106(9):1974-1984.
77. Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, Li Chy, Elliott M, et al. A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:2534-2541.
78. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Manshoury T, Thomas D, Cortes J, et al. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2009;27(28):4760-4766.
79. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, et al. Lenalidomide therapy in del(5q)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia* 2007;21(8):1827-1828.
80. Huang J, Tefferi A. Erythropoiesis stimulating agents have limited therapeutic activity in transfusion dependent patients with primary myelofibrosis regardless of serum erythropoietin level. *Eur J Haematol* 2009;83(2):154-155.
81. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood* 2011;117(13):3949-3504.
82. Pardanani A, Abdelrahman RA, Finke C, Lasho TL, Begna KH, et al. Genetic determinants of response and survival in momelotinib-treated patients with myelofibrosis. *Leukemia* 2015;29(3):741-744.
83. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, et al. A pilot study of the telomerase inhibitor imetelstat for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2015;373:908-919.
84. Martinez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative

manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann Hematol* 2010;89(12):1233-1237.

85. Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, et al. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden on polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol* 2008;83(5):363-365.

86. Thapaliya P, Tefferi A, Pardanani A, Steensma DP, Camoriano J, et al. International working group for myelofibrosis research and treatment response assessment and long-term follow-up of 50 myelofibrosis patients treated with thalidomide-prednisone based regimens. *Am J Hematol* 2011;86(1):96-98.

87. Silver RT, Kiladjan JJ, Hasselbalch HC. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Expert Rev Hematol* 2013;6(1):49-58.

88. Kiladjan JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;117(18):4706-4715.

89. Ianotto JC, Kiladjan JJ, Demory JL, et al. PEG-INF-alpha-2a therapy in patients with myelofibrosis: a study of the french groupe d etudes des myelofibroses (GEM) and France intergroupe des syndromes myéloprolifératifs (FIM). *Br J Haematol* 2009;146:223-225.

90. Silver RT, Vandris K, Goldman JJ. Recombinant interferon-alpha may retard progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report. *Blood* 2011;117:6669-6672.

91. Silver RT, Vandris K. Recombinant interferon alpha (rIFN alpha-2b) may retard progression of early myelofibrosis. *Leukemia* 2009;23:1366-1369.

92. Pizzi M, Silver RT, Barel A, et al. Recombinant interferon- α in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Mod Pathol* 2015;28(10):1315-1323.

93. Silver RT, Barel AC, Lascu E, Ritchie EK, Roboz GJ, et al. The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- α (rIFN α) treatment in early myelofibrosis. *Cancer* 2017;123(14):2680-2637.

94. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:799-807.

95. Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:787-789.
96. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Sirulnik A, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood* 2013;122(25):4047-4053.
97. Mascarenhas J, Hoffman R. A comprehensive review and analysis of the effect of ruxolitinib therapy on the survival of patients with myelofibrosis. *Blood* 2013;121(24):4832-4837.
98. Martí-Carvajal AJ, Anand V, Solà I. Janus kinase-1 and Janus kinase-2 inhibitors for treating myelofibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;10(4):CD010298
99. Passamonti F, Maffioli M, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, et al. Impact of ruxolitinib on the natural history of primary myelofibrosis: a comparison of the DIPSS and the COMFORT-2 cohorts. *Blood* 2014;123(12):1833-1835.
100. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, et al. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica* 2013;98(12):1872-1876.
101. Marchetti M, Barosi G, Cervantes F, Birgegard G, Griesshammer M, et al. Which patients with myelofibrosis should receive ruxolitinib therapy? ELN-SIE evidence-based recommendations. *Leukemia* 2017;31(4):882-888.
102. Mead AJ, Milojkovic D, Knapper S, Garg M, Chacko J, et al. Response to ruxolitinib in patients with intermediate-1, intermediate-2, and high risk myelofibrosis: results of the UK ROBUST Trial. *Br J Haematol* 2015;170(1):29-39.
103. Al-Ali HK, Griesshammer M, le Coutre P, Waller CF, Liberati AM, et al. Safety and efficacy of ruxolitinib in a open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. *Haematologica* 2016;101(9):1065-1073.
104. Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc* 2011;86(12):1188-1191.
105. Dai T, Friedman EW, Barta SK. Ruxolitinib withdrawal syndrome leading to tumor lysis. *J Clin Oncol* 2013;31(29):e430-432.

