

# Protrombotički rizični faktori u bolesnika s Ph negativnim mijeloproliferativnim zloćudnim tumorima

---

Horvat, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:216497>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Horvat

**PROTROMBOTIČKI RIZIČNI FAKTORI U  
BOLESNIKA S PH NEGATIVNIM  
MIJELOPROLIFERATIVNIM ZLOĆUDNIM  
TUMORIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Horvat

**PROTROMBOTIČKI RIZIČNI FAKTORI U  
BOLESNIKA S PH NEGATIVNIM  
MIJELOPROLIFERATIVNIM ZLOĆUDNIM  
TUMORIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2020.



University of Zagreb  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Ivana Horvat

**Prothrombotic risk factors in patients  
with  
Ph negative myeloproliferative  
neoplasms**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Renata Zadro, Ph.D., Professor

Zagreb, 2020

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Doktorski rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u suradnji s Klinikom za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom prof. dr.sc. Renate Zadro u sklopu projekata “Protrombotički rizični čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima u djece” (MZOŠ 0214212, voditelj prof. dr. sc. Renata Zadro) i „Leukemije i transplantacija krvotvornih matičnih stanica” (MZOŠ 108-1081872-1913, voditelj projekta prof. dr. sc. Boris Labar).

*Zahvale*

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Renati Zadro na ukazanom povjerenju za ulazak u svijet molekularne dijagnostike te pomoći, podršci, savjetima i motivaciji za izradu i pisanje ovog rada.*

*Zahvaljujem i prof. dr. sc. Borisu Labaru na financijskoj pomoći za realizaciju eksperimentalnog dijela rada te prof. dr. sc. Rajku Kušecu na poticanju za izradu ovog istraživanja.*

*Hvala doc. dr. sc. Ani Boban i Pavle Rončeviću, dr. med. na pomoći u prikupljanju i interpretaciji kliničkih podataka.*

*Zahvaljujem dr. sc. Désirée Coen Herak na motivaciji, podršci i korisnim savjetima za statističku obradu podataka, te dr. sc. Andrei Gelemanović na dodatnoj pomoći prilikom statističke obrade rezultata.*

*Puno hvala Andrei Čeri, mag. med. biochem. na podršci i razmjeni iskustava i savjeta prilikom izrade ovog rada.*

*Posebno hvala Marijani Jurak, zdrav. tech., Jadranki Jerković, med. lab. ing. i Sandri Ćurčić, med. lab. ing. na pomoći prilikom izdvajanja DNA te Margareti Radić Antolic, spec. med. biochem. na podršci.*

*Zahvaljujem i Hrvatskoj kooperativnoj grupi za hematološke bolesti na prepoznavanju mojeg dosadašnjeg rada i stipendiranju zadnjeg semestra doktorskog studija.*

*Zahvaljujem mojim roditeljima, sestrama i baki na poticanju i motivaciji za ovaj rad. Veliko hvala mojem dragom suprugu Goranu koji mi je, osim puno strpljenja, pomogao i svojim znanjem prilikom pisanja ovog rada.*

*Naposlijetku hvala mojem sinu Neu, najvećem motivatoru za dovršenje ovog rada, koji je i prije nego je došao na ovaj svijet, sudjelovao u svim fazama pisanja ovog rada te je u moj život unio najposebniji osjećaj na svijetu.*

## SAŽETAK

Ph(-) mijeloproliferativni zloćudni tumori (MPN) dijele se na esencijalnu trombocitozu (ET), policitemiju veru (PV) i primarnu mijelofibrozu (PMF). Tromboza je najčešća komplikacija ovih bolesti. Cilj istraživanja bio je utvrditi rizične faktore koji doprinose nastanku tromboze. U tu svrhu, uz detaljnu anamnezu analizirali smo uzorke 258 Ph(-) MPN bolesnika (134 ET, 70 PV i 54 PMF) i 258 zdravih kontrola (bez tromboze) uparenih po dobi i spolu. Odgovarajućom metodom polimerazne lančane reakcije (PCR) ispitane su učestalosti polimorfizama *FV* Leiden, *FII* G20210A, ljudskih trombocitnih antigena (*HPA*-1, -2, -3, -5), P-selektina (*P-SEL* S290N, N562D, V599L, T715P) i P-selektin glikoprotein 1 liganda (*PSGL-1* M62I). Uz to je bolesnicima pri dijagnozi napravljena krvna slika i metodom PCR utvrđen je status V617F mutacije u genu *JAK2*, te je u bolesnika pozitivnih na mutaciju kvantificirano opterećenje mutiranim alelom. Od 79 bolesnika s trombozom, 59 je imalo arterijsku (29 ET, 19 PV i 11 PMF), a 26 bolesnika vensku trombozu (10 ET, 8 PV i 8 PMF). U ET bolesnika leukocitoza, hiperlipidemija i mutacija V617F povećavali su rizik za nastanak tromboze, dok su nositelji alela *HPA-5b* imali niži rizik. U PV bolesnika rizik za trombozu bio je viši u onih sa šećernom bolesti dok su nositelji alela *HPA-2b* imali puno niži rizik. U PMF bolesnika rizik za trombozu bio je viši u nositelja alela 290N. Ovo istraživanje doprinijelo je novim saznanjima o etiologiji nastanka tromboze u Ph(-) MPN bolesnika.

**Ključne riječi:** Ph(-) MPN, tromboza, krvna slika, polimorfizmi gena *P-SEL*, *PSGL-1* i *HPA*, *FV* Leiden, *FII* G20210A, mutacija V617F

## ABSTRACT

**Introduction:** Ph(-) myeloproliferative neoplasms (MPN) are rare hematological diseases. They can be divided into three different entities including Essential thrombocythemia, Polycythemia vera and Primary myelofibrosis. Each of these has its own diagnostic criteria, clinical course, treatment and complications. However, all of them are characterized by thrombosis as the most common complication which occurs in about 20-40 % of patients. Although thrombosis in these patients is a hot topic with several confirmed risk factors, etiology of thrombosis is still not fully understood and is under the scope of investigators. Factors that contribute to thrombosis in MPN patients are age over 60 years, leukocytosis at the time of diagnosis in ET and PV, although still debated in PMF; previous thrombosis in ET and PV, but no unambiguous result for PMF and occurrence of V617F mutation in the *JAK2* gene. Factors that are still under investigation for their correlation to thrombosis are V617F mutation burden allele because it is not clear which value contributes to thrombosis in ET and PV while for PMF there are no results; the number of platelets at diagnosis because in each study different values are related to thrombosis; *FV* Leiden and *FII* G20210A with no unambiguous results in ET, PV and PMF patients; hemoglobin concentration and hematocrit level that are still under investigation regarding their contribution to thrombosis; cardiovascular (CV) risk factors in ET and PV that have not been included yet into all prediction models for thrombosis, and for PMF patients results obtained from studies are contradictory; polymorphisms of human platelet alloantigens (*HPA*) with only two published studies of their influence on thrombosis and polymorphisms of P-selectin (*P-SEL*) and P-selectin glycoprotein 1 ligand (*PSGL-1*) for which, as far as we know, there are no published studies of their role in thrombosis.

**Aim:** To investigate hematologic and genetic prothrombotic risk factors in Ph(-) MPN patients. This included analysis of anamnestic and demographic status of patients, influence of blood count parameters (erythrocyte, leukocyte and platelet count, hemoglobin concentration and hematocrit level), frequency of cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes, smoking, hyperlipidemia and alcoholism), *JAK2* V617F mutation status and its allele burden quantification, genotyping of *FV* Leiden, *FII* G20210A, *HPA* (*HPA*-1, *HPA*-2, *HPA*-3 and *HPA*-5), *P-SEL* (S290N, N562D, V599L and T715P) and *P-SGLI* (M62I) polymorphisms in patients according to thrombosis occurrence and thrombosis type, and according to diagnosis for all patients. Also, sought to



investigate frequency of the same polymorphisms in healthy controls (without thrombosis) matched to patients by age and sex.

**Patients and methods:** For this purpose we analyzed samples of 258 Ph(-) MPN adult patients with confirmed diagnosis according to WHO and 258 healthy controls matched by age and sex. According to diagnosis, there were 134 ET patients, 70 PV and 54 PMF patients. A proportion of patients (26.4 %) was diagnosed before the start of this study. Whole blood was collected into ethylenediaminetetraacetic acid tube for blood counts (number of erythrocytes, leukocytes and platelets, hemoglobin concentration and haematocrit level) and for DNA isolation (genomic DNA that was isolated by salting out method and granulocyte DNA that was isolated by salting out method after isolation of granulocytes from whole blood by Polymorphprep). *HPA* polymorphisms in patients and healthy controls were genotyped by allele discrimination PCR, while *P-SEL* and *PSGL-1* polymorphisms were analyzed by allele specific PCR. *FV* Leiden and *FII* G20210A were determined by PCR - restriction fragment length polymorphisms. In patients, V617F *JAK2* gene mutation status was analyzed by allele specific PCR and for positive mutation, allele burden of mutation was determined by real time quantitative PCR.

**Results:** All thrombosis events before diagnosis and after a median follow-up of 4.8 years were included. Seventy-nine patients experienced 109 thrombotic events in total, 59 patients had arterial thrombosis and 26 venous thrombosis. Six patients (3 ET and 3 PV patients) had both arterial and venous thrombosis and we counted them in both thrombosis groups. Arterial thrombosis occurred in 29 ET patients, 19 PV patients and 11 PMF patients while venous thrombosis occurred in 10 ET patients, 8 PV patients and 8 PMF patients. Recurrent thrombosis occurred in 8 ET patients, 7 PV patients and 5 PMF patients. When patients were divided by sex, there were more female patients in the whole group of Ph(-) MPN patients, as well as in ET group ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively), but there was no difference in frequency of thrombosis between male and female patients. At the time of diagnosis the median age of male ET, PV and PMF patients was 60, 60 and 58 years, respectively. The median age of female patients in ET group was 54 years, in PV group 68 years and in PMF group 68 years. There was no statistical difference for age between male and female patients in PV, ET and PMF group. Furthermore, we divided patients into those with and without thrombosis. Groups of Ph(-) MPN patients and ET patients with thrombosis were older at the time of diagnosis than Ph(-) MPN and ET patients without thrombosis (63 vs 57 years and 65 vs 52 years,  $P = 0.022$  and  $P = 0.008$ , respectively). The same was observed in Ph(-) MPN and ET

patients with arterial thrombosis versus patients without thrombosis (65 vs 57 years and 65 vs 52 years,  $P = 0.008$  and  $P = 0.009$ , respectively). In the group of all Ph(-) MPN patients with thrombosis divided by sex, male patients were younger at the time of their first thrombosis compared to female patients (56 vs 64 years,  $P = 0.026$ ). Ph(-) MPN patients and ET patients, with age over 55 years at the time of diagnosis, had 2.59 fold (95% CI = 1.35-5.00;  $P = 0.006$ ) and 4.56 fold (95% CI = 1.78-11.68;  $P = 0.002$ ) higher risk for arterial thrombosis. Age over 54 years, at the time of diagnosis, in ET patients indicated a 5.56 fold risk of venous thrombosis (95% CI = 1.12-27.56,  $P = 0.041$ ). Compared to those without thrombosis, Ph(-) MPN patients with thrombosis were more often on cytoreductive or activated factor X ( $P = 0.006$ ) therapy and on anticoagulation therapy ( $P < 0.001$ ) while patients with venous thrombosis had, in addition to the above therapy, more often antiaggregation drug therapy ( $P = 0.013$ ). In ET patients with thrombosis, there were more patients that received anticoagulation drugs ( $P < 0.001$ ), while ET patients with arterial thrombosis had more often anticoagulation ( $P < 0.001$ ) and cytoreduction therapy ( $P = 0.024$ ) compared to ET patients without thrombosis. More ET patients with venous thrombosis had therapy with anticoagulation drugs compared to those without thrombosis ( $P < 0.001$ ). Compared to other patients, PV patients with thrombosis and with venous thrombosis were more often on anticoagulation drugs ( $P = 0.050$  and  $P < 0.001$ , respectively). In PMF patients there were no difference in therapy between patients with and without thrombosis. Time frame of first thrombotic event for ET and PV patients was most often the same year when diagnosis was confirmed, while in PMF patients thrombosis occurred mainly one or more years after established diagnosis. Previous thrombosis increased the risk for thrombosis recurrence in Ph(-) MPN and ET patients ( $P = 0.001$  and  $P = 0.016$ , respectively). In the period of prospective study follow-up, survival of ET and PMF patients with thrombosis has been shorter compared to ET and PMF patients without thrombosis (80.4 vs 97.9 % and 32.1 vs 57.6 %). On the contrary, PV patients with thrombosis had higher survival rate than patients without thrombosis (89.4 vs 87.3 %). Ph(-) MPN patients with thrombosis as well as those with arterial thrombosis had higher leukocyte count than patients without thrombosis (10.5 and 10.6 vs 9.5  $\times 10^9/L$ ,  $P = 0.009$  and  $P = 0.001$ , respectively). Ph(-) MPN patients with venous thrombosis had lower platelet count and lower hemoglobin concentration than Ph(-) MPN patients without thrombosis (447 vs 571  $\times 10^9/L$  and 133 vs 141 g/L,  $P = 0.011$  and  $P = 0.049$ , respectively). ET patients with thrombosis and with arterial thrombosis had higher leukocyte count than ET patients without thrombosis (10.2 and 10.6 vs 8.5  $\times 10^9/L$ ,

P = 0.010 and P < 0.001, respectively). ET patients with arterial thrombosis had higher platelet count than ET patients without thrombosis (700 vs 617 x10<sup>9</sup>/L, P = 0.050). In PV and PMF patients there was no difference in blood counts between patients with and without thrombosis. The risk for arterial thrombosis in ET patients had been increased for those with leukocytes > 9.2 x10<sup>9</sup>/L (OR = 6.14, 95% CI = 2.16-17.42; P < 0.001), erythrocytes > 5.48 x10<sup>12</sup>/L (OR = 4.00, 95% CI = 1.18-13.55; P = 0.046), platelets > 632 x10<sup>9</sup>/L (OR = 2.61, 95% CI = 1.08-6.32; P = 0.049) while hemoglobin concentration > 106g /L had protective role (OR = 0.21, 95% CI = 0.06-0.73; P = 0.028). Increased risk for venous thrombosis was established in ET patients with platelets ≤ 536 x10<sup>9</sup>/L (OR = 5.55, 95% CI = 1.34-22.98; P = 0.015) and hematocrit level > 0.45 L/L (OR = 8.06, 95% CI = 1.92-33.80; P=0.004). PV patients with leukocyte count > 18 x10<sup>9</sup>/L had increased risk for arterial thrombosis (OR = 7.86, 95% CI = 1.37-45.06; P=0.019) while the risk for venous thrombosis was increased in patients with hemoglobin concentration ≤ 159 g/L (OR = 5.30, 95% CI = 1.09-25.84; P=0.041). Ph(-) MPN patients with thrombosis, compared to those without thrombosis, had more often hypertension (73.4 vs 49.7 %, P <0.001), hyperlipidemia (30.4 vs 11.2 %, P < 0.001), and at least one CV risk factor present (83.5 vs 60.9 %, P=0.001). Risk for arterial thrombosis had been increased in Ph(-) MPN patients with hypertension (OR = 3.25, 95% CI = 1.67-6.34; P<0.001), hyperlipidemia (OR = 4.08, 95% CI = 2.00-8.31; P<0.001) and at least one CV risk factor present (OR = 5.67, 95% CI = 2.02-13.90; P<0.001). Compared to patients without thrombosis, ET patients with thrombosis had more often hypertension (72.2 vs 40.8 %, P = 0.003), hyperlipidemia (30.6 vs 9.2 %, P = 0.005) and presence of at least one CV risk factor (86.1 vs 55.1 %, P = 0.001). Increased risk for arterial thrombosis was established in ET patients with hypertension (OR = 2.76, 95% CI = 1.16-6.54; P = 0.021), hyperlipidemia (OR = 4.45, 95% CI = 1.56-12.63; P = 0.006) and the presence of at least one CV risk factor (OR = 3.91, CI = 1.38-11.09; P = 0.009). Hypertension in ET patients contributed to increased risk for venous thrombosis (OR = 30.33, 95% CI = 1.73-532.45; P < 0.001). In PV patients with thrombosis, there were more patients with diabetes as compared to patients without thrombosis (33.3 vs 10.9 %, P = 0.048). In PV patients, diabetes was related to increased risk for arterial thrombosis (OR = 4.78, 95% CI = 1.28-17.82; P = 0.030). PMF patients with hyperlipidemia had increased risk for arterial thrombosis (OR = 6.10, 95% CI = 1.11-33.56; P = 0.046). Seventy-one percent of Ph(-) MPN were positive for V617F mutation in the *JAK2* gene, and according to diagnosis it was present in 62.7 % ET, 94.3 % PV and 66.7 % PMF patients. This mutation was more often present in Ph(-) MPN

and ET patients with thrombosis compared to Ph(-) MPN and ET patients without thrombosis (81.0 vs 68.2 %,  $P = 0.049$  and 77.8 vs 57.1 %,  $P = 0.047$ , respectively). Presence of V617F mutation contributed to increased risk for arterial thrombosis in Ph(-) MPN patients (OR = 2.60, 95% CI = 1.19-5.64;  $P = 0.021$ ) and in ET patients (OR = 3.60, CI = 1.27-10.22;  $P = 0.015$ ). There was no difference in the median value of V617F allele burden in patients with and without thrombosis for Ph(-) MPN patients, and in ET, PV and PMF subtypes. Analysis showed that V617F allele burden contributed to arterial thrombosis; in Ph(-) MPN and ET patients with  $> 14.6$  % (OR = 2.33, 95% CI = 1.25-4.33;  $P = 0.011$  and OR = 2.92, 95% CI = 1.25-6.84;  $P = 0.021$ , respectively) while for PMF patients it was the value of  $\leq 34.8$  % (OR = 5.06, 95% CI = 1.19-21.41;  $P = 0.032$ ). In PV patients, those with the value of  $> 56.7$  % had increased risk for venous thrombosis (OR = 6.00, 95% CI = 1.12-32.14;  $P = 0.046$ ). There was no difference in frequency of investigated polymorphisms between Ph(-) MPN patients and healthy controls. In Ph(-) MPN patients with venous thrombosis, there were more patients with *HPA-2aa* genotype (92.3 vs 72.6 %,  $P = 0.030$ ) compared to Ph(-) MPN patients without thrombosis. Comparison of ET patients with thrombosis and healthy controls revealed that *P-SGL1* M62I-MI and M62I-II genotypes had been present only in patients (16.7 vs 0.0 %,  $P = 0.011$  and 2.8 vs 0.0 %,  $P = 0.011$ , respectively). In PV patients with thrombosis, there were more carriers of genotype *HPA-2aa* compared to PV patients without thrombosis and to healthy controls (95.8 vs 63.0 % and vs 58.3 %,  $P = 0.003$  and  $P = 0.004$ , respectively). In PV patients, carriers of allele *HPA-2b* had reduced risk for thrombosis (OR = 0.07, 95% CI = 0.01-0.60;  $P = 0.015$ ) as well as for arterial thrombosis (OR = 0.09, 95% CI = 0.01-0.077;  $P = 0.028$ ). All PV patients with venous thrombosis were carriers of genotype *HPA-2aa*, unlike PV patients without thrombosis (100.0 vs 63.0 %,  $P = 0.046$ ). PMF patients with at least one allele N in *P-SEL* S290N polymorphism had increased risk for thrombosis (OR = 7.31, 95% CI = 2.10-25.48;  $P = 0.002$ ) as well as for arterial thrombosis (OR = 5.90, 95% CI = 1.37-25.43;  $P = 0.017$ ) and for venous thrombosis (OR = 10.12, 95% CI = 1.70-60.30;  $P = 0.011$ ). None of the PMF patients with thrombosis had N562D-NN genotype while it had been present in healthy controls (0.0 vs 26.3 %,  $P = 0.046$ ). In Ph(-) MPN patients, a combination of several genotypes was related to increased risk for venous thrombosis: M62I-MM/S290N-NN, T715P-TT/S290N-NN, S290N-NN/*FV* Leiden-GG and S290N-NN/*FII* G20210A-GG. PMF carriers of genotype combination S290N-SN/*FV* Leiden-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG and S290N-SN/*FII* G20210A-GG had increased risk for thrombosis. In PMF patients, the risk for arterial thrombosis

was increased for carriers of genotype combination S290N-SN/*FV* Leiden-GG and S290N-SN/*FII* G20210A-GG while risk for venous thrombosis was increased for carriers of genotype combination S290N-NN/*FV* Leiden-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG and S290N-SN/*FII* G20210A-GG. We created haplotypes from *P-SEL* polymorphisms and *FV* Leiden and from *HPA-1*, *HPA-2* and *HPA-3* polymorphisms. Haplotypes *HPA-1b2b3b* and SDVPG were present only in Ph(-) MPN patients as compared to healthy controls ( $P = 0.005$  and  $P = 0.033$ , respectively). Haplotype SDLPG was only present in Ph(-) MPN patients with thrombosis compared to Ph(-) MPN patients without thrombosis and healthy controls ( $P = 0.050$  and  $P = 0.018$ , respectively). In ET patients with thrombosis, there were less carriers of haplotype SDVTG than in healthy controls ( $P = 0.042$ ). Multivariate logistic regression in Ph(-) MPN patients confirmed hyperlipidemia as a CV factor that increases risk for thrombosis (OR = 3.30, 95% CI = 1.33-8.19;  $P = 0.010$ ) and risk for arterial thrombosis (OR = 3.75, 95% CI = 1.44-9.78;  $P = 0.007$ ). In the same cohort of patients, risk for arterial thrombosis was decreased for carriers of at least one *HPA-5b* allele (OR = 0.36, 95% CI = 0.13-0.97;  $P = 0.043$ ) while risk for venous thrombosis had been slightly decreased in patients with higher hemoglobin concentration (OR = 0.98, 95% CI = 0.96-0.99;  $P = 0.030$ ). In ET patients, multivariate logistic regression showed that higher leukocyte count, presence of hyperlipidemia and V617F mutation increased risk for thrombosis (OR = 1.19, 95% CI = 1.03-1.38;  $P = 0.019$ ; OR = 4.19, 95% CI = 1.15-15.22  $P = 0.030$  and OR = 2.98, 95% CI = 1.07-8.36;  $P = 0.038$ , respectively) while carriers of at least one *HPA-5b* allele had decreased risk for thrombosis (OR = 0.20, 95% CI = 0.06-0.70;  $P = 0.012$ ). ET patients that had higher leukocyte count and hyperlipidemia had increased risk for arterial thrombosis (OR = 1.21, 95% CI = 1.02-1.42;  $P = 0.025$  and OR = 4.41, 95% CI = 1.08-18.03;  $P = 0.039$ , respectively) while those with at least one *HPA-5b* allele had decreased risk for arterial thrombosis (OR = 0.23, 95% CI = 0.06-0.89;  $P = 0.034$ ). By multivariate regression in PV patients, we confirmed correlation of diabetes with increased risk for thrombosis (OR = 5.61, 95% CI = 1.15-27.44;  $P = 0.033$ ) while carriers of at least one *HPA-2b* allele had much lower thrombotic risk (OR = 0.09, 95% CI = 0.01-0.73;  $P = 0.025$ ). In PV patients, presence of at least one *HPA-2b* allele was also associated with decreased risk for arterial thrombosis (OR = 0.11, 95% CI = 0.01-0.95;  $P = 0.045$ ). In PMF patients, we confirmed by multivariate logistic regression that presence of 290N allele indicates increased risk for thrombosis (OR = 7.41, 95% CI = 2.01-27.26;  $P = 0.003$ ). From all obtained results, we defined four predictive models for thrombosis that stratified patients into categories of low, medium and high risk for thrombosis development.

The first model included age > 60 years, previous thrombosis, presence of at least one CV risk factor and presence of two or more CV risk factors, and it had been applied to predict the risk for thrombosis development in Ph(-) MPN patients, risk for arterial thrombosis development in Ph(-) MPN patients and risk for thrombosis development in PV patients. The second model included the same parameters as the first one plus V617F mutation status and it was used as a predictive model for thrombosis development in PV patients, and arterial thrombosis development in ET and PV patients. The third model included V617F burden allele > 26.1 % and hypertension and was applied to prediction of venous thrombosis development in PV patients. The fourth prediction model included V617F mutation status and presence of at least one 290N allele as parameters for thrombosis development in PMF patients. Using these models, we predicted in Ph(-) MPN patients development of thrombosis in 12.3 % patients in low risk category, 14.1 % in medium risk category and 29 % in high risk category. Development of arterial thrombosis in Ph(-) MPN patients was predicted for 3.6 % patients in low risk category, 14.9 % in medium risk category and 24.7 % in high risk category. In Ph(-) MPN patients, prediction of venous thrombosis development involved 11.1 % patients in low risk category, 13.8 % patients in medium risk category and 31.9 % patients in high risk category. Thrombosis in ET patients, according to our model, would happen in 7.14 % patients of low risk category and 19.3 % patients of high risk category, while arterial thrombosis would occur in 7.14 % patients of low risk category and 21.1 % of patients in high risk category. For PV patients, development of thrombosis was predicted for 12.1 % patients in medium risk category and 21.1 % patients in high risk category. Our model predicted development of arterial thrombosis for 9.0 % of patients in medium risk category and 11.0 % of patients in high risk category. Additionally, by Cox regression model we confirmed the obtained results for parameters that contribute to thrombosis development: in Ph(-) MPN patients it was age > 60 years (HR = 2.15, 95% CI = 1.30-3.54; P = 0.003), previous thrombosis (HR = 2.91, 95% CI = 1.69-5.03; P < 0.001), presence of two or more CV risk factors (HR = 3.01, 95% CI = 1.50-6.04; P = 0.002). Ph(-) MPN patients had increased risk for arterial thrombosis if their age was > 60 years (HR = 2.57, 95% CI = 1.43-4.60; P = 0.002), if they had previous thrombosis (HR = 3.68, 95% CI = 2.09-7.21; P < 0.001) and had presence of two or more CV risk factors (HR = 5.53, 95% CI = 2.18-14.00; P < 0.001), while their risk for venous thrombosis was increased if they had V617F burden allele > 26.1 % (HR = 2.19, 95% CI = 1.01-4.74; P = 0.047) and hypertension (HR = 2.76, 95% CI = 1.17-6.51; P = 0.020). In ET, risk for thrombosis was increased for patients that had age > 60 years

(HR = 3.01, 95% CI = 1.39-6.50; P = 0.005), previous thrombosis (HR = 2.73, 95% CI = 1.16-6.44; P = 0.022), presence of two or more CV risk factors (HR = 4.75, 95% CI = 1.58-14.21; P = 0.005) and presence of V617F mutation (HR = 3.06, 95% CI = 1.31-7.14; P = 0.010). ET patients had increased risk for arterial thrombosis if they had age > 60 years (HR = 2.84, 95% CI = 1.22-6.64; P = 0.016), previous thrombosis (HR = 2.64, 95% CI = 1.00-6.95; P = 0.049), presence of two or more CV risk factors (HR = 3.70, 95% CI = 1.22-11.29; P = 0.021) and presence of V617F mutation (HR = 3.56, 95% CI = 1.30-9.76; P = 0.014). In PV patients, risk for thrombosis was increased if they had previous thrombosis (HR = 7.66, 95% CI = 2.61-22.48; P < 0.001) and presence of two or more CV risk factors (HR = 5.59, 95% CI = 1.30-24.13; P = 0.021) while risk for arterial thrombosis was increased for those who had age > 60 years (HR = 3.23, 95% CI = 1.04-10.04; P = 0.043), previous thrombosis (HR = 7.10, 95% CI = 2.41-20.89; P < 0.001) and diabetes (HR = 3.86, 95% CI = 1.31-11.32; P = 0.014). In PMF patients, thrombosis risk was increased in those with at least one allele 290N of S290N polymorphism (HR = 2.22, 95% CI = 1.23-4.01; P = 0.008).

**Conclusions:** This is the first Croatian study that investigated prothrombotic risk factors in Ph(-) MPN patients and, to our knowledge, the most comprehensive and first study worldwide that combined several of most known prothrombotic risk factors and analyzed them separately and jointly to investigate their contribution to arterial and venous thrombosis in PV, ET and PMF patients. In our study, we emphasized the influence of presence of cardiovascular risk factors as well as importance of their number in Ph(-) MPN patients. As far as we know, this is the first study that investigated influence of several *HPA*, *P-SEL* and *P-SGLI* polymorphisms in these patients, and we discovered that *HPA-2*, *HPA-5* and *P-SEL* S290N increased risk for thrombosis development. Also, we showed that the same parameters do not contribute to arterial and venous thrombosis development and that they should be investigated separately. This study should deepen our knowledge of the thrombosis etiology in Ph(-) MPN patients and show the importance of several new risk factors whose influence should be confirmed in a prospective study with a larger cohort of Ph(-) MPN patients.

**Keywords:** Ph(-) MPN, thrombosis, blood counts, polymorphisms, *P-SEL*, *PSGL-1*, *HPA*, *FV* Leiden, *FII* G20210A, V617F mutation

## POPIS KRATICA

ADP	adenozin difosfat (engl. <i>adenosine diphosphate</i> )
AIC	parametar za procjenu prediktivne mogućnosti pogreške i kvalitete modela (engl. <i>Akaike information criterion</i> )
APC	aktivirani protein C
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
BCR-ABL1	fuzijski gen/fuzijski protein koji se sastoji od regija u kojoj se grupiraju prijelomi (engl. <i>Breakpoint cluster region</i> ) i Abelsonove tirozin kinaze (engl. <i>Abelson tyrosin kinase</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CALR	kalretikulin gen/protein
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CRS	konsenzusni ponavljajući slijedovi (engl. <i>consensus repeat sequences</i> )
CT	kompjuterizirana tomografija
CT ciklus	granični ciklus (engl. <i>cycle threshold</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfati
DVT	duboka venska tromboza
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i> )
ET	esencijalna trombocitoza
FAM	6-karboksifluorescein
FRET	Försterova rezonancija prijenosa energije (engl. <i>Förster resonance energy transfer</i> )



FII G20210A	točkasta mutacija koja dovodi do zamjene gvanina adeninom na 20210. položaju u 3' nekodirajućoj regiji gena faktor 2
FV Leiden	točkasta mutacija zamjene gvanina adeninom na 1691. položaju u eksonu 10 gena faktor 5
GP	glikoprotein
H-L GOF	Hosmer-Lemeshow pretpostavljeni oblik distribucije (engl. <i>Hosmer-Lemeshow goodness of fit</i> )
HPA	ljudski trombocitni aloantigeni (engl. <i>human platelet alloantigens</i> )
HR	omjer rizika (engl. <i>Hazard ratio</i> )
IM	srčani udar (engl. <i>myocardial infarction</i> )
IMU	ishemijski moždani udar
IPSET	Internacionalni prognostički model SZO za nastanak tromboze (engl. <i>International Prognostic Score of Thrombosis in World Health Organization</i> )
IQR	interkvartilni raspon
JAK2	Janus kinaza 2
JH (domena)	Janus kinaza homologna domena
K <sub>3</sub> EDTA	kalijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline
KML	kronična mijeloična leukemija
KV	kardiovaskularan
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
M	medijan
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. <i>mitogen activated protein kinase</i> )
Max	najviša vrijednost
MGB	molekula koje se veže za manje utore (engl. <i>minor groove binder</i> )

Min	najniža vrijednost
MPL	leukemijski mijeloproliferativni virus
MPN	mijeloproliferativni zloćudni tumori (engl. <i>Myeloproliferative neoplasms</i> )
MPN&MPNr-Euronet	Europska mreža eksperata za molekularnu dijagnostiku MPN i MPN povezanih urođenih bolesti
MR	magnetska rezonancija
NFQ	prigušivač bez fluorescencije (engl. <i>nonfluorescent quencher</i> )
OR	odjek rizika (engl. <i>odds ratio</i> )
Pb	par baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	plućna embolija
Ph1 (kromosom)	Philadelphia 1 (kromosom)
PI3K	fosfatidil inozitol 3 kinaza (engl. <i>phosphatidyl inositol 3 kinase</i> )
PMF	primarna mijelofibroza
P-SEL	P-selektin
PSGL-1	P-selektin glikoprotein ligand 1
PV	policitemija vera
Q1 i Q3	prvi i treći kvartil
RAS	obitelj onkogeni koji sudjeluju u staničnom signaliziranju
RE	restriksijska endonukleaza
RFLP	polimorfizmi određeni duljinom restriksijskog fragmenta (engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
Rn	normalizirani izvjestiteljski signal

ROC	statistička metoda temeljena na osjetljivosti i specifičnosti testa (engl. <i>receiver-operating characteristic analysis</i> )
ROX	karboksi-x-rodamin
RQ-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>Single nucleotid polymorphism</i> )
SSP	početnice specifičnog slijeda (engl. <i>sequence specific primer</i> )
STAT	prijenosnik signala i aktivator transkripcije (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TAMRA	tetrametilrodamin
TBE pufer	tris-borna kiselina-etilendiamintetra octena kiselina pufer
TF	tkivni faktor
TIA	prolazni ishemijski napadaj (engl. <i>transitory ischemic attack</i> )
T <sub>m</sub>	temperatura taljenja (engl. <i>melting temperature</i> )
UNG	uracil N-glikozilaza
UZV	ultrazvuk
VIC	2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6 karboksi-fluorescein
VNTR	varijabilan broj tandemskih ponavljanja (engl. <i>variable number of tandem repeats</i> )
VWF	Von Willebrandov faktor
V617F	zamjena aminokiseline valin u fenilalanin na položaju 617
$\bar{x}$	srednja vrijednost
$\chi^2$	hi-kvadrat

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Mijeloproliferativni zloćudni tumori .....	1
1.2. Definicija i podjela .....	2
1.3. Molekularna podloga Ph(-) MPN .....	2
1.3.1. Gen <i>JAK2</i> .....	3
1.3.2. Mutacije gena <i>JAK2</i> .....	4
1.3.2.1. Mutacija V617F u genu <i>JAK2</i> .....	4
1.3.2.2. Opterećenje mutiranim alelom V617F u genu <i>JAK2</i> .....	5
1.3.2.3. Mutacije u eksonu 12 gena <i>JAK2</i> .....	6
1.3.3. Ostale mutacije karakteristične za Ph(-) MPN .....	6
1.4. Esencijalna trombocitoza.....	7
1.4.1. Tromboza u bolesnika s esencijalnom trombocitozom .....	8
1.5. Policitemija vera .....	9
1.5.1. Tromboza u bolesnika s policitemijom verom .....	10
1.6. Primarna mijelofibroza .....	10
1.6.1. Tromboza u bolesnika s primarnom mijelofibrozom .....	12
1.7. Rizični faktori za nastanak tromboze u općoj populaciji .....	13
1.8. Patogeneza arterijske tromboze .....	14
1.9. Patogeneza venske tromboze .....	15
1.10. Etiologija tromboze u Ph(-) MPN.....	15
1.10.1. Faktori koji su u većini istraživanja povezani s rizikom za nastanak arterijske i/ili venske tromboze .....	16
1.10.1.1. Dob bolesnika prilikom postavljanju dijagnoze .....	16
1.10.1.2. Leukocitoza.....	16
1.10.1.3. Prethodna tromboza .....	16
1.10.1.4. Prisutnost mutacije V617F u genu <i>JAK2</i> .....	17
1.10.2. Faktori koji još nisu dovoljno istraženi u etiologiji tromboze u Ph(-) MPN.....	17
1.10.2.1. Opterećenje mutiranim alelom V617F <i>JAK2</i> .....	17
1.10.2.2. Trombociti.....	18
1.10.2.3. <i>FV</i> Leiden i mutacija <i>FII</i> G20210A.....	18
1.10.2.4. Hematokrit/koncentracija hemoglobina.....	19
1.10.2.5. Prisutnost kardiovaskularnih rizičnih faktora .....	19

1.10.2.6.	Polimorfizmi ljudskih trombocitnih aloantigena .....	19
1.11.	Patogeneza tromboze u Ph(-) MPN .....	20
1.12.	Uloga genetskih polimorfizama na nastanak tromboze .....	21
1.12.1.	Ljudski trombocitni aloantigeni.....	21
1.12.1.1.	Kompleks GPIIb/IIIa .....	22
1.12.1.1.1.	Polimorfizmi kompleksa GPIIb/IIIa .....	24
1.12.1.2.	Kompleks GPIa/IIa .....	26
1.12.1.2.1.	Polimorfizmi kompleksa GPIa/IIa .....	26
1.12.1.3.	Kompleks GPIb/IX/V .....	27
1.12.1.3.1.	Polimorfizmi kompleksa GPIb/IX/V .....	28
1.12.2.	Selektini .....	28
1.12.2.1.	P-selektini .....	29
1.12.2.1.1.	Polimorfizmi <i>P-SEL</i> .....	30
1.12.2.1.2.	P-selektin glikoprotein ligand 1 .....	31
1.12.2.1.3.	Polimorfizmi <i>PSGL-1</i> .....	32
1.12.3.	<i>FV</i> Leiden .....	33
1.12.4.	<i>FII</i> G20210A .....	35
<b>2.</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA .....</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>41</b>
4.1.	Ispitanici .....	41
4.2.	Metode .....	43
4.2.1.	Analiza krvne slike.....	43
4.2.2.	Izdvajanje genomske i granulocitne DNA .....	43
4.2.3.	Mjerenje koncentracije i čistoće DNA .....	44
4.2.4.	Analiza točkaste mutacije V617F u genu <i>JAK2</i> .....	44
4.2.5.	Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom V617F.....	46
4.2.6.	Genotipizacija polimorfizama <i>HPA</i> .....	51
4.2.7.	Genotipizacija polimorfizama <i>P-SEL</i> i <i>PSGL-1</i> .....	55
4.2.8.	Genotipizacija polimorfizma <i>FV</i> Leiden.....	60
4.2.9.	Genotipizacija polimorfizma <i>FII</i> G20210A.....	63
4.3.	Statistička analiza .....	65

<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>68</b>
5.1. Učestalost i vrste nastalih tromboza .....	68
5.2. Podjela bolesnika prema spolu .....	70
5.3. Spol bolesnika ovisno o pojavi tromboze i vrsti tromboze .....	71
5.4. Dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze prema spolu.....	71
5.5. Dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze i prema nastanku tromboze .....	72
5.6. Dob bolesnika prilikom nastanka prve tromboze i razlike u spolu .....	73
5.7. Terapija Ph(-) MPN bolesnika.....	74
5.8. Vrijeme proteklo od tromboze do postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN .....	75
5.9. Prethodna tromboza .....	79
5.10. Kaplan-Meier krivulje preživljenja bolesnika ovisno o nastanku tromboze .....	79
5.11. Parametri krvne slike.....	81
5.12. Karadiovaskularni rizični faktori u Ph(-) MPN bolesnika .....	86
5.13. Mutacija V617F u genu <i>JAK2</i> .....	92
5.14. Opterećenje mutiranim alelom V617F .....	95
5.15. Hardy-Weinbergova ravnoteža ispitivanih polimorfizama u svih Ph(-) MPN bolesnika i zdravih ispitanika .....	101
5.16. Učestalosti ispitivanih polimorfizama u bolesnika u usporedbi sa zdravim ispitanicima .....	102
5.17. Povezanost ispitivanih polimorfizama u svih Ph(-) MPN bolesnika s trombozom ...	103
5.17.1. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini ET bolesnika s trombozom .....	112
5.17.2. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini PV bolesnika s trombozom .....	118
5.17.3. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini PMF bolesnika s trombozom .....	124
5.18. Učestalosti kombinacije genotipova <i>FV</i> Leiden, <i>FII</i> G20210A, <i>HPA</i> - 5, <i>P-SEL</i> i <i>P-SGLI</i> .....	130
5.19. Učestalost haplotipova polimorfizama u bolesnika s trombozom i bez tromboze te u zdravih ispitanika .....	132
5.20. Multivarijantna analiza .....	134
5.20.1. Multivarijantna analiza Ph(-) MPN bolesnici.....	135
5.20.2. Multivarijantna analiza ET bolesnici.....	137
5.20.3. Multivarijantna analiza PV bolesnici .....	138
5.20.4. Multivarijantna analiza PMF bolesnici.....	139
5.21. Prediktivni modeli za nastanak tromboze .....	141

<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>152</b>
6.1. Učestalost i vrsta tromboze te vrijeme nastanka tromboze .....	152
6.2. Spol.....	155
6.3. Dob .....	155
6.4. Prethodna tromboza.....	157
6.5. Kaplan-Meier krivulje preživljenja bolesnika ovisno o nastanku tromboze .....	157
6.6. Terapija Ph(-) MPN bolesnika.....	158
6.7. Parametri krvne slike .....	158
6.8. Karadiovaskularni rizični faktori.....	161
6.9. Mutacija V617F u genu <i>JAK2</i> i opterećenje mutiranim alelom V617F .....	163
6.10. Polimorfizmi u skupini Ph(-) MPN bolesnika.....	165
6.11. Učestalosti kombinacije genotipova <i>FV</i> Leiden, <i>FII</i> G20210A, <i>HPA- 5</i> , <i>P-SEL</i> i <i>P-SGLI</i> .....	168
6.12. Učestalost haplotipova polimorfizama u bolesnika i zdravih ispitanika .....	170
6.13. Prediktivni modeli za nastanak tromboze .....	170
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>174</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>178</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>193</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Mijeloproliferativni zloćudni tumori

Početak dvadesetog stoljeća znanstvenici su proučavanjem anamneza bolesnika te *post mortem* biopsijom organa i kosti pretpostavili da su policitemija vera, megakariocitna leukemija i mijelosarkoma s leuko-eritroblastnom anemijom skupine bolesti koje su usko povezane te nastaju zbog istog stimulansa. Zaključili su da su sve stanice koje sudjeluju u nastanku ovih bolesti poput osteoblasta, fibroblasta i megakariocita nastale iz iste primitivne stanice čija promjena bi mogla uzrokovati navedene bolesti (1).

Do sličnog zaključka 1951. godine došao je i američki klinički hematolog William Dameshek smatrajući da ove bolesti nastaju zbog proliferacije stanica koštane srži, uz pretpostavku da bi zajednički stimulans za njihov nastanak mogao biti neki hormon. Dameshek je u svom radu po prvi puta uveo novi zajednički naziv za kroničnu mijeloičnu leukemiju, policitemiju veru, esencijalnu trombocitozu i primarnu mijelofibrozu, nazvavši ih mijeloproliferativni poremećaji (2).

Slučajno, kako to obično i biva s velikim znanstvenim otkrićima, 1960. godine biolog Peter Nowell istražujući diferencijaciju tumorskih stanica otkrio je da ispiranje stanica hipotoničnom otopinom vode prije bojanja Giemsom dovodi do vizualizacije metafaznih kromosoma. To otkriće podijelio je s doktorandom Davidom Hungerfordom koji je radio doktorsko istraživanje na temu ljudskih kromosoma. Njih dvojica primjetila su da muški bolesnici oboljeli od kronične mijeloične leukemije (KML) imaju između ostalih kromosoma i jedan mali kromosom za kojeg su u početku pretpostavili da je dio muškog kromosoma Y. Međutim, isti kromosom su potom našli i kod žena oboljelih od KML, što je dovelo do zaključka da je taj kromosom ipak obilježje ove bolesti. Novootkriveni kromosom nazvan je Ph1 kromosom prema američkom gradu Philadelphia u kojem su ga znanstvenici prvi put opazili. Tim pronalaskom KML je postala prva tumorska bolest za koju se zna da je uzrokovana genetičkom promjenom (3).

Nakon toga bilo je potrebno gotovo pola stoljeća da znanstvenici otkriju koji genetički biljeg, osim Ph1 kromosoma u KML, uzrokuje klonalnu proliferaciju stanica mijeloidne loze u mijeloproliferativnim zloćudnim tumorima.



## 1.2. Definicija i podjela

Mijeloproliferativni zloćudni tumori (MPN, engl. *Myeloproliferative neoplasms*) rijetka su skupina hematoloških bolesti koja se pojavljuje uglavnom u odrasloj populaciji. Pripadaju skupini klonalnih hematopoetskih poremećaja nastalih zbog transformacije hematopoetske matične stanice. Tijek bolesti, prognoza bolesti te smrtnost ovisi o samom tipu bolesti te postojećim komorbiditetima.

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016., MPN se dijele na kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML), kroničnu neutrofilnu leukemiju, policitemiju veru (PV), primarnu mijelofibrozu u prefibrotičkoj fazi (rana PMF) i primarnu mijelofibrozu u fibrotičkoj fazi (fibrotička PMF), esencijalnu trombocitozu (ET), kroničnu eozinofilnu leukemiju, neklasificirane MPN te mastocitozu (4).

MPN se mogu podijeliti i na Ph1(+) pozitivne i Ph1(-) negativne zloćudne tumore. Ph1(+) zloćudni tumori podrazumijevaju prisutnost Philadelphia 1 kromosoma nastalog translokacijom t(9;22)(q34.1;q11.2) koji nosi fuzijski gen *BCR-ABL1*. Ovaj gen kodira stvaranje fuzijskog proteina BCR-ABL1 s konstitutivno aktivnom tirozin kinazom koja uzrokuje neprekidno stanično signaliziranje te nekontroliranu proliferaciju mijeloidnih stanica tipičnu za kroničnu mijeloičnu leukemiju (5, 6).

Ph(-) MPN se najčešće dijeli na tri različita tipa bolesti, policitemiju veru, esencijalnu trombocitozu i primarnu mijelofibrozu (4, 7, 8). Karakteristika ove 3 bolesti je neosjetljivost progenitorskih matičnih stanica na stanično signaliziranje pomoću citokina pri čemu dolazi do konstantne aktivacije signalnih puteva što dovodi do pretjeranog stvaranja stanica hematopoeze (9).

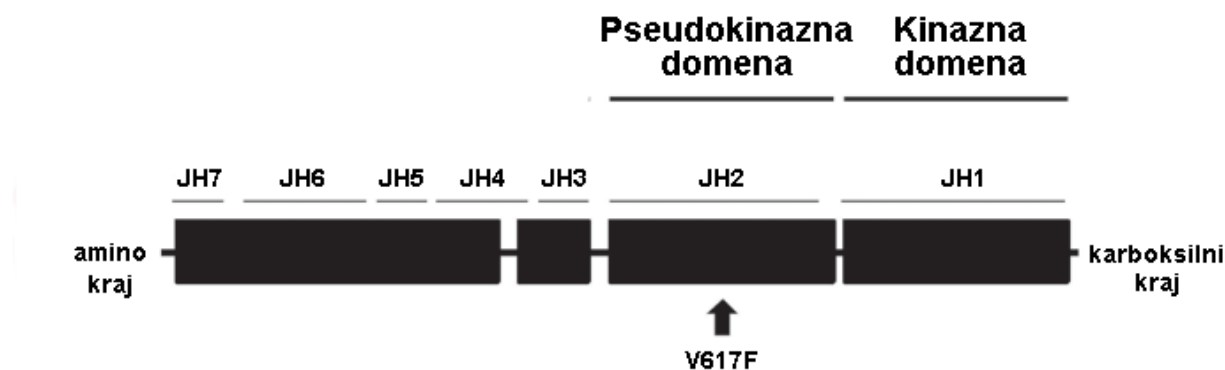
## 1.3. Molekularna podloga Ph(-) MPN

U ovoj skupini bolesti otkrivena su 3 gena s najčešćim pogonskim mutacijama koje su uglavnom međusobno isključive. To su mutacija V617F u genu *JAK2* (engl. *Janus kinase 2*) u eksonu 14 i mutacije gena *JAK2* u eksonu 12, mutacije gena *CALR* (engl. *calreticulin*) i mutacije gena *MPL* (engl. *myeloproliferative leukemia virus*).

### 1.3.1. Gen *JAK2*

Gen *JAK2* pripada obitelji gena *JAK* u kojoj se nalaze i geni Janus kinase 1, Janus kinase 3 i Tyrosine kinase 2. U zdravih ljudi protein JAK2 koji nastaje iz gena *JAK2* djeluje kao tirozin kinaza udružena s receptorima koji nemaju samostalnu kinaznu aktivnost poput receptora za eritropoetin, trombopoetin i receptora za faktor rasta granulocitnih kolonija. Vežanje citokina, hormona i faktora rasta na takve receptore dovodi do multimerizacije dijelova receptora s citoplazmatskim domenama koje su povezane s proteinom JAK2. Ta konformacijska promjena dovodi do autofosforilacije i aktivacije proteina JAK2, koji posljedično prenosi fosfatnu skupinu na protein STAT (engl. *Signal transducer and activator of transcription*) i uzrokuje njegovu dimerizaciju i aktivaciju. Aktivirani STAT potom ulazi u jezgru stanice i djeluje kao aktivator transkripcije ciljnih gena čime se regulira njihova ekspresija (8, 10, 11).

Protein JAK2 sastoji se od 7 homolognih domena naziva JAK homologne (JH) domene nazvanih brojevima od 1 do 7. Na kraju domene JH1 nalazi se karboksilna skupina potrebna za regulaciju staničnog signaliziranja a na kraju domene JH7 vezana je amino skupina bitna za stabilizaciju receptora JAK2 i vežanje citokina (Slika 1.). Svaka od domena ima svoju ulogu. Domena JH1 ima kinaznu aktivnost dok domena JH2 ima pseudokinaznu aktivnost. Strukturna razlika u ove dvije domene je u slijedu aminokiselina potrebnih za katalitičku aktivnost domene pri čemu domena JH2 ne može prenositi fosfatnu skupinu zbog čega je katalitički neaktivna. Glavna uloga domene JH2 je inhibicija domene JH1 dok ne postoji aktivacija citokinima.



**Slika 1.** Struktura proteina JAK2 i mjesto gdje nastaje mutacija V617F (modificirano prema 10).

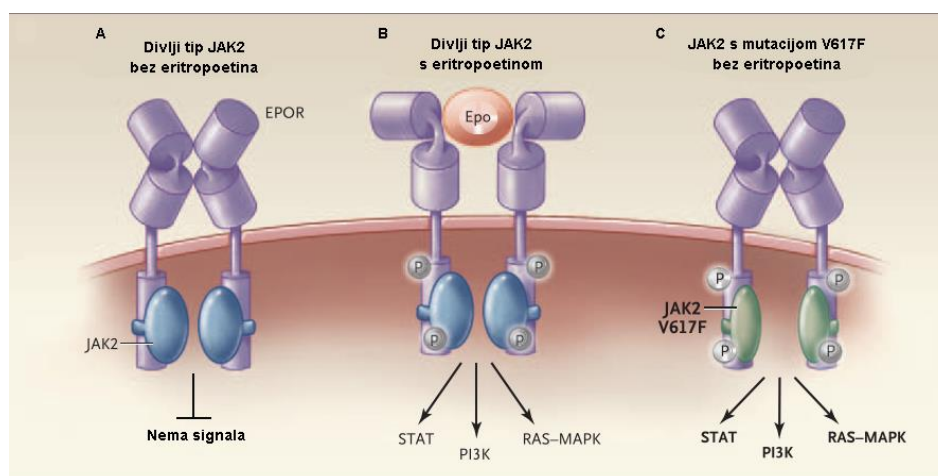
## 1.3.2. Mutacije gena *JAK2*

### 1.3.2.1. Mutacija V617F u genu *JAK2*

Prva pogonska mutacija otkrivena u ovoj skupini bolesti bila je mutacija V617F u genu *JAK2*. To je ujedno i najčešća mutacija u bolesnika sa Ph(-) MPN.

Iste, 2005. godine, otkrile su je četiri neovisne istraživačke skupine, čime je prvi put otkriven molekularni biljeg kao obilježje ovih bolesti (7, 9, 12, 13). To je bilo važno saznanje jer je ova mutacija nađena u 95 % bolesnika s PV, te 50-60 % bolesnika s ET i PMF čime je ujedno bilo potvrđeno da su ove bolesti zaista klonalnog podrijetla (7, 8).

Mutacija V617F u genu *JAK2* je stečena točkasta mutacija zamjene gvanina timinom na položaju 1849. u eksonu 14 koja dovodi do zamjene aminokiseline valin u fenilalanin na položaju 617 u pseudokinaznoj domeni JH2 proteina *JAK2*. Ta zamjena uzrokuje destabilizaciju proteinske strukture te sprječava inhibitornu ulogu domene JH2 i dovodi do konstantne i o citokinima neovisne aktivacije kinazne domene JH1. Posljedično tome aktiviraju se signalni putevi JAK-STAT, fosfatidil inozitol 3 kinaza (engl. *phosphatidyl inositol 3 kinase*, PI3K), onkogeni obitelj RAS i mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen activated protein kinase*, MAPK) što u konačnici dovodi do proliferacije mijeloidnih stanica (8, 10) (Slika 2.).



**Slika 2.** Funkcija proteina *JAK2* bez mutacije i s mutacijom V617F (A) Receptor za eritropoetin (EPOR) u odsustvu svog liganda veže *JAK2* u obliku neaktivnog dimera (B) vezanje eritropoetina za receptor uzrokuje konformacijsku promjenu receptora što dovodi do fosfosforilizacije proteina

JAK2 i citoplazmatskog dijela EPOR. Time započinje stanično signaliziranje posredovano proteinom JAK2, prijenosnikom signala i aktivatorom transkripcije (STAT), PI3K te proteinima RAS i MAPK. (C) U stanicama koje nose mutaciju V617F, prijenos signala je konstantno prisutan, unatoč tome što nema eritropoetina (modificirano prema 8).

#### 1.3.2.2. Opterećenje mutiranim alelom V617F u genu *JAK2*

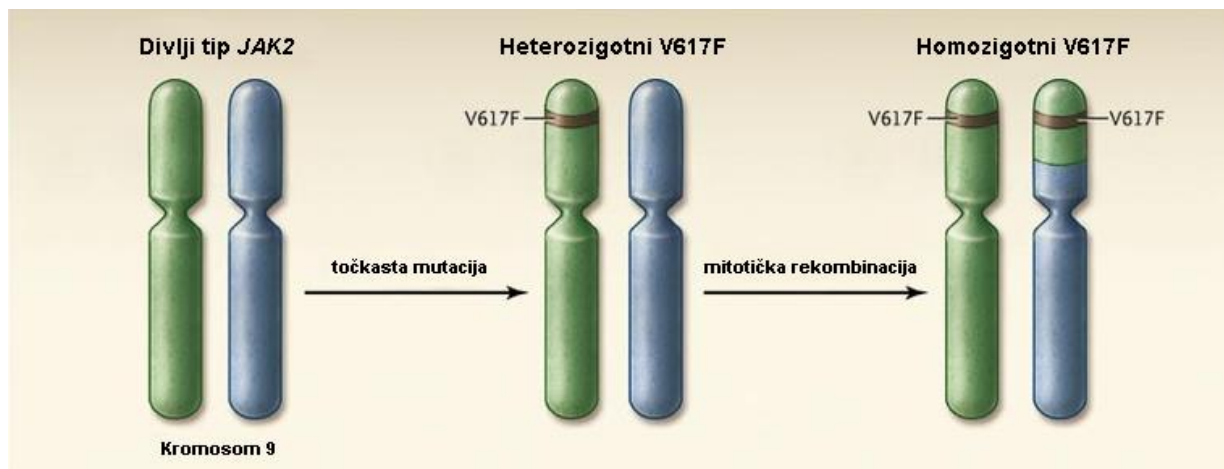
Svaka hematopoetska stanica s jezgrom ima dva alela gena *JAK2*. Ako stečena mutacija V617F nastane samo na jednom alelu, takva vrsta stanice je heterozigotna za mutaciju V617F. S obzirom na to da ova mutacija nastaje najčešće na razini progenitorske usmjerene matične stanice koja se dijeli mitotičkom rekombinacijom, za očekivati je, nakon dužeg vremena, da će većina mijeloidnih stanica zahvaćenih mutacijom steći mutaciju V617F i na drugom alelu. Takva stanica s oba mutirana alela je homozigotna za mutaciju V617F (8,14) (Slika 3.).

Otprilike 30 % bolesnika s PV i PM te 2-4 % bolesnika s ET ima ovu mutaciju u homozigotnom obliku što znači da više od 50 % njihovih granulocita nose mutaciju V617F (15).

Obzirom na to da je istraživanjem potvrđeno da se iz populacije granulocita dobivaju najtočniji rezultati opterećenja mutiranim alelom V617F, kako prilikom dijagnoze tako i nakon terapije bolesnika, poželjno je kvantificirati mutaciju V617F u uzorku s izdvojenom granulocitnom DNA (16).

Smatra se da što je veće opterećenje mutiranim alelom to su jače aktivirani stanični signalni putevi što utječe na hematološke parametre, tijekom bolesti te incidenciju trombotičkih događaja (17–19).

Istraživanja koja su obuhvatila veći broj V617F pozitivnih ET bolesnika dobila su medijan opterećenja mutiranim alelom V617F od 19,9 -23 % uz interkvartilni raspon od 8,2-38,8 % te najniže i najviše opterećenje mutiranim alelom od 1-94 % (20, 21). U PV bolesnika prosječno opterećenje iznosi 46 % uz raspon najniže i najviše vrijednost 1-100 % (21, 22) dok u PMF bolesnika, ovisno o istraživanju, medijan opterećenja iznosi 29-48,8 % uz raspon najviše i najniže vrijednosti 1-100 % (23, 24).



**Slika 3.** Razvijanje homozigotnog oblika mutacije V617F u genu *JAK2*. Divlji tip gena *JAK2* nalazi se na 9. kromosomu. Prvi korak je nastajanje stečene točkaste mutacije V617F u jednom alelu, time nastaje heterozigotni oblik kromosoma. Tijekom vremena mitotičkom rekombinacijom stanica koje nose jedan alel V617F može nastati mutacija i na drugom alelu pri čemu je nastali kromosom homozigot za mutaciju V617F (modificirano prema 8).

### 1.3.2.3. Mutacije u eksonu 12 gena *JAK2*

Ove mutacije javljaju se u 3 % PV bolesnika negativnih na mutaciju V617F. Mutacije se nalaze u blizini pseudokinazne domene gena *JAK2*. One mogu biti rezultat supstitucije, delecije ili duplikacije nukleotida. Ovisno o tome koji nukleotid je zahvaćen mogu uzrokovati i zamjenu aminokiselina u proteinu. Djeluju na način da ometaju veze između pseudokinazne JH2 i kinazne domene JH1 u proteinu što dovodi do konstantne aktivacije kinazne domene JH1, međutim ove mutacije uzrokuju proliferaciju samo eritroidne loze (25-27).

### 1.3.3. Ostale mutacije karakteristične za Ph(-) MPN

Kao molekularni biljeg Ph(-) MPN bolesnika negativnih na mutaciju u genu *JAK2* javljaju se mutacije u genu *MPL*. Taj gen kodira trombopoetinski receptor, a 2006. godine su u genu pronađene točkaste mutacije u bolesnika s esencijalnom trombocitozom i primarnom mijelofibrozmom (28, 29). Sljedeće važno otkriće bilo je tek 2013. godine kad su pronađene mutacije u eksonu 9 gena *CALR* koje se javljaju u bolesnika s esencijalnom trombocitozom i primarnom mijelofibrozmom koji nemaju mutaciju V617F u genu *JAK2* ili mutaciju gena *MPL*. One mogu biti insercije, delecije ili kombinacije insercija i delecija (30-32).

## 1.4. Esencijalna trombocitoza

Ovo je najdobroćudnija bolest u skupini Ph(-) MPN koju karakterizira povišeni broj trombocita u perifernoj krvi. Pojavnost u Europljana iznosi od 0,38-1,70 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje. Najčešća životna dob pri postavljanju dijagnoze je između 64-73 godina, te je bolest nešto češća u žena (0,6-2,0 bolesnica u odnosu na 0,4-2,0 bolesnika na 100 000 ljudi) (33).

Mutacija V617F u genu *JAK2* prisutna je u 55 % bolesnika dok 15-24 % bolesnika ima mutaciju gena *CALR* te 3 % bolesnika mutaciju gena *MPL* (34).

Očekivano preživljenje nakon 5 godina u europskoj populaciji iznosi oko 90 % (20, 35). Istraživanja pokazuju da postoji značajna razlika u dužini preživljenja ovisno o tome je li bolesnik pri postavljanju dijagnoze stariji ili mlađi od 60 godina. Unatoč relativno dugom preživljenju nakon dijagnoze, ovi bolesnici ipak kraće žive u odnosu na zdravu populaciju iste dobi. Oko 9 % bolesnika s vremenom razviju mijelofibrozu. U 3,8 % ET bolesnika dolazi do transformacije bolesti u akutnu leukemiju (36).

Prema SZO kriteriji za postavljanje dijagnoze esencijalne trombocitoze dijele se na glavne i sporedne kriterije (Tablica 1.), pri čemu je potrebno zadovoljiti četiri glavna kriterija ili tri glavna i jedan sporedni kriterij (4):

**Tablica 1.** Dijagnostički kriteriji za ET prema SZO (prema literaturi 4).

<b>Glavni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Broj trombocita u perifernoj krvi <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Biopsija koštane srži prikazuje proliferaciju uglavnom megakariocitne loze pri čemu su megakariociti veći, zreli s hiperlobuliranom jezgrom. Nije prisutan značajan porast ili „pomak ulijevo“ neutrofilne granulopoeze ili eritropoeze te je vrlo rijetko prisutno povećano stvaranje retikulinskih vlakana (faza 1)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ne postoje kriteriji SZO za prisutnost gena <i>BCR-ABL1</i>, <i>KML</i>, <i>PV</i>, <i>PMF</i>, mijelodisplastičnog sindroma ili drugog mijeloidnog zloćudnog tumora</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Dokazana prisutnost mutacije u genu <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ili <i>MPL</i></li></ul>
<b>Sporedni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Postojanje jednog od klonalnih biljega ili nedostatak dokaza o reaktivnoj trombocitozi</li></ul>

### 1.4.1. Tromboza u bolesnika s esencijalnom trombocitozom

Najčešće komplikacije ove bolesti su tromboze koje se događaju u 17-33 % bolesnika ovisno o njihovom *JAK2* statusu (je li mutiran ili ne) (37). S obzirom na to saznanje javila se potreba za prognostičkim bodovanjem koje predviđa nastanak tromboze. Prema modelu nazvanom IPSET- tromboza u ET (engl. *International Prognostic Score of Thrombosis in World Health Organization - essential thrombocythemia*) bolesnici su podijeljeni u kategoriju niskog, srednjeg i visokog rizika za nastanak tromboze (Tablica 2.) (38).

**Tablica 2.** IPSET model za bodovanje nastanka tromboze (prema literaturi 38).

Rizični faktor	Omjer rizika	Bodovi
Dob > 60 godina	1,50	1
Kardiovaskularni rizični faktor	1,56	1
Prethodna tromboza	1,93	2
Mutacija V617F u genu <i>JAK2</i>	2,01	2

Bolesnici koji imaju zbroj bodova 0 - 1 imaju nizak rizik za nastanak tromboze, zbroj bodova 2 nosi srednji rizik, dok bolesnici sa zbrojem bodova  $\geq 3$  imaju visok rizik za nastanak tromboze.

Osim ovog prognostičkog modela, koji je revidiran 2015. godine pri čemu su KV rizični faktori isključeni iz bodovanja rizika te je uključena dodatna kategorija vrlo niskog rizika (39), 2019. su izašli najnoviji podaci o dijagnosticiranju te praćenju i stratifikaciji rizika koji bolesnike s ET dijele u 4 rizične kategorije za nastanak tromboze. Bolesnici vrlo niskog rizika (mlađi od 60 godina, bez prethodne tromboze i bez prisutnosti mutacije V617F), niskog rizika (isti uvjeti kao i kod vrlo niskog rizika uz pozitivnu mutaciju V617F), srednjeg rizika (stariji od 60 godina, bez prethodne tromboze i bez prisutnosti mutacije V617F) i visokog rizika (stariji od 60 godina i pozitivna mutacija V617F ili prethodna tromboza) (40).

Analizirajući vrijeme nastanka tromboze dosadašnja istraživanja uglavnom pokazuju da se tromboze najčešće događaju prilikom dijagnosticiranja bolesti ili nekoliko godina prije postavljanja dijagnoze. U dvije trećine ET bolesnika nastaju arterijske tromboze poput ishemijskog moždanog udara (IMU), srčanog udara (IM) ili periferne arterijske tromboze dok su najčešći venski događaji duboka venska tromboza (DVT), plućna embolija (PE), moždana i abdominalna venska tromboza te površinski tromboflebitis (20, 41).

## 1.5. Policitemija vera

Karakteristike ovog Ph(-) MPN-a povišene su vrijednosti hematokrita i koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi. Osim toga, ponekad je prisutna leukocitoza i/ili trombocitoza. Gotovo svi bolesnici imaju mutacije u genu *JAK2*. Više od 95 % bolesnika ima prisutnu mutaciju V617F u eksonu 14, dok 3 % bolesnika ima pozitivnu neku od mutacija u eksonu 12 gena *JAK2* (27).

Pojavnost ove bolesti na području Europe iznosi između 0,7-2,6 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje. Malo češće se pojavljuje u muškaraca (0,5-3,0 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje) u odnosu na žene (0,3-2,8 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje). Bolesnici najčešće imaju između 65-74 godina života prilikom postavljanja dijagnoze (33).

Očekivano preživljenje nakon 5 godina u europskoj populaciji iznosi 84,8 % (35). Preživljenje ovisi o velikom broju faktora a jedan od glavnih je dob prilikom postavljanja dijagnoze, pri čemu bolesnici stariji od 60 godina imaju značajno kraće preživljenje. Poznato je da se bolest s vremenom transformira u mijelofibrozu 12,5-21 % bolesnika ili akutnu leukemiju u 6,8 % bolesnika (36).

