

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Тијана М. Суботички

Анализа експресије eNOS и ангиогених
фактора HIF-1 α и VEGF у
мијелопролиферативним неоплазмама:
веза са присуством мутација у генима за
JAK2 и CALR

докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tijana M. Subotički

Analysis of the expression of eNOS and
angiogenic factors HIF-1 α and VEGF in
myeloproliferative neoplasms: a connection
with the presence of mutations in the genes
for JAK2 and CALR

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

МЕНТОРИ:

др Оливера Митровић Ајтић, научни сарадник

Институт за медицинска истраживања

Универзитет у Београду

др Маја Чакић Милошевић, доцент

Биолошки факултет

Универзитет у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Владан Чокић, научни саветник

Институт за медицинска истраживања

Универзитет у Београду

Датум одбране _____

Ова докторска дисертација је у целини урађена у Групи за молекуларну онкологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ (ОИ175053), који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЗАХВАЛНИЦА

Др Оливери Митровић Ајтић дугујем огромну захвалност за залагање, труд, разумевање и сугестије приликом израде ове дисертације а пре свега за пријатељство током свих претходних година, што делимо и узајамно радосним чинимо наше путеве.

Др Владану Чокићу дугујем велику захвалност за пружену прилику, велику подршку, за све корисне сугестије и смернице које су учиниле да ова дисертација добије свој смисао.

Др Маји Чакић Милошевић, доценту Биолошког факултета у Београду, захваљујем на корисним сугестијама које су допринеле реализацији ове докторске дисертације.

Проф. др Мирјани Готић и др Данијели Лековић са Института за хематологију Клиничког центра Србије, дугујем велику захвалност на помоћи око организовања и прибављања узорака за израду ове дисертације.

Др Бојани Белеслин-Чокић из Лабораторије за генетику, Клинике за ендокринологију Клиничког центра Србије, захваљујем на помоћи у анализи мутационог статуса болесника са МПН.

Др Милеви Мићић дугујем захвалност на несебичној помоћи и ангажовању приликом реализације ове дисертације.

Захвалност дугујем и својим пријатељима из Групе за молекуларну онкологију, др Драгослави Ђикић, Милошу Диклићу и Сунчици Бјелици, који су ми на различите начине помогли да завршим ову дисертацију, као и на огромној подршци и разумевању.

Неизмерну захвалност дугујем својим родитељима, Јелени и Миломиру, на безрезервној подршци и љубави, који су ми давали снаге да сигурно корачам кроз живот и испуњавам своје циљеве.

Милану, што је мој сапутник и у свим далекосежнијим, свеобухватнијим и дубљим везама и свему што оне доносе и то присутно, стрпљиво и истрајно. На Лени.

Лени. Њено постојање је довољан и највећи разлог.

Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 α и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR

Резиме

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) представљају клоналне болести матичних ћелија хематопоезе које карактерише поремећај пролиферације једне или више мијелоидних ћелијских линија. МПН обухватају 3 ентитета: полицитемију веру (ПВ), есенцијалну тромбоцитемију (ЕТ) и примарну мијелофиброзу (ПМФ). Најзаступљенији поремећај код МПН је JAK2V617F мутација која је присутна код 97% пацијената са дијагнозом ПВ и 50-60% пацијената са дијагнозама ЕТ и ПМФ. JAK2V617F мутација индукује конститутивну активацију нисходних сигналних путева (JAK2/STAT3, PI3K/AKT, MAPK) који су укључени у мијелопролиферацију. Друга најзаступљенија соматска мутација, која је присутна код већине JAK2V617F негативних ЕТ и ПМФ пацијената, повезана је са геном који кодира калретикулин (CALR) присутна код 31,9% ЕТ и 31,7% ПМФ пацијената. Код различитих хематолошких малигнитета, укључујући и МПН, као одраз појачане ангиогенезе, описано је присуство повишене експресије фактора раста васкуларног ендотела (VEGF). У новијим истраживањима показана је веза између експресије VEGF гена и нивоа хипоксија-индуцибилног фактора-1 (HIF-1) азот монооксида (NO). Неколико студија до сада је показало да NO може индуковати продукцију VEGF путем PI3K/Akt/PKB/HIF-1 α пута, али и да делује као инхибитор HIF-1 α експресије.

Циљ истраживања ове дисертације било је испитивање степена експресије и корелација кључних ангиогених фактора - HIF-1 α , VEGF и ендотелне NO синтазе (eNOS) у костној сржи, CD34⁺ ћелијама и гранулоцитима МПН пацијената према JAK2 и CALR статусу и терапији. Поред тога, користили смо проинфламаторни IL-6 да индукујемо експресију HIF-1 α , VEGF и eNOS у хуманој HEL 92.1.7 ћелијској линији са JAK2 мутацијом, као и у диферентованим макрофагама. Такође испитивано је учешће различитих сигналних путева (JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK) путем којих IL-6 остварује своје ефекте, на моделу HEL ћелијске линије као и код гранулоцита МПН пацијената.

Резултати ове студије су показали да ангиогени фактори имају израженију експресију у гранулоцитима него у CD34⁺ и ћелијама костне сржи, што указује на значај инфламаторних гранулоцита у развоју ангиогенезе. Показана је и значајна негативна корелација између протеинске експресије HIF-1 α и VEGF, као и HIF-1 α и eNOS, док између VEGF и eNOS постоји значајна позитивна корелација код гранулоцита МПН пацијената. Стандардно лечење применом хидроксиуреје код МПН пацијената има антиангиогени потенцијал у смислу смањења сва три ангиогена фактора – HIF-1 α , VEGF и eNOS у гранулоцитима.

IL-6 повећава експресију сва три ангиогена фактора у JAK2V617F мутираним HEL ћелијама као и диференцираним макрофагама. Поред тога, JAK1/2 инхибитор руксолитиниб показује јачу и стабилнију стимулацију ангиогених фактора него JAK2 специфични инхибитор 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан и код HEL ћелија и код диференцираних макрофага. IL-6 показује JAK2V617F зависност у активацији MAPK сигналног пута код МПН, док руксолитиниб снажно активира MAPK пут код ЕТ и ПМФ пацијената, независно од JAK2 мутације. IL-6 и оба JAK1/2 инхибитора редукују број HEL ћелија у Г2/М фази ћелијског циклуса и такође доводе до појачане апоптозе код МПН пацијената, IL-6 зауставља гранулоците у С фази ћелијског циклуса, појачавајући ДНК репликацију и спречавајући апоптозу преко JAK1/2 стимулације. Ћелијски циклус у гранулоцитима код ПВ пацијената је у контрасту у односу на ЕТ и ПМФ пацијенте, без утицаја JAK2 мутације, изузев апоптозе код ЕТ пацијената. Оба JAK1/2 инхибитора појачавају апоптозу у гранулоцитима код ПВ пацијената.

Фактори ангиогенезе стимулирани инфламацијом су повећани код МПН и смањују се применом хемиотерапије. Инфламација стимулише ДНК репликацију и JAK1/2 зависну пролиферацију, карактеристично појачану код МПН.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: мијелопролиферативне неоплазме, ангиогенеза, HIF-1 α , VEGF, eNOS, IL-6, STAT3, Akt, MAPK

НАУЧНА ОБЛАСТ: БИОЛОГИЈА

УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ: БИОЛОГИЈА ЋЕЛИЈА И ТКИВА

Analysis of the expression of eNOS and angiogenic factors HIF-1 α and VEGF in myeloproliferative neoplasms: a connection with the presence of mutations in the genes for JAK2 and CALR

ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal diseases of stem cell hematopoiesis characterized by a disorder of proliferation of one or more myeloid cell lines. MPNs include 3 entities: polycythemia (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The most common disorder in MPN is the *JAK2V617F* mutation present in 97% of patients diagnosed with PV and 50-60% of patients with ET and PMF diagnoses. The *JAK2V617F* mutation induces the constituent activation of the innate signal pathways (JAK2 / STAT3, PI3K / AKT, MAPK) involved in myeloproliferation. The second most common somatic mutation, which is present in most *JAK2V617F* negative ET and PMF patients, is associated with the calreticulin (CALR) encoding genome present in 31.9% ET and 31.7% of PMF patients. In the case of various hematological malignancies, including MPN, as a reflection of increased angiogenesis, the presence of elevated expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) has been described. Recent studies have shown the relationship between the expression of the VEGF gene and the levels of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and nitrogen monoxide (NO). Several studies have so far shown that NO can induce the production of VEGF via PI3K / Akt / PKB / HIF-1 α times, but also acts as an inhibitor of HIF-1 α expression.

The aim of the study was to investigate the degree of expression and correlation of key angiogenic factors - HIF-1 α , VEGF and endothelial NO synthase (eNOS) in the bone marrow, CD34⁺ cells and granulocytes of MPN patients according to JAK2 and CALR status and therapy. In addition, we used proinflammatory IL-6 to induce the expression of HIF-1 α , VEGF and eNOS in the human HEL 92.1.7 cell line with a JAK2 mutation, as well as in differentiated macrophages. Also studied was the participation of various signaling pathways (JAK2 / STAT3, PI3K / Akt, MAPK) through which IL-6 achieved its effects on the HEL cell line model as well as in granulocyte of MPN patients.

The results of this study have shown that angiogenic factors have a more pronounced expression in granulocytes than in CD34⁺ and bone marrow cells, which indicates the importance of inflammatory granulocytes in the development of angiogenesis. A significant negative correlation between HIF-1 α and VEGF protein expression, as well as HIF-1 α and eNOS, was shown, while there was a significant positive correlation between VEGF and eNOS in granulocytes of MPN patients. Standard treatment with hydroxyurea in MPN patients has antiangiogenic potential in terms of reducing all three angiogenic factors - HIF-1 α , VEGF and eNOS in granulocytes.

IL-6 increases the expression of all three angiogenic factors in *JAK2V617F* mutated HEL cells as well as differentiated macrophages. In addition, the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib exhibits a stronger and more stable stimulation of angiogenic factors than the JAK2 specific inhibitor 1,2,3,4,5,6-hexabromocyclohexane, both in HEL cells and in differentiated macrophages. IL-6 shows the *JAK2V617F* dependence on the activation of the MAPK signaling pathway in MPN, while ruxolitinib actively activates the MAPK pathway in ET and PMF patients, independently of the JAK2 mutation. IL-6 and both JAK1/2 inhibitors reduce the number of HEL cells in the G2/M phase of the cell cycle and also lead to increased apoptosis. In MPN patients, IL-6 stops granulocytes in the S phase of the cell cycle, enhancing DNA replication and preventing apoptosis through JAK1/2 stimulation. The cell cycle in granulocytes in PV patients contrasts with ET and PMF patients, without the influence of the JAK2 mutation, except for apoptosis in ET patients. Both JAK1/2 inhibitors enhance apoptosis in granulocytes in PV patients.

Inflammation-stimulated angiogenesis factors have been increased in MPN and decreased by the use of chemotherapy. Inflammation stimulates DNA replication and JAK1/2 dependent proliferation, characteristically enhanced by MPN.

KEY WORDS: myeloproliferative neoplasm, angiogenesis, HIF-1 α , VEGF, eNOS, IL-6, STAT3, Akt, MAPK

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SPECIAL TOPICS: CELL AND TISSUE BIOLOGY

Садржај

1. УВОД	1
1.1 Хематопоеза	2
1.1.1. Матичне ћелије хематопоезе.....	3
1.2 Хроничне мијелопролиферативне неоплазме	4
1.2.1. Полицитемија вера	5
1.2.2. Есенцијална тромбоцитемија.....	6
1.2.3. Примарна мијелофиброза.....	7
1.2.4 Морфологија костне сржи код МПН пацијената	7
1.3 Ангиогенеза.....	8
1.3.1. Фактори регулације ангиогенезе	9
1.3.2. Хипоксија и ангиогенеза	12
1.3.3. Регулација експресије VEGF хипоксијом.....	14
1.3.4. Регулација експресије VEGF азот моноксидом	15
1.3.5 Улога Wnt/ β -катенин сигналног пута и PPAR γ фактора у регулацији ангиогенезе	16
1.3.6 Улога макрофага у регулацији ангиогенезе	17
1.4 Јанус Киназа 2 и ЈАК-СТАТ сигнални пут.....	18
1.4.1. PI3K/Akt и MAPK сигнални путеви	23
1.4.2. Мутација у гену за калретинулин	26
1.5 Циторедуктивно лечење код МПН	27
1.6 Инхибитори Јанус киназе у лечењу МПН.....	28
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1 Материјал.....	33
3.1.1. Испитаници.....	33
3.2 Дизајн експеримента	35
3.2.1. Утврђивање нивоа експресије ангиогених фактора у периферној крви и костној сржи МПН пацијената.....	35
3.2.2. Утврђивање нивоа експресије β -катенина, PPAR γ и Ki67 протеина у костној сржи МПН пацијената.....	35
3.2.3. Испитивање деловања хидроксиуреје и ЈАК инхибитора на експресију ангиогених фактора.....	36
3.2.4. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6 и ЈАК инхибитора на еритролеукемијским ћелијама	36
3.2.5. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6 и ЈАК инхибитора на гранулоците МПН пацијената <i>in vitro</i>	36
3.3 Ћелије и ћелијске културе.....	37
3.3.1. Изолација гранулоцита и CD34 ⁺ ћелија из периферне крви	37
3.3.2. Ћелијска линија	38
3.4 Анализа ЈАК2V617F и мутације у гену за CALR.....	38

3.4.1. Секвенцирање PCR производа	38
3.4.2. Испитивање присуства JAK2V617F мутације	39
3.4.3. Испитивање присуства мутације у гену за CALR	40
3.5. Анализа експресије гена помоћу реакције реверзне транскрипције и „REAL-TIME“ PCR (qPCR) методе	41
3.5.1. Одређивање степена експресије eNOS гена применом qRT-PCR методе	43
3.5.2. Одређивање степена експресије HIF-1 α и VEGF гена применом qRT-PCR методе	44
3.6. Анализа експресије протеина	45
3.6.1. Western blot анализа експресије протеина	45
3.6.2. Имуноцитохемијска анализа степена експресије протеина	46
3.7. Имунохистохемијска анализа	47
3.8. Ултраструктурна анализа узорака костне сржи пацијената са МПН	48
3.9. Анализа ћелијског циклуса у гранулоцитима и HEL ћелијама <i>in vitro</i> применом проточне цитометрије	49
3.10. Статистичка обрада резултата	49
4. РЕЗУЛТАТИ	50
4.1. Резултати клиничких испитивања	51
4.1.1. Основна обележја испитаника са МПН	51
4.1.2. JAK2 и CALR мутациони статус испитаника са МПН	52
4.2. Ниво генске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената	54
4.2.1. Степен генске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	54
4.2.2. Степен генске експресије HIF-1 α у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	55
4.2.3. Степен генске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	55
4.2.4. Степен генске експресије VEGF у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	56
4.2.5. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	57
4.2.6. Степен генске експресије eNOS у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације	57
4.2.7. Степен генске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR	58
4.2.8. Степен генске експресије HIF-1 α у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR	59
4.2.9. Степен генске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR	60
4.2.10. Степен генске експресије VEGF у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR	60
4.2.11. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR	61

4.2.12. Степен генске експресије eNOS у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	62
4.3 Степен протеинске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената добијен применом Western blot методе.....	62
4.3.1. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	63
4.3.2. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	64
4.3.3. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAKV617F мутацију.....	66
4.3.4. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	67
4.3.5. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	67
4.3.6. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	68
4.4 Степен протеинске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената добијен применом имуноцитохемијске методе.....	69
4.4.1. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	69
4.4.2. Степен протеинске експресије HIF-1 α у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	70
4.4.3. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	71
4.4.4. Степен протеинске експресије VEGF у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	73
4.4.5. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	74
4.4.6. Степен протеинске експресије eNOS у CD34 ⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију.....	75
4.4.7 Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR.....	75
4.4.8. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR.....	76
4.4.9. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR.....	77
4.5 Степен експресије ангиогених фактора у костној сржи МПН пацијената.....	78
4.5.1. Степен експресије HIF-1 α протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације.....	79
4.5.2. Степен експресије VEGF протеина у узорцима костне сржи односу на присуство JAK2V617F мутације.....	81
4.5.3. Степен експресије eNOS протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације.....	82

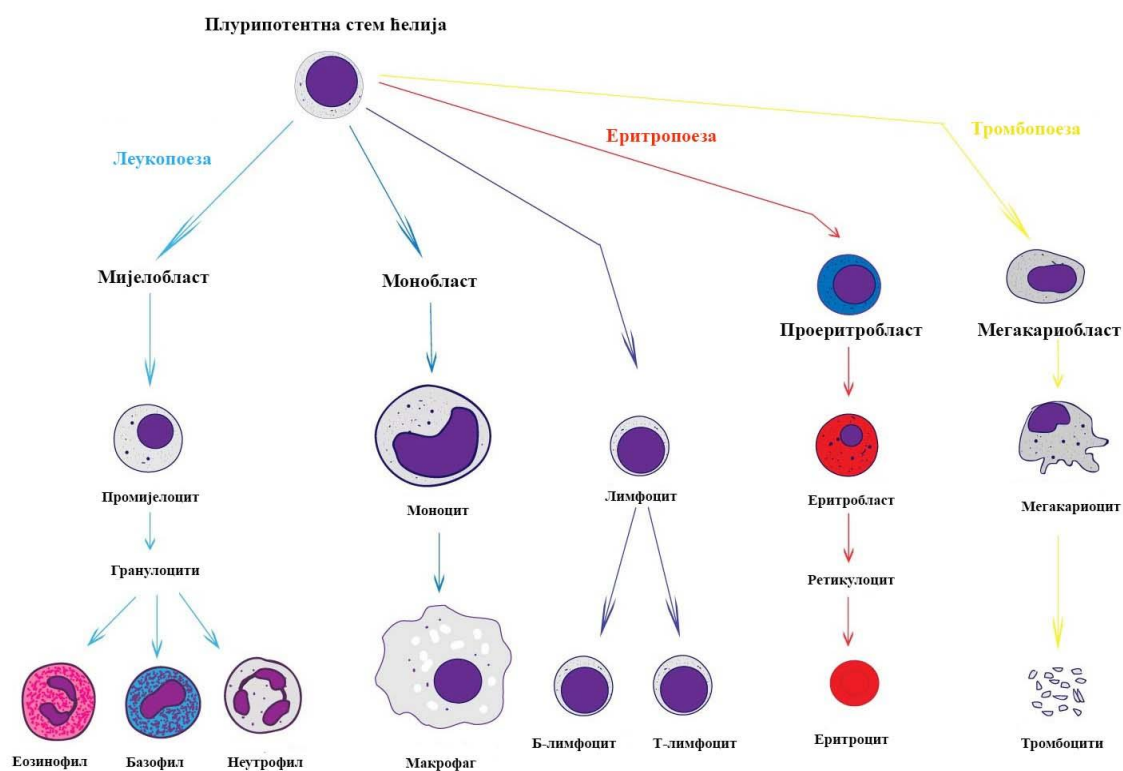
4.5.4. Степен експресије HIF-1 α протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	84
4.5.5. Степен експресије VEGF протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	84
4.5.6. Степен експресије eNOS протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR.....	85
4.6 Степен експресије β -катенина и PPAR γ у костној сржи МПН пацијената	86
4.6.1. Степен експресије β -катенина у костној сржи МПН пацијената	86
4.6.2. Степен експресије PPAR γ у костној сржи МПН пацијената	87
4.7 Индекс пролиферације – Ki67 у костној сржи МПН пацијената	87
4.8 Ултраструктурне карактеристике ћелија костне сржи МПН пацијената.....	88
4.9 Степен експресије ангиогених фактора код МПН пацијената након терапије хидроксиурејом	91
4.10 Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана хидроксиурејом и JAK2 специфичним инхибитором.....	92
4.10.1. Степен генске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана	93
4.10.2. Степен генске експресије ангиогених фактора након 48 сати третмана	93
4.10.3. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана добијен применом <i>Western blot</i> методе.....	94
4.10.4. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 48 сати третмана добијен применом <i>Western blot</i> методе.....	95
4.10.5. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана добијен применом имуноцитохемијске методе	96
4.10.6. Степен протеинске експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS након 48 сати третмана добијен применом имуноцитохемијске методе	97
4.11 Степен протеинске експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6	97
4.11.1. Диференцирање HEL ћелија у макрофаге	98
4.11.2. Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана са IL-6 добијен применом <i>Western blot</i> методе	98
4.11.3. Степен експресије ангиогених фактора у макрофагама добијен применом <i>Western blot</i> методе	101
4.12 Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима.....	103
4.12.1. Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана са IL-6, руксолитинибом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном.....	104
4.12.2. Степен експресије ангиогених фактора у макрофагама након третмана са IL-6, руксолитинибом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном	106
4.13 Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима	109
4.13.1. Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у HEL 92.1.7 ћелијама.....	110
4.13.2. Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у макрофагама	113

4.14 Активација ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима	116
4.14.1. Активација ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код пацијената са ПВ дијагнозом	116
4.14.2. Активација ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код пацијената са ЕТ дијагнозом	120
4.14.3. Активација ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код пацијената са ПМФ дијагнозом	124
4.15 Степен пролиферације и апоптозе HEL 92.1.7 ћелија након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима	128
4.16 Степен пролиферације и апоптозе гранулоцита МПН пацијената након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима	130
4.16.1. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ПВ дијагнозом	130
4.16.2. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ЕТ дијагнозом	131
4.16.3. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ПМФ дијагнозом	132
5. ДИСКУСИЈА	134
5.1 Мијелопролиферативне неоплазме – опште карактеристике анализираних групе болесника	135
5.2 Ангиогенеза код МПН	136
5.2.1. Ангиогени фактор HIF-1 α код МПН	137
5.2.2. Ангиогени фактор VEGF код МПН	138
5.2.3. Ангиогени фактор eNOS код МПН	140
5.3 β -катенин и RAR γ фактори у костној сржи МПН пацијената	142
5.4 Пролиферација у костној сржи МПН пацијената	143
5.5 Ултраструктурне карактеристике костне сржи МПН пацијената	144
5.6 Ефекат хидроксиуреје на експресију ангиогених фактора код МПН пацијената	145
5.7 Ефекат IL-6 и ЈАК1/2 инхибитора на ћелијски циклус и активацију ЈАК2/STAT3, MAPK и PI3K/Akt сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената и HEL ћелијама	146
6. ЗАКЉУЧЦИ	152
7. ЛИТЕРАТУРА	155
Прилог – Списак скраћеница	175
Биографија аутора	178

1.УВОД

1.1 Хематопоеза

Хематопоеза представља сложен процес који обухвата пролиферацију матичних ћелија крви и њихову диференцијацију у зреле ћелијске форме. Овај процес почиње у ембрионалном периоду и траје до смрти јединке, а може се поделити на пренаталну и постнаталну хематопоезу. Пренатална хематопоеза почиње у жуманчаној кеси (мезобласна фаза) већ у трећој недељи развоја. У овој фази изостаје продукција леукоцита и тромбоцита. У шестој недељи гестације хематопоеза почиње да се одвија у јетри (хепатична фаза), а нешто касније и у слезини (лиенална фаза). У хепатичној фази формирају се класични безједарни еритроцити, као и мали број леукоцита и мегакариоцита. Од шестог месеца интраутериног развоја главни хематопоезни орган постаје костна срж, мада продукција крвних ћелија у јетри и слезини траје све до рођења плода. Постнатална хематопоеза се одвија у костној сржи пљоснатих костију (медуларна фаза), али се у току појединих хематолошких болести може одвијати и на местима у којима се иначе одвија код фетуса или чак у делу костне сржи где је током развоја престала да се одвија.



Слика 1. Хематопоеза (Преузето са www.biologija.rs)

Све ћелије крви настају од заједничке матичне (плурипотентне) ћелије. Ове ћелије се ретко деле али имају висок потенцијал самообнављања. Из матичних ћелија хематопоезе пролиферацијом и диференцирањем настају ћелије које су мултипотентне за одвијање мијелопоезе (еритропоезе, гранулоцито-моноцитопоезе, мегакариоцитопоезе) и мултипотентне ћелије лимфопоезе (за Б и Т лимфоците). Из ове две лозе потиче 10 функционално различитих типова ћелија (неутрофили, моноцити/макрофаги базофили, еозинофили, еритроцити, тромбоцити, мастоцити, дендритске ћелије, Б и Т лимфоцити) (*Doulatov* и сар., 2012) (Слика 1).

1.1.1. Матичне ћелије хематопоезе

Помоћу самообнављања, тотипотентне, мултипотентне и/или плурипотентне матичне ћелије хематопоезе одржавају константност сопствене популације у костној сржи у условима физиолошке равнотеже хематопоезе, а до одређене границе и у условима када је ова равнотежа нарушена. Пролиферацијом и диференцијацијом из примитивних плурипотентних матичних ћелија хематопоезе настају најпре ћелије које су и даље плурипотентне, али са унеколико редукованим потенцијалом самообнављања. Из ћелија опредељених за две или само једну лозу, које међутим, имају веома скроман или никакав капацитет самообнављања, диференцијацијом настају морфолошки препознатљиви прогенитори који даљом диференцијацијом и сазревањем дају зреле ћелије.

Данас се матичне ћелије хематопоезе грубо деле на дуготрајно репопулишуће (енг. *Long Term Repopulating Cells - LTRCs*) и краткотрајно репопулишуће (енг. *Short Term Repopulating Cells - STRCs*). Дуготрајно репопулишуће матичне ћелије су способне да дају све ћелијске типове током целокупног живота појединца, а ако се трансплантирају и потомство испољава сличне могућности. Краткотрајно репопулишуће матичне ћелије брзо обнављају ћелије мијелоидне и/или лимфоидне лозе (*Zavidij* и сар., 2010). Мала група матичних ћелија хематопоезе производи прогениторе и зреле крвне ћелије током целокупног живота једног организма. Да би одржале тако дуготрајну хематопоезу, за матичне ћелије хематопоезе је неопходно да одржавају равнотежу између степена самообнове и диференцирања. Током процеса самообнове из једне матичне ћелије хематопоезе настају једна или две матичне ћелије хематопоезе, ћерке ћелије, што обезбеђује да сачувају свој неопходно стабилан број, кад неке од ћелија почну да се

диференцирају. Матичне ћелије хематопоезе поседују изузетно висок пролиферативно потенцијал.

CD34 антиген представља трансмембрански фосфогликопротеин који је првобитно идентификован на хематопоеетским матичним ћелијама и прогениторским ћелијама. У клиничкој пракси експресија CD34 антигена се процењује да би се обезбедило брже пресађивање у трансплантатима костне сржи а такође се може користити и као селективни маркер приликом сортирања ћелија, да би се обогатила популација незрелих хематопоеетских ћелија (*Sidney и сар.*, 2014). Иако се претпоставља да је то само маркер матичних ћелија, детекција CD34 у костној сржи или узорцима крви представља заправо мешавину хематопоеетских матичних/прогениторских ћелија, при чему већина припада популацији прогениторских ћелија. Хумане хематопоеетске матичне ћелије се даље одвајају од CD34⁺ прогениторских ћелија ниском експресијом CD90 антигена и недостатком експресије CD38 антигена, хуманог леукоцитног антигена-DP и панела маркера зрелих хематопоеетских ћелија (*Sidney и сар.*, 2014). CD34⁺ хематопоеетске матичне ћелије су у стању да се диференцирају у све ћелије хематопоеетске линије и имају висок пролиферативни капацитет. Испитивања су показала да CD34⁺ хематопоеетске матичне ћелије и прогениторске ћелије имају способност да се *in vivo* диференцирају у друге ћелијске линије, укључујући респираторне епителне ћелије, хепатоците и кардиомиоците (*Sidney и сар.*, 2014). Постоје такође различити клинички и експериментални протоколи за изолацију матичних CD34⁺ ћелија које се користе за трансплантацију, генску терапију, као и циљне ћелије за будућу замену органа.

1.2 Хроничне мијелопролиферативне неоплазме

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) представљају групу клонских болести матичних ћелија хематопоезе, које карактерише поремећај пролиферације једне или више мијелоидних лоза у костној сржи и повећање броја зрелих ћелија (еритроцита, леукоцита, тромбоцита) у периферној крви (*James и сар.*, 2008).

William Dameshek је 1951. године први пут употребио термин „мијелопролиферативне болести“ када је у исту групу сврстао: есенцијалну тромбоцитемију (ЕТ), полицитемију веру (ПВ), примарну мијелофиброзу (ПМФ) и хроничну мијелоидну леукемију (ХМЛ) (*Dameshek*, 1951). Он је на бази сличности у

клиничком испољавању поставио хипотезу да су ове болести само различита манифестација повећане пролиферативне активности ћелија костне сржи као последица, врло моћног али још увијек неоткривеног стимуланса, који активира хематопоезу у костној сржи, али и ван ње у јетри и слезини. Светска здравствена организација (СЗО) је 2008. године извршила ревизију класификације хематолошких малигнух болести, где је стари назив „хроничне мијелопролиферативне болести“ замењен новим називом „хроничне мијелопролиферативне неоплазме (ХМН)“ (Tefferi и сар., 2007). Наведена класификација је заснована на најистакнутијој линији ћелија крви која подлеже пролиферацији, удруженој са клиничким и лабораторијским налазима. Како се ХМЛ издвојила својим специфичним молекуларним маркером – *Vcr-Abl* фузијом („Филаделфија хромозом“), остале три болести се називају Филаделфија хромозом–негативне болести или мијелопролиферативне неоплазме у ужем смислу.

Prchal и Axelrad су први показали да ћелије костне сржи пацијената са ПВ стварају *in vitro* колоније еритропоезе без додатка спољњег еритропоетина, за разлику од здравих особа (Prchal и сар., 1974). Исто је показано и за прогениторе еритропоезе пацијената са ПВ у културама без серума (Correa и сар., 1994). Овај процес, који се назива ендогено еритроцитно формирање колонија, дуго је био најважнији критеријум у дијагностици ових болести. Међутим, хиперсензитивност туморских ћелија није специфична само за еритропоетин, већ укључује и друге цитокине: интерлеукин 3, SCF (енг. *Stem Cell Factor*), GM-CSF (енг. *Granulocyte Macrophage Colony-Stmulating Factor*), IGF-1 (енг. *Insulin-like Growth Factor 1*) и тромбопоетин (Dai и сар., 1992).

МПН су болести карактеристичне за старије животно доба (преко 65 година), мада се могу јавити било када током живота. Ове болести поседују заједничке клиничке манифестације као што је ризик за развијање тромбоза, еволуција у секундарну мијелофиброзу (ЕТ и ПВ) и трансформација у акутну мијелоидну леукемију (АМЛ).

1.2.1. Полицитемија вера

Полицитемија вера (ПВ) је обољење матичних ћелија хематопоезе где је изражена еритроидна пролиферација, низак степен апоптозе, додатна пролиферација тромбоцита, као и напредовање из пролиферативне фазе у фазу леукемијске трансформације. Степен смртности се повећава са годинама (преко 60 година). Главни разлози смањеног преживљавања код пацијената са ПВ су тромбоза и трансформација у мијелофиброзу или АМЛ. Трансформација у мијелофиброзу се јавља у око 30%

случајева (*Rumi* и сар., 2006), а у АМЛ у 4-8% случајева (*Landgren* и сар., 2008). ПВ је хронична болест крви обележена изразитим повећањем три типа крвних ћелија насталих у костној сржи: еритроцита, леукоцита и тромбоцита. Ваљаност неких коришћених маркера у дијагностици МПН, као на пример полицитемија рубра вера 1 (PRV1) и једарног фактора еритроидне лозе (енг. *nuclear factor erythroid-derived 2*, NF-E2), још увек је контраверзна (*Goerttler* и сар., 2005). PRV1 је рецептор који се налази на површини ћелија хематопоезе и јако је повишен код гранулоцита пацијената са ПВ, али не и код других МПН (*Temerinac* и сар., 2000). Утврђена је и повећана експресија транскрипционог фактора NF-E2 који доводи до развоја ЕПО-независних колонија еритропоезе као и до преусмеравања моноцитних ћелија ка еритропоези и мегакариоцитопоези (*Goerttler* и сар., 2005). Већина симптома ПВ је у блиској вези са повећаном запремином и вискозношћу крви пацијента. У лечењу ове болести најчешће се користи терапијско испуштање крви (флеботомија). Као допуна ординирају се антикоагулациони лекови док код озбиљнијих случајева долази у обзир и хемиотерапијско лечење.

1.2.2. Есенцијална тромбоцитемија

Есенцијална тромбоцитемија је последња класична МПН која је званично описана 1934. године од стране аустријских патолога *Emila Epstein* и *Alfreda Goedela* (*Epstein* и сар., 1934). Карактерише се повећањем броја тромбоцита у крви, хиперплазијом мегакариоцитне лозе у костној сржи и склоношћу ка крварењима и тромбози. Ова болест је ретка и јавља се најчешће после 50. године живота, мада се може јавити и у периоду од 2. до 90. године. Карактерише је убрзано стварање тромбоцита (и до 10 пута више него нормално) уз њихов очуван век, па њихов број у периферној крви прелази и $1000/\text{mm}^3$, док је стварање других ћелијских линија у границама нормале. Недостатак специфичних цитогенетских маркера за ЕТ компликује клоналну анализу и разумевање патогенезе болести. Појачана експресија гена за PRV1 је такође потврђена и у ЕТ, што је од значаја за разликовање ПВ и ЕТ од секундарне тромбоцитозе и еритроцитозе (*Teofili* и сар., 2002). Због увећаног броја тромбоцита долази до склоности ка тромбоемболијским компликацијама како у венским тако и у артеријским судовима. Леукемијска трансформација се јавља код 4-8% случајева (*Abdel-Wahab* и сар., 2010), док се трансформација у мијелофиброзу јавља у око 3-15% случајева (*Cervantes* и сар., 2002).