106. Heine A, Held SA, Daecke SN, Wallner S, Yajnanarayana SP, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 2013;122(7):1192-1202.
107. Wysham NG, Sullivan DR, Allada G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. *Chest* 2013;143(5):1478-1479.
108. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, et al. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. *Leukemia* 2014;28(1):225-227.
109. Colomba C, Rubino R, Siracusa L, Lalicata F, Trizzino M, et al. Disseminated tuberculosis in a patient treated with a JAK2 selective inhibitor: a case report. *BMC Res Notes* 2012;5:552.
110. Wathes R, Moule S, Milojkovic D. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with ruxolitinib. *N Engl J Med* 2013;369:197-198.
111. Tefferi A, Mudireddy M, Gangat N, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Risk factors and prognostic model for postsplenectomy survival in myelofibrosis. *Am J Hematol* 2017;92(11):1187-1192.
112. Elliott MA, Chen MG, Silverstein MN, Tefferi A. Splenic irradiation for symptomatic splenomegaly associated with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1998;103(2):505-511.
113. Petti MC, Latagliata R, Spadea T, Spadea A, Montefusco E, et al. Melphalan treatment in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 2002;116(3):576-581.
114. Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2017; 105(6): 743-747.
115. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Belachew AA, Wassie EA, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014;28(7):1568-1570.
116. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv* 2016;1(2):105-111.
117. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118(7):1723-1735.
118. Carbuccia N, Murati A, Troupli V, Brecqueville M, Adélaïde J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009;23(11):2183-2186.

119. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(6):1146-1151.
120. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010;42(8):722-726.
121. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(22):2289-2301.
122. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, et al. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25(7):1219-1220.
123. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(14):2220-2228.
124. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2014;124(18):2793-2803.
125. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):287-296.
126. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia* 2018;32(10):2274-2278.
127. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28(9):1804-1810.
128. Palova M, Szotkowski T, Hlusi A, et al. Effect of CALR and JAK2 mutations on the clinical and hematological phenotypes of the disease in patients with myelofibrosis – long-term experience from a single center. *Neoplasma* 2018;65:296-303.
129. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 2014;99(7):1184-1190.

130. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(24):3714-3719.
131. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínéz-Trillos A, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062-1069.
132. Guglielmelli P, Bartalucci N, Rotunno G, Vannucchi AM. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol* 2014;7(4):423-425.
133. Eder-Azanza L, Navarro D, Aranaz P, Novo FJ, Cross NC, et al. Bioinformatic analyses of CALR mutations in myeloproliferative neoplasms support a role in signaling. *Leukemia* 2014;28(10):2106-2109.
134. Park SH, Kim SY, Lee SM, Yi J, Kim HH, et al. Incidence, clinical features, and prognostic impact of CALR exon 9 mutations in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: an experience of a single tertiary hospital in Korea. *Ann Lab Med* 2015;35(2):233-237.
135. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Pate J, Harris K, Yao J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70(2):447-452.
136. Patel KP, Newberry KJ, Luthra R, Jabbour E, Pierce S, et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood* 2015;126(6):790-797.
137. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009;23(5):905-911.
138. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2015;372(7):601-612.
139. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugei G, Carrai V, et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia* 2014;28(9):1811-1818.