Kriteriji prema SZO za postavljanje dijagnoze policitemije vere dijele se na glavne i sporedne kriterije, pri čemu je potrebno zadovoljiti sva tri glavna kriterija ili prva dva glavna i jedan sporedni kriterij (Tablica 3.) (4).

**Tablica 3.** Dijagnostički kriteriji za PV prema SZO (prema literaturi 4).

<b>Glavni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Koncentracija hemoglobina u perifernoj krvi u muškaraca &gt; 165 g/L; u žena &gt; 160 g/L ili hematokrit u perifernoj krvi &gt; 0,49 L/L u muškaraca; u žena &gt; 0,48 L/L ili povećana masa eritrocita (više od 25 % od normalne predviđene srednje vrijednosti)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Biopsija koštane srži pokazuje hiperstaničnost u odnosu na dob sa rastom sve 3 loze mijelopoete (panmijeloza) uključujući značajnu proliferaciju eritroidne, granulocitne i megakariocitne loze sa prisutnošću pleomorfnih zrelih megakariocita (različitih po veličini)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Dokazana prisutnost mutacije V617F u genu <i>JAK2</i> ili mutacija u eksonu 12 gena <i>JAK2</i></li></ul>
<b>Sporedni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Koncentracija eritropoetina u serumu ispod referentnog intervala</li></ul>



### **1.5.1. Tromboza u bolesnika s policitemijom verom**

U ovoj skupini MPN bolesnika najveća je učestalost tromboze. Prema dosad objavljenim studijama tromboza nastaje u 23-41 % bolesnika. Velika multicentrična studija rađena na 1638 PV bolesnika iz 2005. godine prepoznala je dob > 65 godina i pojavu prethodne tromboze kao najbitnije rizične faktore za nastanak ponavljajuće tromboze (42). Najnoviji podaci o dijagnosticiranju te praćenju i stratifikaciji rizika za nastanak tromboze iz 2019. godine ukazuju da se bolesnici prema godinama i prethodnoj trombozi dijele na visokorizične (> 60 godina pri dijagnozi ili prethodna tromboza) te niskog rizika (< 60 godina i bez prethodne tromboze) (40).

Tromboza najčešće nastaje u trenutku dijagnosticiranja bolesti ili prije postavljanja dijagnoze dok u manjem broju bolesnika nastaje tijekom praćenja bolesti uz pretpostavku da je to rezultat terapije bolesnika. Postoje oprečni rezultati o učestalosti arterijskih u odnosu na venske tromboze, pri čemu su neki autori tijekom praćenja bolesti zabilježili podjednaku učestalost arterijskih i venskih događaja (42) za razliku od istraživanja u kojem su se češće pojavljivale arterijske u odnosu na venske tromboze (43). Kao najčešći arterijski trombotički događaji javljaju se prolazni ishemijski napadaj (engl. *transitory ischemic attack*, TIA), IM, IMU te periferna arterijska tromboza. Od venskih tromboza najčešće su površinski tromboflebitis i DVT (42, 43).

### **1.6. Primarna mijelofibroza**

Primarna mijelofibroza rijedak je i agresivan oblik Ph(-) MPN koji se odvija u dvije faze. Prva je prefibrotička ili stanična faza, a druga je faza razvijenog oblika PMF. Pojavljuje se u 0,3 bolesnika na 100 000 ljudi godišnje. Češća je u muškaraca 0,32-0,90 u odnosu na žene 0,20-0,70 na 100 000 ljudi godišnje (33). Od molekularnih biljega, 60 % bolesnika ima mutaciju V617F u genu *JAK2*, 22 % bolesnika ima mutaciju u genu *CALR*, dok je oko 6 % bolesnika pozitivno na mutaciju u genu *MPL* (36).

Bolesnici u prosjeku imaju između 69-76 godina života prilikom postavljanja dijagnoze (33). Ovaj Ph(-) MPN prati najkraće preživljenje. Očekivano preživljenje nakon 5 godina doživi 39,0 % bolesnika (44). Preživljenje između ostalih faktora ovisi i o dobi bolesnika pri postavljanju dijagnoze pri čemu stariji od 60 godina žive kraće.

Bolest se s vremenom u 14,2 % bolesnika transformira u akutnu leukemiju. Istraživanja pokazuju da na duljinu preživljenja utječe i prisutnost pogonskih mutacija, tako da bolesnici koji su trostruko negativni (12 % bolesnika koji nisu pozitivni na mutacije u genima *JAK2*, *MPL* ili *CALR*) žive znatno kraće u odnosu na ostale (36).

Kriteriji prema SZO za postavljanje dijagnoze prefibrotičke (stanične) faze primarne mijelofibroze dijele se na glavne i sporedne kriterije, pri čemu je potrebno zadovoljiti sva tri glavna kriterija i barem jedan sporedni kriterij (Tablica 4.) (4).

**Tablica 4.** Dijagnostički kriteriji za prefibrotičku fazu PMF (prema literaturi 4).

<b>Glavni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferacija i atipija megakariocita, bez retikulinske fibroze &gt; stupanj 1, praćena porastom celularnosti koštane srži, proliferacijom granulocita i često smanjenom eritropoezom</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne postoje SZO kriteriji za ET, PV, prisutnost gena <i>BCR-ABL1</i>, <i>KML</i>, mijelodisplastičnog sindroma ili drugog mijeloidnog zloćudnog tumora</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dokazana prisutnost mutacije u genu <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ili <i>MPL</i> ili u nedostatku ovih mutacija, dokazana prisutnost nekog drugog klonalnog biljega ili ne postojanje reaktivne retikulinske fibroze koštane srži</li> </ul>
<b>Sporedni kriteriji</b>
Potrebno je potvrditi barem jedan od sljedećih kriterija u 2 uzastopna ispitivanja:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemija koja nije uzrokovana komorbiditetom</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukocitoza u perifernoj krvi <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Palpatorna splenomegalija</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentracija LDH u serumu viša od gornje granice referentnog intervala</li> </ul>

Kriteriji prema SZO za postavljanje dijagnoze razvijene primarne mijelofibroze dijele se na glavne i sporedne kriterije, pri čemu je potrebno zadovoljiti sva tri velika glavna i barem jedan sporedni kriterij (Tablica 5.) (4).

**Tablica 5.** Dijagnostički kriteriji za razvijenu PMF (prema literaturi 4).

<b>Glavni kriteriji</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Postojanje proliferacije i atipije megakariocita praćenih retikulinskom ili kolagenskom fibrozom stupnja 2 ili 3</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ne postoje SZO kriteriji za ET, PV, prisutnost gena <i>BCR-ABL1</i>, <i>KML</i>, mijelodisplastičnog sindroma ili drugog mijeloidnog zloćudnog tumora</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Dokazana prisutnost mutacije u genu <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ili <i>MPL</i> ili u nedostatku ovih mutacija, dokazana prisutnost nekog drugog klonalnog biljega ili ne postojanje reaktivne retikulinske fibroze koštane srži</li></ul>
<b>Sporedni kriteriji</b>
Potrebno je potvrditi barem jedan od sljedećih kriterija u 2 uzastopna ispitivanja:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Anemija koja nije uzrokovana komorbiditetom</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Leukocitoza u perifernoj krvi <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Palpatorna splenomegalija</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Koncentracija LDH u serumu viša od gornje granice referentnog intervala</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Leukoeritoblastoza</li></ul>

### 1.6.1. Tromboza u bolesnika s primarnom mijelofibrozmom

S obzirom na to da postoji visoka smrtnost u ovih bolesnika, većina prognostičkih modela napravljenih za PMF bolesnike bavi se samo predviđanjem duljine njihovog preživljenja a ne i rizičnim faktorima za nastanak tromboze, što potvrđuju i najnoviji podaci o dijagnosticiranju te praćenju i stratifikaciji rizika ovih bolesnika iz 2019. godine (45).

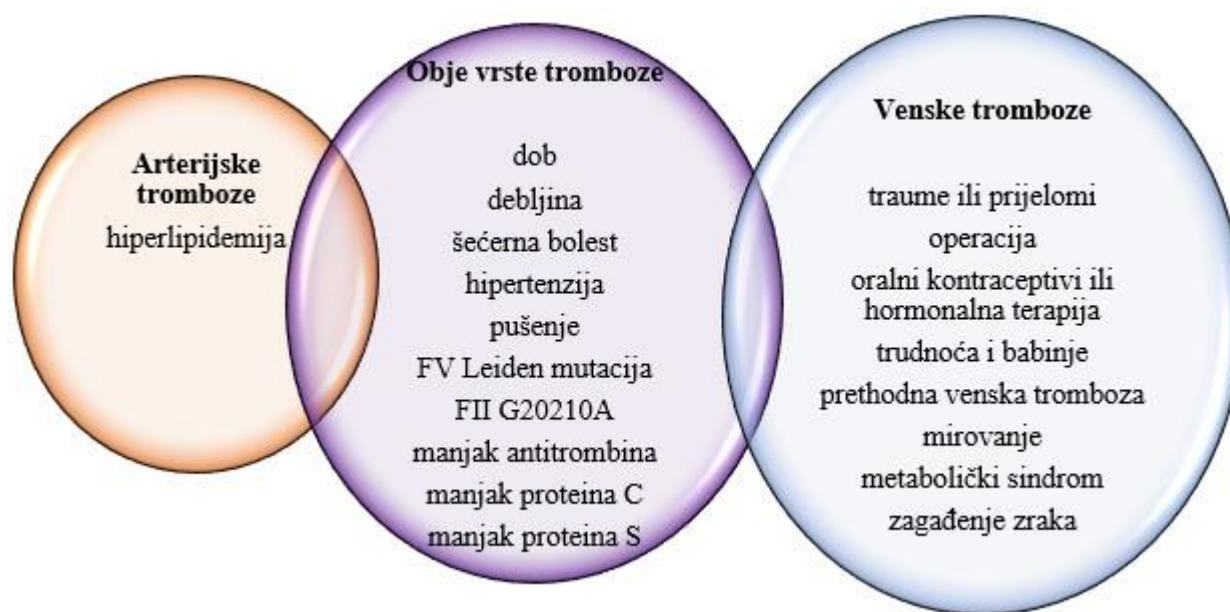
Informacije o učestalosti tromboze u ovih bolesnika nisu ujednačene jer ovise o samom konceptu istraživanja te jesu li uključeni svi bolesnici s PMF ili postoji podjela na prefibrotičku i razvijenu fazu PMF. Studija s bolesnicima u prefibrotičkoj fazi u kojoj su bilježeni trombotički događaji prije i tijekom postavljanja dijagnoze te tijekom praćenja bolesti pokazala je da je trombozu prije i tijekom postavljanja dijagnoze doživjelo 21,9 % bolesnika dok je prilikom praćenja bolesti tromboza nastupila u 20,8 % bolesnika (46). Dvostruko manju pojavu tromboze zabilježila je studija koja je uključila samo bolesnike s razvijenom fazom PMF u kojoj je pri dijagnozi ili neposredno prije dijagnoze trombozu doživjelo 11,6 % bolesnika (47).

Neki istraživači bilježili su samo trombotičke događaje tijekom praćenja bolesti neovisno o fazi PMF-a. Tako su Barbui i sur. zabilježili trombozu u samo 7,2 % bolesnika. I sami istraživači procijenili su da je taj postotak tromboza premali zbog velike smrtnosti njihovih bolesnika prilikom

transformacije u akutnu leukemiju, infekcija te komplikacija nakon transplantacije matičnih stanica (48). Također, ovisno o fazi bolesti, razlikovali su se rezultati o vrstama tromboza. U istraživanju u koje su bili uključeni bolesnici u prefibrotičkoj fazi PMF, arterijske tromboze nastale su se u dvije trećine bolesnika (46), dok istraživanje na 707 PMF bolesnika, koji nisu bili podijeljeni u faze bolesti, bilježi podjednaku učestalost arterijske i venske tromboze (48). Najčešće zabilježene arterijske tromboze su IMU, TIA, periferna arterijska bolest dok su najčešći venski događaj DVT, PE, tromboza portalne vene, tromboza cerebralne vene i Budd-Chiari sindrom (47, 48).

## 1.7. Rizični faktori za nastanak tromboze u općoj populaciji

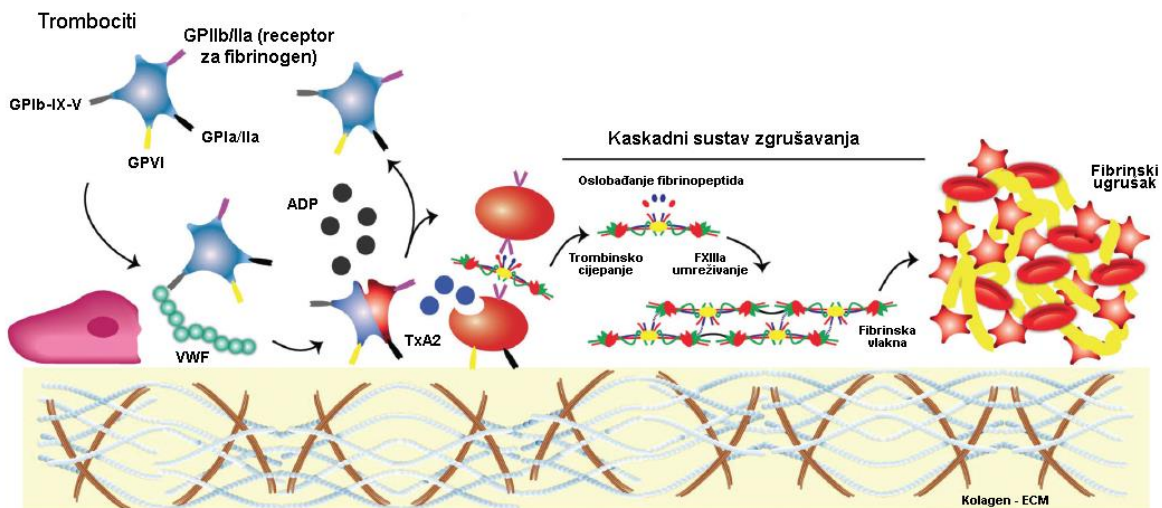
Povijesno gledano arterijska i venska tromboza bila su dva odvojena stanja koja su imala zasebne rizične faktore, patogenezu te način liječenja. Novije epidemiološke studije ukazale su da postoje poveznice između arterijske tromboze i venske tromboembolije. Iako postoje zasebni uzročnici ovih dviju vrsta tromboza, zajednički rizični faktori vjerojatno imaju najveću ulogu u njihovom nastanku. Ovdje su navedeni najčešći rizični faktori za nastanak arterijske i venske tromboze kao i rizični faktori koji su zajednički uzroci obje vrste tromboza (Slika 4.) (49, 50).



**Slika 4.** Najčešći rizični faktori za nastanak arterijske, venske tromboze i obje vrste tromboza (prema 49, 50)

## 1.8. Patogeneza arterijske tromboze

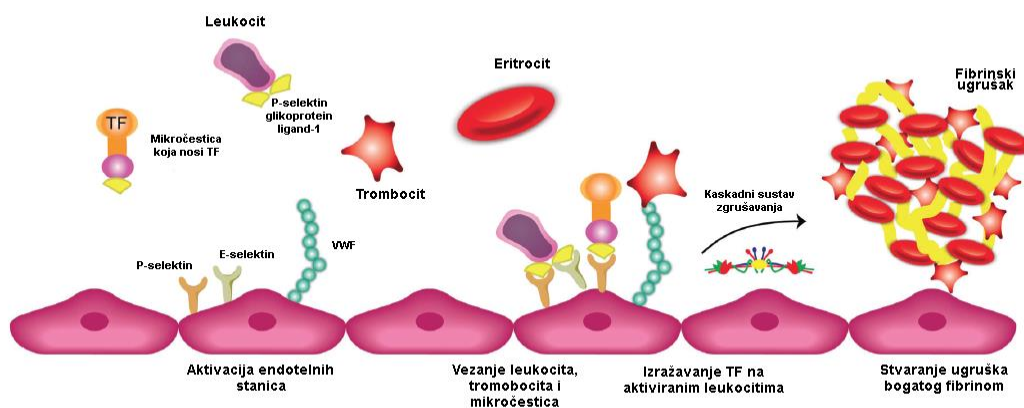
Glavni okidač za nastanak arterijske tromboze je ozljeda endotela krvne žile uzrokovana mehaničkim oštećenjem ili puknućem aterosklerotičnog plaka. Oštećenje krvne žile izlaže subendotelni izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) i potiče brzo okupljanje trombocita i njihovu aktivaciju. Von Willebrandov faktor (VWF) i trombocitni GP receptor Ib-IX-V imaju ključnu ulogu u vezanju trombocita na mjesto oštećenja gdje VWF vezan za kolagen djeluje kao most između kolagenskih vlakana i trombocita. Nakon aktivacije trombocita, i izražaja koagulacijskih faktora VII i XI, fibrinogen se uz pomoć stvorenog trombina pretvara u fibrin, umrežuje se pomoću aktiviranog faktora XIII i nastaje čvrsti fibrinski ugrušak (Slika 5.) (51).



**Slika 5.** Patogeneza arterijske tromboze (modificirano prema 51). Interakcijom receptora GPIIb-IX-V na trombocitima i VWF nastaju nakupine trombocita. Receptori za kolagen GPVI i GPIa/IIa na površini trombocita dovode do čvrste adhezije za fibrilarni kolagen. Adenozin difosfat (ADP) dalje potiče trombocite na promjenu oblika kako bi otpustili sadržaj svojih granula (tromboksan A2) koji omogućuje vezanje fibrinogena i stvaranje nakupina trombocita u primarnom hemostatskom čepu. Trombinsko cijepanje i umreživanje fibrinskih vlakana posredovano koagulacijskim faktorom XIII stvara čvrsti fibrinski ugrušak.

## 1.9. Patogeneza venske tromboze

Venska tromboza stvara se na površini intaktnog endotela, pod niskim pritiskom protoka krvi prilikom hipoksije ili upalnog faktora koji dovodi do izražaja adhezijskih receptora na površini endotela. Ti receptori potiču vezanje cirkulirajućih leukocita i mikročestica. Aktivirani leukociti na svojoj površini izražavaju tkivni faktor (TF), snažan protrombotički faktor, koji djeluje kao okidač za nastanak tromboze (Slika 6.) (51).



**Slika 6.** Patogeneza venske tromboze (modificirano prema 51). Oštećenje endotelne stanice uzorkovano hipoksijom ili upalnim procesima uzrokuje izražaj P-selektina, E-selektina i VWF. Cirkulirajući leukociti, trombociti i mikročestice koje nose TF vežu se na aktivirani endotel. Izražaj TF na aktiviranim leukocitima aktivira koagulacijsku kaskadu koja dovodi do stvaranja ugruška bogatog fibrinom.

## 1.10. Etiologija tromboze u Ph(-) MPN

Etiologija tromboze u Ph(-) MPN je samo djelomično poznata. Za neke faktore je većina istraživanja dokazala da doprinose nastanku tromboze dok za neke postoje oprečni rezultati ili do sada nisu uopće istraživani u Ph(-) MPN (20, 46-48, 52-63).

## **1.10.1. Faktori koji su u većini istraživanja povezani s rizikom za nastanak arterijske i/ili venske tromboze**

### 1.10.1.1. Dob bolesnika prilikom postavljanju dijagnoze

Stariji bolesnici imaju veći rizik za nastanak tromboze tako da je dob bolesnika uvrštena i u prognostički model za predviđanje rizika nastanka tromboze u bolesnika s ET. Većina dosadašnjih istraživanja pokazala su da dob > 60 godina povećava rizik za nastanak tromboze u bolesnika s ET i PMF (20, 38, 48) ili doprinosi samo arterijskoj trombozi u ET bolesnika (41). Dob > 65 godina doprinosi riziku za nastanak tromboze u PV bolesnika (41, 42).

Međutim, postoje i istraživanja u kojima nema razlike između mlađih i starijih bolesnika te rizika za nastanak tromboze (52, 64) kao i istraživanja u grupi PV bolesnika u kojima mlađa dob više doprinosi razvoju venske, a starija dob nastanku arterijske tromboze (52).

### 1.10.1.2. Leukocitoza

Nedavno objavljena meta-analiza potvrdila je povezanost leukocitoze i arterijske tromboze u ET i PV bolesnika. Ista meta-analiza pokazala je da leukocitoza kod ET i PV bolesnika nije povezana s nastankom venske tromboze (65). Analizom broja leukocita u bolesnika s prefibrotičkom fazom PMF također je nađena povezanost broja leukocita >  $11,2 \times 10^9/L$  s nastankom tromboze (podjelom na vrste tromboze nađena je povezanost samo s arterijskom trombozom) (46). Isti autori ponovno su potvrdili u nedavno objavljenoj studiji da je leukocitoza rizičan faktor za nastanak tromboze u prefibrotičkoj fazi PMF (66). Drugačije granične vrijednosti za PMF bolesnike pokazala je studija Barbui i sur. pri čemu su za broj leukocita >  $15 \times 10^9/L$  pokazali da ne postoji povezanost s nastankom tromboze (uz  $P = 0,060$ ) (48).

### 1.10.1.3. Prethodna tromboza

U PV bolesnika pokazano je da prethodna arterijska ili venska tromboza povećavaju rizik za nastanak ponavljajuće arterijske ili venske tromboze (67). Rizik za nastanak ponavljajuće tromboze povećan je i u ET bolesnika s prethodnom trombozom, pri čemu je prethodna tromboza

uvrštena kao jedan od faktora u prognostički model predviđanja nastanka tromboze (38).

Postoje oprečni rezultati o utjecaju prethodne tromboze u PMF bolesnika na nastanak nove tromboze. Autori Buxhofer-Ausch i sur., koji su uključili bolesnike s prefibrotičkom fazom PMF nisu našli povezanost (46) za razliku od Elliott i sur., čiji rezultati potvrđuju povezanost s arterijskom i venskom trombozom u PMF bolesnika (53).

#### 1.10.1.4. Prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*

Mnogobrojna istraživanja pokazuju da prisutnost ove mutacije doprinosi nastanku tromboze u bolesnika s ET, PV i PMF (38, 48, 68). Isto je potvrdila i meta-analiza rađena na uzorcima ET bolesnika (54).

### **1.10.2. Faktori koji još nisu dovoljno istraženi u etiologiji tromboze u Ph(-) MPN**

#### 1.10.2.1. Opterećenje mutiranim alelom V617F *JAK2*

Osim prisutnosti mutacije V617F u genu *JAK2*, bitna je i količina opterećenja mutiranim alelom V617F. U skupini ET bolesnika pokazano je da je vrijednost mutiranog alela > 10 % povezana s nastankom venske tromboze tijekom praćenja bolesti (69), dok je vrijednost > 50 % mutiranog alela povezana s nastankom tromboze prilikom postavljanja dijagnoze (55).

Pokazano je da u PV bolesnika koji imaju vrijednosti mutiranog alela > 75 % postoji povećan rizik za nastanak tromboze tijekom praćenja bolesti u odnosu na bolesnike koji imaju opterećenje mutiranim alelom < 25 % (56), što je oprečno rezultatima studije koja nije pronašla povezanost između količine mutiranog alela i rizika za nastanak tromboze (55).

U jednom istraživanju Ph(-) MPN bolesnika količina mutiranog alela > 20 % bila je povezana s nastankom venske tromboze iako je vrijednost ovog rezultata upitna jer nije bilo podjele na ET, PV i PMF bolesnike čija brojnost nije bila jednako zastupljena (70).

Prema trenutno dostupnim podacima, jedino do sada objavljeno istraživanje o povezanosti tromboze i opterećenja mutiranim alelom u PMF bolesnika je naše istraživanje koje je pokazalo da su vrijednosti  $\leq 34,8$  % povezane s nastankom arterijske tromboze a vrijednosti > 56,7 % s nastankom venske tromboze (71).



### 1.10.2.2. Trombociti

Iako se prije 30-ak godina smatralo da je duga izloženost trombocitozi u ET povezana s većim rizikom za nastanak tromboze (57) novija istraživanja povezuju trombocitozu samo s povećanim rizikom za nastanak krvarenja (72, 73) zbog nastanka stečenog von Willebrandova sindroma. Štoviše, u jednom istraživanju rezultati ukazuju na moguću povezanost trombocitoze pri dijagnozi i smanjenog rizika za nastanak tromboze (58).

U PV bolesnika nekoliko studija nisu našle povezanost trombocitoze i povećanog rizika za trombozu (61,74), međutim postoji i istraživanje koje povezuje trombocitozu s većim rizikom za trombozu ali i krvarenje (75).

Broj trombocita  $> 450 \times 10^9/L$  povezan je s nastankom tromboze u bolesnika s razvijenom fazom PMF (47). U bolesnika s prefibrotičkom fazom PMF pokazano je da broj trombocita  $< 870 \times 10^9/L$  pri dijagnozi doprinosi nastanku arterijske i venske tromboze (46). U suprotnosti s ovim rezultatima je istraživanje u kojem nije nađena povezanost broja trombocita i nastanka tromboze (48).

### 1.10.2.3. *FV* Leiden i mutacija *FII* G20210A

Još uvijek se postavlja pitanje je li *FV* Leiden i mutacija *FII* G20210A u bolesnika s Ph(-) MPN dodatno doprinose nastanku tromboze. Upitno je i to je li prisutnost ovih mutacija povećava rizik samo za vensku trombozu ili rizik povećan i za nastanak arterijske tromboze.

Studije rađene na uzorcima PV i ET bolesnika pokazale su da u nositelja *FV* Leiden postoji povezanost s arterijskim i venskim trombozama (59) te s nastankom ponavljajućih venskih tromboza (76), a nađena je i povezanost mutacije *FII* G20210A s nastankom venske tromboze u ET i PV (60). Postoje rezultati koji ukazuju na dodatno povećani rizik za trombozu u PV i ET bolesnika ukoliko imaju mutaciju V617F i nositelji su nasljednih trombofilijskih faktora (68) što se slaže sa rezultatima još jedne studije koja je uključivala samo ET bolesnike (77).

Međutim, postoje i posve oprečni rezultati poput istraživanja Afshar-Kharghana i sur. u kojem u PV i ET bolesnika nije nađena povezanost *FV* Leiden i mutacije *FII* G20210A s nastankom arterijske i venske tromboze (63). Prema dosadašnjim saznanjima, povezanost *FV* Leiden i *FII* G20210A nije dosad objavljena za PMF bolesnike osim u našem radu u kojem smo pokazali da ne postoji povezanost sa nastankom tromboze (71).

#### 1.10.2.4. Hematokrit/koncentracija hemoglobina

Studija o povezanosti hematokrita s nastankom tromboze u PV bolesnika pokazala je da se pri hematokritu nižem 0,45 L/L rjeđe pojavljuju trombotički događaji (62) dok je studija Di Nisia i sur. ustanovila da vrijednost hematokrita nije povezana s povećanim rizikom za trombozu (61).

U ET bolesnika koncentracija hemoglobina nije bila povezana s nastankom tromboze (72) za razliku od bolesnika s razvijenom fazom PMF gdje je koncentracija hemoglobina > 110 g/L doprinijela nastanku tromboze (47).

Drugačiji rezultati dobiveni su u bolesnika s prefibrotičkom fazom PMF pri čemu je koncentracija hemoglobina < 146 g/L pri dijagnozi bila povezana s nastankom venske tromboze (46).

#### 1.10.2.5. Prisutnost kardiovaskularnih rizičnih faktora

Prisutnost kardiovaskularnih rizičnih faktora povezana je s pojavom tromboze u ET (38) i PV bolesnika (67). Prema nekim istraživačima, njihova prisutnost bila je povezana samo s nastankom arterijske tromboze u ET bolesnika (78).

U grupi bolesnika s razvijenom fazom PMF pronađena je povezanost između svih ispitanih kardiovaskularnih rizičnih faktora (hipertenzija, pušenje, hiperlipidemija i šećerna bolest) s nastankom tromboze (47). No postoje i studije s oprečnim rezultatima u kojima nije dokazana povezanost tromboze i KV rizičnih faktora u PMF bolesnika (46,48).

#### 1.10.2.6. Polimorfizmi ljudskih trombocitnih aloantigena

Ovi polimorfizmi nisu bili predmet velikog broja istraživanja u Ph(-) MPN bolesnika. U istraživanju u kojem su bili uključeni ET i PV bolesnici, pronađena je povezanost polimorfizma Leu33Pro s nastankom arterijske tromboze, za razliku od polimorfizma Thr145Met koji nije bio povezan s nastankom tromboze (63). Oprečni rezultati dobiveni su u istraživanju koje je uključivalo ET, PV i PMF bolesnike pri čemu istraživači nisu našli povezanost polimorfizma Leu33Pro s nastankom tromboze (79).

## 1.11. Patogeneza tromboze u Ph(-) MPN

Patogeneza tromboze u Ph(-) MPN izuzetno je složena. Protrombotičkom miljeu doprinose kvantitativno i kvalitativno promijenjeni eritrociti, leukociti i trombociti nastali iz klonalne hematopoetske progenitorske stanice. Promijenjene stanice luče niz citokina i medijatora upale čime se oštećuje endotel krvnih žila. Aktivirane endotelne stanice poprimaju prokoagulacijska svojstva jer na svojoj površini luče adhezijske molekule što dovodi do zaustavljanja leukocita i trombocita na površini endotela (80). Aktivirani trombociti izražavaju P-selektin i TF i otpuštaju mikročestice. Promijenjena membrana trombocita uzrokuje konstantnu aktivaciju i oslobađanje  $\alpha$  granula. Poznato je da se aktivirani trombociti vežu za leukocite i aktiviraju endotelne stanice, a to naposljetku dovodi do aktivacije koagulacijske kaskade.

Osim toga, prisutnost mutacije V617F osim što povećava broj trombocita, mijenja i njihovu funkciju čime oni poprimaju protrombotička svojstva. To je pokazano i u *knock-in* mišjem modelu s ET pri čemu prisutnost mutacije V617F uzrokuje promjene prilikom nastajanja trombocita iz megakariocita. Promjene se očituju kao povećana diferencijacija i migracijska sposobnost trombocita, ali i stvaranje više novih protrombocita. Takvi trombociti imaju protrombotički učinak i reaktivniji su na dodatak različitih agonista za aktivaciju trombocita što dovodi do povećane agregacije trombocita *in vitro* i kraćeg vremena krvarenja *in vivo* (81).

Neutrofili u PV i ET bolesnika aktivirani su u odnosu na neutrofile zdravih osoba jer izražavaju više biljega CD11b i višu koncentraciju elastaze i mijeloperoksidaze čime utječu na hemostazu. Oni otpuštaju proteolitičke enzime i reaktivne kisikove spojeve što može aktivirati ili oštetiti trombocite i endotelne stanice i umanjiti funkciju nekih koagulacijskih proteina. Također, trombociti adheriraju na leukocite i stvaraju cirkulirajuće nakupine leukociti - trombociti za koje se smatra da imaju protrombotički učinak (82).

Dodatno, abnormalnosti na eritrocitima koji uključuju i biokemijske promjene na membrani i njenom sadržaju, mogu ometati protok krvi stvarajući eritrocitne agregate. Takvi agregati omogućavaju interakciju trombocita i leukocita sa stijenkom krvne žile što u konačnici dovodi do stvaranja ugruška (83).

Ova saznanja potkrepljuje i istraživanje koje je ukazalo na povezanost povišenih koncentracija glavnog upalnog biljega visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina s nastankom tromboze u ET i PV bolesnika (84).

Trombociti imaju važnu ulogu u hemostazi, upalnom odgovoru, imunitetu te rastu i metastaziranju tumora. Te sve funkcije posredovane su trombocitnim receptorima. Receptori na površini trombocita aktiviraju druge trombocite ili djeluju kao adhezijske molekule koje vežu oštećene endotelne stanice, druge trombocite i leukocite (85).

## **1.12. Uloga genetskih polimorfizama na nastanak tromboze**

### **1.12.1. Ljudski trombocitni aloantigeni**

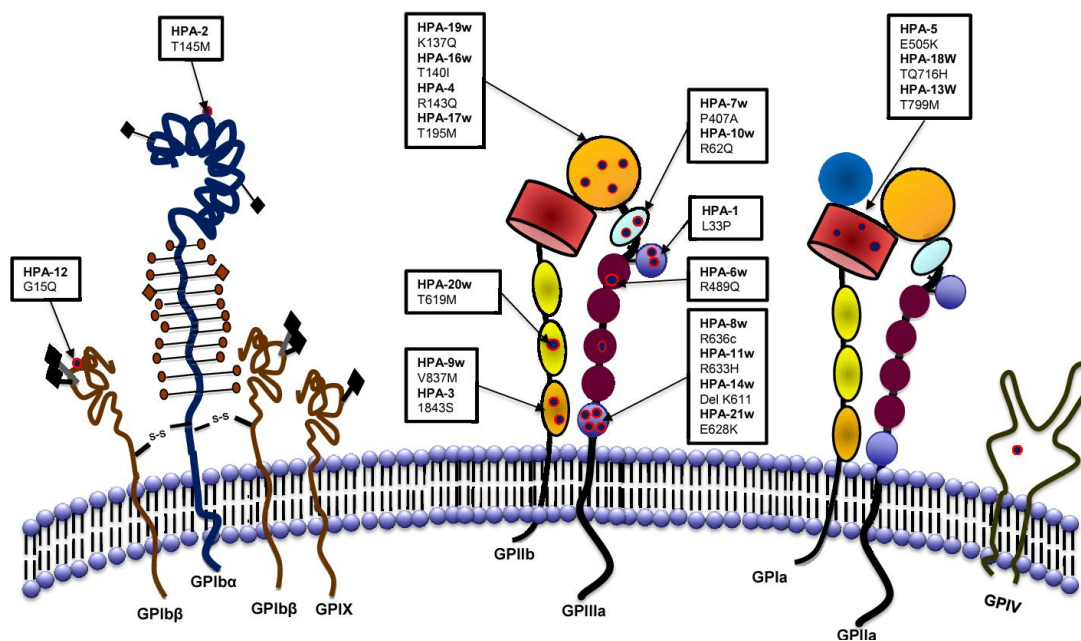
Ljudski trombocitni aloantigeni (engl. *human platelet alloantigens*, HPA) su polimorfni glikoproteini koje uglavnom nalazimo na površini trombocita. Prema HPA nomenklaturi, slijedom njihovih otkrića, dodijeljeni su im redni brojevi od 1 do 5 te 15. Sustav HPA-1 -2 -3 -5 i -15 je bialelan i nasljeđuje se autosomno kodominantno. Dogovoreno je da češći antigen nosi naziv „a“ dok se manje učestali naziva „b“. Ukoliko je poznato samo jedno antitijelo na određeni antigen on uz redni broj nosi naziv „w“ (86–88) (Tablica 6.).

Trenutno je poznato 35 ljudskih trombocitnih antigena koji su zabilježeni u bazi polimorfizama ljudskih trombocitnih antigena (89, 90) (Slika 7.). Svi polimorfizmi su rezultat zamjene jednog nukleotida (engl. *Single nucleotid polymorphism*, SNP) koja rezultira zamjenom aminokiseline u proteinu, osim kod HPA-14 koji nastaje zbog delecije 3 nukleotida u kodirajućoj regiji (88, 90).

Svaki HPA zastupljen je na nekom od 6 trombocitnih glikoproteina GPIIb, GPIIIa, GPIa, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  i CD109 (89). HPA-1 i HPA-4 nalaze se na GPIIIa te su dio receptora za vitronektin, HPA-2 na receptoru GPIb $\alpha$  koji djeluje kao receptor za trombin, HPA-3 nalazi se na GPIIb koji je dio receptora za fibrinogen, von Willebrandov faktor, fibronektin, vitronektin i trombospondin te HPA-5 koji je dio GPIa i ima funkciju receptora za kolagen i laminin. HPA-15 je iznimka jer je preko glikozilfosfatidilinozitola vezan na CD109 koji djeluje kao dio receptora za transformirajući faktor rasta  $\beta$ .

Sustav HPA može djelovati kao aloantigen i uzrokuje stvaranje antitijela na trombocite što se najčešće opaža u bolesnika koji često primaju transfuzije te ponekad u trudnoći. Stvaranje antitijela može izazvati i značajna klinička stanja poput neonatalne aloimune trombocitopenije,

poslije transfuzijske purpure, aloimune trombocitopenije vezane uz transplantaciju te refraktornu transfuziju trombocita (91, 92).



**Slika 7.** Ljudski trombocitni aloantigeni (prema 91).

#### 1.12.1.1. Kompleks GPIIb/IIIa

Glikoproteinski kompleks koji pripada porodici integrina sastavljen je od kovalentno povezanih  $\alpha_{IIb}$  i  $\beta_3$  podjedinice. Na površini jednog trombocita ima oko 80 000 kopija ovog receptora, što ga čini najzastupljenijim, a samim time i najimunogeničnijim trombocitnim receptorom. Aktivna forma ovog receptora ima važnu ulogu u vezanju fibrinogena, vitronektina, fibronektina i VWF. Ukupno 20 od 35 HPA nalaze se na kompleksu GPIIb/IIIa pri čemu su najistraživaniji HPA-1, HPA-3 i HPA-4. Prepoznat je značaj ovog receptora u nastanku arterijske tromboze te su razvijeni lijekovi koji djeluju kao GPIIb/IIIa antagonisti koji smanjuju mortalitet i morbiditet u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (87, 88, 93).

**Tablica 6.** Ljudski trombocitni aloantigeni (HPA) i njihovi polimorfizmi (prema 89, 90).

Sustav	Aloantigen	Alternativni naziv	Glikoprotein	Gen	Kromosom	Zamjena nukleotida	Polimorfizam
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup> Zw <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	176T>C	Leu33Pro
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	GPIb $\alpha$	<i>GP1BA</i>	17	482C>T	Thr161Met
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> Bak <sup>b</sup>	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	2621T>G	Ile843Ser
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	506G>A	Arg143Gln
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup> , He <sup>a</sup>	GPIa	<i>ITGA2</i>	5	1600G>A	Glu505Lys
	HPA-6bw	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1544G>A	Arg489Gln
	HPA-7bw	Mo <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1297C>G	Pro407Ala
	HPA-8bw	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1984C>T	Arg636Cys
	HPA-9bw	Max <sup>a</sup>	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	2602G>A	Val837Met
	HPA10bw	La <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	263G>A	Arg62Gln
	HPA11bw	Gro <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1976G>A	Arg633His
	HPA12bw	Iy <sup>a</sup>	GPIb $\beta$	<i>GP1BB</i>	22	119G>A	Gly15Glu
	HPA13bw	Sit <sup>a</sup>	GPIa	<i>ITGA2</i>	5	2483C>T	Thr799Met
	HPA14bw	Oe <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1909_1911delAAG	Lys611 del
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	Gov <sup>b</sup> Gov <sup>a</sup>	CD109	<i>CD109</i>	6	2108C>A	Ser682Tyr
	HPA-16bw	Duv <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	497C>T	Thr140Ile
	HPA-17bw	Va <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	662C>T	Thr195Met
	HPA-18bw	Cab <sup>a</sup>	GPIa	<i>ITGA2</i>	5	2235G>T	Gln716His
	HPA-19bw	Sta	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	487A>C	Lys137Gln
	HPA-20bw	Kno	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	1949C>T	Thr619Met
	HPA-21bw	Nos	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1960G>A	Glu628Lys
	HPA-22bw	Sey	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	584A>C	Lys164Thr
	HPA-23bw	Hug	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1942C>T	Arg622Trp
	HPA-24bw	Cab <sup>2a+</sup>	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	1508G>A	Ser472Asn
	HPA-25bw	Swi <sup>a</sup>	GPIa	<i>ITGA2</i>	5	3347C>T	Thr1087Met
	HPA-26bw	Sec <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	1818G>T	Lys580Asn
	HPA-27bw	Cab <sup>3a+</sup>	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	2614C>A	Leu841Met
	HPA-28bw	War	GPIIb	<i>ITGA2B</i>	17	2311G>T	Val740Leu
	HPA-29bw	Kh <sup>a</sup>	GPIIIa	<i>ITGB3</i>	17	98C>T	Thr7Met

#### 1.12.1.1.1. Polimorfizmi kompleksa GPIIb/IIIa

Svaka podjedinica ovog glikoproteinskog receptora ima aminokiselinski dimorfizam. Na GP podjedinici IIb nalazi se HPA-3 s dvije izoforme Bak<sup>a</sup> (HPA-3a) i Bak<sup>b</sup> (HPA-3b). Manje učestalu izoformu HPA-3b nalazimo u 48 % bijelaca, 32 % Afrikanaca te 40,5 % Azijata. Ona nastaje kao posljedica zamjene timina gvaninom na položaju 2621 u eksonu 26 gena *ITGA2B* što uzrokuje zamjenu aminokiseline izoleucina (*HPA-3a*) u serin (*HPA-3b*) na položaju 843 u glikoproteinu (Ile843Ser) (NM\_000419.3:c.2621T>G, rs5911) (88, 93). U Hrvatskoj *HPA-3b* je češći u odnosu na općenitu učestalost u bijelaca te je prisutan u 68,0 % zdravih ispitanika (94).

Na podjedinici glikoproteina IIIa nalazi se HPA-1 u dvije izoforme PL<sup>A1</sup> (HPA-1a) i PL<sup>A2</sup> (HPA-1b). Dimorfizam PL<sup>A1</sup>/PL<sup>A2</sup> nastaje zbog zamjene timina citozinom na položaju 176, u eksonu 2, u genu *ITGB3* što uzrokuje zamjenu aminokiseline leucin (*HPA-1a*) u prolin (*HPA-1b*) na položaju 33 u glikoproteinu (Leu33Pro) (NM\_000212.2:c.176T>C, rs5918) (93).

Glikoprotein III Leu33Pro (HPA-1b) prisutan je u 26 % u bijelaca, 10 % Afrikanaca dok ga uopće nema u Azijata (88). U istraživanju provedenom na zdravim hrvatskim ispitanicima, Pavić i sur. pronašli su učestalost *HPA-1b* od 27,4 % (94). Nedavno je pokazano da ova zamjena aminokiselina alosterički mjenja receptor iz mirujućeg u aktivno stanje čime HPA-1b trombociti imaju protrombotički potencijal (95).

Istraživanje o utjecaju polimorfizma Ile843Ser (*HPA-3b*) na *in vitro* agregaciju trombocita uzrokovanu adrenalinom i kolagenom pokazalo je da ne postoji razlika između HPA-3b i HPA-3a trombocita u njihovoj sposobnosti agregacije (96).

Studija rađena na uzorcima bolesnika s koronarnom bolesti srca pokazala je da nositelji *HPA-1b*, nakon što su im trombociti *in vitro* aktivirani ADP-om, jače vežu fibrinogen u odnosu na nositelje *HPA-1a* (97). Međutim, istraživanje na zdravim dobrovoljnim darivateljima krvi nije potvrdilo taj rezultat (98). U jednoj studiji na zdravim ispitanicima pokazano je da nositelji *HPA-1b* imaju znatno niži aktivacijski prag za agregaciju trombocita uzrokovanu adrenalinom. Čini se da su HPA-1b trombociti manje osjetljivi na aktivaciju snažnim agonistima poput trombina, arahidonske kiseline ili tromboksana te da su manje osjetljivi na inhibiciju uzrokovanu aspirinom. Ispitivanje na zdravim muškarcima pokazalo je da nositelji *HPA-1b* trombocita imaju 1 minutu kraće vrijeme krvarenja u odnosu na one s *HPA-1a* trombocitima (93).

Istraživanja na staničnim linijama pokazuju da polimorfizam Leu33Pro (*HPA-1b*) uzrokuje snažnije vezanje fibrinogena, širenje trombocita i rearanžman aktinskog citoskeleta te jaču retrakciju ugruška. To je dovelo do zaključka da Leu33Pro ima blago protrombotičko djelovanje. S obzirom na to da je  $\beta_3$  podjedinica s ovim polimorfizmom prisutna i u endotelnim stanicama te stanicama glatkih mišića kao dio receptora za vitronektin moguće je da Leu33Pro pridonosi nastanku tromboze ali i ateroskleroze (93).

Osim *in vitro* istraživanja na trombocitima istraživači su se usmjerili i na klinički značaj ovih polimorfizama te njihovu povezanost sa trombotičkim događajima. Postoji studija čiji rezultati pokazuju da Ile843Pro (*HPA-3b*) ne doprinosi povećanom riziku za nastanak moždanog udara (99) te meta-analiza koja je pokazala da postoji povećan rizik za moždani udar u Azijata, ali ne i u bijelaca (100). Naše istraživanje pokazalo je da u djece postoji povezanost polimorfizma Ile843Pro i smanjenog rizika za nastanak ishemijskog moždanog udara (101). Prema dosadašnjim saznanjima Ile843Pro povezan je s povećanim rizikom za nastanak srčanog udara samo u žena mlađih od 45 godina s dodatnim rizičnim faktorima (pušenje, hiperkolesterolemija i obiteljsko opterećenje) (102) dok u ostaloj populaciji ne povećava rizik za nastanak srčanog udara (103).

Budući da je u istraživanjima *in vitro* pokazan trombogeni potencijal polimorfizma Leu33Pro, ispitivanja su krenula u smjeru njegovog doprinosa za nastanak arterijskih ili venskih tromboza. Meta-analiza, objavljena prije 20-ak godina, uspoređivala je zdrave osobe i bolesnike koji su doživjeli IM te je pokazano da ne postoji povezanost između Leu33Pro i rizika za nastanak IM (104). Posve suprotno pokazano je prije par godina u meta-analizi koja je obuhvatila 17 911 bolesnika s IM, pri čemu rezultati ukazuju da najveći rizik imaju bolesnici mlađi od 45 godina (105).

Također, postoje oprečni rezultati o povezanosti Leu33Pro i nastanka moždanog udara. Nekoliko starijih istraživanja, na manjem broju bolesnika, pokazala su da ne postoji povezanost s MU (99, 106, 107). Međutim, rezultati novije meta-analize pokazali su da Leu33Pro povećava rizik za nastanak ishemijskog moždanog udara (108). Utjecaj ovog polimorfizma na nastanak venske tromboze nije bio predmet puno istraživanja. Jedna studija na malom broju bolesnika pokazala je povezanost s većim rizikom za nastanak plućne tromboembolije (109), dok studija koja je obuhvatila 2369 bolesnika s venskom tromboembolijom kao i studija u kojoj je bilo 121 bolesnika s venskom trombozom nisu našle povezanost ove vrste tromboze i Leu33Pro (*HPA-1b*) (106, 110).



### 1.12.1.2. Kompleks GPIa/IIa

Ovaj integrinski kompleks sastavljen od  $\alpha_2\beta_1$  podjedinice djeluje kao glavni trombocitni receptor za kolagen. Vezno mjesto za ljudski kolagen tip 1 i tip 3 nalazi u  $\alpha_2$  podjedinici. Osim što posreduje u adheziji trombocita na kolagen, ima ulogu u aktivaciji trombocita te adheziji za subendotel tijekom stvaranja ugruška (111).

GPIa/IIa nalazimo i na fibroblastima te aktiviranim T limfocitima dok na epitelnim i endotelnim stanicama osim uz kolagen, veže se i na laminin, te je uključen u modeliranje vanstaničnog matriksa i mobilnost stanica (93).

#### 1.12.1.2.1. Polimorfizmi kompleksa GPIa/IIa

Gen *ITGA2* za GPIa nalazi se na 5. kromosomu, dok gen *ITGB1* kodira GPIIa na 9. kromosomu. Na podjedinici  $\alpha_2$  nalaze se HPA-5, HPA-13, HPA-18, HPA-25.

HPA-5 ima dimorfizam HPA-5a i HPA-5b koji nastaje zamjenom gvanina adeninom na položaju 1600 što rezultira promjenom glutaminske kiseline (*HPA-5a*) u lizin (*HPA-5b*) na položaju 505 u glikoproteinu (Glu505Lys) (NM\_002203.4:c.1600G>A, rs10471371). Uz njega poznat je i polimorfizam C807T, međutim on ne dovodi do zamjene aminokiselina u proteinu (88, 96, 112).

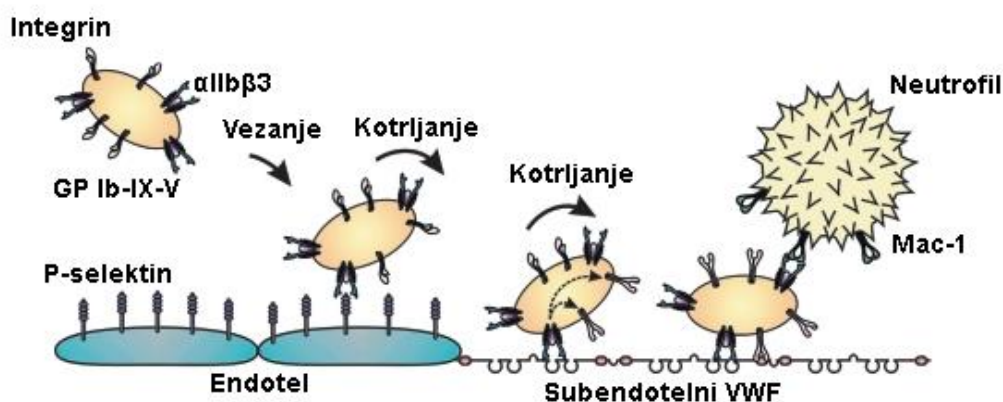
Glu505Lys (*HPA-5b*) nalazimo u 20 % bijelaca, 18 % Afrikanaca te samo 0,4 % Azijata (88). Za zdravu hrvatsku populaciju dobivena je učestalost *HPA-5b* od 20,1 % (94)

Istraživanja su pokazala da broj GPIa/IIa receptora na trombocitu varira između 3000-5000 kopija te ovisi o tipu HPA-5 kao i prisutnosti varijante 807T, pri čemu nositelji *HPA-5b* i 807T imaju veći broj GPIa na trombocitima (88,113,114).

Unatoč većem broju GP receptora i očekivanom protrombotičkom doprinosu, prema dosadašnjim saznanjima, ovaj polimorfizam nije povezan s većim rizikom za nastanak srčanog udara (112). Oprečni rezultati dobiveni su za povezanost *HPA-5b* s nastankom ishemijskog moždanog udara. Studija rađena na uzorcima 216 tuniških bolesnika s IMU pokazuje povezanost (115), dok studija na 218 njemačkih bolesnika ne nalazi povezanost ovog polimorfizma s povećanim rizikom za nastanak moždanog udara (99).

### 1.12.1.3. Kompleks GPIb/IX/V

Ovaj kompleks ima ulogu glavnog trombocitnog receptora za VWF jer sudjeluje u početnoj fazi adhezije trombocita za subendotelni VWF u oštećenju stijenci krvne žile. Osim toga on djeluje kao receptor za endotelni P-selektin što omogućuje trombocitno kotrljanje po oštećenom endotelu te kao receptor za trombin čime doprinosi aktivaciji trombocita posredovanom trombinom (96, 116) (Slika 8.).



**Slika 8.** Interakcija trombocita sa stijenkom krvne žile. Cirkulirajući trombociti vežu se pomoću GPIb/IX/V s P-selektinima izraženim na aktiviranim endotelnim stanicama ili s VWF u subendotelu. Tim se aktivira GPIIb/IIIa koji se također veže za VWF. GPIb/IX/V može se vezati za leukocitni integrin Mac-1 što dovodi do okupljanja leukocita na mjestu nastanka oštećenja endotela (modificirano prema 116).

Kompleks je sastavljen je od 4 podjedinice, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX i GPV. Svaki trombocit na površini ima 25 000 kopija GPIb/IX/V.

Mutacije u podjedinicama kompleksa GPIb/IX/V mogu dovesti do manjkavosti njegove funkcije ili čak nedostatka pojedinih dijelova što rezultira teškim krvarenjima poput onih u Bernard-Soulierovom sindromu (88).

#### 1.12.1.3.1. Polimorfizmi kompleksa GPIb/IX/V

Gen *GP1BA* koji kodira GPIb $\alpha$  podjedinicu nalazi se na 17. kromosomu i u tom je genu nađena većina polimorfizama koji se javljaju u ovom GP kompleksu, dok se gen *GP1BB* nalazi na 5. kromosomu. Na podjedinici GPIb $\alpha$  nalazi se HPA-2 kod kojeg zamjenom citozina u timin na položaju 482 dolazi do promjene aminokiseline treonin (*HPA-2a*) u metionin (*HPA-2b*) na položaju 161 (Thr145Met) (NM\_000173.7:c.482C>T, rs6065). Na podjedinici GPIb $\beta$  nalazi se HPA-12 (88, 96).

Polimorfizam Thr145Met (*HPA-2b*) prisutan je u 14 % u bijelaca, 29 % Afrikanaca te u 5 % Azijata (88). U zdravih hrvatskih ispitanika učestalost je 21,0 % (94).

Pokazano je da polimorfizam *HPA-2b* ne utječe na vezanje trombina, no da trombociti HPA-2a jače vežu VWF. S obzirom na to da je podjedinica GPIb $\alpha$  ujedno receptor i za P-selektine pretpostavka je da možda preko te interakcije ovaj kompleks ima protrombotički učinak (117).

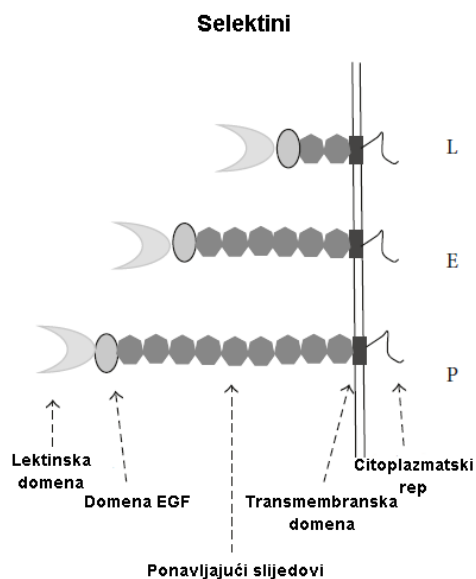
Istraživanjem je otkrivena povezanost između polimorfizma *HPA-2b* i rizika za nastanak akutne cerebrovaskularne bolesti i akutne srčane bolesti, dok utjecaj na nastanak duboke venske tromboze nije pronađen (118). Povezanost s nastankom ishemijske cerebrovaskularne bolesti dokazana je i u jednoj japanskoj studiji (119). Ne tako davno, objavljena meta-analiza potvrdila je dosadašnja saznanja te pokazala da su HPA-2b trombociti povezani s većim rizikom za nastanak srčane bolesti (120).

#### 1.12.2. Selektini

Selektini su obitelj adhezijskih molekula koja se dijeli na P-selektine, L-selektine i E-selektine. P-selektini pohranjeni su u  $\alpha$  granulama trombocita i Weibel-Palade tjelešcima endotelnih stanica (121). L-selektini stalno su izraženi na površini skoro svih leukocita dok se E-selektini po potrebi izražavaju na vaskularnom endotelu.

Imaju zajedničku strukturu sastavljenu od lektinske domene ovisne o kalciju, domene nalik na epidermalni faktor rasta te dvije do devet konsenzusnih ponavljajućih slijedova (engl. *consensus repeat sequences*, CRS).

L-selektini imaju dvije CRS, E-selektini šest, a P-selektini ukupno devet CRS. Uz to imaju i lipofilnu transmembransku domenu i kratak citoplazmatski rep (122) (Slika 9.).



**Slika 9.** Struktura L-selektina, E-selektina i P-selektina (modificirano prema 122).

#### 1.12.2.1. P-selektini

P-selektini (P-SEL) imaju glavnu ulogu u inicijaciji kotrljanja leukocita po endotelu, zatim posreduju u adheziji leukocita i trombocita na endotel te u interakciji leukocita i trombocita.

Izlaganje aktivirajućim stimulansima poput trombina rezultira brзом translokacijom molekula P-selektina tako da se kroz nekoliko minuta pojave na površini trombocita ili endotelnih stanica.

Mogu se lučiti u cirkulaciju kao dio endotelnih stanica ili mikročestica nastalih od trombocita ili u malim količinama kao alternativno skraćena verzija bez transmembranske domene. Ta dva oblika P-selektina povišena su u cirkulaciji ljudi koji imaju aterosklerozu, upalu ili su doživjeli trombozu te služe kao prediktori kardiovaskularnih događaja (123–125).

#### 1.12.2.1.1. Polimorfizmi *P-SEL*

Gen za P-selektin nalazi se na 1. kromosomu blizu gena *FV* te ima 17 eksona. Otkriveno je 13 polimorfizama, pet u promotorskoj regiji i osam u eksonima. Pet polimorfizma uzrokuju promjenu aminokiseline u proteinu (Tablica 7.) (126).

Polimorfizmi gena za P-selektin povezuju se s arterijskim i venskim trombozama. Pretpostavlja se da oni utječu na funkciju i izražaj P-selektina na trombocitima.

Među polimorfizmima P-selektina, najviše je istraživana T715P (NM\_003005.3:c.2266A>C, rs6136) u kojem zamjena treonina prolinom uzrokuje konformacijsku promjenu glikoproteina. Nagađa se da to utječe na brzinu njegovog prenošenja unutar stanice, čime dolazi do smanjenog izražaja na površini stanice i naposljetku do manjeg broja staničnih interakcija (122). Uz njega, predmet istraživanja bili su i ostali polimorfizmi koji uzrokuju promjenu aminokiseline u glikoproteinu poput S290N (NM\_003005.4:c.992G>A, rs6131), u kojem se serin zamjenjuje asparaginom na položaju 290, zatim N562D (NM\_003005.3:c.1807G>A, rs6127), u kojem je asparagin zamjenjen aspartatom na položaju 562 te V599L (NM\_003005.3:c.1918G>T, rs6133) gdje valin biva zamjenjen leucinom na položaju 599.

Rezultati istraživanja na uzorcima bolesnika s IM pokazali su da je alel 715P češći u zdravih ispitanika te stoga ima protektivnu ulogu za razliku od polimorfizama S290N, V599L, N562D kod kojih ne postoji razlika između bolesnih i zdravih ispitanika (127). Tegrou i sur. uspoređujući 582 bolesnika s IM u odnosu na kontrolnu skupinu pronašli su da alel 715P ima protektivni učinak zbog veće učestalosti u kontrolnoj skupini, te da nositelji kombinacije alela 290N i N562 imaju veći rizik za nastanak IM (128). Meta-analiza pokazala je da postoji povezanost između polimorfizama S290N i T715P i nastanka kardiovaskularnih bolesti i IM dok polimorfizam V599L nije povezan s njima (129).

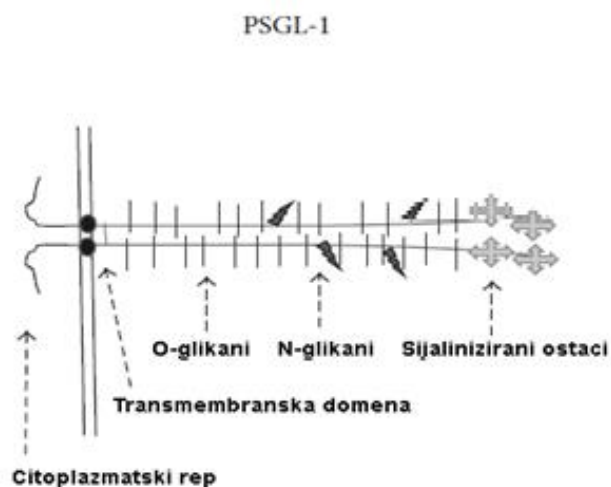
Utjecaj polimorfizama P-selektina na nastanak venske tromboze nije bio predmet mnogo istraživanja. Studija u kojoj su ispitivani haplotipovi polimorfizama P-selektina, uz pretraživanje *FV* Leiden, pronašla je povezanost nositelja 290N alela s povećanim rizikom, te povezanost nositelja 715P alela sa smanjenim rizikom za vensku trombozu. Međutim, kad su iz istraživanja isključili nositelje *FV* Leiden ispitivani aleli više nisu bili povezani sa rizikom za vensku trombozu ukazujući da je to ipak bio utjecaj *FV* Leiden na nastanak venske tromboze (130).

U istraživanju Ay i sur. koje je uključivalo bolesnike s venskom tromboembolijom i zdravu kontrolnu skupinu dobivena je veća učestalost alela 715P u kontrolnoj skupini, međutim ta razlika nije bila statistički značajna.

Osim toga, pokazano je da nositelji alela 715P imaju nižu koncentraciju topljivih P-selektina u plazmi što smanjuje rizik za nastanak venske tromboembolije (131). Istraživanje na malom uzorku bolesnika s venskom tromboembolijom pokazalo je da nema razlike u učestalosti polimorfizma T715P između bolesnika koji su nositelji *FV* Leiden ili *FII* G20210A te zdravih kontrola (132).

#### 1.12.2.1.2. P-selektin glikoprotein ligand 1

Primarni ligand za P-selektine naziva se P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1) i nalazi se na gotovo svim leukocitima. Sastoji se od kratkog citoplazmatskog repa za kotrljanje leukocita po P-selektinu, O-glikana i N-glikana te sijaliniziranih ostataka potrebnih za prepoznavanje P-selektina (Slika 10.) (122). Osim P-selektina on manjim afinitetom može vezati L-selektine i E-selektine. Interakcija P-SEL i PSGL-1 omogućuje usporavanje leukocita u krvotoku te kotrljanje po aktiviranim endotelnim stanicama. To uzrokuje izražaj adhezijskih molekula na endotelnim stanicama čime dolazi do čvrste adhezije leukocita i njihove transmigracije kroz endotel do mjesta oštećenja ili upale što može dovesti do nastanka tromboze. Zbog toga P-SEL i PSGL-1 predstavljaju potencijalne nove mete za antitrombotsku terapiju te iziskuju potrebu za daljnjim istraživanjem njihovog protrombotičkog doprinosa (133, 134).



**Slika 10.** Struktura PSGL-1 (modificirano prema 122).

### 1.12.2.1.3. Polimorfizmi *PSGL-1*

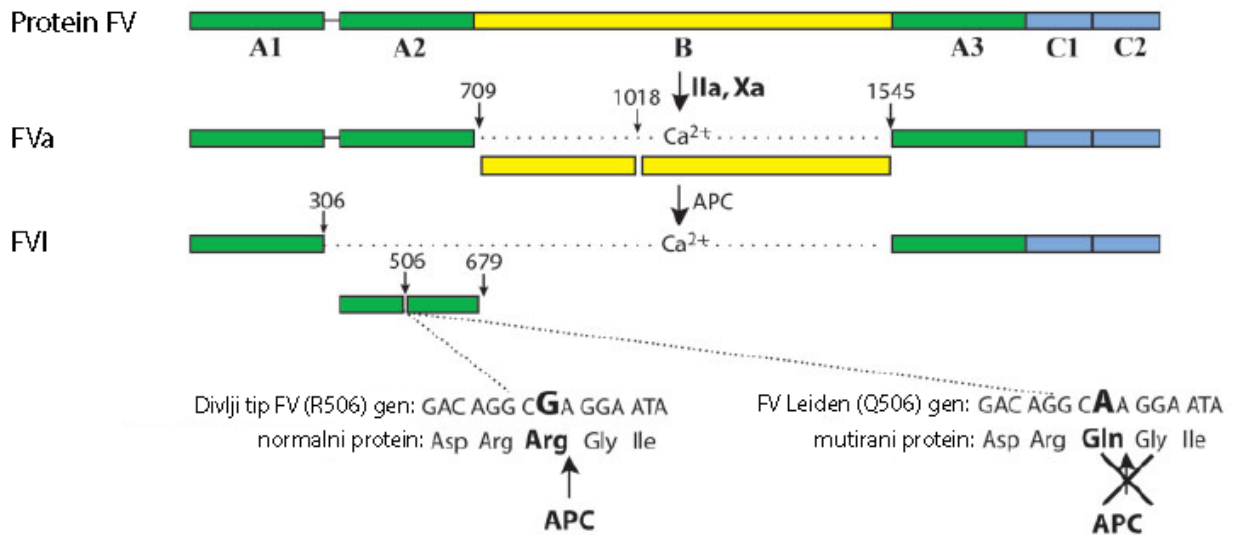
Gen *P-SGL1* nalazi se na 12. kromosomu i sastoji se od dva eksona i jednog introna. Najčešće istraživani polimorfizmi gena *PSGL-1* su polimorfizmi VNTR (engl. *variable number of tandem repeats*) i polimorfizam M62I (Tablica 7.) (135). Polimorfizam M62I gena *PSGL-1* (NM\_003006.4:c.186G>A, rs2228315) nalazi se u eksonu 2 blizu mjesta vezanja s P-selektinima. Stoga postoji mogućnost da ovaj polimorfizam smanjuje jakost vezanja između *PSGL-1* i P-selektina što rezultira manjim brojem leukocitno-trombocitnih i leukocitno-endotelnih kompleksa. Postoje oprečni rezultati o utjecaju polimorfizma M62I na nastanak koronarne arterijske bolesti pri čemu u nekim istraživanjima nije dokazan utjecaj (136, 137), u jednoj studiji pokazali su protektivni učinak alela 62I (126), a postoji i istraživanje u kojem samo u ženskih nositelja alela 62I postoji povezanost s nastankom ateroskleroze u karotidnom plaku (138). Za povezanost polimorfizma M62I s nastankom IMU također su dobiveni različiti rezultati. Istraživanje Volcik i sur. na uzorku 1229 bolesnika nije našlo povezanost (139), za razliku od istraživanja na uzorku 79 bolesnika gdje je postojala povezanost samo u obliku trenda ( $P=0,065$ ) (140) i istraživanja Tao i sur. u kojem je dokazano da alel 62I povećava rizik za nastanak IMU (141). Prema dosadašnjim saznanjima, postoji samo jedno istraživanje koje je ispitalo polimorfizam M62I u maloj skupini mlađih bolesnika s venskom tromboembolijom. Pokazano je da bolesnici koji su nositelji *FV* Leiden ili *FII* G20210A imaju veću učestalost heterozigotnog oblika M62I (132).