1.2.3. Примарна мијелофиброза

Примарна мијелофиброза представља хронично обољење костне сржи које се карактерише прогресивном фиброзом костне сржи са екстрамедуларном хематопоезом у слезини и јетри. Представља најтежу форму од МПН болести са најкраћим временом преживљавања. Може бити тзв. идиопатска или примарна мијелофиброза и секундарна, тј. настала трансформацијом из ПВ, ЕТ или неких других болести. ПМФ представља специфично обољење са фиброзом костне сржи које временом доводи до недовољног стварања ћелија крви и застоја у раду костне сржи. Фибробласти, међутим, нису део малигног процеса већ фиброза представља реакцију ћелија строме костне сржи на малигни процес (*Castro-Malaspina, 1984*). Праћена је мијелоидном метаплазијом – увећање јетре и слезине, услед поновне активације феталних места хематопоезе. Поред спленомегалије обично се јавља и леукоеритробластна анемија која постаје све израженија временом. Најчешће се дијагностикује у касној фази, када је већ присутна анемија и смањење броја крвних ћелија. Дужина живота код пацијената са ПМФ је 31% нижа него код популације сродне по годишту и полу, са просечним преживљавањем од 5 година, мада млађи пацијенти могу живети дуже (*Tefferi и сар., 2007*). Узроци смрти најчешће су инфекције, тромбозе на разним анатомским местима, срчане компликације услед оптерећења слезине, плућна хипертензија и трансформација у акутну мијелоидну леукемију (*Tefferi, 2008*).

1.2.4 Морфологија костне сржи код МПН пацијената

Сва три ентитета МПН – ПВ, ЕТ и ПМФ представљају клоналне поремећаје матичне ћелије костне сржи које карактерише пролиферација једне или више линија еритроидне, мијелоидне или мегакариоцитне ћелијске линије. Постоји све више доказа да микрооколина костне сржи може допринети индуковању и одржавању хематолошких малигнитета. Развој фиброзе у костној сржи МПН пацијената важан је негативни прогностички фактор који одређује клинички ток и шансе за преживљавање.

Хистоморфологија костне сржи, поред клиничких манифестација и лабораторијских налаза, је веома важна у дијагнози и класификацији МПН. Карактеристично за ЕТ пацијенте су велики, хиперлобулирани и зрели мегакариоцити који су лабаво груписани. Костна срж пацијената са ПВ дијагнозом се препознаје по плеоморфним мегакариоцитима који варирају у величини, али су без дефекта током сазревања. Насупрот томе, мегакариоцити у костној сржи ПМФ пацијената показују

абнормално сазревање и имају хиперхроматинске и неправилне гломазне нуклеусе који су збијени. Заједничко за ПВ и ПМФ пацијенте јесте изражена тролинијска мијелопролиферација, која је одсутна код ЕТ пацијената. Хистоморфологија мегакариоцита је стога веома корисно средство у класификацији као и за разликовање МПН од осталих мијелоидних малигнитета. Поред тога, ретикулинска и колагенска фиброза, а често и остеосклероза, је присутна у фибротичној ПМФ. Мали степен ретикулинске фиброзе понекад се може наћи и у костној сржи ЕТ и ПВ пацијената (Thiele., 2009). Познато је да пацијенти са ЕТ дијагнозом имају најмање компликације, међутим, око 10% пацијената развије мијелофиброзу током напредовања болести, познату као пост-ЕТ мијелофиброзу, која је повезана са лошијим прогнозама. Мање од 2% пацијената ће напредовати до АМЛ. Код ПВ, око 30% пацијената развија пост-ПВ мијелофиброзу док се трансформација у леукемије јавља у 1% случајева. Пацијенти са префибротичном ПМФ имају мање компликација, међутим током болести у костној сржи и слезини се повећава количина ретикулина што резултује и колагенском фиброзом са остеосклерозом и смањеном хематопоезом. Клиничка слика за ове пацијенте се одређује на основу степена анемије и спленомегалије. Леукемијска трансформација се јавља код 10% ПМФ пацијената (Murray., 2005; Tefferi.,2011).

За одређивање пролиферативног капацитета код хематолошких малигнитета примењује се имунохистохемијска метода уз коришћење Ki67 као примарног антитета. Антитело Ki67 се везује за једарни антиген који је присутан само у пролиферишућим ћелијама. Како је Ki67 протеин присутан током свих активних фаза ћелијског циклуса, као и у митози, проценат Ki67 позитивних ћелија служи као валидна мера величине пролиферишуће фракције у популацији малигних ћелија (Scholzen i Gerdes, 2000).

1.3 Ангиогенеза

Ангиогенеза је физиолошки процес и природни одговор тела на исхемију, који се карактерише растом нових крвних судова из већ постојећих. Развој крвних судова *de novo* током ембрионалног развоја назива се васкулогенеза. Ангиогенеза (неоваскуларизација) представља даљи раст крвних судова од већ постојећих и дешава се како у ембрионалном, тако и у адултном периоду развоја у физиолошким и патолошким условима. Важно је напоменути да је ангиогенеза проминентни процес код бројних обољења као што су дијабетесна ретинопатија, реуматоидни артритис,

псоријаза, бубрежна обољења и хипертензија (*Gupta i Zhang, 2005*). Туморска ангиогенеза има посебан значај јер раст туморских ћелија и развој метастаза зависе од формирања нових крвних судова који ће их снабдевати кисеоником, храном и факторима раста. Управо из тог разлога, последњих деценија се улажу велики напори у циљу развијања терапеутских приступа који ће промовисати реваскуларизацију исхемичних ткива или инхибирати ангиогенезу код тумора и различитих запаљенских болести.

Процес ангиогенезе се одвија у више фаза: продукција фактора ангиогенезе, везивање ових фактора за рецепторе на ендотелним ћелијама, активација ендотелних ћелија, протеолитичка разградња базалне мембране и екстрацелуларног матрикса, пролиферација и миграција ендотелних ћелија, пупљење и раст солидних ендотелних трака, формирање капиларне петље и васкуларна стабилизација (*Nishida и сар., 2006*).

Осим већ познатог утицаја ангиогенезе у настанку и прогресији солидних тумора, новија истраживања описују и њену значајну улогу у патогенези хематолошких малигнитета (*Medinger и сар., 2010*). Код различитих хематолошких малигнитета, укључујући акутне и хроничне леукемије, мијелопролиферативне неоплазме (МПН), мултипли мијелом (ММ) и лимфоме, као одраз појачане ангиогенезе, описано је присуство повишене експресије фактора раста васкуларног ендотела (енг. *vascular endothelial growth factor, VEGF*) (*Medinger i Passweg, 2014*) и базног фактора раста фибробласта (енг. *basic fibroblast growth factor, bFGF*), као и повећана микроваскуларна густина у костној сржи. Описане су такође и повишене серумске вредности најважнијих проангиогених фактора, VEGF-а и bFGF-а.

1.3.1. Фактори регулације ангиогенезе

Ангиогенеза је регулисана одржавањем равнотеже између стимулишућих фактора и инхибитора који се везују за специфичне ћелијске рецепторе на циљним ћелијама и резултат је низа сложених ћелијских и субћелијских механизма. Специфичне стадијуме ангиогенезе регулишу: адхезиони протеини (интегрини, селектини, кадхерини) који омогућавају причвршћивање ћелија за компоненте екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ), протеини ЕЦМ (колагени, фибронектин, ламинин, протеогликани, тромбоспондин-1, тенасцин-Ц и SPARC - *secreted protein acidic and rich in cysteine*) који су одговорни за интеракције између ћелија и матрикса, ензими ЕЦМ (матриксне металопроотеиназе) који доводе до протеолизе компоненти ЕЦМ (првенствено

колагена), фактори коагулације крви, цитокини (IL-1 β , интерферон α и β , фактор некрозе тумора - TNF) и фактора раста (VEGF, bFGF, TGF- β , EGF - фактор раста епидерма, ангиопоетин-1) који претежно представљају проангиогене факторе (Medinger i Passweg, 2014).

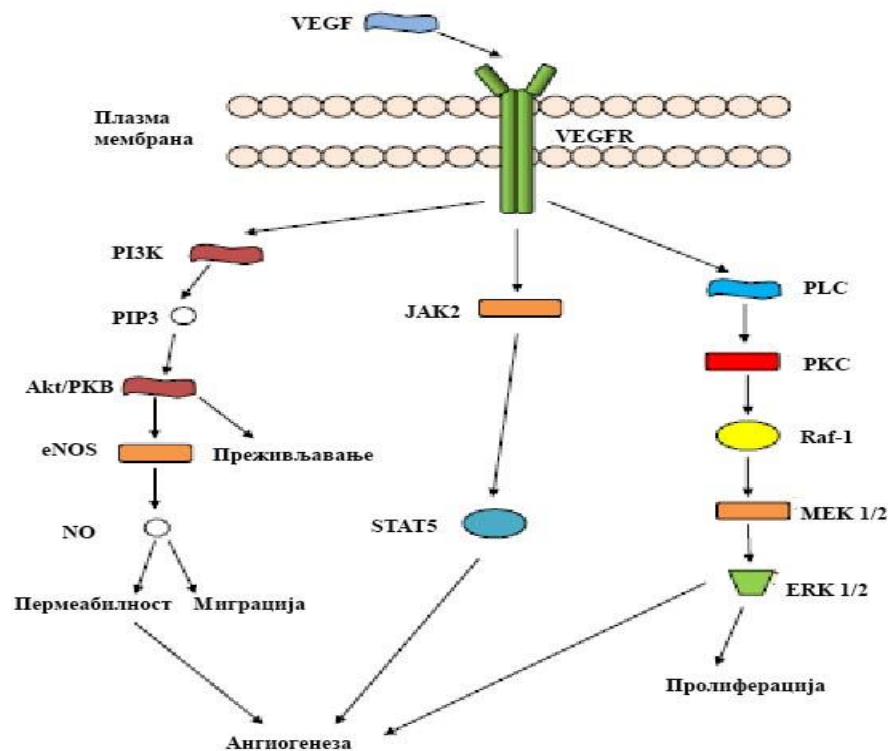
Један од најзначајнијих и најјачих стимулатора ангиогенезе је васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) за који ендотелне ћелије поседују специфичне рецепторе (Hoeben и сар., 2004). VEGF се зове још и васкуларни фактор пермеабилности, јер је показано да повећава микроваскуларну пермеабилност и фенестрацију ендотела. Он представља најзначајнији ћелијски митоген кога продукују ендотелне ћелије у условима хипоксије, а стимулише и миграцију ендотелних ћелија. Поред улоге у индуковању ангиогенезе, VEGF омогућава опстанак ендотелних ћелија у новоформираним крвним судовима, укључујући и оне формиране у туморима. Фамилија VEGF укључује 6 чланова: VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентни фактор раста (енг. *placental growth factor, PGF*) (Medinger i Passweg, 2014).

VEGF је димерни гликопротеин везан дисулфидним везама, молекулске масе од 34-45 kDa. Два ланца која га чине организована су у антипаралелном узорку. Кристалне је структуре. Сваки молекул има два места којима се веже за рецептор. Четири различита VEGF транскрипта који кодирају полипептиде од 206, 189, 165 и 121 аминокиселине, могу бити присутни у хуманим ћелијама. Све изоформе потичу од алтернативног спљасовања једног гена чији је кодирајући регион подељен између 8 егзона. Неколико различитих VEGF изоформи, упркос физичким разликама, поседују идентичне биолошке активности. Међутим, изгледа да се VEGF₁₂₁ и у великој мери VEGF₁₆₅ секретују у солубилној форми, док друге две изоформе остају везане за ћелију, вероватно због њиховог већег афинитета за ћелијске површинске протеогликане (Shibuya, 2011).

Сматра се да је већина биолошких активности VEGF посредована његовом интеракцијом са два трансмембранска тирозин киназна рецептора високог афинитета: Flt1 (VEGF receptor-1) и KDR (VEGF receptor-2). Ови рецептори функционишу као сигнални молекули током васкуларног развоја. Откривен је и трећи, некиназни рецептор, назван неуропилин (NRP-1), али се мало зна о његовом капацитету да иницира сигнализацију ендотелних ћелија (Shibuya, 2011). Аминокиселинска секвенца FLT1 и KDR поседује 44% идентичности структуре, при чему оба протеина имају врло сличне физиолошке функције. Оба се састоје од хидрофобног протеина кога чине 7

имуноглобулину сличних петљи у ЕЦМ, један трансмембрански домен и тирозин киназна секвенца унутар ћелије. Број рецептора по ћелији, међутим, варира код различитих ткива *in vivo*. KDR је искључиво присутан у ендотелним ћелијама и изгледа да има кључну улогу у диференцијацији ендотелних ћелија и васкулогенези (*Schlieve* и сар., 2016). Показано је да мишеви који немају VEGF рецепторе умиру у ембрионалној фази развоја (*Shalaby* и сар., 1995).

Сигнална каскада VEGF у култивисаним ендотелним ћелијама само је делимично схваћена, али је познато да укључује низ протеинских фосфорилација почевши са фосфорилацијом рецептора коју прати фосфорилација тирозинских резидуа фосфолипазе Ц- γ (енг. *Phospholipase C- γ , PLC- γ*) и фосфатидилинозитол 3-киназе (енг. *Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K*). Попут других агониста ендотелних ћелија, као што су тромбин и хистамин, VEGF активира протеин киназу Ц, повећава ниво Ca^{2+} и стимулише акумулацију инозитол-1,4,5-трифосфата (*Brock* и сар., 1991) (Слика 2).



Слика 2. Шематски приказ VEGF пута. VEGF интрацелуларни сигнали обухватају компоненте JAK/STAT пута, PI3-киназе и MAP киназе. Активација JAK/STAT пута је у корелацији са усходном регулацијом VEGF. Такође, PI3K/AKT сигнални пут игра важну улогу у ангиогенези и његова експресија је у корелацији са усходном регулацијом VEGF. Прилагођено из Gavalas, 2013; *International Journal of Molecular Sciences*.

VEGF и његови рецептори укључени су у ангиогенезу која се јавља у многим солидним туморима, укључујући рак дојке, дебелог црева, бешике, желуца и простате (Duffy и сар., 2013). Пошто формирање солидних тумора зависи од ангиогенезе, развијено је неколико стратегија за циљање VEGF пута као дела антитуморске терапије (Duffy и сар., 2013). Приступи за блокирање VEGF активности обухватају инхибицију секреције VEGF ендогених тумора, његово неутралисање у микроциркулацији као и спречавање везивања VEGF и сигналне трансдукције. Бројне стратегије за инхибирање туморске ангиогенезе путем селективног циљања VEGF сигналног пута, тренутно се тестирају у раној фази клиничких испитивања (Duffy и сар., 2013).

1.3.2. Хипоксија и ангиогенеза

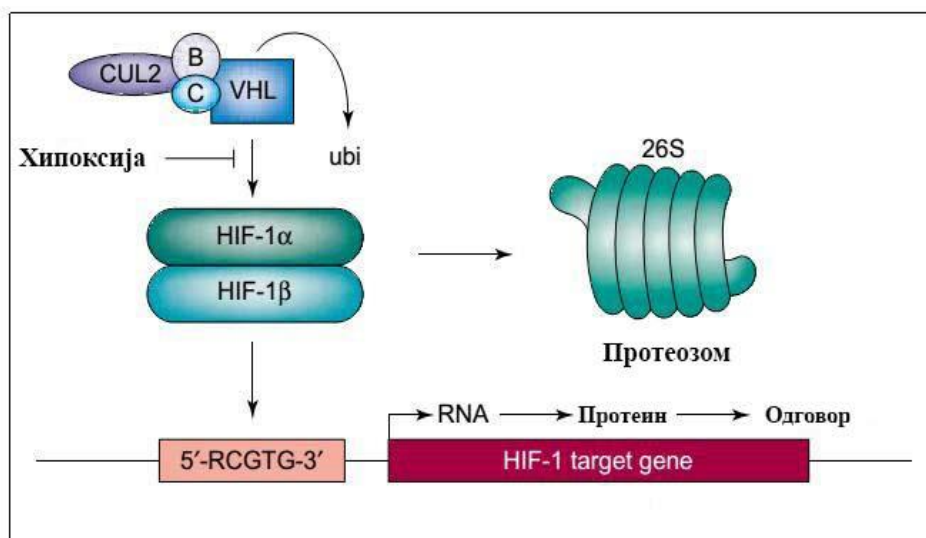
Регулација ангиогенезе хипоксијом представља важну компоненту хомеостатских контролних механизма који повезују кардио-плућно-васкуларни доток кисеоника до метаболичке потражње у локалном ткиву (Giaccia и сар., 2004).

HIF систем (енг. *hypoxia-inducible factor*) је кључни регулатор широког опсега ћелијских и системских одговора на хипоксију који делује у свим ћелијама сисара. Промене у генској експресији, директно или индиректно регулисане HIF-ом, обухватају преко 100 гена. HIF-посредовани путеви утичу на метаболичку адаптацију, еритропоезу, ангиогенезу и васкуларни тонус, ћелијски раст и диференцијацију, опстанак и апоптозу, и на тај начин представљају критичне факторе у развоју, физиологији и болестима (Maxwell и сар., 2001).

Транскрипциони фактор HIF-1 је хетеродимер који се састоји од два основна хеликс-петља-хеликс ПАС протеина (енг. *Per-Arnt-Sim, PAS*): HIF-1 α (око 120 кДа) и HIF-1 β (91-94 кДа) субјединице. HIF-1 α и HIF-1 β субјединица имају неколико изоформних облика који су кодирани различитим генским локусима (Krock и сар., 2011). Кисеоник-неосетљива HIF-1 β субјединица је експримирана конститутивно у релативно константној концентрацији независној од оксигенације ткива. HIF-1 α субјединица је такође експримирана конститутивно, али се веома брзо деградује (полуживот јој је мањи од 5 минута) у ћелијама које су снабдевене кисеоником или се акумулира када су ћелије изложене стресу ниске концентрације кисеоника (Jiang и сар., 1996). Транскрипциона активност HIF-1 хетеродимера, на тај начин, зависи од доступности HIF-1 α субјединице. Постоје 3 изоформна облика HIF- α , при чему су HIF-1 α и HIF-2 α међусобно врло слична и оба имају способност да се везују за хипоксија-

одговорне елементе (енг. *hypoxia responsive elements, HRE*) у циљним хипоксија-одговорним генима и активирају њихову транскрипцију. Експерименти указују да активација HIF-1 укључује редокс зависну стабилизацију HIF-1 α протеина. У хипоксичним условима HIF-1 α се транслоцира у нуклеус и хетеродимеризује са β субјединицом формирајући HIF-1 комплекс. Третирање екстраката хипоксичних ћелија алкалном фосфатазом киде везе са ДНК, што сугерише да би фосфорилација могла бити одговорна за везивање (*Hashimoto i Shibasaki, 2015*).

У условима нормоксије, долази до разградње HIF-1 α субјединице. Идентификована су два одвојена домена унутар HIF-1 α субјединице, који су одговорни за механизам којим ћелијски кисеоник регулише HIF-1 активност. Кисеоник-зависни деградациони домен (енг. *oxygen-dependent degradation domain, ODD*) на хуманом HIF-1 α садржи 2 пролинска остатка (Pro402 и Pro564) и посредује у интеракцији са von Hippel-Lindau (VHL) Е3 лигазним комплексом. Пролински остаци се хидроксиљују специфичним пролил-хидроксилазама (PHD1, PHD2, PHD3) и на тај начин HIF-1 α постаје циљ протеозомске деградације и деградује се путевима који укључују убиквитинацију (*Semenza, 2001*) (Слика 3). Друго хипоксија-сензитивно место је присутно у карбокси-терминалном трансактивационом домену (енг. *C-terminal activating domain, CAD*) HIF-1 α . Кључни регулатор активности HIF-1 α јесте његов фактор инхибиције - FIH-1 (енг. *factor inhibiting HIF-1, FIH-1*) који у условима нормоксије катализује хидроксилацију аспарагинских остатака у CAD, што спречава асоцијацију CAD са транскрипционим ко-активаторима. Пролит-хидроксилазе и FIH-1 служе као сензори за кисеоник у путевима одговорним за хипоксију (*Hashimoto i Shibasaki, 2015*). HIF хидроксилазе су Fe(II)-зависне диоксигеназе које имају велику способност везивања кисеоника чиме омогућују да се HIF не инактивира у хипоксичним условима. Гвожђе је слабиим везама везано за дихидроксилазе и може бити замењено са другим металима, као што су кобалт и манган, и тада губи каталитичку активност. На овај начин се у експерименталним условима може постићи појачана експресија HIF, што иницира могући пут за терапеутску манипулацију ангиогенезе (*Masoud i Li, 2015*). Механизми „сензора“ кисеоника (енг. *oxygen sensing*) још нису до краја објашњени. Према досадашњим подацима, чини се да хем протеин, сличан цитохрому б, служи као сензор концентрације присутног кисеоника у ткивима (*Masoud i Li, 2015*).



Слика 3. Регулисање експресије гена индуковане хипоксијом од стране HIF-1. У условима нормоксије, HIF-1 α субјединица је везана за von Hippel-Lindau (VHL) тумор супресор протеин и на тај начин је мета протеозомске деградације убиквитарним протеозомским путевима. У хипоксичним условима, везивање VHL за HIF-1 α је инхибирано што доводи до акумулације HIF-1 α , његове димеризације са HIF-1 β и везивања за хипоксија-одговорне елементе бројних гена. Прилагођено из Semenza, 2001; Trends in Molecular Medicine.

Активни хетеродимерни HIF-1, везује се за хипоксија-одговорне елементе (енг. *hypoxia-response elements, HREs*) бројних гена. Учествује у иницијацији транскрипције VEGF и bFGF гена у хипоксичним условима. Такође, укључен је у активацију бројних гена који су укључени у различите ступњеве ангиогенезе, као што су гени важни за метаболизам матрикса, и укључују трансглутаминазе, колаген пролил хидроксилазе, затим синтетазу азот оксида која је важна за одржавање васкуларног тонуса. HIF-1 учествује и у регулацији метаболичких процеса активацијом транскрипције неколико гликолитичких ензима и глукозног преносиоца-1 (Hashimoto i Shibasaki, 2015).

1.3.3. Регулација експресије VEGF хипоксијом

Хипоксија је снажан стимулус лучења VEGF. Пораст секреције биолошки активног VEGF делимично је узрокован порастом транскрипције VEGF гена. Када у хипоксичним условима дође до димеризације HIF-1 α и HIF-1 β молекула, овај комплекс се веже за хипоксија одговорне елементе на 5'-крају VEGF гена и активира његову транскрипцију. Такође, експресија VEGF значајно расте у хипоксичним условима због пораста стабилности VEGF иРНК. Уз то, унутрашње рибозомско улазно место (енг. *internal ribosome entry site, IRES*) осигурава успешан улаз VEGF иРНК у рибозоме. VHL (von Hippel Lindau) тумор супресор протеин регулише експресију VEGF на

посттранскрипцијском нивоу. Хипоксијом индукована VEGF експресија, редовно је везана са повећаном експресијом FLT1 и KDR (*Shih и сар.*, 1998).

Како је индукција HIF-1 α неопходна за активацију одговора организма на хипоксију, постављено је питање његове улоге у крајњем исходу исхемијске повреде и да ли HIF манипулација може то поправити. Неколико стратегија је успешно коришћено у експерименталној активацији HIF-а. Међу најзначајнијим могућностима спомиње се коришћење инхибитора HIF хидроксилаза. Инхибицијом HIF хидроксилаза помоћу аналога 2-оксоглутатата стабилизује се HIF и активира транскрипциони одговор (*Pugh и сар.*, 2003).

1.3.4. Регулација експресије VEGF азот моноксидом

Азот моноксид, првобитно познат и као ендотелни фактор релаксације, је растворљив и веома реактиван гас који се везује директно за хем регион многих ензима. Синтетише се заједно са цитрулином у реакцији L-аргинина и молекуларног кисеоника деловањем ензима азот оксид синтетазе (енг. *nitric oxide synthase, NOS*). Своју активност NOS остварују као хомодимери у присуству неопходних косупстрата: L-аргинина, NADPH и O₂, и пет кофактора или простетичних група: флавин аденин динуклеотида, флавин мононуклеотида, калмодулина, тетрахидробиоптерина и хема. Две изоформе NOS: неурална (nNOS или NOS I) и ендотелна NOS (eNOS или NOS III) конститутивно се експримирају у организму и припадају калцијум-калмодулин зависним ензимима. Поред конститутивних NOS (cNOS), постоји и индуцибилна NOS (iNOS или NOS II), карактеристична за имунске ћелије и независна од концентрације калцијума. Њену експресију индукују бактеријски липополисахариди или проинфламаторни цитокини. iNOS се налази у макрофагима, Купферовим ћелијама, неутрофилима, фибробластима, глаткој мускулатури и ендотелу крвних судова. Ендотелна NOS је детектована и у миоцитима срца, мезангијским ћелијама бубрега, остеобластима, остеокластима и тромбоцитима (*Rang и сар.*, 2005), док се nNOS експримира у периферним и централним неуронима, β -ћелијама панкреаса, скелетним мишићима, епителу дисајних путева (*Tippeswamy и сар.*, 2006). Све три изоформе ензима заступљене су и у ЦНС-у (*Stern*, 2004). Посебан тип ензима пронађен је у митохондријама и означен је као mt-NOS (*Blaise и сар.*, 2005).

Улога азот монооксида (NO) у туморској ангиогенези још увек није у потпуности разјашњена. Ниске концентрације NO, по свему судећи, индукују туморску

ангиогенезу док су високе концентрације инхибиторне. Неколико студија је показало да NO може индуковати продукцију VEGF путем PI3K/Akt/PKB-HIF-1 α пута (Amano и сар., 2003; Fukumura и сар., 2001). Међутим, објављени су и резултати према којима NO може да делује као инхибитор VEGF експресије (Amano и сар., 2003). Ова контрадикторност до сада није разјашњена.

Овај двојни и двосмерни регулаторни механизам ангиогенезе постаје још комплекснији уплитањем хипоксије. У условима хипоксије, долази до активације c-Src пута доводећи до HIF-1 α усходне регулације и коначно до повећане експресије VEGF (Choi и сар., 2003), која индукује NO продукцију путем VEGFR-2 и његовог низводног ефектора c-Src (Chou и сар., 2002). Поред тога, изгледа да хипоксија индукује NO продукцију (Beleslin-Čokić и сар., 2004). Насупрот томе, високе концентрације NO инхибирају c-Src доводећи до HIF-1 α нисходне регулације, која условно смањује експресију VEGF (Kimura и сар., 2003).

По свему судећи, интеракције између NO, фактора хипоксије и VEGF доста су сложене и комплексне, с обзиром да:

1. HIF-1 α је регулисан онкогеним сигналним путевима који су ћелијски специфични (Patiar и сар., 2006)
2. Хипоксија елементи за HIF-2 су већ идентификовани у eNOS промотерском региону (Coulet и сар., 2003).

Сходно томе, комбиноване функционалне, молекуларне и имунохистохемијске студије су неопходне да би се разјаснио однос између хипоксије, NO путева и ангиогенезе.

1.3.5 Улога Wnt/ β -катенин сигналног пута и PPAR γ фактора у регулацији ангиогенезе

Сигнализација од стране Wnt фамилије секретованих гликолипопротеина један је од основних механизма који утичу на ћелијску пролиферацију, поларност као и детерминацију ћелијске судбине током ембрионалног развоја и хомеостазе ткива (Logan и Nusse., 2004). Као резултат тога, мутације у Wnt путу су често повезане са дефектима на рођењу, канцером и другим обољењима (Clevers., 2006). Критични и најизучаванији Wnt пут је канонска Wnt сигнализација која функционише тако што регулише количину транскрипционог коактиватора β -катенина, мултифункционалног протеина који контролише кључне развојне програме генске експресије. Претпоставка је да дисрегулација Wnt/ β -катенин сигналног пута може да изазове канцерогене

особине у нормалним ћелијама, модулира микроокружење карцинома као и да помаже пролиферацију и опстанак ћелија канцера (*Thakur и Mishra.*, 2013).

Показано је да је конститутивна стабилизација β -катенина у стромалним ћелијама костне сржи повезана са развојем мијелопролиферативних болести (*Kode и сар.*, 2014), што указује да Wnt сигнализација у стромалним ћелијама мора бити фино подешена за координисану регулацију микроокружења хематопоеетске активности. Имуномодуларни лек талидомид има антиангиогени ефекат путем нисходне регулације bFGF и VEGF. Новије студије су показале да он као самостални лек има значајан ефекат код ПМФ али да се слабо подноси при високим дозама. Међутим, такође је показано да када се користи у комбинацији са Wnt инхибиторима постоји синергистички ефекат на ћелије мијелома (*Kim и сар.*, 2011). Ови резултати указују да циљање Wnt/ β -катенин сигналног пута у комбинацији са имуномодулаторним лековима, може представљати ефикасан приступ за лечење ПМФ.

Пероксизом пролифератор-активирани рецептор гама (PPAR γ) представља мултифункционални транскрипциони фактор са значајним регулаторним улогама у инфламацији, ћелијском расту, диференцијацији и апоптози. PPAR γ је експримиран у различитим имунским ћелијама као и у бројним леукемијама и лимфомима (*Garcia-Bates и сар.*, 2008). PPAR γ агонисти имају PPAR γ -зависне и – независне ефекте на коагулацију, тромбозу, ангиогенезу као и туморски раст и метастазу (*Garcia-Bates и сар.*, 2008). PPAR γ агонисти такође испољавају антиинфламаторне и антифибротичке ефекте путем негативне регулације експресије проинфламаторних гена и путем инхибиције диференцијације миофибробласта (*Straus и сар.*, 2007). Поред тога, PPAR γ агонисти модулирају активност неколико транскрипционих фактора (NF- κ B, AP-1, STAT3) који регулишу инфламацију (*Straus и сар.*, 2007).

1.3.6 Улога макрофага у регулацији ангиогенезе

За туморску ангиогенезу се првобитно веровало да је изазвана само од стране туморских ћелија. Међутим, показано је да су макрофаги такође укључени у васкуларизацију и туморски раст.

Макрофаги потичу од CD 34⁺ прогенитора костне сржи који континуирано пролиферишу и шаљу своје потомство у крвоток као промоноците. Промоноцити онда могу да се развију у моноците и уђу у ткива где се диференцирају у одређени тип „резидентних“ макрофага (*Davies и сар.*, 2013). Скоро сваки локални поремећај

нормалности ткива, било да је то инфекција, имунски одговор или малигнитет, изазива брзо регрутовање макрофага. Регрутовани макрофаги показују многе фенотипске разлике у односу на резидентне ткивне макрофаге. Термин „активација макрофага“ се обично користи да се опише овај процес, мада сама природа те активације зависи од природе регрутујућег стимулуса као и од локације. Rudolf Virchow је први, 1863 године, приметио инфилтрацију леукоцита у малигна ткива и претпоставио да канцери настају у регионима хроничних инфламација (Virchow., 1863). Леукоцити који доспевају до тумора често остају локализовани у туморској периферији или строми и често нису у могућности да изврше јаку антитуморску активност. И мишји и хумани тумори производе хемотаксичне факторе способне да стимулишу миграцију моноцита (Rahat и сар., 2014).

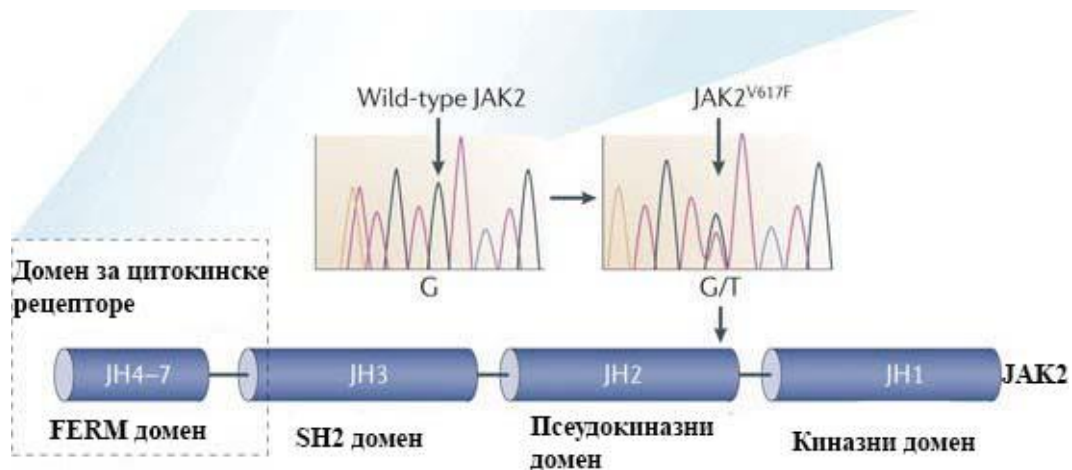
Макрофаги повезани са тумором (енг. *Tumor-associated macrophages, TAMs*) могу да произведу регулаторе ангиогенезе а такође могу да индукују ремоделирање ткива производећи различите протеиназне активаторе и инхибиторе који могу да поремете интегритет базалне мембране и ЕЦМ (Amit-Cohen и сар., 2013). TAM се акумулирају у хипоксичним регионима тумора и хипоксија у њима изазива проангиогени програм. Њихова адаптација на хипоксију се постиже повећаном експресијом хипоксија-индуцибилних и проангиогених гена, као што су VEGF, FGF-2 и CXCL8, чију транскрипцију контролишу HIF-1 и HIF-2 (Riabov и сар., 2014). Повећан број TAM у хипоксичним регионима може промовисати туморску прогресију делимично стимулацијом нивоа ангиогенезе, као што је случај у карциному дојке (Amit-Cohen и сар., 2013).

