

# Kronična renalna insuficijencija u bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazmama

---

**Veić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:632726>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-30**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Petra Veić**

**Kronična renalna insuficijencija u bolesnika s  
mijeloproliferativnim neoplazmama**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za hematologiju Interne klinike Kliničke bolnice Dubrava te Odjelu molekularne dijagnostike i genetike Kliničke bolnice Dubrava, pod vodstvom dr. sc. Marka Lucijanića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## Popis kratica korištenih u radu:

<b>KML</b>	- kronična mijeloična leukemija
<b>PV</b>	- policitemija vera
<b>ET</b>	- esencijalna trombocitemija
<b>PMF</b>	- primarna mijelofibroza
<b>MPN</b>	- mijeloproliferativna neoplazma
<b>Ph-neg</b>	- Philadelphia (kromosom) negativna
<b>JAK2</b>	- Janus kinaza 2
<b>SZO</b>	- Svjetska zdravstvena organizacija
<b>JAK2 V617F</b>	- Janus kinaza 2 s mutacijom V617F
<b>JAK2 WT</b>	- engl. JAK2 Wild type, nemutirana Janus kinaza 2
<b>MPL</b>	- engl. myeloproliferative leukemia virus oncogene
<b>CALR</b>	- engl. calreticulin
<b>abl</b>	- abelson kinaza, kontrolni gen za lančane reakcije polimeraze
<b>PCR</b>	- engl. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimeraze
<b>qPCR</b>	- kvantitativni PCR u realnom vremenu (engl. quantitative real time PCR)
<b>KS</b>	- koštana srž
<b>STAT</b>	- prijenosnik signala i aktivator transkripcije (prema engl. signal transducer and activator of transcription)
<b>AB</b>	- opterećenje alelom (prema engl. allele burden)
<b>V617F</b>	- mutacija 617. kodona koja dovodi do zamjene valina fenilalaninom
<b>WT</b>	- divlji tip (prema engl. wild type)
<b>KBB</b>	- kronična bubrežna bolest

# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Kronične mijeloproliferativne neoplazme.....	1
1.1.1.	Definicija i klasifikacija mijeloproliferativnih neoplazmi.....	1
1.1.2.	Policitemija vera.....	3
1.1.3.	Esencijalna trombocitemija.....	5
1.1.4.	Primarna mijelofibroza.....	8
1.2.	Janus kinaza 2 (JAK2).....	12
1.2.1.	Biologija mutacije <i>V617F</i> .....	12
1.2.2.	Dijagnostička važnost mutacije JAK2 <i>V617</i> .....	14
1.3.	Kronična bubrežna bolest.....	16
1.3.1.	Glomerularna filtracija.....	16
1.3.2.	Epidemiologija i stadiji bubrežne bolesti.....	17
1.3.3.	Komplikacije vezane uz KBB.....	18
1.3.4.	Povezanost KBB i MPN.....	19
2.	Hipoteza.....	20
3.	Ciljevi.....	21
3.1.	Opći cilj.....	21
3.2.	Specifični ciljevi.....	21
4.	Ispitanici i metode.....	22
4.1.	Ispitanici i metode.....	22
4.2.	Statističke metode.....	23
5.	Rezultati.....	24
5.1.	Značajke ispitanika.....	24
5.2.	Opterećenje mutiranim JAK2 <i>V617F</i> alelom i povezanost s kroničnom bubrežnom insuficijencijom.....	26
5.3.	Dinamika bubrežne funkcije tijekom vremena ovisno o opterećenju mutiranim JAK2 <i>V617F</i> alelom.....	29
6.	Rasprava.....	31
7.	Zaključci.....	33
8.	Zahvale.....	34
9.	Literatura.....	35
10.	Životopis.....	44

# SAŽETAK

## **Kronična renalna insuficijencija u bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazmama**

**Petra Veić**

Bolesnici s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN) u četvrtini slučajeva prilikom dijagnoze imaju kroničnu bubrežnu bolest (KBB). Patohistološke studije ukazuju kako bi mogla postojati glomerulopatija povezana s MPN. Ciljevi ovog rada su proučiti povezanost opterećenja mutiranim JAK2 V617F alelom s prisustvom KBB i s dinamikom bubrežne funkcije tijekom vremena.

Analizirano je ukupno 230 bolesnika, 98 s PV, 94 s ET, 20 s PMF i 18 s drugim MPN. Medijan opterećenja mutiranim alelom bio je 26.3%, raspon 0.1-96. Medijan serumskog kreatinina bio je 84  $\mu\text{mol/L}$ , raspon 36-174. Ukupno 46/230 (24.9%) bolesnika imalo je KBB. Bolesnici s KBB pri dijagnozi imali su veće opterećenje mutiranim alelom (medijan 37.6 vs 23.4%,  $P=0.040$ ). Dinamika vrijednosti kreatinina tijekom vremena značajno se razlikovala ovisno o razini opterećenja mutiranim alelom pri dijagnozi (2% pogoršanje vs. 7% poboljšanje u pacijenata s većim opterećenjem mutiranim alelom vs. pacijenti s manjim opterećenjem mutiranim alelom, ( $P=0.032$ )). Veće opterećenje JAK2 V617F mutiranim alelom pri dijagnozi povezano je s većom učestalosti KBB kao i nepovoljnom dinamikom (pogoršanjem) bubrežne funkcije tijekom vremena u bolesnika s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama. Navedeno govori u prilog povezanosti povećane aktivnosti maligne bolesti i lošije bubrežne funkcije.

**Ključne riječi:** kronična mijeloproliferativna neoplazma; kronična bubrežna insuficijencija; tromboza

# SUMMARY

## Chronic renal insufficiency in patients with myeloproliferative neoplasms

**Petra Veić**

Patients with chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) often have a chronic kidney disease (CKD) at the time of diagnosis. Two diseases may be causally related as pathohistological studies suggest existence of MPN-related glomerulopathy. Aims of this study are to examine the correlation between renal function and JAK2-mutation allele burden in MPN patients and analyse dynamics of mutant allele burden (MAB) and CKD.

230 MPN patients were enrolled: 98 polycythaemia vera, 94 essential thrombocythemia, 20 primary myelofibrosis, 18 MPN not classified. At the time of the diagnosis 24.9% of patients had CKD. MPN patients with higher mutant allele burden stratified at median value ( $>26.3\%$ ) had higher occurrence of CKD at baseline (32.6% vs 16.7%,  $P=0.012$ ). MAB differed significantly between different MPN subtypes at the baseline ( $P<0,001$ ), median value in PV patients was 47,5%, 16,5% in ET, 39,5% in PMF and 21,6% in MPN unclassified. Patients with CKD at the time of diagnosis had higher MAB (mean 37,6 vs. 23,4%,  $P=0,040$ ).

Dynamics of kidney function significantly differed regarding baseline allele burden with mean 2% worsening and 7% improvement in serum creatinine levels in patients with higher vs lower baseline mutant allele burden, respectively,  $P=0.032$ .

JAK2 V617F mutated MPN patients with higher mutant allele burden may have higher occurrence of concomitant CKD and unfavorable dynamics of kidney function over time. Although causative relationship cannot be inferred due to the limitations of the study design, our observations support the view that biology of MPN and CKD might be intertwined.

**Keywords:** chronic myeloproliferative neoplasms; chronic kidney disease; thrombosis

# 1. Uvod

## 1.1. Kronične mijeloproliferativne neoplazme

### 1.1.1. Definicija i klasifikacija mijeloproliferativnih neoplazmi

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) su heterogena skupina klonalnih poremećaja hematopoetskih matičnih stanica, karakteriziranih nereguliranom proliferacijom jedne ili više mijeloidnih loza u koštanoj srži (1).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) u svom 4.-tom, revidiranom izdanju klasifikacije tumora hematopoetskog i limfatičnog tkiva (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4<sup>th</sup> edition) iz 2017. godine u skupini mijeloproliferativnih neoplazmi prepoznaje slijedeće entitete:

- kronična mijeloična leukemija Ph<sup>+</sup>, t(9;22)(q34;q11), *BCR/ABL1* pozitivna
- kronična neutrofilna leukemija
- policitemija vera
- primarna mijelofibroza
- esencijalna trombocitemija
- kronična eozinofilna leukemija koja nije drugačije specificirana (NOS)
- mijeloproliferativne neoplazme, neklasificirane

U pripremi je 5. izdanje SZO klasifikacije hematolimfoidnih tumora, koje će u odnosu na četvrto imati promjene u nomenklaturi i nekim dijagnostičkim kriterijima, s naglaskom na molekularnu dijagnostiku (2).

Najučestalije četiri mijeloproliferacije su kronična mijeloična leukemija (KML, Ph<sup>+</sup>, t(9;22)(q34;q11), *BCR/ABL1* pozitivna), policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET) i primarna mijelofibroza (PMF), pri čemu tzv. tri „klasične“ Ph<sup>-</sup> negativne mijeloproliferativne neoplazme (PV, ET i PMF) dijele brojne zajedničke značajke. Povijesno gledano, ovu skupinu bolesti je prvi opisao Dameshek 1951. godine u radu „Some



speculations on the myeloproliferative disorders“ te uveo naziv kronične mijeloproliferativne bolesti u svakodnevnu uporabu (3).

Do velikog pomaka u razumijevanju ovih bolesti dovelo je otkriće točkaste mutacije gena *Janus Kinaze 2 (JAK2)* koja je nađena u većine bolesnika s Ph-negativnim mijeloproliferacijama. O mutaciji je 2005.godine izvijestilo nekoliko grupa autora (4,5,6,7). Ovo otkriće je dalo veliki zamah istraživanju molekularne podloge Ph-negativnih kroničnih mijeloproliferativnih bolesti. Rezultati istraživanja ugrađeni su klasifikaciju Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 2008. godine, te je naziv mijeloproliferativne bolesti promijenjen u mijeloproliferativne neoplazme čime se priznaje klonalna i neoplastična priroda ovih bolesti. Osim JAK2V617F mutacije, dio bolesnika s PV ima mutacije u egzonu 12 (8).

Nakon otkrića *JAK2* mutacije, kod nekih *JAK2* negativnih bolesnika s ET i PMF pronađene su mutacije *CALR* (calreticulin) i *MPL* (myeloproliferative leukemia virus oncogene) gena. U bolesnika s PV, ove se mutacije ne nalaze (9,10, 11,12,13).