Podstudie 2

1. Barbui T, Carrobio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* 2010;115(4):778-782.
2. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica* 2010;95(10):1788-1791.
3. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian JJ, Janssen HL, Leebeek FW. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2012;120(25):4921-4928.
4. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Amm Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:517-581.
5. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, et al. The presence of JAK2 V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009;113(21):5246-5249.
6. Teofili L, Martini M, Iachininoto M, Capodimonti S, Nuzzolo ER, et al. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;117(9):2700-2707.
7. Rosti V, Villani L, Riboni R, Poletto V, Bonetti E, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2 V617F mutation. *Blood* 2013;121(2):360-368.
8. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2011;29(6):761-770.
9. Tefferi A, Barbui T. New and treatment-relevant risk stratification for thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2015;90(8):683-685.
10. Landolfi R, DiGennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, European collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera (ECLAP), et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109(6):2446 – 2452.
11. Schwarz J, Ovesná P, Černá O, Kissová J, Maaloufová-Soukupová J, et al. Thrombosis in thrombocytemic Ph-myeloproliferations is associated with higher

- platelet count prior to the event: results of analyses of prothrombotic risk factors from a registry of patients treated with anagrelide. *Eur J Haematol* 2016;96(1):98-106.
12. Penka M, Schwarz J, Campř V, Pospíšilová D, Křen L, et al. Shrnutí doporučení České pracovní skupiny pro Ph-negativní myeloproliferativní onemocnění (CZEMP) České hematologické společnosti ČLS JEP pro diagnózu a terapii bcr-abl negativních myeloproliferací. *Vnitř Lék* 2012;58(2):163-168.
 13. Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(3):617-633.
 14. Lussana F, Carobbio A, Randi ML, Elena C, Rumi E, et al. A lower intensity of treatment may underlie the increased risk of thrombosis in young patients with masked polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2014;167(4):541-546.
 15. De Stefano V, Vannucchi AM, Ruggeri M, Cervantes F, Fialvarez-Larrán A, et al. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients. *Blood Cancer J* 2016;6(11):e493.
 16. How J, Zhou A, Oh ST. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: pathophysiology and molecular mechanisms of disease. *Ther Adv Hematol* 2017;8(3):107-118.
 17. Robier C, Neubauer M, Sternad H, Quehenberger F, Rainer F, et al. Evaluation of platelet function and pharmacological platelet inhibition in patients with myeloproliferative disorders using multiple electrode aggregometry. *Thromb Res* 2010;126(3):232-237.
 18. Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CP, et al. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur J Med Res* 2010;15(5):214-219.
 19. Hluší A, Slavík L, Úlehlová J, Krčová V, Zapletalová J, et al. Globální hodnocení funkce hemostázy-část II. Vlastní zkušenosti s použitím trombingeneračního testu u pacientů s trombofilií. *Transfuze Hematol.dnes* 2010;16(3):121-125.
 20. Duchemin J, Ugo V, Ianotto JC, Lecucq L, Mercier B, et al. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res* 2010;126(3):238-242.
 21. Tripodi A, Chantarangkul V, Gianniello F, Clerici M, Lemma L, et al. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2013;92(12):1633-1639.

22. Palova M, Slavik L, Hlusi A, Szotkowski T, Ulehlova J, et al. Thrombin generation testing in patients with myelofibrosis. *Clin Lab* 2018;64(9):1373-1383.
23. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* 2008;22(11):2020-2028.
24. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(9):1381-1389.
25. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2008;112(10):4061-4068.
26. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2011;86(4):337-342.
27. Olteanu AL, Mihăilă RG, Mihalache M. Evaluation of thrombin generation in classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Revista Romana de Medicina de Laborator* 2016;24(3):279-289.
28. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062-1069.

Podstudie 3

1. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8520-8530.
2. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama* 2004;292(4):490-95.
3. Chagraoui H, Sabri S, Capron C, Villeval JL, Vainchenker W, et al. Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes. *Exp Hematol* 2003;31(11):1081-88.
4. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, et al. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276(23):20659-72.