1.4 Јанус Киназа 2 и ЈАК-СТАТ сигнални пут

МПН, заједно са хроничном мијелоидном леукемијом (ХМЛ), припадају групи тзв. класичних МПН. ХМЛ је прво малигно обољење коме је одређен молекуларни маркер тзв. Филадельфија хромозом, који представља реципрочну хромозомску транслокацију услед чега се формирају два нова деривата хромозома. Све до открића ЈАК2 мутације 2005. године, остале МПН су се називале Филадельфија хромозом-негативне МПН.

Четири независне лабораторије, 2005 године, дошле су до историјског открића да већина пацијената са класичним BCR-ABL–негативним МПН има ЈАК2 мутацију са новом функцијом (Levine и сар., 2005; Kralovics и сар., 2005). Ова мутација

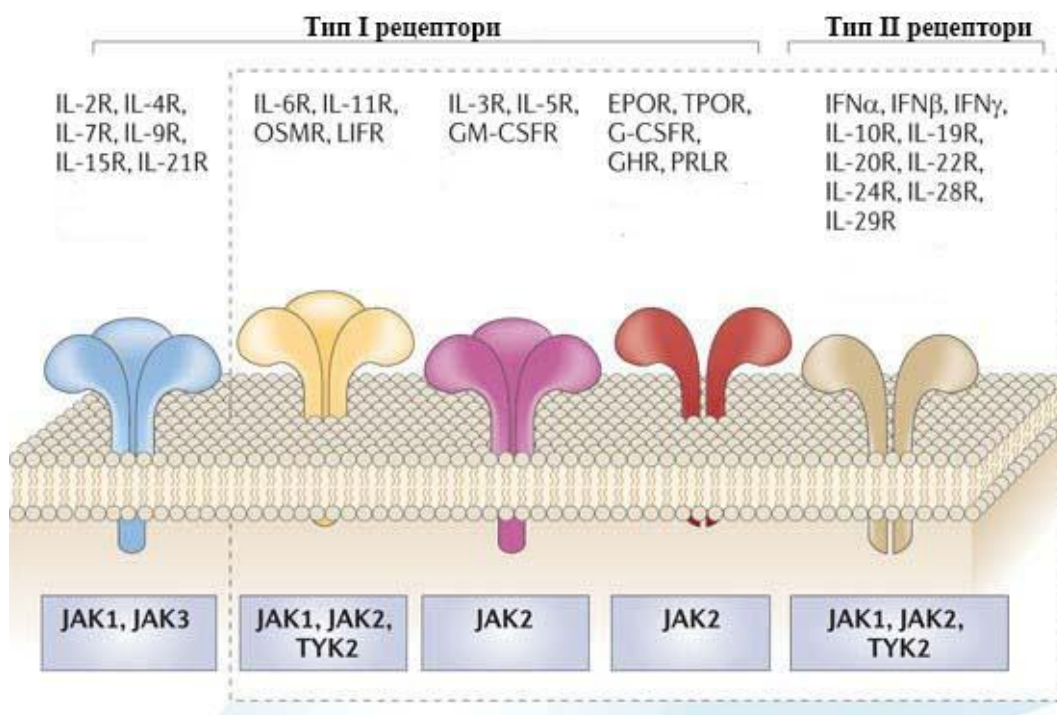
подразумева трансверзију нуклеотида Г у нуклеотид Т на позицији 1849, у егзону 14, ЈАК2 гена. На протеинском нивоу, ова тачкаста мутација доводи до замене аминокиселине валин у фенилаланин на позицији 617 (V617F) протеина ЈАК2, што је потврђено на 65-97% пацијената са ПБ и на око 50% пацијената са ЕТ и ПМФ (Kralovics и сар., 2005). Заменом аминокиселине валин доста већим фенилаланином, дестабилизује се конформација ЈН2 домена који губи своју аутоинхибиторну улогу и постаје конститутивно активан. Тиме се обезбеђује константна активност протеина, што доводи до повећане осетљивости ћелија на долазеће стимулусе, као што су фактори раста. Наредне две године откривене су још две мутације на ЈАК2 гену (егзон 12, 2% код ПБ) (Scott и сар., 2007) и MPL гену (Pardanani и сар., 2006). Сви наведени алели са мутацијом доводе до стимулације функције услед конститутивне активације тирозин киназа–зависних сигналних путева у ћелији, пре свега ЈАК-СТАТ пута (O’Shea и сар., 2005).



Слика 4. Шематски приказ модуларне структуре ЈАК2. Сви чланови ЈАК фамилије поседују 7 ЈН (ЈАК homology) домена који су организовани у 4 региона: ЈН1, који је каталитички (киназни) домен; ЈН2 - каталитички неактиван (псеудо-киназни) домен; ЈН3 и ЈН4, који деле хомологију са SH2 доменом (Src-homology-2) и ЈН4-ЈН7, који чине FERM домен, одговоран за везивање ЈАК протеина за цитосолне домене цитокинских рецептора. Прилагођено из Quintas-Cardata и сар., 2011; Nature Reviews Drug Discovery.

Јанус киназа (енг. ЈАК - „just another kinase“) припада фамилији интрацелуларних нерцепторских тирозин киназа које спроводе сигнале посредоване цитокинима преко ЈАК-СТАТ пута. Чланови Јанус киназа фамилије (ЈАК1, ЈАК2, ЈАК3 и тирозин киназа 2-Тук2) садрже 2 симетрична киназама налик подручја: на С-крају ЈАК homology 1 (ЈН1) подручје има улогу тирозин киназе, док је ЈН2 подручје непосредно поред

ензимски неактивно и негативно регулише активност JH1 (*Quintas-Cardama* и сар., 2011) (Слика 4). JAK2V617F мутација активира киназу преко инактивације JH2 аутоинхибиторног подручја. Уобичајено, JAK су повезани у неактивном стању са цитоплазматским крајем типа I или II цитокинских рецептора (EPOR - рецептор еритропоетина; MPL - рецептор тромбопоетина; G-CSFR - рецептор стимулишућег фактора колонија гранулоцита; рецептор интерферона гама). Пошто чланови типа I и II фамилије цитокинских рецептора не поседују каталитичке киназне активности, они се ослањају на JAK фамилију тирозин киназа да фосфорилишу и активирају низводне протеине укључене у њихове путеве трансдукције сигнала (Слика 5).

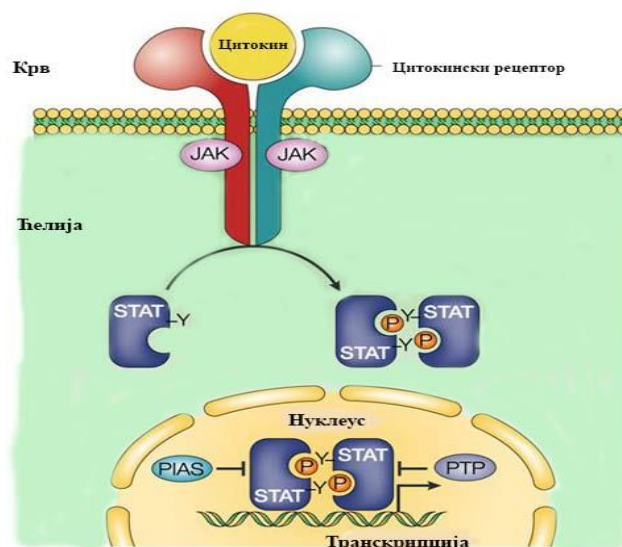


Слика 5. Цитокински рецептори и JAK2. Пролиферација, преживљавање и диференцијација различитих хематопоетских линија су фино регулисани процесом лучењем цитокина. Цитокини остварују своје биолошке ефекте везујући се за рецепторе на површини ћелије. Тип I и тип II цитокинских рецептора немају сопствену тирозин-киназну активност, већ се ослањају на рецептор-везане Јанус киназе да би пренели своје сигнале у цитоплазму. Преузето из *Quintas-Cardama* и сар., 2011; *Nature Reviews Drug Discovery*.

Након ангажовања рецептора са одговарајућим лигандом, JAK пролази кроз промену облика постајући активан фосфорилацијом кључних тирозинских остатака. Наизменично фосфорилисана JAK доводи до фосфорилације тирозинских остатака подручја рецептора у цитоплазми и на тај начин ствара пристаниште за ангажовање неколико протеина доводећи до активације нисходних сигналних путева (JAK2/STAT3,

PI3K/Akt, MAPK) (енг. Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription 3, phosphatidylinositol-3-kinase-Akt, mitogen activated protein kinases) (Mertens и сар., 2007). Долази до димеризације активираних STAT фактора и њихове транслокације у једро где регулишу транскрипцију након везивања за одређену сагласну секвенцу у региону промотера неколико циљаних гена који су укључени у регулацију бројних ћелијских процеса као што су пролиферација, диференцијација и апоптоза (Freitas и Maranduba, 2015) (Слика 6).

STAT фамилија се састоји од 7 чланова: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5а, STAT5б и STAT6. Њихова величина се креће од 750-850 аминокиселина и на основу функције, цела STAT фамилија се може поделити у две групе. Прву групу чине STAT2, 4 и 6 који се активирају преко малог броја цитокина и укључени су у развој Т-ћелија и IFN- γ сигнализацију. У другу групу спадају STAT1, 3 и 5 који се активирају у различитим ткивима преко различитих лиганата и укључени су у IFN- γ сигнализацију, развој млечних жлезда и ембриогенезу. Ова последња група игра кључну улогу у онкогенези с обзиром да контролишу ћелијски циклус и апоптозу (Seif и сар., 2017).



Слика 6. Шематски приказ JAK/STAT сигналног пута. Активација JAK киназе након стимулације цитокином, резултује фосфорилацијом STAT који димеризује и транслоцира се у нуклеус да активира генску транскрипцију. Прилагођено из Shuai, 2003; Nature Reviews Immunology.

Од STAT фамилије протеина, STAT3 је добио највећу пажњу с обзиром да је укључен у бројне онкогене сигналне путеве и интрацелуларне путеве трансдукције сигнала стимулисане од стране неколико проинфламаторних цитокина и фактора раста као што су IL-6, епидермални фактор раста (енг. epidermal growth factor, EGF) као и

фактор раста хепатоцита (енг. *hepatocyte growth factor, HGF*) (Siveen и сар., 2014). Иницирање STAT3 активације путем лиганд–рецептор интеракције резултира димеризацијом сигнал трансдукторског протеина, gp 130 у цитоплазми. То је праћено индукцијом ЈАК фосфорилације а потом и STAT3 фосфорилације. ЈАК фамилија тирозин киназа, посебно ЈАК1, посредује у активацији STAT3 (Garcia и сар., 2001). Фосфорилисани STAT3 мономери се комбинују формирајући димере и транслоцирају се у једро где индукују транскрипцију гена укључених у преживљавање и пролиферацију (Weerasinghe и сар., 2008). Међутим, нефосфорилисани STAT3 је такође способан да се димеризује и индукује транскрипцију (Yang и сар., 2007). Једном активиран, STAT3 контролише експресију антиапоптоских, пропролиферативних и гена имуног одговора.

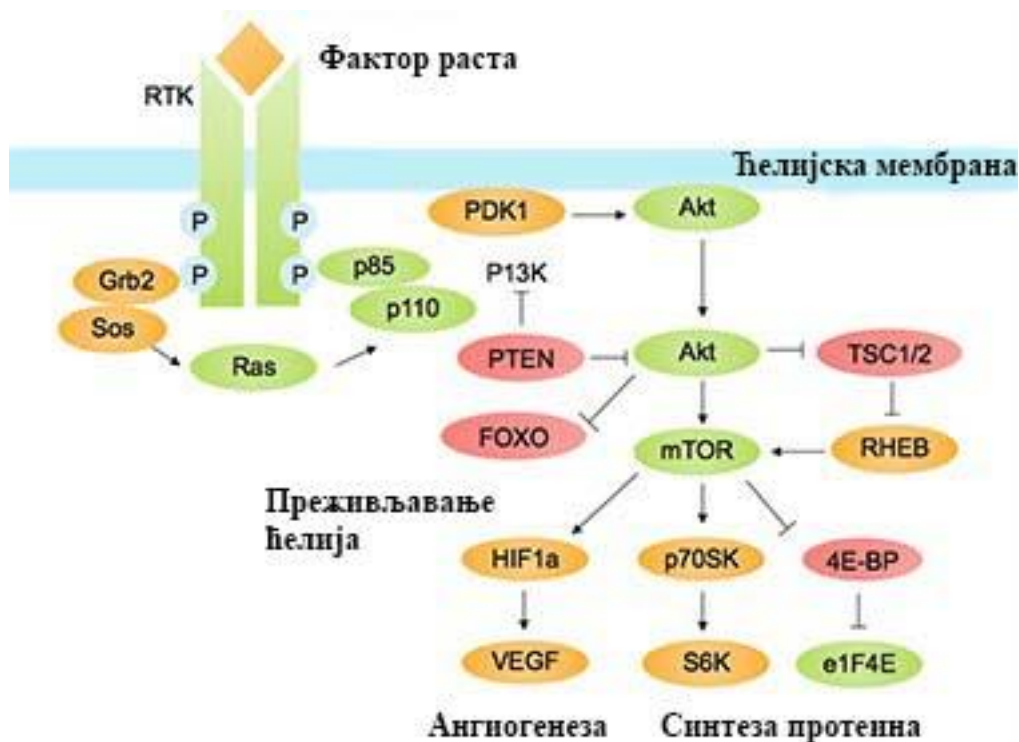
Међу различитим проангиогеним факторима, VEGF и HIF-1 α се издвајају као главни транскрипциони циљеви за STAT3. Експресија фосфо-STAT3 има позитивну корелацију са VEGF и Bcl-2 у узорцима рака желуца што сугерише да фосфо-STAT3 експресија може бити повезана са ангиогенезом, антиапоптозом и прогресијом тумора у овом конкретном канцеру (Zhu и сар., 2013). STAT3 може индиректно да регулише VEGF индукујући експресију HIF-1 α , који покреће транскрипцију VEGF након хипоксије. Циљање STAT3 малим молекулским инхибиторима блокира експресију HIF-1 α и VEGF *in vitro* и инхибира туморски раст и ангиогенезу *in vivo* (Xu и сар., 2005). Активирани STAT3 у исхемијском бубрегу пацова и у хипоксичним ћелијама карцинома бубрега повећава ћелијске нивое HIF-1 α било блокирањем протеинске деградације било повећањем синтезе HIF-1 α под хипоксичним условима. STAT3 такође интерагује директно са HIF-1 α и регрутује га за промотор хуманог VEGF као одговор на хипоксију, што сугерише да је STAT3 мета за хипоксија-индуковану ангиогенезу у хуманом карциному бубрега (Jung и сар., 2005). Као конститутивно активан, STAT3 може да инхибира експресију p53, везивањем за p53 промотор (Sainz-Perez и сар., 2008). Прекид STAT3 сигнализације може смањити активност HIF-1 α промовишући његову деградацију кроз p53-зависни механизам. На тај начин, STAT3 инхибитори могу блокирати експресију VEGF на неколико нивоа стварајући јак антиангиогени ефекат.

IL-6 активира ЈАК фамилију киназа (ЈАК1, ЈАК2 и TYK2) доводећи до активације STAT транскрипционих фактора. Он снажно активира STAT3 и у мањем обиму STAT1, а са друге стране, SOCS3 је примарни инхибитор IL-6 сигнализације (Babon и сар., 2014). IL-6 је гликопротеин састављен од 184 аминокиселине, има молекулску

масу од 26 kDa и представља мултифункционални цитокин. Своје дејство на циљне ћелије испољава везујући се за рецепторски комплекс кога чине мембрански или солубилни рецептор и трансмембрански гликопротеин 130 (gp130). Регулише бројне ћелијске функције као што су пролиферација, активација и диференцијација. Стварају га различити типови ћелија, укључујући моноците/макрофаге, Т ћелије, ендотелне ћелије, фибробласте, хепатоците и ћелије тумора. Ендогени нивои IL-6 су повећани код ЕТ и ПМФ пацијената и показана је позитивна корелација између IL-6 и ангиогенезе у костној сржи МПН пацијената (*Hoermann и сар.*, 2015). У костној сржи оболелих од ПВ уочено је повећање броја мегакариоцита који секретују IL-6, али без повећања нивоа овог цитокина у серуму (*Mondet и сар.*, 2015).

1.4.1. PI3K/Akt и MAPK сигнални путеви

PI3K/Akt је сигнални пут који промовише опстанак и раст ћелија као одговор на екстрацелуларне сигнале. Кључни протеини укључени у овај пут су фосфатидилинозитол 3-киназе (PI3K) и Akt или протеин киназа Б. Овај сигнални пут је регулисан вишеструким механизмима и често је испреплетан са другим сигналним путевима. Проблеми регулације PI3K/Akt пута могу довести до повећања сигналне активности што је повезано са низом болести као што су канцер и дијабетес типа II. Фосфатидилинозитол 3-киназе су одговорне за фосфорилацију фосфатидилинозитола на Д3 позицији и могу да се поделе у 3 групе у зависности од супстратне специфичности и начина активације. Класа I фосфорилише *in vivo* фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат до фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфата (PIP3) и може даље да се подели у 2 подгрупе – а и б. Подгрупа Ia PI3K су хетеродимери састављени од каталитичке субјединице (p110) и регулаторне субјединице (p85), која је везана за каталитичку субјединицу и држи је у неактивном стању (*Liu и сар.*, 2009). Пут се може активирати низом сигнала, укључујући хормоне, факторе раста и компоненте екстрацелуларног матрикса. Стимулише се везивањем екстрацелуларног лиганда за рецептор тирозин киназе у ћелијској мембрани изазивајући димеризацију рецептора и унакрсну фосфорилацију тирозинских остатака у интрацелуларним доменима. Регулаторна субјединица p85 се везује за фосфорилисане тирозинске остатке на активаном рецептору преко свог SH2 домена. Она онда регрутује каталитичку субјединицу p110 да би се формирао комплетно активан PI3K ензим (Слика 7).



Слика 7. Шематски приказ PI3K/Akt и MAPK сигналних путева. Прилагођено из Baer и сар., 2015; BBA – Reviews on Cancer

Akt је солубилни цитосолни протеин молекулске масе 57 kDa, који се код сисара јавља у три изоформе познате као Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) и Akt3 (PKB γ). Све изоформе поседују 3 конзервативна домена: PH домен на N-терминалном крају, централни каталитички киназни домен сродан протеинским киназама А и Ц, који садржи треонин (Thr) на позицији 308 код Akt1 и С-терминални регулаторни домен (садржи Ser⁴⁷³ код Akt1) (Liu и сар., 2009). Његов PH домен интерагује са PIP3. Једном када се Akt веже за ћелијску мембрану, долази до фосфорилације 3-фосфоинозитид-зависном протеин-киназом 1 (PDK1), док се mTOR комплекс 2 (mTORC2) фосфорилише на COOH крају Akt. Пуна активација Akt захтева обе фосфорилације. Активиран Akt мигрира кроз цитосол у једро (Martelli и сар., 2012).

Док је хипоксија примарни стимулус за HIF-1 α усходну регулацију, активација рецептора епидермалног фактора раста (EGFR) и PI3K пута, такође могу допринети повећању експресије HIF-1 α . EGFR је трансмембрански рецептор са тирозин киназном активношћу, који припада HER фамилији рецептора. Он је прекомерно експримиран и активиран код различитих тумора и представља атрактивну мету за антитуморску терапију (Martelli и сар., 2012). Zhong и сарадници (2000) су били међу првима који су показали да активација EGFR/PI3K/Akt/mTOR пута може повећати експресију VEGF

усходном регулацијом HIF-1 α (Zhong и сар., 2000). Активација PI3K/mTOR пута повећава ниво HIF-1 α протеина без промене HIF-1 α иРНК нивоа (Jiang и сар., 2001), вероватно повећањем транслације HIF-1 α (Zhang и сар., 2018).

PI3K/Akt пут је такође имплициран у ангиогенезу кроз регулацију NO сигнализације у ендотелним ћелијама. Туморске ћелије углавном експримирају iNOS, мада неки типови тумора такође експримирају eNOS и nNOS. Туморске васкуларне ендотелне ћелије углавном експримирају eNOS, док туморски стромални фибробласти и имунске ћелије експримирају iNOS (Fukumura и сар., 2006). Студије у којима су коришћени eNOS^{-/-} и iNOS^{-/-} мишеви, показале су да eNOS игра кључну улогу у VEGF-индукованој ангиогенези и васкуларној пропустљивости (Fukumura и сар., 2001). VEGF стимулација у ендотелним ћелијама је неопходна за миграцију ових ћелија и формирање структура налик капиларима на PI3K/Akt зависан начин (Karar и Maity, 2011). Раније студије су показале да VEGF може да индукује продукцију NO, која је ослабљена PI3K инхибиторима (Paparotopoulos и сар., 1997). Ова регулација се може десити путем фосфорилације eNOS на серинском остатку 1177 путем Akt. Ова фосфорилација је неопходна за VEGF-индуковану миграцију ендотелних ћелија (Dimmeler и сар., 2000). Хипоксија такође може да повећа eNOS фосфорилацију путем везивања HSP90 за eNOS и активирањем PI3K/Akt пута (Zhang и сар., 2018). Још једна веза између NO пута и ангиогенезе сугерисана је чињеницом да NO донори могу да повећају експресију и транскрипциону активност HIF-1, што резултује индукцијом VEGF иРНК (Kasuno и сар., 2004).

Главни негативни регулатор PI3K/Akt је протеин/липид фосфатаза-фосфатаза и тензин делетиран хомолог хромозома 10 (PTEN). PTEN антагонизује PI3K функцију, тако што спречава Akt активацију (Gelman и Sudol, 2012). PTEN је такође мутиран у извесним туморима као што је тумор дојке, тиреоидеје и ендометријума, што доводи до повећане активности PI3K/Akt синалног пута (Gelman и Sudol, 2012).

МАРК су фамилија серин (Ser)/треонин (Thr) протеин киназа, које учествују у регулацији више сигналних путева укључених у основне ћелијске процесе као што су раст, пролиферација, диференцијација, преживљавање, ангиогенеза и ћелијска миграција. Каскада укључује читаву групу цитоплазматских протеина, а описана је као линеарни Raf/MEK/ERK пут, од рецептора тирозин киназе на ћелијској мембрани до регулације генске транскрипције у једру преко киназе регулисане екстрацелуларним сигналом (Erk).

Активација сигналних путева MAPK укључује мале GTP хидролазе, тзв. мале GTP везујуће протеине (engl. „*Rat sarcoma*“, *Ras*), која регрутује Raf киназу у мембрану, што доводи до фосфорилације и активације ERK1/2 (*Mebratu i Tesfaigzi, 2009*). За пуну активност ERK1/2 неопходна је фосфорилација на два аминокиселинска места: Thr²⁰² и Tyr²⁰⁴ за ERK1 и Thr¹⁸³ и Tyr¹⁸⁵ на ERK2. Активирана ERK1/2 затим може да фосфорилише различите Ser/Thr остатке више од 50 различитих цитосолних и нуклеусних протеина и транскрипционих фактора и тиме утиче на експресију гена који воде повећању пролиферације, диференцијације и преживљавања ћелије (*Mebratu i Tesfaigzi, 2009*).

1.4.2. Мутација у гену за калретикулин

Код одређеног броја пацијената са дијагнозом ЕТ или ПМФ, негативних у погледу присуства мутације JAK2V617F, откривена је мутација у гену који кодира калретикулин (CALR). Ова мутација представља соматску инсерцију или делецију у егзону 9 гена за калретикулин и друга је по заступљености мутација у МПН (*Nangalia и сар., 2013*). Присуство мутације у гену за CALR код оболелих од МПН, искључује присуство JAK2 мутације и обрнуто, мада постоје студије у којима је описана њихова обострана коекспресија (*Lundberg и сар., 2014*).

Калретикулин је калцијум-везујући протеин превасходно присутан у лумену ендоплазминог ретикулума, укључен у одвијање бројних физиолошких и патолошких процеса у ћелији. Тако, унутар ендоплазминог ретикулума, осигурава склапање новосинтетисаних гликопротеина и модулира хомеостазу калцијума. Поред тога, учествује у пролиферацији, апоптози, фагоцитози и имунском одговору.

Тачан механизам деловања мутације у гену за CALR у патогенези МПН још увек није јасно дефинисан, али постоје сазнања да доводи до хиперактивности JAK2/STAT сигналног пута у прогениторима мегакариоцитне и гранулоцитне лозе (*Nangalia и сар., 2013*). Истраживања су показала да пацијенти са МПН код којих се среће мутација у гену за калретикулин имају мањи ризик од тромбозе и дужу стопу преживљавања него пацијенти са JAK2 мутацијом. Оно што је важно истакнути је да болесници са присутном CALR мутацијом а у одсуству JAK2V617F мутације, такође реагују на терапију JAK2 инхибиторима (*Vainchenker и сар., 2018*).

1.5 Циторедуктивно лечење код МПН

Основа у лечењу нискоризичних пацијената са ПВ је флеботомија. Главни циљ ове терапије је да се ограничи расположивост гвожђа у еритропоези. Насупрот томе, пацијенти са високим ризиком углавном се подвргавају мијелосупресивној терапији, понекад заједно са флеботомијом, где је хидроксиуреја лек избора (*Mesa и сар., 2015*). Нискоризични пацијенти са ЕТ немају потребе за терапијом, док се високоризична група третира хидроксиурејом која смањује тромбозу (*Barbui и сар., 2004*). Пацијенти са JAK2V617F мутацијом имају бољи одговор и захтевају мање дозе хидроксиуреје у контроли тромбоцитозе него пацијенти без мутације (*Campbell и сар., 2005*). Једини приступ код пацијената са ПМФ, који доводи до продужетка преживљавања са могућношћу излечења је алогена трансплантација матичних ћелија хематопоезе (*Kroger и сар., 2008*). За сада се такав третман оставља за високоризичне пацијенте.

Хидроксиуреја инхибира рибонуклеотидну редуктазу, спречавајући на тај начин синтезу и поправку ДНК. Хидроксиуреја се претвара у слободан радикал нитроксид *in vivo* и дифузијом преноси у ћелије где се везује за слободни радикал тирозил на месту активације рибонуклеотидне редуктазе и на тај начин инактивира поменути ензим (*Singh i Xu., 2016*). Студија са електрон спин резонантном спектроскопијом је показала да је (NO) стваран из хидроксиуреје (*Sakano и сар., 2001*). И NO гас и NO створен из лизата активираних макрофага инхибирају рибонуклеотидну редуктазу ћелија тумора, тако да цитостатски ефекти активираних макрофага и хидроксиуреје имају подударне механизме који укључују и инхибицију рибонуклеотидне редуктазе (*Singh i Xu., 2016*). Ови резултати указују да би стварање NO из хидроксиуреје могло бити молекуларна база фармаколошке и антитуморске активности хидроксиуреје (*Singh i Xu., 2016*). Хидроксиуреја је већ коришћени хемиотерапеутски лек у лечењу МПН укључујући ХМЛ, ПВ и ЕТ. Примена хидроксиуреје смањује раст претходника еритропоезе и CD34⁺ ћелија у ПВ и ЕТ (*Andreasson и сар., 2000*). Док је за хлорамбуцил, бусулфан и радиоактивни фосфор (32P) показано да код пацијената са ЕТ и ПВ повећавају ризик трансформације у АМЛ, леукомогени потенцијал хидроксиуреје још увек је ствар расправе. Клиничке студије указују да хидроксиуреја може довести до малог повећања ризика за појаву АМЛ, али је тешко доказати да ли је АМЛ изазвана хидроксиурејом или је природна прогресија ПВ и ЕТ (*Burkitt и сар., 2006*).

1.6 Инхибитори Јанус киназе у лечењу МПН

Откриће JAK2 мутације значајно је побољшало разумевање патогенезе ПВ, ЕТ и ПМФ и довело до важних таксономских и терапијских промена у области мијелопролиферативних неоплазми. Након овог открића, низ мутираних алела је показан у мањим подгрупама пацијената са МПН. Док неке од ових мутација могу претходити стицању JAK2 мутације (нпр. TET2 мутација), друге су изгледа повезане са прогресијом ка АМЛ (нпр. IKZF1 и ASXL1 мутације) (Tefferi., 2010). Утврђивање функције протеина кодираних овим мутираним генима, може олакшати развој нових приступа у лечењу МПН. Пресудна улога JAK2 у патогенези МПН подстакла је откриће АТР-конкурентних једињења ниске молекулске масе која могу да инхибирају активност овог онкопротеина (Lucet и сар., 2006).

Аутономно активирање JAK2 киназног домена са накнадном фосфорилацијом СТАТ и МАРК протеина, јавља се код пацијената са и без JAK2 мутације. JAK2 инхибитори дизајнирани су да супримирају цитокинску сигнализацију индуковану хиперактивним цитоплазматским JAK2 геном. JAK2 инхибитори се надмећу за АТР-везујући џеп тирозин-киназног домена JAK2 (Baskin и сар., 2010). Пошто је JAK2 мутација локализована изван АТР-везујућег места, JAK2 инхибитори не праве разлику између JAK2 и JAK2-мутираних гена (Verstovsek, 2009). Као последица тога, JAK2 инхибитори се могу користити код пацијената са МПН, независно од JAK2 мутационог статуса.

JAK2 инхибитори се могу поредити са BCR-ABL1 инхибиторима, јер су обе врсте лекова инхибитори тирозин киназа. Па ипак, док су BCR-ABL1 инхибитори усмерени против аберантног, фузионисаног гена (Goldman и сар., 2001), JAK2 инхибитори су усмерени против гена који је присутан у нормалним ћелијама и има важну улогу у нормалном одвијању хематопоезе. То значи да JAK2 инхибитори имају ограничену клиничку ефикасност, што је видљиво у клиничким испитивањима, где веома често имају високу оцену хематолошке токсичности (Santos и сар., 2010).

Мала група од четири једињења (руксолитиниб, TG 101348, лестауртиниб и XL019) са различитом селективношћу за четири члана JAK фамилије киназа, први пут је тестирана код пацијената са ПМФ или пост-ПВ или –ЕТ мијелофиброзе са високим ризиком.

Руксолитиниб је орални циклопентилпропионитрилни дериват потентне инхибиторне активности према JAK1 и JAK2, усмерене активности према TYK2 и

занемарљиве активности према JAK3 и 26 додатних киназа (*Nussenzveig* и сар., 2001). Одобрен је 2011. године од стране Америчке администрације за храну и лекове (*US Food and Drug Administration, FDA*), за лечење оболелих од средње и високоризичне мијелофиброзе и полицитемије вере које не реагују на терапију хидроксиурејом.

У смислу циљане терапије и инхибиције JAK1 и JAK2, руксолитиниб је био први лек примењен код мијелопролиферативних неоплазми. У ранијим фазама истраживања показао је значајан утицај на смањење симптома болести и смањење слезине (*Verstovsek* и сар., 2010). То је био темељ за даља истраживања која су донела значајне позитивне резултате при лечењу руксолитинибом у односу на плацебо. Код 40% пацијената дошло је до смањења слезене за трећину, смањења симптома, у смислу мањег абдоминалног бола, бола под левим ребреним луком, ноћног знојења, пруритуса као и мишићне и коштане боли, за огромних 50%. Код готово 68% пацијената који су реаговали, овакво побољшање је било присутно и након 48 недеља континуиране примене терапије. Од нуспојава, анемија и тромбоцитопенија су се појављивале чешће код особа лечених руксолитинибом, али није било значајних проблема у збрињавању ових поремећаја. Тромбоцитопенија је углавном узроковала појаву модрица па није било крварења, док је појава анемије доживљавала свој врхунац након 8 до 12 недеља терапије да би касније пала на једнак ниво као и код пацијената лечених плацебом. Након прекида примене руксолитиниба, степен симптома се вратио у почетно стање које је било присутно пре примене терапије (*Verstovsek* и сар., 2010). Пацијенти су праћени и следеће три године при чему је и даље био присутан позитиван одговор на терапију код већег броја пацијената, без повећања броја нуспојава. Постало је евидентно да ће руксолитиниб имати позитиван учинак код пацијената независно од тога имају ли JAK2 мутацију или немају, као и да ће бити од користи пацијентима који припадају групи са високоризичним молекуларним профилем (*Harrison*, 2015).