Zajedničke značajke triju klasičnih Ph-negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi su dugotrajni klinički tijek, proliferacija zrelih stanica jedne ili više hematopoetskih loza u koštanoj srži, ekstramedularna hematopoeza, sklonost trombozi i hemoragijskim incidentima (14). Ove tri mijeloproliferacije mogu svojim kliničkim značajkama jako nalikovati jedna na drugu (npr. ET i prefibrozna faza PMF), te tijekom bolesti poprimiti značajke druge MPN. Preklapanje kliničkih značajki (tzv.fenotipska mimikrija) ova tri entiteta dijelom je moguće objasniti činjenicom da mutiranu JAK-2 tirozin kinazu koriste receptori za eritropoetin, TPO i G-CSF.

Osim zajedničkih značajki, te se neoplazme međusobno razlikuju svojim kliničkim tijekom, učestalošću komplikacija, prognozom, mogućim ishodom bolesti, te po učestalosti progresije u akutnu leukemiju ili mijelofibrozu (15,16).

### 1.1.2. Policitemija vera

Policitemija vera (PV) je mijeloproliferativna neoplazma (MPN) karakterizirana povećanim stvaranjem crvenih krvnih stanica u koštanoj srži, pođaneovisno o mehanizmima koji normalno reguliraju hematopoezu (1).

Osnovna genetska abnormalnost u policitemiji je stečena somatska „pokretačka“ mutacija („*driver*“ *mutation, engl*) mutacija *JAK-2 V617F*, koja se pojavljuje u 95% bolesnika sa PV. Ta mutacija nije specifična za PV, pojavljuje se i u ostalim MPN, te u <5% drugih hematoloških neoplazmi. U 3% slučajeva prisutne su mutacije na *JAK-2* egzonu 12 (4,5,6,7,8).

### Epidemiologija i klinička slika

Godišnja incidencija PV u Europi i Sjevernoj Americi iznosi 0.01-2.8 slučajeva na 100,000 stanovnika. Incidencija se povećava sa dobi, te je medijan dobi pri dijagnozi 60 godina, a rijetko se javlja u pacijenata mlađih od 20 godina. Nešto češće oboljevaju muškarci.

Većina simptoma policitemije povezana je sa hipertenzijom ili abnormalnostima krvnih žila, uzrokovanih povećanom viskoznošću krvi (uslijed povećane produkcije eritrocita). U 20% slučajeva, postoji anamnestički podatak o prethodnoj venskoj ili arterijskoj trombozi (kao što je DVT, ishemija miokarda ili cerebrovaskularni inzult), što može biti prvi znak policitemije.

U slučaju atipične lokalizacije tromboembolije u splahničkome venskome sustavu (tromboza mezenteričke, portalne, ili v. lienalis, ili Budd-Chiari sindroma), treba posumnjati na podležeći uzrok, napose na postojanje do tad neprepoznate MPN (17).

Često prisutni simptomi su manjak energije, gubitak koncentracije, glavobolje, vrtoglavice, parestezije i poremećaji vida, ponekad se javlja i pruritus (tipičan je svrbež kože nakon tople kupke). Bolesnici su obično pletorični, a u trenutku dijagnoze slezena može biti palpabilna.

U današnje vrijeme PV se ponekad otkriva slučajnim nalazom povišenog hemoglobina u rutinski rađenoj krvnoj slici. Zbog trilinejske proliferacije, uz povišen Hb može se često naći i povećan broj trombocita te leukocita (18).

## Dijagnoza

Prema SZO, za dijagnozu PV potrebno je zadovoljiti tri glavna ili prva dva glavna i sporedni dijagnostički kriterij (1).

Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozi PV su navedeni u Tablici 1.

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za PV prema SZO

<b>Glavni kriteriji :</b>	1. Hb (M > 16.5 g/dL; Ž > 16.0 g/dL ) ili Htc (M > 49%; Ž > 48%) ili povećana masa eritrocita (>25% predviđene vrijednosti)
	2. biopsija koštane srži – Hipercelularnost KS uz panmijelozu i značajnu eritrocitnu, granulocitnu i megakariocitnu proliferaciju
	3. mutacija <i>JAK-2 V617F</i> ili <i>JAK</i> egzon 12
<b>Sporedni kriteriji :</b>	1. serumski eritropoetin snižen ispod referentne vrijednosti

Kao što je navedeno, dijagnoza se danas temelji na nalazu visokog hematokrita ili hemoglobina, biopsiji koštane srži te dokazu *JAK-2 V617F* mutacije, ili neke mutacije u egzonu 12. *JAK-2 V617F* mutacija se nalazi u 95% posto slučajeva (19,20).

Ukoliko nema dokaza o klonalnoj bolesti, potrebno je isključiti sve uzroke sekundarne eritrocitoze.

## **Tijek bolesti, komplikacije, liječenje**

Policitemija vera je relativno indolentna mijeloproliferativna neoplazma, no PV pacijenti imaju kraći očekivani životni vijek od opće populacije.

Bolest je karakterizirana proliferacijom svih triju hematopoetskih loza, uz eritrocitozu prisutne su i leukocitoza i trombocitoza. Tijekom bolesti česti su tromboembolijski incidenti, a u kasnijoj, post-policitemijskoj fazi može doći do razvoja sekundarne fibroze u koštanoj srži sa posljedičnom pojavom ekstramedularne hematopoeze te anemijom.

Medijan preživljenja nakon dijagnoze u liječenih pacijenata premašuje 10 godina. Neki pacijenti žive duže od 20 godina, međutim, cerebrovaskularni ili koronarni incidenti dogode se u oko 60% pacijenata. U oko 5-10% bolesnika može doći do transformacije u akutnu leukemiju (21).

Osnovni cilj liječenja je spriječiti tromboembolijske komplikacije. Ovisno o simptomima bolesti, u terapiji se koriste venepunkcije koje olakšavaju simptome hiperviskoznosti. Cilj je održavanje hematokrita ispod 45%. Rizik tromboze može se reducirati primjenom malih doza aspirina. Citoreduktivna terapija ima za cilj smanjiti proliferaciju hematopetskih stanica te time spriječiti razvoj komplikacija. Indikacije za uključivanje citoreduktivne terapije su, kao i kod drugih MPN, su visoki procijenjeni rizik za tromboembolijske incidente, visoke citoze (vrijednosti Hb, leukocita i/ili trombocita) te izraženi simptomi bolesti (22, 23).

### **1.1.3. Esencijalna trombocitemija**

Esencijalna trombocitemija je mijeloproliferativna neoplazma prvenstveno karakterizirana poremećajem megakariocitne loze. Nekontrolirana proliferacija megakariocita u koštanoj srži dovodi do trajnog povišenja broja trombocita u perifernoj krvi ( $\geq 450 \times 10^9/L$ ). (1)

U većine bolesnika s ET molekularna podloga je mutacija *JAK-2 V617F* koja je prisutna u 50-60% slučajeva. U oko 30% bolesnika možemo naći *CALR* mutaciju na egzonu 9 ili *MPL*

mutaciju. Sve ove mutacije su međusobno isključive i nisu specifične za ET, ali isključuju reaktivne trombocitoze iz diferencijalne dijagnoze. Preostalih 10% bolesnika s ET je trostruko negativno te je, ako je moguće, indicirano pretraživanje na druge mutacije radi potvrde klonalne prirode bolesti. (1)

### **Epidemiologija i klinička slika**

Procijenjena incidencija ET je 0,6-2,5/100000 godišnje, javlja se u oba spola podjednako s najvećom učestalošću između 50-60 godine života. Primijećena je i nešto veća učestalost bolesti u žena u dobi od tridesetak godina (1)

U današnje doba sistematskih pregleda, mogu se otkriti asimptomatski bolesnici s izoliranim povećanjem broja trombocita u perifernoj krvi, međutim, još uvijek se bolesnici učestalo prezentiraju nekom komplikacijom kao što je vaskularna okluzija ili krvarenjem. Mikrovaskularna okluzija može dovesti do TIA (tranzitornih ishemijskih ataka), periferne ishemije s parestezijama i gangrenama. Također može doći do tromboze velikih arterija ili vena, te tromboza splahničkih vena ili Budd-Chiari sindroma. Krvarenje je najčešće u gastrointestinalnom traktu ili gornjim dišnim putevima. U trenutku dijagnoze, palpabilna splenomegalija je prisutna u oko 15-20% bolesnika s ET.

### **Dijagnoza**

Prema SZO, za dijagnozu ET potrebno je zadovoljiti sva četiri glavna dijagnostička kriterija ili tri glavna i sporedni dijagnostički kriterij.

Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozi PV su navedeni u Tablici 2.

Tablica 2. Dijagnostički kriteriji za ET prema SZO

<b>Glavni kriteriji:</b>	1.Trombociti $\geq 450 \times 10^9 / L$
	2.Biopsija KS: proliferacija morfološki velikih i zrelih megakariocita, sa hiperlobuliranim jezgrama i obilnom citoplazmom; bez značajnije granulocitne i eritrocitne proliferacije ili skretanja ulijevo
	3.Neispunjeni WHO kriteriji za <i>BCR-ABL1</i> - pozitivne KML, PV, PMF ili druge mijeloidne neoplazme
	4.prisutvo <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ili <i>MPL</i> mutacija
<b>Sporedni kriteriji:</b>	1.Prisutstvo klonalnog biljega ili nedostatak dokaza za reaktivnu trombozu

Kao što je vidljivo iz tablice, za dijagnozu je potrebna značajna trombocitoza u perifernoj krvi, dok je celularnost koštane srži najčešće normalna, uz morfološke promjene megakariocita ( 24, 25, 26). Prisutnost *JAK-2*, *CALR* ili *MPL* mutacija podržava dijagnozu, dok prisustvo *BCR-ABL1* fuzijskog gena isključuje dijagnozu ET (27).