5. Bock O, Loch G, Schade U, Büsche G, Wasielewski R, et al. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br J Haematol* 2005;130(1):76-82.
6. Wang JC, Hemavathy K, Charles W, Zhang H, Dua PK, et al. Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol* 2004;32(10):905-10.
7. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2(4):389-406.
8. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289(5484):1504-1508.
9. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;90(8):1128-1132.
10. Farmer S, Vestergaard H, Hansen S, Shanbhogue VV, Stahlberg CI, et al. Bone geometry, bone mineral density, and micro-architecture in patients with myelofibrosis: a cross-sectional study using DXA, HR-pQCT, and bone turnover markers. *Int J Hematol* 2015;102(1):67-75.
11. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, et al. International osteoporosis foundation and international federation of clinical chemistry and laboratory medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(8):1271-1274.
12. Lai YH, Fang TC. The pleiotropic effect of vitamin D. *ISRN Nephrol* 2013;2013:898125. doi: 10.5402/2013/898125.
13. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J* 2010;16(1):1-9.
14. Kulling PM, Olson KC, Olson TL, Feith DJ, Loughran TP jr. Vitamin D in hematological disorders and malignancies. *Eur J Haematol* 2017;98(3):187-197.
15. Maalmi H, Ordonez-Mena JM, Schottker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer* 2014;50(8):1510-21.

16. Wang W, Li G, He X, Gao J, Wang R, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prognosis in hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(5):1999-2005.
17. Kreipe H, Büsche G, Bock O, Hussein K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5(suppl 1):S21.
18. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao JZ, Verma A, et al. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF- β . *Stem Cell Investig* 2016;3:5.
19. 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.
20. Jensen MK, Riisbro R, Holten-Andersen MN, Brown P, Junker P, et al. Collagen metabolism and enzymes of the urokinase plasminogen activator system in chronic myeloproliferative disorders: correlation between plasma-soluble urokinase plasminogen activator receptor and serum markers for collagen metabolism. *Eur J Haematol* 2003;71(4):276-82.
21. Pardanani A, Drake MT, Finke C, Lasho TL, Rozell SA, et al. Vitamin D insufficiency in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes: clinical correlates and prognostic studies. *Am J Hematol* 2011;86(12):1013-16.
22. Radujkovic A, Schnitzler P, Ho AD, Dreger P, Luft T. Low serum vitamin D levels are associated with shorter survival after first-line azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome and secondary oligoblastic acute myeloid leukemia. *Clin Nutr* 2017;36(2):542-51.
23. Foa P, Maiolo AT, Cortellaro M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in the treatment of idiopathic thrombocytopenia and myelofibrosis. *Haematologica* 1990;75(3):294-5.
24. Wang Q, Li H, Xie H, Fu M, Guo B, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;135:43-50.
25. Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/INF γ axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2006;83(7):1299-1309.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

A, Publikace autora související s dizertační prací

Původní vědecké publikace in exteso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Palova M, Szotkowski T, Hlusi A, Indrak K, Navratilova J, Divoka M, Papajik T. *Effect of CALR and JAK2 mutations on the clinical and hematological phenotypes of the disease in patients with myelofibrosis – long term experience from a single center.* Neoplasma 2018; 65(2): 296-303.

IF (2018) = 1,696

Palova M, Slavik L, Hlusi A, Szotkowski T, Ulehlova J, Divoka M, Navrátilova J, Papajik T. *Thrombin generation testing in patients with myelofibrosis.* Clin Lab 2018; 64(9): 1373-1383.

IF (2018) = 0,848

Palova M, Szotkowski T, Hlusi A, Navratilova J, Katrincsakova B, Indrák K, Papajik T. *Benefit of next generation sequencing in clinical practice in patients with myelofibrosis – a single-center experience - v recenzním řízení.*

De Stefano V, Carobbio A, Di Lazzaro V, Guglielmelli P, Iurlo A, Finazzi MC, Rumi E, Cervantes F, Elli EM, Randi ML, Griesshammer M, Palandri F, Bonifacio M, Hernandez-Boluda JC, Cacciola R, **Palova M**, Carli G, Beggiato E, Ellis MH, Musolino C, Gaidano G, Rappezi D, Tieghi A, Lunghi F, Loscocco GG, Cattaneo D, Cortelezzi A, Betti S, Rossi E, Finazzi G, Censori B, Cazzola M, Bellini M, Arellano-Rodrigo E, Bertozzi I, Sadjadian P, Vianelli N, Scaffidi L, Gomez M, Cacciola M, Vannucchi MA, Barbui T. *Benefit-risk profile of cytoreductive drugs along with antiplatelet and antithrombotic therapy after transient ischemic attack or ischemic stroke in myeloproliferative neoplasms.* Blood Cancer Journal 2018;8:25.doi: 10.1038/s41408-018-0048-9.