Поред неспецифичних, откривени су и специфични JAK2 инхибитори. Један од њих је **1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан**. Показано је да је он веома потентан инхибитор аутофосфорилације JAK2, као и да је та инхибиција дозно и временски зависна. Поред тога, показано је да он директно инхибира лиганд-зависну активацију JAK2 (*Sandberg* и сар., 2005).

У претклиничким и клиничким студијама, JAK инхибитори могу ублажити многе последице мијелопролиферације, укључујући екстремедуларну хематопоезу. Међутим, механизми којим су ове погодности постигнуте и да ли су оне резултат JAK2 инхибиције, није дефинитивно потврђено.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Новија истраживања указују и на значајну улогу ангиогенезе у патогенези хематолошких малигнитета, укључујући и МПН. Као одраз појачане ангиогенезе описано је присуство повишене експресије фактора раста васкуларног ендотела (VEGF) и базног фактора раста фибробласта (bFGF), као и повећана микроваскуларна густина у костној сржи. Повећана ангиогенеза може бити у обрнутом односу са преживљавањем пацијената оболелих од МПН. Циљ ове студије је да се утврди утицај инфламације на развој ангиогенезе, као и утицај циљане терапије ЈАК1/2 инхибиторима на ангиогенезу код МПН.

Полазећи од наведених сазнања циљ ове студије је био да се код оболелих од МПН:

1. утврди учесталост онкогене JAK2V617F мутације, као и мутације у гену за калретикулин;
2. анализира степен експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS у гранулоцитима и CD34⁺ ћелијама, на нивоу гена и на нивоу протеина. Поред тога, да се изврши и анализа степена њихове експресије у костној сржи оболелих;
3. у циљу анализе ефикасности примењене мијелосупресивне терапије на факторе ангиогенезе, испита степен експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS у гранулоцитима МПН пацијената после најмање 6 месеци терапије хидроксиурејом;
4. анализира степен експресије β -катенина, PPAR γ и Ki67 протеина и упореди са ултраструктурном грађом костне сржи МПН пацијената;
5. испита степен пролиферације и апоптозе гранулоцита МПН пацијената *in vitro*, у одговору на проинфламаторни IL-6 и ЈАК инхибиторе;
6. испита утицај IL-6 на степен експресије ангиогених фактора на моделу хумане HEL 92.1.7. ћелијске линије са ЈАК2 мутацијом, као и степен њихове експресије након третмана са хидроксиурејом и ЈАК инхибиторима;
7. анализира учешће различитих сигналних путева (ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK), којима IL-6 остварује своје ефекте, на моделу хумане HEL 92.1.7. ћелијске линије.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Материјал

3.1.1. Испитаници

Овом студијом је обухваћено 160 новодијагностикованих пацијената оболелих од мијелопролиферативних неоплазми, у Институту за хематологију Клиничког центра Србије. Дијагноза је постављена на основу стандардних клиничких параметара у складу са најновијим препорукама Светске здравствене организације (СЗО) из 2016. године. Контролну групу сачињавало је 15 здравих индивидуа. Студија је одобрена одлуком Етичког одбора Клиничког центра Србије и Етичког одбора Института за медицинска истраживања, док је материјал прикупљан уз претходну писмену дозволу пацијената обавештених о сврси прикупљања крви за експериментални рад.

Од клиничких и хематолошких параметара евидентираних у тренутку постављања дијагнозе, као и током праћења болести, у овом раду су коришћени: пол, старост пацијената при постављању дијагнозе, ниво хемоглобина и хематокрит.

Комплетна дијагностика болести, укључујући и патохистолошку дијагнозу, извршена је у Клиничком центру Србије. Свежи узорци периферне крви су узимани на динатријум EDTA као антикоагулансу и транспортовани до Института за медицинска истраживања, где је вршена изолација гранулоцита и CD34⁺ ћелија. У Лабораторији Групе за молекуларну онкологију, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, извршено је имунохистохемијско бојење на VEGF, HIF-1 α и eNOS, урађена је фотодокументација и обрађени су комплетни резултати.

Подаци о примењеним примарним и секундарним антителима приказани су у **Табелама 1 и 2**. Подаци о фармаколошким инхибиторима сигналне трандукције и цитокинима приказани су у **Табели 3**.

Табела 1. Примарна антитела примењена у експериментима (WB - Western blot; ИНН - имунохистохемијско обележавање; ИСН - имуноцитохемијско обележавање)

Примарна антитела			
Антиген	Порекло	Метода	Произвођач
VEGF	зечије	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD
HIF-1 α	мишје	WB	R&D Systems, SAD
eNOS	зечије	WB, ИНН, ИСН	Santa Cruz Biotechnology, SAD
alpha Tubulin	мишје	WB	Sigma-Aldrich, SAD
H2B	зечије	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD
VEGF	мишје	ИНН, ИСН	BD Biosciences, SAD
HIF-1 α	мишје	ИНН, ИСН	Abcam, UK
pSTAT3	зечије	WB	Abcam, UK
STAT3	зечије	WB	Abcam, UK
pAkt	зечије	WB	Abcam, UK
Akt	зечије	WB	Abcam, UK
pMAPK	зечије	WB	Cell Signaling, SAD
MAPK	зечије	WB	Cell Signaling, SAD
Ki67	мишје	ИНН	Novocastra Laboratories Ltd, UK
β -actin	зечије	WB	Abcam, UK
β -catenin	мишје	ИНН	Thermo Fisher Scientific, SAD
PPAR γ	зечије	ИНН	Santa Cruz Biotechnology, SAD

Табела 2. Секундарна антитела примењена у експериментима (HRP - пероксидаза рена, horse radish peroxidase; WB - Western blot)

Секундарна антитела			
Антитело	Порекло	Метода	Произвођач
HRP коњуговано антимишје	козје	WB	Pierce, SAD
HRP коњуговано антизечије	козје	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD

Табела 3. Фармаколошки инхибитори сигналне трансдукције, цитокини и естри примењени у експериментима (ТРА - *Tetradecanoyl phorbol acetate*)

Фармаколошки инхибитори, цитокини и естри		
Назив	Опис	Произвођач
Хидроксиуреја	инхибитор рибонуклеотид редуктазе	Sigma-Aldrich, SAD
Руксолитиниб	ЈАК1/2 инхибитор	Cayman Chemical, SAD
Хексабромочицлохексан	ЈАК2 инхибитор	Sigma-Aldrich, SAD
Хумани рекомбинантни ИЛ-6	/	R&D Systems, SAD
ТРА	форболни естар	Sigma-Aldrich, SAD

3.2 Дизајн експеримента

3.2.1. Утврђивање нивоа експресије ангиогених фактора у периферној крви и костној сржи МПН пацијената

У циљу утврђивања степена експресије кључних регулатора ангиогенезе VEGF, HIF-1 α и eNOS у периферној крви МПН пацијената, вршена је изолација гранулоцита и CD34⁺ ћелија. Ниво експресије ангиогених фактора праћен је на генском и протеинском нивоу. Поред тога, нивои експресије праћени су и у костној сржи пацијената са МПН. Такође, експресија је испитана код одређеног броја пацијената након најмање 6 месеци лечења стандардном цитостатском терапијом хидроксиурејом.

3.2.2. Утврђивање нивоа експресије β -катенина, PPAR γ и Ki67 протеина у костној сржи МПН пацијената

У циљу испитивања улоге Wnt/ β -катенин сигналног пута као и PPAR γ транскрипционог фактора, вршено је испитивање нивоа експресије ових фактора у костној сржи пацијената са МПН. Поред тога испитиван је и пролиферативни индекс путем експресије Ki67 протеина и поређен са ултраструктурним карактеристикама костне сржи МПН пацијената.

3.2.3. Испитивање деловања хидроксиуреје и ЈАК инхибитора на експресију ангиогених фактора

Као модел за испитивање степена деловања хидроксиуреје и специфичног ЈАК2 инхибитора, коришћена је хумана HEL 92.1.7. ћелијска линија. HEL ћелије су култивисане са хидроксиурејом (100 μM), 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μM), као и са оба фактора заједно у трајању од 24 и 48 сати. Након истека третмана анализирана је експресија ангиогених фактора на генском и протеинском нивоу.

3.2.4. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6 и ЈАК инхибитора на еритролеукемијским ћелијама

На хуманим HEL 92.1.7. ћелијама прво је испитиван утицај проинфламаторног цитокина IL-6. Утицај IL-6 је праћен истовремено на HEL ћелијама и макрофагима. У циљу испитивања макрофага, HEL ћелије су третиране тетрадеcanoил форбол ацетатом (енг. *Tetradecanoyl phorbol acetate, TPA*) (1 μM) у трајању од 72 сата, како би се извршило њихово превођење у макрофаге (*Murate* и сар., 1993; *Long* и сар., 1990). Након тога, HEL ћелије и макрофаги су култивисани са IL-6 (20 ng/ml) у различитом временском трајању (4 сата, 2 сата, 1 сат, 30 минута, 15 минута). Након истека третмана анализирана је експресија ангиогених фактора на протеинском нивоу.

У следећој фази, култивисане HEL ћелије су третиране са IL-6 (20 ng/ml) и 2 ЈАК инхибитора - неспецифичним ЈАК1/2 инхибитором руксолитинибом (1 μM) и специфичним ЈАК2 инхибитором 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μM) током 16 сати, након чега је испитиван њихов утицај на степен пролиферације и апоптозе.

У циљу испитивања механизма путем којих IL-6 остварује своје ефекте, HEL ћелије и макрофаги су третиран са IL-6 и ЈАК инхибиторима у току 60 минута, при чему су ЈАК инхибитори додавани 30 минута пре IL-6. По истеку третмана анализирани су пролиферативни сигнални путеви (ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK), као и ниво експресије ангиогених фактора на протеинском нивоу.

3.2.5. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6 и ЈАК инхибитора на гранулоците МПН пацијената *in vitro*

У циљу испитивања потенцијалног деловања IL-6 и ЈАК инхибитора на ћелијски циклус гранулоцита МПН пацијената, вршена је њихова изолација из периферне крви, након чега су култивисани у чистом RPMI медијуму. Након тога,

гранулоцити су третирани са IL-6 (20 ng/ml), руксолитинибом (1 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M). Након инкубације (16 сати), испитиван је њихов утицај на степен пролиферације и апоптозе гранулоцита. Поред тога, анализирани су и пролиферативни сигнални путеви (JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK) на протеинском нивоу, након третмана у различитом временском трајању (15 минута, 30 минута и 1 сат).

3.3 Ћелије и ћелијске културе

3.3.1. Изолација гранулоцита и CD34⁺ ћелија из периферне крви

Периферна крв пацијената и здравих контрола (по 30 ml) је сакупљана у епруветама са динатријум EDTA антикоагулантом. Крв је затим растварана у запремини 1:1,2 са фосфатним пуфером (PBS-а, pH=7.2, без Ca²⁺ и Mg²⁺) са додатком 2 mM EDTA. Наношено је 35 ml разблаженог ћелијског раствора преко 15 ml лимфопрепа (LСM, *Lymphocyte Separation Medium, Capricorn Scientific, GmbH, Germany*) у епрувети од 50 ml и центрифугирано на 400 g, 35 минута на 20°C. Горњи слој плазме са тромбоцитима је пажљиво аспириран тако да слој мононуклеарних ћелија остане очуван у међуфази.

Изолација гранулоцита. Гранулоцити су изоловани након хипотоне лизе еритроцита сталожених са ЛСМ. Сталожени еритроцити су мешани пар минута у епрувети са хипотоним раствором (0.15 M NH₄Cl, 0.1 mM Na₂EDTA, 12 mM NaHCO₃) до њихове видљиве лизе, а затим су центрифугирани на 200 x g два минута да би се добио талог гранулоцита који се још два пута испирао са PBS-ом. Број и вијабилност ћелија одређивана је бојењем са 0.4% раствором Трипан плавог (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Из гранулоцита је одмах издвајана ДНК, РНК, протеини и прављени су цитоспин препарати.

Изолација CD34⁺ ћелија. Слој мононуклеарних ћелија је два пута испран са PBS 2 mM EDTA. CD34⁺ прогениторске ћелије су изоловане из мононуклеарне ћелијске суспензије коришћењем колоне за магнетно раздвајање (*Super Macs II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*) и мешавине магнетских микрокуглица коњугованих са анти - CD34 антителом (*Miltenyi Biotec*) према упутству произвођача. Број и вијабилност ћелија одређивана је бојењем са 0.4% раствором Трипан плавог (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Из CD34⁺ ћелија је одмах изолована укупна РНК или су припремани цитоспин препарати.

3.3.2. Ћелијска линија

У експериментима у којима је испитиван утицај хидроксиуреје, IL-6 и ЈАК инхибитора на степен експресије ангиогених фактора као и сигналних путева у које је IL-6 укључен, коришћена је хумана HEL 92.1.7. ћелијска линија. То је еритролеукемијска ћелијска линија која се спонтано диференцира у еритробласте (Martin и сар., 1982) и поседује ЈАК2V617F мутацију у хомозиготном стању. Гајена је у RPMI-1640 медијуму за култивацију (Biowest, Nuaille, France) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS, Fetal Bovine Serum, Biowest, Nuaille, France) и 100 јединица/ml пеницилин/стрептомицина (Biowest, Nuaille, France) на температури од 37°C, у атмосфери са 5% CO₂ и 100% влажности.

3.4 Анализа ЈАК2V617F и мутације у гену за CALR

3.4.1. Секвенцирање PCR продуката

Секвенцирање ДНК је вршено BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-ом (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), капиларном електрофорезом на аутоматском секвенатору (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). Овај кит омогућава секвенцирање у PCR реакцији у којој се поред деоксинуклеотида користе и 2',3'-дидеоксинуклеотиди. ДНК полимераза копира један ланац ДНК матрице уграђујући нуклеотиде на 3' крај прајмера све док у растући ланац не угради неки од дидеоксинуклеотида. Дидеоксинуклеотиди немају ОН-групу на 3' позицији, због чега немају способност везивања следећег нуклеотида, па њиховом уградњом долази до терминације полимеризације. Реакције се раде само са једним прајмером (асиметрични PCR) тако да се добија серија фрагмената различитих дужина који се завршавају дидеоксинуклеотидом. Сваки од 4 дидеоксинуклеотида обележен је различитом флуоресцентном бојом чиме је омогућена детекција фрагмената у секвенатору. Смеша за секвенцирање, финалне запремине 8 µl, садржала је следеће компоненте: 3-20 ng пречишћеног PCR продукта (за дужине 200-1000 bp), 3,2 pmol прајмера за секвенцирање и 3 µl Ready Reaction Mix-a (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA).

Температурни профил PCR реакције за секвенцирање:

1. 1 мин/96°C

2. 25 циклуса:
 - 10 сек/96°C
 - 5 сек/50°C
 - 4 мин/60°C
3. 4°C/∞

3.4.2. Испитивање присуства JAK2V617F мутације

За PCR амплификацију (*T3000 Thermocycler, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, Germany*) коришћени су прајмери приказани у табели 4:

Табела 4. Сетови прајмера коришћени за испитивање присуства JAK2V617F мутације

Прајмер	Секвенца (5' – 3')
JAK2-FWD	GTTTCTTAGTGCATCTTTATTATGGCAGA
JAK2-G-REV	FAM-TTACTCTCGTCTCCACAGAC
JAK2-T-REV	FAM-AAATTACTCTCGTCTCCACAGAA

Температурни профил PCR реакције:

1. 5 мин/95°C – активација HotStarTaq полимеразе
2. 30 циклуса:
 - 30 сек/94°C – денатурација
 - 30 сек/62°C – анилинг
 - 80 сек/72°C – елонгација
3. 10 мин/72°C – финална елонгација

Након PCR амплификације извршено је пречишћавање на колони (*QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, USA*) према упутству произвођача. Приликом одређивања присуства JAK2V617F мутације, PCR-ом умножени продукти су секвенцирани BigDye Terminator V3.1 китом за секвенцирање на ABI PRISM 3130 automated DNA Sequencer апарату (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*), коришћењем AB DNA Sequencing Analysis Software (v 5.2).

Прајмери специфични за мутацију су дужи у односу на „wild“ тип прајмера. Током PCR анализе долази до амплификације секвенци гена од интереса. Том приликом се стварају JAK2V617F секвенце, које су за три базна пара дуже у односу на немутиране

ЈАК2 секвенце. Анализа ДНК секвенци (АВІ3130х1) ће показати два различита пика, уколико пацијент има ЈАК2V617F мутацију. Однос ова два пика (мутираног – 190 базних парова и немутираниог – 187 базних парова) указује на различито алелно оптерећење. Алелно оптерећење мутираног гена је анализирано по формули: Висина пика_{ЈАК2V617F} / (висина пика_{wild tip} + висина пика_{ЈАК2V617F}) x 100%. Према овој методи пацијенти су према степену оптерећења ЈАК2 подељени у 3 групе: ЈАК2wt (без мутације), ЈАК2 хетерозиготи (1-50%) и ЈАК2 хомозиготи (≥ 51%).

3.4.3. Испитивање присуства мутације у гену за CALR

За PCR анализу коришћен је кит AmpliTaq Gold 360 Mastermix (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*).

Температурни профил PCR реакције:

1. 10 мин/95°C – активација Таq полимеразе
2. 10 циклуса:
 - 15 сек/94°C – денатурација
 - 15 сек/55°C – анилинг
 - 30 сек/72°C – елонгација
3. 20 циклуса:
 - 15 сек/89°C – денатурација
 - 15 сек/55°C – анилинг
 - 30 сек/72°C – елонгација
4. 20 мин/72°C – финална елонгација.

За PCR амплификацију су коришћени прајмери приказани у табели 5:

Табела 5. Сетови прајмера коришћени за испитивање присуства мутације у гену за CALR

Прајмер	Секвенца (5' – 3')
CALR-intr8-fam-fwd	FAM-GGCAAGGCCCTGAGGTGT
CALR-ex9-rev	GGCCTCAGTCCAGCCCTG

Након PCR амплификације извршено је пречишћавање на колони (*QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, USA*) према упутству произвођача. Умножени производи су секвенцирани са BigDye Terminator V3.1 китом за секвенцирање на АВІ PRISM 3130

automated DNA Sequencer апарату (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*), уз коришћење Gene Mapper software version 4.0 (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*).

3.5 Анализа експресије гена помоћу реакције реверзне транскрипције и „REAL-TIME“ PCR (qPCR) методе

Изолација РНК. У сврху одређивања ћелијски специфичне генске експресије и механизма који регулишу генску експресију из ћелија је изолована интактна РНК, на основу које је потом добијена комплементарна ДНК (сDNA).

На талог ћелија додавано је 0,75 ml TRIzol реагенса (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA USA*), при чему су ћелије директно лизирание пропуштањем кроз пипету. Хомогенизовани узорци су инкубирани пет минута на собној температури како би се омогућила потпуна дисоцијација нуклеопротеинског комплекса, а затим су центрифугирани на 12000 g на температури од 4°C у трајању од десет минута. По завршеном центрифугирању, хомогенат се пребацује у нову епрувету а талог баца. Потом је сваком узорку додавано 0,15 ml хлороформа. Епрувете су снажно мућкане 15 секунди, а потом инкубирание 5 минута на собној температури. Узорци су потом центрифугирани на 12000 g, на температури од 4°C у трајању од 15 минута. Хомогенат се након центрифугирања раздвајао у три фазе: доњу, црвену фенол-хлороформ фазу која садржи протеине, белу интерфазу у којој се налази ДНК и горњу водену фазу која садржи РНК. Водена фаза је пажљиво пребацивана у нову епрувету. Сваком узорку РНК додавано је по 0,5 ml 100% изопропанола а потом су инкубирани 10 минута на собној температури и потом центрифугирани на 12000 g, на 4°C у трајању од десет минута. Након центрифугирања, РНК се могла видети у виду белог талога на дну епрувете Супернатант је одливан а РНК талог је испиран са 1 ml 75% етанола. Узорак је кратко промешан а потом центрифугиран на 7500 g на температури од 4°C у трајању од 15 минута. Након одливања супернатанта, РНК талог је сушен на ваздуху и растваран у води без нуклеаза. Након одређивања концентрације РНК помоћу спектрофотометра, узорци су чувани на -80°C до употребе.

Реверзна транскрипција и добијање комплементарне ДНК. Укупна РНК коришћена је за добијање комплементарне ДНК и то на основу олиго dT прајмера који омогућава реверзну транскрипцију само иРНК. Реверзна транскрипција је вршена

према упутству произвођача комплета за реверзну транскрипцију (*Maxima First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Fisher Scientific, USA*). Укратко: 5 µg РНК и 1 µl олиго dT прајмера су мешани са водом без нуклеаза до укупне запремине од 11 µl а потом им је додаван основни микс који се састојао од M-MuLV реверзне транскриптазе, смеше нуклеотида (dNTP микс), инхибитора рибонуклеазе и пуфера за реверзну транскрипцију. Оваква смеша запремине 20 µl инкубирана је 60 минута на 37°C а затим 5 минута на 70°C у термоблоку апарата Mastercycler personal (*Eppendorf, Germany*). Концентрација cDNA је одређивана помоћу спектрофотометра.

Анализа степена експресије гена помоћу „REAL-TIME“ PCR (qPCR) методе. „Real-time“ PCR или квантитативни PCR (qPCR) је метода која омогућава квантификацију PCR продукта у току сваког PCR циклуса, тј. у реалном времену. qRT-PCR („quantitative RT-PCR“) је варијанта qPCR методе у којој се, као матрица за амплификацију специфичне секвенце, користи cDNA.

У qPCR се мери флуоресцентни сигнал који се емитује у току PCR реакције и чији је интензитет директно пропорционалан количини PCR продукта у датом циклусу. За разлику од „класичног“ PCR, где се количина продукта може мерити само на крају PCR реакције, овде се квантификација одвија у току експоненцијалне фазе реакције у току које долази до удвостручавања PCR продукта приликом сваког циклуса.

Тренутно се користе 2 основне qPCR технике:

1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green је најједноставнија техника, заснована на примени интеркалирајуће SYBR Green I боје која се везује за мањи жлеб дволанчане ДНК. Са повећањем броја циклуса PCR реакције долази до повећања количине дволанчане ДНК, па самим тим и до повећања интензитета флуоресцентног сигнала кога емитује SYBR Green I боја. Ова техника може имати за последицу детекцију неспецифично амплификованих PCR продуката, као и детекцију димера прајмера. Због тога се за процену специфичности реакције примењује анализа криве топљења („*melting curve analysis*“).

TaqMan техника користи 5'→3' егзонуклеазну активност Taq полимеразе за детекцију PCR продукта. За разлику од SYBR Green технике, у TaqMan техници се, поред специфичних прајмера, користи и TaqMan проба. То је олигонуклеотидна проба комплементарна секвенци у оквиру таргет секвенце; на 5' крају је обележена флуоресцентном, репортерском бојом (Reporter, најчешће FAM, VIC или JOE), а на 3' крају сузбијајућом бојом (Quencher, најчешће TAMRA). Све док се репортерска и

сузбијајућа боја налазе близу једна друге, тј. док је TaqMan проба интактна, нема емитовања флуоресценције. Међутим, у току PCR амплификације 5'→3' егзонуклеазна активност Taq полимеразе измешта пробу и уклања је са ДНК ланца, што резултира емитовањем детектабилне флуоресценције од стране репортерске боје. У току сваког новог циклуса PCR реакције, флуоресценција ће расти као последица акумулације слободних репортера.

Квантификација qPCR продуката може бити:

- апсолутна квантификација, где је резултат изражен као апсолутни број копија циљне секвенце; квантификација циљне секвенце се добија поређењем са стандардном кривом израђеном од узорака познате концентрације;
- релативна квантификација, где је резултат изражен као релативни однос количине референтног узорка (калибратор) и мереног узорка.

У оба приступа квантификацији, веома је важно извршити нормализацију добијених података. Како је количина добијених PCR продуката директно зависна од почетне количине матрице, да би се избегле грешке настале приликом поставке експеримента, упоредо са умножавањем циљне секвенце врши се и умножавање тзв. ендогене контроле. Ендогена контрола је обично „housekeeping“ ген чија је експресија стабилна у свим узорцима, односно чија се експресија не мења приликом експерименталних третмана.

У случају релативне квантификације, квантификација експресије циљног гена може се вршити применом методе релативне стандардне криве или компаративном ddCt методом, која је коришћена у овом раду.

3.5.1. Одређивање степена експресије eNOS гена применом qRT-PCR методе

Експресија гена eNOS је праћена qRT-PCR методом на Mastercycler EP RealPlex PCR апарату (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), употребом SYBR Green технике. Као ендогена контрола је коришћен β -актин ген. Називи и секвенце прајмера наведени су у Табели 6.

Реакциона смеша финалног волумена 20 μ l је садржала следеће компоненте:

- 500 ng cDNK
- 1 x SYBR Green qPCR Master Mix (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*)
- 0.3 μ M „forward“ прајмера
- 0.3 μ M „reverse“ прајмера

- UDG

Температурни профил реакције:

- 2 мин/50°C
- 10 мин/95°C
- 40 циклуса: -15сек/95°C
-30сек/60°C
-30сек/72°C

Обрада резултата је извршена коришћењем програма REST (engl. *Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl и сар., 2002).

Табела 6. Прајмери коришћени у qRT-PCR експериментима током испитивања нивоа експресије eNOS гена

Назив прајмера	Секвенца прајмера
eNOSFor	5'-CGG CAT CAC CAG GAA GAA GA-3'
eNOSRev	5'-GCC ATC ACC GTG CCC AT-3'
AktFor	5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'
AktRev	5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'

3.5.2. Одређивање степена експресије HIF-1 α и VEGF гена применом qRT-PCR методе

Експресија HIF-1 α и VEGF је одређивана применом qRT-PCR методе на 480 Light Cycler PCR апарату (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA USA*), употребом TaqMan технике. Као ендогена контрола је коришћен β -актин ген. Називи и секвенце прајмера наведени су у Табели 7.

Температурни профил реакције:

- 2 мин/50°C
- 4 мин/95°C
- 40 циклуса: -15 сек/95°C
-1 мин/60°C

Обрада резултата је извршена применом компаративног ddCt метода.

Табела 7. Прајмери коришћени у qRT-PCR експериментима током испитивања нивоа експресије HIF-1 α и VEGF гена

Назив прајмера	Секвенца прајмера
HIF-1 α For	5'-GGC AGG AAG ATT GTC ATG GAC-3'
HIF-1 α Rev	5'-TCT GTC TGT CAC ATG GGT GAT GAA-3'
VEGFFor	5'-TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT-3'
VEGFRev	5'-CAC TTC GTG ATG ATT CTG CCC-3'

3.6 Анализа експресије протеина

3.6.1. Western blot анализа експресије протеина

Изолација протеина. Укупни ћелијски протеини из гранулоцита, HEL ћелија и макрофага, изоловани су применом хладног RIPA пуфера за лизирање ћелија који се састојао од: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 1% натријум деоксихолат, 0,1% SDS, 2 mM EDTA и 50 mM NaF. Непосредно пре почетка лизирања ћелија, пуферу за лизирање додавани су инхибитори протеаза: 1 mM Na-ортованадат и 10 μ l коктела инхибитора (*Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) по ml пуфера. Ћелије су лизирани са 1 ml пуфера на 1×10^8 ћелија. Лизати су инкубирани 25 минута на 4°C а затим центрифугирани 15 минута на 10000 g. Лизати су чувани на -80°C до употребе. Концентрација протеина у сваком узорку одређивана је употребом комерцијалног BCA теста (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*).

У циљу испитивања активираниог HIF-1 α протеина, вршена је сепарација цитоплазматске и нуклеусне фракције гранулоцита, коришћењем комерцијалног NE-PER кита (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*) према упутству произвођача.

Електрофореза и електротрансфер. Узорцима протеина из ћелијског лизата додаван је редукциони пуфер за узорке следећег састава: 250 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% SDS, 30% глицерол, 5% β -меркаптоетанол и 0,02% бромфенол плаво са којим су узорци кувани у кључалој води пет минута. Овако припремљени узорци протеина наношени су на 10% акриламидни гел дебљине 1 mm и раздвајани SDS-PAGE електрофорезом, при константној струји од 150 mA током два сата. Након тога, раздвојени протеини су електротрансфером на 110 mA током 90 минута преношени на поливинил дифлорид мембрану (*Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany*).

Узорци нуклеусних протеина рађени су по истом принципу, осим што је коришћен 12% акриламидни гел дебљине 1,5 mm.

Имуноблот. Неспецифично везивање протеина за мембрану блокирано је инкубацијом са 3% млеком у TBS током једног сата. Затим је мембрана инкубирана са примарним антителом у 1% млеку у 0,5% Tween 20 у TBS (TTBS) преко ноћи на 4°C, на ротационом шејкеру. Мембране су потом испиране у TTBS, а затим инкубиране са секундарним антителом коњугованим са HRP два сата на собној температури. Мембране су поново испиране у TTBS три пута по десет минута.

Детекција протеина. Протеини обележени антителима визуелизовани су на ауторадиографском филму (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) након инкубације мембране са системом реагенса за појачану хемилуминисценцију (ECL, *Enhanced chemiluminescence reagent system, GE Healthcare, Amersham, UK*). Интензитет протеинских трака је квантификован дензитометријски, применом Image Master Total Lab софтвера (*GE Healthcare*).

3.6.2. Имуноцитохемијска анализа степена експресије протеина

За детекцију протеина у гранулоцитима, CD34⁺ и HEL ћелијама, вршено је њихово обележавање на цитоспин препаратима ових ћелија. У ту сврху, 2,4x10⁶ гранулоцита, CD34⁺ или HEL ћелија је растварано у 6 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biowest, Nuaille, France*). Обележене плочице су затим стављане испод блока са по два цилиндрична отвора и у сваки је сипано 0,5 ml суспензије ћелија. Блокови су потом центрифугирани на 200 x g, пет минута. Плочице са залепљеним ћелијама су сушене 20 минута на собној температури а потом су фиксиране ацетоном.

Примењена је индиректна тростепена стрептавидин-биотин метода детекције (LSAB⁺/HRP кит, DAKO, Denmark) у којој је стрептавидин обележен пероксидазом рена. Прво је извршено блокирање ендогене пероксидазе 3% воденим раствором H₂O₂, десет минута на собној температури. Затим су узорци инкубирани са примарним антителом током ноћи у влажној комори, на собној температури. Након тога вршена је инкубација са биотинизираним антимишјим и антизечјим имуноглобулинима 30 минута на собној температури. У следећој етапи узорци су третираны стрептавидинским коњугатом на пероксидазу рена, 30 минута на собној температури. На крају узорци су инкубирани у раствору супстрат-хромогена (3,3'-диамино-бензидин тетрахидрохлорид и H₂O₂), употребом DAB⁺/кита (*Code No. K3468, DAKO*) у трајању

од десет минута на собној температури. За растварање примарних антисерума коришћен је комерцијални растварач (*Cat. No. SO809, DAKO*), а за испирање у току имуноцитохемијског бојења, 0,01 М фосфатни пуфер рН 7,4. Препарати су контрастирани Мауер-овим хематоксилином и монтирани у водени медијум (*Aquatex-OC 261903, Merck, Germany*).

Као негативна контрола у току имуноцитохемијског бојења служили су узорци испитиваних ћелија који су бојени паралелно са узорцима на којима се доказује експресија биолошких маркера, али су у току процедуре бојења третирани неимуним серумом уместо примарног антитета.

3.7 Имунохистохемијска анализа

На ткивним узорцима костне сржи испитиваних мијелопролиферативних неоплазми, извршена су имунохистохемијска бојења у циљу доказивања експресије протеина HIF-1 α , VEGF и eNOS. Примењена је индиректна тростепена стрептавидин–биотин метода детекције (LSAB⁺/HRP кит, DAKO) у којој је стрептавидин обележен пероксидазом рена.

Бојење је вршено на ткивним пресецима дебљине 5 μ m, који су сушени 60 минута на температури од 56°C. Пресеци су депарафинисани у ксилолу и рехидратисани кроз серију алкохола опадајуће концентрације (100%, 96%, 70%).

Демаскирање антигена. Формалдехид у току фиксације, као и парафин у току калупљења, изазивају стеричне промене протеина у ткиву формирањем интермолекуларних веза. Дуготрајна формалинска фиксација може да маскира антигене и умањи ефекат специфичног имунохистохемијског бојења. Због тога се поступком демаскирања антигена постиже обнављање примарне стеричне конфигурације антигена уклањањем нежељених интермолекуларних веза, путем њиховог кидања и уклањањем Ca²⁺ уз помоћ цитрата.

Демаскирање антигена у овој студији спроведено је након депарафинизације препарата. Ткивни пресеци су потопљени у комерцијални цитратни пуфер рН 6 (*Target Retrieval Solution, Code No. S 1700, DAKO*) и излагани су микроталасним зрацима (при јачини од 560 W) у току 21 минута.