**Tablica 7.** Polimorfizmi gena *P-SEL* i gena *PSGL-1* (prema 126, 135).

Gen <i>P-SEL</i>		Gen <i>PSGL-1</i>	
Polimorfizam	Mjesto na genu	Polimorfizam	Mjesto na genu
-2123C/G	5'	Met62Ile	Ekson 2
-1969A/G	5'	Ser273Phe	Ekson 2
-1817T/C	5'	Met274Val	Ekson 2
1576C/G	5'	VNTR A	Ekson 2
-485insT	5'	VNTR B	Ekson 2
Asn87Asn	Ekson 3	VNTR C	Ekson 2
Pro98Pro	Ekson 3	5' – promotorska regija gena VNTR – varijabilan broj tandemskih ponavljanja	
Val168Met	Ekson 5		
Ser290Asn	Ekson 7		
Asn562Asp	Ekson 11		
Val599Leu	Ekson 12		
Thr715Pro	Ekson 13		
Thr741Thr	Ekson 14		

### 1.12.3. FV Leiden

U zdravih ljudi aktivirani protein C (APC) djeluje kao proteaza koja inaktivira FVa i FVIIIa te na taj način usporava stvaranje trombina. *In vitro* dodatkom APC u plazmu zdravih ispitanika produljuje se aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV). Ispitujući uzorak plazme bolesnika s ponavljajućim trombozama, Dahlback i sur. slučajno su otkrili da u tom uzorku dodatkom APC ne dolazi do očekivanog produljenja APTV-a te su tu pojavu nazvali APC rezistencija (142). Slijedom tog otkrića, 1994. godine Bertina i sur. iz grada Leiden pretraživali su dio gena za FV na kojem se nalaze vezna mjesta za APC, te su u dijelu bolesnika s trombozom i APC rezistencijom pronašli točkastu mutaciju zamjene gvanina adeninom na 1691. položaju u eksonu 10 koja dovodi do zamjene aminokiseline arginina u glicin na položaju 506 (R506Q) (NM\_000130.4:c.1601G>A, rs6025) (Slika 11.). Nastala mutacija uklanja Arg506 vezno mjesto za APC pri čemu se FVa puno sporije inaktivira te stoga ima protrombotički učinak (143).



**Slika 11.** Shematski prikaz strukture proteina FV. FV je jednolančani protein visoke molekularne mase. Protein faktor V sastoji se od domena A1, A2, B, A3, C1 i C2. Peptidne veze između domena mogu biti proteolitički pocijepane aktiviranim faktorom II (FIIa) ili aktiviranim faktorom X (FXa) pri čemu se oslobađa domena B i stvara aktivirani faktor V (FVa). APC cijepa 3 peptidne veze u FVa na mjestima Arg306, Arg506 i Arg679 pri čemu dolazi do inaktivacije FVa (FVI) (modificirano prema 144).

FV Leiden nasljeđuje se autosomno dominantno i najčešći je oblik nasljedne trombofilije. Učestalost mutacije ovisi o promatranj populaciji. Heterozigotni oblik mutacije nalazimo u



4,4 % Europljana dok je iznimno rijedak u Azijata, Afrikanaca i Australaca (145). U Europi učestalost je najviša u Grka 7 % (145) i 14,7 % u Šveđana u južnoj Švedskoj (146). U dva istraživanja provedena u Hrvatskoj učestalost u zdravih ispitanika iznosila je 2,9- 4,0 % (147, 148). S obzirom na toliku učestalost ova mutacija može se smatrati polimorfizmom. Učestalosti homozigota u bijelaca variraju u istraživanjima od 1 na 1000 do 1 na 5000 ljudi (149, 150).

Ova mutacija povezana je najčešće s venskim trombozama. Heterozigoti za ovu mutaciju imaju 5-8 puta veći rizik za nastanak venske tromboze, dok se u homozigota rizik povećava 10-80 puta u odnosu na populaciju bez mutacije (149–152). Najčešće se pojavljuju duboke venske tromboze nogu i ruku, tromboza moždane vene te površinske tromboze dok su plućne embolije rjeđe (153). Istraživanja pokazuju da se ova mutacija otkrije u 11-26 % bolesnika s dubokom venskom trombozom (152–154). Rezultati dvaju hrvatskih istraživanja pokazala su da heterozigotni oblik mutacije nosi 16-21 % bolesnika s venskom tromboembolijom (147, 148). Meta-analizom utvrđeno je da 9,0 % bolesnika s ponavljajućim venskim tromboembolijama imaju ovu mutaciju (155).

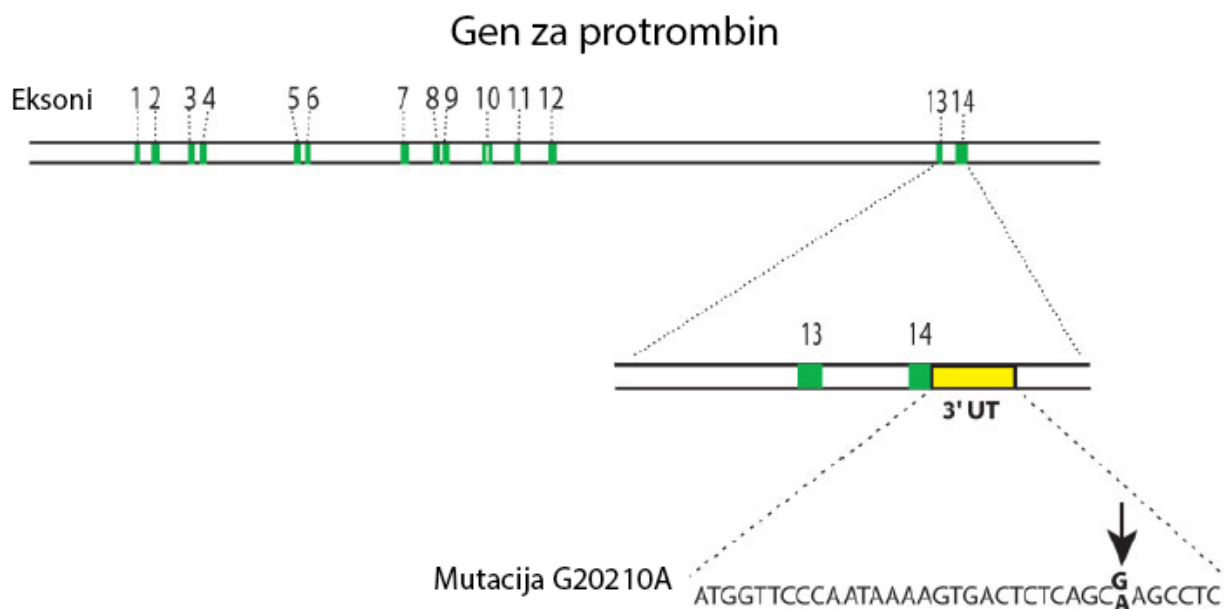
Postoje oprečni rezultati o doprinosu *FV* Leiden ka nastanku arterijske tromboze. Tako je jedna meta-analiza našla povezanost s nastankom IM samo u osoba mlađih od 55 godina (156), za razliku od kasnijeg istraživanja koje je pokazalo da ne postoji povezanost s nastankom IM niti u mlađih osoba (157).

Rezultati nisu ujednačeni niti za povezanost s MU. Studija koja je uključivala bolesnike starije od 65 godina nije našla povezanost *FV* Leiden i nastanka MU ili TIA (158) za razliku od studije koja je uključivala mlađe bolesnike gdje je, samo u žena, dokazana povezanost s nastankom MU (159).

Potvrđen je i dodatni rizični utjecaj pušenja na žene mlađe od 60 godina, koje su nositeljice *FV* Leiden, pri čemu one tada imaju 9 puta veći rizik za nastanak TIA ili MU u odnosu na one koje ne puše te nemaju mutaciju (160).

#### 1.12.4. *FII* G20210A

S obzirom da protrombin stvara ključan enzim u koagulacijskom sustavu s više raznih uloga znanstvenici su odlučili pretražiti gen *F2* u uzorcima bolesnika s venskom trombozom. Tako je istraživačka skupina iz Leidena, 1996. godine pod vodstvom Poorta i sur., u dijelu uzoraka bolesnika otkrila točkastu mutaciju zamjene gvanina adeninom na 20210. položaju (G20210A) u 3' nekodirajućoj regiji gena *F2* (NM\_000506.4:c.\*97G>A, rs1799963) (Slika 12.) (161). Nastala mutacija uzrokuje 33 % povišenja koncentracije protrombina te povećanu aktivnost protrombina u plazmi čime se povećava rizik od nastanka tromboze (161, 162).



**Slika 12.** Shematski prikaz strukture gena *F2*. Gen *F2* sastoji se od 14 eksona. Točkasta mutacija G20210A nalazi se u 3' nekodirajućoj regiji gena *F2* te ne uzrokuje promjenu u slijedu aminokiselina u proteinu protrombina (modificirano prema 144).

*FII* G20210A nasljeđuje se autosomno dominantno i po učestalosti je drugi najčešći oblik nasljedne trombofilije. Učestalost mutacije ovisi o promatranoj populaciji. U europskoj populaciji učestalost varira od 0-2,9 % u sjevernoj Europi do 0,7-8,0 % u južnoj Europi. Približno slična učestalost od 1,3-5,0 % prisutna je i u američkih bijelaca. Vrlo je rijetka ili je nema u Azijata, Afrikanaca te američkih Indijanaca i Aboridžina (163). U hrvatskoj populaciji heterozigotni oblik

mutacije nosi 4,0-6,0 % populacije (147, 148) zbog čega ovu mutaciju možemo smatrati polimorfizmom. Homozigoti u bijelaca pojavljuju se s učestalošću 1 na 5000 ljudi (150).

Rizik za nastanak venske tromboembolije u heterozigota veći je 3-4 puta a u homozigota 30 puta (150, 152, 153).

U meta-analizi bolesnika s venskom trombozom pronađeno je da je 10,3 % bolesnika s izoliranom DVT kao i 10,3 % bolesnika s izoliranom PE (ili DVT praćenom PE) bilo heterozigot za ovu mutaciju (153). Istraživanja rađena na uzorcima hrvatskih bolesnika s venskom tromboembolijom pokazala su da 8,0-16,0 % bolesnika imalo heterozigotni oblik mutacije (147, 148).

U njemačkih bolesnika s venskom cerebralnom trombozom 11 % bolesnika su bili nositelji ove mutacije (164). Meta-analiza pokazala je da je među bolesnicima s ponavljajućim venskim tromboembolijama njih 6,7 % bilo nositelj ove mutacije (155).

Od arterijskih tromboza najčešće se ispitivao utjecaj na nastanak IM i IMU. Meta-analiza koja je obuhvatila bolesnike sa IM nije našla povezanost s mutacijom gena za protrombin, a iste rezultate pokazalo je i kasnije istraživanje u skupini bolesnika mlađoj od 45 godina (156, 157). Rizik za nastanak MU, istraživan u meta-analizi, bio je povećan 1,4 puta u nositelja ove mutacije (165), što se ne slaže s rezultatima kasnije objavljenog istraživanja koje nije našlo povezanost s nastankom MU ili TIA (160).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA

Ph(-) MPN skupina su rijetkih hematoloških bolesti u koju se ubrajaju ET, PV i PMF. Ove bolesti povezane su s kraćim preživljenjem u odnosu na zdrave ljude (35, 36, 44). Tromboza se pojavljuje u 30 % bolesnika kao najčešća komplikacija bolesti, pri čemu su arterijske tromboze češće od venskih (37, 42, 46). Pretpostavlja se da je tako visoka incidencija tromboze uzrokovana kvalitativno i kvantitativno promijenjenim hematološkim stanicama koje djeluju protrombotički jer oštećuju endotel krvnih žila te luče proupalne citokine i adhezijske molekule (80, 81, 83). Poznato je da nastanku arterijske tromboze prethodi proces ateroskleroze u kojem dolazi do nakupljanja i adhezije cirkulirajućih leukocita na endotel krvnih žila. U tome sudjeluju P-selektini (P-SEL), adhezijske molekule koje luče endotelne stanice i trombociti. Interakcija P-SEL i receptora PSGL-1 omogućuje kotrljanje leukocita po endotelu te adheziju leukocita i endotela te leukocita i trombocita (122, 125, 139). Studije u kojima se istraživala povezanost polimorfizama gena *P-SEL* (S290N, N562D, V599L, T715P) i *PSGL-1* (M62I) i nastanka tromboze pokazale su oprečne rezultate za povezanost s nastankom arterijske tromboze, dok o povezanosti s nastankom venske tromboze nema puno istraživanja. (127–129, 131, 139, 141). Prema dostupnim podacima u bolesnika s Ph(-) MPN dosad nije ispitivana povezanost polimorfizama *P-SEL* te *PSGL-1* s nastankom tromboze.

Trombociti imaju ključnu ulogu u procesu primarne hemostaze adherirajući na mjesto ozljede endotela gdje luče sadržaj svojih granula te međusobno agregiraju. Sve te interakcije omogućuju im kompleksi glikoproteinskih receptora koji se nalaze na površini trombocita. Receptori GPIb/IX/V i GPIa/IIa vežu trombocite na oštećeni endotel, a receptor GPIIb/IIIa zaslužan je za agregaciju trombocita (85). Ti receptori su polimorfni i pripadaju skupini ljudskih trombocitnih aloantigena. HPA-1 i HPA-3 aloantigeni su receptora GPIIb/IIIa, HPA-2 nalazi se na GPIb/IX/V dok je HPA-5 dio receptora GPIa/IIa. Istraživanja o povezanosti polimorfizama *HPA* i nastanka arterijske tromboze za većinu polimorfizama pokazala su oprečne rezultate dok o povezanosti s venskom trombozom postoji tek nekolicina istraživanja. (99, 100, 105, 108, 110, 120). Prema nama dostupnim podacima, postoje samo dvije objavljene studije o povezanosti polimorfizama *HPA-1* i *HPA-2* s nastankom tromboze u Ph(-) MPN bolesnika (63, 79).

*FV* Leiden i *FII G20210A* u općoj populaciji dobro su poznati nasljedni rizični faktori za nastanak venske tromboze dok o povezanosti s arterijskom trombozom nema ujednačenih rezultata (144, 156, 160, 165). Međutim, dok je većina studija u PV i ET bolesnika pokazala njihovu povezanost s nastankom venske, ali i arterijske tromboze (59, 60, 76) postoji i istraživanje u kojem povezanost nije nađena (63).

Dokazano je da prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2* povećava rizik za nastanak tromboze u Ph(-) MPN bolesnika (38, 48, 68). Međutim, rezultati istraživanja nisu usaglašeni oko povezanosti kvantitativnih vrijednosti opterećenja mutiranim alelom V617F i nastanka tromboze (55, 56, 69).

Budući da u ovih bolesnika dolazi do mijeloproliferacije, a leukociti i trombociti imaju ključnu ulogu u nastanku ugruška, istraživani su utjecaj leukocitoze i trombocitoze na nastanak tromboze. Dok je leukocitoza u većini studija povezana s nastankom arterijske tromboze (46, 65), za utjecaj trombocitoze nisu dobiveni jednoznačni rezultati (47, 48, 58, 74, 75).

Unatoč tome što povišeni hematokrit i povećana koncentracija hemoglobina povećavaju viskoznost krvi, njihova povezanost s nastankom tromboze ispitivana je u malom broju istraživanja te su dobiveni oprečni rezultati (46, 47, 61, 62, 72).

Dob je rizičan faktor za nastanak tromboze u zdravih ljudi (50), ali i u Ph(-) MPN bolesnika. Većina istraživanja pokazuje da pri postavljanju dijagnoze Ph(-) MPN dob > 60 godina predstavlja rizičan faktor za trombozu (20, 42, 48).

Pokazano je da prethodna tromboza također predstavlja povećani rizik za nastanak nove tromboze (50), što je potvrđeno i u većini ispitivanja Ph(-) MPN bolesnika (38, 53, 67).

Naposlijetku, kardiovaskularni rizični faktori poput hipertenzije, hiperlipidemije, šećerne bolesti i pušenja povezani su s nastankom tromboze u općoj populaciji (49, 50). Isti utjecaj ovih faktora nađen je i u skupini PV i ET (67, 78), međutim za PMF bolesnike dobiveni su oprečni rezultati (46, 47).

Hipoteza ovog istraživanja je da su polimorfizmi gena *HPA*, *P-SEL*, *PSGL-1*, *FV* Leiden i *FII G20210A*, hematološki parametri (broj eritrocita, leukocita, trombocita, vrijednost hematokrita i koncentracija hemoglobina), prisutstvo mutacije V617F u genu *JAK2* (više opterećenje mutiranim alelom V617F) i prisutnost kardiovaskularnih rizičnih faktora povezani s nastankom tromboze u bolesnika s Ph(-) MPN. S obzirom da polimorfizmi gena *P-SEL* i *PSGL-1* nisu još ispitivani u ovoj

skupini bolesnika, dok za dio polimorfizama gena *HPA* koji će biti predmetom ovog istraživanja postoje tek dva istraživačka rada, ovim istraživanjem dobit će se nove informacije o njihovom potencijalnom utjecaju na nastanak tromboze. Ujedno će biti ispitano postoji li kumulativan utjecaj prisutnosti više rizičnih faktora koji bi doprinijeli nastanku tromboze.

U konačnici, dobiveni rezultati će se potencijalno moći koristiti za prepoznavanje veličine utjecaja pojedinih ili udruženih ispitivanih faktora na nastanak tromboze te za izradu prediktivnih modela za nastanak tromboze što će omogućiti liječnicima svrstavanje bolesnika prema riziku za trombozu te posljedičnom sprječavanju trombotičkih komplikacija i smanjenju stope smrtnosti Ph(-) MPN bolesnika.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Analizirati demografske i anamnestičke podatke Ph(-) MPN bolesnika te ispitati njihovu povezanost s nastankom tromboze (arterijske i/ili venske)
2. Analizirati postoji li povezanost parametara krvne slike (broj eritrocita, leukocita i trombocita, vrijednost hematokrita i koncentracija hemoglobina) određenih prilikom postavljanja dijagnoze MPN-a s nastankom tromboze (arterijske i/ili venske)
3. Analizirati u bolesnika učestalost kardiovaskularnih rizičnih faktora te ispitati njihov utjecaj na nastanak tromboze u bolesnika (i u podskupinama bolesnika prema dijagnozi te prema vrsti tromboze) u odnosu na bolesnike bez tromboze
4. Analizirati u bolesnika mutaciju V617F u genu *JAK2* u bolesnika, te ukoliko je prisutna, odrediti opterećenje mutiranim alelom V617F u dijagnostičkom uzorku i odrediti postoji li povezanost s nastankom tromboze (arterijske i/ili venske)
5. Genotipizirati polimorfizme u genu P-selektin (S290N, N562D, V599L, T715P) i polimorfizam M62I u genu P-selektin glikoprotein 1 ligand, polimorfizme ljudskih trombocitnih aloantigena *HPA-1*, *HPA-2*, *HPA-3* i *HPA-5*, *FV Leiden* i *FII G20210A* u svih bolesnika te u zdravih ispitanika
6. Analizirati postoji li povezanost navedenih polimorfizama i mutacija s nastankom tromboze u bolesnika (i u podskupinama bolesnika prema dijagnozi te prema vrsti tromboze) u odnosu na bolesnike bez tromboze
7. Analizirati postoje li razlike u učestalosti navedenih polimorfizama i mutacija između bolesnika i skupine zdravih ispitanika
8. Analizirati kombinacije najčešćih genotipova ispitanih polimorfizama u bolesnika s trombozom i bez tromboze te ispitati njihovu povezanost s nastankom tromboze
9. Analizirati učestalost haplotipova ispitanih polimorfizama u bolesnika s trombozom i bez tromboze te ispitati njihovu povezanost s nastankom tromboze
10. Na temelju dobivenih rezultata napraviti prediktivne modele za nastanak tromboze u Ph(-) MPN bolesnika

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 258 punoljetnih bolesnika oba spola koji su zbog dijagnoze Ph(-) MPN praćeni u Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u sklopu odjela ili ambulante u periodu od 2011. do 2017. godine.

Bolesnici su upućeni na hematološku obradu od strane liječnika opće medicine ili drugih specijalista, te im je temeljem tada važećih standardnih kriterija (166) postavljena dijagnoza Ph negativnog mijeloproliferativnog zloćudnog tumora. Svakom bolesniku je učinjena kompletna krvna slika, patohistološka analiza bioptata kosti, citološka analiza koštane srži i molekularna dijagnostika (analiza točkaste mutacije V617F u genu *JAK2*). Jedan dio bolesnika (N=68, 26,4 %) imao je već ranije postavljenu dijagnozu Ph(-) MPN, ali je za njih tražena molekularna dijagnostika (analiza točkaste mutacije V617F u genu *JAK2* i/ili mutacije u genu *CALR*).

Inicijani pregled je uključivao detaljnu anamnezu i pregled medicinske dokumentacije, posebice vezanu za postojeće kardiovaskularne rizične faktore (hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija, pušenje i alkoholizam), popratnu terapiju, te sve trombotičke događaje prije postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN.

Bolesnici su nakon postavljanja dijagnoze redovito praćeni od strane hematologa, barem jednom u 3 mjeseca, te su tijekom pregleda bilježeni svi neželjeni događaji, uključujući i sve trombotičke događaje koje su nastali nakon postavljanja dijagnoze Ph(-)MPN.

Kriteriji za dijagnosticiranje hipertenzije bili su krvni tlak  $\geq 140/90$  mm Hg ili terapija antihipertenzivima (167). Šećernu bolest dijagnosticirali su liječnici obiteljske medicine ili specijalisti endokrinolozi te je podrazumijevala terapiju oralnim hipoglikemicima ili inzulinom (168). Dijagnoza hiperlipidemije uključivala je hiperkolesterolemiju i/ili hipertrigliceridemiju, pri čemu je ukupan kolesterol bio  $> 5,0$  mmol/L, a trigliceridi  $> 1,7$  mmol/L ili terapiju antilipemicima (169).

Od trombotičkih događaja prije dijagnosticiranja Ph(-) MPN, prilikom dijagnosticiranja i tijekom praćenja bolesti zabilježene su arterijske tromboze i velike aterosklerotske promjene koje su uključivale ishemijski moždani udar, infarkt miokarda, prolazni ishemijski napadaj, infarkt



slezene, okluziju karotidne arterije, okluziju femoralne arterije, okluziju subklavijalne arterije, aortoilijačnu bolest, emboliju arterija ruke, emboliju arterija stopala i intrauterini zastoj u rastu. Nastale venske tromboze bile su duboke venske tromboze (DVT) nogu, DVT abdominalnih vena, plućne embolije (PE), površinski tromboflebitisi, DVT ruke, tromboza retinalne vene i tromboza venskih sinusa mozga.

Kriterij za postavljanje dijagnoze ishemijskog moždanog udara bio je nagli neurološki ispad u trajanju dužem od 24 sata koji je potvrđen je kompjuteriziranom tomografijom (CT) ili magnetskom rezonancijom (MR). Prolazni ishemijski napadaj dijagnosticiran je kao nagli nastanak simptoma moždanog udara koji se povukao unutar 24 sata (170), te na CT i MR nije bilo morfoloških znakova ishemijskog zbivanja.

Infarkt miokarda dijagnosticiran je na temelju prisutnosti simptoma ishemije, promjene u elektrokardiogramu (pojava ST elevacije, stvaranje patoloških Q valova, novi blok lijeve grane) i porasta i/ili pada koncentracije troponina s barem jednom vrijednosti iznad 99. percentile vrijednosti zdrave populacije (171). Infarkt slezene dijagnosticiran je na temelju simptoma, laboratorijskih testova te izradom CT s kontrastom (172). Okluzija karotidne arterije potvrđena je MR angiografijom, CT angiografijom ili ultrazvukom (173). Okluzija femoralne arterije, subklavijalne arterije, aortoilijačna bolest te embolija arterija ruke i stopala dijagnosticirani su pomoću duplex UZV, CT angiografijom, MR angiografijom i kontrastnom angiografijom (174). Zastoj u razvoju trudnoće dijagnosticiran je pomoću doplerskog UZV i biofizikalnog profila (175).

Površinski tromboflebitisi dijagnosticirani su na temelju kliničke slike i ultrazvuka. Tromboza vena ruku potvrđena je ultrazvukom te UZV doplerom i obojenim doplerom (176). PE dijagnosticirana je na temelju kliničke slike, CT angiografije plućnih arterija ili ventilacijsko-perfuzijske scintigrafije pluća, te ehokardiografije (177). Dijagnoza tromboze venskih sinusa mozga dijagnosticirana je MR ili CT (178) dok je tromboza retinalne vene potvrđena fluoresceinskom angiografijom (179).

U istraživanje je bilo uključeno i 258 zdravih ispitanika bez znakova mijeloproliferativne bolesti koji su bili usklađeni prema dobi i spolu s bolesnicima i do trenutka uključivanja u istraživanje, kao niti tijekom trajanja studije, nisu imali trombotičkih događaja. Njihovi uzorci prikupljeni su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom laboratorijske obrade.

Istraživanje je provedeno u uzorcima krvi koji su preostali nakon redovne bolničke obrade bolesnika tijekom njihovog prvog dolaska u KBC Zagreb od trenutka uključanja u istraživanje uz suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

Financiranje istraživanja provedeno je iz projekta “Protrombotički rizični čimbenici u cerebrovaskularnim bolestima u djece”, MZOŠ 0214212, projekta „Leukemije i transplantacija krvotvornih matičnih stanica”, MZOŠ 108-1081872-1913 i projekta “Genetika i funkcija hematopoeze i mikrookoliša Ph- mijeloproliferativnih bolesti”, MZOŠ 108-1980955-3094.

## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Analiza krvne slike**

Za izradu pretrage krvna slika uzet je uzorak 6 mL periferne krvi u epruvetu s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Broj eritrocita, leukocita i trombocita, vrijednost hematokrita i koncentracija hemoglobina određeni su na rutinskim hematološkim brojačima Beckman Coulter LH 750 i Beckman Coulter DxH 800 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD).

### **4.2.2. Izdvajanje genomske i granulocitne DNA**

U epruvetu s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA uzeto je 14 mL periferne krvi za izolaciju genomske i granulocitne DNA. Iz dijela uzorka pune krvi izolirana je genomska DNA metodom isoljavanja (180). Iz drugog dijela pune krvi izdvojeni su granulociti s komercijalnim reagensom Polymorphprep, metodom centrifugiranja pune krvi u otopini različitog gradijenta osmolanosti. Iz granulocita, metodom isoljavanja, izdvojena je granulocitna DNA. Genomska i granulocitna DNA bile su pohranjene na +4 °C do trenutka izrade genetičkih analiza.

### 4.2.3. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija i čistoća DNA mjerena je na spektrofotometru NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji mjeri apsorbancu vodene otopine DNA na 260 i 280 nm te iz dobivenih rezultata izračunava koncentraciju i čistoću DNA.

### 4.2.4. Analiza točkaste mutacije V617F u genu *JAK2*

Dokazivanje točkaste mutacije izvedeno je metodom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s alel-specifičnim početnicama (engl. *allele-specific*) prema metodi Baxter i sur. (7). U toj reakciji koristi se jedna zajednička uzvodna (engl. *reverse*) početnica (*JAK2 R*) i dvije različite nizvodne (engl. *forward*) početnice, od kojih je jedna specifična za mutaciju (*JAK2 Fs*), a druga se koristi za umnažanje produkta (*JAK2 Fk*) koji služi kao unutarnja kontrola umnažanja (kontrolni produkt). Ako postoji mutacija V617F nastati će dva produkta umnažanja, jedan specifičan za mutaciju V617F veličine 203 parova baza (pb) i drugi kontrolni produkt veličine 364 pb. U slučaju da mutacija V617F nije prisutna, nastati će samo kontrolni produkt veličine 364 pb. Vizualizacija nastalih produkata vrši se na elektroforezi u agaroznom gelu (Slika 13.).

Reagensi potrebni za ovu analizu:

- 1) 10x PCR pufer II s  $MgCl_2$   
Tris-HCl, 100mM, pH 8.3  
KCl, 500 mM  
 $MgCl_2$ , 25 mM
- 2) Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP)  
Smjesa otopine dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10 mM
- 3) AmpliTaq Gold® DNA Polimeraza, 250 U

4) Oligonukleotidne početnice, 100  $\mu$ M

JAK2 R 5'- CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA -3'

JAK2 Fs 5'- AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT -3'

JAK2 Fk 5'- ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG -3'

5) Sterilna voda

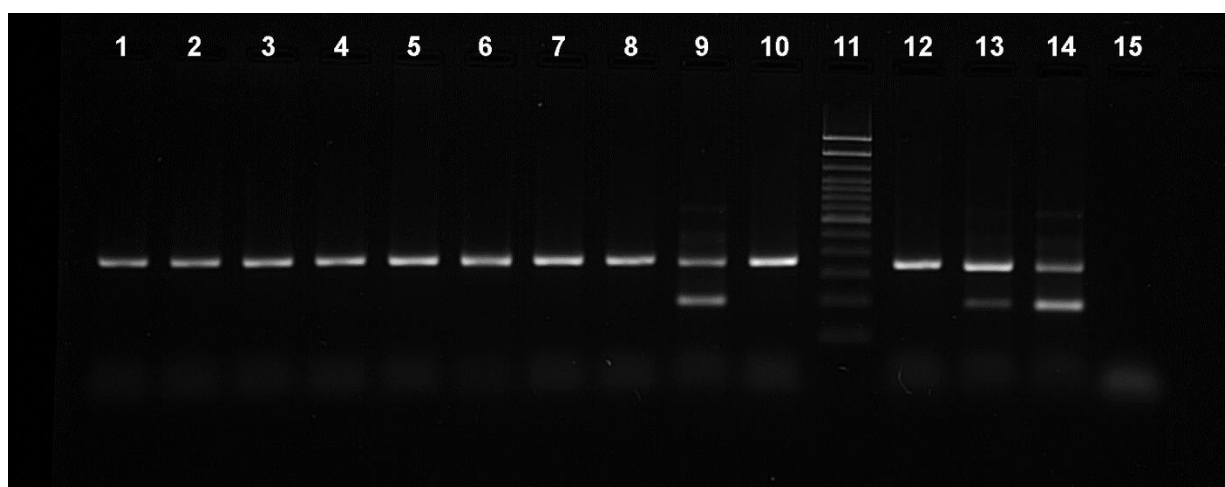
Proizvođač svih reagensa osim sterilne vode i početnica je tvrtka Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD. Početnice su sintetizirane u tvrtki TIB Molbiol, Berlin, Njemačka.

Postupak:

Za otopinu genomske DNA svakog bolesnika napravljena je reakcijska smjesa prema protokolu prikazanom u Tablici 8. U protokolu za izradu reakcijske smjese napravili smo izmjene u odnosu na izvorni protokol (7), i optimizacijom metode smanjili smo koncentraciju početnice JAK2 Fk kako bi umanjili umnažanje kontrolnog produkta. Ujedno smo povećali koncentraciju početnice JAK2 Fs i snizili temperaturu za vezanje početnica na komplementarne dijelove DNA zbog povećanja osjetljivosti PCR reakcije za umnažanje produkta mutacije V617F. PCR reakcija izvedena je u termobloku GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD) pod slijedećim uvjetima: 10 min na 95 °C; 36 ciklusa od 30 s na 94 °C, 30 s na 56 °C i 1 min na 72 °C; 10 min na 72 °C; 4 °C  $\infty$ . Razdvajanje umnoženih produkata izvodilo se sustavom za elektroforezu u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1x tris-borna kiselina-EDTA (TBE) puferu. Uz umnožene produkte uzoraka bolesnika na gel smo nanijeli i pozitivnu kontrolu umnoženu PCR reakcijom, slijepu probu (sterilna voda) koja je prošla postupak PCR umnažanja i biljeg molekularne mase 100 pb (GE Healthcare, Chicago, SAD). Uvjeti za elektroforetsko razdvajanje bili su 20 min na 180V i 150mA. Vizualizacija umnoženih produkata izvedena je pomoću sustava za slikanje gela pod UV svjetlom G-box (Syngene, Cambridge, Velika Britanija) (Slika 13.).

**Tablica 8.** Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za analizu mutacije V617F.

Reagens	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Koncentracija u 50 $\mu\text{L}$
10X PCR pufer s $\text{MgCl}_2$	5,0	1x
$\text{MgCl}_2$	3,0	1,5 mM
dNTP	4,0	0,8 mM
Početnica JAK2 Fs	0,7	1,4 $\mu\text{M}$
Početnica JAK2 Fk	0,2	0,4 $\mu\text{M}$
Početnica JAK2 R	0,5	1,0 $\mu\text{M}$
AmpliTaQ Gold® DNA Polimeraza	0,5	2,5 U
Sterilna destilirana voda	35,1	
Genomska DNA 80 ng/ $\mu\text{L}$	1,0	



**Slika 13.** Elektroforeza produkata alel-specifičnog PCR za mutaciju V617F u genu *JAK2* na agaroznom gelu. Gornji umnoženi produkti su umnoženi ulomci unutarnje kontrole veličine 364 pb, a donji umnoženi produkti veličine 203 pb nastali su zbog prisutnosti mutacije V617F. Uzorci 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 i 12 su negativni dok su uzorci 9 i 13 pozitivni na mutaciju V617F u genu *JAK2*. Uzorak broj 11 je biljeg molekularne mase od 100 pb, uzorak broj 14 je pozitivna kontrola za mutaciju V617F dok je uzorak broj 15 slijepa proba.

#### 4.2.5. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom V617F

Za svakog bolesnika, pozitivnog na mutaciju V617F u genu *JAK2*, napravljena je kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom V617F iz uzorka granulocitne DNA. Pri tome je korištena Taqman metoda kvantitativnog PCR u stvarnom vremenu (RQ-PCR) prema Larsen i sur. (181). Ova metoda temelji se na principu korištenja enzima Taq polimeraze, nizvodne i uzvodne

početnice specifične za dio gena koji se umnaža i fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde komplementarne ciljnom mjestu na kalupu DNA s izvjestiteljskom (engl. *reporter*) fluorescentnom bojom na 5' kraju i prigušivačkom (engl. *quencher*) bojom na 3' kraju. Kad laserska zraka tijekom PCR ciklusa pobudi intaktnu nevezanu sondu, prigušivač koji je u neposrednoj blizini izvjestiteljske boje pomoću Försterove rezonancije prijenosa energije (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) utišava fluorescenciju koju emitira izvjestiteljska boja. Tijekom kvantitativnog PCR nizvodna i uzvodna početnica vežu se za komplementaran slijed DNA a Taq polimeraza ugrađuje nukleotide i produljuje slijed DNA do nastanka novog produkta umnažanja. U toj fazi, ukoliko postoji komplementaran slijed sonde, ona se veže za njega a Taq polimeraza svojom 5' - 3' egzonukleaznom aktivnošću cijepa vezanu sondu pri čemu se prigušivač udaljava od izvjestiteljske boje i dolazi do otpuštanja fluorescencije. Ako ne postoji dio DNA koji je komplementaran sondi, ona se neće vezati za DNA, te ostaje intaktna i ne dolazi do otpuštanja fluorescencije. Nakon svakog ciklusa umnažanja detektor u PCR uređaju mjeri količinu oslobođene fluorescencije izvjestiteljske boje u odnosu na pasivnu referentnu boju karboksi-x-rodamin (ROX), a njihov omjer naziva se normalizirani izvjestiteljski signal ( $R_n$ ) (Slika 14.). Zbog mogućnosti mjerenja fluorescencije nakon svakog ciklusa i saznanja o tome dolazi li do umnažanja DNA ova vrsta PCR ciklusa nosi naziv PCR u stvarnom vremenu. Ciklus u kojem oslobođena fluorescencija nastala umnažanjem prijeđe prag detekcije fluorescencije (engl. *threshold*) naziva se granični ciklus (engl. *cycle threshold*, CT). Smatra se da tijekom eksponencijalne faze PCR umnažanja u svakom ciklusu dolazi do dvostrukog povećanja broja umnoženih produkata te je oslobođena fluorescencija direktno proporcionalna nastalim produktima, što čini ovu fazu optimalnom za analizu početnog broja kopija DNA u uzorku (Slika 15.). Za ovu metodu potrebno je uz uzorke umnožiti i standarde poznatog broja kopija DNA. Uređaj bilježi CT vrijednosti ciklusa za uzorke i za standarde te iz CT vrijednosti standarda izrađuje standardnu krivulju koja omogućuje kvantifikaciju početnog broja kopija DNA u uzorcima bolesnika (Slika 16.) (182).

Reagensi potrebni za ovu metodu:

- 1) TaqMan Universal PCR Master Mix 2x sastoji se od:
  - AmpliTaq Gold DNA polimeraza
  - dATP, dUTP, dCTP, dGTP
  - enzim AmpErase (engl. *uracil N-glycosylase*, UNG)

pasivna referentna boja ROX

pufer

2) Oligonukleotidne početnice, 100 pmol/ $\mu$ L

V617F-F 5' - CTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA -3'

V617Fwt-R 5' - GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAC -3'

V617Fmut-R 5' - GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA -3'

3) Fluorescentno obilježena sonda, 100 pmol/ $\mu$ L

F V617F 5' -FAM- TGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTT- TAMRA -3'

4) Sterilna voda

Svi reagensi osim sterilne vode bili su od tvrtke Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD.

Postupak:

Pripremljene su radne otopine razrijeđenja 1:10 za početnice i sonde (konačna konc. 10 pmol/ $\mu$ L). Za svaki uzorak granulocitne DNA napravljene su dvije odvojene reakcijske smjese, jedna za divlji tip gena *JAK2*, a druga za alel V617F gena *JAK2* prema Tablici 9. Obje smjese sadrže zajedničku nizvodnu početnicu (V617F-F) i zajedničku nizvodnu sondu (F V617F) obilježenu izvjestiteljskom bojom 6-karboksifluorescein (FAM) na 5' kraju te prigušivačkom bojom tetrametilrodamin (TAMRA) na 3' kraju. U jednu reakcijsku smjesu dodaje se nizvodna početnica specifična za divlji tip (V617Fwt-R), a u drugu nizvodna početnica specifična za alel V617F gena *JAK2* (V617Fmut-R). Analiza se provodi na uređaju Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems tvrtke Applied Biosystems, Foster City, SAD, primjenom kompatibilne PCR reakcijske smjese TaqMan Universal PCR Master Mix 2x.

Uz uzorke svaki put je umnažano i pet standarda koje je distribuirala sponzorirana europska mreža eksperata za molekularnu dijagnostiku MPN i urođenih bolesti sličnih MPN (engl. *EU sponsored Network of Experts on the Molecular Diagnosis of Myeloproliferative Neoplasm (MPN) and MPN-related congenital diseases*, MPN&MPNr-Euronet).

Standardi su sadržavali 21 500 kopija divljeg tipa i 64 500, 6450, 645, 64,5 i 0 kopija alela V617F (razrijeđenje svakog sljedećeg standarda u odnosu na prvi standard je 10 puta), kako bi se njihovim omjerom dobio postotak opterećenja mutiranim alelom V617F od 75,0 %, 23,0 %, 3,0 %, 0,3 % i 0,0 % te slijepe probe za obje reakcijske smjese.

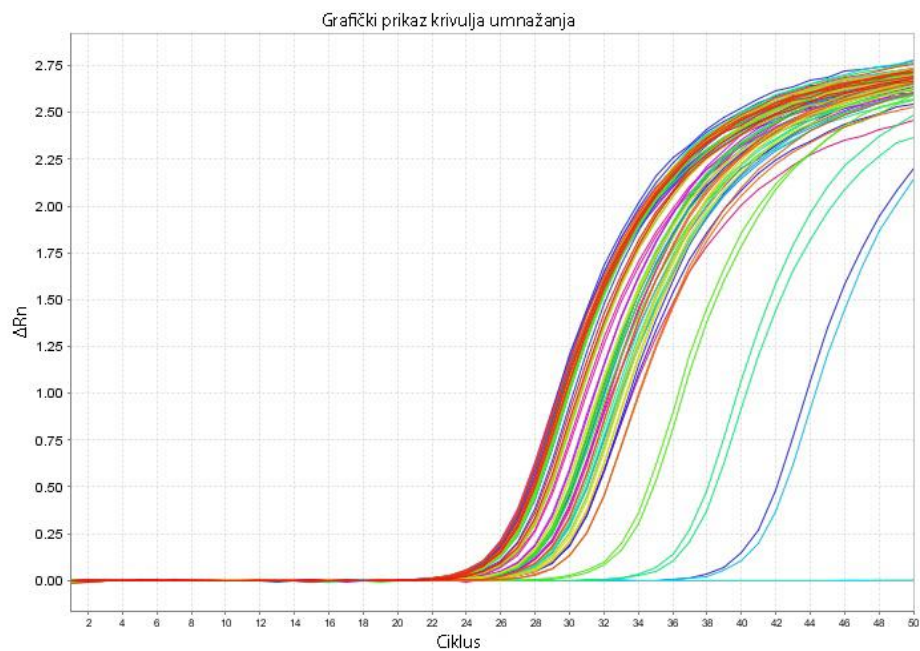
Uvjeti umnažanja reakcijske smjese bili su: 10 minuta na 95 °C; 50 ciklusa od 15 sekundi na 95 °C i 1 minute na 60 °C.

Svi su standardi i uzorci analizirani u duplikatu. Rezultati su izraženi kao postotak V617F *JAK2* primjenom formule:  $V617F\ JAK2\ \% = \frac{\text{broj kopija V617F JAK2}}{(\text{broj kopija divljeg tipa JAK2} + \text{broj kopija V617F JAK2})} \times 100$ .

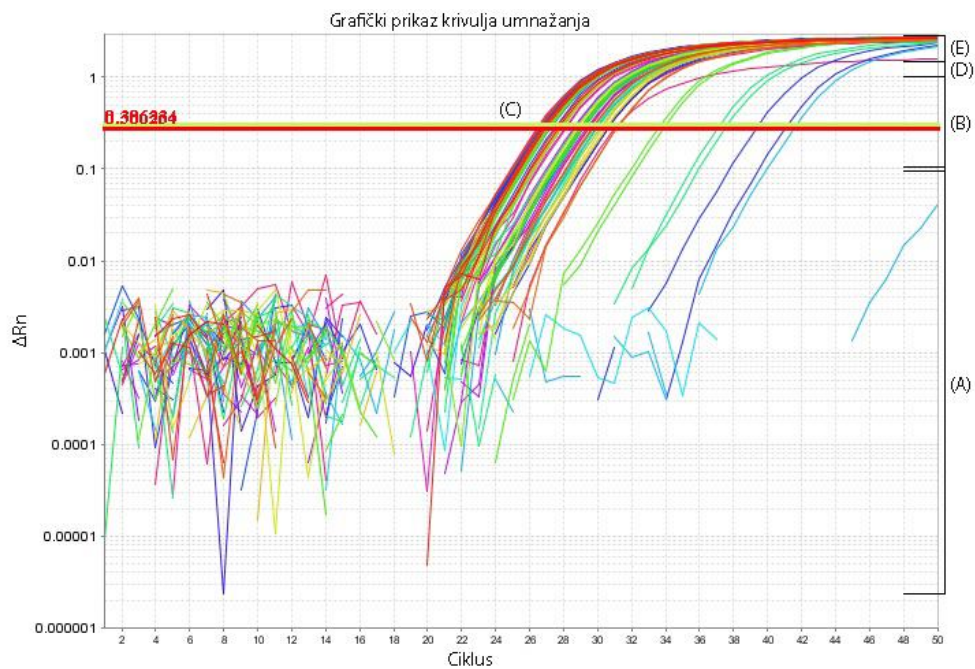
**Tablica 9.** Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za kvantifikaciju opterećenja mutiranim alelom V617F.

Reagens	Divlji tip gena <i>JAK2</i>	Alel V617F gena <i>JAK2</i>
	V (µL) [C (µM) u 25 µL]	
2x TaqMan™ Universal PCR Master Mix	12,5 [1x]	
Početnica F V617F	0,75 [0,3]	0,75 [0,3]
Početnica WT R V617F	0,75 [0,3]	/
Početnica MUT R V617F	/	0,75 [0,3]
Sonda F V617F FAM	0,50 [0,2]	0,50 [0,2]
Sterilna destilirana voda	9,5	9,5
Granulocitna DNA 40 ng/µL	1	

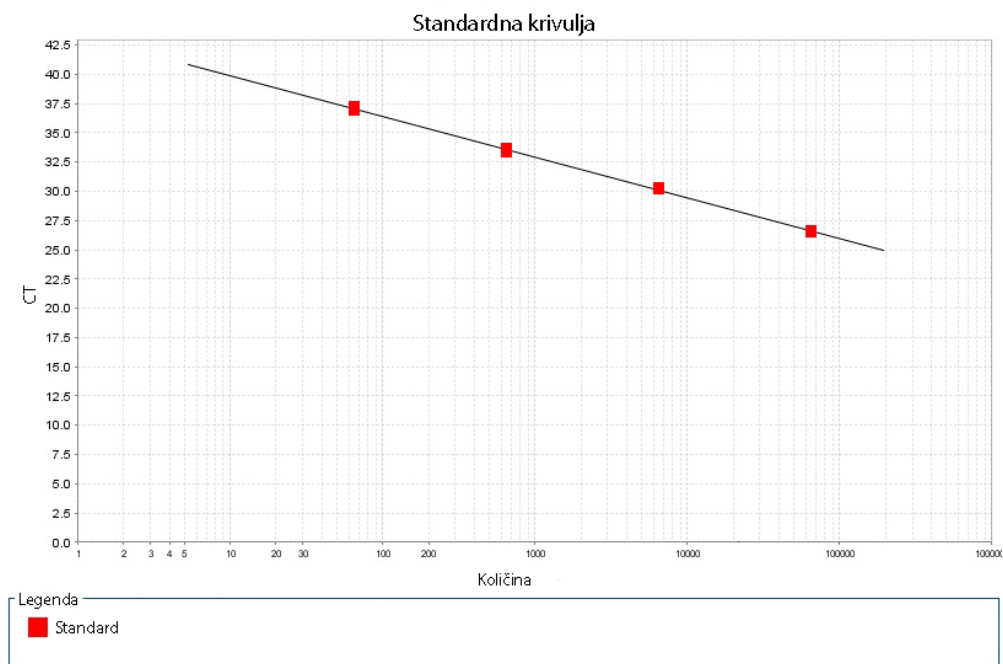




**Slika 14.** Linearni grafički prikaz krivulja umnažanja. Na osi X nalazi se broj ciklusa RQ-PCR a na osi Y  $\Delta R_n$  vrijednosti.  $\Delta R_n$  je razlika između fluorescencije  $R_n$  i pozadinske fluorescencije slijepe probe.



**Slika 15.** Logaritamski grafički prikaz krivulja umnažanja. Na osi X nalazi se broj ciklusa RQ-PCR a na osi Y  $\Delta R_n$  vrijednosti. Na prikazu su označeni (A) pozadinska fluorescencija (B) eksponencijalna faza (C) prag detekcije fluorescencije (D) linearna (E) plato faza.



**Slika 16.** Grafički prikaz standardne krivulje dobivene iz standarda poznatog broja kopija mutiranog alela V617F. Na osi X nalazi se kvantitativni podatak o broju kopija mutiranog alela a na osy Y nalaze se CT vrijednosti. Analizator pomoću tih vrijednosti izračuna jednadžbu pravca (nagib pravca i odsječak na osi Y). Iz te formule potom automatski izračunava količinu mutiranog alela u uzorcima. Za ovu standardnu krivulju nagib pravca iznosio je  $-3,489$  dok je odsječak na osi Y bio je  $43,402$ . Vrijednost odsječka na osi Y jednaka je CT vrijednosti koju bi dobili kad bi u uzorku postojala samo jedna kopija mutiranog alela. Korelacija između razrijeđenja standarda je iznosila  $0,999$  što ukazuje na odličnu linearnost PCR reakcije dok je efikasnost PCR reakcije bila  $93,489\%$ .

#### 4.2.6. Genotipizacija polimorfizama *HPA*

Genotipizacija *HPA* rađena je PCR kvalitativnom metodom alelne diskriminacije u stvarnom vremenu temeljenoj na Taqman tehnologiji prema Ficko i sur. (183).

U ovoj metodi korištena su nizvodna i uzvodna početnica za svaki ispitivani *HPA* koje umnažaju ciljni polimorfni slijed DNA, te dvije obilježene sonde koja se veže za manje utore DNA uzvojnice (engl. *minor groove binder*, MGB), a služe za razlikovanje alela a od alela b. Ove sonde imaju na 5' kraju fluorescentnu izvjestiteljsku boju a na 3' kraju prigušivač bez fluorescencije (engl. *nonfluorescent quencher*, NFQ) koji je konjugiran s molekulom MGB za čvršće vezanje za DNA

kalup što povisuje temperaturu taljenja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ) sonde i omogućuje korištenje kraćih slijedova sonde čime se doprinosi boljem razlikovanju alela. Obzirom da prigušivač u ovoj vrsti sonde nije fluorescentna boja, time se umanjuje pozadinska fluorescencija što doprinosi većoj osjetljivosti i preciznosti u razlikovanju alela. Za alel „a“ svih HPA korištena je sonda s izvjestiteljskom bojom 2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6 karboksi-fluorescein (VIC) dok je za alel „b“ korištena izvjestiteljska boja FAM. Dok je sonda intaktna i nevezana u reakcijskoj smjesi, prigušivač pomoću FRET utišava fluorescenciju izvjestiteljske boje, no ukoliko se sonda veže za komplementarni dio DNA, enzim Taq polimeraza prilikom sinteze novog lanca cijepa sondu zbog čega dolazi do porasta fluorescencije.

Reagensi potrebni za ovu analizu:

- 1) Taqman Genotyping Master mix 2x sastoji se od:

AmpliAq Gold DNA polimeraza

dATP, dTTP, dCTP, dGTP

pasivna referentna boja ROX

pufer

- 2) HPA oligonukleotidne početnice, 100 pmol/ $\mu$ L

HPA-1F 5'- TGATTGCTGGACTTCTCTTTGG -3'

HPA-1R 5'- CTCACTGGGAACTCGATGGATT -3'

HPA-2F 5'- GAGCTCTACCTGAAAGGCAATGA -3'

HPA-2R 5'- TGTTGTTAGCCAGACTGAGCTTCT -3'

HPA-3F 5'- GCCTGACCACTCCTTTGCC -3'

HPA-3R 5'- TGCGATCCCGCTTGTGA -3'

HPA-5F 5'- CTTTCAAATGCAAGTTAAATTACCAG -3'

HPA-5R 5'- TGACCTAAAGAAAGAGGAAGGAAGAGT -3'

3) Fluorescentno obilježene MGB sonde, 100 pmol/μL

HPA-1a 5'- VIC- CCTCTGGGCTCACCT -3'NFQ

HPA-1b 5'- FAM- CCTCCGGGCTCACCT -3'NFQ

HPA-2a 5'- VIC-CCTGTTTACTATCAAAGAG -3'NFQ

HPA-2b 5'- FAM- CTCCTGATGCCCCACAC -3'NFQ

HPA-3a 5'- VIC-CTGCCCATCCCCA -3'NFQ

HPA-3b 5'- FAM-CTGCCCAGCCCCA -3'NFQ

HPA-5a 5'- VIC-CCTGTTTACTATCAAAGAG -3'NFQ

HPA-5b 5'- FAM- CCTGTTTACTATCAAAAA G -3'NFQ

4) Sterilna voda

Svi reagensi osim sterilne vode bili su od tvrtke Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD.

Postupak:

Pripremljene su radne otopine razrijeđenja 1:10 za početnice i sonde (konačna konc. 10 pmol/μL). Za svakog ispitanika napravljene su reakcijske smjese za ispitivane alele *HPA* prema protokolu u Tablici 10. Reakcijska smjesa svakog ispitivanog *HPA* sastojala se od nizvodne i uzvodne početnice te MGB sonda pri čemu je jedna sonda bila specifična za alel a, a druga za alel b. Analiza je provedena na uređaju Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems tvrtke Applied Biosystems, Foster City, SAD. Napravljene su modifikacije u odnosu na izvorni protokol (183) pri čemu je za *HPA-2* smanjena koncentracija nizvodne i uzvodne početnice a povećana koncentracija sonde za oba alela čime je postignuta bolja alelna diskriminacija. Druga modifikacija je uporaba reagensa Taqman Genotyping Master mix 2x umjesto TaqMan Universal PCR Master Mix 2x jer je taj reagens deklariran od strane proizvođača kao optimalan za izradu reakcijske smjese za alelnu diskriminaciju i detekciju završne točke te je shodno tome iz uvjeta umnažanja

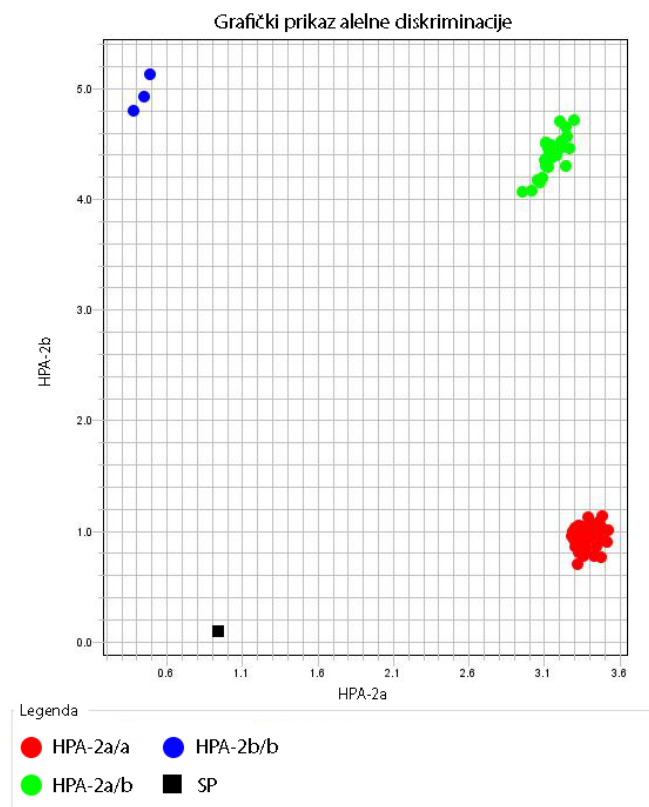
uklonjen prvi korak inkubacije reakcijske smjese 2 min na 50 °C. Za svaku reakcijsku smjesu uz uzorke korištena je i pozitivna kontrola te slijepa proba (SP) koja je sadržavala sterilnu vodu. Nakon završetka PCR reakcije, napravljena je detekcija završne točke (engl. *end point detection*).

Pomoću grafičkog prikaza alelna diskriminacije razlikovali smo homozigote za alel a kod kojih je porastao intenzitet fluorescencije izvjestiteljske boje VIC dok je kod homozigota za alel b porastao fluorescentni signal izvjestiteljske boje FAM. Ukoliko je u uzorku došlo do porasta fluorescencije obje izvjestiteljske boje, to je ukazivalo na heterozigotne nositelje alela ab. (Slika 17.)

Uvjeti umnažanja reakcijske smjese bili su: 10 minuta na 95 °C; 45 ciklusa od 15 sekundi na 95 °C i 1 minute na 60 °C.

**Tablica 10.** Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za alelnu diskriminaciju *HPA* polimorfizama.

Reagens	<i>HPA-1</i>	<i>HPA-2</i>	<i>HPA-3</i>	<i>HPA-5</i>
	Volumen (µL) [C (µM) u 20 µL]			
Taqman Genotyping Master mix 2x	10 [1x]			
Početnica HPA-F	0,40 [0,20]	0,60 [0,30]	1,80 [0,900]	1,20 [0,600]
Početnica HPA-R	0,40 [0,20]	0,60 [0,30]	1,80 [0,900]	1,20 [0,600]
Sonda HPA-a	0,16 [0,08]	0,35 [0,175]	0,38 [0,190]	0,32 [0,160]
Sonda HPA-b	0,20 [0,10]	0,35 [0,175]	0,24 [0,120]	0,18 [0,090]
Sterilna voda	7,84	7,10	4,78	6,10
Genomska DNA 100 ng/µL	1			



**Slika 17.** Grafički prikaz alelne diskriminacije za *HPA-2*. Svaki ispitani uzorak prikazan je pomoću kruga. Na osi X nalaze intenzitet fluorescencije izvjestiteljske VIC boje a na osi Y intenzitet fluorescencije izvjestiteljske FAM boje. Uzorci u desnom kutu osi X označeni crvenim krugovima imali su porast VIC boje što ih definira homozigotima za alel a (*HPA-2aa*), blizu osi Y nalaze se plavim krugovima označeni uzorci koji su imali porast FAM boje te su stoga homozigoti za alel b (*HPA-2bb*), dok se između njih nalaze zelenim krugovima označeni uzorci koji su imali porast i VIC i FAM boje što ih čini heterozigotnim nositeljima oba alela (*HPA-2ab*). U lijevom donjem kutu grafa crni kvadrat označava SP.

#### 4.2.7. Genotipizacija polimorfizama *P-SEL* i *PSGL-1*

Navedeni polimorfizmi genotipizirani su metodom PCR s početnicama specifičnog slijeda (engl. *sequence specific primer*, SSP) prema metodi Bugert i sur. (126).

U ovoj metodi umnažaju se istodobno dvije reakcijske smjese koje koriste istu uzvodnu početnicu. U jednoj reakcijskoj smjesi koriste se nizvodna početnica komplementarna slijedu DNA divljeg tipa, a u drugoj reakcijskoj smjesi koristi se nizvodna početnica komplementarna slijedu rijedeg alela (mutacija ili polimorfizam). Kad nastane produkt samo prve reakcijske smjese,

u uzorku postoji samo divlji tip alela. U slučaju da nastane samo produkt druge reakcijske smjese, u uzorku postoji samo rjeđi oblik alela. Ako nastanu produkti u obje reakcijske smjese, u uzorku postoji i jedan i drugi alel. Osim početnica za ispitivane alele, u obje reakcijske smjese nalazi se i par početnica koji umnaža kontrolni gen, pri čemu nastanak umnoženog produkta predstavlja pozitivnu kontrolu umnažanja. Vizualizacija nastalih umnoženih produkata izvodi se elektroforezom u agaroznom gelu.

Reagensi potrebni za ove analize:

- 1) 10x PCR pufer I  
Tris-HCl 100mM, pH 8.3  
KCl 500 mM  
MgCl<sub>2</sub> 15 mM
- 2) Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP)  
Smjesa otopine dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10 mM
- 3) AmpliTaq DNA Polimeraza, 250 U  
Ili AmpliTaq Gold DNA Polimeraza. 250 U
- 4) Oligonukleotidne početnice. 100 μM

PSEL 290S 5'- CTGGAAGCCCCCAG -3'

PSEL 290N 5'- CACCTGGAAGCCCCCAA -3'

PSEL S290N 5'- TTGGACAGAATGGAGGTTGC -3'

PSEL 562N 5'- CTCCACCTGYCATTTCTCTTGTA-3'

PSEL 562D 5'- CTCCACCTGYCATTTCTCTTG TG -3'

PSEL N562D 5'- AAGTAGAACTGTCTTAGCAAGTAC -3'

PSEL 599V 5'- CACTTCCTACTCCAGGGG -3'

PSEL 599L 5'- CACTTCCTACTCCAGGGT -3'

PSEL V599L 5'- CAACATACAGGCACAATGGC -3'

PSEL 715P 5'- GAGAATGGCCACTGGTCAA -3'

PSEL 715T 5'- GAGAATGGCCACTGGTCAC -3'

PSEL T715P 5'- GGATGGAAAGCAAGACCACT -3'

PSGL 62M 5'- CAGAAACGGAGCCTCCAGAAATG -3'

PSGL 62I 5'- CAGAAACGGAGCCTCCAGAAATA -3'

PSGL M62I 5'- GCTGAATCCGTGGACAGGTTC -3'

Početnice za kontrolni gen *β-globin*:

β-glob-F 5'- GGTGGCCAATCTACTCCCAGG -3'

β-glob-R 5'- GCTCACTCAGTGTGGCAAAG -3'

#### 5) Sterilna destilirana voda

10x PCR pufer I, dNTP, AmpliTaq DNA Polimerazu i AmpliTaq Gold DNA Polimerazu proizvela je tvrtka Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD. Oligonukleotidne početnice proizvela je tvrtka TIB Molbiol, Berlin, Njemačka.

#### Postupak:

Pripremljene su radne otopine razrijeđenja 1:10 za početnice kontrolnog gena (konačna konc. 10 pmol/μL). Za svakog ispitanika napravljeno je osam reakcijskih smjesa prema protokolu u Tablici 11. za umnažanje alela *P-SEL* (S290, 290N, N562, 562D, V599, 599L, T715, T15P) i dvije reakcijske smjese za umnažanje alela *PSGL-1* (M62, 62I), te su dodane početnice za umnažanje gena *β-globin*, koji služi kao unutarnja kontrola umnažanja. Napravljena je modifikacija izvorne metode za polimorfizam S290N za koji je korištena AmpliTaq Gold DNA polimeraza umjesto AmpliTaq DNA polimeraze čijom uporabom nisu nastajali produkti umnažanja, te je zbog promjene polimeraze produženo vrijeme početne aktivacije polimeraze.



Modifikacija je napravljena u kontaktu s autorom metode i za polimorfizam M62I jer s početnicama iz objavljenog rada, te navedenim temperaturama vezanja početnica tijekom PCR reakcije (126) nisu nastajali očekivani produkti.

Umnažanje je provedeno u termobloku GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD). Uvjeti za umnažanje polimorfizama N562D, V599L i T715P bili su: 2 min na 95 °C; 10 ciklusa od 10 s na 95 °C, 1 min na 65 °C; 20 ciklusa od 10 s na 95 °C, 1 min na 61 °C i 20 s na 72 °C; 10 min na 72 °C; 4 °C ∞. U uvjetima za umnažanje S290N produljeno je prvo vrijeme za aktivaciju enzima (10 min na 95 °C) dok su ostali uvjeti ostali isti.

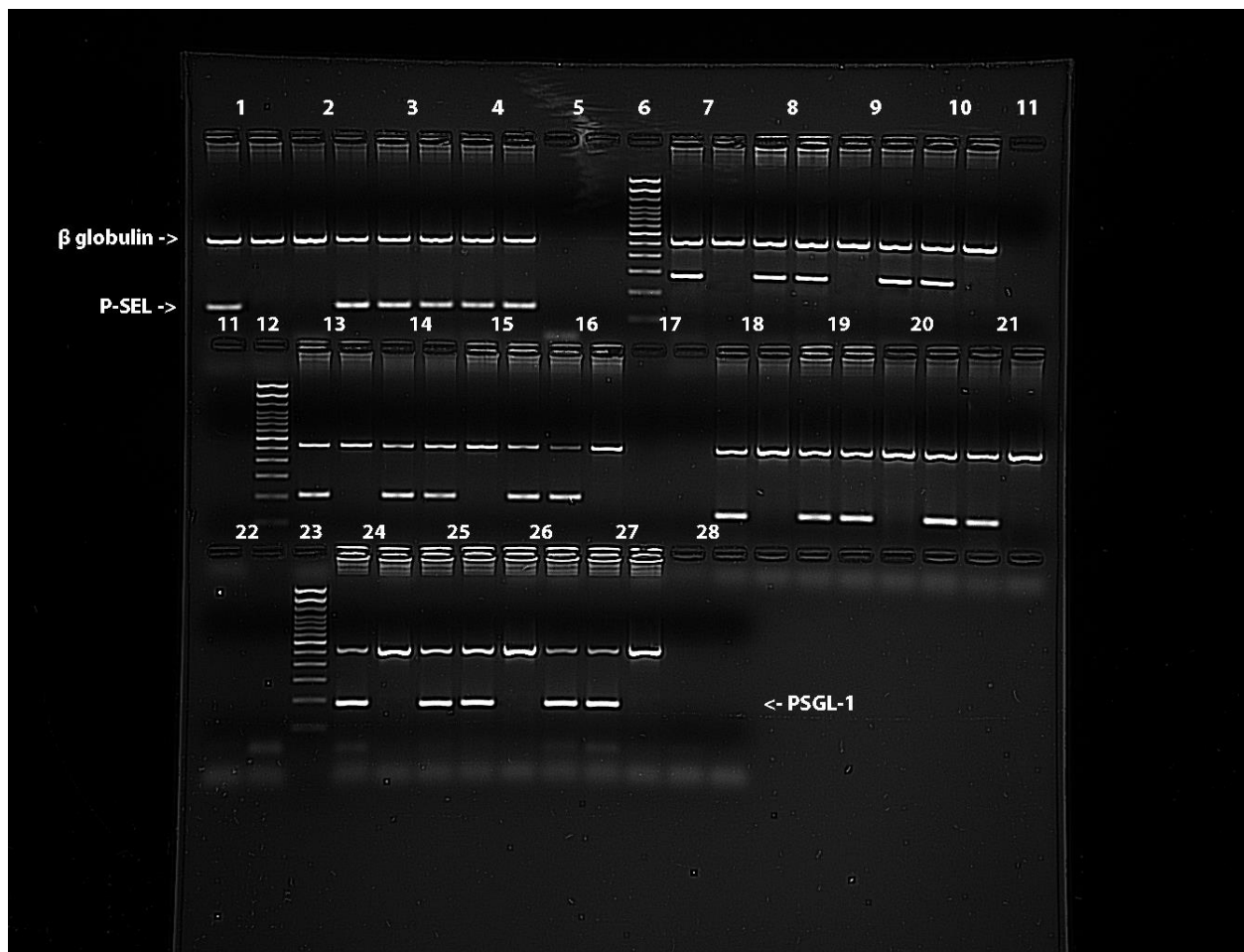
Polimorfizam M62I umnažan je pod slijedećim izmijenjenim uvjetima: 2 min na 95 °C; 10 ciklusa od 10 s na 95 °C, 1 min na 69 °C; 20 ciklusa od 10 s na 95 °C, 1 min na 61 °C i 20 s na 72 °C; 10 min na 72 °C; 4 °C ∞.