IF (2018) = 8,125

De Stefano V, Ruggeri M, Cervantes F, Alvarez-Larran A, Iurlo A, Randi ML, Elli E, Finazzi MC, Finazzi G, Zetterberg E, Vianelli N, Gaidano G, Rossi E, Betti S, Nichele I, Cattaneo D, **Palova M**, Ellis MH, Cacciola R, Tieghi A, Hernandez-Boluda JC, Pungolino E, Specchia G, Rapezzi D, Forcina A, Musolino C, Carrobio A, Griesshammer M, Sant'Antonio E, Vannucchi AM, Barbui T. *High rate of recurrent venous thromboembolism in patients with myeloproliferative neoplasms and effect of prophylaxis with vitamin K antagonists*. *Leukemia* 2016; 30(10): 2032-2038.

IF (2016) = 11,702

De Stefano V, Vannucchi AM, Ruggeri M, Cervantes F, Alvarez-Larran A, Iurlo A, Randi ML, Pieri L, Rossi E, Guglielmelli P, Betti S, Elli E, Finazzi MC, Finazzi G, Zetterberg E, Vianelli N, Gaidano G, Nichele I, Cattaneo D, **Palova M**, Ellis MH, Cacciola E, Tieghi A, Hernandez-Boluda JC, Pungolino E, Specchia G, Rapezzi D, Forcina A, Musolino C, Carrobio A, Griesshammer M, Barbui T. *Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients*. *Blood Cancer J* 2016; 6(11): e493. doi:10.1038/bcj.2016.103.

IF (2016) = 6,126

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných časopisech

Palová M, Szotkowski T, Hluší A, Navrátilová J, Divoká M, Papajík T, Petrová P, Prošková J. *Hodnocení kostního obratu a významu deficitu vitamínu D u pacientů s myelofibrózou*. *Transfuze Hematol.dnes* 1, 2018, No. online, p1-15, v tisku.

Weinbergerová B, Čičátková P, **Palová M**, Stejskal L, Bělohlávková P, Kisořová J, Walterová L, Fraňková H, Černá O, Lakomá L, Brejcha M, Pelková J, Schutzová M, Obernauerová J, Nechvílová D, Bogoczová E, Hluší A, Faber E, Penka M, Brychtová Y, Červinek L, Doubek M, Žák P, Mayer J, Ráčil Z. *Zkušenosti s léčbou ruxolitinem u pacientů s myelofibrózou a pravou polycytémií na českých hematologických pracovištích*. *Transfuze Hematol.dnes* 2017; 23: 30-40.

Přehledné vědecké práce uveřejněné v recenzovaných časopisech bez IF

Palová M, Hluší A, Indrák K, Papajík T. *Trombóza splachnických žil u pacientů s Ph negativní myeloproliferativní nemocí*. Transfuze Hematol.dnes 2018;24:69-78.

Palová M, Indrák K, Hluší A, Szotkowski T. *Současná léčba myelofibrózy na základě rizikové stratifikace pacientů*. Transfuze Hematol.dnes 2013;19:163-170.

Kapitola v monografii

Palová M. *Vybrané Ph-negativní myeloproliferativní neoplázie, str. 109-120*.
Monografie: Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění
Editor: doc. MUDr. P. Rohoň, Ph.D. Nakladatelství Mladá fronta a.s., ISBN 978-80-204-4220-8.