Поступак бојења. Након извршене депарафинизације и поступка демаскирања антигена, блокирана је ендогена пероксидаза 3% воденим раствором H₂O₂, десет

минута на собној температури. Затим су узорци инкубирани са одговарајућим примарним антителима преко ноћи у влажној комори, на собној температури. Након тога вршена је инкубација са биотинизираним антимишјим и антизечјим имуноглобулинима 30 минута на собној температури. У следећој етапи пресеци су третирани стрептавидином коњугованим са пероксидазом рена, 30 минута на собној температури. На крају пресеци су инкубирани у раствору супстрат-хромогена (3,3'-диамино-бензидин тетраhydroхлорид и H₂O₂), употребом DAB⁺/кита (*Code No. K3468, DAKO*) у трајању од десет минута на собној температури. За растварање примарних антисерума коришћен је комерцијални растварач (*Cat. No. SO809, DAKO*), а за испирање у току имунохистохемијског бојења, 0,01 М фосфатни пуфер рН 7,4. Препарати су контрастирани Мауер-овим хематоксилином и монтирани у водени медијум (*Aquatex- OC 261903, Merck, Germany*).

Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења. Као позитивни контролни узорци коришћени су познати узорци мијелопролиферативних неоплазми код којих је експресија биолошких маркера већ раније доказана. Наиме, сви позитивни контролни узорци раније су вишеструко тестирани и доказано садрже испитиване антигене, а примењени су на исти начин као и испитивани узорци у овим истраживањима.

Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења служили су ткивни узорци испитиваних неоплазми који су бојени паралелно са узорцима на којима се доказује експресија биолошких маркера, али су у току процедуре бојења третирани неимуним серумом уместо примарног антитела.

3.8 Ултраструктурна анализа узорака костне сржи пацијената са МПН

За ултраструктурна испитивања, узорци костне сржи су декалцификовани у 10% EDTA пуферу током три сата а затим фиксирани у 4% глутаралдехиду у 0,1 % натријум какодилатном пуферу (рН 7,4), такође три сата. Постфиксација је вршена у осмијум тетроксиду у истом пуферу. Након спровођења кроз серију алкохола узлазне концентрације, ткиво је укалупљено у аралдит смолу (*Fluka, Seelze, Germany*). Пресеци од 1 µm су сечени на ултрамикротому (*LKB, Sweden*) и бојени толуидин плавим за посматрање под светлосним микроскопом (*Olympus AX70, Tokyo, Japan*). За

ультраструктурна испитивања пресеци су бојени уранил-ацетатом и олово-цитратом и посматрани под Morgagni 268(D) електронским микроскопом (*FEI, Hillsboro, OR*).

3.9 Анализа хелијског циклуса у гранулоцитима и HEL ћелијама *in vitro* применом проточне цитометрије

За одређивање присуства и степена пролиферације и апоптозе у гранулоцитима и HEL ћелијама *in vitro*, након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима, ћелије су након обележавања пропидијум-јодидом (PI) (*Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland*) анализирани помоћу проточне цитометрије. За ову анализу, 2×10^6 гранулоцита или HEL ћелија је засејавано по бунарчићу и инкубирано са IL-6 и JAK инхибиторима у трајању од 16 сати. Након инкубације, ћелије су обележаване PI-ом према препоруци произвођача. Анализа је вршена на проточном цитометру CyFlow CL (*Partec, Münster, Germany*).

3.10 Статистичка обрада резултата

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. У статистичкој анализи података коришћен је програм Prism 4 software (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA*). Статистичка анализа урађена је применом једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) а у случају статистичке значајности, за процену значајности међугрупних разлика, употребљен је одговарајући *post hoc* тест (Dunnett's posttest). Статистичка обрада података, добијених qRT-PCR методом за eNOS, изведена је коришћењем програма REST (енг. *Relative Expression Software Tool*) (*Pfaffl и сар., 2002*). Утврђени су следећи нивои статистичке значајности: $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Резултати клиничких испитивања

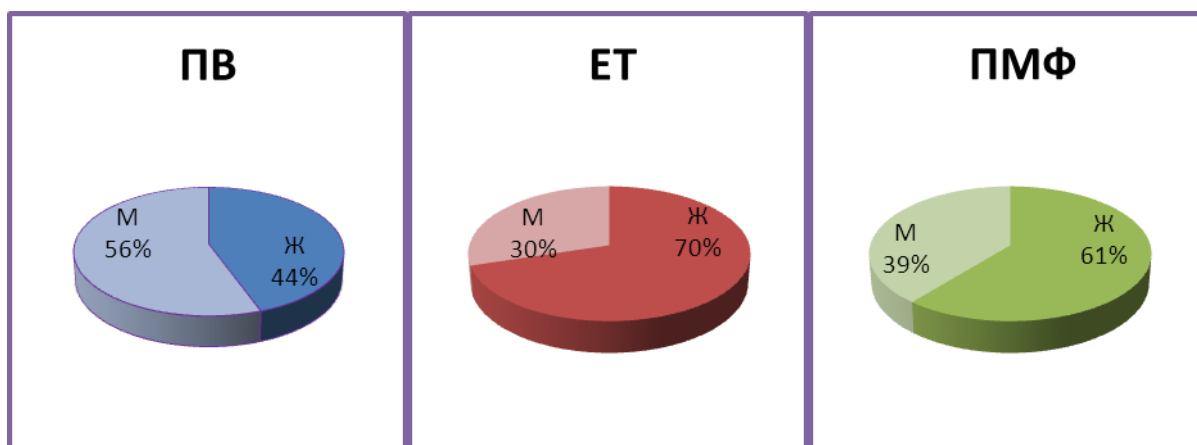
4.1.1. Основна обележја испитаника са МПН

Студија је обухватила укупно 160 испитаника, од чега је било 72 испитаника са ПВ, 47 испитаника са ЕТ и 41 испитаник са ПМФ дијагнозом (Графикон 1). Просечна старост испитаника је износила $63,24 \pm 13,41$ година. Најмлађи испитаник је био стар 27 година, а најстарији 90 година. Осим њих, студија је обухватила и 15 здравих индивидуа, чија је просечна старост износила $53 \pm 11,9$ година (опсег 30-70 година).



Графикон 1. Процентуална заступљеност пацијената по дијагнозама

Када се посматра полна структура испитаника може се приметити да је у ПВ групи болест заступљенија код мушкараца, док је у ЕТ и ПМФ групи болест чешће присутна код жена (Графикон 2).



Графикон 2. Процентуална заступљеност пацијената према полу

4.1.2. JAK2 и CALR мутациони статус испитаника са МПН

За испитивање заступљености JAK2V617F мутације на егзону 14, као и делеције на егзону 12 JAK2 гена, коришћена је квантитативна, у стварном времену извођена, реакција ланчаног умножавања заснована на алелном дискриминационом есеју (AS-qPCRs).

Од укупно 160 испитаника са МПН, JAK2V617F мутација је била заступљена код свих ПВ испитаника, као и код 53% ЕТ и 61% ПМФ испитаника (Табела 8).

Табела 8. Процентуална заступљеност мутације у JAK2 гену код испитаника са МПН

Дијагноза	JAK2-V617F+	JAK2-V617F-	Укупан број испитаника
Полицитемија вера	72(100%)		72
Есенцијална тромбоцитемија	25 (53%)	22 (47%)	47
Примарна мијелофиброза	25 (61%)	16 (39%)	41

Од укупног броја од 72 анализирана пацијента са ПВ дијагнозом, њих 28 (39%) је имало више од 50% мутираног алела (Графикон 3).



Графикон 3. Процентуална заступљеност мутираног алела у оквиру појединачних МПН

Код пацијената са ЕТ дијагнозом проценат мутираног алела ретко прелази 50%, што је био случај и код наше групе (Графикон 3).

Код ПМФ пацијената, ЈАК2V617F мутација је присутна у високом проценту (61%). Међутим, проценат гранулоцита у којима је мутација присутна у хомозиготном стању је дупло мањи (17%) у односу на проценат гранулоцита у којима је мутација присутна у хетерозиготном стању (34%) (Графикон 3).

За испитивање заступљености мутације у гену за калретикулин коришћен је алел-специфични PCR. Од укупно 22 пацијента са ЕТ, код којих није утврђена ЈАК2V617F мутација, 31,9% пацијената је имало мутацију у гену за CALR. Код ПМФ пацијената ова мутација била је заступљена са 31,7%, код пацијената који су били без ЈАК2V617F мутације (Табела 9).

Табела 9. Процентуална заступљеност мутације у гену за калретикулин код испитаника са МПН

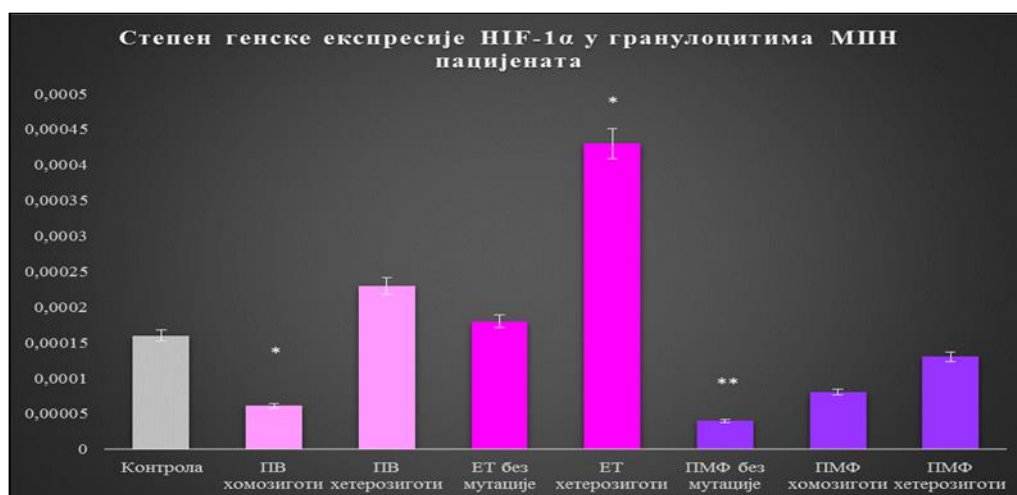
Дијагноза	CALR	Укупан број испитаника
Есенцијална тромбоцитемија (ЈАК2-)	15 (31,9%)	22
Примарна мијелофиброза (ЈАК2-)	13 (31,7%)	16

4.2 Ниво генске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената

Испитивање генске експресије ангиогених фактора HIF-1 α , VEGF и eNOS, вршено је у гранулоцитима и хематопоетским CD34⁺ прогениторима МПН пацијената као и код здравих контрола. Испитивање степена експресије вршено је у односу на присуство мутација у генима за JAK2 и CALR.

4.2.1. Степен генске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

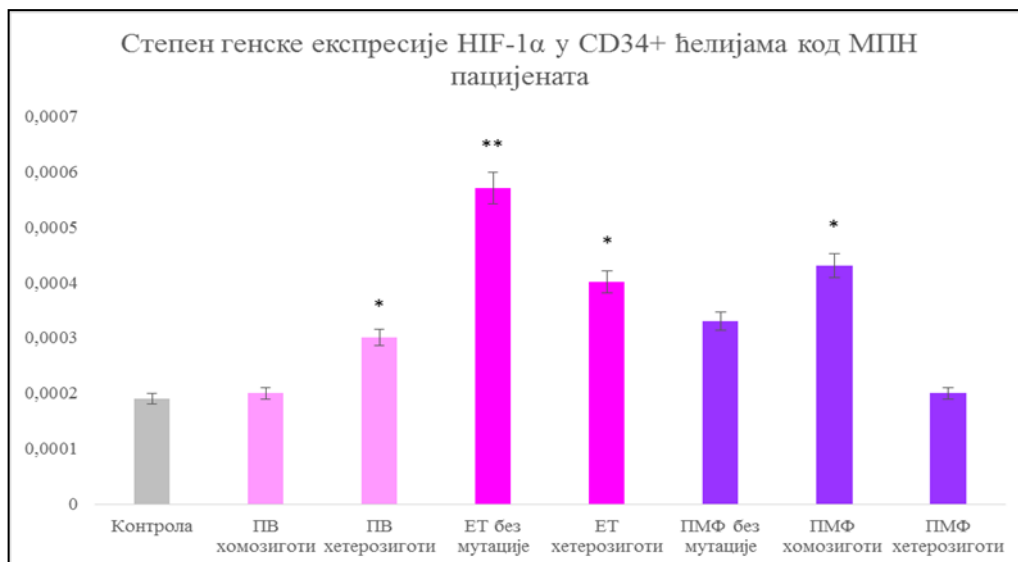
У гранулоцитима код пацијената са ПВ дијагнозом који су хомозиготни, присутна је значајно смањена експресија HIF-1 α ангиогеног фактора у односу на здраве контроле (* $p < 0,05$). Код хетерозиготних пацијената, степен експресије је већи у односу на здраве контроле, али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика. Код пацијената са ЕТ дијагнозом, статистички значајно повећање степена експресије HIF-1 α у односу на здраве контроле, присутно је код хетерозиготних пацијената (* $p < 0,05$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом, степен експресије HIF-1 α је смањен у односу на здраве контроле, али је само код пацијената без JAK2V617F мутације статистички значајно (** $p < 0,01$) (Графикон 4).



Графикон 4. Степен генске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.2.2. Степен генске експресије HIF-1 α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

У CD34⁺ ћелијама код свих МПН пацијената, присутна је повећана експресија HIF-1 α ангиогеног фактора у односу на здраве контроле, која је статистички значајна код пацијената са ЕТ који немају JAK2V617F мутацију (**p<0,01), код хетерозиготних пацијената са ПВ (*p<0,05), и са ЕТ (*p<0,05), као и код хомозиготних пацијената са ПМФ дијагнозом (*p<0,05). Код осталих пацијената, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на здраве контроле у погледу експресије HIF-1 α (Графикон 5).



Графикон 5. Степен генске експресије HIF-1 α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (*p<0,05; ** p<0,01)

4.2.3. Степен генске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

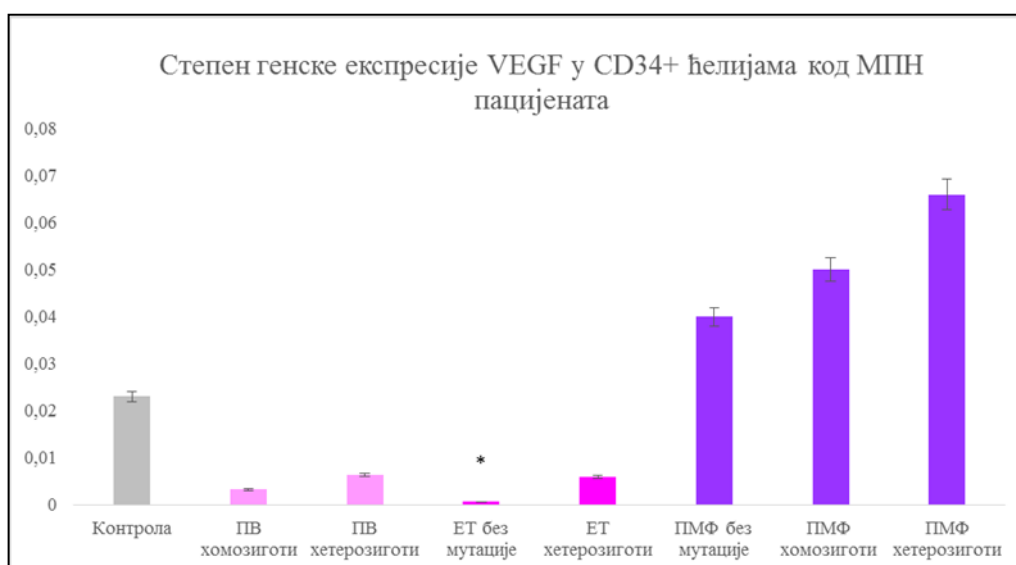
У гранулоцитима свих МПН пацијената присутна је смањена експресија VEGF ангиогеног фактора у односу на здраве контроле, која је статистички значајна код хомозиготних пацијената са ПВ дијагнозом (*p<0,05) као и код пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом без JAK2V617F мутације (*p<0,05) (Графикон 6).



Графикон 6. Степен генске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$)

4.2.4. Степен генске експресије VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

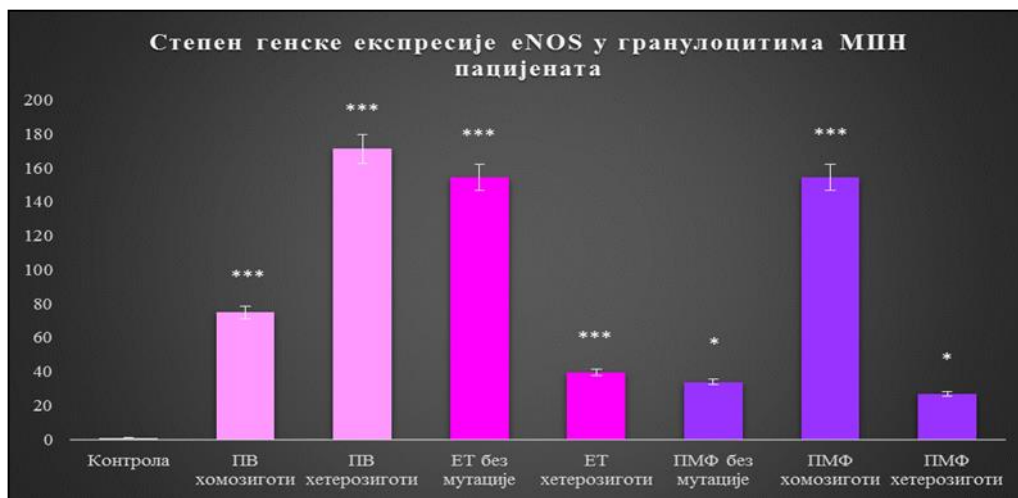
У CD34⁺ ћелијама код пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом присутна је смањена експресија VEGF ангиогеног фактора у односу на здраве контроле, која је статистички значајна само код ЕТ пацијената без JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$). Пацијенти са ПМФ дијагнозом имају повећану експресију VEGF у односу на здраве контроле, мада статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у експресији VEGF ниједне групе ПМФ пацијената у односу на здраве контроле (Графикон 7).



Графикон 7. Степен генске експресије VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$)

4.2.5. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

У гранулоцитима свих пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом, присутна је значајно повећана експресија eNOS фактора у односу на здраве контроле (**p<0,001). Код пацијената са ПМФ дијагнозом, значајно повећана експресија eNOS фактора карактерише хомозиготне пацијенте (**p<0,001) као и пацијенте без JAK2V617F мутације и хетерозиготне пацијенте (*p<0,05) (Графикон 8).

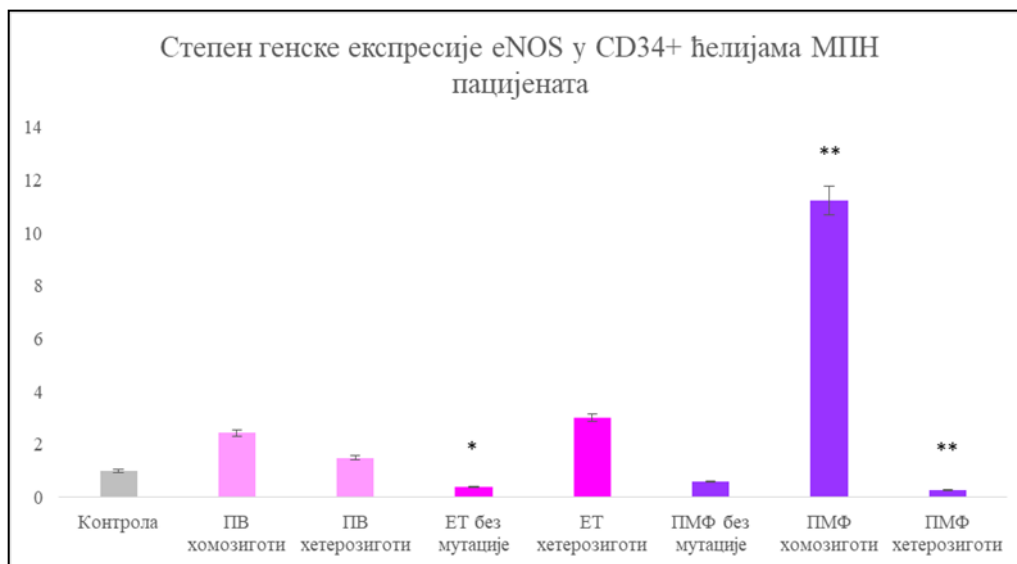


Графикон 8. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (*p<0,05; *** p<0,001)

4.2.6. Степен генске експресије eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације

У CD34⁺ ћелијама пацијената са ПВ дијагнозом присутна је повећана експресија eNOS фактора у односу на здраве контроле мада статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика. Код пацијената са ЕТ дијагнозом који немају JAK2V617F мутацију, присутно је значајно смањење експресије eNOS у односу на здраве контроле (**p<0,01), док је код хетерозиготних пацијената експресија eNOS повећана али без статистичке значајности. Код пацијената са ПМФ дијагнозом који су хомозиготни присутна је значајно повећана експресија eNOS (**p<0,001), док пацијенти који су хетерозиготни имају значајно смањену експресију eNOS фактора (**p<0,01) у односу

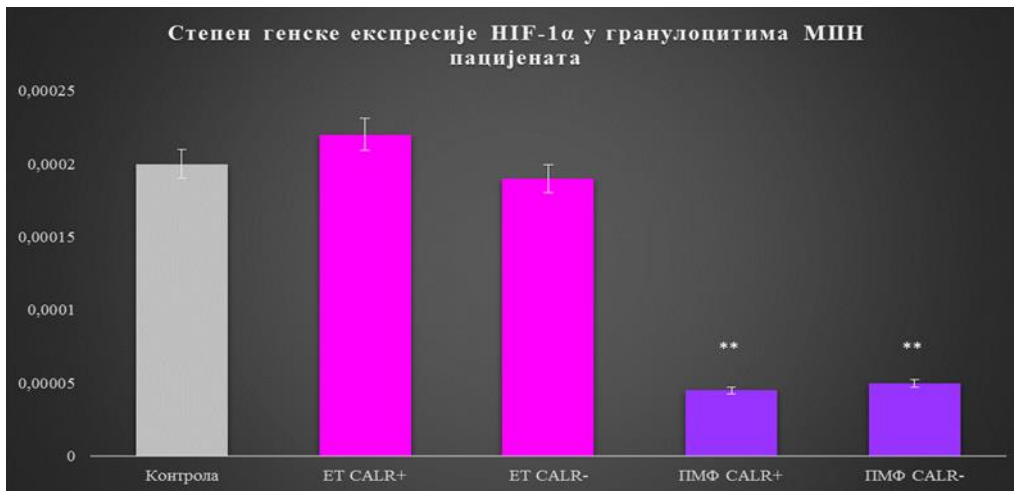
на здраве контролне узорке. Код ПМФ пацијената без JAK2V617F мутације статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у експресији eNOS у односу на здраве контроле (Графикон 9).



Графикон 9. Степен генске експресије eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (**p<0,01; ***p<0,001)

4.2.7. Степен генске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

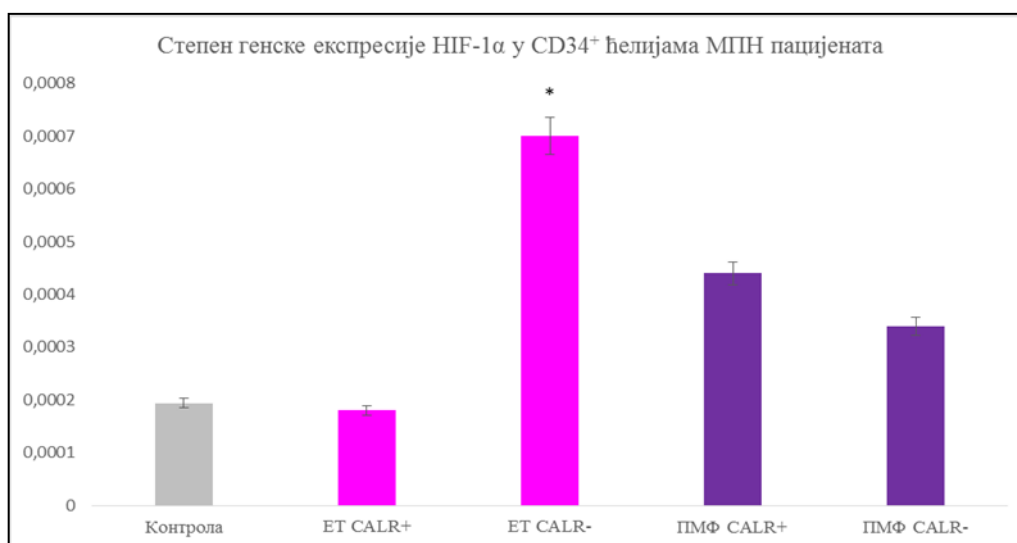
У гранулоцитима пацијената са ЕТ дијагнозом статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у погледу експресије HIF-1 α , без обзира на присуство мутације у гену за CALR. Код свих пацијената са ПМФ дијагнозом, експресија HIF-1 α значајно је смањена независно од присуства мутације у гену за CALR (**p<0,01) (Графикон 10).



Графикон 10. Степен генске експресије HIF-1α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (** p<0,01)

4.2.8. Степен генске експресије HIF-1α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

У CD34⁺ ћелијама пацијената са ЕТ који немају мутацију у гену за CALR, експресија HIF-1α фактора је значајно повећана у односу на здраве контроле (*p<0,05). Код пацијената са ЕТ код којих није присутна мутација у гену за CALR, експресија HIF-1α је смањена али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика. Код пацијената са ПМФ дијагнозом експресија HIF-1α је повећана код свих пацијената независно од мутације у гену за CALR али није статистички значајна (Графикон 11).



Графикон 11. Степен генске експресије HIF-1α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR

4.2.9. Степен генске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

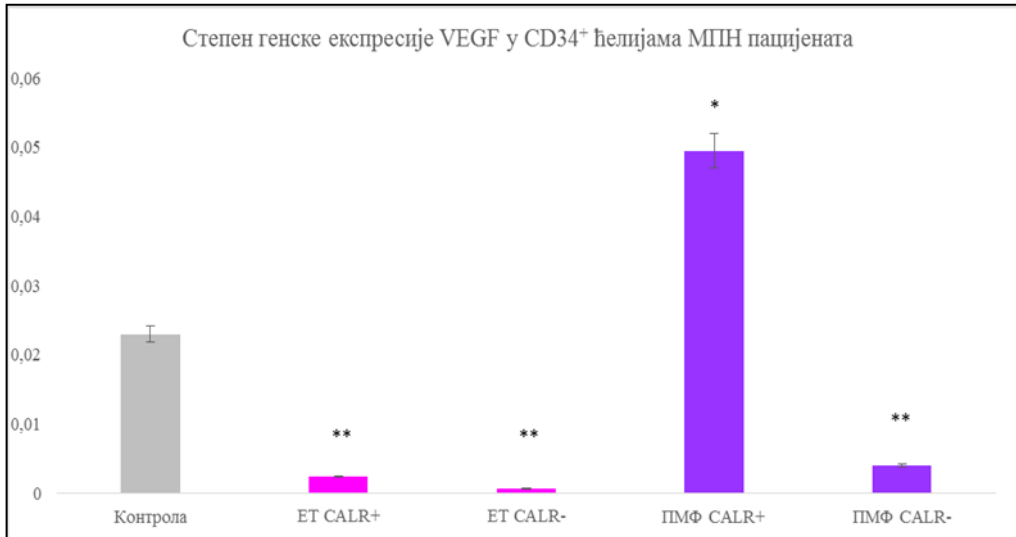
У гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозама присутно је значајно смањење експресије VEGF ангиогеног фактора, без обзира на присуство мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$) (Графикон 12).



Графикон 12. Степен генске експресије VEGF ангиогеног фактора у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$)

4.2.10. Степен генске експресије VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

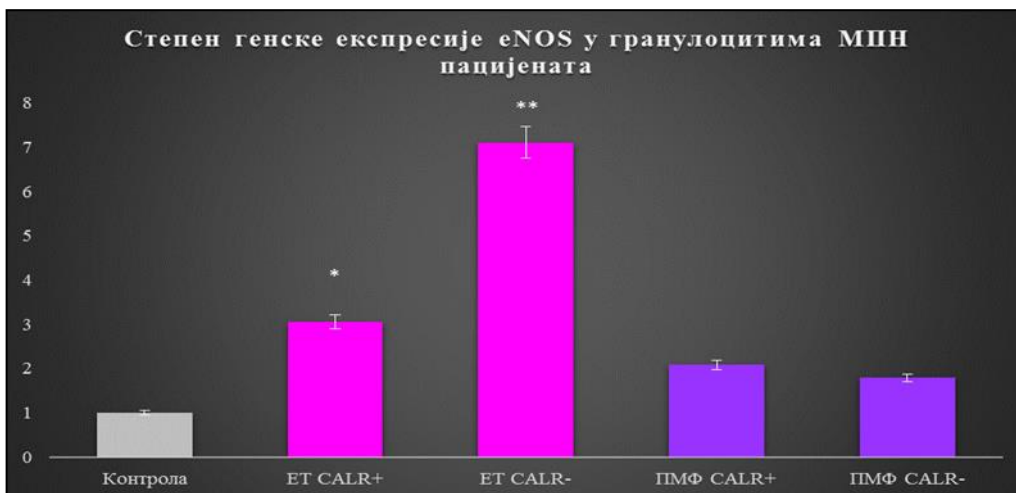
У CD34⁺ ћелијама пацијената са ЕТ дијагнозом присутно је значајно смањење експресије VEGF ангиогеног фактора, независно од присуства мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$). У CD34⁺ ћелијама пацијената са ПМФ дијагнозом код којих је присутна мутација у гену за CALR, експресија VEGF је значајно повећана (* $p < 0,05$). Насупрот томе код пацијената са ПМФ дијагнозом који немају мутацију у гену за CALR, експресија VEGF ангиогеног фактора је значајно смањена (** $p < 0,01$) (Графикон 13).



Графикон 13. Степен генске експресије VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.2.11. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

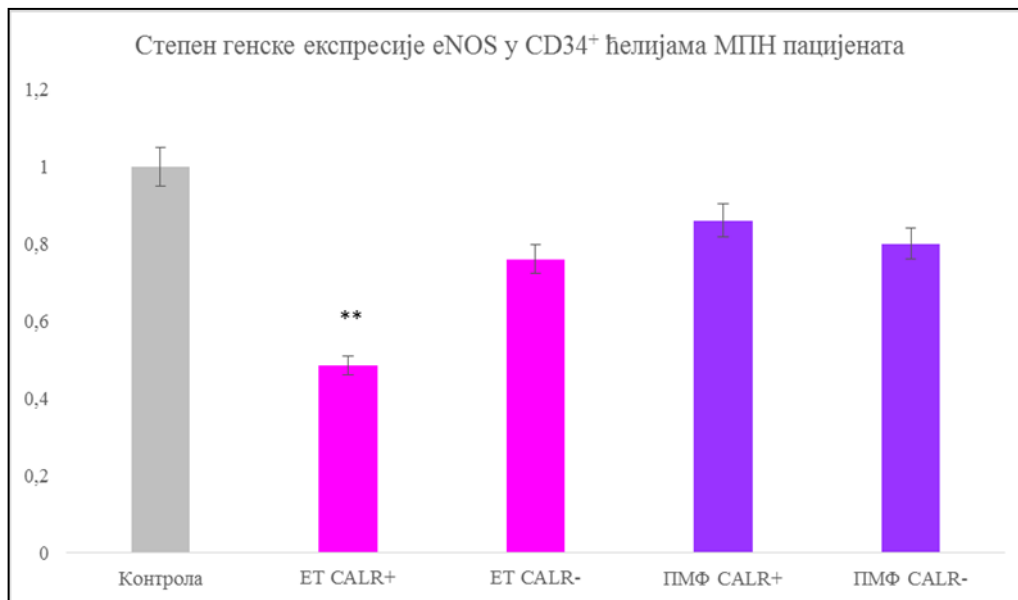
У гранулоцитима пацијената са ЕТ дијагнозом присутна је повећана експресија eNOS у односу на здраве контроле и код пацијената код којих је присутна мутација у гену за CALR (* $p < 0,05$), као и код пацијената који немају мутацију у гену за CALR (** $p < 0,01$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом експресија eNOS је такође повећана, без обзира на присуство мутације у гену за CALR али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на здраве контроле (Графикон 14).



Графикон 14. Степен генске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.2.12. Степен генске експресије eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

У CD34⁺ ћелијама пацијената са ЕТ дијагнозом присутна је смањена експресија eNOS фактора у односу на здраве контроле, која је статистички значајна код пацијената који имају мутацију у гену за CALR (** $p < 0,01$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом, без обзира на присуство мутације у гену за CALR, експресија eNOS је смањена у односу на здраве контроле али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика (Графикон 15).