### Tijek bolesti, komplikacije i liječenje

ET je indolentni poremećaj karakteriziran asimptomatskim razdobljima, te životno ugrožavajućim tromboembolijskim ili hemoragijskim incidentima. Učestalost razvoja fibroze koštane srži je daleko manja nego u PV i PMF, dok je učestalost transformacije u akutnu leukemiju također značajno manja, te iznosi oko 1-5% (21).Pojava ekstramedularne hematopoeze je rijetka. Usprkos sklonosti tromboembolijskim incidentima, bolesnici imaju gotovo normalni očekivani životni vijek. Liječenje je usmjereno na sprječavanje komplikacija tj. tromboembolijskih incidenata. Bolesnici niskog rizika za razvoj okluzivnih vaskularnih

dogadaja često ne zahtjevaju terapiju ili se koriste niske doze aspirina. Simptomatski bolesnici, bolesnici s višim brojem trombocita ( $>1500 \times 10^9/L$ ) i prisutnim drugim faktorima rizika kao što su dijabetes, hipertenzija zahtjevaju uvođenje citoreduktivne terapije (hidroksikarbamid, anagrelid) (23).

#### **1.1.4. Primarna mijelofibroza**

Primarna mijelofibroza je klonalna kronična mijeloproliferativna neoplazma karakterizirana predominantno proliferacijom abnormalnih megakariocita i granulocita u koštanoj srži, što je u potpuno razvijenoj bolesti popraćeno reaktivnom fibrozom u koštanoj srži i razvojem ekstramedularne hematopoeze. Razlikujemo dvije faze bolesti: prefibrotsku ranu fazu i fibroznu fazu sa značajnom retikulinskom i kolagenom fibrozom i često osteosklerozom (1).

PMF je u većini slučajeva karakterizirana mutacijom *JAK2 V617F* koja se nalazi u 50-60% bolesnika. Međusobno isključive mutacije *CALR* se nađu u oko u 24% bolesnika, a *MPL* mutacije u 8% bolesnika. Oko 10 % bolesnika su trostruko negativni, tj. nemaju niti jednu od navedenih mutacija. Kao što je već navedeno, ove mutacije nisu specifične za PMF, ali ih razlikuju od reaktivnih stanja. Bolesnici s *CALR* mutacijom imaju povoljniju prognozu od trostruko negativnih bolesnika (9,10,11).

#### **Epidemiologija i klinička slika**

Procijenjena godišnja incidencija jasne mijelofibroze je 0,5-1,5/100,000 osoba. Oboljevaju podjednako osobe oba spola, a bolest se najčešće javlja u šestom i sedmom desetljeću života.

Okolo trećine bolesnika nema razvijene simptome u trenutku dijagnoze, te su otkriveni palpacijom slezene pri fizikalnom pregledu ili slučajnim nalazom anemije, leukocitoze i/ili trombocitoze u krvnoj slici. Rjeđe se dijagnosticiraju zbog neobjašnjene leukoeritroblastoze ili povišene razine LDH.

Većina bolesnika ipak ima izražene sustavne simptome (tzv. B-simptome) poput umora, zaduhe, gubitka na tjelesnoj težini, noćnog znojenja, blago povišene temperature te konačno kaheksiju. Slezena može biti izrazito povećana zbog ekstramedularne hematopoeze. Uz to može biti prisutna i hepatomegalija. Ovi simptomi su odraz biološke aktivnosti bolesti, te utječu na kvalitetu života i povezani su sa prognozom bolesti (28).

Giht i bubrežni kamenci također su mogući simptomi zbog prisutstva hiperuricemije.

Osim u slezeni i jetri, ekstramedularna hematopoeza se može javiti i u drugim organima i tkivima.

### **Dijagnoza**

Prema SZO, za dijagnozu PMF potrebno je zadovoljiti sva tri glavna kriterija i barem jedan sporedni dijagnostički kriterij, dokazan u dva uzastopna mjerenja.

Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozu PMF su navedeni u Tablici 3.



Tablica 3. Dijagnostički kriteriji za PMF prema SZO , fibrozna faza

<b>Glavni kriteriji:</b>	1.Proliferacija atipičnih megakariocita, sa značajnom retikulinskom/kolagenom fibrozom gradusa 2ili 3
	2. Nisu zadovoljeni kriteriji SZO za PV, <i>BCR-ABL1+</i> KML, MDS, ili druge mijeloidne neoplazme
	3. Prisutnost <i>JAK-2 V617F</i> , <i>CALR</i> ili <i>MPL</i> ili drugog klonalnog markera, ili odsutvo reaktivne fibroze
<b>Sporedni kriteriji:</b>	1.anemija 2.leukocitoza $\geq 11 \times 10^9 /L$ 3. palpabilna splenomegalija 4. porast LDH 5. leukoeritroblastoza

U prefibroznoj fazi se ne nalazi značajna fibroza u koštanoj srži, nalazi se hipercelularna koštana srž uz umnoženu granulopoezu i smanjenu eritropoezu, te nema leukoeritroblastoze.

Kao što se vidi iz glavnih dijagnostičkih kriterija, dijagnoza se postavlja na temelju biopsije koštane srži. Prefibrotska i fibrotska faza PMF imaju različito prognostičko značenje te ih je potrebno razlikovati od ET ili postpolicitemijske PV (29,30, 31).

U krvnoj slici se u fibroznoj fazi nalazi leukoeritroblastoza (nalaz nezrelih oblika granulopoeze i eritropoeze u perifernoj krvi) uz eritrocite specifičnog izgleda (poput suza, dakriociti *lat.*) te ponekad velike trombocite. Anemija je obično izražena, dok broj leukocita i trombocita može varirati od sniženih, preko urednih do povišenih vrijednosti.

Ovi nalazi nisu specifični za PMF, mogu se naći i u drugim stanjima, zbog čega je biopsija koštane srži neophodna dijagnostička metoda. Prisutstvo mutacija podržava dijagnozu (30, 31).

### **Tijek bolesti, komplikacije i liječenje**

Prognoza PMF ovisi o fazi bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Za procjenu rizika se često koristi „Dynamic International Prognostic Scoring System Plus“ (DIPPS Plus) koji uključuje 8 prediktora slabijeg preživljenja: dob > 65, hemoglobin <10 g/dL, leukociti > 25 x 10<sup>9</sup> /L, cirkulirajući blasti ≥ 1%, sustavni simptomi, ovisnost o transfuzijama eritrocita, trombociti < 100 x 10<sup>9</sup>/L i nepovoljni kariotip (32,33).

Medijan preživljenja je 4 godine od dijagnoze, ali je raspon od godine dana do preko 20 godina.

Terapija je prvenstveno usmjerena kontroli simptoma i poboljšanju kvalitete života, često je simptomatska, npr. transfuzije eritrocita za kontrolu anemije.

Citoreduktivne terapije te terapija *JAK-2* inhibitorima koriste se za kontrolu veličine slezene i smanjenje sistemskih simptoma (34,35,36,37).

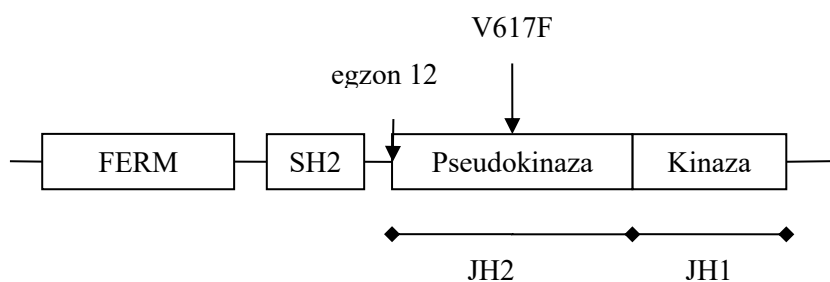
## **1.2. Janus kinaza 2 (JAK2)**

Središnje mjesto u patogenezi triju klasičnih Ph-negativnih mijeloproliferacija ima stečena somatska mutacija gena *Janus kinaza 2 (JAK-2)*. Gen je smješten na egzonu 14 na kratkom kraku kromosoma 9. Mutacija je nađena u preko 50% svih Ph-negativnih kroničnih mijeloproliferativnih bolesti, ali nije ograničena na pojedini entitet i ne može međusobno razlikovati tri glavna fenotipska subtipa MPN (4,5,6,7,8).

### **1.2.1. Biologija mutacije *V617F***

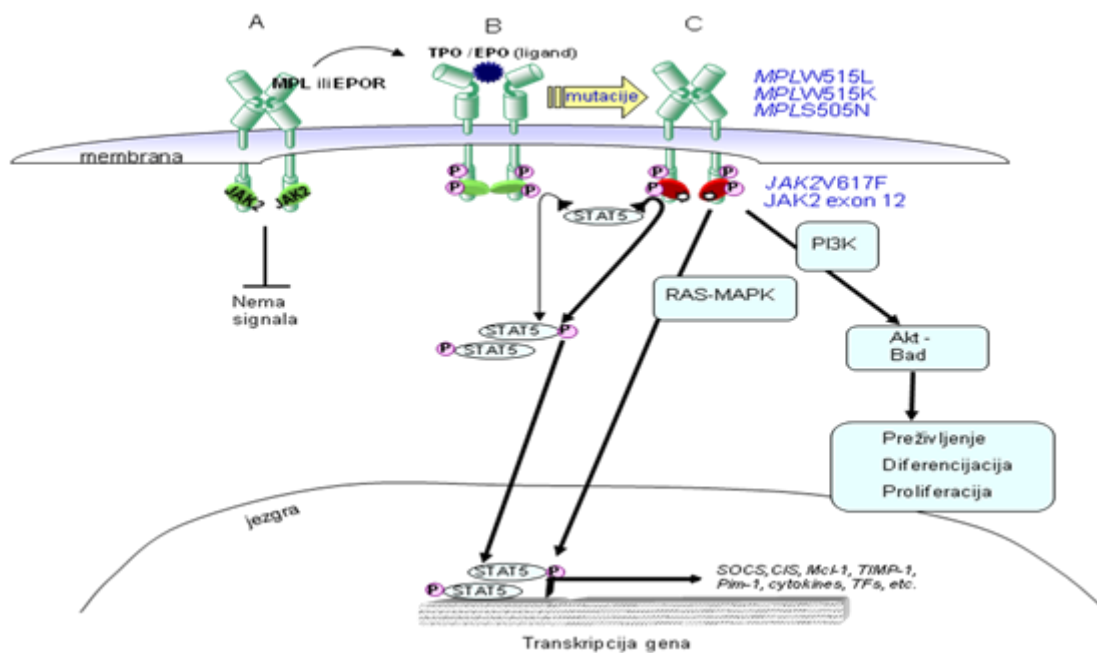
Gen *JAK-2* kodira enzim Janus kinazu-2 (JAK-2). JAK-2 je tirozin kinaza nerekceptorskog tipa, povezana s intracelularnim domenama citokinskih receptora (tip I citokinski receptori), koja se aktivira djelovanjem nekoliko čimbenika rasta i citokina kao što su EPO, TPO, GM-CSF, G-CSF, IL-3, IGF-1. Ligand koji se veže na neki od površinskih receptora dovodi do povezivanja s JAK proteinima, koji se aktiviraju fosforilacijom. Aktivirani JAK fosforilira i aktivira STAT proteine koji se translociraju u jezgru gdje se vežu za DNA i modificiraju transkripciju više različitih gena.