Seznam přednášek/ posterů přednesených uchazečem na odborných veřejných fórech (1. autor/ přednášející)

Palová M, Szotkowski T, Hluší A, Indrák K, Navrátilová J, Divoká M, Papajík T. *Význam vyšetření mutačního stavu a jeho vliv na klinický a laboratorní fenotyp u myelofibrózy*.

XXXI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 28. - 30. 5. 2017.

Palová M. *Jak léčím pravou polycytémii a esenciální trombocytémii*.

XXIII. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 14. - 15. 10. 2016, Prostějov.

Palová M, Hluší A, Indrák K, Szotkowski T, Papajík T. *Žilní trombotické komplikace Ph negativních myeloproliferativních chorob*.

XXX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 29. - 31. 5. 2016, Olomouc.

Palová M. *Trombotické komplikace u myeloproliferativních onemocnění.*

XXII. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 23. - 24. 10. 2015, Prostějov.

Palová M, Szotkowski T, Hluší T, Indrác K, Faber E. *Nové možnosti léčby osteomyelofibrózy, účinnost a bezpečnost Ruxolitiniu – zkušenosti jednoho centra.*
XXXIV. Dny mladých internistů, 5. 6. 2015, Olomouc.

Palová M, Szotkowski T, Raida L, Indrác K, Szotkowská R. *Alogenní transplantace kmenových buněk u pacientů s primární myelofibrózou – zkušenosti jednoho centra.*
XXVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 1.- 3. 6. 2014, P 26.

Palová M, Indrác K. *Osteomyelofibróza: management na základě stratifikace rizika.*
XX. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 8. - 9. 11. 2013, Prostějov.

Palová M, Indrác K, Hluší A. *Nové možnosti léčby osteomyelofibrózy.*
III. Olomouc kazuistická, 8. 12. 2012, Olomouc.

Palová M, Indrác K, Hluší A. *Diagnostika pravé polycytémie u pacienta s izolovanou erytrocytózou.*
III. Olomouc kazuistická, 8.11. 2012, Olomouc.

Publikovaná abstrakta (kromě všech výše uvedených přednášek a posterů)

Navrátilová J, **Palová M,** Szotkowski T, Hluší A, Indrác K, Papajík T. *Detection of CALR mutations in JAK2 V617F positive patients.*
XXXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 27. - 29. 5. 2018, sborník abstrakt, P4.

Navrátilová J, **Palová M**, Szotkowski T, Hluší A, Urbánková H, Papajík T. *Mutace genů ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 a SRSF2 u pacientů s myelofibrózou – pilotní analýza jednoho centra.*

XXXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 27. - 29. 5. 2018, sborník abstrakt, P14.

Hluší A, Slavík L, **Palová M**, Úlehlová J. *Generace trombinu u pacientů s myelofibrózou.*

XXIV. Česko-Slovenská konference o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí, 18. - 20. 5. 2017, sborník abstrakt.

Navrátilová J, Divoká M, **Palová M**, Hluší A, Pospíšilová D, Kučerová J, Indrác K. *Mutace v genu pro CALRETICULIN: nový marker esenciální trombocytémie a primární myelofibrózy.*

XXVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 1. - 3. 6. 2014, sborník abstrakt, P18.

Barbui T, Ghirardi A, Masciulli A, Carobbio A, Palandri F, Vianelli N, De Stefano V, Betti S, Di Veroli A, Iurlo A, Cataneo D, Delaini F, Bonifacio M, Scaffidi L, Patriarca A, Rumi E, Stephenson C, Guglielmelli P, Elli EM, **Palova M**, Bertolotti L, Erez D, Gomez M, Wille K, Pérez-Encinas M, Lunghi F, Figueras AA, Fox ML, Beggiato E, Benevolo G, Carli G, Cacciola RR, McMullin F, Tieghi A, Flores VR, Marchetti M, Griesshammer M, Alvarez-Larran A, Vannucchi AM, Finazzi G. *Risk factors for secondary cancer in a case-control study on 1,259 patients with myeloproliferative neoplasms.* ASH 2018, sborník abstrakt.