Графикон 15. Степен генске експресије eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$)

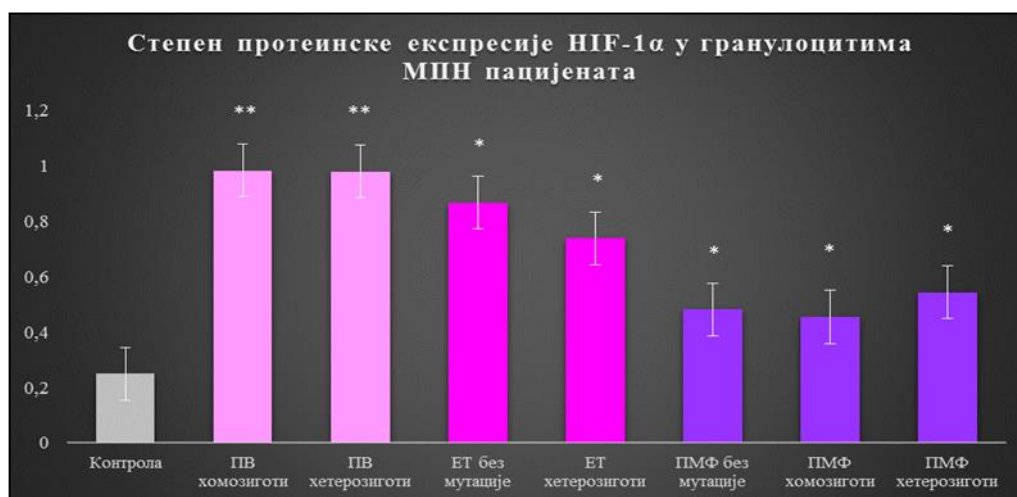
4.3 Степен протеинске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената добијен применом Western blot методе

Анализа протеинске експресије ангиогених фактора HIF-1 α , VEGF и eNOS Western blot методом вршена је у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације и мутације у гену за CALR.

4.3.1. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

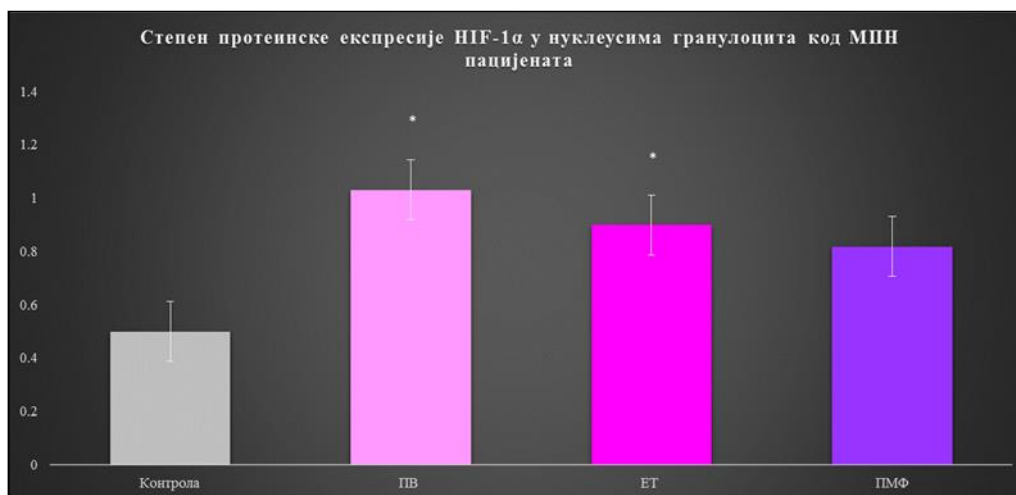
Анализа експресије укупног HIF-1 α протеина *Western blot* методом у гранулоцитима МПН пацијената урађена је на 12 узорака ПВ (по 6 хетерозигота и хомозигота), 13 узорака ЕТ (7 без JAK2V617F мутације и 6 хетерозигота), 17 узорака ПМФ пацијената (7 без JAK2V617F мутације, 6 хетерозигота и 4 хомозигота) и 4 здраве контроле.

Ниво HIF-1 α протеина повећан је код свих МПН пацијената у односу на здраве контроле. Значајно повећан ниво HIF-1 α протеина присутан је код пацијената са ПВ дијагнозом (** $p < 0,01$), као и код свих пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, независно од присуства JAK2V617F мутације ($p < 0,05$) (Графикон 16).



Графикон 16. Протеинска експресија укупног HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

У циљу испитивања експресије активiranог HIF-1 α протеина, вршено је раздвајање нуклеусне и цитоплазматске фракције гранулоцита МПН пацијената и здравих контрола. Анализа степена експресије активiranог HIF-1 α протеина у нуклеусним фракцијама гранулоцита показује повећање експресије код свих МПН пацијената, које је статистички значајно код пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом ($p < 0,05$) (Графикон 17).

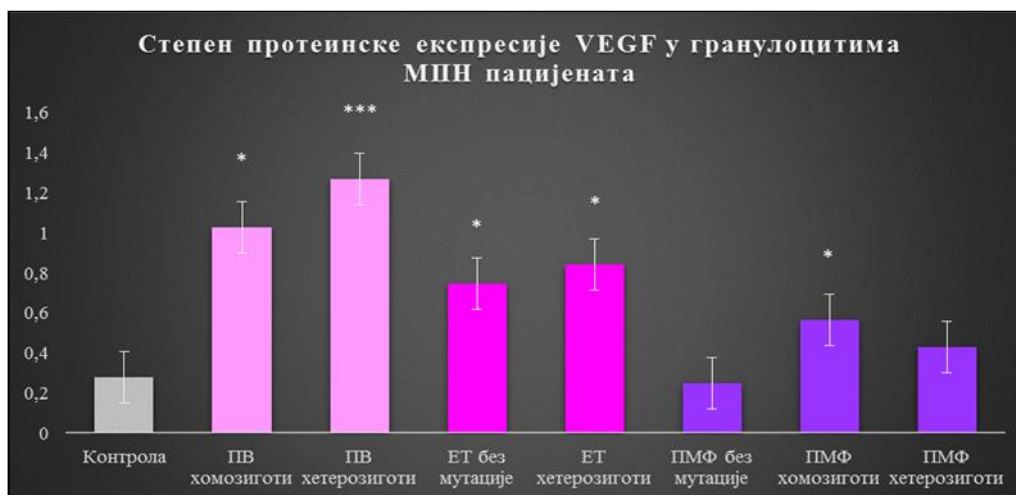


Графикон 17. Протеинска експресија активираниог HIF-1 α у нуклеусима гранулоцита МПН пацијената и здравих контрола (*p<0,05). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

4.3.2. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Western blot анализа експресије VEGF протеина урађена је на 17 узорака ПВ (10 хетерозигота и 7 хомозигота), 17 узорака ЕТ (8 без JAK2V617F мутације и 9 хетерозигота), 15 ПМФ узорака пацијената (6 без JAK2V617F мутације, 5 хетерозигота и 4 хомозигота) и 4 здраве контроле.

Ова анализа је показала да је ниво VEGF протеина значајно повећан код свих пацијената са ПВ дијагнозом - хетерозиготних (**p<0,001) и хомозиготних (*p<0,05). Значајно повећање експресије VEGF протеина присутно је такође и код свих пацијената са ЕТ дијагнозом, независно од присуства JAK2V617F мутације (*p<0,05). Код пацијената са ПМФ дијагнозом значајно повећање VEGF је присутно само код хомозиготних пацијената (*p<0,05), док је једино код ПМФ пацијената без JAK2V617F мутације уочена смањена експресија VEGF протеина, али она није статистички значајна (Графикон 18).



Графикон 18. Протеинска експресија VEGF у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Поред тога, тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна негативна корелација између протеинске експресије VEGF и HIF-1 α код ПВ хомозиготних пацијената ($r = -0,969$, $p < 0,01$, Табела 10).

Табела 10. Корелација између HIF-1 α , VEGF и eNOS протеинске експресије у гранулоцитима МПН пацијената

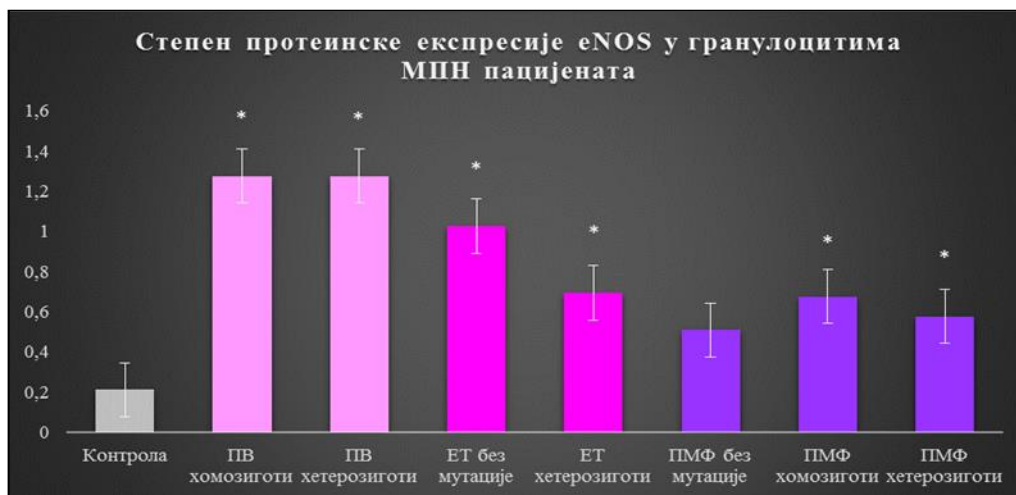
Дијагноза	Western blot	
	VEGF/HIF-1	eNOS/HIF1 α
ПВ хетерозиготи	-0,714	0,300
ПВ хомозиготи	-0,969**	0,029
ЕТ без мутације	-0,143	-0,939**
ЕТ хетерозиготи	-0,600	0,500
ПМФ без мутације	0,600	-0,486
ПМФ хетерозиготи	0,000	-0,314
ПМФ хомозиготи	0,800	0,800

** $p < 0,01$

4.3.3. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Анализа експресије eNOS протеина у гранулоцитима урађена је на 11 узорака ПВ (5 хетерозигота и 6 хомозигота), 12 узорака ЕТ (7 без JAK2V617F мутације и 5 хетерозигота), 17 узорака ПМФ пацијената (6 без JAK2V617F мутације, 7 хетерозигота и 4 хомозигота) и 4 здраве контроле.

Ниво eNOS протеина повећан је код свих МПН пацијената у односу на здраве контроле. Значајно повећан ниво eNOS протеина присутан је код свих ПВ пацијената (* $p < 0,05$), ЕТ пацијената (* $p < 0,05$), као и код ПМФ пацијената са JAK2V617F мутацијом (* $p < 0,05$). Једино код пацијената са ПМФ дијагнозом код којих није присутна JAK2V617F мутација, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у нивоу експресије eNOS у односу на здраве контроле (Графикон 19).



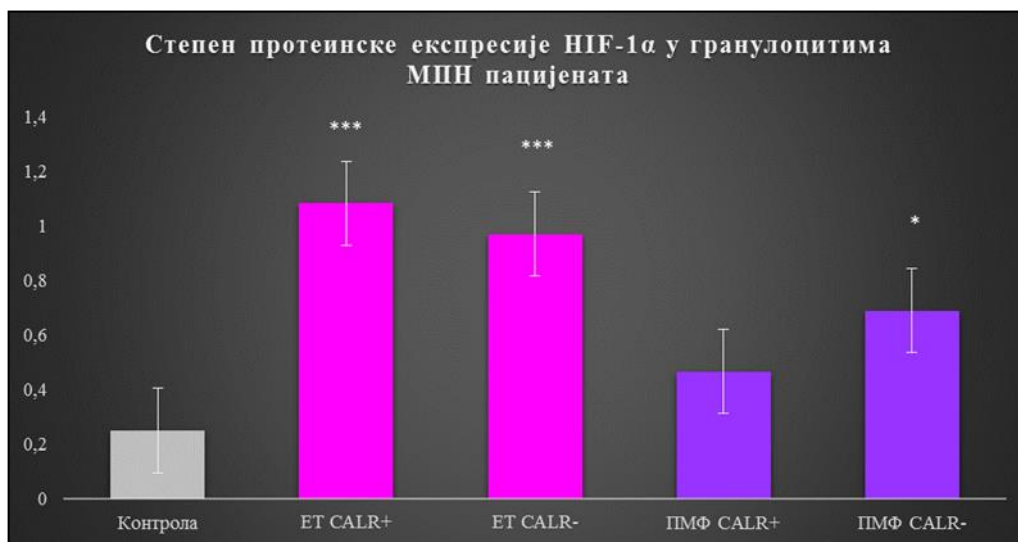
Графикон 19. Протеинска експресија eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Поред тога, тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна негативна корелација између протеинске експресије eNOS и HIF-1 α код ЕТ пацијената без JAK2V617F мутације ($r = -0,939$, $p < 0,05$; Табела 10).

4.3.4. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

Анализа експресије укупног HIF-1 α протеина *Western blot* методом у гранулоцитима МПН пацијената урађена је на по 7 узорака ЕТ и ПМФ пацијената без JAK2V617F мутације и 4 здраве контроле

Ниво HIF-1 α протеина значајно је повећан код свих пацијената са ЕТ дијагнозом независно од присуства мутације у гену за CALR (*** $p < 0,001$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом, ниво HIF-1 α протеина значајно је повећан код пацијената код којих није присутна мутација у гену за CALR (* $p < 0,05$), док код пацијената код којих је мутација присутна, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на здраве контроле (Графикон 20).

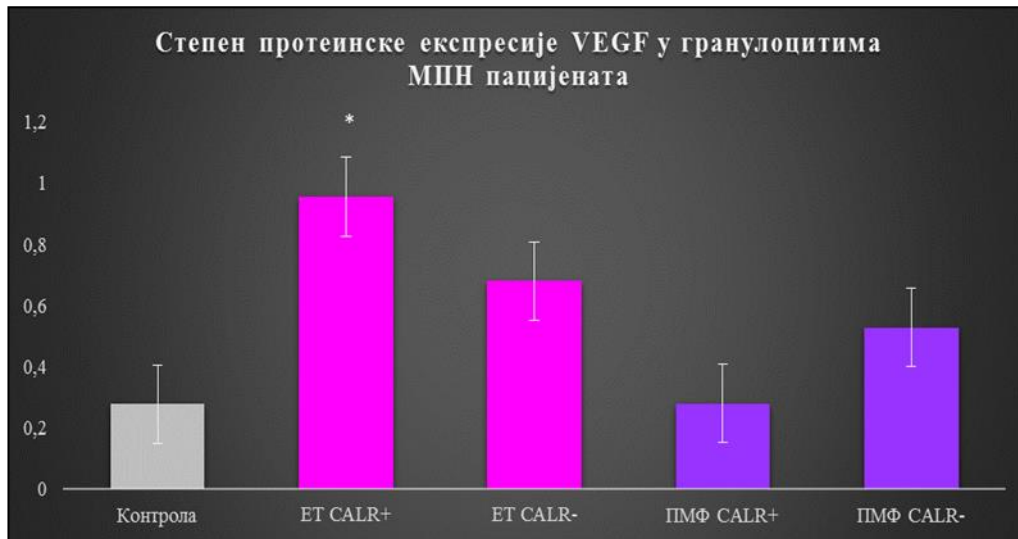


Графикон 20. Протеинска експресија HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

4.3.5. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

Анализа експресије VEGF протеина у гранулоцитима МПН пацијената урађена је на 8 узорака ЕТ и 6 узорака ПМФ пацијената без JAK2V617F мутације и 4 здраве контроле.

Western blot анализа протеинске експресије VEGF је показала да је ниво овог протеина значајно повећан само код пацијената са ЕТ дијагнозом, код којих је присутна мутација у гену за CALR (* $p < 0,05$). Код осталих група пацијената статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на здраве контроле (Графикон 21).

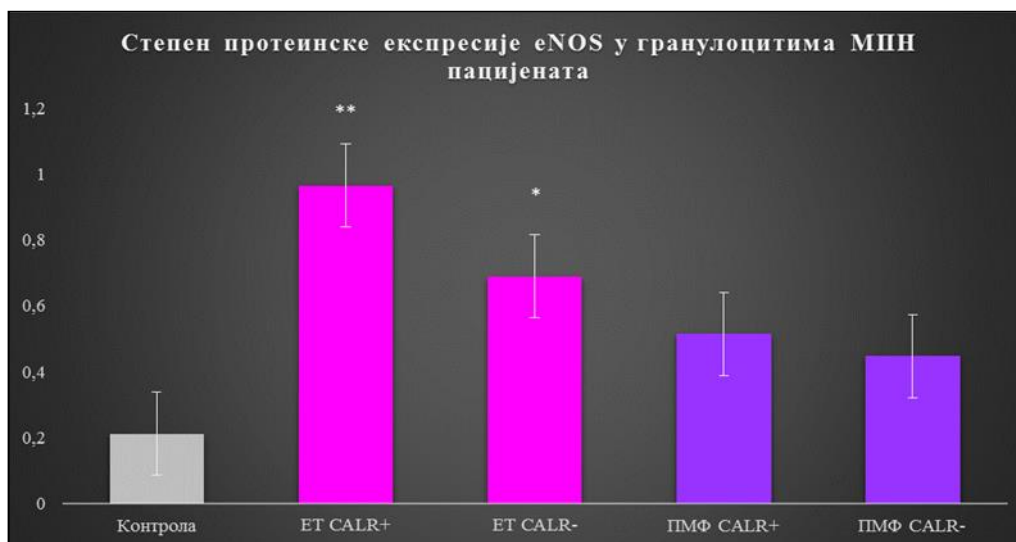


Графикон 21. Протеинска експресија VEGF у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

4.3.6. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство мутације у гену за CALR

Анализа експресије eNOS протеина у гранулоцитима МПН пацијената урађена је на 7 узорака ЕТ и 6 узорака ПМФ пацијената без JAK2V617F мутације и 4 здраве контроле.

Значајно повећање нивоа eNOS протеина присутно је код свих пацијената са ЕТ дијагнозом - оних код којих је присутна мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$), као и код оних који немају ову мутацију (* $p < 0,05$). Код свих пацијената са ПМФ дијагнозом ниво eNOS протеина је такође повећан али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на здраве контроле (Графикон 22).



Графикон 22. Протеинска експресија eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$; * $p < 0,01$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

4.4 Степен протеинске експресије ангиогених фактора код МПН пацијената добијен применом имуноцитохемијске методе

Имуноцитохемијска анализа протеинске експресије ангиогених фактора HIF-1 α , VEGF и eNOS вршена је на цитоспин препаратима гранулоцита и прогениторских CD34⁺ ћелија МПН пацијената у односу на присуство JAK2V617F мутације и мутације у гену за CALR.

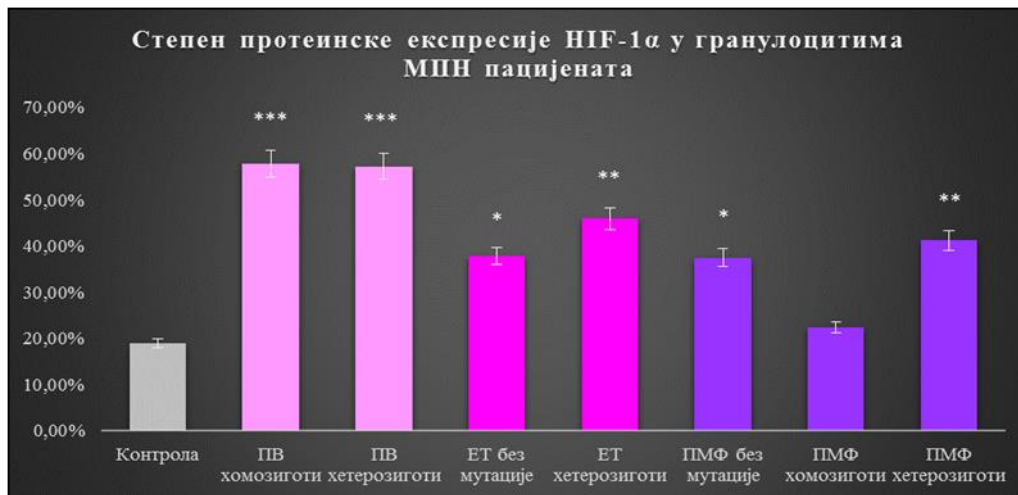
4.4.1. Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа степена експресије HIF-1 α протеина у гранулоцитима МПН пацијената показала је да је број HIF-1 α позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ПВ дијагнозом (** $p < 0,001$) (Графикон 23, Слика 8).

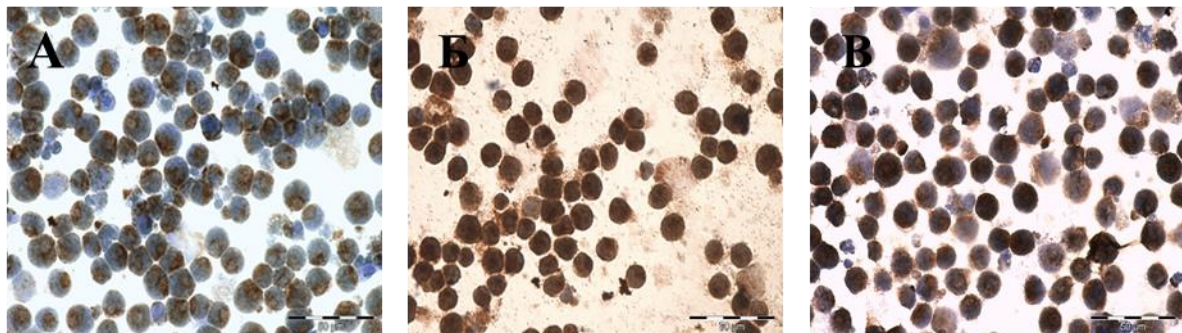
Код пацијената са ЕТ дијагнозом, значајно повећање HIF-1 α позитивних ћелија присутно је и код пацијената без JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$), као и код хетерозиготних пацијената (** $p < 0,01$) (Графикон 23).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, значајно повећање HIF-1 α позитивних ћелија присутно је код хетерозиготних пацијената (** $p < 0,01$) и пацијената без

JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом који су хомозиготни, статистичка анализа није показала постојање значајне разлике у броју HIF-1 α позитивних ћелија у односу на здраве контроле (Графикон 23, Слика 8).



Графикон 23. Протеинска експресија HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

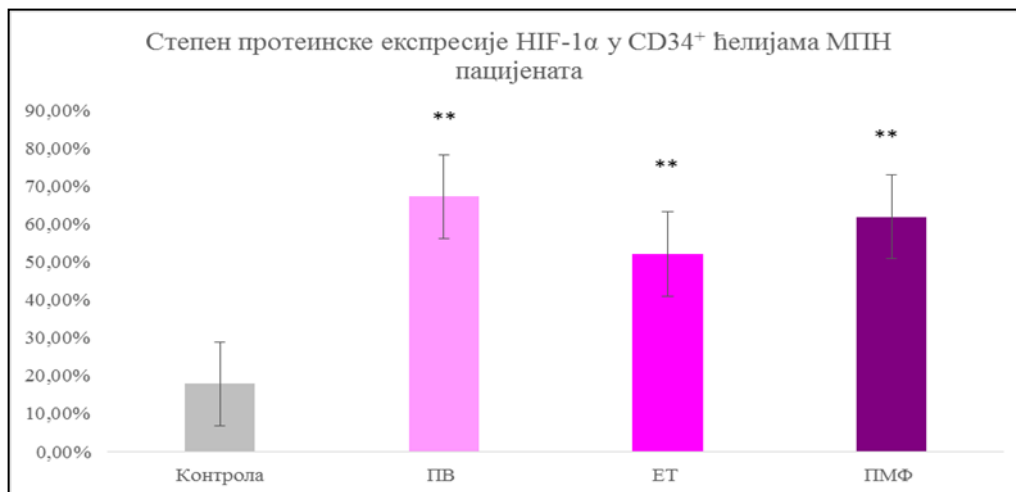


Слика 8. Експресија HIF-1 α у гранулоцитима здраве контроле (А), ПВ хомозиготног (Б) и ПМФ хетерозиготног пацијента (В) (x 40)

4.4.2. Степен протеинске експресије HIF-1 α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа степена експресије HIF-1 α протеина у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената показала је да је број HIF-1 α позитивних ћелија значајно

повећан код свих пацијената са ПВ са ЕТ као и ПМФ дијагнозом (** $p < 0,01$) (Графикон 24).

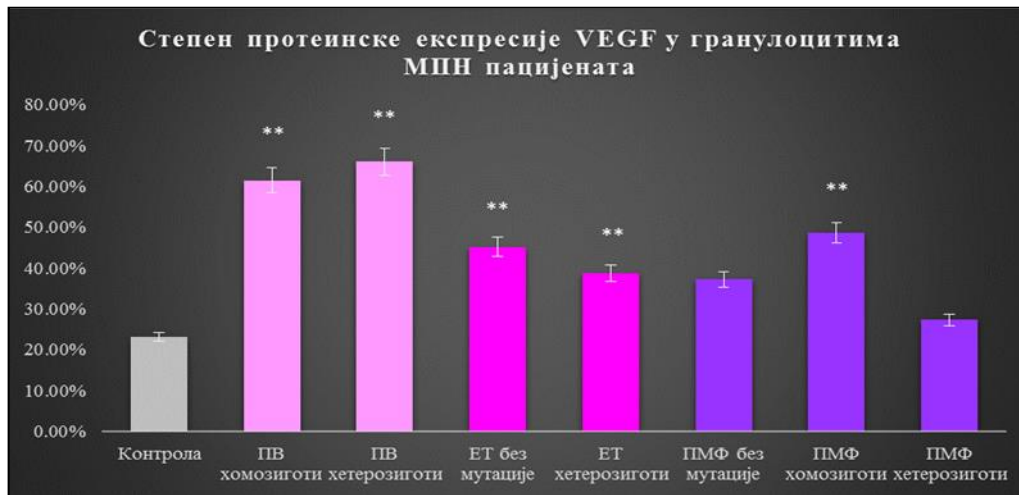


Графикон 24. Протеинска експресија HIF-1 α у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола (** $p < 0,01$)

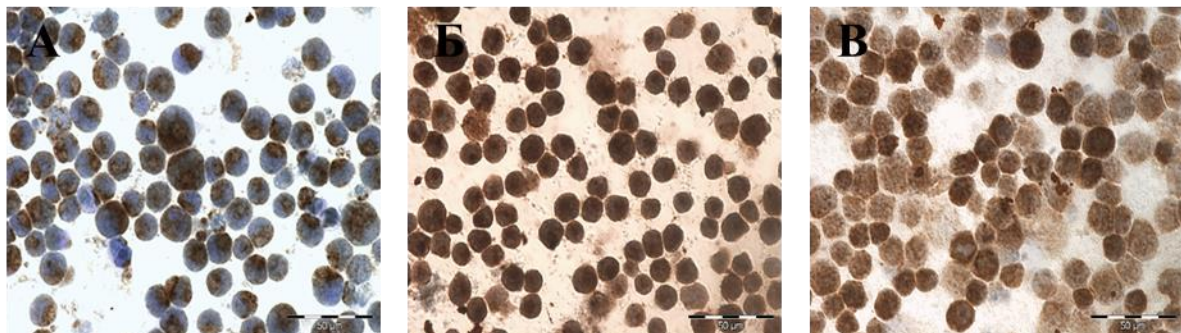
4.4.3. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа експресије VEGF протеина у гранулоцитима код МПН пацијената је показала да је број VEGF позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ПВ дијагнозом као и свих пацијената са ЕТ дијагнозом, независно од присуства JAK2V617F мутације (** $p < 0,01$) (Графикон 25, Слика 9).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, број VEGF позитивних ћелија значајно је повећан код хомозиготних пацијената (** $p < 0,01$), док код хетерозиготних и пацијената без JAK2V617F мутације статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у броју VEGF позитивних ћелија у односу на здраве контроле (Графикон 25, Слика 9).



Графикон 25. Протеинска експресија VEGF у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (** $p < 0,01$)



Слика 9. Експресија VEGF у гранулоцитима здраве контроле (А), ПВ хетерозиготног (Б) и ПМФ хомозиготног пацијента (В) (x 40)

Поред тога, тест Pearsonове корелације је показао да постоји статистички значајна негативна корелација између нивоа протеинске експресије HIF-1 α и VEGF протеина код ПМФ хетерозиготних пацијената ($r = -0,513$, $p < 0,05$; Табела 11).

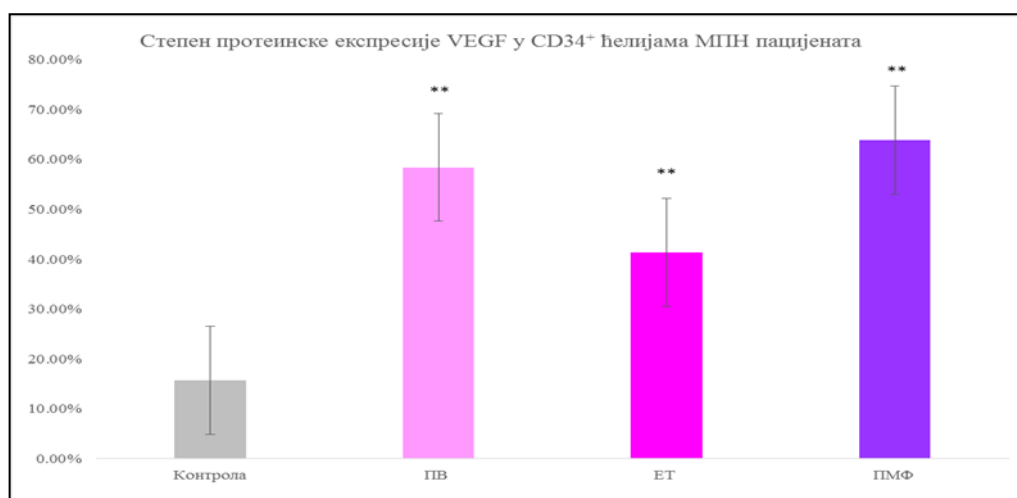
Табела 11. Корелација између HIF-1 α , VEGF и eNOS протеинске експресије у гранулоцитима МПН пацијената

Дијагноза	Имуноцитохемија/ Гранулоцити	
	eNOS/VEGF	VEGF/HIF-1 α
ПВ хетерозиготи	0,536**	0,400
ПВ хомозиготи	0,723**	-0,667
ЕТ без мутације	-0,400	-0,800
ЕТ хетерозиготи	0,406*	-0,500
ПМФ без мутације	0,726**	0,800
ПМФ хетерозиготи	0,709**	-0,513*

*p<0,05; **p<0,01

4.4.4. Степен протеинске експресије VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа степена експресије VEGF протеина у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената показала је да је број VEGF позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ПВ са ЕТ као и ПМФ дијагнозом (**p<0,01) (Графикон 26).