Zamjena guanina za timin na kodonu 1849 dovodi do zamjene fenilalanina s valinom na mjestu 617 (*V617F*) u autoinhibitornoj JH2 domeni *JAK-2* (slika 1). Ta zamjena dovodi do konstitutivne i o citokinima neovisne aktivnosti JAK kinaze te aktivacije JAK- STAT signalnog puta (Slika 2).



**Slika 1.** Shematski prikaz strukture JAK-2 proteina, strelice označuju mjesto najčešćih mutacija

U normalnim uvjetima, JAK-2 je nekovalentno vezan za membranski receptor i zauzima inaktivnu konformaciju. Ligand koji se veže na neki od površinskih receptora dovodi do povezivanja s JAK proteinima, protein se strukturno mijenja, što dovodi do slabljenja inhibitorne funkcije JH2 domene i aktivacije kinazne aktivnosti JAK-2 tirozin-kinaze. Aktivirani JAK sukcesivno fosforilira tirozinske ostatke na vlastitoj molekuli i drugim proteinima, te aktivira STAT proteine koji se translociraju u jezgru gdje se vežu za DNA i modificiraju transkripciju više različitih gena.



**Slika 2.** Shematski prikaz konstitutivne aktivacije JAK-STAT signalnog puta

Budući da se zamijenjena aminokiselina nalazi na mjestu najvjerojatnijeg kontakta između pseudokinazne i katalitičke domene, smatra se da zbog mutacije *V617F* dolazi do popuštanja autoregulacije proteina JAK-2 i njegove konstitutivne aktivacije (38,39,40,41).

Osim ove točkaste mutacije, u bolesnika s PV su opisane još i četiri aktivacijske mutacije u egzonu 12 *JAK2*, koje se za razliku od *V617F* mutacije, ne nalaze u ET i PMF (8).

### 1.2.2. Dijagnostička važnost mutacije JAK2 V617

Testiranje na mutaciju *JAK-2 V617* pomoću alel-specifične lančane reakcije polimerazom (PCR) danas je dio rutinske dijagnostike MPN-a koja se provodi u ranoj fazi obrade suspektanog bolesnika. Selektivni izražaj mutiranog alela dijagnostički je vrlo značajan jer s 99%-tnom sigurnošću upućuje na prisutnost maligne klonalne hematopoeze, te isključuje reaktivne razloge moguće proliferacije krvnih stanica. Međutim, negativan nalaz ne isključuje prisutnost bolesti,

a da bi se mogao identificirati pojedini subtip unutar spektra MPN-a, detekcija mutacije treba biti dopunjena drugim kliničkim, histološkim i laboratorijskim nalazima (14, 16, 18, 22).

Osim same mutacije pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qPCR), moguće je odrediti opterećenje mutiranim *JAK-2 V617F* alelom (allele burden, AB).

Opterećenje alelom predstavlja udio mutiranog alela u uzorku stanica.–Više razine opterećenja mutiranim alelom povezuju se s težim kliničkim fenotipom u PV-u (pruritus, splenomegalija, leukocitoza), povišenim rizikom trombotičkih incidenata u ET-u, i preživljenjem u PMF-u (42,43,33).

### 1.3. Kronična bubrežna bolest

Kronična renalna insuficijencija ili kronična bubrežna bolest (KBB), definirana je prema Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) kriterijima kao abnormalnost bubrežne strukture ili funkcije, u trajanju barem 3 mjeseca, sa posljedicama na cjelokupno zdravlje. Da bi se postavila dijagnoza kronične bubrežne bolesti mora biti prisutno bubrežno oštećenje (prema nalazu slikovnih pretraga ili biopsije, abnormalnosti sedimenta urina, albuminurija) ili procijenjena glomerularna filtracija (eGFR) manja od 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (44).

#### 1.3.1. Glomerularna filtracija

Stopa glomerularne filtracije (GFR), mjera je ekskretorne funkcije bubrega. Proporcionalna je veličini tijela, i referentna vrijednost se najčešće izražava nakon korekcije za površinu tijela kao 120 ± 25 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Glomerularna filtracija može se direktno mjeriti injiciranjem i mjerenjem klirensa tvari poput inulina ili radiooznačene EDTA, koje se u potpunosti filtriraju u glomerulu i nisu sekretirane ili resorbirane od strane renalnih tubula. Rutinski se ne primjenjuju direktne metode mjerenja glomerularne filtracije, već se procjenjuju formulama na temelju serumskih razina endogeno proizvednog kreatinina, koji se normalno proizvodi u konstantnoj mjeri u mišićima i gotovo u potpunosti filtrira u glomerulima, te se ne resorbira (u većoj mjeri) (45).

Procijenjena glomerularna filtracija utvrđena je pomoću Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formule koja u svome općenitom obliku glasi:

$$\text{GFR} = 141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{dob}} \times 1.018 [\text{žena}] \times 1.159 [\text{crna rasa}]$$

(Scr označava serumski kreatinin serum,  $\kappa$  is 0.7 za žene i 0.9 za muškarce,  $\alpha$  is -0.329 za žene i -0.411 za muškarce, min je manju broj: Scr/ $\kappa$  ili 1, a max je veći broj: Scr/ $\kappa$  ili 1).

CKD-EPI formula dobro procjenjuje glomerularnu filtraciju u pacijenata sa relativno dobro očuvanom funkcijom bubrega, no ima svoja ograničenja, budući da se radi o procijenjenoj, a ne direktno mjerenoj vrijednosti.

Mjerenje je bazirano je na serumskim vrijednostima kreatinina, stoga može precijeniti GFR u pacijenata sa malom mišićnom masom (npr. kahektični bolesnici, amputirani) i podcijeniti GFR u bolesnika koji uzimaju suplemente kreatina (budući da je kreatinin metabolit kreatina) ili trimetoprim (inhibira sekreciju kreatinina). eGFR nije pogodan za procjenu akutne ozljede bubrega, te procjenu bubrežne funkcije u mlađih od 18 ili trudnica (46,47,48,49).

### **1.3.2. Epidemiologija i stadiji bubrežne bolesti**

KBB je visoko prevalentna u općoj populaciji (10-13%), te je ireverzibilna, progresivna bolest koja u konačnici može dovesti do potpunog zatajenja bubrega i potrebe za dijalizom ili transplantacijom. Povezana je i sa povećanim kardiovaskularnim rizikom.

Zahvaćena je većinom starija populacija, te čak 25% populacije >75 godina ima glomerularnu filtraciju  $<60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , no u malog broja osoba bolest progredira do završne faze (zatajenja bubrega).

Različiti su mogući uzroci KBB, uključujući dijabetes mellitus tipa 2 (20-40%), hipertenziju (5-20%), kronični glomerulonefritis (10-20%), kronični pijelonefritis, kroničnu uporabu anti-inflamatornih lijekova, autoimune bolesti (5-10%), policističnu bolest bubrega, Alportovu bolest, kongenitalne malformacije (5%) i prolongiranu akutnu bolest bubrega.

Postoji podjela na 3 stadija prema albuminuriji (A1, A2, A3) i 5 stadija prema eGFR (G1, G2, G3, G4, G5). Stadij G3 predstavlja sniženu glomerularnu filtraciju (i kroničnu bubrežnu bolest, ukoliko traje duže od 3 mjeseca), dok G5 (vrijednosti eGFR  $<15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ) predstavlja zatajenje bubrega, tj. označava završni stadij bolesti, kada se bolesnika priprema za nadomjesnu terapiju primjenom dijalize ili transplantacije.



Pacijenti su većinom asimptomatski, te pokazuju simptome komplikacija tipičnih za renalnu disfunkciju samo u uznapredovalim fazama bolesti, te tada dolazi do slabljenja ekskretorne, endokrine i metaboličke funkcije bubrega.

### **1.3.3. Komplikacije vezane uz KBB**

Komplikacije uključuju povećanu toksičnost lijekova, metaboličke i endokrine komplikacije, povećan kardiovaskularni rizik. Može doći do komplikacija u bilo kojoj fazi bubrežne bolesti. Intervencije i terapija također sa sobom nose određen rizik od komplikacija.

Anemija je česta komplikacija KBB, najčešće uzrokovana smanjenim lučenjem eritropoetina, ali i defcijacijom željeza, folne kiseline i vitamina B12, te u bolesnika na dijalizi, zbog kraćeg životnog vijeka eritrocita. Sukladno tome, u bolesnika s KBB trebalo bi rutinski provjeravati razine hemoglobina, i korigirati anemiju ukoliko ona postoji.

Kardiovaskularne bolesti su glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u populaciji sa KBB. Prema podacima iz literature, svi pacijenti s KBB smatraju se visoko rizičnima za KVB, te se pristupa strategijama smanjenja kardiovaskularnih čimbenika rizika, kao što je prestanak pušenja, kontrola hipertenzije i dijabetesa, kontrola dislipidemije, poticanje fizičke aktivnosti, terapija anemije i smanjenje proteinurije. Hipertenzija je jedan od potencijalnih uzroka KBB, no sama bolest nosi rizik povećanog zadržavanja volumena i porasta tlaka, te se u liječenju koriste diuretici Henleove petlje.

Također zbog poremećene funkcije izlučivanja u bubregu, može doći do elektrolitnog disbalansa, što se može manifestirati metaboličkom acidozom, hiperkalemijom (potreban oprez pri korištenju ACEi) te renalnom osteodistrofijom (zbog poremećaja metabolizma fosfata i kalcija).

Neki nepromjenjivi čimbenici koji utječu na napredovanje bolesti jesu dob, spol, rasa, te genetski čimbenici, na koje je nemoguće utjecati. No čimbenike poput hipertenzije, i

metaboličkih faktora možemo regulirati odgovarajućom terapijom i potencijalno znatno usporiti pogoršanje bubrežne funkcije.

Liječenje KBB može biti konzervativno ili se koristi nadomjesna terapija (hemodijaliza, peritonealna dijaliza i transplantacija bubrega).