Razdvajanje umnoženih produkata ispitanika izvedeno je sustavom za elektroforezu u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom u 1x TBE puferu uz umnoženu pozitivnu kontrolu, slijepu probu (sterilnu vodu) i biljeg molekularne mase 100 pb (GE Healthcare, Chicago, SAD). Uvjeti za elektroforetsko razdvajanje bili su 20 min na 190V i 150mA. Detekcija produkata umnažanja izvedena je pomoću sustava za slikanje gela pod UV svjetlom G-box (Syngene, Cambridge, Velika Britanija).

Aleli polimorfizama *P-SEL* i polimorfizma *PSGL-1* određeni su prema nastalim ulomcima specifične veličine, dok prisustvo ulomka veličine 536 pb u svakoj jažici označava uspješno izvedenu PCR reakciju (umnožen dio gena *β-globin* kao unutarnja kontrola) (Slika 18.).

**Tablica 11.** Protokol za umnažanje polimorfizama S290N, N562D, V599L i T715P gena *P-SEL* i polimorfizma M62I gena *PSGL-1*.

Reagens	Volumen	Koncentracija u 10 µL
10x PCR Pufer I	1,0	1X
dNTP	0,2	0,2 mM
P-SEL F ili PSGL-1 F	0,1	1,0 µM
P-SEL R ili PSGL-1 R	0,1	1,0 µM
β-glob F	0,2	0,2 µM
β-glob R	0,2	0,2 µM
AmpliTaq DNA polimeraza (AmpliTaq Gold DNA za S290N)	0,1	0,5 U
Sterilna destilirana voda	7,1	
Genomska DNA 10 ng/µL	1,0	



**Slika 18.** Elektroforetski prikaz umnoženih produkata polimorfizma N562D, V599L, S290N, T715P gena *P-SEL* i polimorfizma M62I gena *P-SGL1*. Gornji ulomci pozitivnih PCR reakcija su umnožena unutarnja kontrola (gen  $\beta$ -globulin) dok su donji ulomci umnoženi *P-SEL* i *PSGL-1*. U prvom redu uzorci od 1 do 5 produkti su polimorfizma N562D veličine 141 pb (1-NN, 2-DD, 3-ND, 4-ND, 5-SP). Broj 6 je biljeg molekularne mase 100 pb, uzorci od 7 do 11 su produkti polimorfizma V599L veličine 278 pb (7-VV, 8-VL, 9-LL, 10-VV, 11-SP). U drugom redu na gelu broj 11 je SP, broj 12 je biljeg molekularne mase 100 pb, a od 13-17 prikazani su produkti polimorfizma S290N veličine 208 pb (13-SS, 14-SN, 15-NN, 16-SS, 17-SP). Od 18 do 22 prikazani su produkti polimorfizma T715P veličine 141 pb (18-TT, 19-TP, 20-PP, 21-TT). U trećem redu pod brojem 22 je SP reakcijske smjese za polimorfizam T715P. Broj 23 je biljeg molekularne mase 100 pb, a od 24 do 28 su produkti polimorfizma M62I veličine 184 pb za MM i 185 pb za II (24-MM, 25-MI, 26-II, 27-MM, 28-SP).

#### 4.2.8. Genotipizacija polimorfizma *FV* Leiden

Ova analiza izvedena je metodom PCR uz određivanje polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Metoda se zasniva na korištenju nizvodne i uzvodne početnice u PCR reakcijskoj smjesi kojima se umnoži dio DNA od interesa. Zatim se nastali produkt umnažanja podvrgava digestiji s restrikcijskim endonukleazama (RE) koje cijepaju točno određeni slijed DNA u produktu. Ukoliko postoji zamjena nukleotida u slijedu kojeg RE ciljano cijepa, neće doći do digestije na tom mjestu. Elektroforezom se detektiraju pocijepani fragmenti i ovisno o veličini nastalih fragmenata donose se zaključci o rezultatu analize.

Reagensi potrebni za ovu analizu:

- 1) 10x PCR pufer II s  $MgCl_2$   
Tris-HCl, 100mM, pH 8.3  
KCl, 500 mM  
 $MgCl_2$ , 25 mM
- 2) Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP)  
Smjesa otopine dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10 mM
- 3) AmpliTaq DNA Polimeraza, 250 U
- 4) Oligonukleotidne početnice, 100  $\mu$ M  
FV I 5'- GGAACAACCCATGATCAGAGCA - 3'  
FV II 5'- TAGCCAGGAGACCTAACATGTTC - 3'
- 5) Sterilna voda
- 6) Restrikcijska endonukleaza *MnII*, 500 U

10x PCR pufer II, dNTP i AmpliTaq DNA Polimerazu proizvela je tvrtka Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD. Oligonukleotidne početnice proizvela je tvrtka TIB Molbiol, Berlin, Njemačka, dok je restrikcijska endonukleaza *MnII* proizvedena u Ipswich, Massachusetts, SAD u tvrtci New England Biolabs.

Postupak:

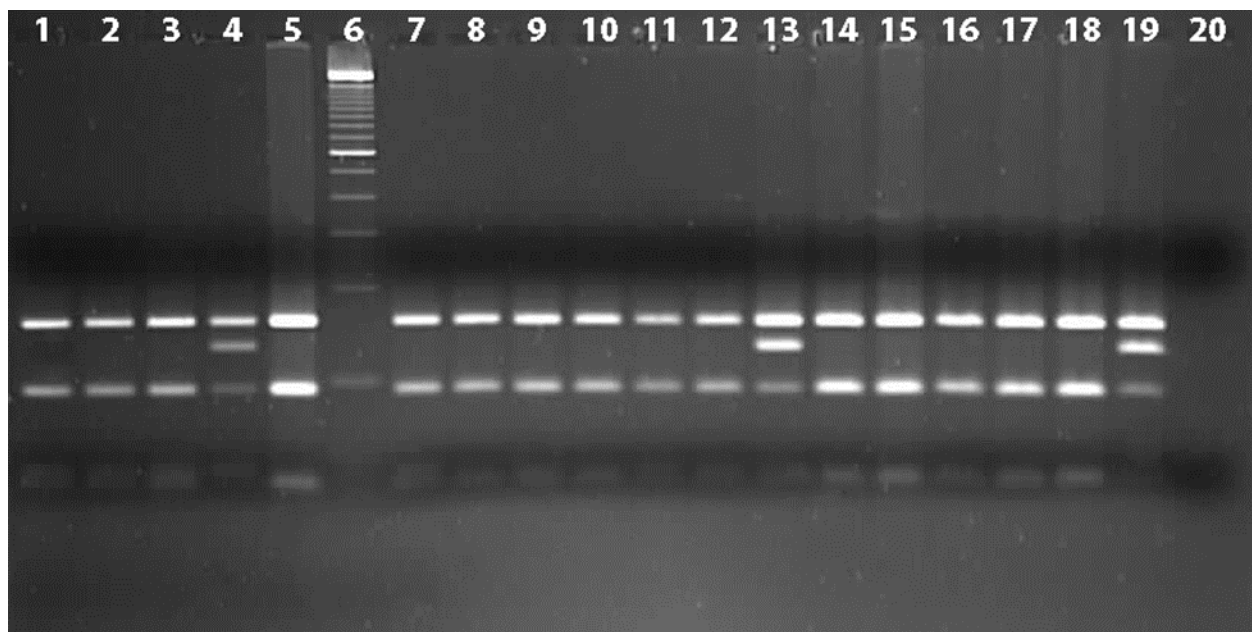
Za svakog ispitanika pripremi se reakcijska smjesa za PCR prema metodi Zöller i sur. (184). Nakon umnažanja nastaju produkti koji se preko noći inkubiraju na 37 °C s restrikcijskom endonukleazom *MnII*. Uz uzorke, u PCR reakciju bili su uključeni i pozitivna kontrola (heterozigot za *FV* Leiden) i slijepa proba. Umnažanje DNA provedeno je prema protokolu u Tablici 12. na uređaju GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD) pod slijedećim uvjetima: 5 min na 94 °C; 30 ciklusa od 60 s na 93 °C, 30 s na 62 °C i 1,5 min na 72 °C; 10 min na 72 °C; 4 °C ∞. Nakon umnažanja napravljena je kontrolna elektroforeza nastalih produkata s 2 % agaroznim gelom obojenim etidij bromidom u 1x TBE puferu, uz biljeg molekularne mase, pri čemu je reakcija bila uspješna ukoliko postoje produkti umnažanja veličine 287 pb.

**Tablica 12.** Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za analizu polimorfizma *FV* Leiden.

Reagens	Volumen (µL)	Koncentracija u 50 µL
10x PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	5,0	1X
MgCl <sub>2</sub>	5,0	2,50 mM
dNTP	4,0	0,8 mM
Početnica <i>FV</i> I	0,22	0,44 µM
Početnica <i>FV</i> II	0,22	0,44 µM
AmpliTaQ DNA Polimeraza	0,25	1,25 U
Sterilna destilirana voda	34,0	
Genomska DNA 80 ng/µL	1,0	

Uspješno umnoženi produkti inkubiraju se preko noći s restrikcijskim enzimom *MnII*. Nastali fragmenti podvrgavaju se elektroforetskom razdvajanju u 3 % agaroznom gelu visoke rezolucije obojenom etidij bromidom uz biljeg molekularne mase 100 pb (GE Healthcare, Chicago, SAD) te uvjete razdvajanja od 120V, 180mA, 2h. Nakon tog slijedi vizualizacija fragmenata pomoću sustava za slikanje gela pod UV svjetlom G-box (Syngene, Cambridge, Velika Britanija).

U nositelja divljeg tipa gena *FV* cijepanjem umnoženog produkta od 287 pb nastaju fragmenti veličine 157 pb, 93 pb i 37 pb. U slučaju prisutnosti *FV* Leiden gubi se jedno mjesto cijepanja s RE *MnII*. Zbog toga u nositelja oba mutirana alela (homozigoti) nastaju samo fragmenti veličine 157 pb i 130 pb, dok kod nositelja jednog alela divljeg tipa i jednog mutiranog (heterozigoti) nastaje kombinacija prethodno navedenih fragmenata veličine 157 pb, 130 pb, 93 pb i 37 pb (Slika 19.).



**Slika 19.** Genotipizacija *FV* Leiden pomoću elektroforetskog razdvajanja fragmenata nastalih nakon digestije produkata umnažanja s RE. U jažicama pod brojevima 1, 2, 3, 5, 7 do 12 i 14 do 18 nastali su fragmenti koji odgovaraju divljem tipu gena *FV*. U jažici broj 4 i 13 nastali su fragmenti koji ukazuju na heterozigotne nositelje *FV* Leiden. Biljeg molekularne mase 100 pb prikazan je u jažici 6. Pozitivna kontrola (ranije dokazan heterozigot *FV* Leiden) nalazi se u jažici 19 a slijepa proba u jažici 20.

#### 4.2.9. Genotipizacija polimorfizma *FII G20210A*

Ova analiza izvedena je metodom PCR-RFLP.

Reagensi potrebni za ovu analizu:

- 1) 10x PCR pufer II s MgCl<sub>2</sub>  
Tris-HCl, 100mM, pH 8.3  
KCl, 500 mM  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 2) Deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP)  
Smjesa otopine dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM
- 3) AmpliTaq DNA Polimeraza, 250 U
- 4) Oligonukleotidne početnice, 100 μM  
FII I 5' - TCTAGAAACAGTTGCCTGGC -3'  
FII II 5' ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC 3'
- 5) Sterilna voda
- 6) Restriksijska endonukleaza *HindIII*, 5000 U
- 7) Govedi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA), 1mg/mL

10x PCR pufer II, dNTP i AmpliTaq DNA Polimerazu proizvela je tvrtka Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD. Oligonukleotidne početnice proizvela je tvrtka TIB Molbiol, Berlin, Njemačka, dok je restriksijska endonukleaza *Hind III* proizvedena u tvrtci Roche, Basel, Švicarska.

Postupak:

Za svakog ispitanika pripremila se reakcijska smjesa za PCR prema metodi Poort i sur. (161). Nakon umnažanja nastali produkti su preko noći inkubirani na 37 °C s restriksijskom endonukleazom *HindIII*. Uz uzorke, u PCR reakciju bili su uključeni i pozitivna kontrola (heterozigot za *FII* G20210A) i slijepa proba.

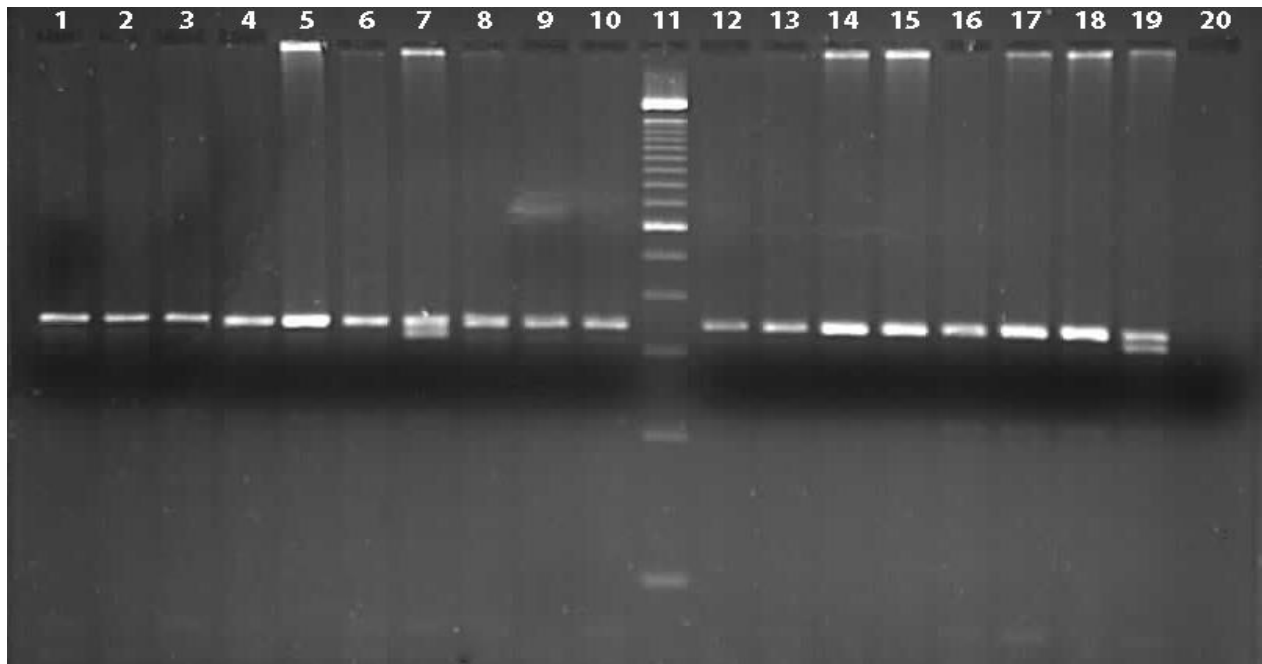
Umnažanje DNA provedeno je prema protokolu u Tablici 13. na uređaju GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, SAD) pod slijedećim uvjetima: 4 min na 94 °C; 32 ciklusa od 60 s na 93 °C, 1 min na 55 °C i 1 min na 67 °C; 10 min na 4 °C; 4 °C ∞. Nakon umnažanja napravljena je kontrolna elektroforeza nastalih produkata u 2 % agaroznom gelu obojenom etidij bromidom u 1x TBE puferu uz biljeg molekularne mase pri čemu je reakcija bila uspješna ukoliko postoje produkti umnažanja veličine 345 pb.

**Tablica 13.** Protokol za izradu reakcijske PCR reakcijske smjese za analizu *FII* G20210A.

Reagens	Volumen (µL)	Koncentracija u 50 µL
10X PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	5,0	1X
MgCl <sub>2</sub>	4,0	2,0 mM
dNTP	4,0	0,8 µM
BSA	5,0	0,1 mg/mL
Početnica <i>FII</i> I	0,2	0,4 µM
Početnica <i>FII</i> II	0,2	0,4 µM
AmpliAq DNA Polimeraza	0,2	1,0 U
Sterilna destilirana voda	29,4	/
Genomska DNA 300 ng/µL	2,0	12 ng

Uspješno umnoženi produkti podvrgavaju se preko noći inukbaciji s restriksijskom endonukleazom *HindIII*. Nastali fragmenti podvrgavaju se elektroforetskom razdvajanju u 3 % agaroznom gelu visoke rezolucije obojenom etidij bromidom uz biljeg molekularne mase 100 pb (GE Healthcare, Chicago, SAD) te uvjete razdvajanja od 120V, 180mA, 3h i 30 min. Nakon tog slijedi vizualizacija fragmenata pomoću sustava za slikanje gela pod UV svjetlom G-box (Syngene, Cambridge, Velika Britanija).

Restriksijska endonukleaza *HindIII* cijepat će produkt umnažanja samo ukoliko postoji zamjena nukleotida gvanina u adenin (polimorfizam G20210A) na ciljnom mjestu za cijepanje. U ispitanika s divljim tipom gena *FII* neće doći do digestije s RE i produkt umnažanja ostati će u izvornoj veličini od 345 pb. U heterozigota s jednim mutiranim alelom nastati će fragmenti veličine 345 pb i 322 pb (Slika 20.) dok će u homozigota nastati fragmenti veličine 322 pb i 23 pb.



**Slika 20.** Genotipizacija *FII* G20210A pomoću elektroforetskog razdvajanja fragmenata nastalih nakon digestije umnoženih produkata s RE. U jažicama pod brojevima 1 do 6, 8 do 10 i 12 do 18 nije došlo do digestije s RE stoga ovi ispitanici imaju divlji tip gena *FII*. U jažici broj 7 vidimo fragment veličine 322 i intaktni fragment 345 pb što znači da je ispitanik heterozigot za *FII* G201210A. U jažici broj 11 nalazi se biljeg molekularne mase 100 pb. Pozitivnu kontrolu (poznati heterozigot G20210A) vidimo u jažici 19 dok je slijepa proba u jažici broj 20.

### 4.3. Statistička analiza

Statistička analiza podataka napravljena je uporabom programa MedCalc verzija 17.2. (MedCalc Software, Ostend, Belgija) i statističko-programskog jezika R verzija 3.2.2. (R Core Team, Beč, Austrija)

Normalnost razdiobe kvantitativnih varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Ako su rezultati imali normalnu razdiobu, prikazani su pomoću srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) i standardne devijacije (SD), te je usporedba među podacima dvije skupine bolesnika provedena t-testom za nezavisne uzorke. Ukoliko rezultati nisu slijedili normalnu razdiobu prikazani su pomoću medijana (M) i interkvartilnog raspona (IQR), dok je za usporedbu rezultata između dvije grupe bolesnika korišten Mann-Whitneyev test. Vrijeme praćenja bolesnika, vrijeme proteklo do



nastanka prve tromboze te dob bolesnika prikazani su medijanom i minimalnim i maksimalnim rasponom.

Usporedba broja muškaraca i žena unutar jedne skupine te između skupina napravljena je testom usporedbe proporcija. Za odabir optimalnih graničnih vrijednosti (engl. *cutoff value*) kvantitativnih varijabli koristili smo ROC krivulju (engl. *receiver-operating characteristic analysis*). Nakon toga kvantitativne varijable prevedene su u kategoričke nominalne varijable (više ili niže od granične vrijednosti) te je njihova značajnost ispitana hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom uz izračun odjeka rizika (engl. *odds ratio*, OR) uz pripadajuće 95% intervale pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI).

Statistički značajna razlika između kategoričkih varijabli (spol, podskupina MPN, prisutnost mutacije V617F, genotip, alel) ispitivana je Fisherovim egzaktnim (ukoliko je broj podataka < 5) ili hi-kvadrat testom. Za kategoričke varijable izračunali smo moguću povezanost s nastankom tromboze koristeći OR uz pripadajuće 95% CI prema dominantnom modelu u kojem su homozigoti divljeg tipa uspoređeni s heterozigotnim i homozigotnim varijantama.

Utjecaj istraživanih varijabli na nastanak tromboze ispitano je za cijelu skupinu te za vrste tromboze modelom logističke regresije. Svaka varijabla je prvo ispitana univarijantnom regresijskom analizom pri čemu je P vrijednost < 0,05 smatrana statistički značajnom razlikom. Rezultati logističke regresije prikazani su kao OR uz pripadajuće 95% CI. Kad je pokazano da neke varijable imaju statistički značajnu razliku za njih je napravljen multivarijantni regresijski model pri čemu je P vrijednost < 0,05 smatrana statistički značajnom razlikom.

Hardy Weinbergova ravnoteža izračunata je kalkulatorom Courtlab-HW, dok je odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže (razlika između dobivenih i očekivanih genotipova) ispitano  $\chi^2$  testom.

Učestalosti haplotipova za *HPA* -1, -2, -3, -5, *P-SEL* S290N, N562D, V599L, T715P, *PSGL-1* M62I, *FV* Leiden i *FII* G20210A određene su uporabom programa za statističku analizu povezanosti haplotipova i bolesti HAPSTAT, verzija 3.0 (Danyu Lin, Sjeverna Karolina, SAD). Usporedba učestalosti haplotipova između skupina ispitana je  $\chi^2$  testom.

Učestalosti kombinacije genotipova *FV* Leiden, *FII* G20210A, *HPA*-5, *P-SEL* i *PSGL-1* te njihova povezanost s nastankom tromboze određene su putem modela multifaktorskog smanjenja dimenzija (engl. *Model Based Multifactor Dimensionality Reduction*) uporabom R paketa *mbmdr* verzija 2.6. gdje je najprije svaka kombinacija genotipova testirana za povezanost s

nastankom tromboze permutacijskim testom koristeći Waldovu statistiku. Doprinos najznačajnijih kombinacija genotipova s nastankom tromboze je potom ispitan univarijantnom logističkom regresijom kako bi se izračunali OR i 95% CI.

Napravljeni su probni prediktivni modeli za nastanak tromboze koristeći logističku regresiju koji su zatim uspoređeni pomoću parametra koja procjenjuje prediktivnu mogućnost pogreške i kvalitetu modela u odnosu na druge modele (engl. *Akaike information criterion*, AIC) pri čemu je model u kojem je ta vrijednost bila najniža smatran najboljim.

Osim toga, za svaki prediktivni model provjerili smo Hosmer-Lemeshow pretpostavljeni oblik distribucije (engl. *Hosmer-Lemeshow goodness of fit*, H-L GOF) koji prikazuje koliko pouzdano se dobiveni rezultati slažu s napravljenim modelom, pri čemu je vrijednost  $> 0,05$  uzeta kao mjera dobrog modela.

Kako bi se u modele uključio parametar vremena, tj. pratilo preživljenje bolesnika bez nastanka tromboze za vrijeme trajanja studije, napravljena je i Coxova regresijska analiza gdje su rezultati grafički prikazani (Forest plot) uz dobivene vrijednosti omjera rizika (engl. *Hazard ratio*, HR) te 95% intervale pouzdanosti.

Također su napravljene i Kaplan-Meier krivulje preživljenja. Analize preživljenja bez nastanka tromboze uz sve navedene grafičke prikaze napravljene su pomoću sljedećih R paketa: survival verzija 2.38 za Coxovu regresijsku analizu, forestplot verzija 1.9 i ggplot2 verzija 3.2.1 za Forest plot te ggkm verzija 1.0 i ggplot2 verzija 3.2.1 za Kaplan-Meier krivulje preživljenja.

## 5. REZULTATI

U istraživanje je bilo uključeno 258 bolesnika i 258 zdravih ispitanika istog spola i iste dobi. Prema dijagnozi bilo je 134 ET bolesnika, 70 PV bolesnika i 54 PMF bolesnika. Vrijeme praćenja bolesnika od trenutka uključivanja u istraživanje do završetka istraživanja imalo je medijan od 58 mjeseci uz raspon od 10-74 mjeseca. Obzirom da je dio bolesnika imao postavljenu dijagnozu prije početka istraživanja medijan vremena praćenja bolesnika i svih trombotičkih događaja iznosio je 67 mjesec uz raspon od 15-463 mjeseca.

### 5.1. Učestalost i vrste nastalih tromboza

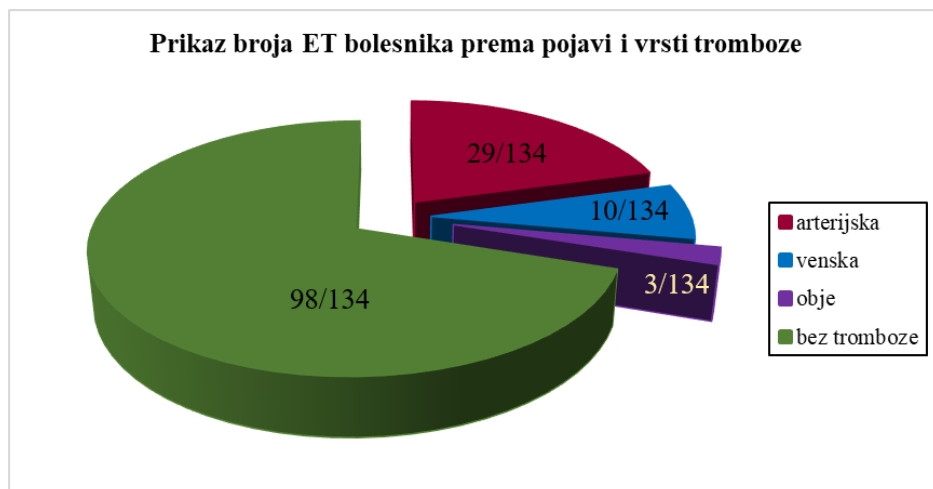
U ovom istraživanju 79 (30,6 %) Ph(-) MPN bolesnika doživjelo je 109 trombotičkih događaja, od kojih je bilo 72 arterijska (66,1 %) i 37 venskih (33,9 %) (Tablica 14.).

**Tablica 14.** Vrste i broj nastalih trombotičkih događaja prema dijagnozi bolesnika.

Vrsta trombotičkog događaja	ET bolesnici	PV bolesnici	PMF bolesnici
<b>Arterijske tromboze i velike aterosklerotske promjene</b>			
Ishemijski moždani udar	7	12	5
Infarkt miokarda	6	2	8
Prolazni ishemijski napadaj	8	4	1
Infarkt slezene	5	1	1
Okluzija karotidne arterije	2	/	1
Okluzija femoralne arterije	1	/	/
Okluzija subklavijalne arterije	/	/	1
Aortoilijačna bolest	/	3	/
Embolija arterija ruke	1	/	/
Embolija arterija stopala	1	/	/
Intrauterini zastoj u rastu	1	1	/
<b>Venske tromboze</b>			
Duboka venska tromboza noge	4	4	2
Duboka venska tromboza abdominalnih vena	1	1	4
Plućna embolija	3	2	3
Duboka venska tromboza uz plućnu emboliju	1	/	/
Površinski tromboflebitisi	1	1	2
Duboka venska tromboza ruke	3	/	2
Tromboza retinalne vene	1	/	/
Tromboza venskih sinusa mozga	/	2	/

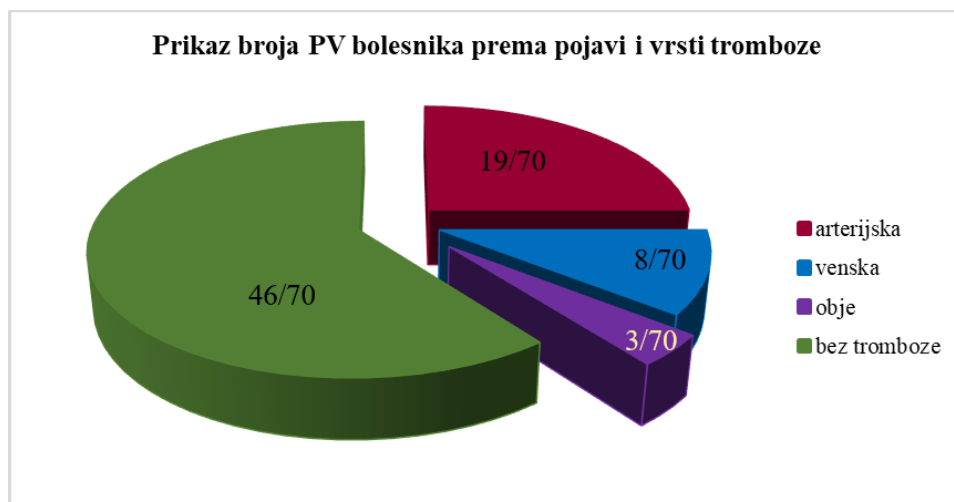
Tri PV i tri ET bolesnika razvili su tijekom života arterijsku i vensku trombozu pri čemu su ubrojani u skupinu bolesnika s arterijskom i skupinu bolesnika s venskom trombozom.

Učestalost tromboze u ET bolesnika bila je 26,9 % pri čemu je 29 ET bolesnika doživjelo 32 arterijske tromboze dok je 10 bolesnika doživjelo 14 venskih tromboza (Slika 21.).



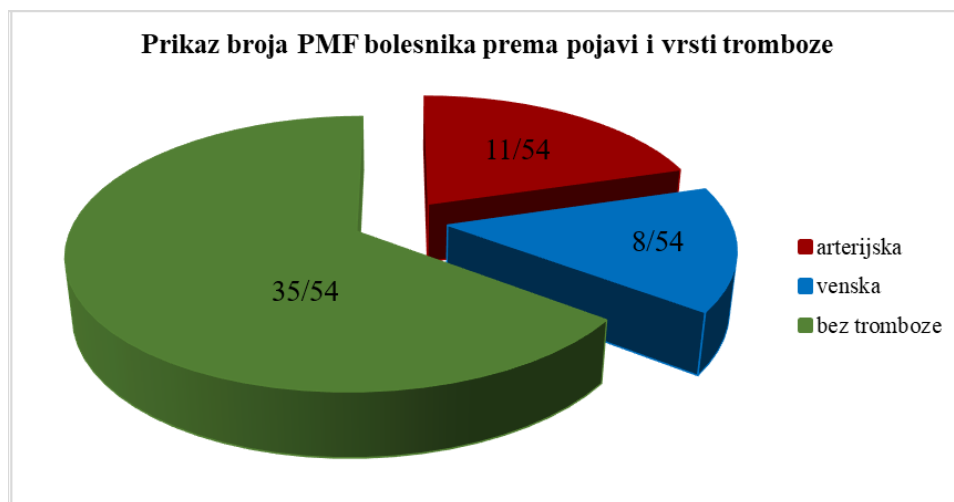
**Slika 21.** Prikaz broja ET bolesnika prema pojavi i vrsti tromboze.

U skupini PV bolesnika trombozu je nastala u 34,3 % bolesnika pri čemu je 19 bolesnika imalo 23 arterijske tromboze dok je u 8 bolesnika nastalo 10 venskih tromboza (Slika 22.).



**Slika 22.** Prikaz broja PV bolesnika prema pojavi i vrsti tromboze.

Od 19 PMF bolesnika (35,2 %) koji su imali trombozu 11 bolesnika je imalo 17 arterijskih tromboza dok je u 8 bolesnika nastalo 13 venskih tromboza (Slika 23.)



**Slika 23.** Prikaz broja PMF bolesnika prema pojavi i vrsti tromboze.

## 5.2. Podjela bolesnika prema spolu

Osnovne karakteristike bolesnika prema spolu i dijagnozi prikazane su u Tablici 15. U skupini svih Ph(-) MPN bolesnika bilo je više žena, kao i u skupini ET bolesnika ( $P < 0,001$  i  $P < 0,001$ ). U PV i PMF skupinama nije bilo statistički značajne razlike u broju muških i ženskih bolesnika.

**Tablica 15.** Raspodjela bolesnika prema spolu uz podjelu prema dijagnozi.

Skupina	N	Spol, N (%)		P
		Muški	Ženski	
<b>Svi Ph(-) MPN bolesnici</b>	258	104 (40,3)	154 (59,7)	<b>&lt;0,001</b>
<b>ET bolesnici</b>	134	40 (29,9)	94 (70,1)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PV bolesnici</b>	70	34 (48,6)	36 (51,4)	0,866
<b>PMF bolesnici</b>	54	30 (55,6)	24 (44,4)	0,336

Za usporedbu učestalosti korišten je  $\chi^2$  test

### 5.3. Spol bolesnika ovisno o pojavi tromboze i vrsti tromboze

Nakon što smo podijelili bolesnike prema spolu i nastanku tromboze, nismo našli povezanost spola s nastankom tromboze u cijeloj skupini Ph(-) MPN bolesnika kao niti prilikom svrstavanja u dijagnostičke skupine (Tablica 16.).

**Tablica 16.** Raspodjela bolesnika prema spolu i trombozi uz podjelu prema dijagnozi.

Skupina	Bolesnici s trombozom	Bolesnici bez tromboze	P	Bolesnici s arterijskom trombozom	P*	Bolesnici s venskom trombozom	P**
Svi Ph(-) MPN bolesnici	38/41	66/113	0,119	28/31	0,197	12/14	0,831
ET bolesnici	14/22	26/72	0,241	12/17	0,166	3/7	1,000
PV bolesnici	13/11	21/25	0,671	10/9	0,785	4/4	1,000
PMF bolesnici	11/8	19/16	0,975	6/5	1,000	5/3	1,000

Vrijednosti prikazane kao broj muškaraca/broj žena

Za usporedbu učestalosti korišten  $\chi^2$  ili Fisherov egzaktni test

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

### 5.4. Dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze prema spolu

Karakteristike bolesnika prema dobi i spolu prilikom postavljanja dijagnoze prikazane su u Tablici 17. Nije bilo statistički značajne razlike u godinama između svih bolesnika podijeljenih po spolu kao ni nakon podjele prema spolu i skupinama bolesti. Prosječna dob postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN za sve bolesnike bila je 59 godina, dok su nakon podjele u skupine najstariji bili PV bolesnici s prosječnom dobi od 64 godine, a najmlađi ET bolesnici s prosječnom dobi od 55 godina.

**Tablica 17.** Dob bolesnika prema spolu i podjela na skupine bolesti.

Skupina	Dob, godine	Dob muškarci, godine	Dob žene, godine	P
Svi Ph(-) MPN bolesnici	59 (18-92)	59 (25-83)	60 (18-92)	0,943
ET bolesnici	55 (18-92)	60 (25-82)	54 (18-92)	0,312
PV bolesnici	64 (29-84)	60 (29-83)	68 (31-84)	0,107
PMF bolesnici	62 (24-85)	58 (30-80)	68 (24-85)	0,088

Vrijednosti prikazane kao medijan uz raspon najviše i najniže vrijednosti, a za njihovu usporedbu korišten je Mann-Whitney test za nezavisne uzorke

## 5.5. Dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze i prema nastanku tromboze

U Tablici 18. prikazani su rezultati analize dobi bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze uz podjelu ovisno o nastanku tromboze te vrsti tromboze. Pri tome je ustanovljeno da u grupi svih Ph(-) MPN bolesnika postoji statistički značajna razlika u dobi bolesnika s trombozom i bez tromboze (63 vs. 57 godina,  $P = 0,022$ ). U istoj skupini pronađeno je da su bolesnici s arterijskom trombozom bili stariji prilikom postavljanja dijagnoze u odnosu na bolesnike bez tromboze (65 vs. 57 godina,  $P = 0,008$ ).

U skupini ET bolesnika, također su bolesnici s trombozom bili stariji u odnosu na bolesnike bez tromboze (65 vs. 52 godine,  $P = 0,008$ ), a isto je utvrđeno i u ET bolesnika s arterijskom trombozom koji su bili stariji u odnosu na bolesnike bez tromboze (65 vs. 52 godine,  $P = 0,009$ ). U ET bolesnika s venskom trombozom dob nije bila statistički značajno različita u odnosu na bolesnike bez tromboze.

**Tablica 18.** Dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze u godinama te usporedba bolesnika prema nastanku i vrsti tromboze i dijagnozi.

Skupina	Bolesnici s trombozom	Bolesnici bez tromboze	P	Bolesnici s arterijskom trombozom	P*	Bolesnici s venskom trombozom	P**
Svi Ph(-) MPN bolesnici	63 (23-92)	57 (18-90)	<b>0,022</b>	65 (55-74)	<b>0,008</b>	59 (51-65)	0,658
ET bolesnici	65 (23-92)	52 (18-90)	<b>0,008</b>	65 (23-92)	<b>0,009</b>	63 (38-82)	0,079
PV bolesnici	64 (29-81)	64 (31-84)	0,785	64 (34-81)	0,423	58 (29-69)	0,128
PMF bolesnici	58 (30-81)	63 (24-85)	0,821	71 (30-81)	0,928	57 (44-79)	0,618

Vrijednosti prikazane kao medijan i raspon najviše i najniže vrijednosti, a za njihovu usporedbu korišten je Mann-Whitney test za nezavisne uzorke

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

## 5.6. Dob bolesnika prilikom nastanka prve tromboze i razlike u spolu

Dob prilikom nastanka prve tromboze u kohorti svih Ph(-) MPN bolesnika bila je statistički značajno niža u muških u odnosu na ženske bolesnike (56 vs. 64 godine,  $P = 0,026$ ). Kad su bolesnici podijeljeni prema dijagnozama, dob pri nastanku tromboze više se nije razlikovala u muških i ženskih bolesnika. Također, nije bilo statistički značajne razlike u pojavnosti tromboze između muških i ženskih bolesnika (Tablica 19.).

**Tablica 19.** Dob bolesnika prilikom nastanka prve tromboze uz podjelu prema spolu i prema dijagnozi.

Skupina	N ukupno	Dob prilikom prve tromboze, godine			P*	Spol, N (%)		P**
		Svi	Muškarci	Žene		Muškarci	Žene	
<b>Svi Ph(-) MPN bolesnici</b>	79	61 (23-92)	56 (23-81)	64 (25-92)	<b>0,026</b>	38 (48,1)	41 (51,9)	0,750
<b>ET bolesnici</b>	36	60 (23-92)	53 (23-79)	64 (25-92)	0,105	14 (38,9)	22 (61,1)	0,099
<b>PV bolesnici</b>	24	64 (28-81)	62 (28-81)	64 (37-77)	0,487	13 (54,2)	11 (45,8)	0,773
<b>PMF bolesnici</b>	19	58 (38-78)	56 (43-70)	72 (38-78)	0,127	11 (57,9)	8 (42,1)	0,516

\* Vrijednosti prikazane kao medijan uz raspon najviše i najniže vrijednosti, a za njihovu usporedbu korišten je Mann-Whitney test za nezavisne uzorke

\*\* Za usporedbu učestalosti korišten je  $\chi^2$  test

Dob prilikom postavljanja dijagnoze analizirana je pomoću ROC krivulje pri čemu su dobivene granične vrijednosti za bolesnike s arterijskom i venskom trombozom. Broj bolesnika s višom i nižom vrijednosti od granične vrijednosti testiran je  $\chi^2$  testom i prikazan uz odjeke rizika i 95% interval pouzdanosti (Tablica 20.).

Ph(-) MPN bolesnici kojima je dijagnoza postavljena nakon 55 godine života kao i ET bolesnici iste dobi imaju 2,59 puta odnosno 4,56 puta veći rizik za nastanak arterijske tromboze u odnosu na mlađe bolesnike ( $P = 0,006$  i  $P = 0,002$ ). ET bolesnici koji su stariji od 54 godine prilikom postavljanja dijagnoze imaju 5,56 puta veći rizik za nastanak venske tromboze ( $P = 0,041$ ).



**Tablica 20.** Granične vrijednosti dobi prilikom postavljanja dijagnoze za nastanak arterijske i venske tromboze.

Skupina	Arterijska tromboza			Venska tromboza		
	Dob prilikom postavljanja dijagnoze, godine	OR (95% CI)	P	Dob prilikom postavljanja dijagnoze, godine	OR (95% CI)	P
Svi Ph(-) MPN bolesnici	> 55	2,59 (1,35-5,00)	<b>0,006</b>	> 54	1,44 (0,57-3,61)	0,578
ET bolesnici	> 55	4,56 (1,78-11,68)	<b>0,002</b>	> 54	5,56 (1,12-27,56)	<b>0,041</b>
PV bolesnici	> 59	3,15 (0,91-10,95)	0,093	≤ 69	8,37 (0,45-154,53)	0,089
PMF bolesnici	> 68	3,00 (0,74-12,10)	0,153	≤ 61	3,56 (0,63-20,16)	0,240

Granična vrijednost dobivena analizom ROC krivulje, rezultati su pretvoreni u kategoričke varijable i ispitani  $\chi^2$  testom uz odgovarajući OR i 95% CI

## 5.7. Terapija Ph(-) MPN bolesnika

Za Ph(-) MPN bolesnike koji su dijagnosticirani od 2011. godine do 2017. godine analizirali smo podatke o terapiji prilikom postavljanja dijagnoze te njihov mogući utjecaj na nastanak tromboze. Bolesnike smo podijelili na one bez terapije i one s terapijom antidiijabetikom, antihipertenzivom, antilipemikom, tromboireduktivnim i citoreduktivnim lijekovima, antiagregacijskim i antikoagulacijskim lijekovima, inhibitorima JAK2 kinaze i venepunkcijama te smo usporedili bolesnike s istom dijagnozom u kojih je nastala tromboza odnosu na one bez tromboze. Uz to smo podijelili bolesnike i prema vrsti tromboze i usporedili njihovu terapiju i terapiju bolesnika bez tromboze. Ph(-) MPN bolesnici s trombozom bili su češće na terapiji inhibitorima trombocita, aktiviranog faktora X (klopidogrel i rivaroxaban,  $P = 0,006$ ) i antikoagulantnoj terapiji (varfarin,  $P < 0,001$ ), dok su bolesnici s venskom trombozom uz istu tu terapiju ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,001$ ) češće uzimali i antiagregacijski lijek (acetilsalicilna kiselina,  $P = 0,013$ ).

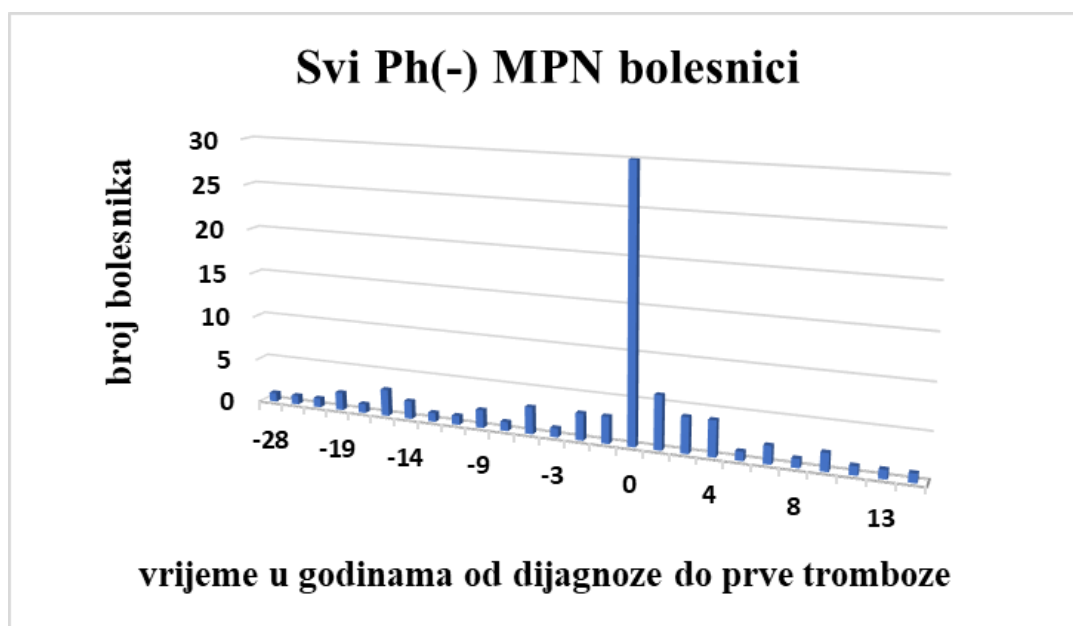
U ET bolesnika s trombozom bilo je više bolesnika koji su bili na antikoagulantnoj terapiji (varfarin,  $P < 0,001$ ), dok je u ET bolesnika s arterijskom trombozom više bolesnika bilo na antikoagulantnoj (varfarin,  $P < 0,001$ ) i citoreduktivnoj terapiji (hidroksiureja,  $P = 0,024$ ). U ET bolesnika s venskom trombozom bila je češća primjena antikoagulacijske terapije (varfarina,  $P < 0,001$ ). PV bolesnici s trombozom i s venskom trombozom češće su uzimali antikoagulacijsku

terapiju (varfarin,  $P = 0,050$  i  $P < 0,001$ ). U PMF bolesnika nije bilo razlike u terapiji između bolesnika s trombozom i bez tromboze.

## 5.8. Vrijeme proteklo od tromboze do postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN

Utvrđeno je da prvi trombotički događaj kod svih bolesnika najčešće nastao iste godine kad je i postavljena dijagnoza Ph(-) MPN.

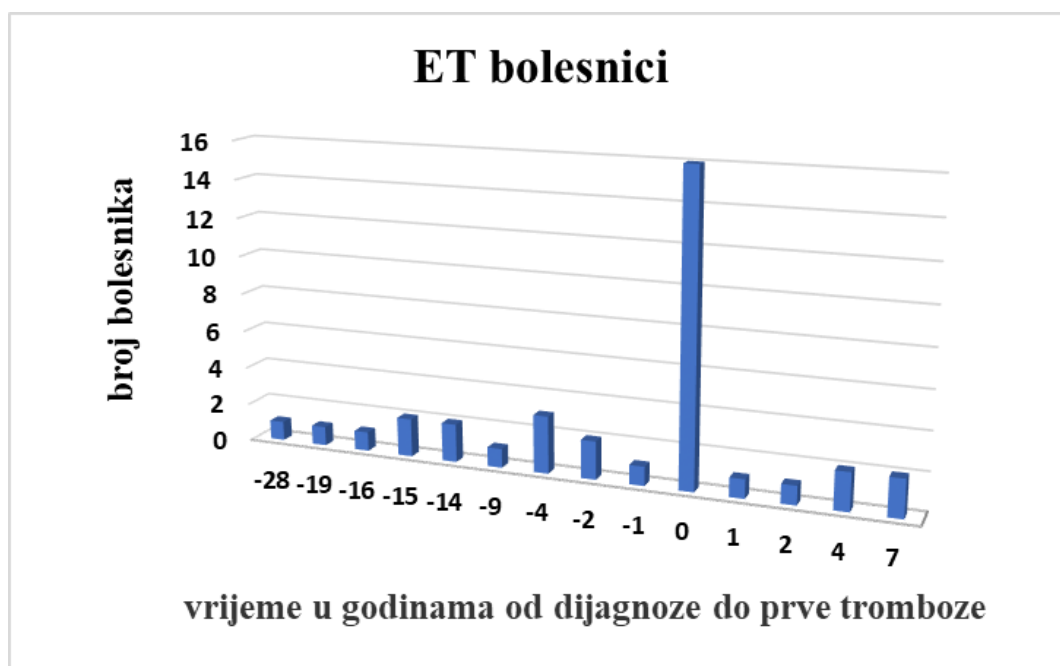
Na Slici 24. za 79 bolesnika s trombozom prikazan je vremenski raspon u godinama od nastanka prve tromboze u odnosu na godinu postavljanja dijagnoze koja je označena brojkom 0 (negativne vrijednosti su vrijeme u godinama prije postavljanja dijagnoze a pozitivne nakon) pri čemu je vidljivo da je kod 30 bolesnika (38,0 %) tromboza nastala iste godine kad je postavljena dijagnoza Ph(-) MPN.



**Slika 24.** Vrijeme u godinama od nastanka prve tromboze u odnosu na godinu u kojoj je postavljena dijagnoza bolesti u skupini svih Ph(-) MPN bolesnika.

I kod ET bolesnika prisutan je isti trend u kojem je u 16 bolesnika (44,4 %) prva tromboza nastala prilikom postavljanja dijagnoze ET (14 bolesnika s arterijskom i dva s venskom trombozom). U tom periodu najčešće arterijske tromboze bile su ishemijski moždani udar te infarkt

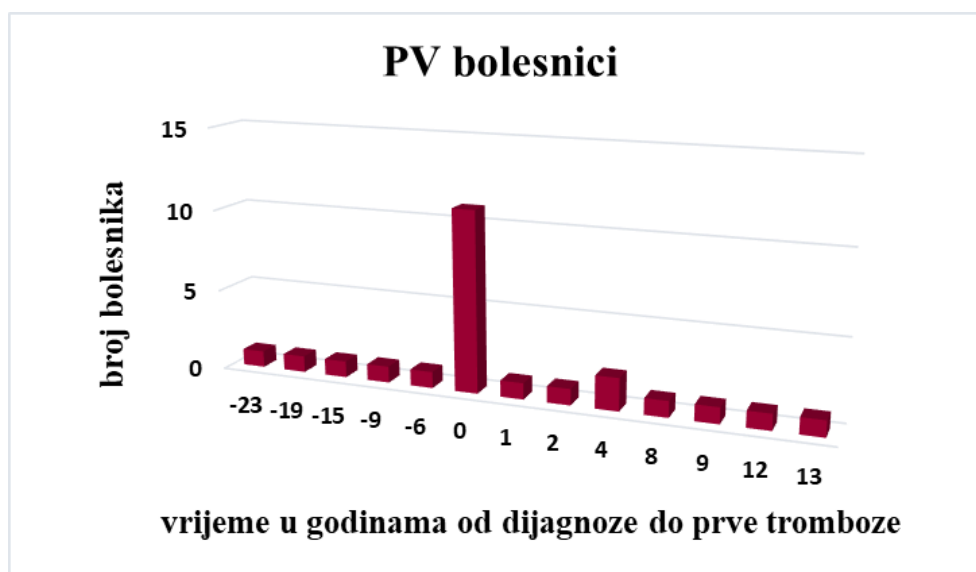
miokarda, svaki od navedenih nastao je u četiri bolesnika. Od venskih tromboza u dva bolesnika nastale su duboke venske tromboze. U 14 bolesnika (38,9 %) tromboza je nastupila više od godinu dana prije postavljanja dijagnoze pri čemu je u devet bolesnika nastala arterijska a u pet venska tromboza. Od arterijskih tromboza nastalih prije postavljanja dijagnoze najčešći je bio infarkt miokarda, koji je nastupio u tri bolesnika. Kao najčešći venski događaj prije dijagnoze zabilježena je duboka venska tromboza u četiri bolesnika. Šest bolesnika (16,7 %) imali su trombozu nakon jedne ili više godina od trenutka postavljanja dijagnoze. U četiri bolesnika nastala je arterijska tromboza, od kojih je u dva bolesnika nastao prolazni ishemijski napadaj kao najčešći oblik tromboze, dok je različita venska tromboza nastala u dva bolesnika (Slika 25.).



**Slika 25.** Vrijeme u godinama od nastanka prve tromboze u odnosu na godinu u kojoj je postavljena dijagnoza bolesti u skupini ET bolesnika.

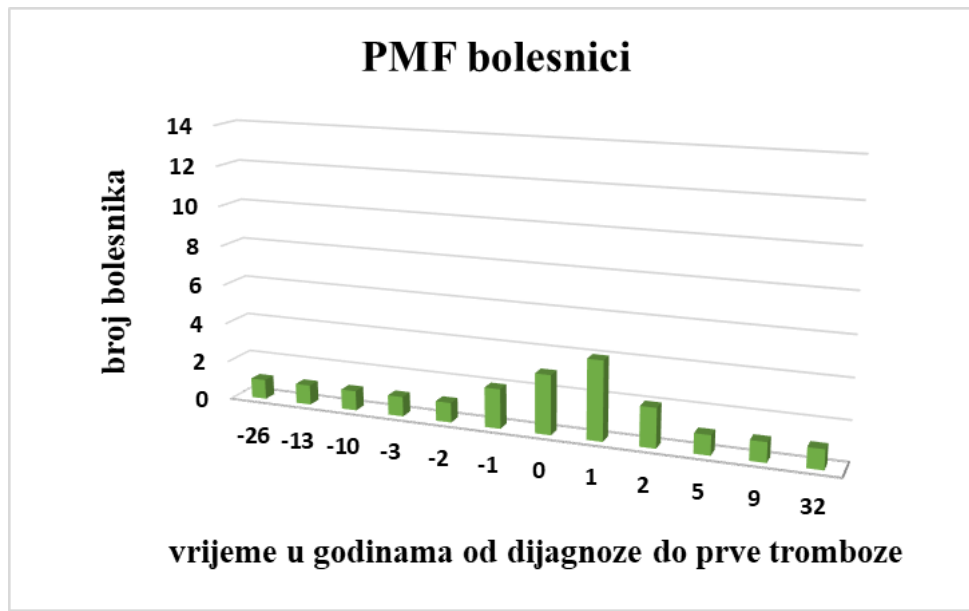
Raspodjela tromboza prema vremenu njihovog nastanka u PV bolesnika prikazana je na Slici 26. Jedanaest bolesnika (45,8 %) trombozu je doživjelo prilikom postavljanja dijagnoze pri čemu je osam bolesnika imalo arterijsku, a tri vensku trombozu. Ishemijski moždani udar nastao je u četiri bolesnika što ga čini najčešćom arterijskom trombozom u trenutku postavljanja dijagnoze. U pet bolesnika (20,8 %) nastala je tromboza godinama prije postavljanja dijagnoze pri čemu je svih pet bolesnika imalo isključivo arterijsku trombozu (tri bolesnika imala su

ishemijski moždani udar a dva bolesnika infarkt miokarda). Jednu ili više godina nakon postavljanja tromboze, trombozu je doživjelo osam bolesnika (33,4 %) od kojih je bilo šest arterijskih i dvije venske tromboze. Od arterijskih tromboza nastalih godinu ili više nakon postavljanja dijagnoze najčešće su bile ishemijski moždani udar i prolazni ishemijski napadaj (svaki se pojavio u dva bolesnika) dok su dva bolesnika imala duboku vensku trombozu.



**Slika 26.** Vrijeme u godinama od nastanka prve tromboze u odnosu na godinu u kojoj je postavljena dijagnoza bolesti u skupini PV bolesnika.

PMF je jedina skupina bolesnika kod kojih je nastanak tromboze imao najveću pojavnost godinu dana ili više nakon postavljanja dijagnoze što je opaženo u 9 bolesnika (47,4 %) od kojih je troje bolesnika imalo arterijsku trombozu, a šest bolesnika vensku trombozu (31,6 %). Najčešći arterijski trombotički događaj u tom periodu bio je infarkt miokarda u dva bolesnika dok je najčešći venski bio tromboza abdominalnih vena koji se dogodio u tri bolesnika. Prvi trombotički događaj u sedam bolesnika (36,8 %) nastao je godinu ili više dana prije postavljanja dijagnoze pri čemu je nastalo pet arterijskih tromboza i dvije venske. Najčešća arterijska tromboza tih bolesnika bio je infarkt miokarda koji je nastao u četiri bolesnika dok je jedini venski događaj koji se pojavio u dva bolesnika bila plućna embolija. Tri bolesnika (15,8 %) trombozu su doživjeli iste godine kad im je postavljena dijagnoza pri čemu su dva bolesnika imali arterijsku trombozu a jedan bolesnik vensku trombozu (Slika 27.).



**Slika 27.** Vrijeme u godinama od nastanka prve tromboze u odnosu na godinu u kojoj je postavljena dijagnoza bolesti u skupini PMF bolesnika.

## 5.9. Prethodna tromboza

Od 79 Ph(-) MPN bolesnika s trombozom 20 (25,3 %) bolesnika imalo je ponavljajuće tromboze (tromboza nakon prethodne tromboze) (Tablica 21.). Pri tome je u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom rizik za nastanak ponavljajuće tromboze bio povećan 3,03 puta u odnosu na bolesnike bez tromboze. ET bolesnici s trombozom imali su 3,50 puta veći rizik za nastanak nove tromboze, dok u PV i PMF bolesnika rizik za nastanak nove tromboze nije bio statistički značajno viši u odnosu na bolesnike sa samo jednom trombozom. Ponavljajuće tromboze bile su najrjeđe u ET bolesnika (22,2 %), a najčešće u PV bolesnika (29,2 %).

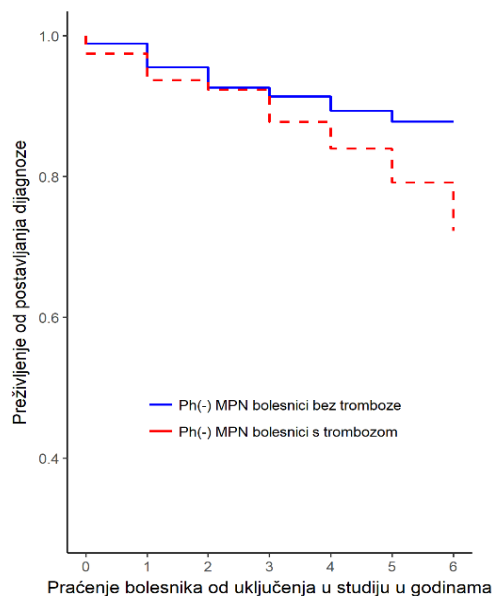
**Tablica 21.** Broj bolesnika ovisno broju tromboza podijeljenih prema dijagnozama u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

Skupina	Bolesnici bez tromboze, N	Bolesnici sa samo jednom trombozom, N (%)	Bolesnici s trombozom nakon prethodne tromboze, N (%)	OR (95% CI)	P
Svi Ph(-) MPN bolesnici	179	59 (74,7)	20 (25,3)	3,03 (1,53-6,03)	<b>0,001</b>
ET bolesnici	98	28 (77,8)	8 (22,2)	3,50 (1,21-10,17)	<b>0,016</b>
PV bolesnici	46	17 (70,8)	7 (29,2)	2,71 (0,83-8,86)	0,093
PMF bolesnici	35	14 (73,7)	5 (26,3)	2,50 (0,63-10,00)	0,186

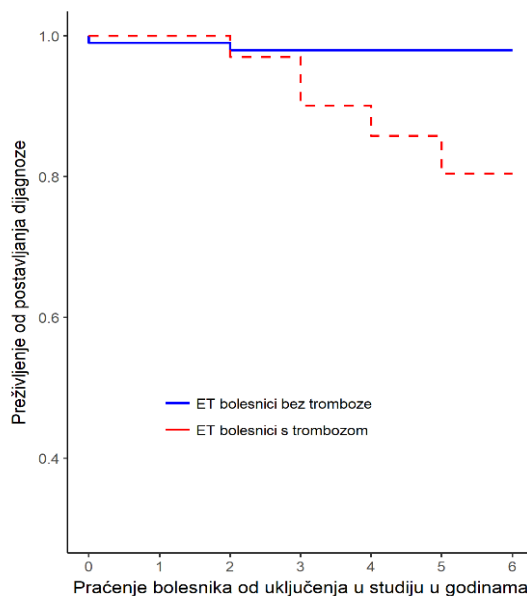
Za usporedbu učestalosti korišten  $\chi^2$  test

## 5.10. Kaplan-Meier krivulje preživljenja bolesnika ovisno o nastanku tromboze

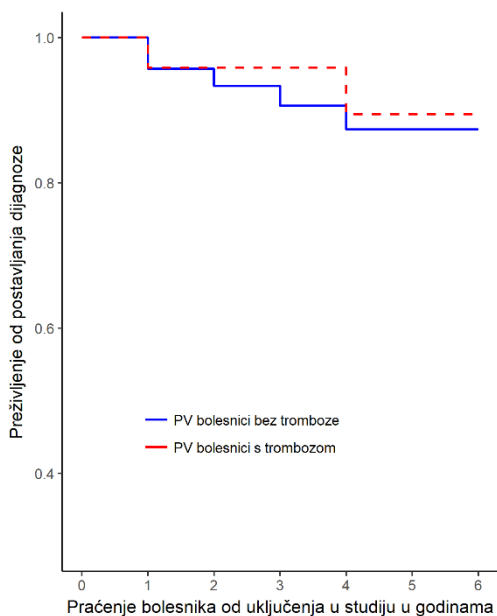
Izradili smo Kaplan-Meierove krivulje preživljenja Ph(-) MPN bolesnika, ovisno o nastanku tromboze, za bolesnike koji su tijekom 6,16 godina prospektivno praćeni, pri čemu smo dobili stopu preživljenja od 72,3 % za bolesnike s trombozom, za razliku od bolesnika bez tromboze sa stopom preživljenja od 87,8 % (Slika 28.).



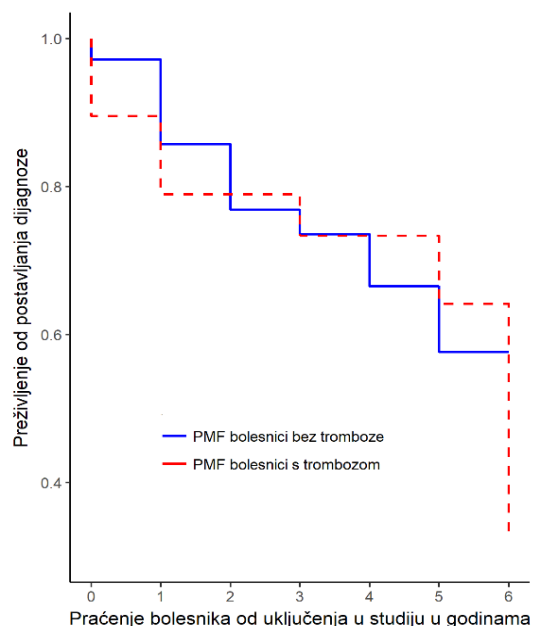
**Slika 28.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja svih Ph(-) MPN bolesnika ovisno o nastanku tromboze.



**Slika 29.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja ET bolesnika ovisno o nastanku tromboze.



**Slika 30.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja PV bolesnika ovisno o nastanku tromboze.



**Slika 31.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja PMF bolesnika ovisno o nastanku tromboze.

Analizirajući stope preživljenja prema dijagnozama za ET bolesnike s trombozom preživljenje je iznosilo 80,4 % dok je u skupini bolesnika bez tromboze u tom periodu preživjelo 97,9 % bolesnika (Slika 29.). U PV bolesnika u periodu prospektivnog praćenja bolesnika

preživjelo je 89,4 % bolesnika s trombozom u odnosu na 87,3 % preživljenja u skupini bolesnika bez tromboze (Slika 30.). Nakon 6,16 godina od postavljanja dijagnoze PMF preživjelo je 32,1 % bolesnika s trombozom u odnosu na preživljenje 57,6 % bolesnika bez tromboze (Slika 31.).

## 5.11. Parametri krvne slike

Parametri krvne slike (leukociti, eritrociti, trombociti, hematokrit i hemoglobin) za većinu bolesnika (73,6 %) određeni su tijekom postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN. Vrijednosti za bolesnike bez tromboze u odnosu na bolesnike s trombozom te u odnosu na bolesnike s arterijskom ili venskom trombozom prikazani su u Tablici 22.

**Tablica 22.** Usporedba parametara krvne slike u Ph(-) MPN bolesnika ovisno o dijagnozi s trombozom i bez tromboze, te usporedba parametara krvne slike bolesnika ovisno o vrsti tromboze u odnosu na bolesnike bez tromboze.

Svi Ph(-) MPN bolesnici, N=258							
Parametar krvne slike	Bolesnici s trombozom, N=79	Bolesnici bez tromboze, N=179	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=59	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=26	P**
Leukociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	10,5 (8,3-14,7)	9,5 (7,2-12,1)	<b>0,009</b>	10,6 (9,0-14,7)	<b>0,001</b>	9,7 (6,4-14,9)	0,591
Eritrociti $\times 10^{12}/L$ , $\bar{x} (\pm SD)$	5,02 ( $\pm 1,29$ )	5,09 ( $\pm 1,12$ )	0,692	5,17 ( $\pm 1,28$ )	0,634	4,78 ( $\pm 1,27$ )	0,204
Trombociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	551 (376-685)	571 (437-720)	0,229	568 (404-734)	0,884	447 (349-586)	<b>0,011</b>
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	0,45 (0,39-0,49)	0,44 (0,40-0,50)	0,750	0,45 (0,40-0,50)	0,437	0,42 (0,37-0,46)	0,172
Hgb g/L, $\bar{x} (\pm SD)$	141 ( $\pm 32$ )	144 ( $\pm 26$ )	0,409	146 ( $\pm 32$ )	0,666	133 ( $\pm 30$ )	<b>0,049</b>

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze \*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze



Pokazalo se da u skupini svih bolesnika s Ph(-) MPN bolesnici s trombozom imaju viši broj leukocita u odnosu na one bez tromboze ( $P = 0,009$ ), a isto je pokazano i u bolesnika s arterijskom trombozom ( $P = 0,001$ ). Analizirajući skupinu svih Ph(-) MPN bolesnika, bolesnici s venskom trombozom imali su niže trombocite ( $P = 0,011$ ) i nižu koncentraciju hemoglobina ( $P = 0,049$ ) u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

Zatim smo podijelili bolesnike prema dijagnozi i analizirali parametre krvne slike prema pojavi tromboze i vrsti tromboze. Utvrđeno je da ET bolesnici s trombozom imaju veći broj leukocita naspram ET bolesnika bez tromboze ( $P = 0,010$ ), a isto je pronađeno i u bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze ( $P < 0,001$ ). Bolesnici s arterijskom trombozom imali su također i veći broj trombocita u odnosu na bolesnike bez tromboze ( $P = 0,050$ ) (Tablica 23.).