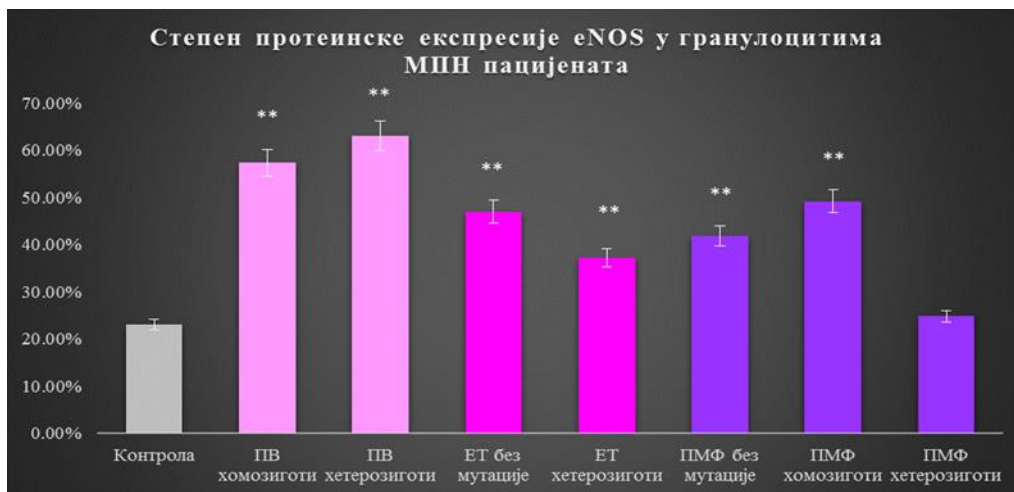


Графикон 26. Протеинска експресија VEGF у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола (**p<0,01)

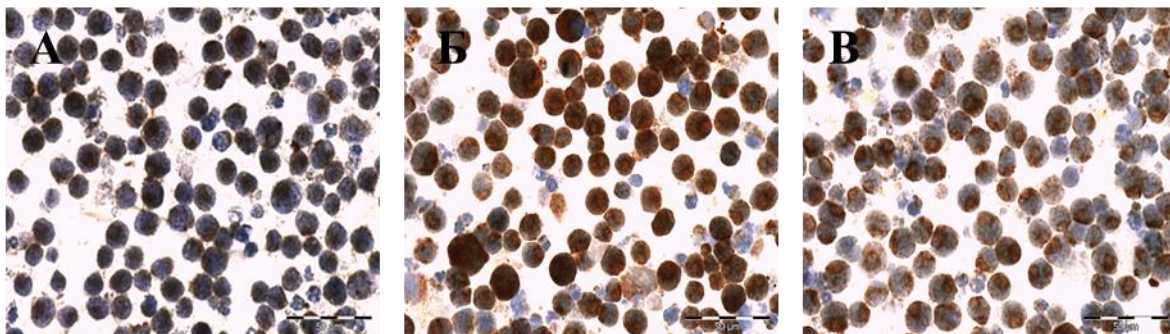
4.4.5. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа експресије eNOS протеина у гранулоцитима код МПН пацијената је показала да је број eNOS позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ПВ дијагнозом као и свих пацијената са ЕТ дијагнозом, независно од присуства JAK2V617F мутације (**p<0,01) (Графикон 27, Слика 10).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, број eNOS позитивних ћелија значајно је повећан код хомозиготних и пацијената без JAK2V617F мутације (**p<0,01), док код ПМФ хетерозиготних пацијената статистичка анализа није показала значајну разлику у броју eNOS позитивних ћелија у односу на здраве контроле (Графикон 27, Слика 10)



Графикон 27. Протеинска експресија eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (**p<0,01)

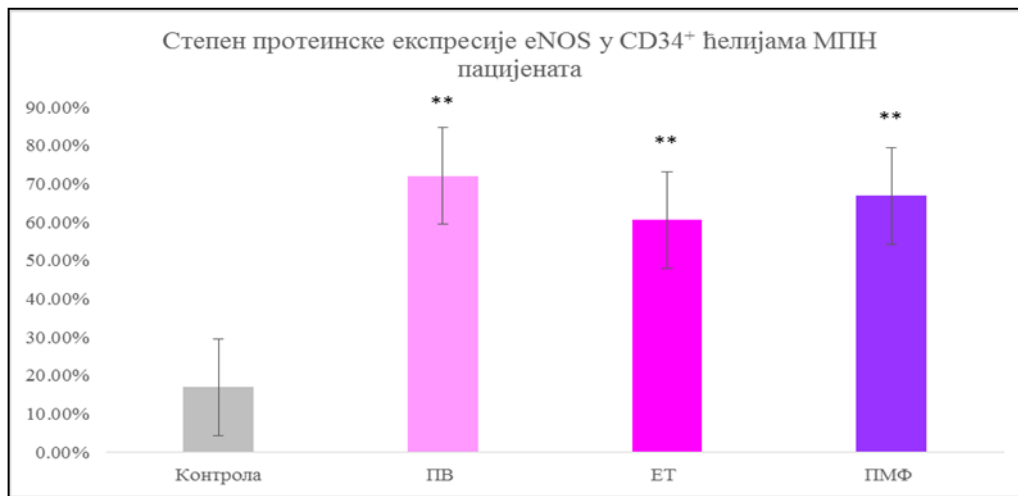


Слика 10. Експресија eNOS у гранулоцитима здраве контроле (А), ПВ хетерозиготног (Б) и ЕТ хетерозиготног пацијента(В) (x 40)

Поред тога, тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна позитивна корелација између нивоа протеинске експресије eNOS и VEGF протеина код пацијената са ПВ дијагнозом (JAK2 хетерозиготи $r=0,536$, $p<0,01$; JAK2 хомозиготи $r=0,723$, $p<0,01$), пацијената са ПМФ дијагнозом (без мутације $r=0,726$, $p<0,01$; JAK2 хетерозиготи $r=0,709$, $p<0,01$; JAK2 хомозиготи $r=0,859$, $p<0,01$), као и код ЕТ хетерозиготних пацијената ($r=0,406$, $p<0,05$) (Табела 11).

4.4.6. Степен протеинске експресије eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

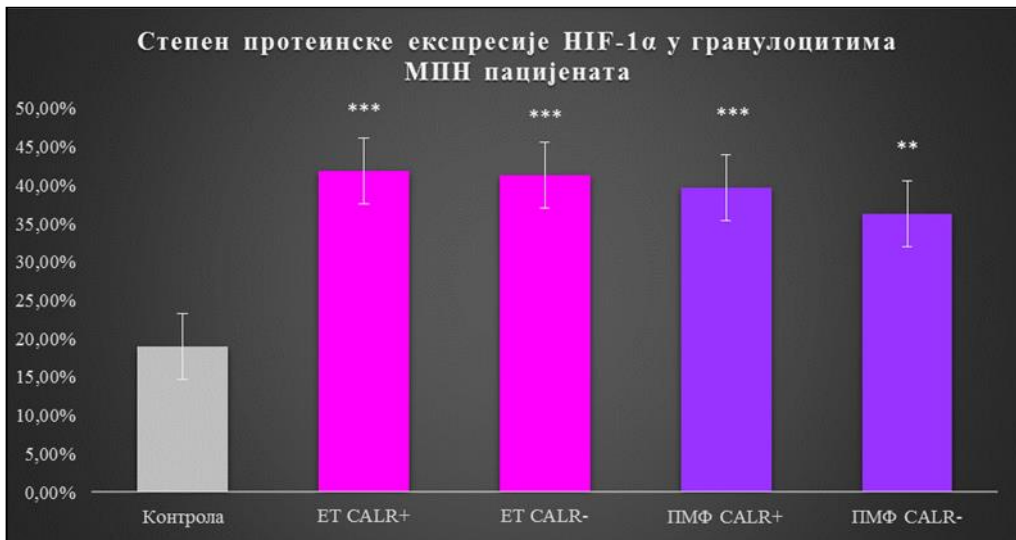
Имуноцитохемијска анализа степена експресије eNOS протеина у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената показала је да је број eNOS позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ПВ са ЕТ као и ПМФ дијагнозом (** $p<0,01$) (Графикон 28).



Графикон 28. Протеинска експресија eNOS у CD34⁺ ћелијама МПН пацијената и здравих контрола (** $p<0,01$)

4.4.7 Степен протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR

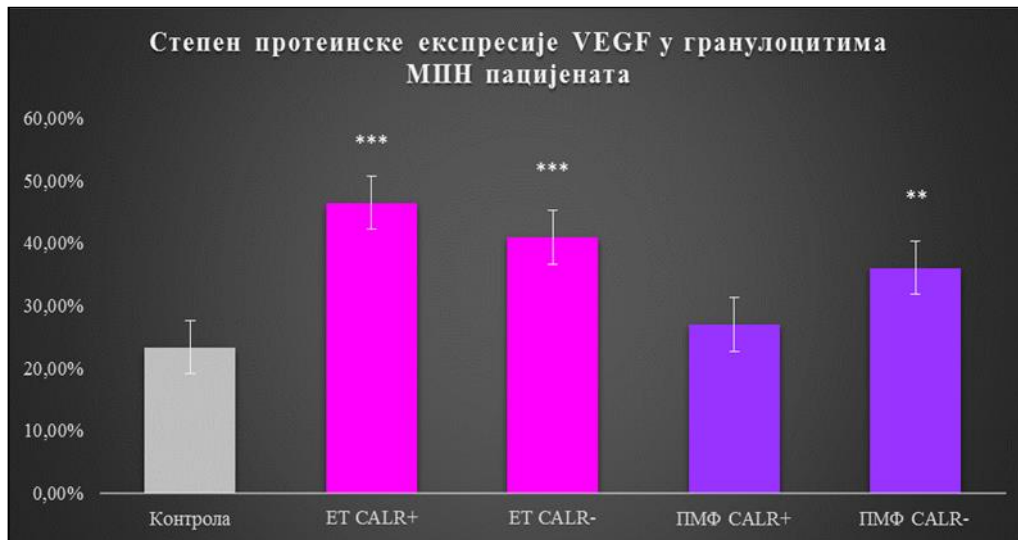
Имуноцитохемијска анализа степена експресије HIF-1 α протеина у гранулоцитима МПН пацијената показала је да је број HIF-1 α позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, независно од присуства мутације у гену за CALR (** $p<0,01$; *** $p<0,001$) (Графикон 29).



Графикон 29. Протеинска експресија HIF-1 α у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (**p<0,01; ***p<0,001)

4.4.8. Степен протеинске експресије VEGF у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR

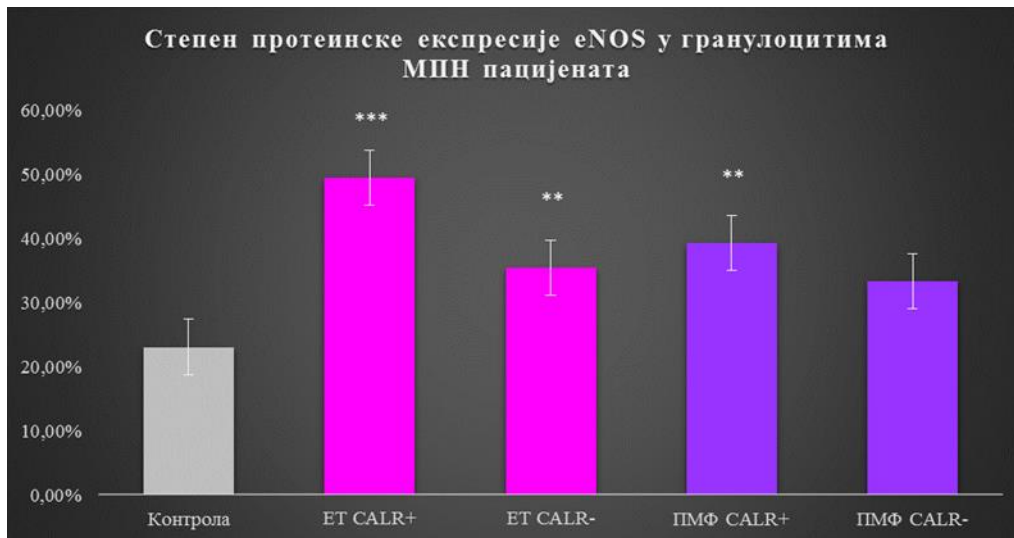
Имуноцитохемијска анализа степена експресије VEGF протеина у гранулоцитима МПН пацијената показала је да је број VEGF позитивних ћелија значајно повећан код свих пацијената са ЕТ дијагнозом, независно од присуства мутације у гену за CALR (**p<0,001). Код пацијената са ПМФ дијагнозом, број VEGF позитивних ћелија значајно је повећан код пацијената који немају мутацију у гену за CALR (**p<0,01) док код пацијената код којих је мутација у гену за CALR присутна, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у броју VEGF позитивних ћелија у односу на здраве контроле (Графикон 30).



Графикон 30. Протеинска експресија VEGF у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4.4.9. Степен протеинске експресије eNOS у гранулоцитима МПН пацијената у односу на мутацију у гену за CALR

Имуноцитохемијска анализа степена експресије eNOS протеина у гранулоцитима МПН пацијената показала је да је број eNOS позитивних ћелија значајно повећан и код пацијената са ЕТ дијагнозом код којих је присутна мутација у гену за CALR (** $p < 0,01$), као и код пацијената који немају мутацију у гену за CALR (** $p < 0,01$). Код пацијената са ПМФ дијагнозом који поседују мутацију у гену за CALR присутан је значајно повећан број eNOS позитивних ћелија ($p < 0,05$), док код пацијената који немају мутацију у гену за CALR статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у броју eNOS позитивних ћелија у односу на здраве контроле (Графикон 31).



Графикон 31. Протеинска експресија eNOS у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (**p<0,01; ***p<0,001)

4.5 Степен експресије ангиогених фактора у костној сржи МПН пацијената

Имунохистохемијска анализа степена експресије ангиогених фактора HIF-1 α , VEGF и eNOS урађена је на узорцима костне сржи МПН пацијената и контрола. За процену експресије HIF-1 α фактора извршено је бојење 40 узорака костне сржи од чега 11 узорака ПВ (5 хомозиготних и 6 хетерозиготних), 10 узорака ЕТ (5 без JAK2V617F мутације и 5 хетерозиготних), 15 узорака ПМФ пацијената (по 5 узорака без JAK2V617F мутације, хомозиготних и хетерозиготних) и 4 контроле.

За процену експресије VEGF фактора извршено је бојење 45 узорака костне сржи од чега 15 узорака ПВ (8 хомозиготних и 7 хетерозиготних), 10 узорака ЕТ (по 5 без JAK2V617F мутације и хетерозиготних), 15 узорака ПМФ пацијената (по 5 узорака без JAK2V617F мутације, хомозиготних и хетерозиготних) и 5 контрола.

За процену експресије eNOS фактора извршено је бојење 41 узорка костне сржи од чега 10 ПВ (по 5 узорака хомозиготних и хетерозиготних), 11 узорака ЕТ (5 без JAK2V617F мутације и 6 хетерозиготних), 15 узорака ПМФ пацијената (по 5 узорака без JAK2V617F мутације, хомозиготних и хетерозиготних) и 5 контрола.

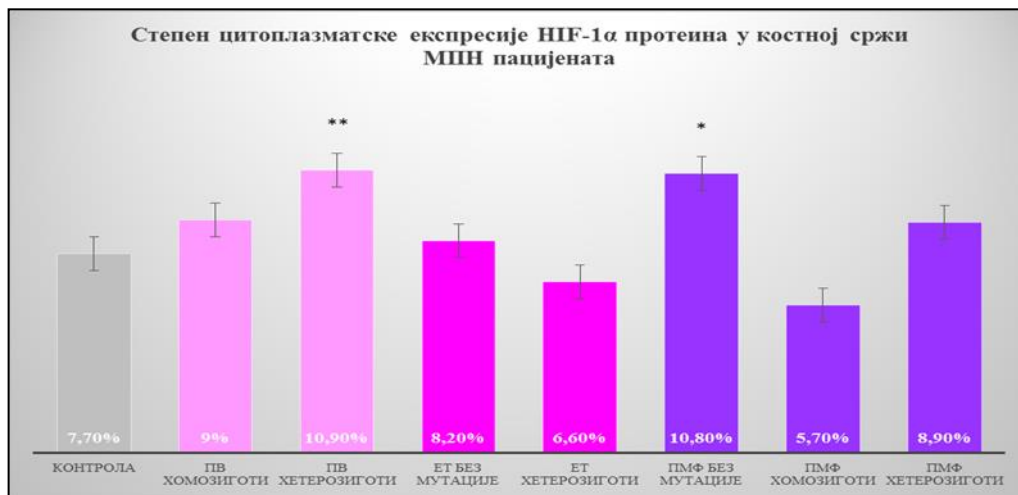
4.5.1. Степен експресије HIF-1 α протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације

У ћелијама костне сржи МПН пацијената праћена је експресија HIF-1 α протеина у цитоплазми, као и активiranог HIF-1 α протеина у нуклеусима ћелија.

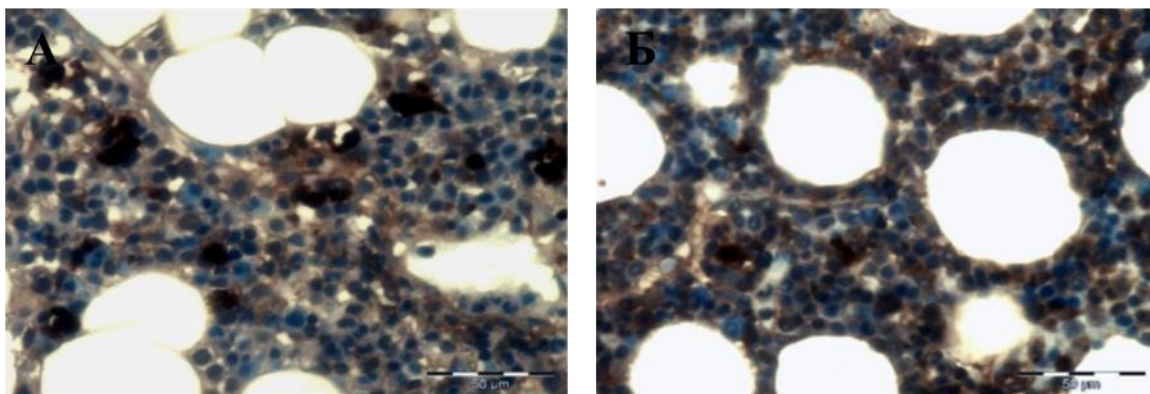
Имунохистохемијска анализа степена експресије HIF-1 α протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број HIF-1 α позитивних ћелија значајно повећан код пацијената који су хетерозиготи (** $p < 0,01$), док код хомозигота статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на контроле (Графикон 32).

Код пацијената са ЕТ дијагнозом ни код једне групе статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије HIF-1 α протеина у односу на контроле (Графикон 32).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, значајно повећање броја HIF-1 α позитивних ћелија присутно је код пацијената без JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$), док код друге две групе пацијената, хомозиготних и хетерозиготних, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије HIF-1 α протеина у односу на контроле (Графикон 32, Слика 11).



Графикон 32. Цитоплазматска експресија HIF-1 α протеина у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)



Слика 11. Експресија HIF-1 α протеина у ћелијама костне сржи здраве контроле (А) и ПМФ пацијента без JAK2V617F мутације (Б) (x40)

У случају активираниог HIF-1 α протеина који је присутан у нуклеусима ћелија, ни код једне групе МПН пацијената статистичка анализа није показала разлику у степену експресије у односу на контроле. Поред тога, код пацијената са ЕТ дијагнозом који су без JAK2V617F мутације, као и код хомозиготних ПМФ пацијената експресија активираниог HIF-1 α протеина није детектована (Графикон 33).



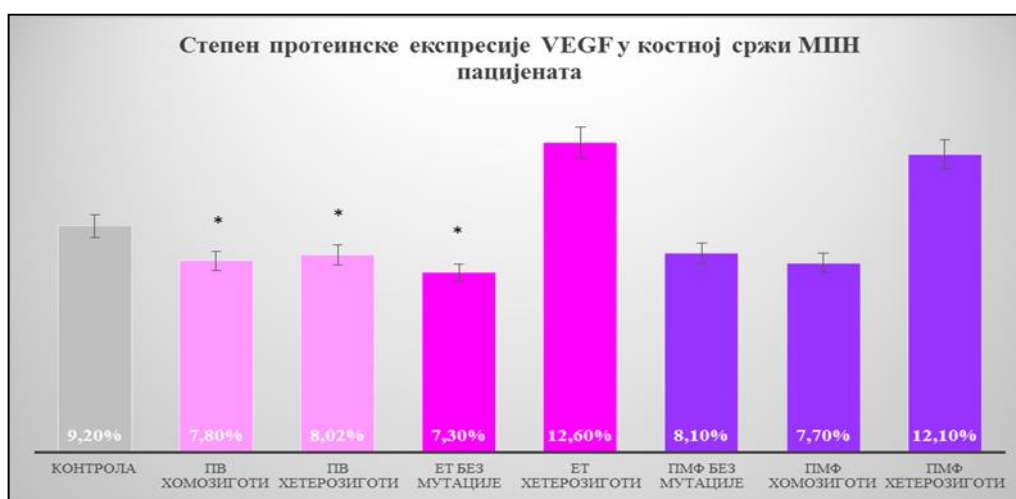
Графикон 33. Нуклеусна експресија HIF-1 α протеина у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације

4.5.2. Степен експресије VEGF протеина у узорцима костне сржи односу на присуство JAK2V617F мутације

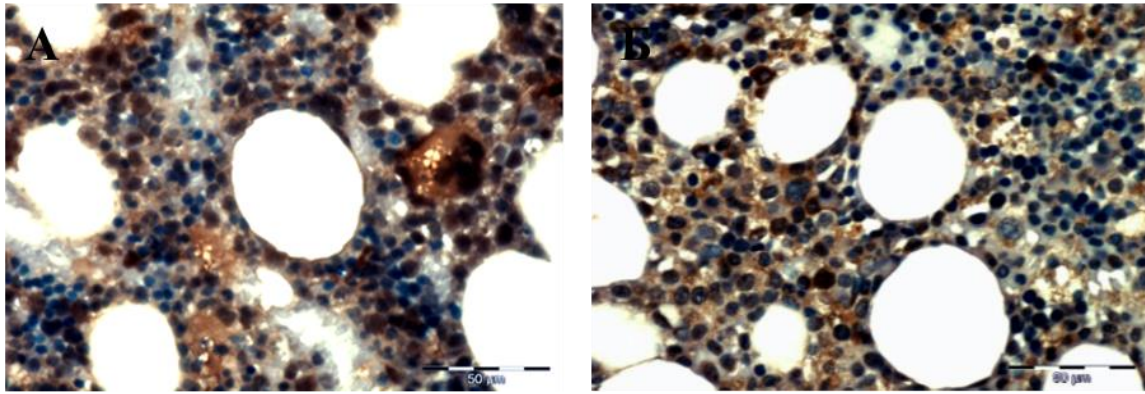
Имунохистохемијска анализа степена експресије VEGF протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број VEGF позитивних ћелија значајно смањен код свих пацијената (* $p < 0,05$) (Графикон 34, Слика 12)

Код пацијената са ЕТ дијагнозом, статистички значајно смањење броја VEGF позитивних ћелија, присутно је код пацијената без JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$), док код хетерозиготних пацијената није било статистички значајне разлике у односу на контроле (Графикон 34).

У случају пацијената са ПМФ дијагнозом ни код једне групе пацијената статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије VEGF протеина у односу на контроле (Графикон 34).



Графикон 34. Протеинска експресија VEGF у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$)



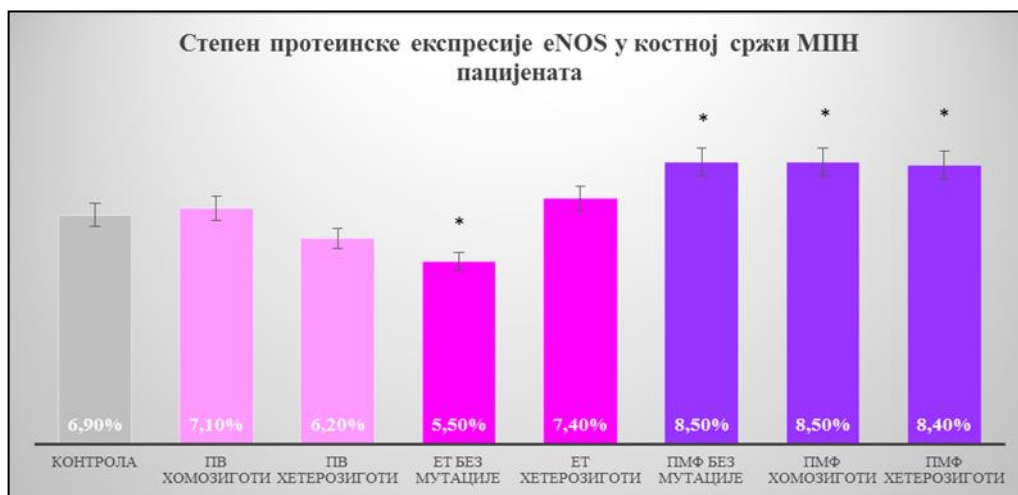
Слика 12. Експресија VEGF протеина у ћелијама костне сржи здраве контроле (А) и ПВ хетерозиготног пацијента (Б) (x40)

4.5.3. Степен експресије eNOS протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације

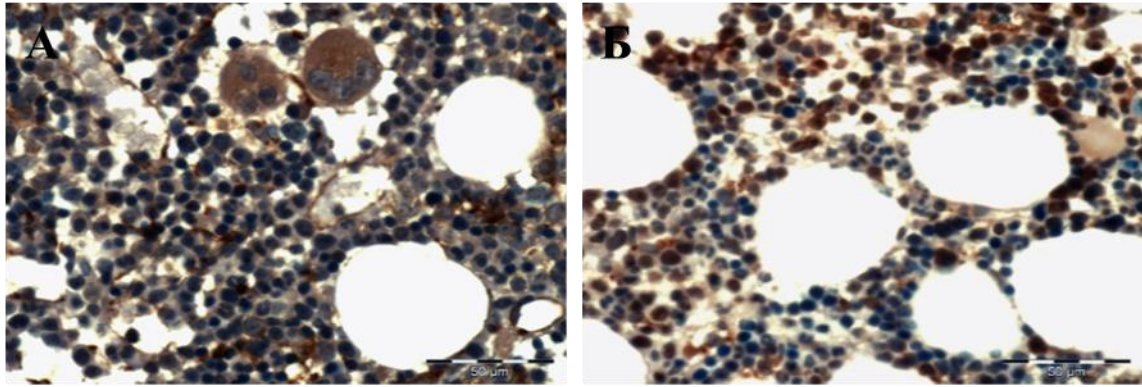
Имунохистохемијска анализа експресије eNOS протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом показала је одсуство статистички значајне разлике у односу на контроле (Графикон 35).

Код пацијената са ЕТ дијагнозом, статистички значајно смањење броја eNOS позитивних ћелија, присутно је код пацијената без JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$), док код хетерозиготних пацијената, није било статистичке разлике у односу на контроле (Графикон 35).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, у свим групама постоји значајно повећање степена експресије eNOS протеина у односу на контроле (* $p < 0,05$) (Графикон 35, Слика 13).



Графикон 35. Протеинска експресија eNOS у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$)



Слика 13. Експресија eNOS протеина у ћелијама костне сржи здраве контроле (А) и ПМФ хетерозиготног пацијента (Б) (x40)

Поред тога, тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна позитивна корелација између степена протеинске експресије VEGF и eNOS протеина код пацијената са ПМФ дијагнозом који су без JAK2V617F мутације ($r=0,703$, $p<0,01$) (Табела 12).

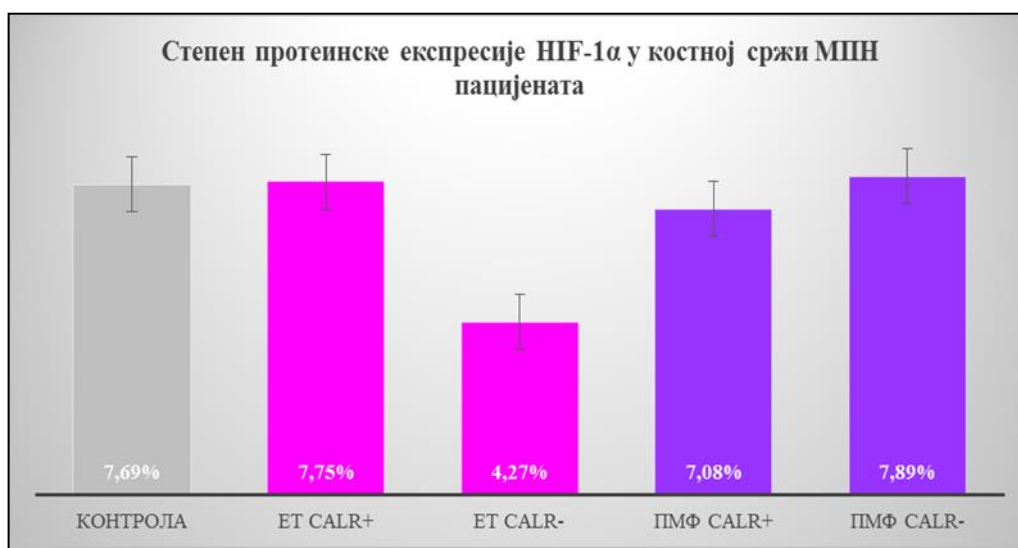
Табела 12. Корелација између VEGF и eNOS протеинске експресије у костној сржи МПН пацијената

Дијагноза	Имунохистохемија/ Костна срж
JAK2V617F	VEGF /eNOS
ПВ хетерозиготи	-0,200
ПВ хомозиготи	0,100
ЕТ без мутације	0,100
ЕТ хетерозиготи	-0,300
ПМФ без мутације	0,703**
ПМФ хетерозиготи	0,400

** $p<0,01$

4.5.4. Степен експресије HIF-1 α протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR

Имунохистохемијска анализа степена експресије HIF-1 α протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом је показала да не постоји статистички значајна разлика у степену експресије HIF-1 α протеина ни код једне групе пацијената у односу на контроле, без обзира на присуство мутације у гену за CALR (Графикон 36).



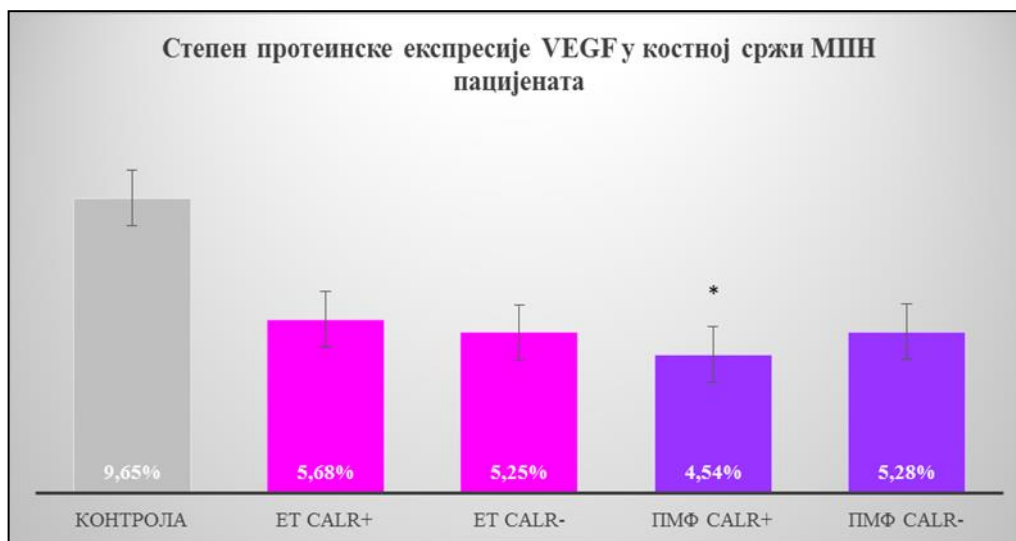
Графикон 36. Експресија HIF-1 α у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR

Експресија активираниог HIF-1 α протеина у нуклеусима ћелија, није детектована ни код једне групе пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, независно од присуства мутације у гену за CALR.

4.5.5. Степен експресије VEGF протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR

Имунохистохемијска анализа степена експресије VEGF протеина у костној сржи пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом показала је смањену експресију овог протеина у свим групама пацијената у односу на контроле, мада је само код пацијената са ПМФ

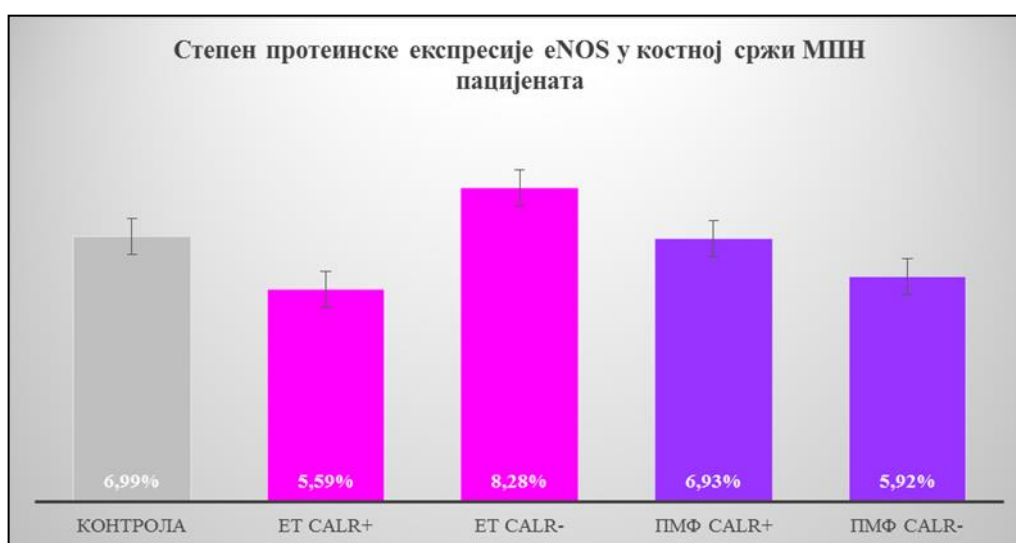
дијагнозом који поседују мутацију у гену за CALR она достигла статистичку значајност (* $p < 0,05$) (Графикон 37).



Графикон 37. Протеинска експресија VEGF у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR (* $p < 0,05$)

4.5.6. Степен експресије eNOS протеина у узорцима костне сржи у односу на присуство мутације у гену за CALR

Имунохистохемијска анализа степена експресије eNOS протеина у костној сржи пацијената са ET и ПМФ дијагнозом је показала да не постоји статистички значајна разлика у степену експресије eNOS протеина у односу на контроле (Графикон 38).