Ciljevi konzervativne terapije za KBB je očuvanje preostale renalne funkcije, te liječenje komplikacija (anemija, poremećaji mineralizacije kostiju, elektrolitni poremećaji, kardiovaskularne bolesti),

Glavne strategije usporavanja progresije KBB su uporaba ACE inhibitora ili ARB u pacijenata sa proteinurijom (i to  $>500$  mg/24 h), postizanje ciljnog tlaka ispod 130/80 mmHg, razina HbA1c  $< 7\%$  (za dijabetičare), restrikcija proteina u prehrani korekcija metaboličke acidoze i poticanje na prestanak pušenja.

#### **1.3.4. Povezanost KBB i MPN**

U literaturi su opisani pojedini slučajevi, kao i manje serije slučajeva, koji govore o mogućoj povezanosti mijeloproliferativnih neoplazmi i kronične bubrežne bolesti (44, 50,51,52,53). U novije se vrijeme pojavljuje i termin MPN-povezane glomerulopatije. Dokazi za MPN-povezanu glomerulopatiju potječu uglavnom iz malih biopsijskih uzorka koji se uzimaju u strogo određenim indikacijama ili iz obdukcijskih uzoraka, što utječe na učestalost pojavnosti histoloških bubrežnih promjena (54) Dosad je opisano da bubrežna disfunkcija može biti povezana sa težinom bolesti i tromboembolijskim incidentima (50). Opisane patohistološke promjene bubrega odgovaraju kroničnim promjenama, te su jače izražene nego u osoba koje ne boluju od MPN, a odgovarajuće su dobi i spola. Patohistološke promjene zahvaćaju glomerule, a opisana su zadebljanja glomerulane membrane, segmentalna glomeruloskleroza, akutno oštećenje endotela, trombotička mikroangiopatija, mezangialna skleroza i drugo (55,56,57).

## **2. Hipoteza**

Bolesnici s JAK2 V617F mutiranim kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama imaju jače izraženo propadanje bubrežne funkcije ukoliko imaju veće opterećenje mutiranim JAK2 alelom.

## **3. Ciljevi**

### **3.1. Opći cilj**

Analizirati povezanost opterećenja mutiranim *JAK2 V617F* alelom s parametrima bubrežne funkcije u bolesnika s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama.

### **3.2. Specifični ciljevi**

- Analizirati povezanost opterećenja mutiranim *JAK2 V617F* alelom s parametrima bubrežne funkcije u bolesnika s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama
- Analizirati povezanost opterećenja mutiranim *JAK2 V617F* alelom s pristunošću kronične bubrežne bolesti.
- Analizirati povezanost opterećenja mutiranim *JAK2 V617F* alelom s dinamikom bubrežne funkcije tijekom vremena

## 4. Ispitanici i metode

### 4.1. Ispitanici i metode

Proveli smo retrospektivnu analizu podataka 230 bolesnika s MPN koji su testirani i bili pozitivni na *JAK2 V617F* mutaciju i kojima je izmjereno opterećenje mutiranim *JAK2 V617F* alelom u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu u periodu od 2006. do 2022. godine.

Opterećenje mutiranim *JAK2 V617F* alelom određeno je pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (quantitative real time polymerase chain reaction – qPCR) na uređaju 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) korištenjem alel-specifičnog seta početnica i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe prema Larsenu i sur.(58).

Na temelju vrijednosti standardnih krivulja specifičnih za mutirani i divlji tip *JAK2* alela, CT vrijednosti dobivene kvantifikacijom svakog uzorka prevedene su u broj kopija mutiranog i divljeg tipa *JAK2* alela u uzorku. Potom je opterećenje mutiranim alelom izračunato prema formuli: broj kopija *JAK2 V617F* / (broj kopija *JAK2 V617F* + broj kopija *JAK*, divlji tip) x 100 i izraženo je kao postotak.

Demografski, laboratorijski i klinički podaci uključujući podvrstu MPN dobiveni su iz elektroničke medicinske dokumentacije. Kronična bubrežna bolest definirana je prema Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) kriterijima kao procijenjena glomerularna filtracija <60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> u trajanju barem 3 mjeseca (44). Procijenjena glomerularna filtracija utvrđena je pomoću Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formule (45).

Opterećenje mutiranim *JAK2 V617F* alelom mjereno je na početku studije, a serumski kreatinin mjereno je na početku te nakon 6 i 12 mjeseci. Dinamika bubrežne funkcije tijekom vremena evaluirana je kao omjer vrijednosti kreatinina u pojedinim vremenskim točkama u odnosu na početak, te tako dobiveni brojevi predstavljaju postotak porasta odnosno pada bubrežne

funkcije tijekom vremena u odnosu na početak. Bolesnici s opterećenjem mutiranim *JAK2 V617F* alelom iznad medijana mjerenja smatrani su da imaju visoko, a ispod ili jednako medijanu mjerenja da imaju nisko opterećenje mutiranim alelom.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava pod brojem: 2023/2301-07.

#### **4.2. Statističke metode**

Normalnost distribucije testirana je Shapiro Wilkovim testom. Zbog ne-normalne distribucije numeričke varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon (IKR) i uspoređene su između bolesnika s visokim i niskim opterećenjem mutiranim alelom koristeći Mann Whitney U test. Kategorijske varijable prikazane su kao omjeri i postoci i uspoređeni su između bolesnika s visokim i niskim opterećenjem mutiranim alelom koristeći hi kvadrat test. P vrijednosti  $<0.05$  smatrane su statistički značajnima. Sve analize rađene su u statističkom programu MedCalc verzija 20.114 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

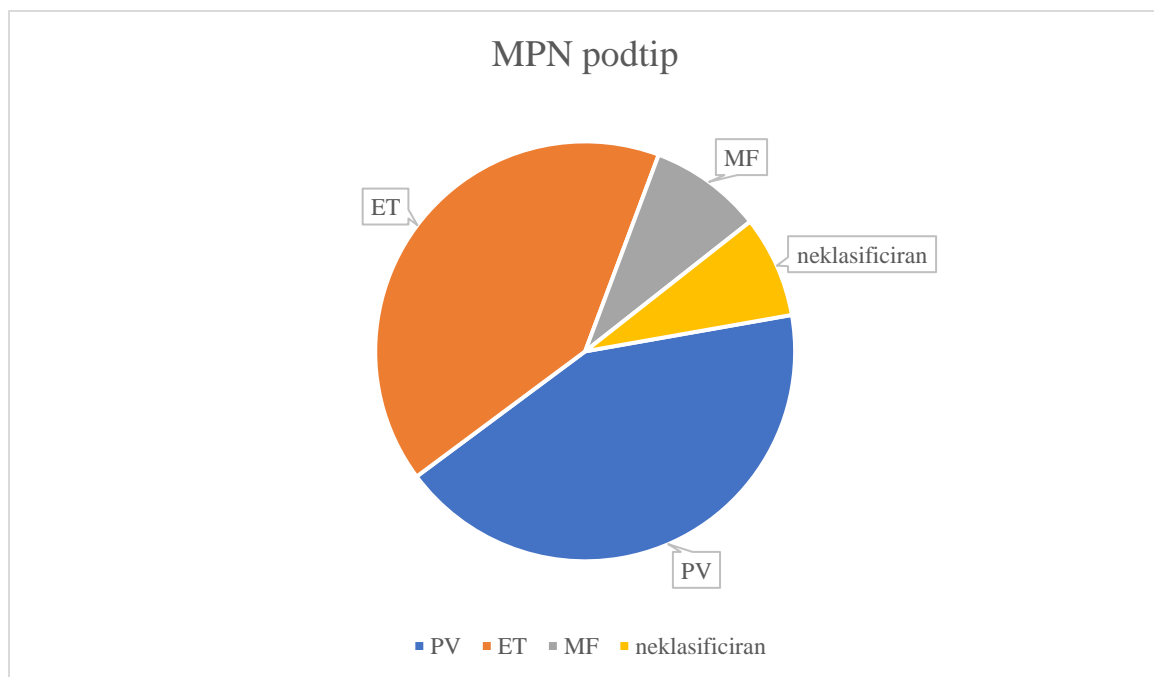
## 5. Rezultati

### 5.1. Značajke ispitanika

Analizirano je ukupno 230 MPN bolesnika. Prema podtipovima MPN bilo je 98 (40.9%) PV, 94 (40.9%) ET, 20 (8.7%) MF i 18 (7.8%) neklasificiranih MPN bolesnika. Distribucija bolesnika prema MPN podtipu prikazan je na Slici 3.

Medijan dobi bio je 67 godina, IKR (57-76). Bilo je 116 (50.4%) žena i 114 (49.6%) muškaraca.

Kliničke karakteristike prikazane su u Tablici 4.