**Tablica 23.** Usporedba parametara krvne slike u ET bolesnika s trombozom i bez tromboze, te usporedba parametara krvne slike bolesnika ovisno o vrsti tromboze u odnosu na one bez tromboze.

ET bolesnici, N=134							
Parametar krvne slike	Bolesnici s trombozom, N=36	Bolesnici bez tromboze, N=98	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=29	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=10	P**
Leukociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	10,2 (8,6-13,5)	8,5 (7,0-10,9)	<b>0,010</b>	10,6 (9,7-14,0)	<b>&lt;0,001</b>	8,6 (5,9-10,4)	0,840
Eritrociti $\times 10^{12}/L$ , $\bar{x} (\pm SD)$	4,68 ( $\pm 0,89$ )	4,68 ( $\pm 0,66$ )	0,964	4,82 ( $\pm 0,90$ )	0,500	4,54 ( $\pm 0,90$ )	0,517
Trombociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	657 (543-850)	617 (526-745)	0,576	700 (571-910)	<b>0,050</b>	492 (444-707)	0,074
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	0,43 (0,39-0,46)	0,42 (0,39-0,45)	0,535	0,44 (0,39-0,46)	0,629	0,43 (0,40-0,45)	0,677
Hgb g/L, $\bar{x} (\pm SD)$	136 ( $\pm 27$ )	136 ( $\pm 19$ )	0,938	136 ( $\pm 29$ )	0,949	135 ( $\pm 20$ )	0,823

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

U skupini PV bolesnika jedino je razlika u koncentraciji hemoglobina u bolesnika s venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze bila blizu statistički značajne razlike ( $P = 0,058$ ), dok među svim ostalim ispitanim parametrima krvne slike nije bilo razlike između bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze (Tablica 24.)

**Tablica 24.** Usporedba parametara krvne slike u PV bolesnika s trombozom i bez tromboze, te usporedba parametara krvne slike bolesnika ovisno o vrsti tromboze u odnosu na one bez tromboze.

PV bolesnici, N=70							
Parametar krvne slike	Bolesnici s trombozom, N=24	Bolesnici bez tromboze, N=46	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=19	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	P**
Leukociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	11,4 (9,0-18,4)	10,9 (8,5-13,5)	0,276	12,2 (9,0-18,4)	0,223	11,4 (8,7-19,9)	0,636
Eritrociti $\times 10^{12}/L$ , $\bar{x} (\pm SD)$	6,28 ( $\pm 1,05$ )	6,38 ( $\pm 0,96$ )	0,692	6,34 ( $\pm 1,14$ )	0,896	6,07 ( $\pm 0,51$ )	0,412
Trombociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	430 (375-594)	516 (367-674)	0,252	468 (377-594)	0,342	381 (373-576)	0,259
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	0,50 (0,47-0,57)	0,53 (0,50-0,55)	0,293	0,52 (0,49-0,57)	0,921	0,49 (0,43-0,53)	0,115
Hgb g/L, $\bar{x} (\pm SD)$	166 ( $\pm 27$ )	172 ( $\pm 18$ )	0,353	172 ( $\pm 25$ )	0,115	156 ( $\pm 27,7$ )	0,058

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

U Tablici 25. prikazani su rezultati za skupinu PMF bolesnika pri čemu je pokazano da ne postoji razlika u parametrima krvne slike između bolesnika s trombozom i s različitim vrstama tromboze u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

**Tablica 25.** Usporedba parametara krvne slike u PMF bolesnika s trombozom i bez tromboze, te usporedba parametara krvne slike bolesnika ovisno o vrsti tromboze u odnosu na one bez tromboze.

PMF bolesnici, N=54							
Parametar krvne slike	Bolesnici s trombozom, N=19	Bolesnici bez tromboze, N=35	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=11	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	P**
<b>Leukociti x10<sup>9</sup>/L, medijan (IQR)</b>	9,5 (6,9-22,8)	9,0 (6,1-15,3)	0,556	9,4 (7,1-18,8)	0,690	10,3 (6,4-31,8)	0,596
<b>Eritrociti x10<sup>12</sup>/L, <math>\bar{x}</math> (<math>\pm</math> SD)</b>	4,16 ( $\pm$ 1,11)	4,52 ( $\pm$ 1,04)	0,246	4,32 ( $\pm$ 0,97)	0,582	3,94 ( $\pm$ 1,31)	0,186
<b>Trombociti x10<sup>9</sup>/L, medijan (IQR)</b>	278 (198-562)	365 (209-597)	0,415	278 (204-547)	0,554	333 (137-556)	0,492
<b>Hematokrit (L/L), medijan (IQR)</b>	0,39 (0,31-0,44)	0,40 (0,35-0,48)	0,293	0,42 (0,33-0,45)	0,963	0,35 (0,26-0,40)	0,075
<b>Hgb g/L, <math>\bar{x}</math> (<math>\pm</math> SD)</b>	120 ( $\pm$ 27)	129 ( $\pm$ 27)	0,241	128 ( $\pm$ 24)	0,871	109 ( $\pm$ 29)	0,074

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

Granične vrijednosti parametara krvne slike za bolesnike s arterijskom i venskom trombozom dobivene su pomoću analize ROC krivulje. Broj bolesnika s višom i nižom vrijednosti od granične vrijednosti testiran je  $\chi^2$  testom.

Rezultati za skupinu ET bolesnika prikazani su u Tablici 26. Ustanovljeno je da je rizik za nastanak arterijske tromboze bio povećan 6,14 puta u bolesnika s brojem leukocita  $> 9,2 \times 10^9/L$ , broj eritrocita  $> 5,48 \times 10^{12}/L$  povećavao je rizik 4,00 puta, broj trombocita  $> 632 \times 10^9/L$  povećavao je rizik 2,61 puta, dok je koncentracija hemoglobina  $> 106 \text{ g/L}$  ima zaštitni učinak ( $P < 0,001$ ;  $P = 0,046$ ;  $P = 0,049$  i  $P = 0,028$ , slijedom). Rizik za nastanak venske tromboze bio je povećan 5,55 puta u bolesnika s brojem trombocitima  $\leq 536 \times 10^9/L$  te 8,06 puta u bolesnika s vrijednosti hematokrita  $> 0,45 \text{ L/L}$  ( $P = 0,015$  i  $P = 0,004$ ).

**Tablica 26.** Granične vrijednosti parametara krvne slike ET bolesnika za nastanak arterijske i venske tromboze.

ET bolesnici s trombozom, N=36						
Parametar krvne slike kao optimalna granična vrijednost	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=29	OR (95% CI)	P	Bolesnici s venskom trombozom, N=10	OR (95% CI)	P
Leukociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	> 9,2	6,14 (2,16-17,42)	<0,001	$\leq 5,9$	3,14 (0,76-15,06)	0,120
Eritrociti $\times 10^{12}/L$ , $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	> 5,48	4,00 (1,18-13,55)	0,046	$\leq 4,23$	2,77 (0,71-10,81)	0,215
Trombociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	> 632	2,61 (1,08-6,32)	0,049	$\leq 536$	5,55 (1,34-22,98)	0,015
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	> 0,45	2,11 (0,87-5,13)	0,153	> 0,45	8,06 (1,92-33,80)	0,004
Hgb g/L, $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	> 106	0,21 (0,06-0,73)	0,028	$\leq 101$	7,92 (1,15-54,50)	0,067

Granična vrijednost dobivena analizom ROC krivulje, rezultati su pretvoreni u kategoričke varijable i ispitani  $\chi^2$  testom uz odgovarajući OR i 95% CI

U PV bolesnika broj leukocita  $> 18 \times 10^9/L$  povećavao je rizik za nastanak arterijske tromboze 7,86 puta ( $P = 0,019$ ), dok je koncentracija hemoglobina  $\leq 159$  g/L bila povezana s 5,30 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze ( $P = 0,041$ ) (Tablica 27.).

**Tablica 27.** Granične vrijednosti parametara krvne slike PV bolesnika za nastanak arterijske i venske tromboze.

PV bolesnici s trombozom, N=24						
Parametar krvne slike kao optimalna granična vrijednost	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=19	OR (95% CI)	P	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	OR (95% CI)	P
Leukociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	> 18,0	7,86 (1,37-45,06)	0,019	> 18	7,33 (0,86-62,18)	0,100
Eritrociti $\times 10^{12}/L$ , $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	$\leq 5,45$	3,75 (0,88-15,94)	0,108	$\leq 6,42$	2,11 (0,38-11,61)	0,461
Trombociti $\times 10^9/L$ , medijan (IQR)	$\leq 640$	4,1 (0,8-20,2)	0,118	$\leq 385$	4,23 (0,88-20,31)	0,100
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	$\leq 0,56$	0,61 (0,19-1,89)	0,070	$\leq 0,49$	4,11 (0,86-19,68)	0,084
Hgb g/L, $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	> 191	3,78 (0,99-14,47)	0,067	$\leq 159$	5,30 (1,09-25,84)	0,041

Granična vrijednost dobivena analizom ROC krivulje, rezultati su pretvoreni u kategoričke varijable i ispitani  $\chi^2$  testom uz odgovarajući OR i 95% CI

Analizom graničnih vrijednosti parametara krvne slike u PMF bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze nisu nađene statistički značajne razlike (Tablica 28.).

**Tablica 28.** Granične vrijednosti parametara krvne slike PMF bolesnika za nastanak arterijske i venske tromboze.

PMF bolesnici s trombozom, N=19						
Parametar krvne slike kao optimalna granična vrijednost	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=11	OR (95% CI)	P	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	OR (95% CI)	P
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L, medijan (IQR)	> 6,5	5,22 (0,59-45,74)	0,141	> 18,9	4,65 (0,79-27,31)	0,106
Eritrociti x10 <sup>12</sup> /L, $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	$\leq$ 2,98	7,56 (0,61-93,01)	0,138	$\leq$ 3,9	4,81 (0,95-24,32)	0,089
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L, medijan (IQR)	$\leq$ 315	2,63 (0,64-10,67)	0,298	$\leq$ 218	2,89 (0,60-14,02)	0,217
Hematokrit (L/L), medijan (IQR)	$\leq$ 0,39	0,50 (0,11-2,21)	0,486	$\leq$ 0,36	1,73 (0,34-8,76)	0,665
Hgb g/L, $\bar{x}$ ( $\pm$ SD)	$\leq$ 158	6,05 (0,32-114,89)	0,171	$\leq$ 140	7,00 (0,37-132,59)	0,165

Granična vrijednost dobivena analizom ROC krivulje, rezultati su pretvoreni u kategoričke varijable i ispitani  $\chi^2$  testom uz odgovarajući OR i 95% CI

## 5.12. Kardiovaskularni rizični faktori u Ph(-) MPN bolesnika

U kardiovaskularne (KV) rizične faktore ubrojili smo hipertenziju, šećernu bolest, hiperlipidemiju, pušenje i alkoholizam. Pušenje se smatralo pozitivnim u aktivnih i u bivših pušača dok je alkoholizam dijagnosticiran od strane nadležnog liječnika. Uz navedene faktore, dodan je i parametar prisutnost najmanje jednog KV rizičnog faktora što se odnosilo na prisutnost najmanje jednog od nabrojanih, a moguće i više KV rizičnih faktora u istog bolesnika.

U Ph(-) MPN bolesnika s trombozom postojala je statistički značajno veća učestalost hipertenzije (73,4 vs. 49,7 %, P < 0,001), hiperlipidemije (30,4 vs. 11,2 %, P < 0,001) te je veći broj bolesnika s trombozom u anamnezi imao prisutan najmanje jedan KV rizičan faktor u odnosu na bolesnike bez tromboze (83,5 vs. 60,9 %, P = 0,001) (Tablica 29.).

**Tablica 29.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom i bez tromboze.

Svi Ph(-) MPN bolesnici, N=258				
KV rizičan faktor	Bolesnici s trombozom, N=79	Bolesnici bez tromboze, N=179	OR (95% CI)	P
Hipertenzija, N (%)	58 (73,4)	89 (49,7)	2,79 (1,57-4,98)	<0,001
Šećerna bolest, N (%)	16 (20,3)	24 (13,4)	1,64 (0,82-3,29)	0,225
Hiperlipidemija, N (%)	24 (30,4)	20 (11,2)	3,47 (1,78-6,77)	<0,001
Pušenje, N (%)	13 (16,5)	23 (12,8)	1,34 (0,64-2,80)	0,565
Alkoholizam, N (%)	1 (1,3)	1 (0,6)	2,28 (0,14-36,95)	0,519
Prisutnost barem jednog KV faktora, N (%)	66 (83,5)	109 (60,9)	3,26 (1,67-6,35)	0,001

Nakon podjele tromboza na arterijsku i vensku i njihove usporedbe s bolesnicima bez tromboze utvrđeno je da u Ph(-) MPN bolesnika s arterijskom trombozom češće nalazimo hipertenziju (76,3 vs. 49,7 % uz  $P < 0,001$ ) i hiperlipidemiju (33,9 vs. 11,2 % uz  $P < 0,001$ ). Također, bolesnici s arterijskom trombozom imali su veću učestalost barem jednog KV rizičnog faktora u odnosu na bolesnike bez tromboze (89,8 vs. 60,9 % uz  $P < 0,001$ ). U Ph(-) MPN bolesnika s venskom trombozom učestalost KV rizičnih faktora nije se razlikovala u odnosu na Ph(-) MPN bolesnike bez tromboze (Tablica 30.).

**Tablica 30.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u Ph(-) MPN bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

Svi Ph(-) MPN bolesnici prema vrsti tromboze, N=79						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N= 59	OR (95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N= 26	OR (95% CI)	P**
Hipertenzija, N (%)	45 (76,3)	3,25 (1,67-6,34)	<0,001	18 (69,2)	2,28 (0,94-5,50)	0,099
Šećerna bolest, N (%)	14 (23,7)	2,01 (0,96-4,20)	0,095	3 (11,5)	0,84 (0,23-3,02)	1,000
Hiperlipidemija, N (%)	20 (33,9)	4,08 (2,00-8,31)	<0,001	5 (19,2)	1,54 (0,54-4,54)	0,330

**Tablica 30.** (nastavak)

Svi Ph(-) MPN bolesnici prema vrsti tromboze, N=79						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N= 59	OR (95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N= 26	OR (95% CI)	P**
Pušenje, N (%)	13 (22,0)	1,92 (0,90-4,08)	0,097	1 (3,8)	0,27 (0,04-2,10)	0,324
Alkoholizam, N (%)	1 (1,7)	3,07 (0,19-49,85)	0,435	0 (0,0)	2,25 (0,09-56,57)	1,000
Prisutnost barem jednog KV faktora, N (%)	53 (89,8)	5,67 (2,32-13,90)	<0,001	18 (69,2)	1,44 (0,60-3,50)	0,547

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

Analizom KV rizičnih faktora u ET bolesnika s trombozom u odnosu na ET bolesnike bez tromboze ustanovljeno je da više ET bolesnika s trombozom imalo hipertenziju (72,2 vs. 40,8 %, P = 0,003), hiperlipidemiju (30,6 vs. 9,2 %, P = 0,005) te prisutan barem jedan KV rizičan faktor (86,1 vs. 55,1 %, P = 0,001). Rezultati su prikazani u Tablici 31.

**Tablica 31.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u ET bolesnika s trombozom i bez tromboze.

ET bolesnici, N= 134				
KV rizičan faktor	Bolesnici s trombozom, N=36	Bolesnici bez tromboze, N=98	OR (95% CI)	P
Hipertenzija, N (%)	26 (72,2)	40 (40,8)	3,77 (1,64-8,67)	<b>0,003</b>
Šećerna bolest, N (%)	6 (16,7)	10 (10,2)	1,76 (0,59-5,25)	0,470
Hiperlipidemija, N (%)	11 (30,6)	9 (9,2)	3,14 (1,24-8,14)	<b>0,005</b>
Pušenje, N (%)	8 (22,2)	13 (13,3)	1,87 (0,70-4,97)	0,319
Alkoholizam, N (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	2,70 (0,05-138,53)	1,000
Prisutnost barem jednog KV faktora, N (%)	31 (86,1)	54 (55,1)	5,05 (1,81-14,08)	<b>0,001</b>

Usporedba ET bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na ET bolesnike bez tromboze pokazala je veću učestalost hipertenzije (65,5 vs 40,8 %, P = 0,021) i hiperlipidemije (31,0 vs. 9,2 %, P = 0,005) te prisutnost najmanje jednog KV rizičnog faktora (82,8 vs. 55,1 %, P = 0,009). Svi ET bolesnici s venskom trombozom imali su prisutnu hipertenziju, što je ujedno rezultiralo time da svi ET bolesnici s venskom trombozom imaju prisutan barem jedan KV rizičan faktor. Oba rezultata bila su statistički značajna u odnosu na ET bolesnike bez tromboze (100,0 vs. 40,8 %, P < 0,001 i 100,0 vs. 55,1 %, P = 0,005) (Tablica 32.)

**Tablica 32.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u ET bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

ET bolesnici prema vrsti tromboze, N=36						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=29	OR (95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=10	OR (95% CI)	P**
Hipertenzija, N (%)	19 (65,5)	2,76 (1,16-6,54)	<b>0,021</b>	10 (100,0)	30,33 (1,73-532,45)	<b>&lt;0,001</b>
Šećerna bolest, N (%)	6 (20,7)	2,30 (0,76-6,98)	0,198	1 (10,0)	1,02 (0,12-8,54)	1,000
Hiperlipidemija, N (%)	9 (31,0)	4,45 (1,56-12,63)	<b>0,006</b>	3 (30,0)	4,24 (0,93-19,31)	0,081
Pušenje, N (%)	8 (27,6)	2,49 (0,91-6,78)	0,088	1 (10)	0,73 (0,08-6,22)	1,000
Alkoholizam, N (%)	0 (0,0)	3,34 (0,06-171,95)	1,000	0 (0,0)	9,50 (0,18-502,70)	1,000
Prisutnost min jednog KV faktora, N (%)	24 (82,8)	3,91 (1,38-11,09)	<b>0,009</b>	10 (100,0)	17,15 (0,98-300,79)	<b>0,005</b>

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

U Tablici 33. prikazana je razlika učestalosti KV rizičnih faktora u PV bolesnika. Učestalost šećerne bolesti pokazala se kao jedini KV rizičan faktor koji se statistički značajno razlikovao između PV bolesnika s trombozom i PV bolesnika bez tromboze (33,3 vs. 10,9 %, P = 0,048.



**Tablica 33.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u PV bolesnika s trombozom i bez tromboze.

PV bolesnici, N= 70				
KV rizičan faktor	Bolesnici s trombozom, N=24	Bolesnici bez tromboze, N=46	OR ( 95% CI)	P
Hipertenzija, N (%)	19 (79,2)	30 (65,2)	2,03 (0,64-6,45)	0,280
Šećerna bolest, N (%)	8 (33,3)	5 (10,9)	4,10 (1,17-14,42)	<b>0,048</b>
Hiperlipidemija, N (%)	8 (33,3)	8 (17,4)	2,37 (0,76-7,43)	0,227
Pušenje, N (%)	3 (12,5)	5 (11,1)	1,17 (0,25-5,38)	1,000
Alkoholizam, N (%)	1 (4,2)	1 (2,2)	1,95 (0,12-31,35)	1,000
Prisutnost min jednog KV faktora, N (%)	20 (83,3)	32 (69,6)	2,19 (0,63-7,59)	0,259

Usporedbom KV rizičnih faktora u PV bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na PV bolesnike bez tromboze ustanovljeno je da su imali veću učestalost šećerne bolesti (36,8 vs. 10,9 %, P = 0,030) i prisutnost najmanje jednog KV rizičnog faktora (94,7 vs. 69,6 %, P = 0,049). Skupina PV bolesnika s venskom trombozom imala je jednake učestalosti svih KV rizičnih faktora kao i PV bolesnici bez tromboze (Tablica 34.).

**Tablica 34.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u PV bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

PV bolesnici prema vrsti tromboze, N=24						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=19	OR ( 95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	OR ( 95% CI)	P**
Hipertenzija, N (%)	17 (89,5)	4,53 (0,93-22,14)	0,067	4 (50,0)	0,53 (0,12-2,42)	0,450
Šećerna bolest, N (%)	7 (36,8)	4,78 (1,28-17,82)	<b>0,030</b>	1 (12,5)	1,17 (0,12-11,59)	1,000
Hiperlipidemija, N (%)	7 (36,8)	2,77 (0,83-9,24)	0,112	1 (12,5)	0,68 (0,07-6,31)	1,000
Pušenje, N (%)	3 (15,8)	1,54 (0,33-7,20)	0,683	0 (0,0)	0,44 (0,02-8,81)	1,000

**Tablica 34.** (nastavak)

PV bolesnici prema vrsti tromboze, N=24						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=19	OR (95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	OR (95% CI)	P**
Alkoholizam, N (%)	1 (5,3)	2,50 (0,15-42,16)	0,502	0 (0,0)	1,78 (0,07-47,58)	1,000
Prisutnost min jednog KV faktora, N (%)	18 (94,7)	7,88 (0,96-64,91)	<b>0,049</b>	4 (50,0)	0,44 (0,10-2,00)	0,418

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

Skupina PMF bolesnika jedina je skupina u kojoj se učestalost KV rizičnih faktora nije razlikovala između PMF bolesnika s trombozom u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze (Tablica 35.).

**Tablica 35.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u PMF bolesnika s trombozom i bez tromboze.

PMF bolesnici, N= 54				
KV rizičan faktor	Bolesnici s trombozom, N=19	Bolesnici bez tromboze, N=35	OR (95% CI)	P
Hipertenzija, N (%)	13 (68,4)	20 (57,1)	1,63 (0,50-5,27)	0,603
Šećerna bolest, N (%)	2 (10,5)	9 (25,7)	0,34 (0,07-1,77)	0,292
Hiperlipidemija, N (%)	5 (26,3)	3 (8,5)	3,81 (0,80-18,19)	0,113
Pušenje, N (%)	1 (5,3)	5 (14,3)	0,33 (0,04-3,09)	0,408
Alkoholizam, N (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,82 (0,03-95,38)	1,000
Prisutnost min jednog KV faktora, N (%)	15 (78,9)	23 (65,7)	1,96 (0,53-7,22)	0,365

Međutim, podjelom PMF bolesnika prema vrsti nastale tromboze, ustanovljeno je da PMF bolesnici s arterijskom trombozom češće imaju hiperlipidemiju u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze (36,4 vs. 8,5 %, P = 0,046). Ujedno, svi PMF bolesnici s arterijskom trombozom imali su prisutan barem jedan KV rizičan faktor, što je bilo češće nego u skupini PMF bolesnika bez

tromboze (100,0 vs. 65,7 %, P = 0,044). U bolesnika s venskom trombozom nije bilo razlike u učestalosti KV rizičnih faktora u odnosu na bolesnike bez tromboze (Tablica 36.).

**Tablica 36.** Usporedba učestalosti kardiovaskularnih rizičnih faktora u PMF bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u usporedbi s bolesnicima bez tromboze.

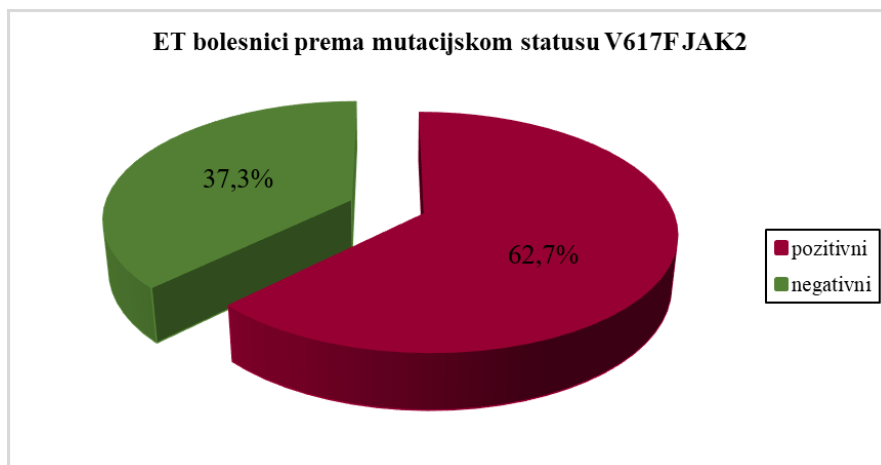
PMF bolesnici prema vrsti tromboze, N=19						
KV rizičan faktor	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=11	OR (95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N=8	OR (95% CI)	P**
Hipertenzija, N (%)	9 (81,8)	3,38 (0,63-17,97)	0,172	4 (50,0)	0,75 (0,16-3,50)	1,000
Šećerna bolest, N (%)	1 (9,1)	0,29 (0,03-2,58)	0,410	1 (12,5)	0,41 (0,0-3,8)	0,656
Hiperlipidemija, N(%)	4 (36,4)	6,10 (1,11-33,56)	<b>0,046</b>	1 (12,5)	0,4 (0,04-3,83)	1,000
Pušenje, N (%)	2 (18,2)	1,33 (0,22-8,07)	1,000	0 (0,0)	0,33 (0,02-6,51)	0,565
Alkoholizam, N (%)	0 (0,0)	3,09 (0,1-164,5)	1,000	0 (0,0)	4,18 (0,08-225,94)	1,000
Prisutnost min jednog KV faktora, N (%)	11 (100,0)	12,23 (0,66-225,35)	<b>0,044</b>	4 (50,0)	0,52 (0,11-2,46)	0,443

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

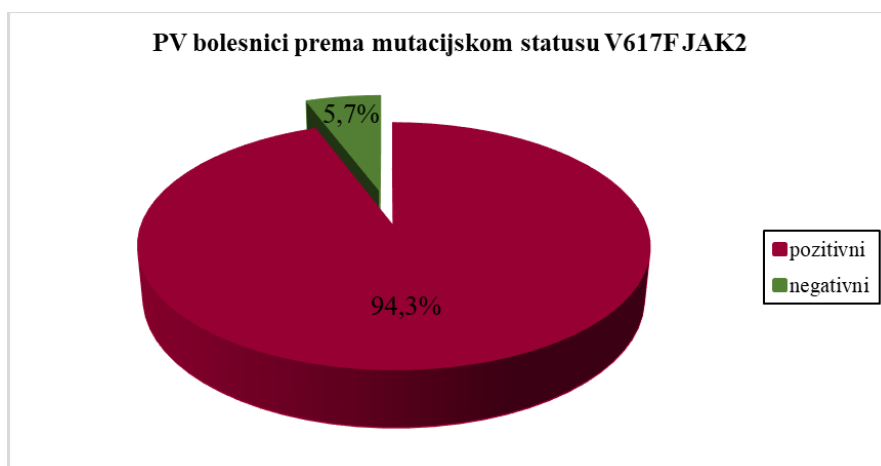
\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

### 5.13. Mutacija V617F u genu *JAK2*

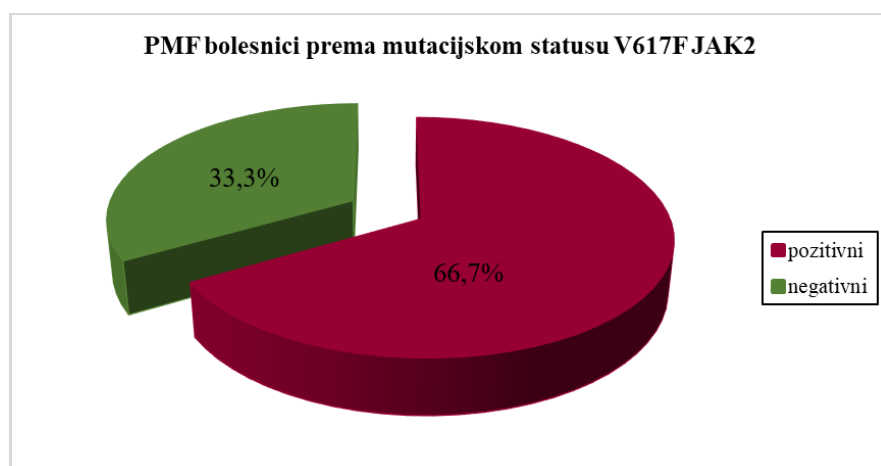
Od 258 Ph(-) MPN bolesnika, 186 (72,1 %) bolesnika bilo je pozitivno na mutaciju V617F u genu *JAK2*. Mutacija V617F nađena je u 84 ET bolesnika (Slika 32.), 66 PV bolesnika (Slika 33.) i 36 PMF bolesnika (Slika 34.).



**Slika 32.** ET bolesnici prema mutacijskom statusu V617F JAK2.



**Slika 33.** PV bolesnici prema mutacijskom statusu V617F JAK2.



**Slika 34.** PMF bolesnici prema mutacijskom statusu V617F JAK2.

Usporedba bolesnika prema učestalosti mutacije i pojavi tromboze pokazala je povezanost mutacije V617F u skupini svih Ph(-) MPN bolesnika s 1,99 puta većim rizikom za nastanak tromboze (P = 0,049). Mutacija V617F bila je povezana i s 2,63 puta povećanim rizikom za nastanak tromboze u ET bolesnika (P = 0,047). U bolesnika s PV i PMF učestalost mutacije V617F nije se razlikovala između bolesnika s trombozom i bez tromboze (Tablica 37.).

Utvrđeno je da Ph(-) MPN bolesnici s mutacijom V617F imaju 2,60 puta veći rizik za nastanak arterijske tromboze (P = 0,021), dok u ET bolesnika prisutnost mutacije povećava rizik za arterijsku trombozu 3,60 puta (P = 0,015). U bolesnika s venskom trombozom nije nađena povezanost prisutnosti mutacije V617F s nastankom tromboze (Tablica 38.).

**Tablica 37.** Usporedba učestalosti tromboze prema dijagnozi za JAK2 V617F pozitivne bolesnike.

Skupina	Bolesnici s trombozom N (%)	Bolesnici bez tromboze N (%)	OR ( 95% CI)	P
Svi Ph(-) MPN bolesnici	64 (81,0)	122 (68,2)	1,99 (1,05-3,80)	<b>0,049</b>
ET bolesnici	28 (77,8)	56 (57,1)	2,63 (1,09-6,34)	<b>0,047</b>
PV bolesnici	22 (91,7)	44 (95,7)	0,50 (0,07-3,79)	0,889
PMF bolesnici	14 (73,7)	22 (62,9)	1,65 (0,48-5,66)	0,550

**Tablica 38.** Usporedba učestalosti arterijske i venske tromboze prema dijagnozi za JAK2 V617F pozitivne bolesnike.

Skupina	Bolesnici s arterijskom trombozom, N (%)	OR ( 95% CI)	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N (%)	OR ( 95% CI)	P**
Svi Ph(-) MPN bolesnici	50 (84,7)	2,60 (1,19-5,64)	<b>0,021</b>	20 (76,9)	1,56 (0,59-4,09)	0,498
ET bolesnici	24 (82,8)	3,60 (1,27-10,22)	<b>0,015</b>	7 (70,0)	1,75 (0,43-7,12)	0,517
PV bolesnici	17 (89,5)	0,39 (0,05-2,97)	0,574	8 (100,0)	0,96 (0,04-21,71)	1,000
PMF bolesnici	9 (81,8)	2,66 (0,50-14,25)	0,296	5 (62,5)	0,98 (0,20-4,82)	1,000

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

## 5.14. Opterećenje mutiranim alelom V617F

Slijedi prikaz rezultata ET bolesnika pozitivnih na mutaciju V617F u genu *JAK2*.

U Tablici 39. prikazani su rezultati opterećenja mutiranim alelom za sve ET bolesnike, bolesnike podijeljene na one s trombozom i bez tromboze te bolesnike podijeljene ovisno o vrsti tromboze. Nije postojala statistički značajna razlika između opterećenja mutiranim alelom kod bolesnika s trombozom u odnosu na one bez tromboze. Ujedno nije bilo razlike niti u vrijednostima opterećenja mutiranim alelom između bolesnika s arterijskom odnosno venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze.

Rezultati iz Tablice 39. detaljnije su prikazani na Slici 35. grafičkim prikazom za sve ET bolesnike, dok je usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom između skupina bolesnika prema vrsti tromboze u odnosu na bolesnike bez tromboze prikazana na Slici 36.

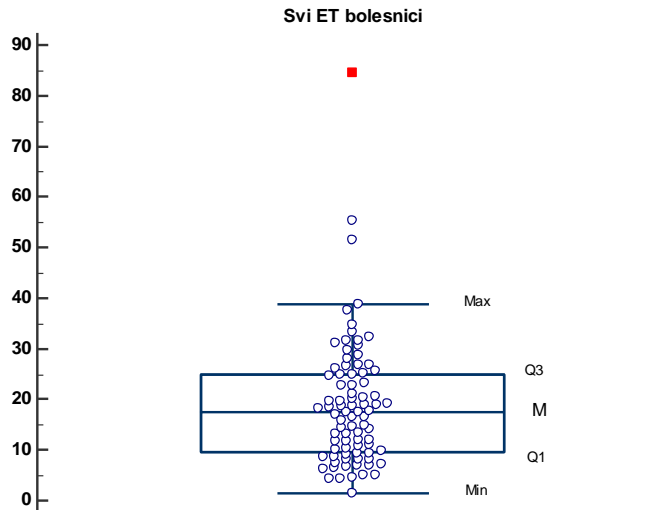
**Tablica 39.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom V617F u ET bolesnika prema pojavnosti tromboze i vrsti tromboze.

Podaci o opterećenju mutiranim alelom V617F	Svi bolesnici, N= 84	Bolesnici s trombozom, N= 28	Bolesnici bez tromboze, N=56	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=24	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N= 7	P**
M %	17,5	19,3	16,7	0,253	19,8	0,140	18,7	0,948
IQR %	9,5-25	10,4-27,7	9,2-24,7		11,2-30,2		8,8-24,9	
Min-max %	1,4-84,5	1,4-84,5	4,2-55,2		6,2-84,5		1,4-84,5	

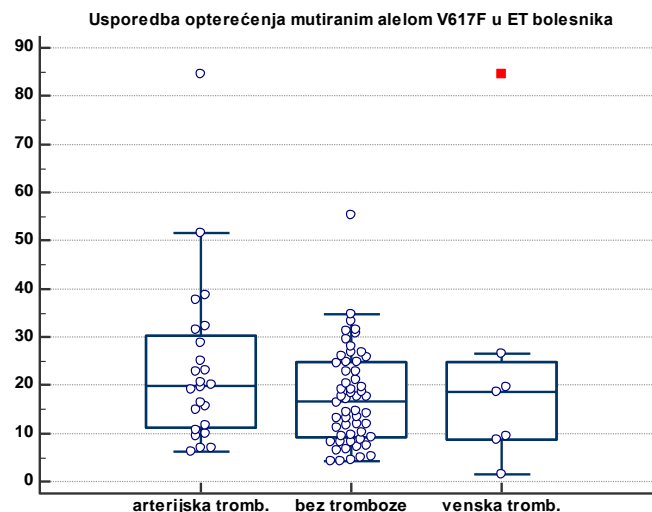
M – medijan opterećenja mutiranim alelom, IQR – interkvartilni raspon, min-max – najniža i najviša vrijednost; vrijednosti prikazane kao postotak

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze



**Slika 35.** Grafički prikaz opterećenja mutiranim alelom svih V617F pozitivnih ET bolesnika. Svaki krug predstavlja vrijednost opterećenja mutiranim alelom V617F pojedinog bolesnika. Središnja crta u pravokutniku označena M predstavlja medijan rezultata. Donja stranica pravokutnika s oznakom Q1 predstavlja donji kvartil (25 % rezultata je niže od toga) dok gornja horizontalna linija pravokutnika označena s Q3 predstavlja gornji kvartil (75 % rezultata je više od toga). Donja crta ispod pravokutnika označena s Min predstavlja najniži rezultat dok gornja crta iznad pravokutnika označena s Max označava najviši rezultat. Točke iznad Max predstavljaju rezultate koji odudaraju od ostalih (engl. *outliers*).



**Slika 36.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom pomoću grafičkog prikaza za ET bolesnike bez tromboze u odnosu na bolesnike s arterijskom i venskom trombozom.

Rezultati usporedbe opterećenja mutiranim alelom V617F u PV bolesnika prikazani su u Tablici 40. Utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između opterećenja mutiranim alelom kako između bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez, tako i kod usporedbe bolesnika s venskom i arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze.

**Tablica 40.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom u PV bolesnika prema pojavnosti tromboze i vrsti tromboze.

Podaci o opterećenju mutiranim alelom V617F	Svi bolesnici, N=66	Bolesnici s trombozom, N=22	Bolesnici bez tromboze N=44	P	Bolesnici s arterijskom trombozom, N=17	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N= 8	P**
M %	43,3	51,2	37,6	0,089	55,1	0,082	41,5	0,348
IQR %	18,8-70,1	32,5-90,9	15,8-70,0		34,8-86,3		27,6-94,0	
Min-max %	0,5-99,9	8,9-99,9	0,5-99,9		12,8-97,2		8,9-99,9	

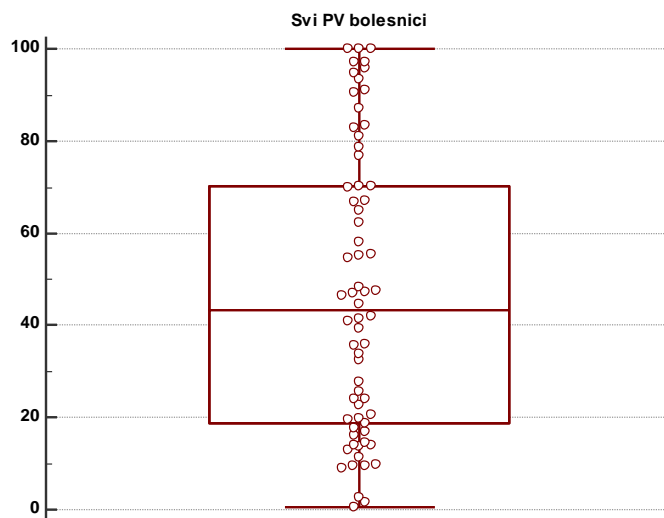
M – medijan opterećenja mutiranim alelom, IQR – interkvartilni raspon, min-max – najniža i najviša vrijednost; vrijednosti prikazane kao postotak

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

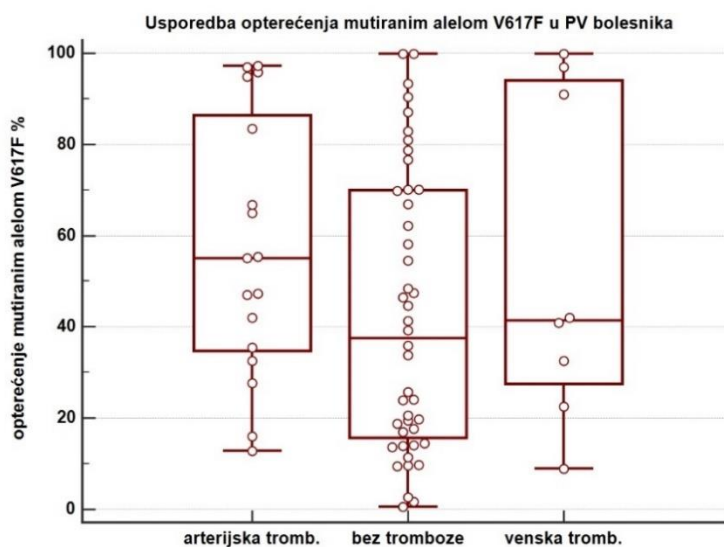
\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

Opterećenje mutiranim alelom V617F za sve PV bolesnike prikazano je grafičkim prikazom na Slici 37., dok je usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom PV bolesnika prema vrsti tromboze u odnosu na PV bolesnike bez tromboze prikazana na Slici 38.





**Slika 37.** Grafički prikaz opterećenja mutiranim alelom za sve V617F pozitivne PV bolesnike.



**Slika 38.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom pomoću grafičkog prikaza za PV bolesnike bez tromboze u odnosu na bolesnike s arterijskom i venskom trombozom.

Uspoređujući rezultate opterećenja mutiranim alelom V617F u skupini PMF bolesnika s trombozom u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze te prema vrsti tromboze nije nađena statistički značajna razlika između njihovih vrijednosti. Postojao je samo trend u kojem su PMF bolesnici s venskom trombozom imali više rezultate u odnosu na bolesnike bez tromboze (medijan 80,5 vs. 36,5 %) uz  $P=0,070$  (Tablica 41.).

**Tablica 41.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom u PMF bolesnika prema pojavnosti tromboze i vrsti tromboze.

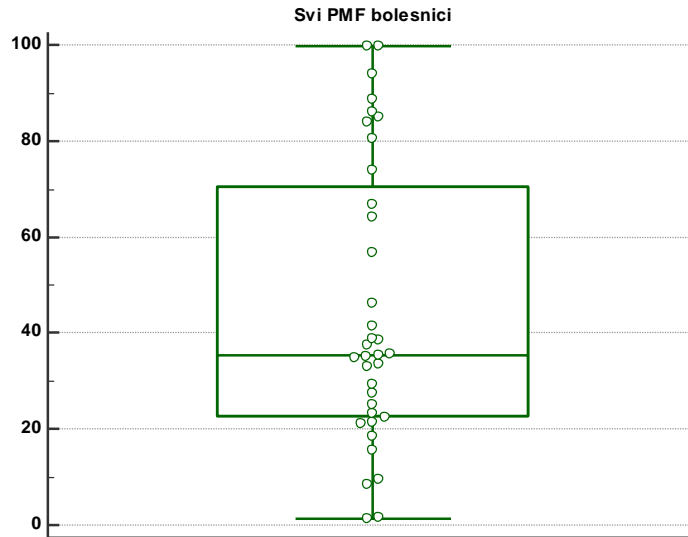
Podaci o opterećenju mutiranim alelom V617F	Svi bolesnici, N= 36	Bolesnici s trombozom, N= 14	Bolesnici bez tromboze, N= 22	P	Bolesnici s arterijskom trombozom N= 9	P*	Bolesnici s venskom trombozom, N= 5	P**
M %	35,4	35,1	36,5	0,795	29,3	0,361	80,5	0,070
IQR %	22,8-70,4	23,1-83,9	22,4-56,7		14,0-47,1		56,9-85,3	
Min-max %	1,4-99,8	1,6-99,8	1,4-99,7		1,6-99,8		35,3-86,1	

M – medijan opterećenja mutiranim alelom, IQR – interkvartilni raspon, min-max – najniža i najviša vrijednost; vrijednosti prikazane kao postotak

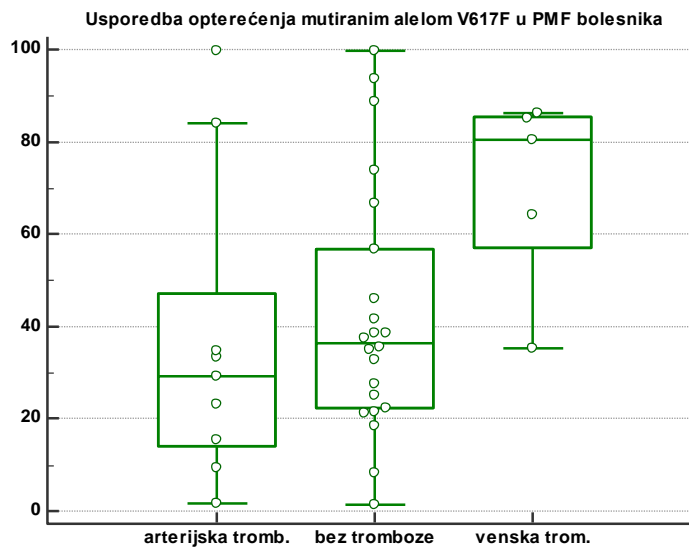
\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

Rezultati opterećenja mutiranim alelom za sve PMF bolesnike prikazani su grafičkim prikazom na Slici 39., dok usporedbu rezultata između PMF bolesnika s arterijskom trombozom, venskom trombozom i bez tromboze pokazuje grafički prikaz na Slici 40.



**Slika 39.** Grafički prikaz opterećenja mutiranim alelom svih V617F pozitivnih PMF bolesnika.



**Slika 40.** Usporedba rezultata opterećenja mutiranim alelom pomoću grafičkog prikaza za PMF bolesnike bez tromboze u odnosu na bolesnike s arterijskom i venskom trombozom.

Analizirali smo i optimalne granične vrijednosti za razlikovanje bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze, te prema dijagnozi. Rezultati su prikazani u Tablici 42. Utvrđeno je da su Ph(-) MPN bolesnici s vrijednošću opterećenja mutiranim alelom  $> 14,6\%$  imali 2,3 puta veći rizik za nastanak arterijske tromboze ( $P = 0,011$ ). Rizik za

nastanak arterijske tromboze u ET bolesnika bio je veći 2,92 puta u bolesnika koji su imali opterećenje mutiranim alelom > 14,6 % (P = 0,021), dok je u PMF bolesnika opterećenje mutiranim alelom ≤ 34,8 % povećavalo 5,06 puta rizik za nastanak arterijske tromboze (P = 0,032). Vrijednost opterećenja mutiranim alelom > 90,4 nosila je 1,94 puta veći rizik za nastanak venske tromboze u PV bolesnika (P = 0,036). U skupini PMF bolesnika 6,00 puta veći rizik za nastanak venske tromboze imali su bolesnici s opterećenjem mutiranim alelom > 56,7 % (P = 0,046).

**Tablica 42.** Granične vrijednosti za opterećenje mutiranim alelom za skupine bolesnika podijeljene na arterijske i venske tromboze u odnosu na bolesnike bez tromboze.

Skupina	Arterijska tromboza			Venska tromboza		
	Opterećenje mutiranim alelom V617F %	OR (95% CI)	P	Opterećenje mutiranim alelom V617F %	OR (95% CI)	P
Svi Ph(-)MPN bolesnici	> 14,6	2,33 (1,25-4,33)	<b>0,011</b>	> 26,1	1,89 (0,82-4,32)	0,193
PV bolesnici	> 25,7	3,43 (0,99-11,94)	0,055	> 90,4	1,94 (0,44-9,34)	<b>0,036</b>
ET bolesnici	> 14,6	2,92 (1,25-6,84)	<b>0,021</b>	> 18,3	2,06 (0,53-7,90)	0,281
PMF bolesnici	≤ 34,8	5,06 (1,19-21,41)	<b>0,032</b>	> 56,7	6,00 (1,12-32,14)	<b>0,046</b>

Granična vrijednost dobivena analizom ROC krivulje, rezultati su pretvoreni u kategoričke varijable i ispitani  $\chi^2$  testom uz odgovarajući OR i 95% CI

### 5.15. Hardy-Weinbergova ravnoteža ispitivanih polimorfizama u svih Ph(-) MPN bolesnika i zdravih ispitanika

Genotipizirano je ukupno 11 polimorfizama u uzorcima Ph(-) MPN bolesnika i skupini zdravih ispitanika: *FV* Leiden, *FII* G20210A, *HPA*-1, *HPA*-2, *HPA*-3, *HPA*-5, *P-SEL* S290N, N562D, V599L, T715P i *PSGL-I* M62I. Za svaki ispitivani polimorfizam napravljena je usporedba s očekivanim učestalostima genotipova tzv. Hardy-Weinbergova ravnoteža. Rezultati su prikazani u Tablici 43.

Nije bilo odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže za sve ispitane polimorfizme u skupini svih Ph(-) MPN bolesnika i skupini zdravih ispitanika. No, prilikom usporedbe Ph(-) MPN bolesnika s trombozom, Ph(-) MPN bolesnika bez tromboze i skupine zdravih ispitanika

ustanovljeno je odstupanje od ravnoteže za polimorfizam *HPA-5* ( $P = 0,007$ ) i *P-SGL-1 M62I* ( $P = 0,029$ ) u skupini bolesnika s trombozom.

**Tablica 43.** Rezultati usporedbe dobivenih i očekivanih učestalosti (Hardy-Weinbergove ravnoteže) za ispitane polimorfizme u Ph(-) MPN bolesnika prema pojavnosti tromboze i u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Polimorfizam	P vrijednost svih Ph(-) MPN bolesnika, N=258	P vrijednost zdravih ispitanika, N=258	P vrijednost Ph(-) MPN bolesnika s trombozom, N=79	P vrijednost Ph(-) MPN bolesnika bez tromboze, N=179	P vrijednost zdravih ispitanika, N= 79
<i>FV</i> Leiden	0,726	0,875	0,817	0,790	1,000
<i>FII</i> G20210A	0,875	0,800	1,000	0,850	0,909
<i>HPA-1</i>	0,866	0,247	0,150	0,537	0,909
<i>HPA-2</i>	0,215	0,353	0,351	0,318	0,909
<i>HPA-3</i>	0,285	0,208	0,625	0,326	0,253
<i>HPA-5</i>	0,958	0,391	<b>0,007</b>	0,137	0,920
<i>P-SEL</i> S290N	0,424	0,072	0,379	0,873	0,269
<i>P-SEL</i> N562D	0,533	0,528	0,731	0,596	0,731
<i>P-SEL</i> V599L	0,644	0,283	0,880	0,500	0,706
<i>P-SEL</i> T715P	0,312	0,247	0,388	0,503	0,880
<i>PSGL-1</i> M62I	0,326	0,288	<b>0,029</b>	0,429	0,635

## 5.16. Učestalosti ispitivanih polimorfizama u bolesnika u usporedbi sa zdravim ispitanicima

Raspodjela učestalosti genotipova i alela svih bolesnika, kao i bolesnika podijeljenih prema dijagnozi uspoređena je s odgovarajućom skupinom zdravih ispitanika (Tablica 44.). Statistička analiza usporedbe raspodjele učestalosti genotipova napravljena je uporabom dominantnog modela (homozigoti za divlji tip u odnosu na heterozigote + homozigote za polimorfni alel). Rezultati su pokazali kako nisu dokazani rijetki homozigoti za polimorfni alel *FV* Leiden i *FII* G20210A ni u skupini svih bolesnika niti u skupini zdravih ispitanika. Osim toga, genotipizacija je pokazala kako nisu prisutni homozigoti za polimorfni alel *HPA-5* i *P-SGL1* M62I u skupini PV

bolesnika, te homozigoti za polimorfni alel *P-SEL* T715P u skupini PMF bolesnika i njihovoj odgovarajućoj skupini zdravih ispitanika. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti svih ispitanih genotipova i alela između svih bolesnika i skupine zdravih ispitanika, neovisno o dijagnozi. Jedino je između skupine svih PMF bolesnika i odgovarajuće skupine zdravih ispitanika uočeno da za polimorfizam *P-SEL* N562D postoji granična statistička značajnost ( $P = 0,052$ ) pri čemu su genotipovi *P-SEL* N562D-ND i N562D-DD bili učestaliji u skupini PMF bolesnika.

### **5.17. Povezanost ispitivanih polimorfizama u svih Ph(-) MPN bolesnika s trombozom**

Napravljena je raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze, te raspodjela učestalosti genotipova u bolesnika s trombozom i skupinom zdravih ispitanika (Tablica 45.).

Nisu ustanovljene statistički značajne razlike između učestalosti genotipova i alela između bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze, kao ni u usporedbi učestalosti genotipova u bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika.

Univarijantnom logističkom regresijom, prema dominantnom modelu, ispitali smo povezanost svakog polimorfizma s nastankom tromboze u bolesnika, uz usporedbu s bolesnicima bez tromboze te usporedbom sa skupinom zdravih ispitanika ( $N = 79$ ) uz izračun OR i 95% CI. Utvrđeno je kako ispitivani polimorfizmi nisu bili rizični faktori za nastanak tromboze u skupini svih bolesnika.

Analizirajući prema vrsti tromboze, nije bilo razlike između učestalosti genotipova u bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze. U bolesnika s venskom trombozom genotip *HPA-2aa* kao i alel *HPA-2a* bili su češće prisutni u odnosu na njihovu pojavnost u bolesnika bez tromboze ( $P = 0,030$  i  $P = 0,044$ ) (Tablica 46.).

**Tablica 44.** Raspodjela učestalosti genotipova ispitanih polimorfizama u svih Ph(-) MPN bolesnika, te ovisno prema dijagnozi, u usporedbi s odgovarajućom skupinom zdravih ispitanika.

Genotip	Svi Ph(-) MPN bolesnici, N=258 (%)	Zdravi ispitanici, N=258 (%)	P	Svi ET bolesnici, N=134 (%)	Zdravi ispitanici, N=134 (%)	P	Svi PV bolesnici, N=70 (%)	Zdravi ispitanici, N=70 (%)	P	Svi PMF bolesnici, N=54 (%)	Zdravi ispitanici, N=54 (%)	P
Allel												
<b>FV Leiden</b>												
GG	247 (95,7)	253 (98,1)	0,204	128 (95,5)	130 (97,0)	0,750	67 (95,7)	70 (100,0)	0,245	52 (96,3)	53 (98,1)	1,000
GA	11 (4,3)	5 (1,9)		6 (4,5)	4 (3,0)		3 (4,3)	0 (0,0)		2 (3,7)	1 (1,9)	
AA	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
G	505	511	0,208	262	264	0,752	137	140	0,247	106	107	1,000
A	11	5		6	4		3	0		2	1	
<b>FII G20210A</b>												
GG	253 (98,1)	250 (96,9)	0,574	131 (97,8)	131 (97,8)	1,000	69 (98,6)	68 (97,1)	1,000	53 (98,1)	51 (94,4)	0,618
GA	5 (1,9)	8 (3,1)		3 (2,2)	3 (2,2)		1 (1,4)	2 (2,9)		1 (1,9)	3 (5,6)	
AA	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
G	511	508	0,577	265	265	1,000	139	138	1,000	107	105	0,621
A	5	8		3	3		1	2		1	3	
<b>HPA-1</b>												
aa	183 (70,9)	185 (71,7)	0,923	95 (70,9)	91 (67,9)	0,691	48 (68,6)	54 (77,1)	0,177	40 (74,1)	40 (74,1)	0,826
ab	69 (26,8)	64 (24,8)		35 (26,1)	39 (29,1)		20 (28,6)	13 (18,6)		14 (25,9)	12 (22,2)	
bb	6 (2,3)	9 (3,5)		4 (3,0)	4 (3,0)		2 (2,9)	3 (4,3)		0 (0,0)	2 (3,7)	
a	435	434	1,000	225	221	0,729	116	121	0,507	94	92	0,844
b	81	82		43	47		24	19		14	16	
<b>HPA-2</b>												
aa	194 (75,2)	191 (74,0)	0,840	103 (76,9)	106 (79,1)	0,768	52 (74,3)	47 (67,1)	0,458	39 (72,2)	38 (70,4)	1,000
ab	62 (24,1)	64 (24,8)		31 (23,1)	25 (18,7)		17 (24,3)	23 (32,9)		14 (25,9)	16 (29,6)	
bb	2 (0,8)	3 (1,2)		0 (0,0)	3 (2,2)		1 (1,4)	0 (0,0)		1 (1,9)	0 (0,0)	
a	450	446	0,783	237	237	1,000	121	117	0,616	92	92	1,000
b	66	70		31	31		19	23		16	16	
<b>HPA-3</b>												
aa	89 (34,5)	97 (37,6)	0,521	44 (32,8)	55 (41,0)	0,206	26 (37,1)	23 (32,9)	0,723	19 (35,2)	18 (33,3)	1,000
ab	132 (51,2)	130 (50,4)		66 (49,3)	63 (47,0)		36 (51,4)	39 (55,7)		30 (55,5)	29 (53,7)	
bb	37 (14,3)	31 (12,0)		24 (17,9)	16 (12,0)		8 (11,4)	8 (11,4)		5 (9,3)	7 (13,0)	
a	310	324	0,406	154	173	0,111	88	85	0,806	68	65	0,780
b	206	192		114	95		52	55		40	43	

**Tablica 44.** (nastavak)

Genotip	Svi Ph(-) MPN bolesnici, N=258 (%)	Zdravi ispitanici, N=258 (%)	P	Svi ET bolesnici, N=134 (%)	Zdravi ispitanici, N=134 (%)	P	Svi PV bolesnici, N=70 (%)	Zdravi ispitanici, N=70 (%)	P	Svi PMF bolesnici, N=54 (%)	Zdravi ispitanici, N=54 (%)	P
Alel												
<b>HPA-5</b>												
aa	197 (76,3)	212 (82,2)	0,129	98 (73,7)	112 (83,6)	0,068	53 (75,7)	58 (82,9)	0,404	45 (83,3)	42 (77,8)	0,627
ab	57 (22,1)	45 (17,4)		34 (25,6)	21 (15,7)		17 (24,3)	12 (17,1)		6 (11,1)	12 (22,2)	
bb	4 (1,6)	1 (0,4)		1 (0,8)	1 (0,7)		0 (0,0)	0 (0,0)		3 (5,6)	0 (0,0)	
a	451	469	0,085	230	245	0,092	123	128	0,433	96	96	1,000
b	65	47		36	23		17	12		12	12	
<b>P-SEL S290N</b>												
SS	155 (60,1)	159 (61,6)	0,787	80 (59,7)	87 (64,9)	0,450	42 (60,0)	45 (64,3)	0,728	33 (61,1)	25 (46,3)	0,178
SN	87 (33,7)	93 (36,1)		48 (35,8)	46 (34,3)		24 (34,3)	22 (31,4)		15 (27,8)	26 (48,1)	
NN	16 (6,2)	6 (2,3)		6 (4,5)	1 (0,8)		4 (5,7)	3 (4,3)		6 (11,1)	3 (5,6)	
S	397	411	0,326	208	220	0,236	108	112	0,662	81	76	0,541
N	119	105		60	48		32	28		27	32	
<b>P-SEL N562D</b>												
NN	61 (23,6)	65 (25,2)	0,756	28 (20,9)	31 (23,1)	0,768	18 (25,7)	20 (28,6)	0,849	2 (3,7)	9 (16,7)	0,052
ND	134 (51,9)	134 (51,9)		70 (52,2)	70 (52,2)		36 (51,4)	39 (55,7)		43 (79,6)	30 (55,5)	
DD	63 (24,4)	59 (22,9)		36 (26,9)	33 (24,6)		16 (22,9)	11 (15,7)		9 (16,7)	15 (27,8)	
N	256	264	0,663	126	132	0,666	72	79	0,472	47	48	1,000
D	260	252		142	136		68	61		61	60	
<b>P-SEL V599L</b>												
VV	204 (79,1)	219 (84,9)	0,109	103 (76,9)	115 (85,8)	0,085	57 (81,4)	56 (80,0)	1,000	44 (81,4)	48 (88,9)	0,416
VL	50 (19,4)	36 (13,9)		30 (22,4)	19 (14,2)		11 (15,7)	12 (17,1)		9 (16,7)	5 (9,2)	
LL	4 (1,6)	3 (1,2)		1 (0,7)	0 (0,0)		2 (2,9)	2 (2,9)		1 (1,9)	1 (1,9)	
V	458	474	0,115	236	249	0,077	125	124	1,000	97	101	0,460
L	58	42		32	19		15	16		11	7	
<b>P-SEL T715P</b>												
TT	209 (81,0)	215 (83,3)	0,565	105 (78,4)	110 (82,1)	0,540	59 (84,3)	55 (78,6)	0,515	45 (83,3)	49 (90,7)	0,390
TP	48 (18,6)	39 (15,1)		28 (20,9)	21 (15,7)		11 (15,7)	14 (20,0)		9 (16,7)	5 (9,3)	
PP	1 (0,4)	4 (1,6)		1 (0,7)	3 (2,2)		0 (0,0)	1 (1,4)		0 (0,0)	0 (0,0)	
T	466	469	0,831	238	241	0,779	129	124	0,418	99	103	0,401
P	50	47		30	27		11	16		9	5	



**Tablica 44.** (nastavak)

	Svi Ph(-) MPN bolesnici, N=258 (%)	Zdravi ispitanici, N=258 (%)	P	Svi ET bolesnici, N=134 (%)	Zdravi ispitanici, N=134 (%)	P	Svi PV bolesnici, N=70 (%)	Zdravi ispitanici, N=70 (%)	P	Svi PMF bolesnici, N=54 (%)	Zdravi ispitanici, N=54 (%)	P
Alel												
<b>PSGL-1 M62I</b>												
MM	227 (88)	226 (87,6)	1,000	119 (88,9)	126 (94,0)	0,191	62 (88,6)	55 (78,6)	0,170	46 (85,2)	45 (83,3)	1,000
MI	29 (11,2)	32 (12,4)		14 (10,4)	8 (6,0)		8 (11,4)	15 (21,4)		7 (12,9)	9 (16,7)	
II	2 (0,8)	0 (0,0)		1 (0,7)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		1 (1,9)	0 (0,0)	
M	483	484	1,000	252	260	0,144	132	125	0,192	99	99	1,000
I	33	32		16	8		8	15		9	9	

P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

**Tablica 45.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom u usporedbi s Ph(-) MPN bolesnicima bez tromboze, i u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika.

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom, N=79 (%)	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N= 79 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	75 (94,9)	172 (96,1)	0,741	1,31 (0,37-4,61)	0,674	69	79 (0,0)	0,120	/	0,995	53
GA	4 (5,1)	7 (3,9)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	154	351	0,743				158	0,122			
A	4	7					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	79 (100,0)	174 (97,2)	0,327	/	0,993	69	77 (97,5)	0,497	/	0,994	51
GA	0 (0,0)	5 (2,8)					2 (2,5)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	158	353	0,330				156	0,498			
A	0	5					2				

**Tablica 45.** (nastavak)

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom, N=79 (%)	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N= 79 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>HPA-1</b>											
aa	57 (72,2)	126 (70,4)	0,890	0,92 (0,51-1,65)	0,774	69	55 (69,6)	0,861	0,88 (0,45-1,76)	0,726	51
ab	22 (27,8)	47 (26,3)					22 (27,8)				
bb	0 (0,0)	6 (3,4)					2 (2,5)				
a	136	299	0,546				132	0,638			
b	22	59					26				
<b>HPA-2</b>											
aa	64 (81,0)	130 (72,6)	0,200	0,62 (0,32-1,19)	0,153	69	55 (69,9)	0,140	0,54 (0,26-1,12)	0,099	56
ab	15 (19,0)	47 (26,3)					22 (27,8)				
bb	0 (0,0)	2 (1,1)					2 (2,5)				
a	143	307	0,178				132	0,094			
b	15	51					26				
<b>HPA-3</b>											
aa	30 (38,0)	59 (33,0)	0,523	0,80 (0,46-1,39)	0,435	69	22 (27,8)	0,236	0,63 (0,32-1,23)	0,177	55
ab	39 (49,4)	93 (52,0)					44 (55,7)				
bb	10 (12,6)	27 (15,0)					13 (16,5)				
a	99	211	0,485				88	0,252			
b	59	147					70				
<b>HPA-5</b>											
aa	66 (83,5)	131 (73,2)	0,100	0,54 (0,27-1,06)	0,074	69	63 (79,9)	0,681	0,77 (0,35-1,74)	0,538	52
ab	10 (12,7)	47 (26,3)					15 (19,0)				
bb	3 (3,8)	1 (0,6)					1 (1,3)				
a	142	309	0,327				141	1,000			
b	16	49					17				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	42 (53,2)	113 (63,1)	0,140	1,51 (0,88-2,58)	0,133	69	47 (59,5)	0,521	1,29 (0,69-2,43)	0,423	53
SN	29 (36,7)	58 (32,4)					30 (38,0)				
NN	8 (10,1)	8 (4,5)					2 (2,5)				
S	113	284	0,068				124	0,194			
N	45	74					34				

**Tablica 45.** (nastavak)

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom, N=79 (%)	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N= 79 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	20 (25,3)	45 (25,1)	0,900	0,88 (0,47-1,62)	0,675	69	20 (25,3)	1,000	1,24 (0,59-2,65)	0,566	52
ND	41 (51,9)	93 (52,0)					41 (51,9)				
DD	18 (22,8)	41 (22,9)					18 (22,8)				
N	81	175	0,866				81	1,000			
D	77	175					77				
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	61 (77,2)	143 (79,9)	0,749	1,17 (0,62-2,22)	0,627	69	65 (82,3)	0,553	1,37 (0,63-2,99)	0,430	53
VL	17 (21,5)	33 (18,4)					13 (16,5)				
LL	1 (1,3)	3 (1,7)					1 (1,3)				
V	139	319	0,823				143	0,586			
L	19	39					15				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	65 (82,3)	144 (80,4)	0,862	0,89 (0,45-1,76)	0,730	69	61 (77,2)	0,553	0,73 (0,33-1,59)	0,430	53
TP	14 (17,7)	34 (19,0)					17 (21,5)				
PP	0 (0,0)	1 (0,6)					1 (1,3)				
T	144	322	0,794				139	0,462			
P	14	36					19				
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	68 (86,1)	159 (88,8)	0,676	1,29 (0,58-2,83)	0,536	69	71 (89,9)	0,625	1,66 (0,61-4,54)	0,320	53
MI	9 (11,4)	20 (11,2)					8 (10,1)				
II	2 (2,5)	0 (0,0)					0 (0,0)				
M	145	338	0,350				150	0,366			
I	13	20					8				

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

**OZNAKE:** % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

**Tablica 46.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u Ph(-) MPN bolesnika bez tromboze u usporedbi s Ph(-) MPN bolesnicima s arterijskom trombozom i u usporedbi s Ph(-) MPN bolesnicima s venskom trombozom.