B, Ostatní publikace

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Papajik T, Myslivecek M, Sedova Z, Buriankova E, Prochazka V, Koranda P, Raida L, Kubova Z, **Palova M**, Kucerova L, Flodr P, Jarkovsky J, Dusek L, Indrak K. *Standardised uptake value of 18F-FDG on staging PET/CT in newly diagnosed patients with different subtypes of non-Hodgkin's lymphoma*. Eur J Hematol 2011;86(1): 32-37.

Přehledové vědecké práce uveřejněné v recenzovaných časopisech bez IF

Hluší A, Slavík L, **Palová M**, Krčová V. *Nová orální antikoagulancia – pohled hematologa*. Interní Med 2015; 17(4): 200-203.

Krčová V, Hluší A, **Palová M**, Slavík L, Úlehlova J. *Nová antikoagulancia – možnosti monitorování antikoagulačního účinku (dabigatran)*. Interni Med 2012; 14: 318-321.

Seznam přednášek/ posterů přednesených uchazečem na odborných veřejných fórech (1. autor/ přednášející)

Palová M. *Nenádorová polyglobulie.*

XXV. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 12. - 13. 10. 2018, Olomouc.

Palová M. *Trombotické komplikace PNH.*

XXI. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 7. - 8. 11. 2014, Prostějov.

Palová M, Krčová V, Hluší A. *Nová antikoagulancia.*

XVIII. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 4. - 5. 11. 2011, Prostějov.

Palová M, Hluší A, Procházková J. *Současnost a budoucnost léčby hemofiliků.*

XVII. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska, 12. - 13. 11. 2010, Prostějov.

Publikovaná abstrakta (kromě všech vše uvedených přednášek a posterů)

Palová M, Hluší A. *Úspěšná léčba získané hemofilie A u pacienta se systémovým onemocněním pojiva.*

XXIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 24. - 26. 6. 2010, sborník abstrakt.

Hluší A, **Palová M**, Procházková J, Slavík L. *Získaná hemofilie.*

XXXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 27. - 29. 5. 2018, sborník abstrakt.

Slavík L, Lukeš J, Zhánělová M, Němcová M, Úlehlová J, Procházková J, Hluší A, **Palová M**, Václavík J. *Stanovení NOAC pomocí HPLC MS/MS a porovnání s funkčními koagulačními testy.*

XXIV. Česko-Slovenská konference o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí, 18. - 20. 5. 2017, sborník abstrakt.

Procházková J, Slavík L, Úlehlová J, **Palová M**, Hluší A. *Závislost účinnosti nízkomolekulárního heparinu (stanovené testem anti Xa) na hladině antitrombinu – kazuistika gravidní pacientky s deficitem antitrombinu.*

XXX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 29. - 31. 5. 2016, sborník abstrakt, P52.

Úlehlová J, Slavík L, Krčová V, Hluší A, Procházková J, **Palová M**. *Možnosti laboratorní kontroly nových antitrombotik.*

XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 12. - 14. 5. 2013, sborník abstrakt, P68.

Úlehlová J, Slavík L, Krčová V, Hluší A, Procházková J, **Palová M**. *In vitro* detekce inhibice agregace trombocytů acetylosalicylovou kyselinou.

XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 12. - 14. 5. 2013, sborník abstrakt, P69.

Úlehlová J, Slavík L, Krčová V, Hluší A, Procházková J, **Palová M**. *Rozlišení endogenních a exogenních příčin ASA rezistence in vitro*.

XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 24. - 26. 6. 2012, sborník abstrakt, P35.

Kapitáňová Z, Mysliveček M, Papajík T, Buriánková E, Procházka V, Koranda P, Rusiňáková Z, Henzlová L, **Palová M**, Indrác K. *Hodnocení terapeutické odpovědi pomocí 18F-FDG PET/CT u nemocných s B-buněčnými ne-hodgkinskými lymfomy léčenými imunochemoterapií s použitím rituximabu*.

XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 22. - 25. 6. 2011, sborník abstrakt.