Slika 3.: Distribucija bolesnika prema MPN podtipu

Tablica 4. Značajke ispitanika

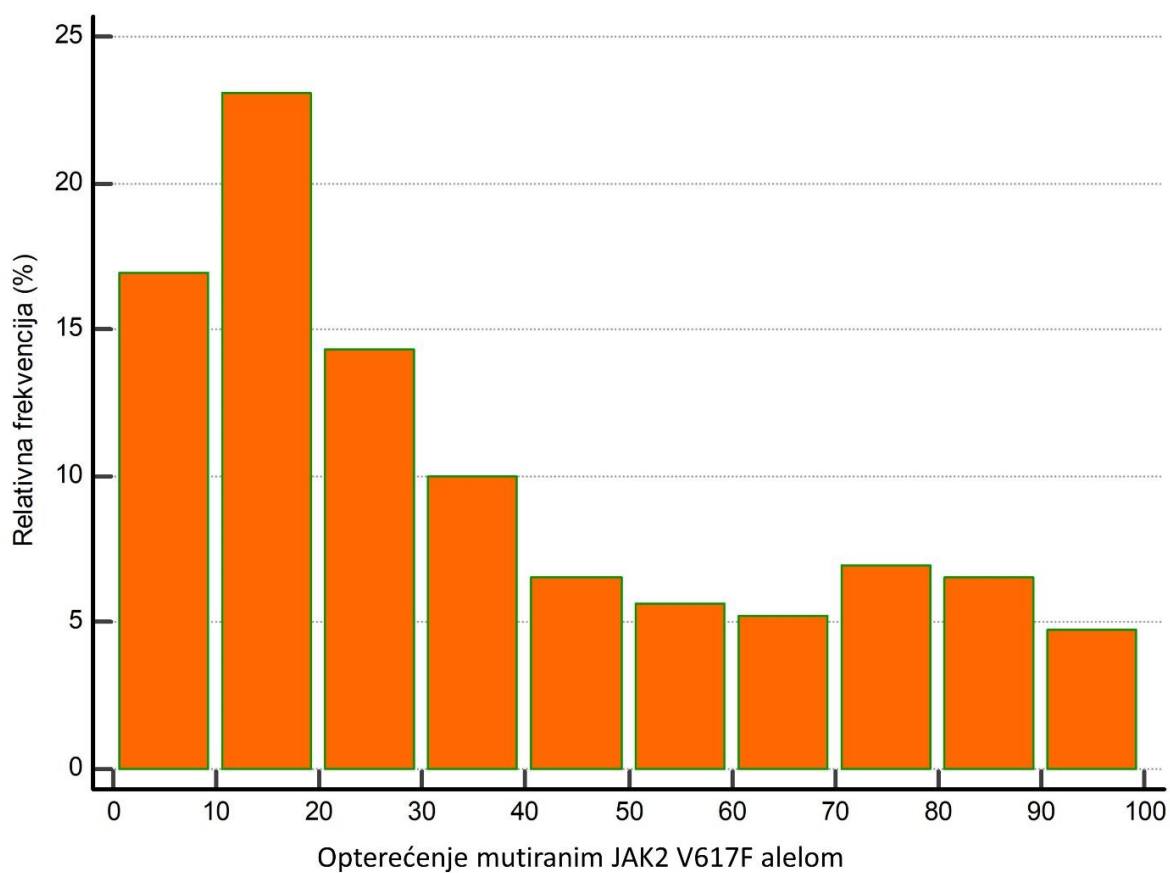
Dob (godine)	67 IKR (57 - 76)
Spol	
Ženski	116 (50.4%)
Muški	114 (49.6%)
Podtip MPN	
Policitemija vera	98 (40.9%)
Esencijalna trombocitemija	94 (40.9%)
Mijelofibroza	20 (8.7%)
Drugo	18 (7.8%)
Kronična bubrežna bolest	46 (24.9%)
Hemoglobin (g/L)	139 IKR (120 - 155.5)
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	10.2 IKR (7.68 - 14.88)
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	512 IKR (340 - 663.25)



## 5.2. Opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom i povezanost s kroničnom bubrežnom insuficijencijom

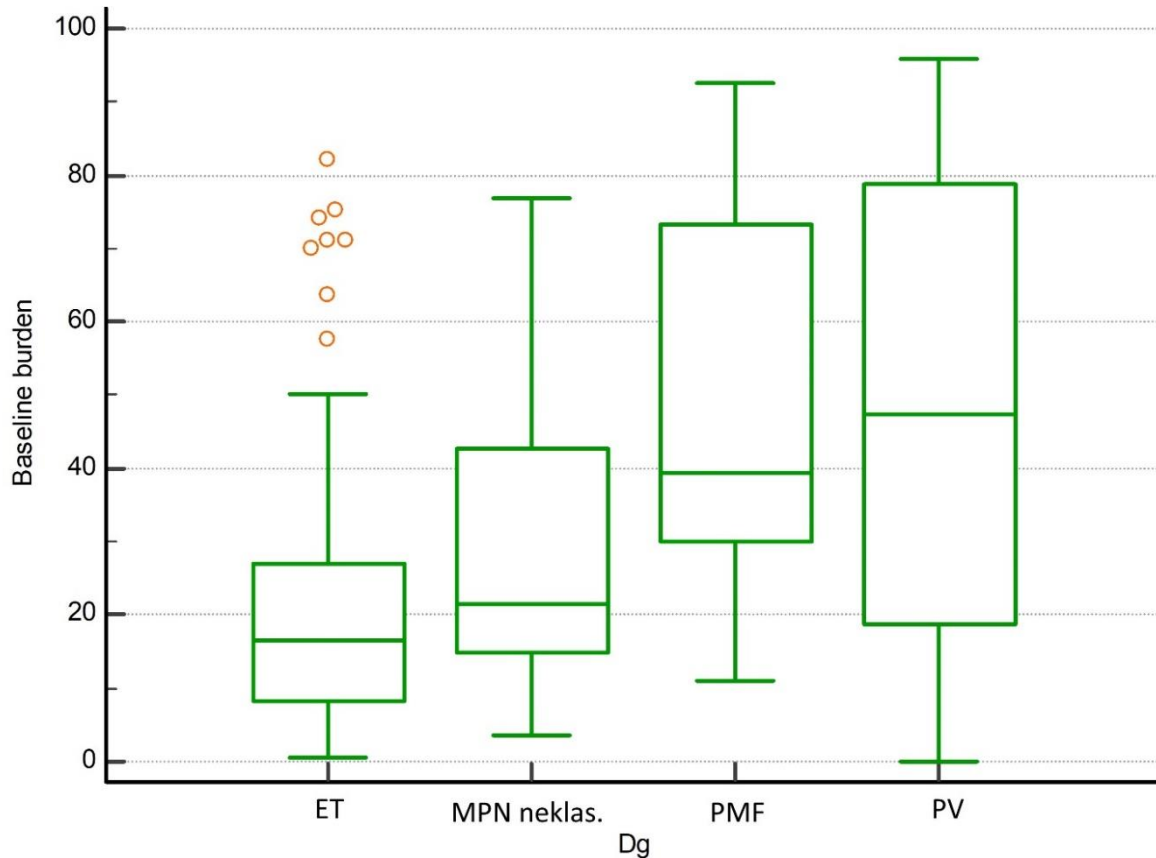
Medijan opterećenja mutiranim JAK2 V617F alelom bio je 26.3%, IKR (13.9-57.05).

Distribucija bolesnika prema opterećenju mutiranim alelom prikazana je na Slici 4.



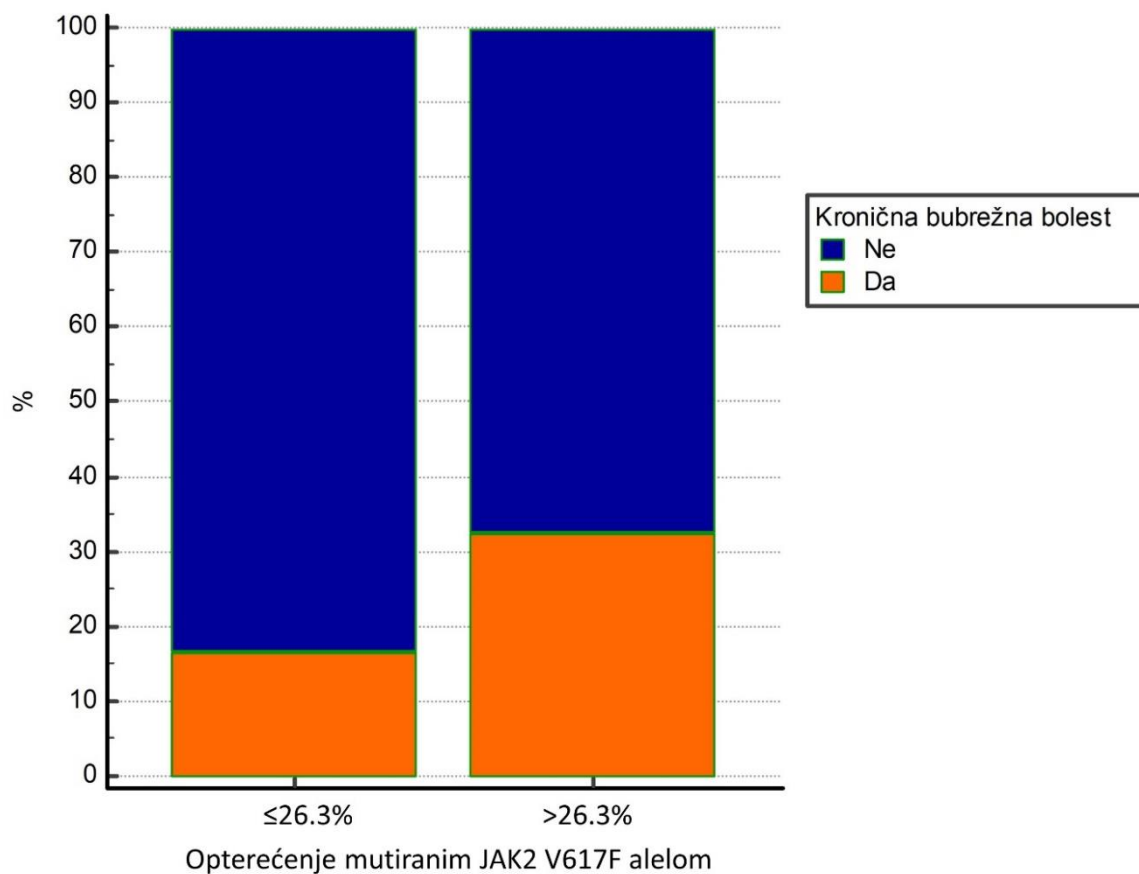
Slika 4.: Distribucija bolesnika prema opterećenju mutiranim JAK2 V617F alelom

Opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom statistički se značajno razlikovalo ovisno o MPN podtipu, medijan 47.5% u PV, 21.6% u PMF, 21.6% u neklasificiranih MPN i 16.5% u ET bolesnika,  $P < 0.001$ , Slika 5.



Slika 5.: Opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom ovisno o MPN podtipu.

Prevalencija kronične bubrežne bolesti nije statistički značajno razlikovala među MPN podtipovima ( $P=0.140$ ). Međutim veće opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom bilo je statistički značajno povezano s većom učestalosti kronične bubrežne insuficijencije (32.6% vs 16.7%,  $P=0.012$ ), Slika 6.