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	Ph(-) MPN bolesnici s arterijskom trombozom, N=59 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom, N=26 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	172 (96,1)	57 (96,6)	1,000	0,86 (0,17-4,27)	0,856	75	24 (92,3)	0,319	2,04 (0,40-10,43)	0,388	87
GA	7 (3,9)	2 (3,4)					2 (7,7)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	351	116	1,000				50	0,319			
A	7	2					2				
<b>FII G20210A</b>											
GG	174 (97,2)	59 (100,0)	0,336	/	0,994	75	26 (100,0)	1,000	/	0,996	87
GA	5 (2,8)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	353	118	0,339				52	1,000			
A	5	0					0				
<b>HPA-1</b>											
aa	126 (70,4)	42 (71,2)	0,961	0,96 (0,50-1,84)	0,907	75	20 (76,9)	0,649	0,79 (0,30-2,08)	0,630	87
ab	47 (26,3)	17 (28,8)					6 (23,1)				
bb	6 (3,4)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	299	101	0,698				46	0,479			
b	59	17					6				
<b>HPA-2</b>											
aa	130 (72,6)	45 (76,3)	0,704	0,83 (0,42-1,64)	0,582	75	24 (92,3)	<b>0,030</b>	0,22 (0,05-0,97)	<b>0,046</b>	87
ab	47 (26,3)	14 (23,7)					2 (7,7)				
bb	2 (1,1)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	307	104	0,618				50	<b>0,044</b>			
b	51	14					2				
<b>HPA-3</b>											
aa	59 (33,0)	21 (35,6)	0,832	0,89 (0,48-1,65)	0,711	75	11 (42,3)	0,473	0,67 (0,29-1,55)	0,350	87
ab	93 (52,0)	29 (49,2)					14 (53,9)				
bb	27 (15,0)	9 (15,2)					1 (3,8)				
a	211	71	0,898				36	0,206			
b	147	47					16				

**Tablica 46.** (nastavak)

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	Ph(-) MPN bolesnici s arterijskom trombozom, N=59 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom, N=26 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>HPA-5</b>											
aa	131 (73,2)	49 (83,0)	0,175	0,56 (0,26-1,19)	0,129	75	20 (76,9)	0,868	0,82 (0,31-2,16)	0,686	87
ab	47 (26,3)	7 (11,9)					6 (23,1)				
bb	1 (0,6)	3 (5,1)	0,555				0 (0,0)	0,836			
a	309	105					46				
b	49	13					6				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	113 (63,1)	29 (49,2)	0,081	1,77 (0,98-3,21)	0,059	75	16 (61,5)	0,952	0,97 (0,42-2,27)	0,950	87
SN	58 (32,4)	26 (44,0)					5 (19,2)				
NN	8 (4,5)	4 (6,8)	0,088				5 (19,2)	0,248			
S	284	84					37				
N	74	34					15				
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	45 (25,1)	12 (20,3)	0,566	0,96 (0,47-1,91)	0,896	75	8 (30,8)	0,709	0,48 (0,20-1,12)	0,091	87
ND	93 (52,0)	33 (60,0)					14 (53,8)				
DD	41 (22,9)	14 (23,7)	0,832				4 (15,4)	0,375			
N	175	57					30				
D	175	61					22				
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	143 (79,9)	46 (78,0)	0,896	1,12 (0,55-2,30)	0,752	75	20 (76,9)	0,929	1,19 (0,45-3,18)	0,727	87
VL	33 (18,4)	12 (20,3)					6 (23,1)				
LL	3 (1,7)	1 (1,7)	0,903				0 (0,0)	0,922			
V	319	104					46				
L	39	14					6				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	144 (80,4)	49 (83,1)	0,802	0,84 (0,39-1,82)	0,658	75	22 (84,6)	0,791	0,75 (0,24-2,31)	0,614	87
TP	34 (19,0)	10 (16,9)					4 (15,4)				
PP	1 (0,6)	0 (0,0)	0,746				0	0,803			
T	322	108					48				
P	36	10					4				

**Tablica 46.** (nastavak)

Genotip	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179 (%)	Ph(-) MPN bolesnici s arterijskom trombozom, N=59 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom, N=26 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	159 (88,8)	50 (84,7)	0,547	1,43 (0,61-3,34)	0,408	75	23 (88,5)	1,000	1,04 (0,29-3,77)	0,956	87
MI	20 (11,2)	8 (13,6)					2 (7,7)				
II	0 (0,0)	1 (1,7)	0,368				1 (3,8)				
M	338	108					48				
I	20	10					4	0,527			

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

OZNAKE: % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

### 5.17.1. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini ET bolesnika s trombozom

Analizom nismo našli razliku u učestalosti genotipova između ET bolesnika s trombozom i bez tromboze. Međutim, razlika je postojala u učestalosti genotipa *P-SGL1* M62I između ET bolesnika s trombozom i zdravih ispitanika, pri čemu su genotipovi *P-SGL1* M62I-MI i *P-SGL1* M62I-II kao i alel 62I bili prisutni samo u bolesnika s trombozom ( $P = 0,011$  i  $P = 0,011$ ).

Kako bi se provjerila povezanost pojedinačnih polimorfizama s trombozom u ET skupini bolesnika, napravljena je univarijantna logistička regresija za ET bolesnike s trombozom i ET bolesnike bez tromboze, te ET bolesnike s trombozom i skupinom zdravih ispitanika (Tablica 47.). Nije bila dokazana povezanosti niti jednog ispitanog polimorfizma s nastankom tromboze u skupini ET bolesnika, iako je polimorfizam *HPA-5* uz  $P = 0,057$  bio blizu razine statističke značajnosti, koja bi upućivala na njegovu moguću zaštitnu ulogu u nastanku tromboze kod ET bolesnika.

Kad smo podijelili ET bolesnike prema vrsti tromboze i usporedili ih s ET bolesnicima bez tromboze, alel 62I polimorfizma *P-SGL1* M62I bio je učestaliji u bolesnika s arterijskom trombozom uz graničnu statističku značajnost ( $P = 0,051$ ). Međutim, univarijantna logistička regresija nije pokazala povezanost niti jednog ispitanog polimorfizma u skupinama bolesnika s arterijskom i venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze (Tablica 48.)

**Tablica 47.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u ET bolesnika s trombozom u usporedbi s ET bolesnicima bez tromboze i u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika.

Genotip	ET bolesnici s trombozom, N=36 (%)	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=36 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	34 (94,4)	94 (95,9)	0,659	1,38 (0,24-7,89)	0,716	73	36 (100,0)	0,493	/	0,994	53
GA	2 (5,6)	4 (4,1)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	70	192	0,661				72	0,497			
A	2	4					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	36 (100,0)	95 (96,9)	0,564	/	0,995	73	36 (100,0)	1,000	/	/	/
GA	0 (0,0)	3 (3,1)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	72	193	0,566				72	1,000			
A	0	3					0				
<b>HPA-1</b>											
aa	25 (69,4)	70 (71,4)	0,992	1,10 (0,48-2,53)	0,823	73	24 (66,7)	1,000	0,88 (0,33-2,37)	0,800	51
ab	11 (30,6)	24 (24,5)					12 (33,3)				
bb	0 (0,0)	4 (4,1)					0 (0,0)				
a	61	164	0,984				60	1,000			
b	11	32					12				
<b>HPA-2</b>											
aa	27 (75,0)	76 (77,6)	0,853	1,15 (0,47-2,81)	0,756	73	26 (72,2)	1,000	0,87 (0,30-2,47)	0,789	51
ab	9 (25,0)	22 (22,4)					8 (22,2)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)					2 (5,6)				
a	63	174	0,941				60	0,637			
b	9	22					12				
<b>HPA-3</b>											
aa	14 (38,9)	30 (30,6)	0,486	0,69 (0,31-1,54)	0,370	73	9 (25,0)	0,312	0,52 (0,19-1,44)	0,209	57
ab	16 (44,4)	50 (51,0)					21 (58,3)				
bb	6 (16,7)	18 (18,4)					6 (16,7)				
a	44	110	0,553				39	0,500			
b	28	86					33				



**Tablica 47.** (nastavak)

Genotip	ET bolesnici s trombozom, N=36 (%)	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=36 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>HPA-5</b>											
aa	31 (86,1)	68 (69,4)	0,083	0,37 (0,13-1,03)	0,057	73	28 (77,8)	0,540	0,56 (0,17-1,93)	0,362	54
ab	5 (13,9)	29 (29,6)					7 (19,4)				
bb	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (2,8)								
a	67	165	63								
b	5	31	0,092				9	0,399			
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	20 (55,6)	60 (61,2)	0,693	1,26 (0,58-2,74)	0,554	73	23 (63,9)	0,631	1,42 (0,55-3,64)	0,472	54
SN	13 (36,1)	35 (35,7)					12 (33,3)				
NN	3 (8,3)	3 (3,1)	1 (2,8)								
S	53	155	58								
N	19	41	0,431				14	0,428			
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	8 (22,2)	20 (20,4)	0,991	0,90 (0,36-2,27)	0,819	73	9 (25,0)	1,000	1,17 (0,39-3,47)	0,782	51
ND	20 (55,6)	50 (51,0)					18 (50,0)				
DD	8 (22,2)	28 (28,6)					9 (25,0)				
N	36	90	36								
D	36	106	0,649				36	1,000			
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	28 (77,8)	79 (80,6)	0,905	1,15 (0,47-2,81)	0,756	73	29 (80,6)	1,000	1,38 (0,45-4,22)	0,572	53
VL	8 (22,2)	18 (18,4)					7 (19,4)				
LL	0 (0,0)	1 (1,0)					0 (0,0)				
V	64	176	65								
L	8	20	0,992				7	1,000			
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	26 (72,2)	75 (76,5)	0,774	1,30 (0,53-3,20)	0,568	73	27 (75,0)	1,000	1,00 (0,34-2,91)	1,000	50
TP	10 (27,8)	22 (22,4)					8 (22,2)				
PP	0 (0,0)	1 (1,0)					1 (2,8)				
T	62	172	62								
P	10	24	0,880				10	1,000			

**Tablica 47.** (nastavak)

Genotip	ET bolesnici s trombozom, N=36 (%)	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=36 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	29 (80,6)	90 (91,8)	0,127	2,72 (0,91-8,14)	0,074	73	36 (100,0)	<b>0,011</b>	/	0,993	60
MI	6 (16,7)	8 (8,2)					0 (0,0)				
II	1 (2,8)	0 (0,0)					0 (0,0)				
M	64	188	0,063				72	<b>0,011</b>			
I	8	8					0				

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

OZNAKE: % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

**Tablica 48.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u ET bolesnika bez tromboze u usporedbi s ET bolesnicima s arterijskom trombozom i u usporedbi s ET bolesnicima s venskom trombozom.

Genotip	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	ET bolesnici s arterijskom trombozom, N=29 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			ET bolesnici s venskom trombozom, N=10 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	94 (95,9)	28 (96,6)	1,000	0,84 (0,09-7,82)	0,878	77	9 (90,0)	0,391	2,61 (0,26-25,93)	0,413	91
GA	4 (4,1)	1 (3,4)					1 (10,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	192	57	1,000				19	0,388			
A	4	1					1				
<b>FII G20210A</b>											
GG	95 (96,9)	29 (100,0)	1,000	/	0,995	77	10 (100,0)	1,000	/	0,995	91
GA	3 (3,1)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	193	58	1,000				20	1,000			
A	3	0					0				

**Tablica 48.** (nastavak)

Genotip	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	ET bolesnici s arterijskom trombozom, N=29 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			ET bolesnici s venskom trombozom, N=10 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>HPA-1</b>											
aa	70 (71,4)	20 (69,0)	0,981	1,12 (0,45-2,77)	0,798	77	7 (70,0)	1,000	1,25 (0,30-5,22)	0,760	90
ab	24 (24,5)	9 (31,0)					3 (30,0)				
bb	4 (4,1)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	164	49	0,995				17	1,000			
b	32	9					3				
<b>HPA-2</b>											
aa	76 (77,6)	21 (72,4)	0,747	1,32 (0,51-3,38)	0,568	77	8 (80,0)	1,000	0,86 (0,17-4,37)	0,859	91
ab	22 (22,4)	8 (27,6)					2 (20,0)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	174	50	0,764				18	1,000			
b	22	8					2				
<b>HPA-3</b>											
aa	30 (30,6)	12 (41,4)	0,391	0,63 (0,27-1,47)	0,281	77	3 (30,0)	1,000	1,03 (0,25-4,25)	0,968	91
ab	50 (51,0)	12 (41,4)					6 (60,0)				
bb	18 (18,4)	5 (17,2)					1 (10,0)				
a	110	36	0,513				12	0,923			
b	86	22					8				
<b>HPA-5</b>											
aa	68 (69,4)	25 (86,2)	0,095	0,36 (0,12-1,13)	0,081	77	8 (80,0)	0,720	0,57 (0,11-2,83)	0,489	91
ab	29 (29,6)	4 (13,8)					2 (20,0)				
bb	1 (1,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	165	54	0,127				18	0,746			
b	31	4					2				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	60 (61,2)	14 (48,3)	0,304	1,69 (0,73-3,89)	0,216	77	8 (80,0)	0,317	0,39 (0,08-1,96)	0,255	91
SN	35 (35,7)	13 (44,8)					1 (10,0)				
NN	3 (3,1)	2 (6,9)					1 (10,0)				
S	155	41	0,246				17	0,771			
N	41	17					3				

**Tablica 48.** (nastavak)

Genotip	ET bolesnici bez tromboze, N=98 (%)	ET bolesnici s arterijskom trombozom, N=29 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			ET bolesnici s venskom trombozom, N=10 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	20 (20,4)	6 (20,7)	0,819	0,98 (0,35-2,74)	0,974	77	4 (40,0)	0,224	0,38 (0,10-1,49)	0,168	91
ND	50 (51,0)	22 (75,9)					6 (60,0)				
DD	28 (28,6)	1 (3,4)					0 (0,0)				
N	90	34	0,121				14	0,069			
D	106	24					6				
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	79 (80,6)	22 (75,9)	0,768	1,10 (0,42-2,91)	0,849	77	8 (80,0)	1,000	0,86 (0,17-4,37)	0,859	91
VL	18 (18,4)	7 (24,1)					2 (20,0)				
LL	1 (1,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
V	176	51	0,871				18	1,000			
L	20	7					2				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	75 (76,5)	22 (75,9)	0,862	1,24 (0,47-3,31)	0,667	77	8 (80,0)	1,000	0,98 (0,19-4,95)	0,976	91
TP	22 (22,4)	7 (24,1)					2 (20,0)				
PP	1 (1,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
T	172	51	0,848				18	1,000			
P	24	7					2				
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	90 (91,8)	23 (79,3)	0,120	2,93 (0,93-9,30)	0,067	77	8 (80,0)	0,232	2,81 (0,51-15,55)	0,236	91
MI	8 (8,2)	5 (17,2)					2 (20,0)				
II	0 (0,0)	1 (3,4)					0 (0,0)				
M	188	51	0,051				18	0,234			
I	8	7					2				

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

**OZNAKE:** % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

### 5.17.2. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini PV bolesnika s trombozom

Ispitana je raspodjela učestalosti genotipova i alela za skupinu bolesnika s trombozom, bez tromboze i skupini zdravih ispitanika, te su rezultati prikazani u Tablici 49. Nađena je statistički značajna razlika između raspodjele učestalosti genotipova i alela u bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze za *HPA-2* ( $P = 0,003$  i  $P = 0,003$ ). Učestalost genotipova i alela za *HPA-2* pokazala se statistički značajno različita i u bolesnika s trombozom u odnosu na skupini zdravih ispitanika ( $P = 0,004$  i  $P = 0,008$ ).

Univarijantnom logističkom regresijom, prema dominantnom modelu, analizirali smo povezanost ispitanih polimorfizama između bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze, te bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika. Utvrdili smo da postoji povezanost između alela *HPA-2b* i njegove zaštitne uloge u nastanku tromboze, pri čemu je dobiven  $OR = 0,07$  i  $95\% CI = 0,01-0,60$  uz  $P = 0,015$  u usporedbi bolesnika s trombozom i bez tromboze dok je u usporedbi bolesnika s trombozom i zdravih ispitanika dobiven  $OR = 0,06$  i  $95\% CI = 0,01-0,53$  uz  $P = 0,011$ .

Zanimala nas je i raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u bolesnika s arterijskom trombozom i venskom trombozom u odnosu na isto u bolesnika bez tromboze. Rezultati analize prikazani su u Tablici 50. Utvrđena je statistički značajna razlika učestalosti genotipova i alela za polimorfizam *HPA-2* u skupini bolesnika s arterijskom trombozom, te genotipa *HPA-2* u bolesnika s venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze. ( $P = 0,013$  i  $P = 0,013$  te  $P = 0,046$ , slijedom).

Univarijantnom logističkom regresijom dobivena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela za *HPA-2* u bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze ( $P = 0,028$ ). Budući da je uz statistički značajnu razliku dobiven  $OR = 0,09$  to ukazuje na zaštitnu ulogu alela *HPA-2b* za nastanak arterijske tromboze u bolesnika.

**Tablica 49.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u PV bolesnika s trombozom u usporedbi s PV bolesnicima bez tromboze i u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika.

Genotip	PV bolesnici s trombozom, N=24 (%)	PV bolesnici bez tromboze, N=46 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=24 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	24 (100,0)	43 (93,5)	0,546	/	0,994	66	24 (100,0)	1,000	/	/	/
GA	0 (0,0)	3 (6,5)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	48	89	0,551				48	1,000			
A	0	3					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	24 (100,0)	45 (97,8)	1,000	/	0,995	66	23 (95,8)	1,000	/	0,994	52
GA	0 (0,0)	1 (2,2)					1 (4,2)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	48	91	1,000				47	1,000			
A	0	1					1				
<b>HPA-1</b>											
aa	18 (75,0)	30 (65,2)	0,572	0,67 (0,22-2,02)	0,475	65	17 (70,8)	1,000	0,81 (0,23-2,90)	0,745	52
ab	6 (25,0)	14 (30,4)					6 (25,0)				
bb	0 (0,0)	2 (4,3)					1 (4,2)				
a	42	74	0,414				40	0,772			
b	6	18					8				
<b>HPA-2</b>											
aa	23 (95,8)	29 (63,0)	<b>0,003</b>	0,07 (0,01-0,60)	<b>0,015</b>	66	14 (58,3)	<b>0,004</b>	0,06 (0,01-0,53)	<b>0,011</b>	69
ab	1 (4,2)	16 (34,8)					10 (41,7)				
bb	0 (0,0)	1 (2,2)					0 (0,0)				
a	47	74	<b>0,003</b>				38	<b>0,008</b>			
b	1	18					10				
<b>HPA-3</b>											
aa	10 (41,7)	16 (34,8)	0,760	0,75 (0,27-2,06)	0,572	66	6 (25,0)	0,359	2,14 (0,63-7,33)	0,225	58
ab	11 (45,8)	25 (54,3)					15 (62,5)				
bb	3 (12,5)	5 (10,9)					3 (12,5)				
a	31	57	0,904				27	0,531			
b	17	35					21				

**Tablica 49.** (nastavak)

Genotip	PV bolesnici s trombozom, N=24 (%)	PV bolesnici bez tromboze, N= 46 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=24 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>HPA-5</b>											
aa	20 (83,3)	33 (71,7)	0,383	0,51 (0,15-1,77)	0,288	66	22 (91,7)	0,666	2,20 (0,36-13,34)	0,391	54
ab	4 (16,7)	13 (28,3)					2 (8,3)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)								
a	44	79	46								
b	4	13	0,419				2	0,667			
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	16 (66,7)	26 (56,5)	0,572	0,65 (0,23-1,82)	0,412	66	17 (70,8)	1,000	1,21 (0,36-4,12)	0,756	52
SN	7 (29,2)	17 (37,0)					7 (29,2)				
NN	1 (4,1)	3 (6,5)	0 (0,0)								
S	39	69	41								
N	9	23	0,533				7	0,785			
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	8 (33,3)	10 (21,7)	0,444	0,56 (0,18-1,67)	0,295	66	6 (25,0)	0,751	1,50 (0,43-5,26)	0,526	54
ND	12 (50,0)	24 (52,2)					14 (58,3)				
DD	4 (16,7)	12 (26,1)	4 (16,7)								
N	28	44	26								
D	20	48	0,316				22	0,837			
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	18 (75,0)	40 (87,0)	0,398	2,75 (0,80-9,38)	0,107	67	19 (79,2)	1,000	1,56 (0,42-5,86)	0,507	54
VL	5 (20,8)	5 (10,9)					4 (16,7)				
LL	1 (4,2)	1 (2,2)	1 (4,2)								
V	41	85	42								
L	7	7	0,313				6	1,000			
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	21 (87,5)	37 (80,4)	0,523	0,37 (0,07-1,89)	0,234	66	17 (70,8)	0,286	0,22 (0,04-1,20)	0,081	60
TP	3 (12,5)	9 (19,6)					7 (29,2)				
PP	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)								
T	45	83	41								
P	3	9	0,751				7	0,317			

**Tablica 49.** (nastavak)

Genotip	PV bolesnici s trombozom, N=24 (%)	PV bolesnici bez tromboze, N= 46 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=24 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	22 (91,7)	40 (87,0)	0,706	0,61 (0,11-3,26)	0,560	66	20 (83,3)	0,666	0,45 (0,08-2,76)	0,391	54
MI	2 (8,3)	6 (13,0)					4 (16,7)				
II	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
M	46	86	0,715				44	0,677			
I	2	6					4				

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

OZNAKE: % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

**Tablica 50.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u PV bolesnika bez tromboze u usporedbi s PV bolesnicima s arterijskom trombozom i u usporedbi s PV bolesnicima s venskom trombozom.

Genotip	PV bolesnici bez tromboze, N= 46 (%)	PV bolesnici s arterijskom trombozom, N=19 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PV bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	43 (93,5)	19 (100,0)	0,550	/	0,995	71	8 (100,0)	1,000	/	0,994	85
GA	3 (6,5)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	89	38	0,555				16	1,000			
A	3	0					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	45 (97,8)	19 (100,0)	1,000	/	0,995	71	8 (100,0)	1,000	/	0,995	85
GA	1 (2,2)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	91	38	1,000				16	1,000			
A	1	0					0				



Tablica 50. (nastavak)

Genotip	PV bolesnici bez tromboze, N= 46 (%)	PV bolesnici s arterijskom trombozom, N=19 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PV bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>HPA-1</b>											
aa	30 (65,2)	15 (78,9)	0,379	0,50 (0,14-1,76)	0,281	71	6 (75,0)	0,704	0,67 (0,12-3,71)	0,643	85
ab	14 (30,4)	4 (21,1)					2 (25,0)				
bb	2 (4,3)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	74	34	0,304				14	0,731			
b	18	4					2				
<b>HPA-2</b>											
aa	29 (63,0)	18 (94,7)	<b>0,013</b>	0,09 (0,01-0,77)	<b>0,028</b>	71	8 (100,0)	<b>0,046</b>	/	0,994	85
ab	16 (34,8)	1 (5,3)					0 (0,0)				
bb	1 (2,2)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	74	37	<b>0,013</b>				16	0,068			
b	18	1					0				
<b>HPA-3</b>											
aa	16 (34,8)	6 (31,6)	0,968	1,16 (0,37-3,62)	0,804	71	5 (62,5)	0,238	0,32 (0,07-1,51)	0,151	85
ab	25 (54,3)	10 (52,6)					3 (37,5)				
bb	5 (10,9)	3 (15,8)					0 (0,0)				
a	57	22	0,815				13	0,165			
b	35	16					3				
<b>HPA-5</b>											
aa	33 (71,7)	16 (84,2)	0,357	0,48 (0,12-1,91)	0,295	71	5 (62,5)	0,681	1,52 (0,32-7,31)	0,599	85
ab	13 (28,3)	3 (15,8)					3 (37,5)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	79	35	0,394				13	0,703			
b	13	3					3				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	26 (56,5)	11 (57,9)	0,862	0,95 (0,32-2,79)	0,919	71	6 (75,0)	0,449	0,43 (0,08-2,38)	0,336	85
SN	17 (37,0)	7 (36,8)					1 (12,5)				
NN	3 (6,5)	1 (5,3)					1 (12,5)				
S	69	29	0,948				13	0,757			
N	23	9					3				

**Tablica 50.** (nastavak)

Genotip	PV bolesnici bez tromboze, N=46 (%)	PV bolesnici s arterijskom trombozom, N=19 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PV bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR ( 95% CI)	P	%			OR ( 95% CI)	P	%
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	10 (21,7)	3 (15,8)	0,740	0,60 (0,18-1,99)	0,405	71	1 (12,5)	1,000	0,28 (0,06-1,31)	0,106	85
ND	24 (52,2)	14 (73,7)					7 (87,5)				
DD	12 (26,1)	2 (10,5)					0 (0,0)				
N	44	20	0,760				9	0,725			
D	48	18					7				
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	40 (87,0)	15 (78,9)	0,461	2,38 (0,63-9,04)	0,209	71	5 (62,5)	0,118	4,00 (0,75-21,22)	0,104	85
VL	5 (10,9)	3 (15,8)					3 (37,5)				
LL	1 (2,2)	1 (5,3)					0 (0,0)				
V	85	33	0,509				13	0,166			
L	7	5					3				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	37 (80,4)	17 (89,5)	0,486	0,23 (0,03-1,94)	0,177	71	7 (87,5)	1,000	0,59 (0,06-5,40)	0,638	85
TP	9 (19,6)	2 (10,5)					1 (12,5)				
PP	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
T	83	36	0,507				15	1,000			
P	9	2					1				
<b>PSGL-1 M62I</b>											
MM	40 (87,0)	17 (89,5)	1,000	0,78 (0,14-4,28)	0,779	71	8 (100,0)	0,575	0,95 (0,10-9,16)	0,966	85
MI	6 (13,0)	2 (10,5)					0 (0,0)				
II	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
M	86	36	1,000				16	0,589			
I	6	2					0				

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

**OZNAKE:** % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alel

### 5.17.3. Povezanost ispitivanih polimorfizama u skupini PMF bolesnika s trombozom

Analiza je pokazala značajnu razliku u učestalosti genotipa i alela polimorfizma *P-SEL* S290N između PMF bolesnika s trombozom i bez tromboze, pri čemu su genotipovi *P-SEL* S290N-SN i *P-SEL* S290N-NN i alel N290 bili učestaliji u bolesnika s trombozom. Uz to, ustanovljena je značajna razlika u učestalosti genotipa polimorfizma *P-SEL* N562D između PMF bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika pri čemu su bolesnici s trombozom bili nositelji samo genotipova *P-SEL* N562D-ND i *P-SEL* N562D-DD (Tablica 51.). Otkrili smo da postoji povezanost polimorfizma *P-SEL* S290N s nastankom tromboze pri čemu je prisutnost alela N povećavala rizik za trombozu 7,31 puta.

U bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze postojala je manja učestalost alela *HPA-5a*. Osim toga, u bolesnika s arterijskom trombozom pronašli smo povezanost polimorfizma *P-SEL* S290N s nastankom tromboze. Pri čemu je alel 290N povećavao rizik za nastanak arterijske tromboze skoro 6 puta (OR = 5,90, 95% CI = 1,37-25,43).

Bolesnici s venskom trombozom imali su veću učestalost alela 290N, a uz to je nađena i povezanost tog alela s 10 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze (OR = 10,12, 95% CI = 1,70-60,30) (Tablica 52.).

**Tablica 51.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u PMF bolesnika s trombozom u usporedbi s PMF bolesnicima bez tromboze i u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika.

Genotip	PMF bolesnici s trombozom, N=19 (%)	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=19 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	17 (89,5)	35 (100,0)	0,119	/	0,994	69	19 (100,0)	0,486	/	0,994	55
GA	2 (10,5)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	36	70	0,122				38	0,493			
A	2	0					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	19 (100,0)	34 (97,1)	1,000	/	0,995	65	19 (100,0)	1,000	/	0,994	53
GA	0 (0,0)	1 (2,9)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	38	69	1,000				38	1,000			
A	0	1					0				
<b>HPA-1</b>											
aa	14 (73,7)	26 (74,3)	0,782	1,03 (0,29-3,68)	0,962	65	14 (73,7)	1,000	1,00 (0,24-4,24)	1,000	50
ab	5 (26,3)	9 (25,7)					4 (21,0)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)					1 (5,3)				
a	33	61	0,798				32	1,000			
b	5	9					6				
<b>HPA-2</b>											
aa	14 (73,7)	25 (71,4)	0,888	0,89 (0,25-3,14)	0,860	65	15 (78,9)	1,000	1,33 (0,30-6,02)	0,703	53
ab	5 (26,3)	9 (25,7)					4 (21,1)				
bb	0 (0,0)	1 (2,9)					0(0,0)				
a	33	59	0,941				34	1,000			
b	5	11					4				
<b>HPA-3</b>											
aa	6 (31,6)	13 (37,1)	0,912	1,28 (0,39-4,19)	0,683	65	7 (36,8)	1,000	1,26 (0,33-4,84)	0,733	53
ab	12 (63,2)	18 (51,4)					8 (42,1)				
bb	1 (5,3)	4 (11,4)					4 (21,1)				
a	24	44	0,859				22	0,815			
b	14	26					16				

**Tablica 51.** (nastavak)

Genotip	PMF bolesnici s trombozom, N=19 (%)	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=19 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>HPA-5</b>											
aa	15 (78,9)	30 (85,7)	0,704	1,60 (0,37-6,85)	0,526	65	13 (68,4)	0,714	0,58 (0,13-2,51)	0,464	55
ab	1 (5,3)	5 (14,3)					6 (31,6)				
bb	3 (15,8)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	31	65	0,144				32	1,000			
b	7	5					6				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	6 (31,6)	23 (65,7)	<b>0,034</b>	7,31 (2,10-25,48)	<b>0,002</b>	74	7 (36,8)	1,000	1,26 (0,33-4,84)	0,733	53
SN	9 (47,4)	10 (28,6)					11 (57,9)				
NN	4 (21,1)	2 (5,7)					1 (5,3)				
S	21	56	<b>0,013</b>				25	0,481			
N	17	14					13				
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	0 (0,0)	2 (5,7)	0,535	1,72 (0,46-6,39)	0,419	65	5 (26,3)	<b>0,046</b>	/	0,995	61
ND	13 (68,4)	30 (85,7)					9 (47,4)				
DD	6 (31,6)	3 (8,6)					5 (26,3)				
N	13	34	0,217				19	0,245			
D	25	36					19				
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	17 (89,5)	27 (77,1)	0,465	0,40 (0,08-2,10)	0,277	65	17 (89,5)	1,000	1,00 (0,13-7,94)	1,000	50
VL	2 (10,5)	7 (20,0)					2 (10,5)				
LL	0 (0,0)	1 (2,9)					0 (0,0)				
V	36	61	0,322				36	1,000			
L	2	9					2				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	16 (84,2)	29 (82,9)	1,000	0,91 (0,20-4,12)	0,899	65	17 (89,5)	1,000	1,59 (0,23-10,82)	0,633	53
TP	3 (15,8)	6 (17,1)					2 (10,5)				
PP	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
T	35	64	1,000				36	1,000			
P	3	6					2				

**Tablica 51.** (nastavak)

Genotip	PMF bolesnici s trombozom, N=19 (%)	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			Zdravi ispitanici, N=19 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>P-SGL1 M62I</b>											
MM	17 (89,5)	29 (82,9)	0,698	0,57 (0,10-3,14)	0,517	65	16 (84,2)	1,000	0,63 (0,09-4,26)	0,633	53
MI	1 (5,3)	6 (17,1)					3 (15,8)				
II	1 (5,3)	0 (0,0)					0 (0,0)				
M	35	64	1,000				35	1,000			
I	3	6					3				

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

OZNAKE: % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela

**Tablica 52.** Raspodjela učestalosti genotipova i alela ispitanih polimorfizama i rezultati univarijantne logističke regresije prema dominantnom modelu u PMF bolesnika bez tromboze u usporedbi s PMF bolesnicima s arterijskom trombozom i u usporedbi s PMF bolesnicima s venskom trombozom.

Genotip	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	PMF bolesnici s arterijskom trombozom, N=11 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PMF bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>FV Leiden</b>											
GG	35 (100,0)	11 (100,0)	1,000	/	0,995	78	8 (100,0)	1,000	/	0,995	84
GA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	70	22	1,000				16	1,000			
A	0	0					0				
<b>FII G20210A</b>											
GG	34 (97,1)	10 (90,9)	0,452	/	0,996	76	7 (87,5)	0,341	/	0,994	84
GA	1 (2,9)	1 (9,1)					1 (12,5)				
AA	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
G	69	21	0,423				15	0,339			
A	1	1					1				

Tablica 52. (nastavak)

Genotip	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	PMF bolesnici s arterijskom trombozom, N=11 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PMF bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
Alel				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>HPA-1</b>											
aa	26 (74,3)	7 (63,6)	0,702	1,65 (0,39-6,99)	0,496	76	7 (87,5)	0,656	0,41 (0,04-3,83)	0,436	81
ab	9 (25,7)	4 (36,4)					1 (12,5)				
bb	0 (0,0)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	61	18	0,503				15	0,680			
b	9	4					1				
<b>HPA-2</b>											
aa	25 (71,4)	6 (54,5)	0,501	2,08 (0,52-8,41)	0,303	76	8 (100,0)	0,165	/	0,995	81
ab	9 (25,7)	5 (45,5)					0 (0,0)				
bb	1 (2,9)	0 (0,0)					0 (0,0)				
a	59	17	0,664				16	0,116			
b	11	5					0				
<b>HPA-3</b>											
aa	13 (37,1)	3 (27,3)	0,722	1,58 (0,35-7,02)	0,551	76	3 (37,5)	1,000	0,98 (0,20-4,82)	0,985	81
ab	18 (51,4)	7 (63,6)					5 (62,5)				
bb	4 (11,4)	1 (9,1)					0 (0,0)				
a	44	13	0,948				11	0,877			
b	26	9					5				
<b>HPA-5</b>											
aa	30 (85,7)	8 (72,7)	0,374	2,25 (0,44-11,48)	0,330	76	7 (87,5)	1,000	0,86 (0,09-8,54)	0,896	81
ab	5 (14,3)	0 (0,0)					1 (12,5)				
bb	0 (0,0)	3 (27,3)					0 (0,0)				
a	65	16	<b>0,031</b>				15	1,000			
b	5	6					1				
<b>P-SEL S290N</b>											
SS	23 (65,7)	4 (36,4)	0,158	5,90 (1,37-25,43)	<b>0,017</b>	76	2 (25,0)	0,052	10,12 (1,70-60,30)	<b>0,011</b>	81
SN	10 (28,6)	6 (54,5)					3 (37,5)				
NN	2 (5,7)	1 (9,1)					3 (37,5)				
S	56	14	0,200				7	<b>0,008</b>			
N	14	8					9				

**Tablica 52. (nastavak)**

Genotip	PMF bolesnici bez tromboze, N=35 (%)	PMF bolesnici s arterijskom trombozom, N=11 (%)	P*	Univarijantna logistička regresija			PMF bolesnici s venskom trombozom, N=8 (%)	P**	Univarijantna logistička regresija		
				OR (95% CI)	P	%			OR (95% CI)	P	%
<b>P-SEL N562D</b>											
NN	2 (5,7)	0 (0,0)	1,000	2,06 (0,38-11,18)	0,401	76	0 (0,0)	1,000	/	0,995	81
ND	30 (85,7)	7 (63,6)					6 (75,0)				
DD	3 (8,6)	4 (36,4)	0,257				2 (25,0)				
N	34	7					6				
D	36	15					10	0,601			
<b>P-SEL V599L</b>											
VV	27 (77,1)	10 (90,9)	0,421	0,34 (0,04-3,05)	0,333	76	7 (87,5)	1,000	0,48 (0,05-4,52)	0,523	81
VL	7 (20,0)	1 (9,1)					1 (12,5)				
LL	1 (2,9)	0 (0,0)	0,452				0 (0,0)	1,000			
V	61	21					15				
L	9	1					1				
<b>P-SEL T715P</b>											
TT	29 (82,9)	9 (81,8)	1,000	1,07 (0,18-6,28)	0,937	76	7 (87,5)	1,000	0,69 (0,07-6,70)	0,749	81
TP	6 (17,1)	2 (18,2)					1 (12,5)				
PP	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000				0 (0,0)	1,000			
T	64	20					15				
P	6	2					1				
<b>P-SGLI M62I</b>											
MM	29 (82,9)	10 (90,9)	0,666	0,48 (0,05-4,52)	0,524	76	7 (87,5)	1,000	0,69 (0,07-6,70)	0,749	81
MI	6 (17,1)	1 (9,1)					0 (0,0)				
II	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000				1 (12,5)	0,638			
M	64	21					14				
I	6	1					2				

\* Usporedba bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s venskom trombozom i bolesnika bez tromboze

**OZNAKE:** % – postotak ispravno klasificiranih slučajeva; P\*/P\*\* – P vrijednosti dobivene  $\chi^2$  ili Fisherovim egzaktnim testom ovisno o učestalosti ispitivanog polimorfizma/alela



## 5.18. Učestalosti kombinacije genotipova *FV* Leiden, *FII* G20210A, *HPA-5*, *P-SEL* i *P-SGLI*

Napravili smo analizu najčešćih kombinacija genotipova ispitivanih polimorfizma u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom u odnosu na one bez tromboze, te ih podijelili i prema vrsti tromboze i prema dijagnozama. U Tablici 53. prikazali smo samo rezultate koji su bili statistički značajno različiti između ispitivanih skupina.

Analizirajući skupinu Ph(-) MPN bolesnika, ustanovili smo da su nositelji kombinacije genotipa M62I-MM/*HPA-5ab* te *HPA-5ab/FII* G20210A-GG imali puno manji rizik za nastanak tromboze, ali i arterijske tromboze. Kombinacija genotipa *HPA-5ab/FII* G20210A-GG s učestalosti od 26,3 % bila je najčešća kombinacija u Ph(-) MPN bolesnika bez tromboze.

Pojedine kombinacije genotipova smanjivale su rizik za nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika poput kombinacije T715P-TT/N562D-DD i kombinacije T715P-TT/N562D-ND koja je bila prisutna u ukupno 47,5 % bolesnika bez tromboze. Kombinacije koje su povećavale rizik za nastanak venske tromboze bile su M62I-MM/S290N-NN, T715P-TT/S290N-NN, S290N-NN/*FV* Leiden-GG i S290N-NN/*FII* G20210A-GG.

Ispitivanje kombinacija genotipova u ET i PV bolesnika nije pokazalo značajnu razliku između bolesnika s trombozom i bez tromboze, stoga njihove najčešće kombinacije genotipova nisu prikazane.

U PMF bolesnika nekoliko kombinacija genotipova pokazalo se značajno različito između bolesnika s trombozom i bez tromboze, pri čemu su sve kombinacije povećavale rizik za nastanak tromboze ili pojedine vrste tromboze. Kombinacije S290N-SN/*FV* Leiden-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG u PMF bile su značajno češće u bolesnika s trombozom, te su povećavale rizik za nastanak tromboze. Nositelji kombinacija genotipova S290N-SN/*FV* Leiden-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG imali su povećani rizik za nastanak arterijske tromboze, dok su kombinacije genotipova S290N-NN/*FV* Leiden-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG bile povezane s većim rizikom za nastanak venske tromboze u PMF bolesnika.

**Tablica 53.** Učestalosti kombinacije polimorfizama u Ph(-) MPN i PMF bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze.

Kombinacija polimorfizama	Genotip	Vrsta tromboze	Bolesnici s trombozom	Bolesnici bez tromboze	Univarijantna logistička regresija	
					OR (95% CI)	P
<b>Ph(-) MPN bolesnici</b>						
<i>P-SGL1</i> M62I/ <i>HPA-5</i>	M62I-MM/ <i>HPA-5ab</i>	Arterijska i venska	8	44	0,06 (0,01-0,66)	<b>0,021</b>
<i>HPA-5</i> / <i>FII</i> G20210A	<i>HPA5-ab</i> / <i>FII</i> *GG	Arterijska i venska	10	47	0,07 (0,01-0,75)	<b>0,028</b>
<i>P-SGL1</i> M62I/ <i>HPA-5</i>	M62I-MM/ <i>HPA-5ab</i>	Arterijska	5	44	0,04 (0,003-0,44)	<b>0,009</b>
<i>HPA-5</i> / <i>FII</i> G20210A	<i>HPA-5ab</i> / <i>FII</i> *GG	Arterijska	7	47	0,05 (0,01-0,55)	<b>0,014</b>
<i>P-SGL1</i> M62I/ <i>P-SEL</i> S290N	M62I-MM/S290N-NN	Venska	5	7	5,33 (1,47-19,27)	<b>0,011</b>
<i>P-SEL</i> T715P/ <i>P-SEL</i> N562D	T715P-TT/N562D-DD T715P-TT/N562D-ND	Venska	4	41	0,22 (0,06-0,82)	<b>0,025</b>
		Venska	10	85	0,27 (0,09-0,76)	<b>0,014</b>
<i>P-SEL</i> T715P/ <i>P-SEL</i> S290N	T715P-TT/S290N-NN	Venska	5	7	4,95 (1,37-17,90)	<b>0,015</b>
<i>P-SEL</i> V599L/ <i>P-SEL</i> S290N	V599L-VV/S290N-NN	Venska	4	5	6,40 (1,49-27,46)	<b>0,012</b>
S290N/ <i>FV</i>	S290N-NN/ <i>FV</i> *GG	Venska	4	7	4,23 (1,11-16,18)	<b>0,035</b>
S290N/ <i>FII</i>	S290N-NN/ <i>FII</i> *GG	Venska	5	8	4,30 (1,25-14,76)	<b>0,021</b>
<b>PMF bolesnici</b>						
S290N: <i>FV</i>	S290N-SN/ <i>FV</i> *GG	Arterijska i venska	8	6	6,00 (1,51-23,84)	<b>0,011</b>
S290N: <i>FII</i>	S290N-NN/ <i>FII</i> *GG S290N-SN/ <i>FII</i> *GG	Arterijska i venska	4	2	9,00 (1,33-61,03)	<b>0,024</b>
		Arterijska i venska	9	5	8,10 (1,99-33,05)	<b>0,004</b>
S290N: <i>FV</i>	S290N-SN/ <i>FV</i> *GG	Arterijska	5	6	5,63 (1,15-27,44)	<b>0,033</b>
S290N: <i>FII</i>	S290N-SN/ <i>FII</i> *GG	Arterijska	6	5	8,10 (1,66-39,51)	<b>0,010</b>
S290N: <i>FV</i>	S290N-NN/ <i>FV</i> *GG	Venska	2	2	13,50 (1,19-153,33)	<b>0,036</b>
S290N: <i>FII</i>	S290N-NN/ <i>FII</i> *GG S290N-SN/ <i>FII</i> *GG	Venska	3	2	20,25 (2,04-200,85)	<b>0,010</b>
		Venska	3	5	8,10 (1,07-61,54)	<b>0,043</b>

*FV*\* – *FV* Leiden; *FII*\* – *FII* G20210A

## 5.19. Učestalost haplotipova polimorfizama u bolesnika s trombozom i bez tromboze te u zdravih ispitanika

S obzirom na to da se gen za P-selektin nalazi na 1. kromosomu blizu gena za *FV*, kako bi provjerili njihov međusoban utjecaj, od alela polimorfizama gena za P-selektin (S290N, N562D, V599L, T715P) i polimorfizma *FV* (G1691A) napravili smo haplotip *P-SEL-FV*. Također smo iz istog razloga napravili haplotip *HPA* od alela za polimorfizme *HPA-1*, *HPA-2* i *HPA-3* koji se nalaze na 17. kromosomu. Oba sažeta haplotipa ispitana su u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika te su njihove učestalosti međusobno uspoređene.

U Tablici 54. prikazani su rezultati analize haplotipova *HPA*. Nađeno je 8 haplotipova u bolesnika i u zdravih ispitanika. Najčešći haplotip kako u bolesnika tako i u zdravih ispitanika bio je *HPA-1a2a3a*. Razlika u učestalosti haplotipa između bolesnika s trombozom i zdravih ispitanika dobivena je za haplotip *HPA-1b2b3b* (nije bio prisutan u zdravih ispitanika) uz OR = 38,16 i 95% CI = 2,09-698,23.

**Tablica 54.** Raspodjela učestalosti haplotipova *HPA* u bolesnika s trombozom i bez tromboze i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika.

HAPLOTIP <i>HPA</i>	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom, N=79	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179	P*	Zdravi ispitanici, N=258	P**
<i>HPA-1a2a3a</i>	0,5269	0,4091	0,080	0,4424	0,188
<i>HPA-1a2a3b</i>	0,2758	0,3010	0,683	0,2789	0,957
<i>HPA-1a2b3a</i>	0,0304	0,0893	0,091	0,0732	0,172
<i>HPA-1a2b3b</i>	0,0276	0,0358	0,736	0,0422	0,557
<i>HPA-1b2a3a</i>	0,0634	0,0910	0,459	0,0755	0,717
<i>HPA-1b2a3b</i>	0,0389	0,0565	0,555	0,0648	0,392
<i>HPA-1b2b3a</i>	0,0058	0	0,309	0,0210	0,367
<i>HPA-1b2b3b</i>	0,0311	0,0173	0,482	0	<b>0,005</b>

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

Od ukupno 32 moguća haplotipova u Tablici 55. prikazani su samo haplotipovi koji su bili prisutni u nekoj od ispitanih skupina. Najučestaliji haplotip u skupini bolesnika s trombozom bio je SNVTG dok je u bolesnika bez tromboze i u skupini zdravih ispitanika to bio haplotip SDVTG. Statistički značajna razlika (P = 0,033) dobivena je za haplotip SDVPG koji je bio prisutan u

Ph(-) MPN bolesnika s trombozom dok ga u skupini zdravih ispitanika nije bilo uz OR = 23,65 i 95% CI = 1,20-463,00.

Utvrđeno je da je haplotip SDLPG prisutan samo u bolesnika s trombozom u odnosu na one bez tromboze, što je bilo značajno različito uz OR = 16,42 i 95% CI=0,83-321,85; P = 0,050. Isti haplotip bio je prisutan samo u bolesnika s trombozom u odnosu na zdrave ispitanike u kojima ga nije bilo uz OR=23,65 i 95% CI=1,21-463,0; P = 0,018.

**Tablica 55.** Raspodjela učestalosti haplotipova *P-SEL-FV* u bolesnika s trombozom i bez tromboze i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika.

HAPLOTIP <i>P-SEL-FV</i>	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom, N=79	Ph(-) MPN bolesnici bez tromboze, N=179	P*	Zdravi ispitanici, N=258	P**
SNVTG	0,2888	0,2803	0,889	0,2738	0,795
SNVPG	0,0346	0,0703	0,264	0,0751	0,204
SNLTG	0,0685	0,0363	0,257	0,0564	0,691
SNLTA	0	0	/	0,0019	0,699
SNLPG	0	0,0091	0,396	0,0021	0,684
SDVTG	0,2643	0,3462	0,195	0,3778	0,065
SDVTA	0,0077	0,0068	0,937	0,0044	0,721
SDVPG	0,0177	0,0060	0,375	0	<b>0,033</b>
SDLTG	0,0120	0,0384	0,255	0,0049	0,494
SDLPG	0,0215	0	<b>0,050</b>	0	<b>0,018</b>
NNVTG	0,1046	0,0578	0,181	0,0818	0,530
NNVPG	0	0,0122	0,325	0,0062	0,484
NNVPA	0	0,0007	0,941	0	/
NNLTG	0,0161	0,0224	0,742	0,0104	0,681
NNLPG	0	0	/	0,0039	0,579
NDVTG	0,1317	0,0993	0,443	0,0924	0,313
NDVTA	0,0153	0,0093	0,673	0,0033	0,232
NDVPG	0,0148	0,0024	0,243	0,0038	0,283
NDLTG	0	0	/	0,0017	0,714
NDLTA	0,0023	0,0028	0,943	0	0,442

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

Od ukupno 32 moguća haplotipova za ET bolesnike u Tablici 56. prikazani su samo haplotipovi prisutni u nekoj od ispitanih skupina. Ustanovljeno je da haplotip SDVTG ima značajno manju učestalost u skupini ET bolesnika s trombozom u odnosu na skupinu zdravih ispitanika uz OR = 0,36 i 95% CI = 0,13-0,99; P = 0,042.

**Tablica 56.** Raspodjela učestalosti haplotipova *P-SEL-FV* u ET bolesnika s trombozom i ET bolesnika bez tromboze i kontrolnoj skupini zdravih ispitanika.

HAPLOTIP <i>P-SEL-FV</i>	ET bolesnici s trombozom, N=36	ET bolesnici bez tromboze, N=98	P*	Zdravi ispitanici, N=36	P**
SNVTG	0,3411	0,2244	0,172	0,1964	0,169
SNVPG	0	0	/	0,0943	0,061
SNLTG	0,0798	0,0595	0,674	0,0633	0,787
SNLPG	0	0,0157	0,451	0	/
SDVTG	0,2232	0,3677	0,116	0,4515	<b>0,042</b>
SDVTA	0,0139	0,0116	0,915	0	0,481
SDVPG	0,0490	0,0106	0,170	0	0,182
SDLTG	0	0,0339	0,265	0	/
SDLPG	0,0292	0	0,091	0	0,305
NNVTG	0,0619	0,0839	0,675	0,0675	0,924
NNVPG	0,0172	0	0,195	0,0446	0,505
NNLTG	0	0,0002	0,789	0,0339	0,269
NNLPG	0	0,0080	0,592	0	/
NDVTG	0,1412	0,1030	0,538	0,0485	0,183
NDVTA	0	0,0088	0,574	0	/
NDVPG	0,0275	0,0053	0,282	0	0,320
NDLTA	0,0139	0	0,244	0	0,481
NDLPG	0,0022	0	0,644	0	0,780

\* Usporedba bolesnika s trombozom i bolesnika bez tromboze

\*\* Usporedba bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika

Napravili smo i analizu haplotipova *HPA* u ET, PV i PMF bolesnika s trombozom i bez tromboze te skupini zdravih ispitanika kao i analizu haplotipova *P-SEL-FV* za PV i PMF bolesnike, no nismo našli značajnu razliku u njihovoj učestalosti. Isto smo napravili i nakon podjele bolesnika prema dijagnozama i vrsti tromboze, no također nije bilo značajnih razlika u učestalosti haplotipova *HPA* i *P-SEL-FV* u ispitanim skupinama (rezultati nisu prikazani).

## 5.20. Multivarijantna analiza

U analizu multivarijantne logističke regresije uključili smo sve varijable koje su imale statističku značajnost prilikom izrade modela univarijante logističke regresije ili su bili blizu razine statističke značajnosti (parametri krvne slike, KV rizični faktori, mutacija V617F u genu *JAK2* i polimorfizmi ispitivanih gena). Izračunati su odjeci rizika i 95% intervali pouzdanosti.

### 5.20.1. Multivarijantna analiza Ph(-) MPN bolesnici

U model multivarijantne logističke regresije za Ph(-) MPN bolesnike uvršteni su svi statistički značajni parametri ispitivani u bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze te parametar *HPA-5* koji je u univarijantnoj analizi imao razinu značajnosti  $P=0,074$ .

Pokazano je da bolesnici s hiperlipidemijom imaju 3,30 puta veći rizik za nastanak tromboze (95% CI = 1,33-8,19) (Tablica 57).

**Tablica 57.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za Ph(-) MPN bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija Ph(-) MPN bolesnici s trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Godine prilikom postavljanja dijagnoze	0,99 (0,97-1,02)	0,569	73
Leukociti	1,03 (0,98-1,09)	0,258	73
Hipertenzija	0,45 (0,13-1,60)	0,220	73
Hiperlipidemija	3,30 (1,33-8,19)	<b>0,010</b>	73
Prisutnost barem jednog KV faktora	0,55 (0,14-2,10)	0,377	73
Prisutnost mutacije V617F	/	0,995	73
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,01 (1,00-1,02)	0,145	73
<i>HPA-5</i>	0,42 (0,17-1,00)	0,051	73
<i>P-SEL S290N</i>	1,38 (0,68-2,79)	0,378	73

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

U modelu multivarijantne logističke regresije za bolesnike s arterijskom trombozom prikazanom u Tablici 58. ustanovljena je povezanost hiperlipidemije s nastankom tromboze (OR = 3,75 i 95% CI = 1,44-9,78), dok je alel *HPA-5b* bio povezan sa zaštitnom ulogom za nastanak tromboze (OR = 0,36 i 95% CI = 0,13-0,97).

**Tablica 58.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za Ph(-) MPN bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija Ph(-) MPN bolesnici s arterijskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Leukociti	1,03 (0,96-1,11)	0,413	76
Godine prilikom postavljanja dijagnoze	0,99 (0,97-1,03)	0,894	76
Hipertenzija	1,70 (0,46-6,24)	0,427	76
Hiperlipidemija	3,75 (1,44-9,78)	<b>0,007</b>	76
Prisutnost barem jednog KV faktora	3,92 (0,83-18,42)	0,084	76
Prisutnost mutacije V617F	/	0,996	76
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,01 (0,99-1,03)	0,216	76
<i>HPA-5</i>	0,36 (0,13-0,97)	<b>0,043</b>	76
<i>P-SEL S290N</i>	1,83 (0,83-4,01)	0,134	76

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

Povećanje koncentracije hemoglobina u bolesnika s Ph(-) MPN za 1 g/L povezano je s malim zaštitnim učinkom protiv nastanka venske tromboze (OR = 0,98 uz 95% CI = 0,96-0,99), dok je P vrijednost dobivena za opterećenje mutiranim alelom V617F ukazivala na povezanost s blago većim rizikom za trombozu, zbog pripadajućeg rezultata 95% CI ta značajnost se izgubila. (Tablica 59.).

**Tablica 59.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za Ph(-) MPN bolesnike s venskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Hemoglobin	0,98 (0,96-0,99)	<b>0,030</b>	88
Trombociti	0,99 (0,99-1,00)	0,235	88
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,02 (1,00-1,04)	<b>0,021</b>	88
<i>HPA-2</i>	0,15 (0,02-1,22)	0,076	88

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

## 5.20.2. Multivarijantna analiza ET bolesnici

U Tablici 60. prikazan je model multivarijane logističke regresije za ET bolesnike. U njih je potvrđena povezanost broja leukocita s nastankom tromboze pri čemu je povećanje leukocita za  $1 \times 10^9/L$  povećavalo rizik za nastanak tromboze za 19 % (OR = 1,19 uz 95% CI = 1,03-1,38). Uz to, nađena je povezanost hiperlipidemije i nastanka tromboze, pri čemu su bolesnici s hiperlipidemijom imali 4,19 puta veći rizik za nastanak tromboze. Prisutnost mutacije V617F povećavala je rizik za nastanak tromboze 2,98 puta, dok su nositelji *HPA-5b* alela imali smanjen rizik za nastanak tromboze (OR = 0,20 uz 95% CI = 0,06-0,70)

**Tablica 60.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za ET bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija ET bolesnici s trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Godine prilikom postavljanja dijagnoze	1,02 (0,98-1,05)	0,310	80
Leukociti	1,19 (1,03-1,38)	<b>0,019</b>	80
Hipertenzija	2,01 (0,43-9,31)	0,373	80
Hiperlipidemija	4,19 (1,15-15,22)	<b>0,030</b>	80
Prisutnost barem jednog KV faktora	2,34 (0,51-10,67)	0,274	80
Prisutnost mutacije V617F	2,98 (1,07-8,36)	<b>0,038</b>	80
<i>HPA-5</i>	0,20 (0,06-0,70)	<b>0,012</b>	80
<i>P-SGLI M62I</i>	1,19 (0,32-4,36)	0,794	80

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

Analizom bolesnika s arterijskom trombozom ustanovljeno je da je broj leukocita bio povezan s nastankom arterijske tromboze, pri čemu je svako povećanje leukocita za  $1,0 \times 10^9/L$  bilo povezano s 21 % povećanja rizika za nastanak tromboze. Uz to, nađena je povezanost hiperlipidemije s nastankom tromboze pri čemu su ET bolesnici s hiperlipidemijom imali 4,41 puta veći rizik za nastanak tromboze dok je u nositelja mutacije V617F taj rizik bio 4,94 veći. I u ovom modelu, alel *HPA-5b* je bio povezan sa smanjenim rizikom za nastanak tromboze (OR = 0,23 uz 95% CI = 0,06-0,89). Rezultati su prikazani u Tablici 61.



**Tablica 61.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za ET bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija ET bolesnici s arterijskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Godine prilikom postavljanja dijagnoze	1,02 (0,99-1,07)	0,131	82
Leukociti	1,21 (1,02-1,42)	<b>0,025</b>	82
Trombociti	1,00 (1,00-1,42)	0,579	82
Hipertenzija	1,53 (0,24-9,95)	0,652	82
Hiperlipidemija	4,41 (1,08-18,03)	<b>0,039</b>	82
Pušenje	2,30 (0,45-11,68)	0,315	82
Prisutnost barem jednog KV faktora	1,37 (0,19-9,85)	0,754	82
Prisutnost mutacije V617F	4,94 (1,29-18,83)	<b>0,020</b>	82
<i>HPA-5</i>	0,23 (0,06-0,89)	<b>0,034</b>	82
<i>P-SGLI M62I</i>	1,39 (0,31-6,23)	0,666	82

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

U Tablici 62. prikazano je da u ET bolesnika niti jedna ispitana varijabla u multivarijantnoj logističkoj regresiji nije bila povezana s nastankom venske tromboze.

**Tablica 62.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za ET bolesnike s venskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija ET bolesnici s venskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Trombociti	0,99 (0,99-1,00)	0,385	91
Hipertenzija	/	0,997	91
Prisutnost barem jednog KV faktora	/	1,000	91
Godine prilikom postavljanja dijagnoze	/	0,954	91

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

### 5.20.3. Multivarijantna analiza PV bolesnici

U PV bolesnika utvrđena je povezanost šećerne bolesti s 5,61 puta povećanim rizikom za nastanak tromboze, dok je alel *HPA-2b* bio povezan sa znatno smanjenim rizikom (Tablica 63.).

**Tablica 63.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za PV bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija PV bolesnici s trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Šećerna bolest	5,61 (1,15-27,44)	<b>0,033</b>	74
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,02 (1,00-1,04)	0,109	74
<i>HPA-2</i>	0,09 (0,01-0,73)	<b>0,025</b>	74

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

U bolesnika s arterijskom trombozom nađena je povezanost alela *HPA-2b* s jakim zaštitnim učinkom za nastanak arterijske tromboze (OR = 0,11 uz 95% CI = 0,01-0,95) (Tablica 64.)

Multivarijantna logistička regresija za bolesnike s venskom trombozom i bolesnike bez tromboze nije rađena jer se u univarijantnoj logističkoj regresiji ispitivane varijable nisu statistički značajno razlikovale.

**Tablica 64.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za PV bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija PV bolesnici s arterijskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Šećerna bolest	4,68 (0,82-26,64)	0,082	79
Prisutnost barem jednog KV faktora	8,36 (0,81-86,20)	0,074	79
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,02 (1,00-1,05)	0,060	79
<i>HPA-2</i>	0,11 (0,01-0,95)	<b>0,045</b>	79

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

#### 5.20.4. Multivarijantna analiza PMF bolesnici

U skupini PMF bolesnika utvrđena je povezanost alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* s 7,41 puta većim rizikom za nastanak tromboze uz 95% CI = 2,01-27,26 (Tablica 65.).

**Tablica 65.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za PMF bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija PMF bolesnici s trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Hiperlipidemija	3,95 (0,68-23,00)	0,126	74
<i>HPA-5</i>	1,02 (0,19-5,40)	0,980	74
<i>P-SEL S290N</i>	7,41 (2,01-27,26)	<b>0,003</b>	74

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

Nismo našli povezanost hiperlipidemije, prisutnosti barem jednog KV faktora i alela *HPA-5b* s nastankom arterijske tromboze (Tablica 66.), kao niti povezanost opterećenja mutiranim alelom V617F i alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* s nastankom venske tromboze (Tablica 67.).

**Tablica 66.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za PMF bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija PMF bolesnici s arterijskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Hiperlipidemija	3,94 (0,70-22,18)	0,120	78
Prisutnost barem jednog KV faktora	/	0,994	78
<i>P-SEL S290N</i>	4,64 (0,93-23,33)	0,062	78
<i>HPA-5</i>	1,33 (0,24-7,46)	0,748	78

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

**Tablica 67.** Rezultati multivarijantne logističke regresije za PMF bolesnike s venskom trombozom i bez tromboze.

Varijabla	Multivarijantna logistička regresija PMF bolesnici s venskom trombozom i bez tromboze		
	OR (95% CI)	P	%
Opterećenje mutiranim alelom V617F	1,04 (0,99-1,09)	0,095	93
<i>P-SEL S290N</i>	9,24 (0,84-101,37)	0,070	93

% – postotak ispravno klasificiranih slučajeva

## 5.21. Prediktivni modeli za nastanak tromboze

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju kao i pregleda dosadašnjih istraživanja napravili smo nekoliko prediktivnih modela za nastanak tromboze. U njih su uvršteni parametri koji su se u našem istraživanju kroz univarijantnu i multivarijantnu logističku regresiju pokazali statistički značajnima, te parametri koji su značajno doprinosili nastanku tromboze u drugim istraživanjima i koje smo, pomoću univarijantne logističke regresije, dodatno ispitali u našoj skupini bolesnika (Tablica 68. i Tablica 69.).

**Tablica 68.** Dodatno ispitani parametri za izradu prediktivnog modela za nastanak tromboze u skupini Ph(-) MPN bolesnika.

Univarijantna logistička regresija						
Varijabla	Ph(-) MPN bolesnici s trombozom i bez tromboze		Ph(-) MPN bolesnici s arterijskom trombozom i bez tromboze		Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom i bez tromboze	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>Dob &gt; 60 godina</b>	1,63 (0,96-2,78)	0,073	2,03 (1,11-3,70)	<b>0,021</b>	0,95 (0,41-2,18)	0,903
<b>Prethodna tromboza</b>	1,29 (1,18-1,44)	<b>&lt; 0,001</b>	1,31 (1,18-1,50)	<b>&lt; 0,001</b>	1,47 (1,23-1,81)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Prisutnost &gt; 1 KV faktora</b>	4,59 (2,15-9,80)	<b>&lt; 0,001</b>	8,39 (3,18-22,15)	<b>&lt; 0,001</b>	1,63 (0,55-4,85)	0,379

**Tablica 69.** Dodatno ispitani parametri za izradu prediktivnog modela za nastanak tromboze u skupini ET, PV i PMF bolesnika.

Univarijantna logistička regresija						
Varijabla	ET bolesnici s trombozom i bez tromboze		PV bolesnici s trombozom i bez tromboze		PMF bolesnici s trombozom i bez tromboze	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>Dob &gt; 60 godina</b>	2,35 (1,08-5,12)	<b>0,031</b>	1,40 (0,51-3,84)	0,514	0,76 (0,25-2,32)	0,627
<b>Prethodna tromboza</b>	1,33 (1,15-1,63)	<b>&lt; 0,001</b>	1,51 (1,21-1,95)	<b>&lt; 0,001</b>	1,43 (1,15-1,90)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Prisutnost &gt; 1 KV faktora</b>	8,80 (2,69-28,78)	<b>&lt; 0,001</b>	3,50 (0,87-14,06)	0,077	1,60 (0,37-7,02)	0,530

Probni prediktivni modeli ispitani su pomoću parametara AIC i H-L GOF te je odabrano 4 najbolja modela (Tablica 70.).

**Tablica 70.** Četiri prediktivna modela za nastanak tromboze u skupinama bolesnika.

Skupina bolesnika	Varijable u probnom prediktivnom modelu
<b>1. model</b>	
Tromboza u Ph(-) MPN bolesnika Arterijska tromboza u Ph(-) MPN bolesnika Tromboza u PV bolesnika	Dob > 60 godina Prethodna tromboza Prisutnost 1 KV rizičnog faktora Prisutnost > 1 KV rizičnog faktora
<b>2. model</b>	
Tromboza u ET bolesnika Arterijska tromboza u ET bolesnika Arterijska tromboza u PV bolesnika	Dob > 60 godina Prethodna tromboza Prisutnost 1 KV rizičnog faktora Prisutnost > 1 KV rizičnog faktora Prisutnost mutacije V617F
<b>3. model</b>	
Venska tromboza u Ph(-) MPN bolesnika	Opterećenje mutiranim alelom V617F > 26,1% Hipertenzija
<b>4. model</b>	
Tromboza u PMF bolesnika	Prisutnost mutacije V617F Alel 290N polimorfizma <i>P-SEL</i> S290N

Prema vrijednostima odjeka rizika parametara koji su uključeni u izradu prediktivnih modela svim parametrima je dodijeljen 1 bod, dok je prisutnost dva ili više KV rizična faktora zbog visokog OR bodovana s 2 boda. Prema tome, bodovali smo: dob > 60 godina (1 bod), prethodna tromboza (1 bod), prisutnost 1 KV rizičnog faktora (1 bod), prisutnost > 1 KV rizičnog faktora (2 boda), hipertenzija (1 bod), prisutnost mutacije V617F (1 bod), opterećenje mutiranim alelom V617F > 26,1 % (1 bod), prisutnost alela 290N polimorfizma *P-SEL* S290N (1 bod).

Bolesnici su ovisno o zbroju bodova u 1. i 2. modelu svrstani u skupine niskog rizika (0 bodova), srednjeg rizika (1-2 boda) i visokog rizika (> 2 boda) za nastanak tromboze dok su za 3. i 4. model svrstani u skupinu niskog rizika (0 bodova), srednjeg rizika (1 bod) i visokog rizika (2 bodova).

Raspodjela Ph(-) MPN bolesnika u rizične skupine za nastanak tromboze, te prema vrsti tromboze prema izrađenim prediktivnim modelima prikazana je u Tablici 71.

**Tablica 71.** Prediktivni model za nastanak tromboze, te arterijske tromboze i venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika.