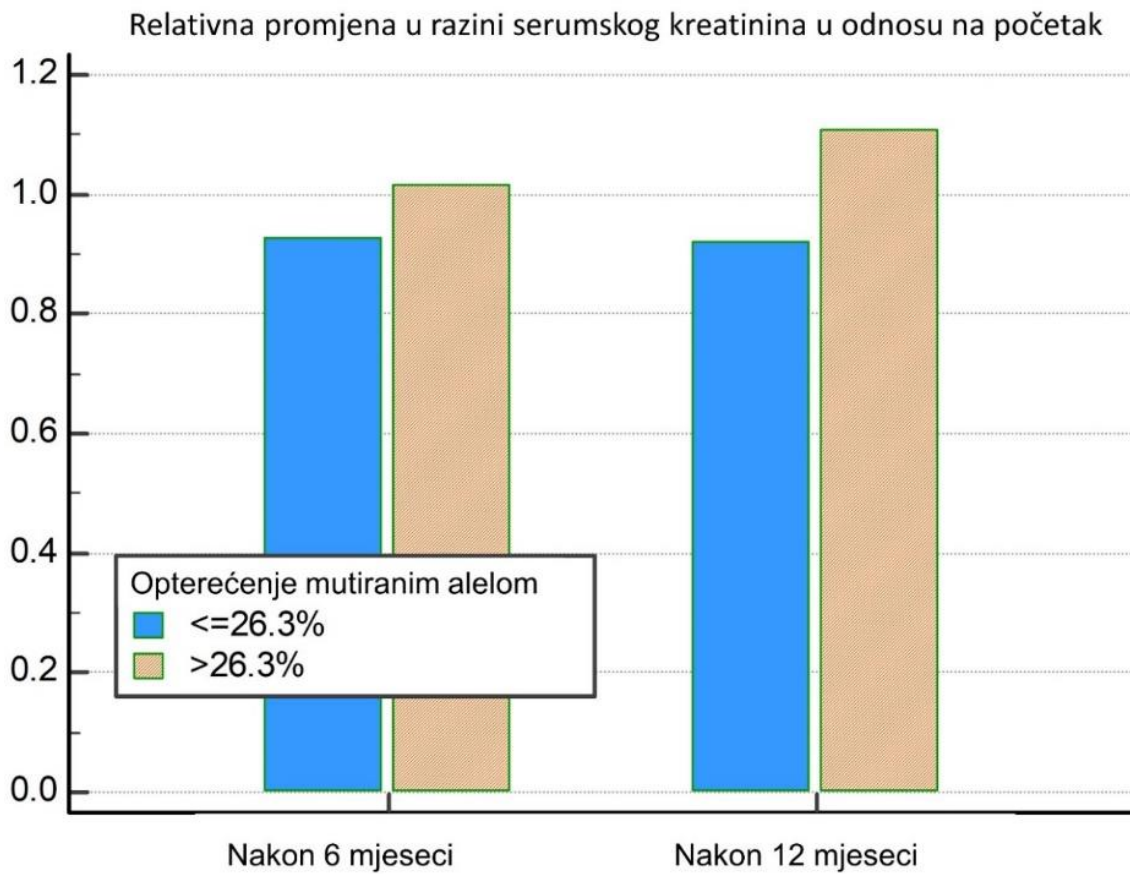


Slika 6.: Prevalencija kronične bubrežne bolesti ovisno o opterećenju mutiranim JAK2 V617F alelom.

### **5.3. Dinamika bubrežne funkcije tijekom vremena ovisno o opterećenju mutiranim JAK2 V617F alelom**

Opterećenjem mutiranim JAK2 V617F alelom značajno se odražavalo na dinamiku bubrežne funkcije tijekom vremena. Bolesnici s većim u odnosu na one s manjim opterećenjem mutiranim alelom imali su značajno nepovoljniju dinamiku u odnosu na početak nakon 6 mjeseci (prosječno 2% pogoršanja vs 7% poboljšanja u razini serumskog kreatinina,  $P=0.032$ ) i nakon 12 mjeseci (prosječno 11% pogoršanja vs 8% poboljšanja u razini serumskog kreatinina,  $P=0.007$ ) kao što je prikazano na Slici 7.

Starija dob je značajno nepovoljno utjecala na dinamiku bubrežne ekskrecijske funkcije ( $P<0.05$  za analize nakon 6 i 12 mjeseci) dok prisustvo kronične bubrežne bolesti, MPN podtip i spol nisu značajno utjecali na dinamiku bubrežne funkcije tijekom perioda istraživanja ( $P>0.05$  za sve analize).



Slika 7.: Relativna promjena u razini serumskog kreatinina nakon 6 i 12 mjeseci u odnosu na početak

## 6. Rasprava

Analiza podataka dobivenih našom retrospektivnom studijom pokazala je da je veće opterećenje mutiranim V617F alelom povezano je s prisutnošću kronične bubrežne bolesti kao i sa nepovoljnom dinamikom bubrežne funkcije tijekom vremena. Ovi rezultati govore u prilog moguće povezanosti mijeloproliferativnih neoplazmi i kronične bubrežne bolesti, kako je opisano u literaturi (50,51,52,53,54). Obzirom na ograničenja dizajna našeg istraživanja, ne možemo zaključivati o uzročno-posljedičnoj povezanosti.

Moguće je da upala podržavana prisustvom KBB može potencirati rast i razvoj MPN klona, dok sama MPN kroz upalne i druge čimbenike može potencirati oštećenje bubrežne funkcije (53,54). Dosad je opisano da bubrežna disfunkcija može biti povezana sa težinom bolesti i tromboembolijskim incidentima (50).

U novije vrijeme u literaturi se opisuje stanje koje se naziva MPN povezana glomerulopatija. Pokazalo se da neki bolesnici s MPN imaju patohistološke promjene bubrega koje odgovaraju kroničnim promjenama a jače su izražene nego u općoj populaciji odgovarajuće dobi u i spola. Patohistološke promjene zahvaćaju glomerule a opisana su zadebljanja glomerulane membrane, segmentalna glomeruloskleroza, akutno oštećenje endotela, trombotička mikroangiopatija, mezangialna skleroza i drugo (55,56,57). U nekim opisanim slučajevima je rana dijagnoza i terapija doprinijela poboljšanju bubrežne funkcije (55), što također podržava teoriju o međusobnoj povezanosti dvaju bolesnih stanja.

Opisano je da citoreduktivni drugi lijekovi koji se koriste u terapiji MPN, mogu poboljšati bubrežnu funkciju u bolesnika s MPN (53, 59, 60,61). Mogući mehanizam bi bio smanjenja mase mijeloičnih stanica te eventualno posljedično smanjenja lučenja citokina, faktora rasta te moguće putem sustava aktivacije komplementa (53,57). Osim pozitivnih učinaka, opisan je i mogući negativni utjecaj terapije anagrelidom na bubrežnu funkciju (62,63).

Lijekovi koji se koriste u terapiji drugih kroničnih bolesti a koje se javljaju kao komorbiditet u bolesnika s MPN, kao što su antihipertenzivi (npr. ACE inhibitori), statini, SGLT2 inhibitori, također mogu utjecati na bubrežnu funkciju (64,65). Utvrđivanje rizičnih faktora za pogoršanje bubrežne funkcije tijekom MPN moglo bi imati utjecaja na razvoj terapijske strategije koja bi usporila razvoj bubrežne bolesti te moguće i poboljšala preživljenje bolesnika s MPN (54,55). Kao je već navedeno, iako je naše istraživanje pokazalo da je veće opterećenje mutiranim V617F alelom povezano je s prisutnošću kronične bubrežne bolesti kao i sa nepovoljnom dinamikom bubrežne funkcije tijekom vremena.

Temeljem naših rezultata, iako smo pokazali da je veće opterećenje mutiranim V617F alelom povezano je s prisutnošću kronične bubrežne bolesti kao i sa nepovoljnom dinamikom bubrežne funkcije tijekom vremena, ne možemo zaključivati o uzročno-posljedičnoj povezanosti, zbog ograničenja dizajna studije. Radi se o retrospektivnoj studiji provedenoj u jednom centru.

Uz to, opterećenje mutiranim alelom mjereno je u različitim vremenskim odstupanjima od dijagnoze MPN bolesti u pojedinim bolesnika i samim time bolesnici su bili potencijalno različito izloženi pojedinim specifičnim lijekovima koji se koriste u terapiji MPN. Na pojavnost KBB i na dinamiku bubrežne funkcije potencijalno je mogla utjecati i prisutnost pojedinih komorbiditeta kao što su arterijska hipertenzija, bubrežna bolest, dijabetes, a ne smije se zanemariti niti utjecaj povećane tjelesne težine, pušenja i drugih životnih navika. Drugi lijekovi poput antihipertenziva (npr. ACE inhibitori), statini, SGLT2 inhibitori također mogu utjecati na bubrežnu funkciju (64). Krečak i sur. su pokazali povoljan utjecaj ACE inhibitora na bubrežnu funkciju MPN bolesnika (65). Na dostupnost tih podataka nismo mogli utjecati u našem istraživanju. Unatoč ovim ograničenjima, naši rezultati upotpunjavaju dosadašnja saznanja o mogućoj povezanosti biologije MPN i kronične bubrežne bolesti i otvaraju put novim istraživanjima.

## 7. Zaključci

Veće opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom bilo je statistički značajno povezano s većom učestalosti kronične bubrežne insuficijencije u bolesnika s MPN.

Opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom statistički se značajno razlikovalo ovisno o MPN podtipu, medijan 47.5% u PV, 21.6% u PMF, 21.6% u neklasificiranih MPN i 16.5% u ET bolesnika

Opterećenje JAK2V617F mutiranim alelom nije se značajno mijenjalo tijekom praćenja u odnosu na razinu opterećenja u trenutku dijagnoze

Opterećenje mutiranim JAK2 V617F alelom značajno se odražavalo na dinamiku bubrežne funkcije tijekom vremena.

Bolesnici s većim opterećenjem JAK2V617F mutiranim alelom u imali su nepovoljnu dinamiku (pogoršanje) bubrežne funkcije tijekom praćenja (nakon 6 i 12 mjeseci).



## **8. Zahvale**

Najljepše zahvaljujem svom mentoru dr.sc. Marku Lucijaniću na strpljenju i vodstvu pri izradi ovog rada.

Posebno zahvaljujem predstojniku Kliničkog zavoda za hematologiju Interne klinike KB Dubrava prof.dr.sc. Rajku Kušecu te svim kolegama s Kliničkog zavoda za hematologiju kao i Odjela molekularne dijagnostike i genetike KB Dubrava.