Ph(-) MPN bolesnici						
Rizik	Vrsta tromboze	Bolesnici s trombozom, N	Bolesnici bez tromboze, N	P*	OR 95% CI	P**
Nizak	Tromboza	11	51	< 0,001	Referentna	
Srednji		35	111		1,46 (0,69-3,11)	0,324
Visok		33	17		9,00 (3,75-21,61)	< 0,001
Nizak	Arterijska tromboza	4	51	< 0,001	Referentna	
Srednji		28	111		3,22 (1,07-9,65)	0,037
Visok		27	17		20,25 (6,19-66,22)	< 0,001
Nizak	Venska tromboza	4	67	0,017	Referentna	
Srednji		13	85		2,56 (0,80-8,22)	0,114
Visok		9	27		5,58 (1,58-19,68)	0,007

P\* usporedba učestalosti bolesnika s trombozom i bez tromboze dobivena  $\chi^2$  testom

P\*\* vrijednost dobivena univarijatnom logističkom regresijom

Raspodjela ET bolesnika u rizične skupine za nastanak tromboze, te prema vrsti tromboze pomoću prediktivnih modela prikazana je u Tablici 72. Model za ET bolesnike s venskom trombozom nije značajno razlikovao bolesnike s venskom trombozom i bez tromboze pa stoga nije niti prikazan.

**Tablica 72.** Prediktivni model za nastanak tromboze i arterijske tromboze u ET bolesnika.

ET bolesnici						
Rizik	Vrsta tromboze	Bolesnici s trombozom, N	Bolesnici bez tromboze, N	P*	OR 95% CI	P**
Nizak	Arterijska + venska	1	13	< 0,001	Referentna	
Srednji		12	65		2,40 (0,29-20,10)	0,419
Visok		23	20		14,95 (1,79-124,60)	0,012
Nizak	Arterijska	1	13	< 0,001	Referentna	
Srednji		8	65		1,60 (0,18-13,91)	0,670
Visok		20	20		13,00 (1,55-108,99)	0,018

Za izradu prediktivnog modela nastanka tromboze u PV bolesnika najboljim se pokazao 1. model, dok je 2. model najbolje predviđao nastanak arterijske tromboze. Ukupan zbroj bodova i svrstavanje u rizične skupine bilo je jednako i u 1. i 2. modelu.

Raspodjela PV bolesnika u rizične skupine za nastanak tromboze, te prema vrsti tromboze pomoću prediktivnih modela prikazana je u Tablici 73. Za PV bolesnike s venskom trombozom niti jedan predloženi model nije se pokazao značajnim (rezultati nisu prikazani).

**Tablica 73.** Prediktivni model za nastanak tromboze i arterijske tromboze u PV bolesnika.

PV bolesnici						
Rizik	Vrsta tromboze	Bolesnici s trombozom, N	Bolesnici bez tromboze, N	P*	OR 95% CI	P**
Nizak	Arterijska + venska	3	9	< 0,001	Referentna	
Srednji		8	32		0,75 (0,16-3,43)	0,711
Visok		13	5		7,8 (1,48-41,21)	<b>0,016</b>
Nizak	Arterijska	3	19	< 0,001	Referentna	
Srednji		7	24		1,85 (0,42-8,12)	0,417
Visok		9	3		19,00 (3,19-113,35)	<b>0,031</b>

P\* usporedba učestalosti bolesnika s trombozom i bez tromboze dobivena  $\chi^2$  testom

P\*\* vrijednost dobivena univarijatnom logističkom regresijom

Raspodjela PMF bolesnika u rizične skupine za nastanak tromboze prema prediktivnom modelu prikazana je u Tablici 74.

**Tablica 74.** Prediktivni model za nastanak tromboze u PMF bolesnika.

PMF bolesnici						
Rizik	Vrsta tromboze	Bolesnici s trombozom, N	Bolesnici bez tromboze, N	P*	OR 95% CI	P**
Nizak	Arterijska + venska	/	/	<b>0,020</b>	/	
Srednji		10	30		Referentna	
Visok		9	5		5,40 (1,46-19,95)	<b>0,011</b>

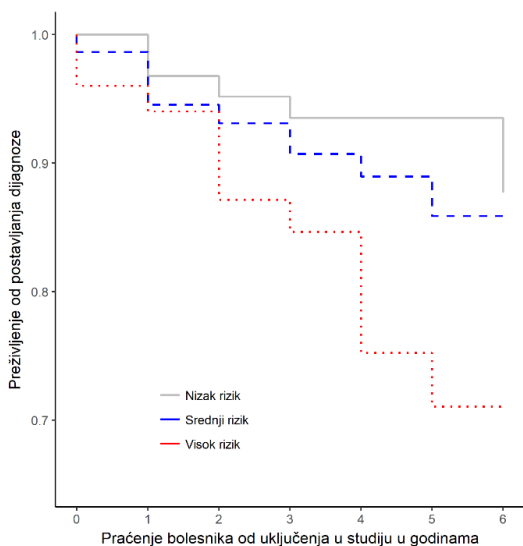
P\* usporedba učestalosti bolesnika s trombozom i bez tromboze dobivena  $\chi^2$  testom

P\*\* vrijednost dobivena univarijatnom logističkom regresijom

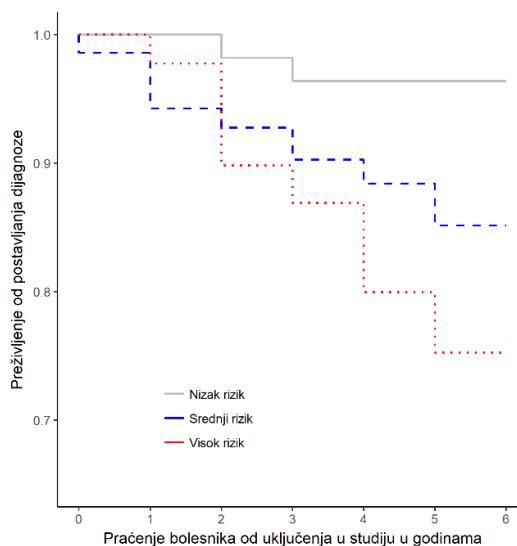
Potom smo izradili Kaplan-Meier prediktivne krivulje preživljenja bez tromboze prema izrađenim prediktivnim modelima za nastanak tromboze.

Kad su u 1. model bili uključeni svi Ph(-) MPN bolesnici, tromboza je nastupila u 12,3 % bolesnika s niskim rizikom, 14,1 % bolesnika sa srednjim rizikom i 29 % bolesnika s visokim rizikom za nastanak tromboze (Slika 41.).

Zatim smo podijelili Ph(-) MPN bolesnike prema vrsti tromboze te ih ponovno stratificirali u rizične skupine pomoću 1. prediktivnog modela. Za bolesnike s niskim rizikom arterijska tromboza je nastupila u 3,6 % bolesnika, za one srednjeg rizika u 14,9 % bolesnika te u 24,7 % bolesnika svrstanih u skupinu visokog rizika (Slika 42.).



**Slika 41.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez tromboze prema prediktivnom modelu za sve Ph(-) MPN bolesnike.



**Slika 42.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez arterijske tromboze prema prediktivnom modelu za Ph(-) MPN bolesnike.

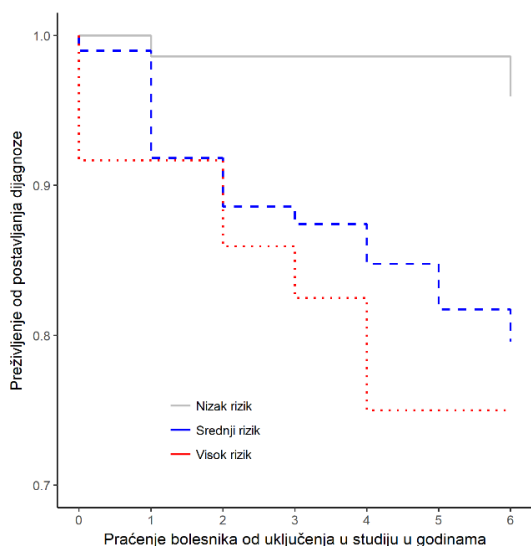
Nakon primjene 1. prognostičkog modela za nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika, tromboza je nastupila u 11,1 % bolesnika niskog rizika, 13,8 % bolesnika srednjeg rizika i 31,9 % bolesnika visokog rizika (Slika 43.).

Za predviđanje tromboze u ET bolesnika primjenili smo naš 3. prediktivni model pri čemu je tromboza nastala u 7,14 % bolesnika niskog rizika, nije bilo bolesnika koji su imali kriterije za srednji rizik, dok je u skupini visokog rizika 19,3 % bolesnika imalo trombozu (Slika 44.).

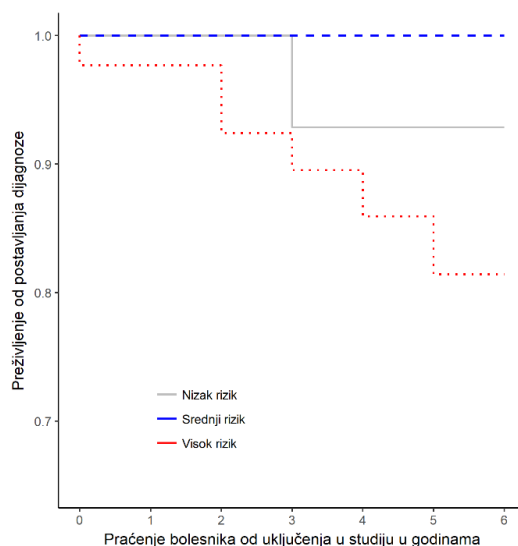
Prema istom modelu u ET bolesnika predvidjeli smo i nastanak arterijske tromboze. Pri tome je arterijska tromboza nastala u 7,14 % bolesnika niskog rizika, nije bilo bolesnika s



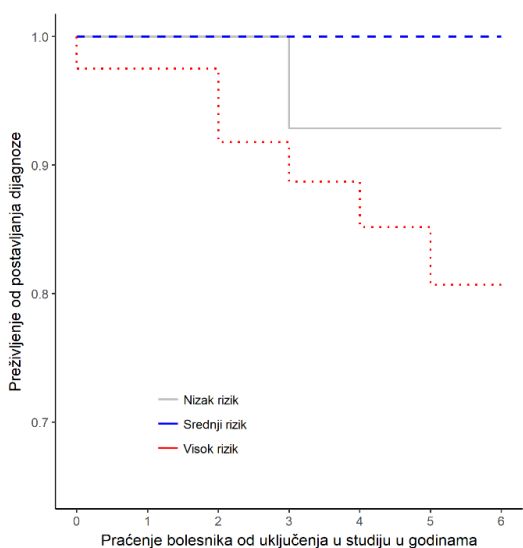
kriterijima za srednji rizik, a 21,1 % bolesnika svrstanih u skupinu visokog rizika imalo je trombozu (Slika 45.).



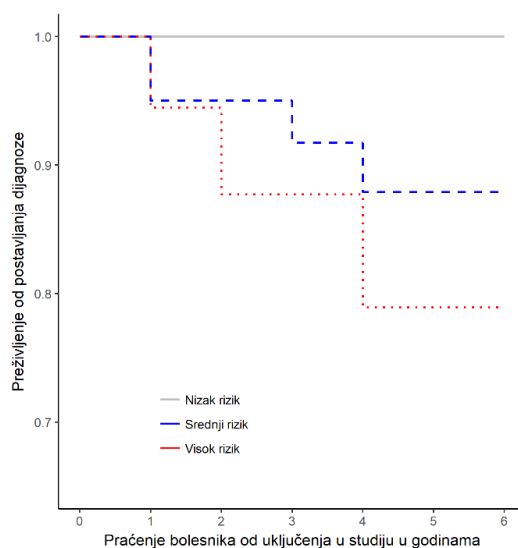
**Slika 43.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez venske tromboze prema prediktivnom modelu za Ph(-) MPN bolesnike.



**Slika 44.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez tromboze prema prediktivnom modelu za ET bolesnike.



**Slika 45.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez arterijske tromboze prema prediktivnom modelu za ET bolesnike.

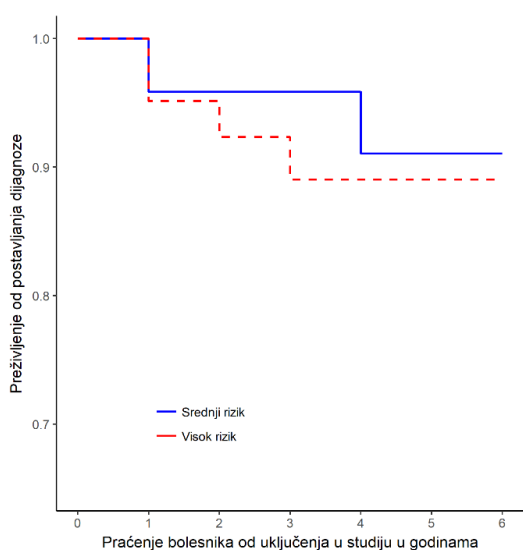


**Slika 46.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez tromboze prema prediktivnom modelu za PV bolesnike.

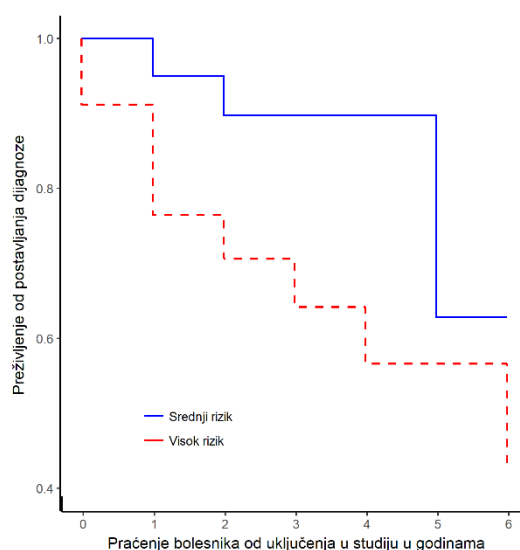
Prilikom svrstavanja PV bolesnika u rizične skupine koristili smo 1. model za nastanak tromboze općenito te 2. model za nastanak arterijske tromboze.

Pri tome nije bilo tromboze u bolesnika s niskim rizikom, dok je u skupini bolesnika sa srednjim rizikom tromboza nastala u 12,1 % bolesnika, te u 21,1 % bolesnika svrstanih u skupinu visokog rizika (Slika 46.).

Koristeći 2. prediktivni model za nastanak arterijske tromboze u PV bolesnika, nije bilo bolesnika s trombozom u niskoj rizičnoj skupini, dok je u skupini srednjeg rizika tromboza nastala u 9 % bolesnika, a visoko rizičnoj skupini je bilo 11 % bolesnika s trombozom (Slika 47.). U PMF skupini prema 4. prediktivnom modelu nije bilo bolesnika s niskim rizikom za trombozu, dok je u skupini srednjeg rizika tromboza nastala u 37,2 % bolesnika, a u skupini visokog rizika u 57,5 % bolesnika.



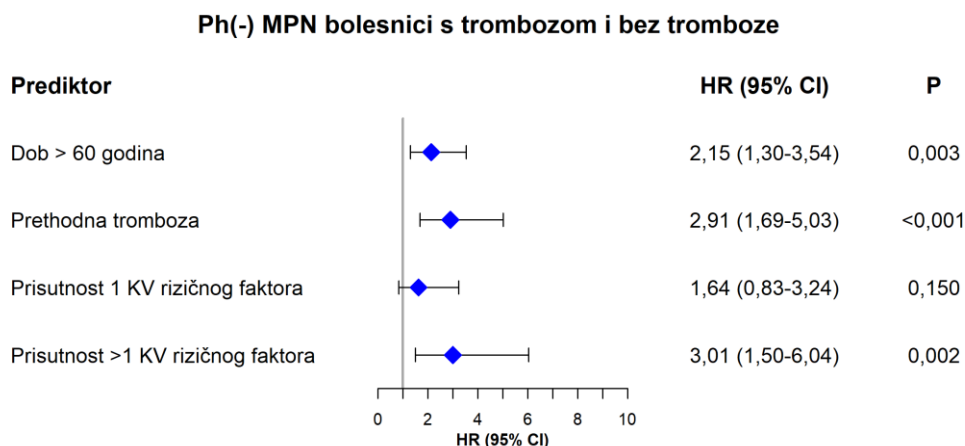
**Slika 47.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez arterijske tromboze prema prediktivnom modelu za PV bolesnike.



**Slika 48.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bez tromboze prema prediktivnom modelu za PMF bolesnike.

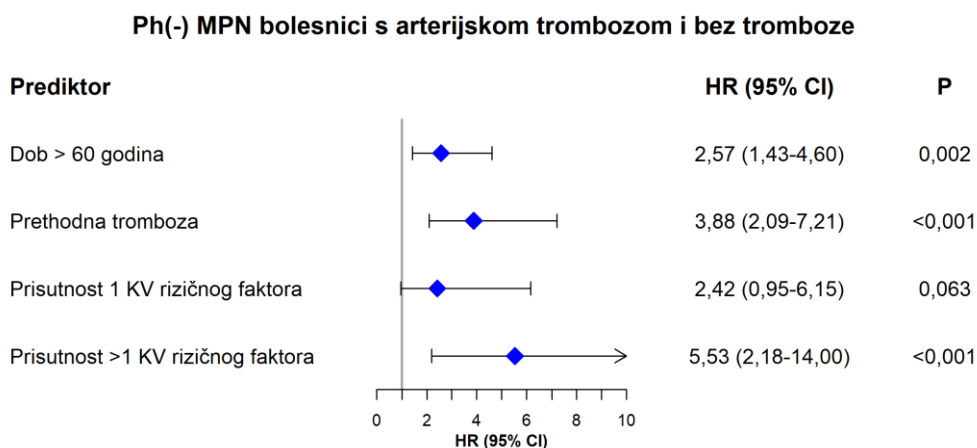
Dodatno smo Coxovom regresijskom analizom htjeli ispitati sve parametre koji su se pokazali značajnim prilikom izrade prediktivnih modela za nastanak tromboze kao i uvrštavanjem parametara koji su se u našem istraživanju pokazali značajno različitim između bolesnika s trombozom i bez tromboze. Rezultati su prikazani grafičkim prikazima uz dobivene vrijednosti omjera rizika (HR) te 95% intervale pouzdanosti.

Na Slici 49. prikazane su HR vrijednosti ispitanih parametara u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom i bez tromboze, pri čemu je dob > 60 godina povećavala rizik za nastanak tromboze 2,15 puta, prethodna tromboza 2,91 puta, a prisutnost > 1 KV rizičnog faktora 3,01 puta.



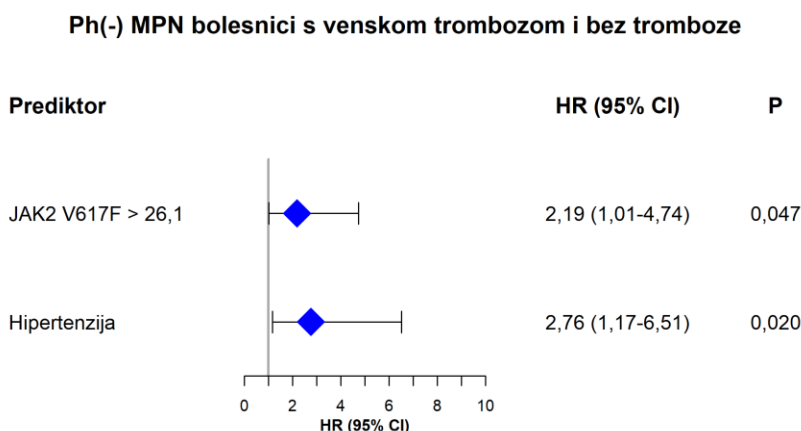
**Slika 49.** Grafički prikaz Forest plot za Ph(-) MPN bolesnike s trombozom i bez tromboze.

U Ph(-) MPN tri parametra značajno su povećavala rizik za nastanak arterijske tromboze. To su bili dob > 60 godina koja je povećavala rizik 2,57 puta, prethodna tromboza 3,88 puta i prisutnost > 1 KV rizičnog faktora 5,53 puta (Slika 50.).



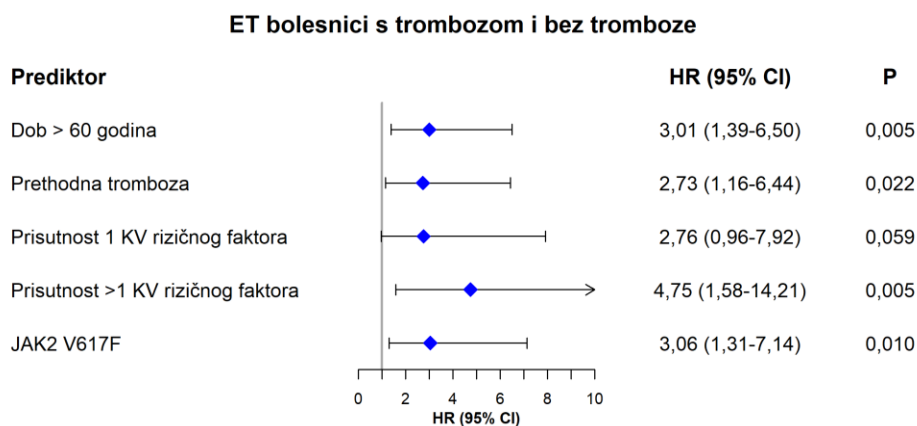
**Slika 50.** Grafički prikaz Forest plot za Ph(-) MPN bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Rizik za nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika bio je 2,19 puta veći u bolesnika s opterećenjem mutiranim alelom V617F > 26,1% te 2,76 puta u bolesnika koji su imali hipertenziju (Slika 51.).



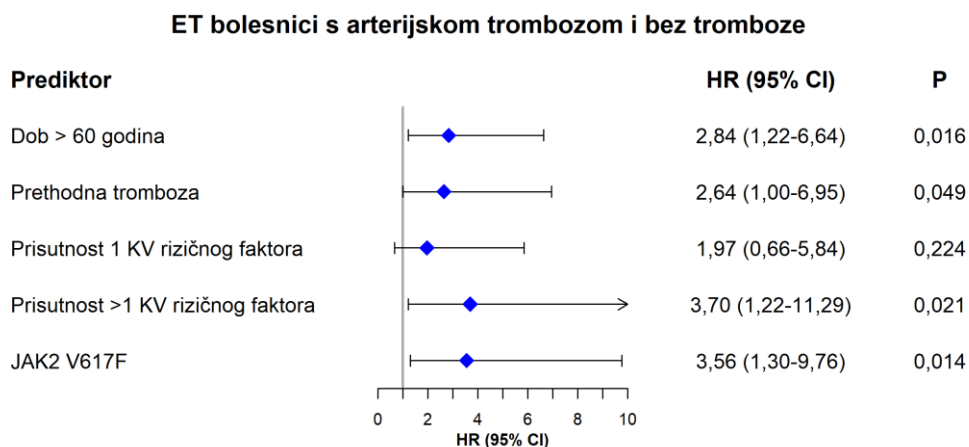
**Slika 51.** Grafički prikaz Forest plot za Ph(-) MPN bolesnike s venskom trombozom i bez tromboze.

Nakon podjele bolesnika prema dijagnozama, sljedeći parametri značajno su povećavali rizik za nastanak tromboze u ET bolesnika. To je bila dob > 60 godina uz 3,01 puta veći rizik, prethodna tromboza 2,73 puta veći rizik, prisutnost > 1 KV rizičnog faktora 4,75 puta veći rizik te prisutnost mutacije V617F koja je povećavala rizik za nastanak tromboze 3,06 puta (Slika 52.).



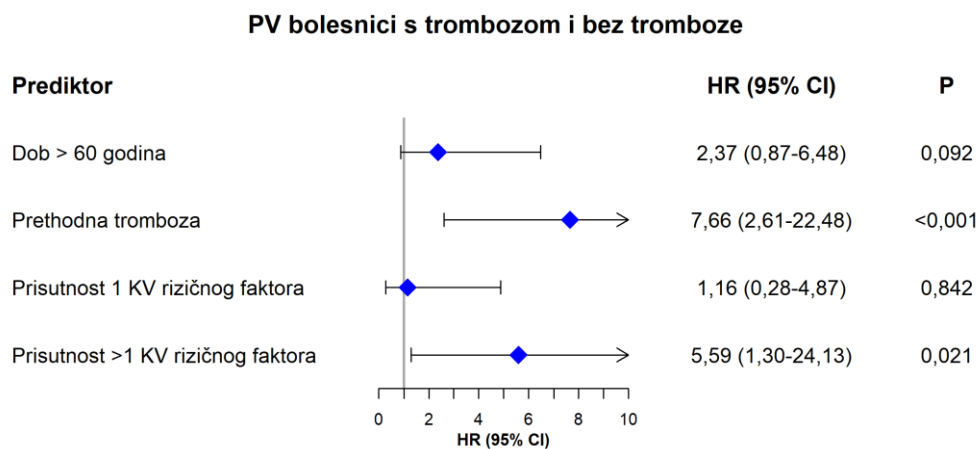
**Slika 52.** Grafički prikaz Forest plot za ET bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Isti parametri pokazali su se značajnim i za povećanje rizika za nastanak arterijske tromboze u ET bolesnika pri čemu je dob > 60 godina povećavala rizik 2,84 puta, prethodna tromboza 2,64 puta, prisutnost > 1 KV rizičnog faktora 3,70 puta, dok je prisutnost mutacije V617F povećavala rizik 3,56 puta (Slika 53.).



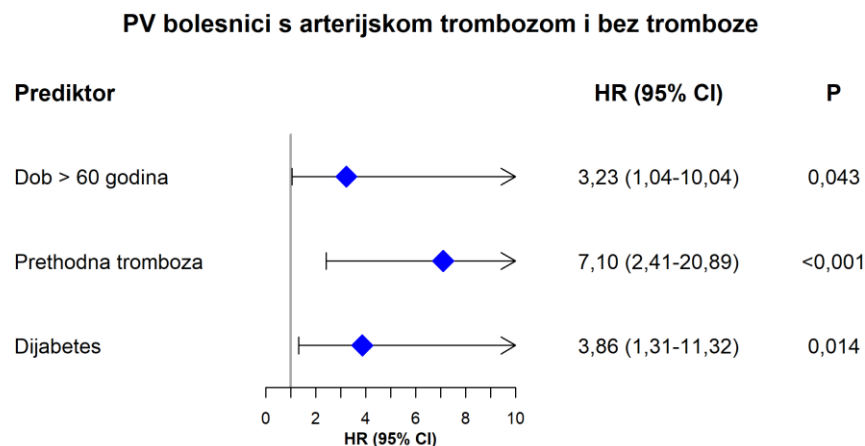
**Slika 53.** Grafički prikaz Forest plot za ET bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

Na Slici 54. vidimo da je u PV bolesnika prethodna tromboza povećavala za nastanak tromboze 7,66 puta, a prisutnost > 1 KV rizičnog faktora 5,59 puta.



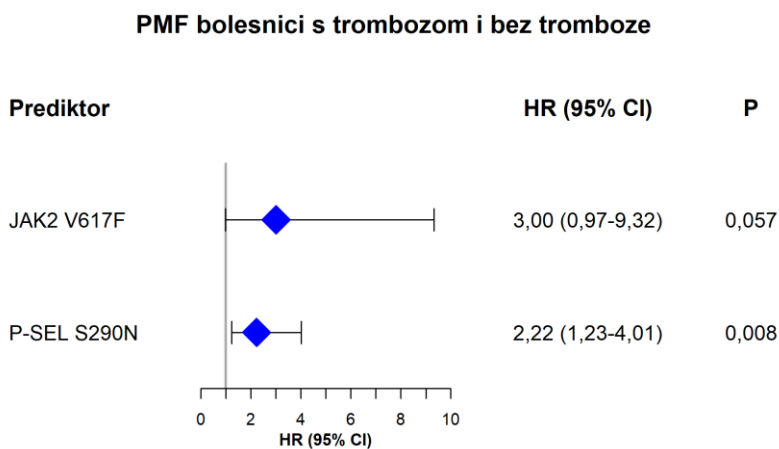
**Slika 54.** Grafički prikaz Forest plot za PV bolesnike s trombozom i bez tromboze.

Analizom PV bolesnika ustanovili smo da je dob > 60 godina povećala rizik za nastanak arterijske tromboze 3,23 puta, prethodna tromboza taj rizik povećala je 7,10 puta, dok su bolesnici s dijabetesom imali 3,86 puta veći rizik (Slika 55.).



**Slika 55.** Grafički prikaz Forest plot za PV bolesnike s arterijskom trombozom i bez tromboze.

U PMF bolesnika nositelji alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* imali su 2,22 puta veći rizik za nastanak tromboze (Slika 56).



**Slika 56.** Grafički prikaz Forest plot za PMF bolesnike s trombozom i bez tromboze.

## 6. RASPRAVA

Tromboza je najčešća komplikacija Ph(-) MPN s pojavnosću od 17-41 % što umanjuje kvalitetu života bolesnika, a u nekih završava trajnim invaliditetom ili čak smrću (37, 43, 46).

Iz tog razloga to je jedna od najistraživanijih komplikacija, međutim učestalost njenog istraživanja nije jednaka u svim skupinama Ph(-) MPN. Većina istraživanja bavila se trombozom u PV i ET bolesnika, dok postoji tek nekolicina istraživanja koja su analizirala pojavnost tromboze u PMF bolesnika. Ujedno, poznato je da arterijska i venska tromboza nemaju jednaku etiologiju, no nema puno istraživanja koja jasno razlučuju rizične faktore za nastanak arterijske u odnosu na vensku trombozu. Iz tog razloga smo u ovom istraživanju ispitali neke poznate faktore koje doprinose arterijskoj i/ili venskoj trombozi, ali i uključili neke nove dosad rijetko ispitivane parametre poput polimorfizama ljudskih trombocitnih antigena, P-selektina i P-selektin glikoprotein liganda 1 za koje je pokazano da možda doprinose trombozi u općoj populaciji.

Istraživanjem smo obuhvatili 258 Ph(-) MPN bolesnika i 258 zdravih kontrolnih ispitanika. Prema zadnje objavljenim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, incidencija Ph(-) mijeloproliferativnih zloćudnih tumora 2017. godine iznosila je 2,1 oboljelih na 100 000 ljudi (185). S obzirom na tako nisku učestalost ovih bolesti, broj bolesnika uključenih u ovo istraživanje je velik.

Genetički parametri uspoređeni su u bolesnika u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, te između skupine bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze. Na taj način provjerili smo postoje li razlike između bolesnika i zdrave kontrolne skupine, ali i mogućnost postojanja razlika u samoj skupini bolesnika koja u jednih doprinosi nastanku tromboze.

### 6.1. Učestalost i vrsta tromboze te vrijeme nastanka tromboze

Učestalost tromboze u našoj kohorti Ph(-) MPN bolesnika iznosila je 30,6 %, dok je prema dijagnozama bilo 26,9 % ET bolesnika s trombozom, 34,3 % PV bolesnika i 35,2 % PMF bolesnika. Slične rezultate za ET i PV bilježe i sve veće studije poput Barbui i sur. koji su predstavili i validirali IPSET prognostički model za nastanak tromboze na 891 ET bolesnika u

kojem su u 20 % bolesnika zabilježili trombozu prije postavljanja dijagnoze, dok je tijekom praćenja tromboza nastala u 12 % bolesnika (38), te rezultati dobiveni analizom njemačkog registra Ph(-) MPN bolesnika u kojem je 25 % ET bolesnika imalo trombozu (186). Talijanska grupa istraživača pratila je 20 godina 1213 PV bolesnika od kojih je 41 % bolesnika doživjelo trombozu, 27,0 % prije postavljanja dijagnoze i 19,0 % tijekom praćenja (43) što je vrlo slično rezultatima njemačkih istraživača koji su zabilježili 38,9 % PV bolesnika s trombozom (186). Velika studija koja je uključivala 707 PMF bolesnika zabilježila je 9,5 % bolesnika s trombozom prije postavljanja dijagnoze, te trombozu u 7,2 % bolesnika tijekom praćenja, iako se sami autori ograđuju od tako niske učestalosti tromboze s pretpostavkom da je to rezultat visoke smrtnosti bolesnika u njihovoj studiji, pri čemu je tijekom praćenja umrlo 33 % bolesnika (48). Studija rađena na 205 PMF bolesnika pokazala je malo višu učestalost tromboze prije i tijekom postavljanja dijagnoze (13,2 %) u odnosu na pojavu tromboze tijekom praćenja bolesti (10,7 %) uz naglasak na vrlo kratko vrijeme praćenja bolesnika od 2,6 godine (53). Za razliku od toga, istraživanje Buxhofer-Ausch i sur. rađeno na 264 PMF bolesnika u prefibrotičkoj fazi bolesti pokazalo je učestalost tromboze od 21,9 % prije postavljanja dijagnoze te u 20,8 % bolesnika s trombozom tijekom praćenja od 6,3 godine (46) dok je u njemačkom registru Ph(-) MPN bolesnika tromboza nastupila u 31,2 % PMF bolesnika (186). Učestalost tromboza u našoj skupini PMF bolesnika slična je onoj dobivenoj u studiji Buxhofer-Ausch te u njemačkom registru Ph(-) MPN bolesnika, a puno niža u odnosu na prve dvije studije. S obzirom da je prosječna starost bolesnika u prve dvije studije u prosjeku bila 62 godine, baš kao i u našoj kohorti PMF bolesnika te smo također zabilježili visoku stopu smrtnosti tijekom praćenja bolesnika od 38,9 %, smatramo da je ova razlika u broju tromboza nastala zbog tog što smo mi u istraživanje uključili i manje trombotičke događaje poput tromboflebitisa te stenoze arterija.

Analizirajući samo prospektivno uključene bolesnike s trombozom koja je nastala tijekom ili nakon uključanja u studiju, učestalost tromboze u naših Ph(-) MPN bolesnika iznosila je 4,5 % godišnje. Tromboza je bila najčešća u PV bolesnika pri čemu je nastala u 5,9 % bolesnika godišnje, zatim u 4,6 % bolesnika PMF godišnje te naposljetku u ET bolesnika s učestalošću 3,8 % bolesnika godišnje.

Godišnja učestalost tromboze u naših ET bolesnika bila je nešto veća nego u istraživanju Barbui i sur. koji bilježe učestalost između 1,03-3,56 % godišnje ovisno o tome je li bolesnici pripadaju niskoj ili visokoj rizičnoj skupini za nastanak tromboze (38). Veću učestalost tromboze



u našoj skupini ET bolesnika objašnjavamo time što su Barbui i sur. u svom istraživanju uključivali samo velike trombotičke događaje dok su u našoj studiji bili uključeni i manji događaji poput okluzija arterija i površinskog tromboflebitisa.

I naši PV bolesnici imali su nešto veću godišnju učestalost tromboze u odnosu na 1213 PV bolesnika uključenih u studiju u kojoj je dobivena prosječna učestalost od 3,4 % bolesnika godišnje ili 1,8-5,1 % bolesnika godišnje u ovisnosti o dobnoj skupini kojoj pripadaju (43). Međutim, u toj studiji bolesnici su bili mlađi u odnosu na naše PV bolesnike što umanjuje i rizik za nastanak tromboze.

Godišnja učestalost trombotičkih događaja u naših PMF bolesnika bila je viša u odnosu na procijenjenu učestalost od 2,2 % u studiji Barbui i sur. (48) koji nisu uključivali površinske tromboflebitise a puno niža u odnosu na 13,8 % bolesnika godišnje dobivenih u studiji Brodmann i sur. u koju je uključen mali broj bolesnika koji su relativno kratko praćeni (187).

Prema vrsti tromboze, arterijska tromboza nastaje češće od venske u ET (38, 41) i PV bolesnika (42, 43) dok u PMF bolesnika postoje različiti rezultati, pri čemu neki istraživači bilježe gotovo jednak omjer (48) dok drugi bilježe više venskih tromboza i postavljaju sumnju da su to uglavnom tromboze izazvane vanjskim faktorima (53). U našem istraživanju je u otprilike dvije trećine PV i ET bolesnika nastala arterijska tromboza dok je u PMF bolesnika nastalo gotovo podjednako arterijskih i venskih tromboza. Vrste nastalih tromboza koje smo zabilježili uobičajene su za Ph(-) MPN pri čemu su od arterijskih tromboza prevladavali ishemijski moždani udar i infarkt miokarda te prolazni ishemijski napadaj, dok su najčešći venski događaji bile duboke venske tromboze ekstremiteta, plućna embolija i duboka venska tromboza abdominalnih vena.

Većina trombotičkih događaja okidač su za postavljanje sumnje na dijagnozu Ph(-) MPN poput Budd Chiari sindroma i ostalih abdominalnih tromboza koje se pojavljuju u 20,0-40,9 % nedijagnosticiranih Ph(-) MPN bolesnika (186, 188). Najveća incidencija tromboze u trenutku postavljanja dijagnoze zabilježena je također i u radu koji se bavio analizom švedskog registra Ph(-) MPN u kojem je tada bilo 9429 bolesnika praćenih 20 godina (64). Naši rezultati slažu se s postojećim saznanjima o nastanku tromboze malo prije ili unutar iste godine (43, 189) od postavljanja dijagnoze u PV i ET bolesnika. Međutim, u našoj skupini PMF bolesnika pronašli smo veću učestalost tromboze nakon postavljanja dijagnoze što je zabilježeno i u istraživanju Cervantesa i sur. (47). Ovaj rezultat upućuje na inicijalnu potrebu za stvaranjem modela ne samo za procjenu preživljenja PMF bolesnika poput DIPSS modela (190, 191) koji uključuje dob,

konstitucijske simptome, koncentraciju hemoglobina, broj leukocita i blasta u perifernoj krvi već i modela za procjenu trombotičkog rizika što bi uz odgovarajuću terapiju moglo doprinijeti dužem preživljenju visokorizičnih bolesnika.

## **6.2. Spol**

Poznato je da žene češće obolijevaju od ET (20, 186, 189), dok je za PV bolesnike razlika u učestalosti muškog i ženskog spola vrlo mala (33, 42, 43). Većina oboljelih od PMF je muškog spola (48, 53). U našem istraživanju pokazalo se da postoji značajno više žena (59,7 vs. 40,3 %) u skupini Ph(-) MPN, te je isto dobiveno i za skupinu ET bolesnika (70,1 vs. 29,9 %). Visoka učestalost žena u našoj kohorti Ph(-) MPN bolesnika može se objasniti ukupnim brojem ET bolesnika koji su bili najzastupljeniji (51,9 %) a među kojima prevladavaju žene. Također je među našim PV bolesnicima bilo malo više žena (51,4 vs. 48,6 %) kao i u skupini PMF bolesnika (55,6 vs. 44,4 %) međutim ove razlike nisu bile statistički značajno različite.

Obzirom na rezultate jedne studije u koju su bili uključeni ET bolesnici te je dokazana povezanost muškog spola s 1,99 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze (41), u našem smo istraživanju bolesnike s trombozom podijelili prema vrsti tromboze, spolu i prema dijagnozi. Međutim, nismo pronašli razliku u učestalosti tromboze između muškaraca i žena u cijeloj skupini Ph(-) MPN kao niti nakon podjele prema dijagnozama.

## **6.3. Dob**

Dob je jedan od glavnih faktora koji povećava rizik za nastanak tromboze. To je potvrđeno u velikim kohortama ET i PV bolesnika pri čemu je dob iznad 60 godina rizičan faktor za nastanak tromboze u ET bolesnika (38).

Za PV bolesnike prema nekim autorima dob od 65 godina predstavlja rizičan faktor (42) za trombozu dok noviji podaci ukazuju i da dob iznad 60 godina svrstava bolesnike u skupinu visokog rizika za trombozu (40).

Prema dosadašnjim saznanjima, samo je jedno istraživanje na PMF bolesnicima pokazalo povezanost dobi iznad 60 godina sa 2,34 puta većim rizikom za nastanak tromboze (48), dok u ostalim istraživanjima takva povezanost nije nađena (53, 66, 192). Dob bolesnika iznad 65 godina povezana je s nižim preživljenjem u PMF bolesnika (190).

Ono što primjećujemo kao ograničenje dosadašnjih istraživanja je da trombotički model za ET i PV bolesnike ne razlikuje rizik za arterijsku od venske tromboze što bi za bolesnike s visokim rizikom moglo pomoći u boljem optimiranju preventivne terapije dok za PMF takav model niti ne postoji.

Iz tog razloga smo u našem istraživanju dob ispitivali zasebno u svakoj skupini bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze i prilikom nastanka tromboze te u ovisnosti o vrsti nastale tromboze.

Potvrdili smo već poznata saznanja da su Ph(-) MPN bolesnici s trombozom prilikom postavljanja dijagnoze bili statistički značajno stariji u odnosu na bolesnike bez tromboze (63 vs. 57 godina), a nakon podjele na vrste tromboze ustanovljena je statistički značajna razlika u dobi bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze (65 vs. 57 godina). Međutim, uvrštavanjem dobi u multivarijatnu logističku regresiju gubi se povezanost razlike u dobi pri dijagnozi s nastankom tromboze kao i nastankom arterijske tromboze.

U našoj skupini ET bolesnika s trombozom također je utvrđena značajna razlika dobi pri dijagnozi u odnosu na ET bolesnike bez tromboze (65 vs. 52 godine) kao i kod ET bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na ET bolesnike bez tromboze (65 vs. 52 godine), no multivarijantna regresijska analiza nije potvrdila ovu povezanost.

Analizom granične vrijednosti dobi koja doprinosi nastanku tromboze pronašli smo povezanost dobi > 55 godina s 2,59 puta većim rizikom za nastanak arterijske tromboze u skupini Ph(-) MPN bolesnika. Podjelom prema dijagnozama u ET bolesnika je otkrivena povezanost dobi > 55 godina s 4,56 puta većim rizikom za nastanak arterijske tromboze te dobi > 54 godine s 5,56 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze.

Istraživanja su pokazala da postoji razlika u dobi između muških i ženskih Ph(-) MPN bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze pri čemu su žene bile mlađe (189, 193), međutim u našoj kohorti ispitanika nije bilo razlike (59 vs. 60 godina). Mi smo ustanovili da postoji značajna razlika u dobi prilikom nastanka prve tromboze te su muškarci u prosjeku bili 8 godina mlađi u trenutku

nastanka prve tromboze u odnosu žene (56 vs. 64 godine). Ovo saznanje vjerojatno je povezano s rezultatima istraživanja u ET bolesnika koje je našlo povezanost muškog spola i kraćeg preživljenja (194) te otvara nova pitanja za neko buduće istraživanje o mogućem utjecaju kombinacije spol / dob na pojavu tromboze za svaku od dijagnoza u Ph(-) MPN.

#### **6.4. Prethodna tromboza**

U nekoliko istraživanja potvrđeno je da prethodna tromboza značajno doprinosi nastanku ponavljajuće tromboze (38, 53, 67). U našoj kohorti bilo je 25,3 % Ph(-) MPN bolesnika s ponavljajućom trombozom. Učestalost ponavljajuće tromboze bila je najviša u PV bolesnika (29,2 %), dok ih je najmanje bilo u skupini ET bolesnika (22,2 %). U PMF učestalost ponavljajuće tromboze bolesnika bila je slična učestalosti u PV i ET bolesnika i iznosila je 26,3 %. Prethodna tromboza značajno je povećavala rizik za nastanak nove tromboze samo u skupini Ph(-)MPN i ET bolesnika koje su ujedno bile i najveće ispitane skupine. Obzirom da smo za sve skupine dobili sličnu učestalost ponavljajuće tromboze, pretpostavljamo da je razlog zašto u naših PV i PMF bolesnika s trombozom nije potvrđena povezanost s nastankom ponavljajuće tromboze, premali mali broj bolesnika da bi se pronašla značajna razlika.

#### **6.5. Kaplan-Meier krivulje preživljenja bolesnika ovisno o nastanku tromboze**

Napravili smo analizu preživljenja bolesnika kroz prospektivni period praćenja od 6,16 godina ovisno o tome jesu li u tom periodu doživjeli trombozu. Očekivano, u cijeloj kohorti Ph(-) MPN bolesnika, preživjelo je 87,8 % bolesnika bez tromboze u odnosu na 72,3 % bolesnika s trombozom.

Nakon podjele bolesnika prema dijagnozama, ET bolesnici živjeli su najduže, pri čemu je taj period preživjelo 97,9 % bolesnika bez tromboze te 80,4 % bolesnika s trombozom.

Za PV bolesnike dobili smo iznenađujući rezultat, pri čemu je tijekom 6,16 godina praćenja preživjelo 89,4 % bolesnika s trombozom u odnosu na preživljenje 87,3 % bolesnika bez tromboze.

Smatramo da je tome vjerojatno doprinijelo češće praćenje i intenzivnija terapija PV bolesnika s trombozom kao i s ponavljajućim trombozama (u PV skupini najviše bolesnika je imalo ponavljajuće tromboze u odnosu na ostale dijagnoze) što u konačnici umanjuje rizik za nastanak nove tromboze te smrtni ishod u ovih bolesnika.

PMF bolesnici imali su najmanju stopu preživljenja, najčešće zbog progresije bolesti i komplikacija prilikom i /ili nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Međutim, iz naših rezultata vidljivo je da je dužina preživljenja ovisila i o nastanku tromboze, pri čemu je 6,16 godina praćenja preživjelo 57,6 % bolesnika bez tromboze u odnosu na samo 32,1 % bolesnika s trombozom.

## **6.6. Terapija Ph(-) MPN bolesnika**

U bolesnika koji su prospektivno dijagnosticirani i koji su uključeni u studiju od trenutka postavljanja dijagnoze do kraja studije, bilježili smo terapiju, te ju usporedili u bolesnika s trombozom i bez tromboze.

Ph(-) MPN bolesnici s trombozom smatrani su visokorizičnima za nastanak nove tromboze te su koristili standardnu antikoagulacijsku terapiju, inhibitore trombocita i aktiviranog faktora X dok su bolesnici s venskom trombozom uzimali istu terapiju no uz to su češće uzimali i antiagregacijsku terapiju. ET bolesnici s trombozom uzimali su antikoagulacijsku terapiju dok su oni s arterijskom trombozom još uzimali i citoreduktivnu terapiju. Značajno više PV bolesnika s trombozom kao i onih s venskom trombozom uzimalo je antikoagulacijsku terapiju. U PMF bolesnika nismo pronašli razlike u terapiji između bolesnika s trombozom i bez tromboze.

## **6.7. Parametri krvne slike**

Krvna slika jedna je od osnovnih pretraga u algoritmu dijagnosticiranja svih Ph(-) MPN bolesnika. Iz tog razloga parametri krvne slike predmetom su mnogih istraživanja, te je pokazano da stanice hematopoeze uz to što proliferiraju, mijenjaju i svoja kvalitativna svojstva (80–83). Osim toga, leukociti (neutrofili) aktiviraju trombocite što u konačnici dovodi do oštećenja endotela, dok

povišena vrijednost hematokrita doprinosi većoj viskoznosti i smanjenom protoku krvi te se na taj način stvara idealan milje za nastanak tromboze.

Analizom parametara krvne slike u naših Ph(-) MPN bolesnika utvrdili smo da su bolesnici s trombozom imali više leukocite u odnosu na bolesnike bez tromboze (10,5 vs. 9,5 x10<sup>9</sup>/L) a isto je dobiveno i za bolesnike s arterijskom trombozom, no unošenjem tih parametara u model multivarijantne logističke regresije gubi se značajna razlika u broju leukocita.

U skupini Ph(-) MPN bolesnika s venskom trombozom dobivene su niže vrijednosti trombocita (447 vs. 571 x10<sup>9</sup>/L) te niža koncentracija hemoglobina (133 vs. 144 g/L) u odnosu na bolesnike bez tromboze pri čemu samo koncentracija hemoglobina ostaje značajno različita u multivarijantnoj analizi. Ovakav rezultat u cijeloj skupini Ph(-) MPN bolesnika s venskom trombozom povezujemo s doprinosom PMF bolesnika koji su imali najvišu učestalost venske tromboze, uz medijan vrijednosti trombocita 333 x10<sup>9</sup>/L i nisku koncentraciju hemoglobina od 109g/L. Ovi rezultati potvrđuju rezultate Buxhofer-Ausch i sur. (46) koji su pokazali da u PMF bolesnika u prefibrotičkoj fazi bolesti niže vrijednosti trombocita pri dijagnozi povećavaju rizik za nastanak arterijske tromboze, dok niža koncentracija hemoglobina povećava rizik za nastanak venske tromboze.

Nedavno objavljena meta-analiza koja je uključila više od 30 000 bolesnika s ET i PV potvrdila je povezanost leukocitoze i nastanka arterijske tromboze. U ET bolesnika rizik je bio povećan 1,65 puta a u PV bolesnika 1,34 puta. U istoj meta-analizi nije nađena povezanost leukocitoze i venske tromboze (65). Međutim, postoje i oprečni rezultati poput istraživanja u ET bolesnika Campbell i sur., koje nije bilo uključeno u prethodnu meta-analizu, a u kojem nije utvrđena povezanost leukocitoze, broja trombocita i koncentracije hemoglobina pri dijagnozi i rizika za nastanak tromboze u budućnosti (72).

U naših ET bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze pronašli smo više leukocite pri dijagnozi (10,2 vs. 8,5 x10<sup>9</sup>/L), a isto je otkriveno i u skupini bolesnika s arterijskom trombozom (10,6 vs. 8,5 x10<sup>9</sup>/L). Multivarijantnom analizom potvrdili smo povezanost leukocita i nastanka tromboze kao i arterijske tromboze. Ovakve rezultate potvrđuje i rad Buxhofer-Ausch i sur. koji su u ET bolesnika našli povezanost leukocitoze pri dijagnozi s nastankom tromboze (66). Naši ET bolesnici s arterijskom trombozom imali su i više vrijednosti trombocita pri dijagnozi (700 vs. 617 x10<sup>9</sup>/L) u odnosu na bolesnike bez tromboze no ta razlika se tijekom multivarijantne analize izgubila. To je u suprotnosti s rezultatima istraživanja Schwarz i sur. u kojem su ET

bolesnici s trombozom uspoređivani s ET bolesnicima bez tromboze te su imali niže trombocite pri dijagnozi dok su im neposredno prije trombotičkog događaja trombociti bili viši (195). Objašnjenje razlike u ovim rezultatima vidimo u tome što se u našoj ET skupini većina tromboza dogodila neposredno prije postavljanja dijagnoze, dok u je istraživanju Schwarz i sur. zabilježeno 68,7 % tromboza prije uključivanja u studiju te samo 31,3 % tijekom praćenja bolesnika.

Od interesa nam je bilo analizirati granične vrijednosti parametara krvne slike u naših Ph(-) MPN bolesnika podijeljenih prema dijagnozi i prema pojavi i vrsti nastale tromboze. Pri tome smo za ET bolesnike ustanovili da broj leukocita  $> 9,2 \times 10^9/L$  povećava rizik za nastanak arterijske tromboze 6,14 puta. Osim toga, pronašli smo povezanost broja eritrocita  $> 5,48 \times 10^{12}/L$  i broja trombocita  $> 632 \times 10^9/L$  s povećanim rizikom za nastanak arterijske tromboze. Broj trombocita  $\leq 536 \times 10^9/L$  i vrijednosti hematokrita  $> 0,45 L/L$  povećavali su rizik za nastanak venske tromboze. U istraživanju Carobbio i sur. na 891 ET bolesnika pokazano je da broj leukocita  $> 11,0 \times 10^9/L$  povećava rizik za nastanak arterijske tromboze 1,7 puta (41) što potvrđuje činjenicu da leukocitoza pri dijagnozi doprinosi nastanku tromboze. Istraživanje Schwarz i sur. u ET bolesnika, nije dijelilo bolesnike prema arterijskoj i venskoj trombozi prije postavljanja dijagnoze te tijekom praćenja, međutim zabilježili su u bolesnika s trombozom više vrijednosti hematokrita i koncentracije hemoglobina (195). Za istaknuti je i rad Carobbio i sur. u koji je bilo uključeno 1063 ET bolesnika pri čemu su pokazali da kombinacija leukocitoze  $> 11 \times 10^9/L$  i umjerene trombocitoze (trombociti  $> 650 \times 10^9/L$  i  $< 1000 \times 10^9/L$ ) zajedno s mutacijom V617F u genu *JAK2* značajno povisuju rizik za nastanak tromboze (196). Barbui i sur. razvili su IPSET model za procjenu rizika nastanka tromboze na 891 ET bolesnika, prilikom kojeg su otkrili povezanost leukocitoze i nastanka arterijske tromboze, međutim leukocitozu nisu uvrstili u IPSET model bodovanja smatrajući da je nezgodno napraviti zaseban model za arterijsku te vensku trombozu te su odlučili u svoj prognostički model uvrštavati samo parametre koji su povezani s nastankom obje vrste tromboze (38). Obzirom da očigledno postoji razlika u parametrima krvne slike između ET bolesnika s arterijskom u odnosu na vensku trombozu smatramo da bi buduća istraživanja trebala ići u smjeru izrade zasebnih prediktivnih modela za svaku vrstu tromboze.

Prilikom usporedbe vrijednosti parametara krvne slike PV bolesnika s trombozom i bez tromboze nismo našli razliku izuzev koncentracije hemoglobina u bolesnika s venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze (156 vs. 172 g/L) uz graničnu statističku značajnost ( $P = 0,058$ ). Ovaj rezultat vjerojatno je usporediv s rezultatima studije u PMF bolesnika

koje su ukazale na to da niža koncentracija hemoglobina pri dijagnozi doprinosi nastanku venske tromboze (46). Ispitivanjem graničnih vrijednosti u naših PV bolesnika nađena je povezanost broja leukocita  $> 18 \times 10^9/L$  s 7,86 puta većim rizikom za nastanak arterijske tromboze, dok je koncentracija hemoglobina  $\leq 159 \text{ g/L}$  bila povezana s 5,30 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze. Nismo našli povezanost broja trombocita s trombozom. Naši rezultati su na tragu velike studije Di Nisio i sur. na 1638 PV bolesnika u kojoj je nađena povezanost vrijednosti hematokrita  $\leq 0,45 \text{ L/L}$  s nastankom tromboze prije postavljanja dijagnoze, dok povezanost s brojem trombocita nije nađena (61). U istoj kohorti PV bolesnika Landolfi i sur. pronašli su povezanost leukocita  $> 15 \times 10^9/L$  s 1,71 puta većim rizikom za nastanak arterijske tromboze (197).

Moguća povezanost leukocitoze i nastanka tromboze u PMF bolesnika ispitivana je u nekoliko istraživanja. Barbui i sur. ustanovili da ne postoji povezanost broja leukocita  $> 15 \times 10^9/L$  s nastankom tromboze ali uz P vrijednost koja je blizu granične vrijednosti statističke značajnosti ( $P = 0,060$ ), dok s brojem trombocita povezanost nije pronađena (48). To je na tragu rezultata Buxhofer-Ausch i sur. koji su utvrdili da postoji povezanost leukocitoze pri dijagnozi i povećanog rizika za nastanak tromboze tijekom praćenja u bolesnika u prefibrotičkoj fazi PMF (66). Za razliku od tih rezultata, u našoj kohorti PMF bolesnika nije bilo razlike u parametrima krvne slike za PMF bolesnike s trombozom u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze, moguće zbog malog broja ispitanika.

## **6.8. Karadiovaskularni rizični faktori**

U novije vrijeme prepoznata je povezanost kardiovaskularnih rizičnih faktora s nastankom tromboze te se oni sve češće istražuju u Ph(-) MPN bolesnika.

U našoj kohorti Ph(-) MPN bolesnika postojala je značajna razlika u učestalosti hipertenzije (73,4 vs. 49,7 %) i hiperlipidemije (30,4 vs. 11,2 %) između bolesnika s trombozom i bez tromboze dok je u multivarijantnoj analizi samo hiperlipidemija ostala povezana s nastankom tromboze. Ujedno je čak 83,5 % bolesnika s trombozom imalo pozitivan jedan ili više kardiovaskularnih rizičnih faktora u odnosu na njihovu prisutnost u 60,9 % bolesnika bez tromboze. Međutim, nakon podjele na arterijsku i vensku trombozu, hipertenzija, hiperlipidemija i prisutnost barem jednog KV rizičnog faktora ostaju značajno različiti samo između bolesnika s



arterijskom trombozom u odnosu bolesnike bez tromboze, dok je multivarijantnom analizom potvrđena samo povezanost hiperlipidemije i nastanka tromboze.

Utjecaj KV rizičnih faktora na nastanak tromboze u ET bolesnika bio je uvršten u IPSET model iz 2012. u kojem je ustanovljeno da hipertenzija, šećerna bolest i pušenje povećavaju rizik za nastanak tromboze 1,6 puta (38). Carobbio i sur. su u toj istoj kohorti od 891 ET bolesnika pronašli poveznost KV rizičnih faktora samo sa arterijskom trombozom (povećavaju rizik 1,91 puta), dok povezanost s venskom trombozom nije pronađena (41). Međutim, u revidiranim IPSET smjernicama iz 2015. testiranim na 1019 ET bolesnika KV rizični faktori nisu značajno doprinosili trombozi te su isključeni iz ovog modela (39). Leković i sur. u svom radu istraživali su važnost KV rizičnih faktora (hipertenzija, šećerna bolest, pušenje, hiperlipidemija) u 244 ET bolesnika i predložili CARDIO-ET prognostički model koji razvrstava bolesnike u niski, srednji i visoki rizik za nastanak tromboze. Isti autori ustanovili su povezanost hipertenzije, hiperlipidemije i prisutnost barem jednog KV rizičnog faktora s arterijskom trombozom, dok je od svih ispitanih KV rizičnih faktora jedino hiperlipidemija bila povezana s povećanim rizikom za nastanak venske tromboze (198). Važnost doprinosa KV rizičnih faktora u nastanku tromboze potkrepljuje i najnovije istraživanje objavljeno 2020. godine na 403 ET i PV bolesnika pri čemu su bolesnici bez prisutnih KV rizičnih faktora imali manje tromboza u odnosu na bolesnike s jednim KV rizičnim faktorom, dok su bolesnici s više prisutnih KV rizičnih faktora doživjeli najviše tromboza (199).

Kod naših ET bolesnika pronašli smo povezanost hipertenzije, hiperlipidemije i prisutnosti barem jednog KV rizičnog faktora s nastankom tromboze pri čemu je u multivarijantnoj analizi ostala značajna samo povezanost hiperlipidemije s nastankom tromboze. Isti KV rizični faktori bili su povezani i s nastankom arterijske tromboze te se izradom multivarijantne analize ponovno hiperlipidemija jedina pokazala statistički značajno povezana s nastankom tromboze. Pušenje i šećerna bolest u našoj studiji nisu doprinosili nastanku tromboze. Ujedno, otkrili smo da su svi naši ET bolesnici s venskom trombozom imali hipertenziju što je prema dostupnim podacima prvo istraživanje koje ukazuje na ovu povezanost, međutim u multivarijantnoj analizi se ta značajnost izgubila. Ispitivanjem KV rizičnih faktora u našoj kohorti PV bolesnika pronašli smo povezanost šećerne bolesti s povećanim rizikom za nastanak tromboze, što je potvrđeno multivarijantnom regresijskom analizom. Podjelom na vrste tromboze, šećerna bolest uz prisutnost barem jednog KV rizičnog faktora ostala je povezana s nastankom arterijske tromboze, a hipertenzija je pokazala trend prema toj povezanosti ( $P = 0,067$ ), no u multivarijantnoj analizi se gubi značajnost za sve te

parametre. U PV bolesnika s venskom trombozom niti jedan KV faktor nije bio značajno različit. Povezanost šećerne bolesti i arterijske tromboze pronađena je i u istraživanju Cerquozzi i sur. u 587 PV bolesnika pri čemu je otkrivena još i povezanost hipertenzije i hiperlipidemije s arterijskom trombozom dok, isto kao i u našem istraživanju, nije nađena povezanost KV rizičnih faktora i venske tromboze (67). U velikoj kohorti od 1638 PV bolesnika, pušenje se pokazalo kao jedini statistički značajan KV faktor koji povećava rizik za nastanak arterijske tromboze (197).

Prema dosadašnjim saznanjima, nema puno objavljenih istraživanja o utjecaju KV rizičnih faktora na nastanak tromboze u PMF bolesnika. U najvećoj objavljenoj studiji u koju je bilo uključeno 707 bolesnika povezanost s KV rizičnim faktorima (hipertenzija, šećerna bolest, pušenje) nije pronađena (48). Mi smo pronašli povezanost arterijske tromboze s hiperlipidemijom te s prisutnošću barem jednog KV rizičnog faktora, no ta se povezanost nakon multivarijantne regresijske analize izgubila. Zanimljivo je otkriće da su svi naši bolesnici s arterijskom trombozom imali prisutan najmanje jedan KV rizičan faktor. Iako je naša kohorta PMF bolesnika bila relativno mala, naši rezultati upućuju na potrebu za potvrdom povezanosti hiperlipidemije i arterijske tromboze na većem broju bolesnika te da su KV rizični faktori izuzeno bitni prilikom procjene trombotičkog rizika i u PMF bolesnika.

## **6.9. Mutacija V617F u genu *JAK2* i opterećenje mutiranim alelom V617F**

Obzirom da je mutacija V617F u genu *JAK2* bila prvi molekularni biljeg u Ph(-) MPN bolestima ona je kvalitativno i kvantitativno najistraživanija mutacija u ovih bolesnika. Pokazano je da je prosječna vrijednost opterećenja mutiranim alelom V617F najviša u PV bolesnika, potom u PMF bolesnika a najniža u ET bolesnika, ali i da postoje male razlike i prema dobi i spolu (17, 189, 200). Temeljem mnogih istraživanja potvrđeno je da njena prisutnost doprinosi nastanku tromboze u PV, ET i PMF bolesnika. Meta-analiza u ET bolesnika našla je povezanost ove mutacije s 1,83 puta većim rizikom za nastanak tromboze (54) te je uključena u IPSET prognostički model za nastanak tromboze (38).

Mi smo utvrdili njenu povezanost s 1,99 puta većim rizikom za nastanak tromboze u skupini svih Ph(-) MPN bolesnika kao i 2,63 puta veći rizik u skupini ET bolesnika. U skupini ET bolesnika s trombozom i nakon multivarijantne analize mutacija je povećavala rizik za nastanak tromboze 2,98 puta. Podjelom na vrste tromboze, također je nađena njena povezanost za skupinu

Ph(-) MPN bolesnika i ET bolesnika s nastankom arterijske tromboze, međutim nakon izrade multivarijantne analize značajnost se izgubila.

Istraživanja su pokazala da opterećenje mutiranim alelom V617F daje pregledniju informaciju od kvalitativnog rezultata, međutim u naših PV, ET i PMF bolesnika nije bilo razlike u opterećenju mutiranim alelom između bolesnika s trombozom i bez tromboze. U PV bolesnika s trombozom uočili smo postojanje trenda prema višim rezultatima u odnosu na bolesnike bez tromboze (43,3 vs. 37,6 % uz  $P = 0,089$ ) te PV bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na PV bolesnike bez tromboze (55,1 vs. 37,6 % uz  $P = 0,082$ ). Također, ustanovili smo prisutnost trenda višeg opterećenja mutiranim alelom V617F u PMF bolesnika s venskom trombozom u odnosu na PMF bolesnike bez tromboze (80,5 vs. 36,5 % uz  $P = 0,070$ ).

Izračunom graničnih vrijednosti opterećenja mutiranim alelom V617F ustanovili smo vrijednosti koje su bile povezane s nastankom arterijske tromboze. Tako je vrijednost  $> 14,6$  % u Ph(-) MPN povećavala rizik 2,33 puta, dok je ista vrijednost u ET bolesnika povećavala rizik 2,92 puta, a u PMF bolesnika vrijednost  $\leq 34,8$  % taj rizik je povećavala 5,06 puta. Za PV bolesnike vrijednost  $> 25,7$  % bila je na granici da postane statistički značajno povezana s nastankom arterijske tromboze ( $P=0,055$ ).

Vannuchi i sur. u grupi PV bolesnika pokazali su povezanost opterećenja mutiranim alelom V617F  $> 75$  % s 3,56 većim rizikom za nastanak tromboze, dok je rizik tijekom praćenja bolesti uz vrijednosti  $> 75$  % bio čak 7,1 puta veći (56). S time se ne slažu rezultati Passamonti i sur. koji u kohorti od 338 PV bolesnika nisu našli povezanost opterećenja mutiranim alelom V617F s nastankom tromboze (22). Ispitujući PV i ET bolesnike koji su imali status homozigotnog opterećenja mutiranim alelom V617F (vrijednosti  $> 50$  %), Vannuchi i sur. otkrili su povezanost s nastankom tromboze samo u ET bolesnika (3,97 puta veći rizik) ali ne i u PV bolesnika (15). U pola nižu vrijednost opterećenja mutiranim alelom V617F ( $> 25$  %) Antonioli i sur. pokazali su kao značajnu za 3,0 puta veći rizik za nastanak arterijske tromboze u ET bolesnika (17). Za PMF bolesnike, izuzev našeg istraživanja, nismo pronašli niti jedno drugo istraživanje koje je ispitalo povezanost opterećenja mutiranim alelom s nastankom tromboze (71).

Analiza graničnih vrijednosti opterećenja mutiranim alelom V617F u naših bolesnika s venskom trombozom pokazala je povezanost s višim vrijednostima u odnosu na bolesnike s

arterijskom trombozom. Tako je vrijednost > 90,4 % u PV bolesnika povećavala rizik 1,94 puta, dok je vrijednost > 56,7 % u PMF bolesnika povećavala rizik za nastanak venske tromboze 6,00 puta.

Iz prikazanih rezultata za opterećenje mutiranim alelom zaključujemo da ono vrlo vjerojatno doprinosi nastanku tromboze te ukazujemo na potrebu za prospektivnim istraživanjem na većoj skupini ispitanika koja bi ispitala njihovu moguću povezanost. Ujedno pretpostavljamo da obzirom na razlike u dobi, spolu, terapiji i ostalim komorbiditetima u ispitivanih bolesnika biti će teško ustanoviti koja razina opterećenja mutiranim alelom V617F je ona koja značajno doprinosi nastanku arterijske i venske tromboze.