## 9. Literatura

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition, Volume 2, Ed.: Swerdlow et al., IARC, 2017, Lyon, France
2. Li W. The 5<sup>th</sup> Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. In: Li W, ed. *Leukemia*. Brisbane (AU): Exon Publications; October 16, 2022.
3. DAMESHEK W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372-375.
4. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148. doi:10.1038/nature03546
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790. doi:10.1056/NEJMoa051113
7. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005;280(24):22788-22792. doi:10.1074/jbc.C500138200
8. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468. doi:10.1056/NEJMoa065202

9. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379-2390. doi:10.1056/NEJMoa1311347
10. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062-1069. doi:10.1182/blood-2014-05-578435
11. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2013;121(21):4388-4395. doi:10.1182/blood-2013-02-486050
12. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood.* 2008;112(1):141-149. doi:10.1182/blood-2008-01-131664
13. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. *Blood Rev.* 2016;30(6):453-459. doi:10.1016/j.blre.2016.06.001
14. Tremblay D, Yacoub A, Hoffman R. Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(2):159-176. doi:10.1016/j.hoc.2020.12.001
15. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1416-1430. doi:10.1056/NEJMoa1716614
16. Szuber N, Mudireddy M, Nicolosi M, et al. 3023 Mayo Clinic Patients With Myeloproliferative Neoplasms: Risk-Stratified Comparison of Survival and Outcomes

- Data Among Disease Subgroups. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(4):599-610. doi:10.1016/j.mayocp.2018.08.022
17. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Carobbio A, Vannucchi AM, Tefferi A. Diagnostic impact of the 2016 revised who criteria for polycythemia vera. *Am J Hematol.* 2017;92(5):417-419. doi:10.1002/ajh.24684
  18. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia.* 2021;35(12):3339-3351. doi:10.1038/s41375-021-01401-3
  19. Thiele J, Kvasnicka HM. Diagnostic impact of bone marrow histopathology in polycythemia vera (PV). *Histol Histopathol.* 2005;20(1):317-328. doi:10.14670/HH-20.317
  20. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005;90(8):1128-1132.
  21. Shahin OA, Chifotides HT, Bose P, Masarova L, Verstovsek S. Accelerated Phase of Myeloproliferative Neoplasms. *Acta Haematol.* 2021;144(5):484-499. doi:10.1159/000512929
  22. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(12):1599-1613. doi:10.1002/ajh.26008
  23. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia.* 2018;32(5):1057-1069. doi:10.1038/s41375-018-0077-1
  24. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to

- validate the WHO classification. *Blood*. 2011;117(21):5710-5718. doi:10.1182/blood-2010-07-293761
25. Gisslinger H, Jeryczynski G, Gisslinger B, et al. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria [published correction appears in *Leukemia*. 2017 Mar;31(3):774-775]. *Leukemia*. 2016;30(5):1126-1132. doi:10.1038/leu.2015.360
26. Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol*. 2003;82(3):148-152. doi:10.1007/s00277-002-0604-y
27. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366(9501):1945-1953. doi:10.1016/S0140-6736(05)67785-9
28. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96(1):145-162. doi:10.1002/ajh.26050
29. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. *Histopathology*. 2016;68(6):905-915. doi:10.1111/his.12871
30. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(2):129-140. doi:10.1016/j.beha.2014.07.004
31. Boiocchi L, Mathew S, Gianelli U, et al. Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. *Mod Pathol*. 2013;26(12):1577-1585. doi:10.1038/modpathol.2013.109

32. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895-2901. doi:10.1182/blood-2008-07-170449
33. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-1708. doi:10.1182/blood-2009-09-245837
34. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica*. 2013;98(12):1872-1876. doi:10.3324/haematol.2013.095109
35. Pizzi M, Silver RT, Barel A, Orazi A. Recombinant interferon- $\alpha$  in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Mod Pathol*. 2015;28(10):1315-1323. doi:10.1038/modpathol.2015.93
36. Jamieson C, Hasserjian R, Gotlib J, et al. Effect of treatment with a JAK2-selective inhibitor, fedratinib, on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Transl Med*. 2015;13:294. Published 2015 Sep 10. doi:10.1186/s12967-015-0644-4
37. Harrison CN, Schaap N, Mesa RA. Management of myelofibrosis after ruxolitinib failure. *Ann Hematol*. 2020;99(6):1177-1191. doi:10.1007/s00277-020-04002-9
38. Constantinescu SN, Leroy E, Gryshkova V, Pecquet C, Dusa A. Activating Janus kinase pseudokinase domain mutations in myeloproliferative and other blood cancers. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(4):1048-1054. doi:10.1042/BST20130084

39. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(9):971-976. Published 2011 Aug 14. doi:10.1038/nsmb.2099
40. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(8):754-759. doi:10.1038/nsmb.2348
41. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjan Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):1002-1007. doi:10.1042/BST20130005
42. De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2009;94(5):733-737. doi:10.3324/haematol.13869
43. Fiorini A, Chiusolo P, Rossi E, et al. Absence of the JAK2 exon 12 mutations in patients with splanchnic venous thrombosis and without overt myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol.* 2009;84(2):126-127. doi:10.1002/ajh.21335
44. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* 2014;85(1):49-61. doi:10.1038/ki.2013.444
45. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate [published correction appears in *Ann Intern Med.* 2011 Sep 20;155(6):408]. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-612. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006
46. Selistre L, Rabilloud M, Cochat P, et al. Comparison of the Schwartz and CKD-EPI Equations for Estimating Glomerular Filtration Rate in Children, Adolescents, and

- Adults: A Retrospective Cross-Sectional Study. *PLoS Med.* 2016;13(3):e1001979.  
Published 2016 Mar 29. doi:10.1371/journal.pmed.1001979
47. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, Levey AS, Uhlig K. Estimating equations for glomerular filtration rate in the era of creatinine standardization: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2012;156(11):785-795. doi:10.7326/0003-4819-156-6-201203200-00391
48. Muto S, Matsubara T, Inoue T, et al. Chapter 1: Evaluation of kidney function in patients undergoing anticancer drug therapy, from clinical practice guidelines for the management of kidney injury during anticancer drug therapy 2022 [published online ahead of print, 2023 Jun 29]. *Int J Clin Oncol.* 2023;10.1007/s10147-023-02372-4. doi:10.1007/s10147-023-02372-4
49. Jin X, Yang X, Xu Y, et al. Differential correlation between time in range and eGFR or albuminuria in type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2023;15(1):92. Published 2023 May 5. doi:10.1186/s13098-023-01071-4
50. Gecht J, Tsoukakis I, Kricheldorf K, et al. Kidney Dysfunction Is Associated with Thrombosis and Disease Severity in Myeloproliferative Neoplasms: Implications from the German Study Group for MPN Bioregistry. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):4086. Published 2021 Aug 13. doi:10.3390/cancers13164086
51. Christensen AS, Møller JB, Hasselbalch HC. Chronic kidney disease in patients with the Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.* 2014;38(4):490-495. doi:10.1016/j.leukres.2014.01.014
52. Büttner-Herold M, Sticht C, Wiech T, Porubsky S. Renal disease associated with myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasms. *Histopathology.* 2021;78(5):738-748. doi:10.1111/his.14282



53. Baek SW, Moon JY, Ryu H, et al. Chronic kidney disease in the BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasm: a single-center retrospective study. *Korean J Intern Med.* 2018;33(4):790-797. doi:10.3904/kjim.2016.263
54. Lucijanac M, Krecak I, Kusec R. Renal disease associated with chronic myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol.* 2022;15(2):93-96. doi:10.1080/17474086.2022.2039117
55. Del Sordo R, Brugnano R, Covarelli C, et al. Nephrotic syndrome in primary myelofibrosis with renal extramedullary hematopoiesis and glomerulopathy in the JAK inhibitor era. *Clin Nephrol Case Stud.* 2017;5:70-77. Published 2017 Jul 24. doi:10.5414/CNCS109100
56. Said SM, Leung N, Sethi S, et al. Myeloproliferative neoplasms cause glomerulopathy. *Kidney Int.* 2011;80(7):753-759. doi:10.1038/ki.2011.147
57. Popov H, Koleva T, Stoyanov GS, Ghenev P. Myeloproliferative Neoplasm and Myelodysplastic Syndrome-Associated Renal Disease: A Histopathological Report of Two Cases. *Cureus.* 2022;14(12):e32388. Published 2022 Dec 10. doi:10.7759/cureus.32388
58. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2007;136(5):745-751. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06497.x
59. Rajasekaran A, Ngo TT, Abdelrahim M, et al. Primary myelofibrosis associated glomerulopathy: significant improvement after therapy with ruxolitinib. *BMC Nephrol.* 2015;16:121. Published 2015 Aug 1. doi:10.1186/s12882-015-0121-6

60. Fukuda Y, Araki M, Yamamoto K, et al. Evidence for prevention of renal dysfunction associated with primary myelofibrosis by cytoreductive therapy. *Haematologica*. 2019;104(11):e506-e509. doi:10.3324/haematol.2018.208876
61. Strati P, Abdelrahim M, Selamet U, et al. Ruxolitinib therapy is associated with improved renal function in patients with primary myelofibrosis. *Ann Hematol*. 2019;98(7):1611-1616. doi:10.1007/s00277-019-03708-9
62. Kwiatkowski J, Kuliszkiwicz-Janus M, Rymer W, Jaźwiec B, Małecki R. Treatment of Essential Thrombocythemia with Anagrelide Is Associated with an Increased Risk of Worsened Kidney Function. *Pharmacology*. 2021;106(5-6):316-322. doi:10.1159/000513377
63. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720-1728. doi:10.1182/blood-2012-07-443770
64. Krečak I, Morić Perić M, Zekanović I, et al. Beneficial effect of ACE inhibitors on kidney function in polycythemia vera. *Wien Klin Wochenschr*. 2021;133(15-16):808-815. doi:10.1007/s00508-021-01812-3
65. Kanbay M, Ozkara A, Selcoki Y, et al. Effect of treatment of hyperuricemia with allopurinol on blood pressure, creatinine clearance, and proteinuria in patients with normal renal functions. *Int Urol Nephrol*. 2007;39(4):1227-1233. doi:10.1007/s11255-007-9253-3

## **10. Životopis**

Petra Veić rođena je u Zagrebu i pohađala je osnovnu školu Jordanovac i V. gimnaziju u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2017. godine i završila 2023. godine. Tijekom studija sudjelovala je u ERASMUS+ projektima, kao i na više studentskih kongresa. Završila je Osnovnu glazbenu školu Pavao Markovac (smjer glasovir), aktivno se bavi plesom i sudjeluje na brojnim plesnim natjecanjima.