## 6.10. Polimorfizmi u skupini Ph(-) MPN bolesnika

Genetička istraživanja u Ph(-) MPN bolesnika uglavnom su obuhvaćala mutacije karakteristične za nastanak i progresiju bolesti dok je povezanost s trombozom ispitivana za tek nekolicinu najčešćih mutacija.

Već duži niz godina prepoznata je povezanost *FV* Leiden i *FII*20210A s nastankom venske tromboze (152–154). S obzirom na to saznanje, znanstvenike je zanimala i njihova povezanost s nastankom tromboze u Ph(-) MPN bolesnika (59, 60, 63, 68, 77). Za razliku od ova dva poznata polimorfizma, doprinos polimorfizama ljudskih trombocitnih antigena i polimorfizama gena P-selektin i P-selektin glikoprotein 1 ligand nastanku tromboze još uvijek se istražuje i u općoj populaciji (95, 99, 102, 103, 106, 108, 118, 128, 139). S obzirom na to, da su jedni povezani s ekspresijom svojih biljega na trombocitima i endotelnim stanicama, a drugi s ekspresijom na leukocitima u svrhu hemostatskog i upalnog odgovora, zanimalo nas je postoje li razlike u ovim polimorfizmima između zdravih ispitanika i skupine Ph(-) MPN bolesnika te njihova moguća povezanost s nastankom tromboze u Ph(-) MPN bolesnika. Prema dosadašnjim saznanjima ovo je prvo istraživanje polimorfizama *HPA-3*, *HPA-5*, *P-SEL* i *P-SGLI* u skupini Ph(-) MPN bolesnika.

Analizom svih ispitanih polimorfizama nismo pronašli razliku u učestalosti genotipova i alela između Ph(-) MPN bolesnika i skupine zdravih ispitanika. Također, nije bilo razlike u

učestalosti alela ispitanih polimorfizama između Ph(-) MPN bolesnika s trombozom i bez tromboze kao ni između bolesnika s trombozom i njihove odgovarajuće skupine zdravih ispitanika.

Provjerom Hardy-Weinbergove ravnoteže za ispitane polimorfizme, ustanovili smo da postoji odstupanje dobivenih u odnosu na očekivane vrijednosti u skupini bolesnika s trombozom za *HPA-5* i *P-SGL1 M62I*. Takav rezultat nam ukazuje na nehomogenost za ove polimorfizme u skupini bolesnika s trombozom i stoga rezultate u kojima su ova dva polimorfizma statistički značajna u ovoj skupini treba uzeti s oprezom.

Nadalje, ustanovili smo da ispitani polimorfizmi nisu bili povezani s nastankom tromboze uspoređujući Ph(-) MPN bolesnike s trombozom i bez tromboze kao i usporedbom Ph(-) MPN bolesnika s trombozom i skupine zdravih ispitanika.

Nakon podjele Ph(-) MPN bolesnika prema vrsti tromboze, pronašli smo razliku u učestalosti genotipa *HPA-2* u skupini bolesnika s venskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze, pri čemu su genotipovi *HPA-2ab* i *HPA-2bb* i alel *HPA-2b* bili češći u bolesnika bez tromboze. Naši rezultati oprečni su rezultatima većine objavljenih istraživanja u općoj populaciji u kojima su genotipovi *HPA-2ab* i *HPA-2bb* bili povezani s povećanim rizikom za nastanak arterijske tromboze dok povezanost s nastankom venske tromboze nije nađena (118-120, 201).

S obzirom na to da su učestalosti *HPA-2* genotipova naših bolesnika kao i zdravih kontrolnih ispitanika bile iste te da su usporedive s rezultatima istraživanja Pavić i sur. o učestalosti polimorfizama *HPA* u hrvatskoj populaciji (94), a ova razlika u učestalosti nastala je tek nakon podjele bolesnika prema vrsti tromboze, smatramo kako je potrebno povezanost ovih genotipova ispitati i potvrditi u većoj kohorti Ph(-) MPN bolesnika s venskom trombozom.

U skupini Ph(-) MPN s arterijskom trombozom multivarijantnom regresijskom analizom pronašli smo blagu zaštitnu ulogu genotipa *HPA-5ab* za nastanak tromboze (OR = 0,36 i 95% CI = 0,13-0,97; P = 0,043), iako nije postojala razlika u učestalosti polimorfizama *HPA-5* u odnosu na Ph(-) MPN bolesnike bez tromboze. Ovi rezultati, razlikuju se od onih dobivenih u studiji koja je analizirala opću populaciju u kojima nije nađena povezanost alela *HPA-5b* s nastankom infarkta miokarda (112) te studiji u kojoj nije nađena povezanost polimorfizama *HPA-5* s nastankom ishemijskog moždanog udara (99).

Osim toga, u Ph(-) MPN bolesnika pronašli smo da postoji trend prema povezanosti (P = 0,059) alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* s nastankom arterijske tromboze. Sličan

rezultat dobili su i Tregouet i sur. (128) pri čemu su povezali kombinaciju alela 290N i alela N562 polimorfizma *P-SEL* N562D s nastankom moždanog udara.

Nakon što smo napravili analizu učestalosti genotipa i alela bolesnika prema dijagnozama za ET bolesnike nismo pronašli povezanost polimorfizma *HPA-2* s nastankom tromboze čime smo potvrdili rezultate istraživanja Afshar-Kharghana (63). Unatoč tome što nije bilo razlike u učestalosti polimorfizama *HPA-5* u ET bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze, multivarijantnom analizom utvrdili smo povezanost genotipa *HPA-5ab* sa zaštitnom ulogom u nastanku tromboze u ET bolesnika (OR = 0,20 i 95% CI = 0,06-0,70; P = 0,012). ET bolesnici nositelji genotipa *HPA-5ab* također su imali manji rizik za nastanak arterijske tromboze (OR = 0,23 i 95% CI = 0,06-0,89; P = 0,034). Iako smo za ET bolesnike s trombozom pronašli razliku u učestalosti genotipa *P-SGLI* M62I u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika pri čemu je genotip M62I-MI i M62I-II kao i alel 62I bio učestaliji u ET bolesnika s trombozom, nismo našli povezanost ovog genotipa s nastankom tromboze. Učestalost alela 62I polimorfizma *P-SGLI* M62I između ET bolesnika s arterijskom trombozom i bolesnika bez tromboze bila je vrlo blizu statističke značajnosti (P = 0,051) pri čemu je alel 62I bio učestaliji u ET bolesnika s trombozom, međutim nismo pronašli povezanost s nastankom tromboze. Na takav utjecaj alela 62I upućuje i istraživanje u kojem je samo nađen trend ka povezanosti s moždanim udarom (140) te drugo veće istraživanje u kojem je povezanost s nastankom ishemijskog moždanog udara potvrđena (141). Na tom tragu je i studija koja je ustanovila zaštitni učinak genotipa *P-SEL* M62I-MM za nastanak ateroskleroze karotidnih arterija (138). Za razliku od nabrojanih istraživanja, Bugert i sur. prikazali su rezultate istraživanja u kojima je alel 62I bio povezan sa zaštitnom ulogom u nastanku kardiovaskularne bolesti (126).

Za razliku od rezultata istraživanja koji su u PV bolesnika našli povezanost genotipova *HPA-1ab* i *HPA-1bb* s nastankom arterijske tromboze (63), studija Dambrauskienė i sur. nije našla povezanost polimorfizma *HPA-1* u skupini PV bolesnika (79), što je potvrđeno i u našem istraživanju. Analizom PV bolesnika s trombozom utvrdili smo da postoji razlika u učestalosti genotipova i alela *HPA-2* u odnosu na PV bolesnike bez tromboze (P = 0,003 i P = 0,003) pri čemu su genotip *HPA-2ab* i alel *HPA-2b* bili učestaliji u bolesnika bez tromboze, te je nađena njihova povezanost s jakim zaštitnim učinkom na nastanak tromboze (OR = 0,09, 95% CI = 0,01-0,73; P = 0,025). Isto je pronađeno i u skupini PV bolesnika s arterijskom trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze, pri čemu je potvrđena povezanost genotipa *HPA-2ab* i alela *HPA-2b* kao

zaštitnih faktora za nastanak arterijske tromboze (OR = 0,11, 95% CI = 0,01-0,95; P = 0,045). Naši rezultati bili su oprečni rezultatima studije Afshar-Khargan i sur. koji nisu našli razliku u učestalosti polimorfizma *HPA-2* između bolesnika s trombozom i bez tromboze (63). Kao mogući razlog za nepodudaranje rezultata ističemo mali broj PV bolesnika (N=43) uključenih u tu studiju.

Ujedno, svi naši PV bolesnici s venskom trombozom bili su nositelji jedino genotipa *HPA-2aa* što je bilo značajno različito u odnosu na bolesnike bez tromboze (P = 0,046), međutim povezanost s nastankom venske tromboze nije nađena, vjerojatno zbog premalog uzorka. Stoga bi bilo uputno provjeriti moguće postojanje povezanosti polimorfizama *HPA-2* s nastankom tromboze na većem broju PV bolesnika.

U skupini PMF bolesnika ustanovili smo značajnu razliku u učestalosti genotipova i alela polimorfizma *P-SEL S290N*, te je multivarijantnom analizom potvrđena povezanost genotipova *P-SEL S290N-SN* i *S290N-NN* te alela 290N s 7,41 puta većim rizikom za nastanak tromboze (95% CI = 2,01-27,26; P = 0,003). Iako niti jedan PMF bolesnik s venskom trombozom nije imao genotip *N562D-NN* polimorfizma *P-SEL N562D*, što je bilo značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, nismo pronašli povezanost ovog genotipa i zaštitnog učinka na nastanak tromboze. Rizik za nastanak arterijske tromboze u PMF bolesnika bio je 5,90 puta veći u nositelja genotipova *S290N-SN* i *S290N-NN* te alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* (95% CI = 1,37-25,43; P = 0,017) te su isti genotipovi kao i alel 290N bili povezani s 10,12 puta većim rizikom za nastanak venske tromboze (95% CI = 1,70-60,30; P = 0,011). Međutim, u multivarijantnoj analizi gubi se povezanost s nastankom arterijske i venske tromboze.

## **6.11. Učestalosti kombinacije genotipova *FV Leiden*, *FII G20210A*, *HPA- 5*, *P-SEL* i *P-SGLI***

Analizirajući utjecaj kombinacije genotipova ispitanih polimorfizama, ustanovili smo zaštitnu ulogu kombinacije genotipa *M62I-MM/HPA-5ab* te *HPA-5ab/FII G20210A-GG* za nastanak kako tromboze tako i arterijske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika. Prikazani genotipovi zasebno su pokazali u nekoliko studija da nemaju utjecaj na nastanak tromboze u općoj populaciji (99, 112, 139, 156, 157). Moguće je da njihova kombinacija u Ph(-) MPN bolesnika ima sinergistički utjecaj te umanjuje rizik za nastanak tromboze.

Nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika bio je smanjen u nositelja kombinacija genotipa *P-SEL* T715P-TT/N562D-DD i *P-SEL* T715P-TT/N562D-ND. Ovi rezultati različiti su u odnosu na rezultate dobivene u općoj populaciji jedne studije pri čemu su nositelji alela 715P imali manji rizik za nastanak venske tromboze (131) te rezultata koji nisu našli povezanost polimorfizma N562D s nastankom venske tromboze (130).

Otkrili smo ukupno četiri kombinacije genotipova koje su doprinosile nastanku venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika: M62I-MM/S290N-NN, T715P-TT/S290N-NN, S290N-NN/*FV* G1691A-GG i S290N-NN/*FII* G20210A-GG. S obzirom na to da su neke od njih bile pronađene i u kombinacijama genotipa koje su imale zaštitnu ulogu za nastanak tromboze poput genotipa M62I-MM, i T715P-TT te *FII* G20210A-GG, a u svim kombinacijama koje doprinose nastanku venske tromboze bio je prisutan genotip S290N-NN zaključujemo da je doprinos tog genotipa nastanku venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika bio izuzetno velik.

U skupini PMF dodatno je naglašena uloga polimorfizma *P-SEL* S290N jer su genotipovi S290N-SN i S290N-NN u kombinaciji s nasljednim faktorima trombofilije divljeg tipa (genotip *FV* G1691A-GG i *FII* G20210A-GG) bili povezani s povećanim rizikom za nastanak tromboze općenito kao i s nastankom arterijske i venske tromboze. Pri tome je zanimljivo primjetiti da je nastanku arterijske tromboze doprinosio samo genotip S290N-SN u kombinaciji s nasljednim faktorima trombofilije, dok je nastanak venske tromboze bio povezan s kombinacijom genotipa S290N-NN i S290N-SN s *FII* G20210A-GG i *FV* G1691A-GG. U odnosu na rezultate istraživanja u općoj populaciji u kojima nasljedni faktori trombofilije pokazuju svoj utjecaj samo ako su prisutni u heterozigotnom ili homozigotnom obliku (152, 153), u PMF bolesnika već i dominantni divlji tip ovih polimorfizama u kombinaciji s polimorfizmom S290N značajno je povećavao rizik za nastanak tromboze.

Prema nama dostupnim podacima, ovo je prvo istraživanje koje je analiziralo utjecaj nasljedne trombofilije na nastanak tromboze u PMF bolesnika, a ovi rezultati otvaraju vrata novim spoznajama o mogućim faktorima koji tome doprinose.



## 6.12. Učestalost haplotipova polimorfizama u bolesnika i zdravih ispitanika

Analizirali smo napravljene haplotipove *HPA* i *P-SEL-FV* u skupini Ph(-) MPN bolesnika i zdravih ispitanika te nakon podjele bolesnika prema dijagnozama. Najučestaliji *HPA* haplotip u svim ispitivanim skupinama bio je *HPA-1a2a3a*. U skupini Ph(-) MPN bolesnika s trombozom bilo je najviše nositelja haplotipa SNVTG dok je u bolesnika bez tromboze i u skupini zdravih ispitanika to bio haplotip SDVTG.

Obzirom da su učestalosti pojedinih haplotipova vrlo male, ovi rezultati nisu previše pouzdani, ali mogu ukazivati na postojanje trendova koji bi možda ispitivanjem u većoj kohorti potvrdili svoju značajnost.

Haplotip *HPA-1b2b3b* pronašli smo samo u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom pri čemu su njegovi nositelji imali povećani rizik za nastanak tromboze, dok isti haplotip nije imao niti jedan zdravi ispitanik. Osim toga, utvrdili smo povezanost nositelja haplotipa *P-SEL-FV* SDVPG s povećanim rizikom za nastanak tromboze u Ph(-) MPN bolesnika u usporedbi sa zdravim ispitanicima, te je također ovaj haplotip bio prisutan samo kod bolesnika s trombozom.

Povećan rizik za nastanak tromboze u odnosu na zdrave ispitanike imali su i Ph(-) MPN bolesnici koji su bili nositelji haplotipa SDLPG.

Ovi rezultati razlikuju se od rezultata dobivenih u općoj populaciji pri čemu je haplotip NNVP dobiven od polimorfizama *P-SEL* S290N, N562D, V599L i T715P bio povezan s 2,09 puta većim rizikom za nastanak kardiovaskularne bolesti (139) dok je u drugoj studiji isti haplotip imao mali zaštitni utjecaj za nastanak venske tromboze (130).

## 6.13. Prediktivni modeli za nastanak tromboze

Iz većine rezultata dobivenih u našem istraživanju napravili smo 4 prediktivna modela koji bolesnike svrstavaju u skupinu niskog, srednjeg i visokog rizika za nastanak tromboze. U njih smo uključili čim više parametara koji su lako dostupni hematolozima (godine pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora, prethodna tromboza, prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2* i broj leukocita pri dijagnozi).

Pri tome se 1. prediktivni model koristi za svrstavanje Ph(-) MPN bolesnika u rizične skupine za nastanak tromboze, a uključuje dob pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora i prethodnu trombozu. Isti model koristili smo i za predviđanje nastanka tromboze u PV bolesnika. Za predviđanje nastanka venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika najboljim se pokazao 3. model koji uključuje opterećenje mutiranim alelom V617F > 26,1 % i hipertenziju.

Za nastanak tromboze u ET bolesnika kao i nastanak arterijske tromboze u ET bolesnika najboljim se pokazao 2. model koji je uključivao dob pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora, prethodnu trombozu i prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*. Isti model se pokazao najboljim i za predviđanje arterijske tromboze u PV bolesnika.

Niti jedan od ispitivanih modela nije se pokazao statistički značajnim za ET i PV bolesnike s venskom trombozom, vjerojatno zbog manje pojavnosti venske tromboze.

Za PMF bolesnike koristili smo 4. model koji je ujedno jedini model koji uključuje prisutnost alela 290N polimorfizma *P-SEL S290N* te prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*.

Kako bi dodatno potvrdili doprinos ispitivanih parametara za nastanak tromboze napravili smo Coxov regresijski model u koji su uključeni svi ispitivani parametri koji su se u ovom istraživanju pokazali statistički značajnim. U Coxov regresijski model uključeno je vrijeme od postavljanja dijagnoze do nastanka tromboze ili vrijeme do završetka studije.

Kroz ovaj model uvidjeli smo da u Ph(-) MPN bolesnika najznačajniji doprinos trombozi imaju dob > 60 godina, prethodna tromboza, prisutnost > 1 KV rizičnog faktora, dok se prisutnost samo 1 KV rizičnog faktora nije pokazala značajnom. Isti parametri bili su značajni i za nastanak arterijske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika.

Za razliku od ovih čestih parametara koji doprinose trombozi, Coxovom regresijskom analizom značajan doprinos venskoj trombozi u Ph(-) MPN bolesnika doprinijeli su opterećenje mutiranim alelom V617F > 26,1 % te hipertenzija.

U ET bolesnika značajna povezanost s nastankom tromboze kao i arterijske tromboze dobivena je za dob > 60 godina, prethodnu trombozu, prisutnost > 1 KV rizičnog faktora i prisutnost mutacije V617F.

Značajan doprinos nastanku tromboze u PV bolesnika imali su prethodna tromboza i prisutnost > 1 KV rizičnog faktora dok se dob > 60 godina u ovoj skupini nije pokazala značajnom

Međutim, u PV bolesnika s arterijskom trombozom dob > 60 godina značajno je doprinosila nastanku tromboze, baš kao i prethodna tromboza i dijabetes.

Prediktivni model za nastanak tromboze u PMF bolesnika koji je uključivao prisutnost mutacije V617F i alela 290N polimorfizma *P-SEL* S290N dodatno je potvrdila Coxova regresijska analiza prikazujući da oba parametra značajno doprinose nastanku tromboze.

Najpoznatiji prediktivni model za nastanak tromboze u ET bolesnika bio je IPSET model iz 2012. godine u kojem su se bolesnici razvrstavali u 3 rizične skupine u ovisnosti o dobi > 60 godina, prethodnoj trombozi, prisutnosti KV rizičnih faktora i prisutnosti mutacije V617F (38). U ovom modelu svi parametri bili su jednako bodovani što se ne slaže s našim rezultatima u kojima smo otkrili da prisutnost > 1 KV rizičnog faktora puno više (8,80 puta) doprinosi trombozi u odnosu na prisutnost samo jednog KV rizičnog faktora (rizik povećan 3,74 puta). Naposljetku je IPSET model revidiran 2015. i iz njega su izbačeni KV rizični faktori jer je novije istraživanje pokazalo da ne doprinose nastanku tromboze (39). Za naglasiti je i da Coxovom regresijskom analizom nismo utvrdili značajan doprinos prisutnosti 1 KV rizičnog faktora nastanku tromboze u cijeloj skupini Ph(-) MPN kao ni u ET i PV bolesnika.

Velika multicentrična studija o PV bolesnicima objavljena 2005. godine kao 2 glavna faktora za prepoznavanje visoko rizičnih bolesnika za nastanak tromboze uzimala je dob > 65 godina i prisutnost prethodne tromboze (42), dok naši rezultati ukazuju i na značajan doprinos trombozi prisutnost > 1 KV faktora. Obzirom da postoji veliki interes za ovu temu, 2019. su objavljeni i podaci o dijagnosticanju te praćenju i stratifikaciji rizika koji ET bolesnike dijele u 4 rizične skupine za nastanak tromboze koji uključuju samo dob pri dijagnozi, prethodnu trombozu i prisutnost mutacije V617F. Isti autori PV bolesnike dijele u 2 rizične skupine za nastanak tromboze, visoku i nisku pri čemu u rizične parametre uključuju samo dob pri dijagnozi i prethodnu trombozu (40). Rezultati naše studije ukazuju da dob > 60 godina ima veći utjecaj na nastanak arterijske tromboze.

Zaključujemo da se naši prediktivni modeli razlikuju od dosad objavljenih modela jer naglašavaju važnost ne samo prisutnosti KV rizičnih faktora, koja u nekim modelima nije uključena, već i broja KV rizičnih faktora koje pojedini bolesnik ima. Ujedno pokazali smo da isti parametri ne doprinose nastanku i arterijske i venske tromboze. Istražili smo doprinos dosad neispitanih polimorfizama u ovih bolesnika te pokazali da je njihov utjecaj drugačiji u odnosu na

onaj u općoj populaciji. Otkrili smo dosad neistraživane parametre koji su bili povezani s nastankom tromboze poput polimorfizama *P-SEL S290N*, *N562D* te *HPA-2* i *HPA-5*.

Ovo je prvo hrvatsko istraživanje koje se bavilo protrombotičkim rizičnim faktorima u Ph(-) MPN bolesnika te prema dosadašnjim saznanjima jedino istraživanje u svijetu koje je obuhvatilo sve najpoznatije ispitivane parametre te jasno razdvajalo faktore koji utječu na nastanak arterijske odnosno venske tromboze. Stoga smatramo da je ovo istraživanje doprinijelo novim spoznajama o etiologiji nastanka tromboze u Ph(-) MPN bolesnika, koje bi trebalo potvrditi u prospektivnoj studiji s većim brojem bolesnika.

## 7. ZAKLJUČCI

### 1. Učestalost i vrsta tromboze

Tromboza je nastala u 30,6 % Ph(-) MPN bolesnika. Prema dijagnozama, tromboza je nastala u 35,2 % PMF bolesnika, 34,3 % PV bolesnika i 26,9 % ET bolesnika. U dvije trećine ET i PV bolesnika nastala je arterijska tromboza, dok je u PMF bolesnika učestalost arterijskih i venskih tromboza bila podjednaka. Najviše tromboza nastalo je unutar godinu dana od postavljanja dijagnoze Ph(-) MPN.

### 2. Spol

U skupini svih Ph(-) MPN bolesnika i u ET skupini bilo je više žena. Tromboza je nastala u podjednakom broju muških i ženskih bolesnika.

### 3. Dob

Ph(-) MPN bolesnici s trombozom bili su stariji od bolesnika bez tromboze, dok su bolesnici s arterijskom trombozom bili stariji od bolesnika s venskom trombozom. ET bolesnici s trombozom kao i oni s arterijskom trombozom bili su stariji od ET bolesnika bez tromboze. Nije bilo razlike u dobi između muških i ženskih bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze. Prilikom nastanka prve tromboze muški Ph(-) MPN bolesnici bili su prosječno 8 godina mlađi u odnosu ženske bolesnike.

### 4. Prethodna tromboza

Prethodna tromboza povećavala je rizik za nastanak nove tromboze u skupini Ph(-) MPN bolesnika i u ET bolesnika.

### 5. Preživljenje bolesnika

Preživjelo je više Ph(-) MPN, ET i PMF bolesnika bez tromboze u odnosu na iste skupine bolesnika s trombozom, dok je u PV bolesnika preživjelo više bolesnika s trombozom u odnosu na one bez.

### 6. Terapija bolesnika

PV i ET bolesnici s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze češće su uzimali citoreduktivnu i/ili antikoagulacijsku terapiju. U PMF bolesnika nije bilo razlike u terapiji između bolesnika s trombozom u odnosu na bolesnike bez tromboze.

## 7. Parametri krvne slike pri dijagnozi

Ph(-) MPN bolesnici s trombozom kao i s arterijskom trombozom imali su viši broj leukocita u odnosu na bolesnike bez tromboze. Ph(-) MPN bolesnici s venskom trombozom imali su niži broj trombocita i nižu koncentraciju hemoglobina u odnosu na bolesnike bez tromboze. Veći broj leukocita pri dijagnozi u ET bolesnika bio je povezan s nastankom tromboze kao i s nastankom arterijske tromboze.

## 8. Kardiovaskularni rizični faktori

Ph(-) MPN bolesnici s trombozom imali su veću učestalost hipertenzije i hiperlipidemije, te je potvrđena povezanost hiperlipidemije i nastanka tromboze.

Bolesnici s arterijskom trombozom imali su veću učestalost hipertenzije, hiperlipidemije i prisutnost barem 1 KV rizičnog faktora u odnosu na bolesnike bez tromboze, te je potvrđena povezanost hiperlipidemije i nastanka arterijske tromboze. ET bolesnici s trombozom kao i ET bolesnici s arterijskom trombozom imali su veću učestalost hipertenzije, hiperlipidemije i prisutnosti barem 1 KV rizičnog faktora. Svi ET bolesnici s venskom trombozom imali su hipertenziju. Potvrdili smo povezanost hiperlipidemije i nastanka tromboze i arterijske tromboze u ET bolesnika.

U PV bolesnika šećerna bolest bila je češća u bolesnika s trombozom te je potvrđena njihova povezanost. PV bolesnici s arterijskom trombozom češće su imali šećernu bolest i prisutnost barem 1 KV rizičnog faktora.

PMF bolesnici s arterijskom trombozom imali su veću učestalost hiperlipidemije i prisutnosti barem 1 KV rizičnog faktora.

## 9. Mutacija V617F u genu *JAK2* i opterećenje mutiranim alelom V617F

U Ph(-) MPN bolesnika s trombozom i s arterijskom trombozom češće je bila prisutna mutacija V617F u genu *JAK2*. U ET bolesnika potvrđena je povezanost mutacije V617F s nastankom tromboze. Nije nađena razlika u opterećenju mutiranim alelom V617F između bolesnika s trombozom i bez tromboze ni u jednoj od ispitivanih skupina bolesnika.

## 10. Polimorfizmi ispitanih gena

Genotip *HPA-2ab* i *HPA-2bb* kao i alel *HPA-2b* bio je učestaliji u Ph(-) MPN bolesnika bez tromboze u odnosu na bolesnike s venskom trombozom. Potvrđena je povezanost zaštitnog utjecaja genotipa *HPA-5ab* za nastanak arterijske tromboze u Ph(-) MPN. U ET

bolesnika genotip *HPA-5ab* imao je blagi zaštitni utjecaj za nastanak tromboze kao i arterijske tromboze. Genotipovi *P-SGL1* M62I-MI i M62I-II kao i alel 62I bili su učestaliji u ET bolesnika s trombozom u odnosu na skupinu zdravih ispitanika.

U PV bolesnika genotip *HPA-2ab* i alel *HPA-2b* bili su povezani s jakim zaštitnim utjecajem za nastanak tromboze kao i za nastanak arterijske tromboze. Svi PV bolesnici s venskom trombozom bili su nositelji genotipa *HPA-2aa*.

U PMF bolesnika potvrđena je povezanost genotipova *P-SEL* S290N-SN i S290N-NN te alela 290N s povećanim rizikom za nastanak tromboze. U PMF bolesnika nije bilo nositelja genotipa *P-SEL* N562D-NN što je bilo različito u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

#### 11. Učestalosti kombinacije pojedinih genotipova

Kombinacija genotipova M62I-MM/*HPA-5ab* i *HPA-5ab/FII* G20210A-GG imala je zaštitni učinak na nastanak tromboze kao i arterijske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika. Rizik za nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bio je manji u nositelja kombinacije genotipova *P-SEL* T715P-TT/N562D-DD i *P-SEL* T715P-TT/N562D-ND. Kombinacije genotipova koje su povećavale rizik za nastanak venske tromboze bili su M62I-MM/S290N-NN, T715P-TT/S290N-NN, S290N-NN/*FV* G1691A-GG i S290N-NN/*FII* G20210A-GG.

U PMF bolesnika genotipovi S290N-SN/*FV* G1691A-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG povećavali su rizik za nastanak tromboze. Rizik za nastanak arterijske tromboze bio je povećan u PMF nositelja genotipova S290N-SN/*FV* G1691A-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG, dok su nositelji genotipova S290N-NN/*FV* G1691A-GG, S290N-NN/*FII* G20210A-GG i S290N-SN/*FII* G20210A-GG imali povećan rizik za nastanak venske tromboze.

#### 12. Učestalost haplotipova polimorfizama u bolesnika i zdravih ispitanika

Haplotipovi *HPA-1b2b3b* i SDVPG bili su značajno učestaliji u Ph(-) MPN bolesnika s trombozom u odnosu na zdrave ispitanike. Haplotip SDLPG bio je prisutan samo u bolesnika s trombozom dok ga nije bilo u bolesnika bez tromboze kao ni u zdravih ispitanika. U ET bolesnika s trombozom bilo je manje nositelja haplotipa SDVTG u odnosu na njegovu prisutnost u zdravih ispitanika.

### 13. Prediktivni modeli za nastanak tromboze

Modeli koje smo izradili svrstavali su bolesnike u skupinu niskog, srednjeg i visokog rizika za nastanak tromboze. Model za nastanak tromboze u Ph(-) MPN bolesnika uključivao je dob pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora i prethodnu trombozu. Model za nastanak venske tromboze u Ph(-) MPN bolesnika uključivao je opterećenje mutiranim alelom V617F > 26,1 % i hipertenziju. Model za nastanak tromboze kao i arterijske tromboze u ET bolesnika uključivao je dob pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora, prethodnu trombozu i prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*.

U PV bolesnika model za nastanak tromboze sadržavao je dob pri dijagnozi, prisutnost i broj KV rizičnih faktora i prethodnu trombozu, dok je model za nastanak arterijske tromboze uključivao i prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2*.

U Model za nastanak tromboze u PMF bolesnika bili su uključeni prisutnost mutacije V617F u genu *JAK2* i alel 290N polimorfizma *P-SEL S290N*.



## 8. LITERATURA

1. Vaughan JM, Oxon. DM. Leuco-erythroblastic anæmia. *J Pathol Bacteriol.* 1936; 42: 541–64.
2. Dameshek W, Guglielmo D. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes [editorial]. *Blood.* 1951;6(4):372-375. *Blood.* 2016; 127: 663.
3. Nowell PC. Progress with Chronic Myelogenous Leukemia: A Personal Perspective over Four Decades. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 1–13.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016; 127: 2391–405.
5. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984; 36: 93–9.
6. Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 930–7.
7. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005; 365: 1054–61.
8. Campbell PJ, Green AR. The Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2452–66.
9. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005; 434: 1144–8.
10. Barcelos MM, Santos-Silva MC. Molecular approach to diagnose BCR/ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33: 290–6.
11. Shammo JM, Stein BL. Mutations in MPNs: Prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decisions. *Hematology.* 2016; 2016: 552–60.
12. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1779–90.
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7: 387–97.
14. Wang L, Swierczek SI, Lanikova L, Kim SJ, Hickman K, Walker K, et al. The relationship of JAK2V617F and acquired UPD at chromosome 9p in polycythemia vera. *Leukemia.* 2014; 28: 938–41.
15. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia

- vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007; 110: 840–6.
16. Hermouet S, Dobo I, Lippert E, Boursier MC, Ergand L, Perrault-Hu F, et al. Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2V617F. *Leukemia*. 2007; 21: 1128–30.
  17. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008; 93: 41–8.
  18. Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: Effects on phenotype, prognosis and change with treatment. *Ther Adv Hematol*. 2011; 2: 21–32.
  19. Silver RT, Vandris K, Wang YL, Adriano F, Jones AV, Christos PJ, et al. JAK2V617F allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. *Leuk Res*. 2011; 35: 177–82.
  20. Montanaro M, Latagliata R, Cedrone M, Spadea A, Rago A, Di Giandomenico J, et al. Thrombosis and survival in essential thrombocythemia: A regional study of 1,144 patients. *Am J Hematol*. 2014; 89: 542–6.
  21. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Hernández-Boluda JC, Martínez-Avilés L, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol*. 2014; 89: 517–23.
  22. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010; 24: 1574–9.
  23. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, 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: 756–61.
  24. Takahashi K, Patel KP, Kantarjian H, Luthra R, Pierce S, Cortes J, et al. JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013; 122: 3784–6.
  25. Leszczynska A, Grzenkowicz-Wydra J, Chmielewska-Gorycka L, Bieniaszewska M, Hellmann A. Detection of JAK2 Exon 12 Mutations in JAK2 V617F-Negative Polycythemia Vera Patients by Cloning Technique. *Acta Haematol*. 2016; 136: 123–8.
  26. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am J Hematol*. 2011; 86: 668–76.
  27. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007; 21: 1960–3.
  28. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS*

Med. 2006; 3: e270.

29. Ma W, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh C-H, Uyeji J, et al. MPL Mutation Profile in JAK2 Mutation-negative Patients With Myeloproliferative Disorders. *Diagnostic Mol Pathol*. 2011; 20: 34–9.
30. Varricchio L, Migliaccio AR. Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms: The Other Side of the Alice Mirror. *EMJ Hema*. 2014; 1: 114–22.
31. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2013; 369: 2379–90.
32. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123: 3714–9.
33. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014; 92: 289–97.
34. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 573–82.
35. Maynadié M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: A HAEMACARE study. *Haematologica*. 2013; 98: 230–8.
36. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014; 124: 2507–13.
37. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. *Haematologica*. 2007; 92: 135–6.
38. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012; 120: 5128–33.
39. Barbui T, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer J*. 2015; 5: e369.
40. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2019; 94: 133–43.
41. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011; 117: 5857–9.
42. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 2224–32.
43. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia Vera: The Natural History of 1213

Patients Followed for 20 Years. *Ann Intern Med.* 1995; 123: 656–64.

44. Hulterantz M, Kristinsson SY, Andersson TML, Landgren O, Eloranta S, Derolf ÅR, et al. Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: A population-based study. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 2995–3001.
45. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018; 93: 1551–60.
46. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger H, Thiele J, Gisslinger B, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Leukocytosis as an important risk factor for arterial thrombosis in WHO-defined early/prefibrotic myelofibrosis: An international study of 264 patients. *Am J Hematol.* 2012; 87: 669–72.
47. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: Analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia.* 2006; 20: 55–60.
48. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood.* 2010; 115: 778–82.
49. Lowe GD. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2008; 140: 488–95.
50. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 2011; 9: 120–38.
51. Oliveira BL, Caravan P. Peptide-based fibrin-targeting probes for thrombus imaging. *Dalt Trans.* 2017; 46: 14488–508.
52. Stein BL, Saraf S, Sobol U, Halpern A, Shammo J, Rondelli D, et al. Age-related differences in disease characteristics and clinical outcomes in polycythemia vera. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54: 1989–95.
53. 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: 1788–91.
54. Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgarelis M. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res.* 2009; 33: 67–73.
55. Coucelo M, Caetano G, Sevivas T, Santos SA, Fidalgo T, Bento C, et al. JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Int J Hematol.* 2014; 99: 32–40.
56. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia.* 2007; 21: 1952–9.
57. Cortelazzo S. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol.* 1990; 8: 556–62.

58. Latagliata R, Montanaro M, Cedrone M, Di Veroli A, Spirito F, Santoro C, et al. High platelet count at diagnosis is a protective factor for thrombosis in patients with essential thrombocythemia. *Thromb Res.* 2017; 156: 168–71.
59. Trifa AP, Cucuianu A, Popp RA, Coadă CA, Costache RM, Militaru MS, et al. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2014; 93: 203–9.
60. Gisslinger H, Müllner M, Pabinger I, Heis-Vahidi-Fard N, Gisslinger B, Brichta A, et al. Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study. *Haematologica.* 2005; 90: 408–10.
61. Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, Borrelli G, Finazzi G, Landolfi R, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol.* 2007; 136: 249–59.
62. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2013; 368: 22–33.
63. Afshar-Kharghan V, López JA, Gray LA, Padilla A, Borthakur G, Roberts SC, et al. Hemostatic gene polymorphisms and the prevalence of thrombotic complications in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004; 15: 21–4.
64. Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf ÅR, Kristinsson SY, et al. Risk for Arterial and Venous Thrombosis in Patients With Myeloproliferative Neoplasms. *Ann Intern Med.* 2018; 168: 317.
65. Carobbio A, Ferrari A, Masciulli A, Ghirardi A, Barosi G, Barbui T. Leukocytosis and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: A systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* 2019; 3: 1729–37.
66. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Schalling M, Gleiss A, Schiefer A-I, Müllauer L, et al. Impact of white blood cell counts at diagnosis and during follow-up in patients with essential thrombocythaemia and prefibrotic primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2017; 179: 166–9.
67. Cerquozzi S, Barraco D, Lasho T, Finke C, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Risk factors for arterial versus venous thrombosis in polycythemia vera: a single center experience in 587 patients. *Blood Cancer J.* 2017; 7: 662.
68. Tevet M, Ionescu R, Dragan C, Lupu AR. Influence of the JAK2 V617F Mutation and Inherited Thrombophilia on the Thrombotic Risk among Patients with Myeloproliferative Disorders. *Maedica (Buchar).* 2015; 10: 27–32.
69. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer.* 2007; 109: 2279–84.
70. Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydłowska A, et al. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-

negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res.* 2015; 135: 272–80.

71. Horvat I, Boban A, Zadro R, Radic Antolic M, Serventi-Seiwerth R, Roncevic P, et al. Influence of Blood Count, Cardiovascular Risks, Inherited Thrombophilia, and JAK2 V617F Burden Allele on Type of Thrombosis in Patients With Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019; 19: 53–63.
72. Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, Buck G, Wheatley K, Kiladjian J-J, et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood.* 2012; 120: 1409–11.
73. Lancellotti S, Dragani A, Ranalli P, Petrucci G, Basso M, Tartaglione R, et al. Qualitative and quantitative modifications of von Willebrand factor in patients with essential thrombocythemia and controlled platelet count. *J Thromb Haemost.* 2015; 13: 1226–37.
74. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *N Engl J Med.* 2004; 350: 114–24.
75. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, et al. Assessment and prognostic value of the European leukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood.* 2012; 119: 1363–9.
76. Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter C, Pabinger I, et al. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2002; 71: 1–6.
77. De Stefano V, Za T, Rossi E, Fiorini A, Ciminello A, Luzzi C, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2009; 94: 733–7.
78. Navarro LM, Trufelli DC, Bonito DR, Del Giglio A, Bollmann PW. Application of Prognostic Score IPSET-thrombosis in patients with essential thrombocythemia of a brazilian public service. *Rev Assoc Med Bras.* 2016; 62: 647–51.
79. Dambrauskiene R, Gerbutavičius R, Ugenskiene R, Jankauskaite R, Savukaityte A, Šimoliuniene R, et al. Genetic polymorphisms of hemostatic factors and thrombotic risk in non BCR-ABL myeloproliferative neoplasms: A pilot study. *Balk J Med Genet.* 2017; 20: 35–42.
80. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 2012: 571–81.
81. Devendra KC, Falchi L, Verstovsek S. The underappreciated risk of thrombosis and bleeding in patients with myelofibrosis: a review. *Ann Hematol.* 2017; 96: 1595–604.
82. Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13: 34–9.
83. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood.* 2013; 122: 2176–84.
84. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Vannucchi AM, Barosi G, Antonioli E, et al. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera

- different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011; 96: 315–8.
85. Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pakistan J Med Sci*. 2013; 29: 891–6.
  86. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003; 85: 240–5.
  87. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection Polymorphisms of the glycoprotein complexes. *Vox Sang*. 2004; 87: 82–6.
  88. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014; 106: 93–102.
  89. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html>, pristupljeno 01.08.2019.
  90. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table2.html>, pristupljeno 01.08.2019.
  91. Zdravic D, Yougbare I, Vadasz B, Li C, Marshall AH, Chen P, et al. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016; 21: 19–27.
  92. Thude H, Bischoff W, Sterneck M, Marget M, Nashan B, Koch M. Polymorphisms of the human platelet antigen-1, -2, -3, -5, and -15 systems and acute cellular liver transplant rejection. *Hum Immunol*. 2017; 78: 534–9.
  93. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Platelet Glycoprotein Gene Polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001; 5: 262–87.
  94. Pavic M, Zadro R, Coen Herak D, Radic Antolic M, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfus Med*. 2010; 20: 73–7.
  95. Pagani G, Pereira JPV, Stoldt VR, Beck A, Scharf RE, Gohlke H. The human platelet antigen-1b (Pro 33) variant of IIb3 allosterically shifts the dynamic conformational equilibrium of this integrin toward the active state. *J Biol Chem*. 2018; 293: 4830–44.
  96. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D. The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. *Br J Haematol*. 2001; 114: 387–93.
  97. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, et al. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-Proline33 (HPA-1b, PI A2, Zw b) positive platelets in patients with cardiovascular disease. 1999; 33: 742–7.
  98. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PIA2): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol*. 1999; 105: 664–6.
  99. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet Receptors for Fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb/IX), and Collagen (GPIa/IIa) Are Not Correlated With an Increased Risk for Stroke. *Stroke*. 1997; 28: 1392–5.
  100. Liu H, Wang Y, Zheng J, Li G, Chen T, Lei J, et al. Platelet glycoprotein gene Ia C807T, HPA-3, and Iba VNTR polymorphisms are associated with increased ischemic stroke risk: Evidence from a comprehensive meta-analysis. *Int J Stroke*. 2017; 12: 46–70.
  101. Coen Herak D, Lenicek Krleza J, Radic Antolic M, Horvat I, Djuranovic V, Zrinski Topic R, et al. Association of Polymorphisms in Coagulation Factor Genes and Enzymes of

- Homocysteine Metabolism with Arterial Ischemic Stroke in Children. *Clin Appl Thromb.* 2017; 23: 1042–51.
102. Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Rosendaal FR, Pearce RM, Aramaki KM, et al. Platelet glycoprotein IIb polymorphism, traditional risk factors and non-fatal myocardial infarction in young women. *Br J Haematol.* 2001; 112: 632–6.
  103. Böttiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schömig K, et al. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 559–62.
  104. Zhu MM, Weedon J, Clark LT. Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2000; 86: 1000–5.
  105. Floyd CN, Mustafa A, Ferro A. The PIA1/A2 Polymorphism of Glycoprotein IIIa as a Risk Factor for Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2014; 9: e101518.
  106. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PI(A1/A2) polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet.* 1997; 349: 385–8.
  107. Meiklejohn DJ, Vickers MA, Morrison ER, Dijkhuisen R, Moore I, Urbaniak SJ, et al. In vivo platelet activation in atherothrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib. *Br J Haematol.* 2001; 112: 621–31.
  108. Floyd CN, Ellis BH, Ferro A. The PIA1/A2 Polymorphism of Glycoprotein IIIa as a Risk Factor for Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2014; 9: e100239.
  109. Boroujeni HR, Pourgheysari B, Hasheminia A, Boroujeni PR, Drees F. Effect of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa PLA2 Polymorphism on Severity of Pulmonary Thromboembolism. *Tanaffos.* 2014; 13: 14–22.
  110. Kvasnicka T, Bobickova P, Malikova I, Hajkova J, Zima T, Ulrych J, et al. The Frequencies of Ten Platelet Polymorphisms Associated with Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients with Venous Thromboembolism: A Population-Based Case-Control Study. *Hered Genet.* 2015; 04: 153.
  111. Estavillo D, Ritchie A, Diacovo TG, Cruz MA. Functional Analysis of a Recombinant Glycoprotein Ia/IIa (Integrin  $\alpha 2 \beta 1$ ) I Domain That Inhibits Platelet Adhesion to Collagen and Endothelial Matrix under Flow Conditions. *J Biol Chem.* 1999; 274: 35921–6.
  112. Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 392–6.
  113. Ajzenberg N, Berroeta C, Philip I, Grandchamp B, Ducellier P, Huart V, et al. Association of the -92C/G and 807C/T polymorphisms of the  $\alpha 2$  subunit gene with human platelets  $\alpha 2 \beta 1$  receptor density. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1756–60.
  114. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C. Genetic Polymorphisms of Platelet Glycoprotein Ia and the Risk for Premature Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 1959–66.
  115. Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Association of



- Human Platelet Alloantigen 1 through 5 Polymorphisms with Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2008; 25: 81–6.
116. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 178–88.
  117. Ulrichts H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, Vauterin S, Kroll H, Santoso S, et al. Von Willebrand Factor But Not  $\alpha$ -Thrombin Binding to Platelet Glycoprotein Ib $\alpha$  Is Influenced by the HPA-2 Polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1302–7.
  118. Vicente V, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$  associated with arterial thrombotic disease. *Blood.* 1998; 92: 2771–6.
  119. Sonoda A, Murata M, Ito D, Tanahashi N, Ohta A, Tada Y, et al. Association between platelet glycoprotein Ib $\alpha$  genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2000; 31: 493–7.
  120. Ni W, He J, Wang H, Liu T. Association of Platelet Membrane Glycoprotein HPA-2a/b, GP VI T13254C, and GP Ib  $\alpha$  VNTR Polymorphisms with Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 1–8.
  121. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989; 73: 1109–12.
  122. Kappelmayer J, Nagy B. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 1–18.
  123. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation.* 2001; 103: 491–5.
  124. Wagner DD, Burger PC. Platelets in Inflammation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2131–7.
  125. Gawaz M, Langer H, May AE, Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis Find the latest version : Review series Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3378–84.
  126. Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Klüter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 997–1004.
  127. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1277–84.
  128. Tregouet DA, Barboux SC, Escolano S, Tahri. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 2015–23.
  129. Zhou DH, Wang Y, Hu WN, Wang LJ, Wang Q, Chi M, et al. SELP genetic polymorphisms may contribute to the pathogenesis of coronary heart disease and myocardial infarction: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014; 41: 3369–80.
  130. Uitte De Willige S, De Visser MCH, Vos HL, Houwing-duistermaat JJ, Rosendaal FR, Bertina RM. Selectin haplotypes and the risk of venous thrombosis: Influence of linkage

- disequilibrium with the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 478–85.
131. Ay C, Jungbauer LV, Sailer T, Tengler T, Koder S, Kaider A, et al. High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin Chem.* 2007; 53: 1235–43.
  132. Tàssies P, Monteagudo TJ, Reverter CJC. Role of genetic polymorphism in selectins and tissue factor in venous thromboembolism in young patients. *Mapfre Med.* 2007; 18: 316–22.
  133. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. *J Exp Med.* 2003; 197: 1585–98.
  134. Alfonso F, Angiolillo DJ. Targeting P-selectin during coronary interventions: The elusive link between inflammation and platelets to prevent myocardial damage. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61: 2056–9.
  135. Afshar-Kharghan V, Diz-Küçükkaya R, Ludwig EH, Marian AJ, López JA. Human polymorphism of P-selectin glycoprotein ligand 1 attributable to variable numbers of tandem decameric repeats in the mucinlike region. *Blood.* 2001; 97: 3306–7.
  136. Tregouet DA, Barboux S, Poirier O, Blankenberg S, Bickel C, Escolano S, et al. SELPLG gene polymorphisms in relation to plasma SELPLG levels and coronary artery disease. *Ann Hum Genet.* 2003; 67: 504–11.
  137. Gremmel T, Koppensteiner R, Kaider A, Eichelberger B, Mannhalter C, Panzer S. Impact of variables of the P-selectin – P-selectin glycoprotein ligand-1 axis on leukocyte-platelet interactions in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2015; 113: 806–12.
  138. Živković M, Kolaković A, Radak D, Dinčić D, Radak S, Djurić T, et al. The sex-specific association of Met62Ile gene polymorphism in P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) with carotid plaque presence: Preliminary study. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 6479–85.
  139. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis.* 2007; 195: 5–11.
  140. Schmalbach B, Stepanow O, Jochens A, Riedel C, Deuschl G, Kuhlenbäumer G. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2015; 39: 176–80.
  141. Tao L, Changfu W, Linyun L, Bing M, Xiaohui H. Correlations of platelet-leukocyte aggregates with P-selectin S290N and P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I genetic polymorphisms in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2016; 367: 95–100.
  142. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 1004–8.
  143. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.

- Nature. 1994; 369: 64–7.
144. Dahlbäck B. Advances in understanding mechanisms of thrombophilic disorders. *Hamostaseologie*. 2020; 40: 12–21.
  145. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995; 346: 1133–4.
  146. Zöller B, Norlund L, Leksell H, Nilsson JE, von Schenck H, Rosén U, et al. High prevalence of the FVR506Q mutation causing APC resistance in a region of southern Sweden with a high incidence of venous thrombosis. *Thromb Res*. 1996; 83: 475–7.
  147. Coen D, Zadro R, Honovic L, Banfic L, Stavljenic Rukavina A. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. *Croat Med J*. 2001; 42: 488–92.
  148. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, et al. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case-control study. *Biochem Medica*. 2010; 20: 229–35.
  149. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*. 1995; 85: 1504–8.
  150. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost*. 2015; 114: 885–9.
  151. Koster T, Vandenbroucke J, Rosendaal F, de Ronde H, Briët E, Bertina R. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet*. 1993; 342: 1503–6.
  152. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism: A meta-analysis involving ~120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 360–70.
  153. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism: Pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 809–16.
  154. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the Gene Coding for Coagulation Factor V and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in Apparently Healthy Men. *N Engl J Med*. 1995; 332: 912–7.
  155. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: A systematic review. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 729–36.
  156. Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AHM, Levi M, Büller HR, Peters RJG. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: A systematic review. *Circulation*. 2001; 104: 3063–8.
  157. Mannucci PM, Merlini PA, Ardissino D, Barzuini C, Bernardi F, Bernardinelli L, et al. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development

- of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation*. 2003; 107: 1117–22.
158. Cushman M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, et al. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: Results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 912–5.
  159. Margaglione M, D’Andrea G, Giuliani N, Brancaccio V, De Lucia D, Grandone E, et al. Inherited prothrombotic conditions and premature ischemic stroke: Sex difference in the association with factor V Leiden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 1751–6.
  160. Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Tentschert S, Lang W, et al. Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. *Stroke*. 2005; 36: 1405–9.
  161. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3’-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; 88: 3698–703.
  162. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, et al. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood*. 2000; 95: 2780–5.
  163. Jadaon MM. Epidemiology of prothrombin G20210A mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011; 3:e2011054.
  164. Gonzalez JV., Barboza AG, Vazquez FJ, Gándara E. Prevalence and Geographical Variation of Prothrombin G20210A Mutation in Patients with Cerebral Vein Thrombosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11: e0151607.
  165. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of Genetic Studies in Ischemic Stroke. *Arch Neurol*. 2004; 61: 1652.
  166. Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes. 2009; 114: 937–51.
  167. Krause T, Lovibond K, Caulfield M, McCormack T, Williams B. Management of hypertension: Summary of NICE guidance. *BMJ*. 2011; 343: 1–6.
  168. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010; 33: S62–9.
  169. Graham I. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Executive summary. *Atherosclerosis*. 2007; 194: 1–45.
  170. Yew KS, Cheng E. Acute stroke diagnosis. *Am Fam Physician*. 2009; 80: 33–40.
  171. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation*. 2012; 126: 2020–35.
  172. Antopolsky M, Hiller N, Salameh S, Goldshtein B, Stalnikowicz R. Splenic infarction: 10 years of experience. *Am J Emerg Med*. 2009; 27: 262–5.
  173. Jin J. Testing for Carotid Stenosis. *JAMA*. 2015; 313: 212.

174. Kasapis C, Gurm HS. Current Approach to the Diagnosis and Treatment of Femoral-Popliteal Arterial Disease. A Systematic Review. *Curr Cardiol Rev.* 2010; 5: 296–311.
175. Belci D, Zoričić D, Perkov T, Milevoj-Ražem M, Žužek A, Rogulj G, et al. Antenatalni testovi i ishodi trudnoća s teškim zastojem fetalnog rasta koje su prijevremeno dovršene elektivnim carskim rezom- Iskustva Opće bolnice Pula. *Glas.pul.boln.* 2008; 5: 98–103.
176. Banfic L. Guidelines on diagnosis, treatment and prevention of venous thrombosis. *Cardiol Croat.* 2016; 11: 351–74.
177. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2014; 35: 3033–80.
178. Saposnik G, Barinagarrementeria F, Brown RD, Bushnell CD, Cucchiara B, Cushman M, et al. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011; 42: 1158–92.
179. Rehak M, Wiedemann P. Retinal vein thrombosis: Pathogenesis and management. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1886–94.
180. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
181. 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: 745–51.
182. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002; 30: 503–12.
183. Ficko T, Galvani V, Ruprecht R, Dovic T, Rožman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. *Transfus Med.* 2004; 14: 425–32.
184. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest.* 1994; 94: 2521–4.
185. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stravinoha M i sur. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Hrv zavod za javno Zdr. 2020; Bilten 42: 1–34.
186. Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol.* 2016; 9: 18.
187. Brodmann S, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A, Skoda RC. Myeloproliferative disorders: Complications, survival and causes of death. *Ann Hematol.* 2000; 79: 312–8.
188. Karaköse S, Oruç N, Zengin M, Akarca US, Ersöz G. Diagnostic value of the JAK2 V617F mutation for latent chronic myeloproliferative disorders in patients with budd-chiari syndrome and/or portal vein thrombosis. *Turkish J Gastroenterol.* 2015; 26: 42–8.

189. Stein BL, Rademaker A, Spivak JL, Moliterno AR. Gender and Vascular Complications in the JAK2 V617F-Positive Myeloproliferative Neoplasms. *Thrombosis*. 2011; 2011: 1–8.
190. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, 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: 1703–8.
191. Scott BL, Gooley TA, Sorrow ML, Rezvani AR, Linenberger ML, Grim J, et al. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012; 119: 2657–64.
192. Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Palumbo GA, Breccia M, Sabattini E, et al. Comparison of JAK2 V617F -positive essential thrombocythaemia and early primary myelofibrosis: The impact of mutation burden and histology. *Hematol Oncol*. 2018; 36: 269–75.
193. Geyer HL, Kosiorek H, Dueck AC, Scherber R, Slot S, Zweegman S, et al. Associations between gender, disease features and symptom burden in the MPN population: An analysis by the MPN QOL International Working Group. *Haematologica*. 2017; 102: 85–93.
194. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004; 117: 755–61.
195. Schwarz J, Ovesná P, Černá O, Kissová J, Soukupová JM, Brychtová Y, 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: 98–106.
196. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, et al. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2008; 112: 3135–7.
197. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007; 109: 2446–52.
198. Lekovic D, Gotic M, Milic N, Miljic P, Mitrovic M, Cokic V, et al. The importance of cardiovascular risk factors for thrombosis prediction in patients with essential thrombocythemia. *Med Oncol*. 2014; 31: 231.
199. Accurso V, Santoro M, Mancuso S, Contrino AD, Casimio P, Sardo M, et al. Cardiovascular Risk in Essential Thrombocythemia and Polycythemia vera: Thrombotic Risk and Survival. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2020; 12: e2020008.
200. Ha JS, Kim YK, Jung S Il, Jung HR, Chung IS. Correlations between Janus kinase 2 V617F allele burdens and clinicohematologic parameters in myeloproliferative neoplasms. *Ann Lab Med*. 2012; 32: 385–91.

201. Sykes TCF. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease. *Mol Pathol.* 2000; 53: 300–6.

## 9. ŽIVOTOPIS

Ivana Horvat je rođena 1982. godine u Zagrebu. Nakon završetka srednje škole u Samoboru, upisuje studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod nazivom „Evaluacija testa D-dimer HS na instrumentu ACL TOP“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Zadro brani 2007. godine. Pripravnički staž obavlja 2007. - 2008. godine u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Od 2009. - 2010. radi u Klinici za traumatologiju. Od 2010. godine radi u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb kao specijalizant medicinske biokemije i laboratorijske medicine, te iste godine upisuje poslijediplomski specijalistički studij i poslijediplomski doktorski studij. 2014. godine polaže specijalistički ispit i stječe naziv specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Kao vanjski suradnik sudjeluje u izvođenju nastave na dodiplomskom te poslijediplomskim studijima na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Od 2011. - 2017. godine sudjeluje u izvođenju vježbi za studente Studija medicinske biokemije na kolegiju „Hematologija I“. Od 2012. - 2016. godine sudjeluje u izvođenju vježbi za studente Studija farmacije na kolegiju „Medicinska biokemija s hematologijom“. Od 2016. - 2017. sudjelovala je u izvođenju vježbi za studente Studija medicinske biokemije na kolegiju „Hematologija II“. 2015. godine bila je suradnik u izvođenju vježbi i seminara u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija „Molekularna dijagnostika“ iz kolegija „Molekularna dijagnostika u hematologiji“ i kolegija „Molekularna dijagnostika poremećaja zgrušavanja“. Od 2015. godine na dalje sudjeluje na poslijediplomskom specijalističkom studiju „Medicinska biokemija i laboratorijska medicina“ u držanju dijela predavanja i seminara za kolegij „Novosti u laboratorijskoj hematologiji i imunohematologiji“.

Ivana Horvat bila je suradnica na istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost IP-2014-09-2047 „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“.

Kao autor ili koautor objavila je 8 znanstvenih radova i 2 stručna rada, od čega je 5 citirano u bazi Current Contents i 33 kongresnih priopćenja.



Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu te Hrvatske kooperativne hematološke grupe (KROHEM) u čijem radu aktivno sudjeluje držanjem predavanja i pisanjem stručnih tekstova.

## Popis radova:

Radovi indeksirani u CC časopisima:

1. Milos M, Herak Coen D, Kuric L, **Horvat I**, Zadro R. Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer –HemosIL reagents. *Int J Lab Hematol*. 2009; 31: 26-35
2. Coen Herak D, Lenicel Krleza J, Radic Antolic M, **Horvat I**, Djuranovic V, Zrinski Topic R, Zadro R. Association of Polymorphisms in Coagulation Factor Genes and Enzymes of Homocysteine Metabolism With Arterial Ischemic Stroke in Children. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23: 1042-51.
3. Krecak I, Gveric-Krecak V , Roncevic P, Basic-Kinda S, Gulin J , Lopic I, Fumic K, Ilic I, **Horvat I**, Zadro R, Holik H, Coha B, Peran N, Aurer I, Durakovic N. Serum chitotriosidase: a circulating biomarker in polycythemia vera. *Hematology*. 2018; 23: 793-802.
4. **Horvat I**, Boban A, Zadro R, Radic Antolic M Serventi-Seiwerth R, Roncevic P, Radman I, Sertic D, Vodanovic M, Pulanic D, Basic-Kinda S, Durakovic N, Zupancic-Salek S, Vrhovac R, Aurer I, Nemet D, Labar B. The influence of blood count, cardiovascular risks, inherited thrombophilia and JAK2 V617F burden allele on the type of thrombosis in patients with Ph(-) myeloproliferative Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019; 19: 53-63.
5. Ceri A, Pavic M, **Horvat I**, Radic Antolic M, Zadro R. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis. *J Clin Lab Anal*. 2019; 33: e22698.

Radovi u ostalim časopisima:

1. **Horvat I**, Radic Antolic M, Zadro R, Sertic D, Labar B. Clinical significance of T315I ABL kinase domain mutation detection in patients resistant to imatinib mesylate therapy. *Biochem Med* 2010; 20: 75-81.
2. Tkalčić Švabek Ž, Josipović M, **Horvat I**, Zadro R, Davidović M, Mrišić S. The incidence of atypical patterns of BCR-ABL1 rearrangement and molecular-cytogenetic response to tyrosine kinase inhibitor therapy in newly diagnosed cases with chronic myeloid leukemia (CML). *Blood Res*. 2018; 53: 152-159.
3. **Horvat I**, Boban A, Radić Antolic M, Rončević P, Zadro R.

Dvije kvantitativne metode za mjerenje opterećenja mutiranim alelom V617F u genu za JAK2: Usporedba rezultata. Zbornik Sveučilišta Libertas. 2019; 4: 61-72

Popis stručnih tekstova:

1. **Horvat I**, Radić Antolic M, Zadro R. Preporuke za izražavanje rezultata pretrage kvantitativnog PCR bcr-abl1 u svrhu praćenja minimalne ostatne bolesti i procjene dubokog molekularnog odgovora kod KML bolesnika. Bilten KROHEMA. 2015; 7: 6-8.
2. **Horvat I**, Radić Antolic M, Zadro R. Klinička značajnost kvantifikacije mutacije V617F u bolesnika s Ph(-) MPN. Bilten KROHEMA. 2016; 8: 3-6.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## PROTROMBOTIČKI RIZIČNI FAKTORI U BOLESNIKA S PH NEGATIVNIM MIJELOPROLIFERATIVNIM ZLOĆUDNIM TUMORIMA

Ivana Horvat

### SAŽETAK

Ph(-) mijeloproliferativni zloćudni tumori (MPN) dijele se na esencijalnu trombocitozu (ET), policitemiju veru (PV) i primarnu mijelofibrozu (PMF). Tromboza se pojavljuje u 20 – 40 % bolesnika što je čini najčešćom komplikacijom ovih bolesti. Cilj istraživanja bio je utvrditi genetičke i hematološke rizične faktore koji doprinose nastanku tromboze. U tu svrhu, uz detaljnu anamnezu analizirali smo uzorke 258 Ph(-) MPN bolesnika (134 ET, 70 PV i 54 PMF) i 258 zdravih kontrola (bez tromboze) uparenih po dobi i spolu. Odgovarajućom metodom polimerazne lančane reakcije (PCR) ispitane su učestalosti polimorfizama *FV* Leiden, *FII* G20210A, ljudskih trombocitnih antigena (*HPA*-1, -2, -3, -5), P-selektina (*P-SEL* S290N, N562D, V599L, T715P) i P-selektin-glikoprotein-1-liganda (*PSGL-1* M62I). Uz to je bolesnicima pri dijagnozi napravljena krvna slika i PCR metodom s alel specifičnim početnicama utvrđen je status mutacije V617F u genu *JAK2* te je u bolesnika pozitivnih na mutaciju PCR metodom u stvarnom vremenu kvantificirano opterećenje mutiranim alelom. Od 79 bolesnika s trombozom, 59 je imalo arterijsku (29 ET, 19 PV i 11 PMF), a 26 bolesnika vensku trombozu (10 ET, 8 PV i 8 PMF). U ET bolesnika leukocitoza, hiperlipidemija i mutacija V617F povećavali su rizik za nastanak tromboze, dok su nositelji alela *HPA-5b* imali niži rizik. U PV bolesnika rizik za trombozu bio je viši u onih sa šećernom bolesti dok su nositelji alela *HPA-2b* imali puno niži rizik. U PMF bolesnika rizik za trombozu bio je viši u nositelja alela 290N. Ovo istraživanje doprinijelo je novim saznanjima o etiologiji nastanka tromboze u Ph(-) MPN bolesnika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 196 stranica, 56 slika, 74 tablice i 201 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ph(-) MPN, tromboza, krvna slika, polimorfizmi gena *P-SEL*, *PSGL-1* i *HPA*, *FV* Leiden, *FII* G20210A, mutacija V617F

Mentor: dr. sc. Renata Zadro, red. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Nada Vrkić, viša znanstvena suradnica  
dr. sc. József Petrik, red. prof.  
dr. sc. Mirna Sučić, red. prof

Rad je prihvaćen: 21.10.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### PROTHROMBOTIC RISK FACTORS IN PATIENTS WITH PH NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Ivana Horvat

#### SUMMARY

Ph(-) myeloproliferative neoplasms (MPN) are divided into three different entities including Essential thrombocythemia (ET), Polycythemia vera (PV) and Primary myelofibrosis (PMF). Thrombosis as the most common complication occurs in about 20-40% of patients. Aim of this study was to investigate genetic and hematologic prothrombotic risk factors in Ph(-) MPN patients.

For this purpose we analyzed anamnestic status and blood samples of 258 Ph(-) MPN adult patients (134 ET, 70 PV and 54 PMF) and 258 healthy controls (without thrombosis) matched by age and sex. Different types of polymerase chain reactions (PCR) were performed for detection of *FV* Leiden, *FII* G20210A, human platelet antigens (*HPA*-1, -2, -3, -5), P-selectin (*P-SEL* S290N, N562D, V599L, T715P) and P-selectin glycoprotein 1 ligand (*PSGL-1* M62I) polymorphisms. Blood counts were performed at diagnosis as well as detection of V617F mutation in *JAK2* gene by allele specific PCR, and for V617F positive patients mutation burden allele was determined by real time quantitative PCR. Seventy-nine patients experienced 109 thrombotic events in total, 59 patients (29 ET, 19 PV and 11 PMF) had arterial thrombosis and 26 patients (10 ET, 8 PV and 8 PMF) venous thrombosis. In the group of ET patients leukocytosis, hyperlipidemia and V617F mutation increased risk for thrombosis, while for carriers of *HPA-5b* allele this risk was decreased. In PV patients those with diabetes had higher risk for thrombosis while in carriers of *HPA-2b* risk was much lower. PMF patients with allele 290N had higher risk for thrombosis. This study brought some new findings of the thrombosis etiology in Ph(-) MPN patients.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 196 pages, 56 figures, 74 tables and 201 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ph(-) MPN, thrombosis, blood counts, polymorphisms, *P-SEL*, *PSGL-1*, *HPA*, *FV* Leiden, *FII* G20210A, V617F mutation

Mentor: Full Professor Renata Zadro, Ph.D.

Reviewers: Senior Research Associate Nada Vrkić, Ph.D.  
Full Professor József Petrik, Ph.D.  
Full Professor Mirna Sučić, Ph.D.

The thesis was accepted: October 21<sup>th</sup>, 2020