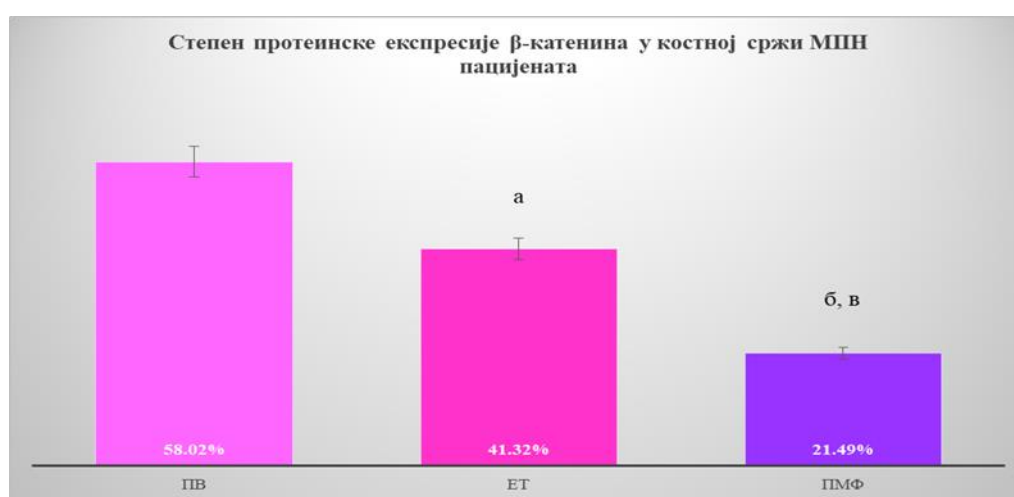
Графикон 38. Експресија eNOS у ћелијама костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство мутације у гену за CALR

4.6 Степен експресије β -катенина и PPAR γ у костној сржи МПН пацијената

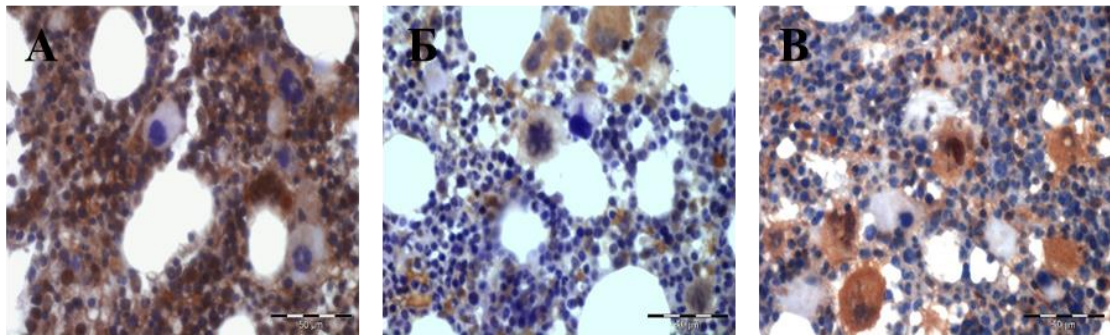
Имунохистохемијска анализа експресије β -катенина и PPAR γ урађена је на узорцима костне сржи МПН пацијената. За процену експресије оба фактора извршено је бојење 30 узорака костне сржи и то по 10 узорака ПВ, ЕТ и ПМФ пацијената.

4.6.1. Степен експресије β -катенина у костној сржи МПН пацијената

Имунохистохемијска анализа експресије β -катенина у костној сржи МПН пацијената је показала да је највећи број β -катенин имунореактивних ћелија откривен у групи пацијената са ПВ дијагнозом (Графикон 39, Слика 14А), док је у групи пацијената са ПМФ дијагнозом тај број најнижи (Графикон 39, Слика 14В). Статистичка анализа је показала да је разлика у погледу броја β -катенин-позитивних ћелија значајна између пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом (^a $p < 0,01$), ПВ и ПМФ дијагнозом (^b $p < 0,01$), као и између ЕТ и ПМФ дијагнозом (^b $p < 0,01$). Позитивна реакција на бојење са β -катенином је забележена на ћелијској мембрани и/или у цитоплазматском региону мегакариоцита, незрелих ћелија мијелоидне лозе и васкуларним ендотелним ћелијама. Имунореактивност у нуклеусима није откривена. Ћелије еритроидне линије карактерише одсуство или врло ретко минимално бојење β -катенином (Слика 14).



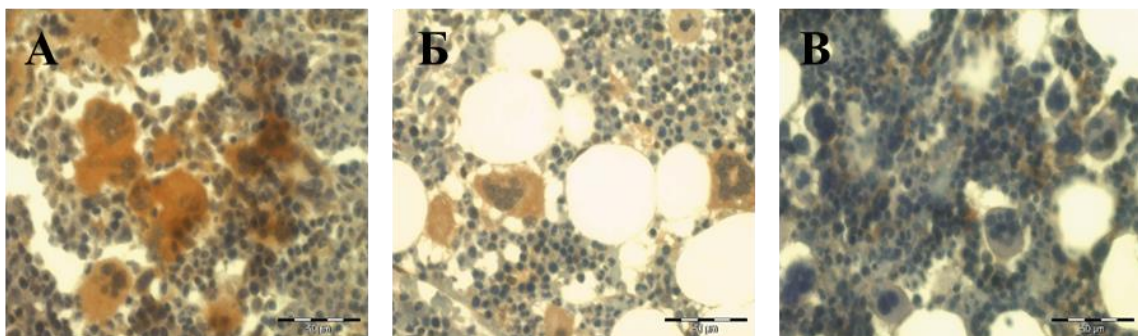
Графикон 39. Експресија β -катенина у ћелијама костне сржи МПН пацијената (^a $p < 0,01$ ПВ vs ЕТ; ^b $p < 0,01$ ПВ vs ПМФ; ^b $p < 0,01$ ЕТ vs ПМФ)



Слика 14. Експресија β -катенин протеина у ћелијама костне сржи ПВ (А), ЕТ (Б) и ПМФ пацијента (В) (x40)

4.6.2. Степен експресије PPAR γ у костној сржи МПН пацијената

Имунохистохемијска анализа степена експресије PPAR γ у костној сржи МПН пацијената је показала, да за разлику од β -катенина, PPAR γ има другачији образац експресије. Пре свега, код свих МПН пацијената присутан је јако мали број PPAR γ имунопозитивних ћелија, и то претежно мегакариоцита. Поред тога, највећи број PPAR γ имунопозитивних ћелија је присутан код пацијената са ПМФ дијагнозом, док је најмањи број ћелија потврђен код пацијената са ЕТ дијагнозом (Слика 15).



Слика 15. Експресија PPAR γ протеина у ћелијама костне сржи ПМФ (А), ПВ (Б) и ЕТ пацијента (В) (x40)

4.7 Индекс пролиферације – Ki67 у костној сржи МПН пацијената

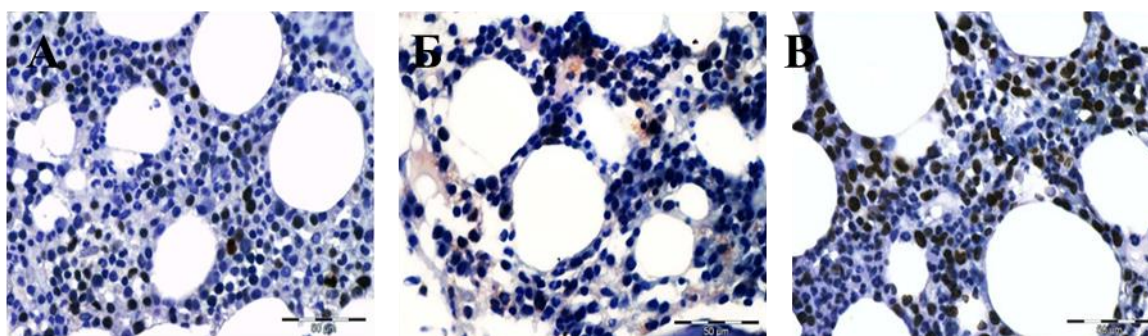
Имунохистохемијска анализа степена пролиферације у костној сржи МПН пацијената показала је да је нуклеусна експресија Ki67 протеина код пацијената са ПМФ и ПВ дијагнозом значајно већа у односу на пацијенте са ЕТ дијагнозом (Слика

16). Пролиферативни индекс, израчунат из односа броја Ki67-позитивних ћелија и укупног броја ћелија по mm², значајно је повећан код ПМФ и ПВ пацијената у поређењу са ЕТ пацијентима (Табела 13).

Табела 13. Индекс пролиферације код МПН пацијената

Групе	Број ћелија по јединици површине/mm ²	Број Ki67 ⁺ ћелија по јединици површине/mm ²	Индекс пролиферације
ПВ	69,55 ± 12,7	12,84 ± 9,1*	17,62 ± 9,9*
ЕТ	73,54 ± 10,6	8,11 ± 6,1	11,04 ± 8,2
ПМФ	75,34 ± 16,1	17,89 ± 11,2***	22,81 ± 12,1***

*p<0,05 ПВ vs ЕТ; ***p<0,001 ПМФ vs ЕТ;

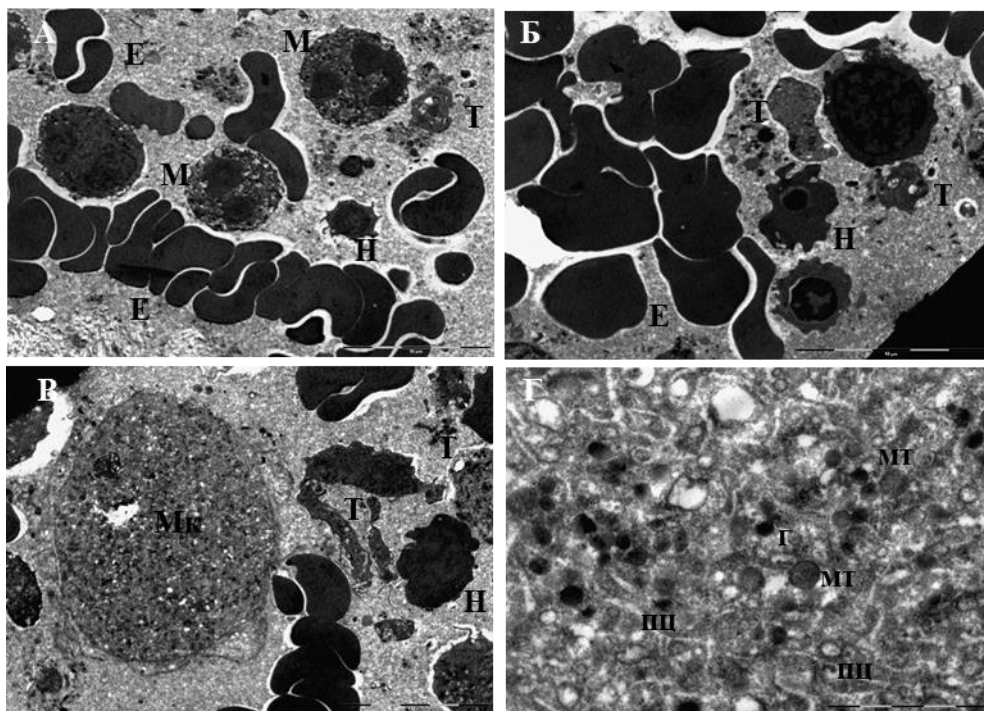


Слика 16. Експресија протеина Ki67 у ћелијама костне сржи код ПВ (А), ЕТ (Б) и ПМФ пацијената (В) (x40)

4.8 Ултраструктурне карактеристике ћелија костне сржи МПН пацијената

Основно обележје костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је њена хиперцелуларност. У костној сржи ових пацијената јавља се тролинијска пролиферација (панмијелоза), међутим број еритроцита је далеко већи у односу на друге врсте ћелија, као и у односу на пацијенте са ЕТ или ПМФ дијагнозом. Ултраструктурна анализа је показала присуство бројних зрелих еритроцита, еритропоетских прекурсора – нормобласта, ћелија мијелоидне линије и тромбоцита.

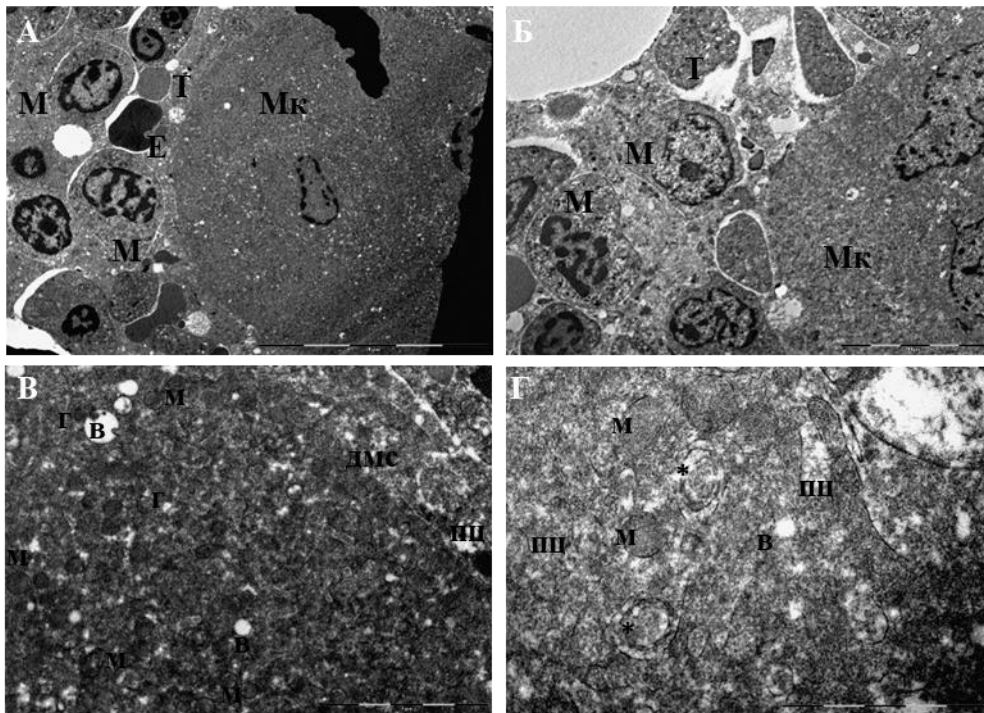
Ћелије мијелоидне линије карактерише присуство сегментисаних нуклеуса и цитоплазма која садржи проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, као и примарне грануле. Тромбоцити, који су издужени или неправилног облика, садрже проширене цистерне ендоплазминог ретикулума (Слика 17А, Б). Мегакариоцити су умножени, формирају кластере и/или се налазе у близини коштаних трабекула. Њих карактерише обимна и добро организована цитоплазма (Слика 17В). У цитоплазми мегакариоцита се уочавају митохондрије, проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, грануле и везикуле (Слика 17Г).



Слика 17. Електронска микрографија костне сржи пацијента са ПВ дијагнозом.(А-Г) У костној сржи је присутан повећан број ћелија еритроидне и мијелоидне лозе. (А, Б) Мегакариоцити садрже пространу и добро организовану цитоплазму. (В) У цитоплазми мегакариоцита се налазе митохондрије, проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, грануле и везикуле (Г) (Е - еритроцит, М - мијелоидна ћелија, Н - нормобласт, Т - тромбоцит, Мк - мегакариоцит, г - грануле, мт - митохондрија, пц- проширене цистерне) (уранил-ацетат, олово-цитрат, увећање x4000)

Ултраструктурна анализа костне сржи пацијента са ЕТ дијагнозом показала је присуство ћелија мијелоидне и еритроидне лозе и великих мегакариоцита са веома сложеним системом мембрана у цитоплазми и неправилног облика нуклеуса са

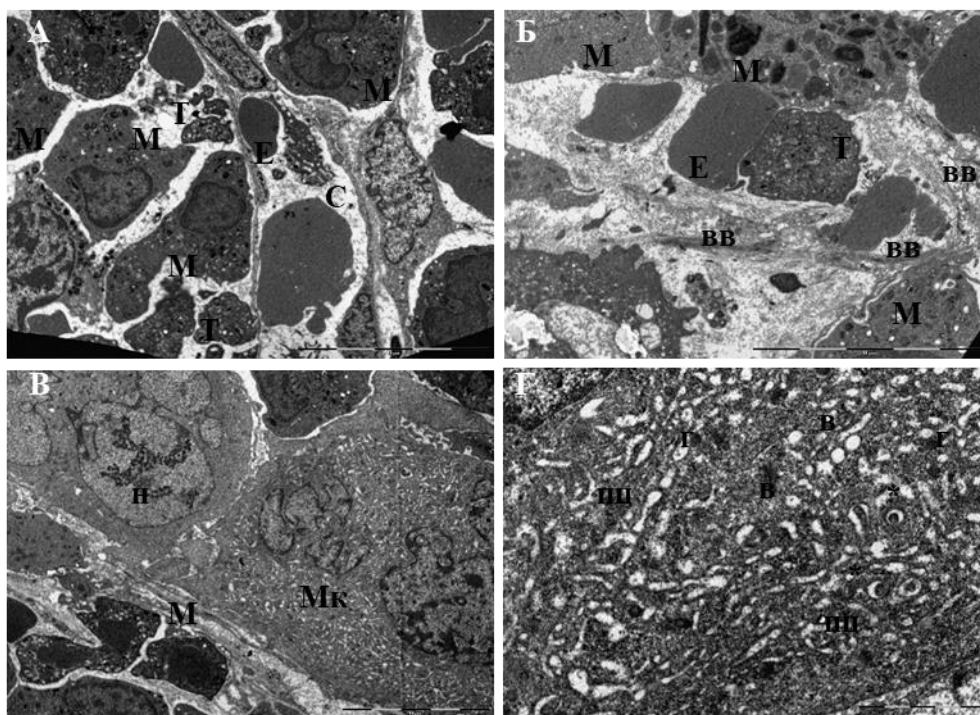
хетерохроматином смештеним уз нуклеусну мембрану (Слика 18А, Б). У цитоплазми мегакариоцита су видљиве проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, мале грануле, везикуле различитих величина и нормалне и оштећене митохондрије. Интензивна мрежа демаркационих мембрана је лоцирана на периферији ћелије и омогућава регионалну поделу цитоплазме истицањем области за одвајање тромбоцита спремних да буду пуштени у циркулацију (Слика 18В, Г).



Слика 18. Електронска микрографија костне сржи пацијента са ЕТ дијагнозом (А-Г). У костној сржи су присутне ћелије мијелоидне и еритроидне лозе као и увећани мегакариоцити (А, Б). У цитоплазми мегакариоцита су уочљиве проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, мале грануле, вакуоле различитих величина и митохондрије, нормалне и оштећене структуре. Интензивна мрежа демаркационих мембрана је лоцирана на периферији ћелије (В, Г) (Е - еритроцит, М - мијелоидна ћелија, Т - тромбоцит, Мк - мегакариоцит, г - грануле, дмс - демаркациони мембрански систем, мт - митохондрија, пц - проширене цистерне, в- везикуле, *- оштећене митохондрије) (уранил-ацетат, олово-цитрат, увећање x4000)

Ултраструктурна анализа костне сржи пацијента са ПМФ дијагнозом показала је присуство проширених синуса, ћелије еритроидне и мијелоидне лозе и тромбоците око и унутар синусоида, као и везивна влакна између крвних елемената (Слика 19А, Б). Мегакариоцити садрже сегментисане нуклеусе са хетерохроматином уз нуклеусну

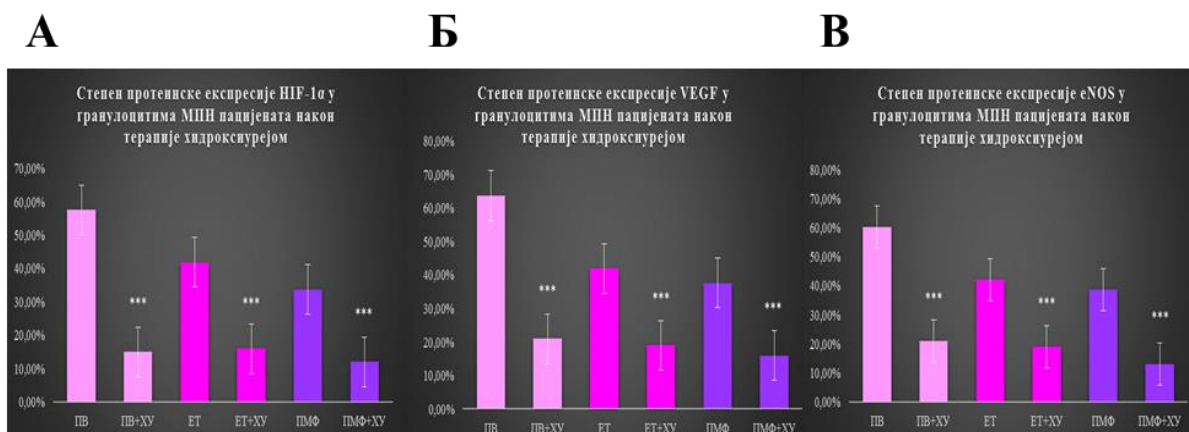
мембрану. У цитоплазми су присутне проширене цистерне ендоплазминог ретикулума, оштећене митохондрије, ретке грануле и везикуле (Слика 19В, Г).



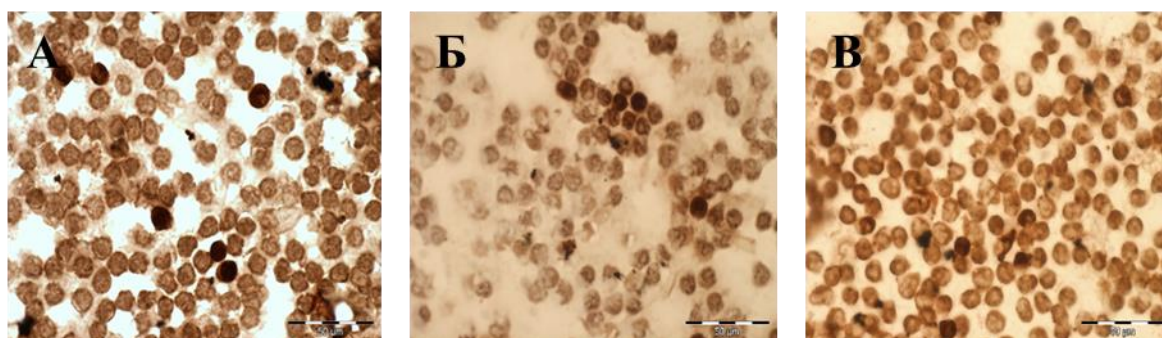
Слика 19. Електронска микрографија костне сржи пацијента са ПМФ дијагнозом (А-Г). Ћелије еритроидне и мијелоидне лозе као и тромбоцити су присутне око и унутар синусоида (А), као и везивна влакна између крвних елемената (Б). Присутни су мегакариоцити са сегментисаним нуклеусима (В), ендоплазмички ретикулум са проширеним цистернама, оштећене митохондрије, ретке грануле и вакуоле (Г) (Е - еритроцит, М - мијелоидна ћелија, Т - тромбоцит, Мк - мегакариоцит, С - синусоид, вв – везивна влакна, н - нуклеус, г - грануле, пц - проширене цистерне, в - везикуле, *- оштећене митохондрије) (уранил-ацетат, олово-цитрат, увећање x4000)

4.9 Степен експресије ангиогених фактора код МПН пацијената након терапије хидроксиурејом

Анализа протеинске експресије ангиогених фактора у гранулоцитима МПН пацијената који су најмање 6 месеци били на терапији хидроксиурејом вршена је имуноцитохемијским бојењем цитоспин препарата. Ова анализа је показала статистички значајно смањење експресије сва три фактора - HIF-1 α , VEGF и eNOS код сва три ентитета МПН независно од присуства JAK2V617F мутације или мутације у гену за CALR (***) $p < 0,001$) (Графикон 40, Слика 20).



Графикон 40. Протеинска експресија ангиогених фактора HIF-1 α (А), VEGF (Б) и eNOS (В) у гранулоцитима МПН пацијената након терапије хидроксиурејом (ХУ) (***) $p < 0,001$



Слика 20. Експресија HIF-1 α (А) VEGF (Б) eNOS (В) у гранулоцитима пацијената са ПБ дијагнозом након терапије хидроксиурејом (х40)

4.10 Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана хидроксиурејом и ЈАК2 специфичним инхибитором

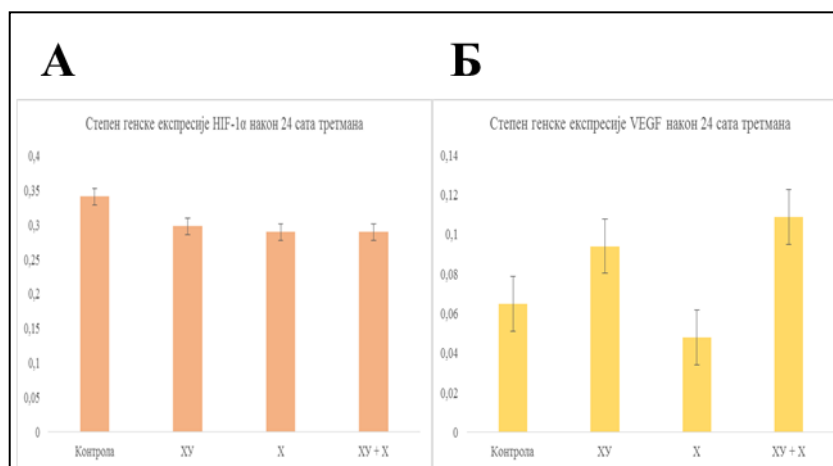
У циљу испитивања утицаја хидроксиуреје и ЈАК2 специфичног инхибитора – 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексана на степен експресије ангиогених фактора, HEL 92.1.7 ћелије су третиране хидроксиурејом (100 μM) и 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном (50 μM) – посебно и у комбинацији, у трајању од 24 и 48 сати. Степен експресије ангиогених фактора HIF-1 α , VEGF и eNOS испитиван је на генском нивоу и протеинском нивоу применом *Western blot* и имуноцитохемијске методе

4.10.1. Степен генске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана

У HEL ћелијама након 24 сата третмана, долази до смањене експресије HIF-1 α у свим групама у односу на контроле. Статистичка анализа, међутим, није показала да постоји значајна разлика у погледу степена експресије HIF-1 α у односу на контроле (Графикон 41А).

Степен експресије VEGF смањен је након 24 сата третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, док у остале две групе долази до повећања његове експресије у односу на контроле. Међутим, ни код једне групе статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у погледу степена експресије VEGF у односу на контроле (Графикон 41Б).

Степен експресије eNOS фактора био је испод границе детекције.

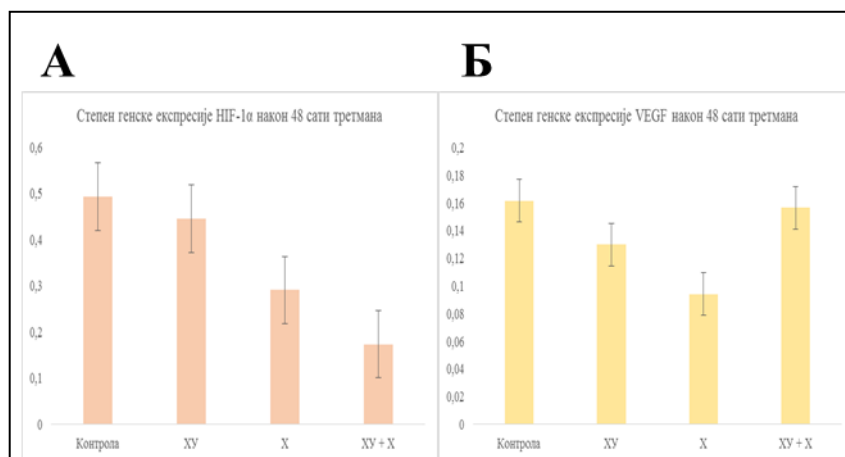


Графикон 41. Степен генске експресије HIF-1 α (А) и VEGF (Б) ангиогених фактора након 24 сата третмана са хидроксиурејом (100 μ М) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ М) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

4.10.2. Степен генске експресије ангиогених фактора након 48 сати третмана

Након 48 сати третмана, степен експресије HIF-1 α и VEGF је смањен у свим групама у односу на контроле, међутим статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика (Графикон 42).

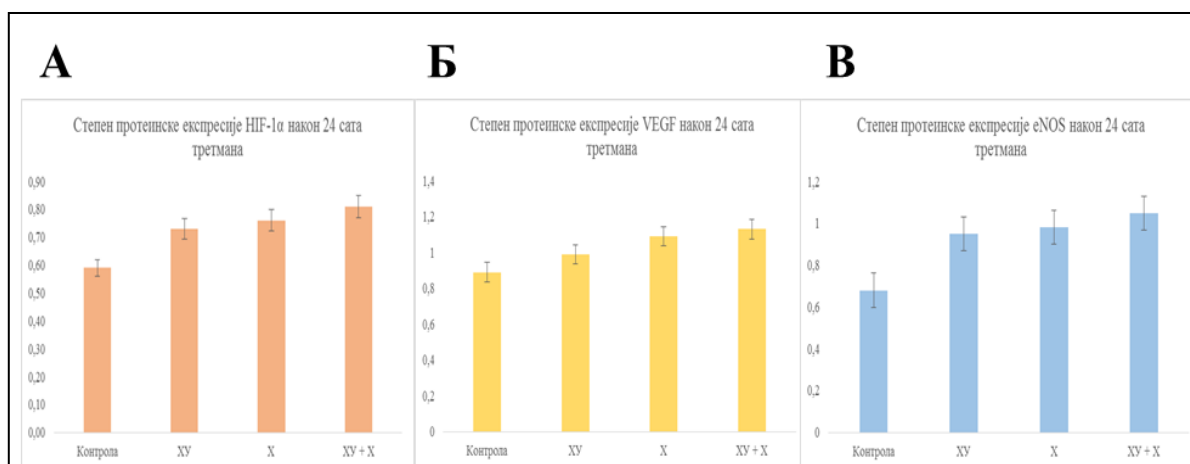
Степен експресије eNOS фактора био је испод границе детекције.



Графикон 42. Степен генске експресије HIF-1 α (A) и VEGF (Б) ангиогених фактора након 48 сати третмана са хидроксиурејом (100 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

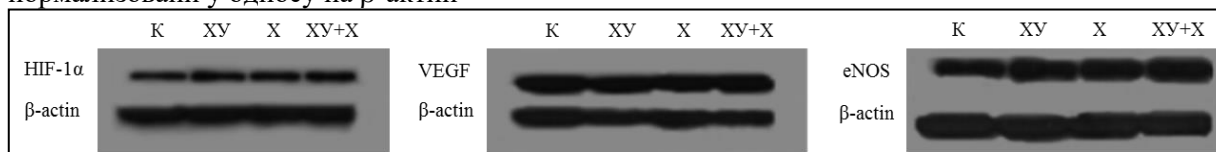
4.10.3. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана добијен применом *Western blot* методе

Western blot анализа степена протеинске експресије сва три ангиогена фактора у HEL ћелијама након 24 сата третмана је показала да долази до повећања степена њихове експресије у свим групама. Међутим, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије у односу на контролну групу (Графикон 43, Слика 21).



Графикон 43. Протеинска експресија HIF-1 α (A), VEGF (Б) и eNOS (В) након 24 сата третмана са хидроксиурејом (100 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M) у HEL

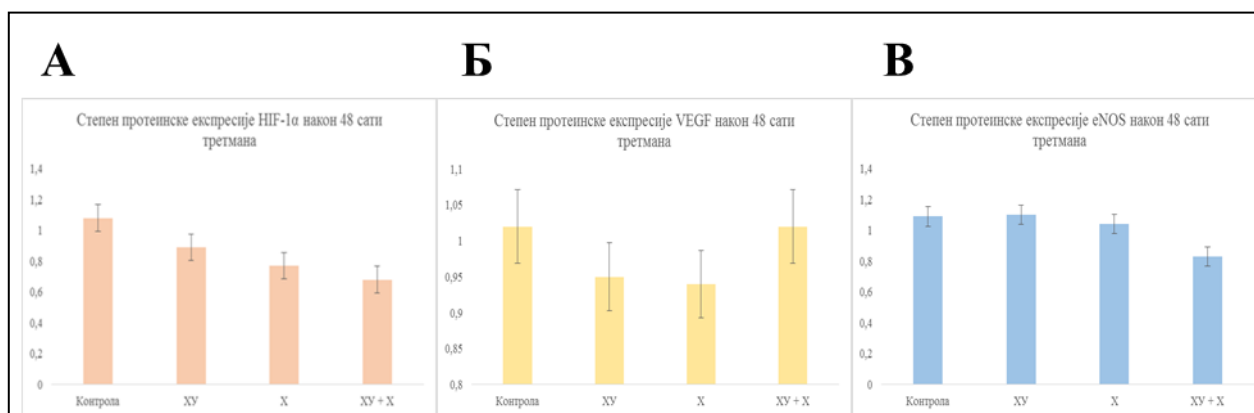
ћелијама (ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



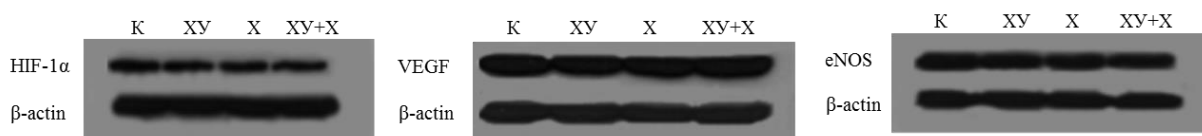
Слика 21. Експресија HIF-1 α , VEGF, eNOS и β -актина у HEL ћелијама након 24 сата третмана (К-контрола, ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.10.4. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 48 сати третмана добијен применом *Western blot* методе

Western blot анализа степена протеинске експресије сва три ангиогена фактора у HEL ћелијама након 48 сати третмана је показала да долази до смањења степена њихове експресије у свим групама. Међутим, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије у односу на контролну групу (Графикон 44, Слика 22).



Графикон 44. Протеинска експресија HIF-1 α (А), VEGF (Б) и eNOS (В) након 48 сати третмана са хидроксиурејом (100 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



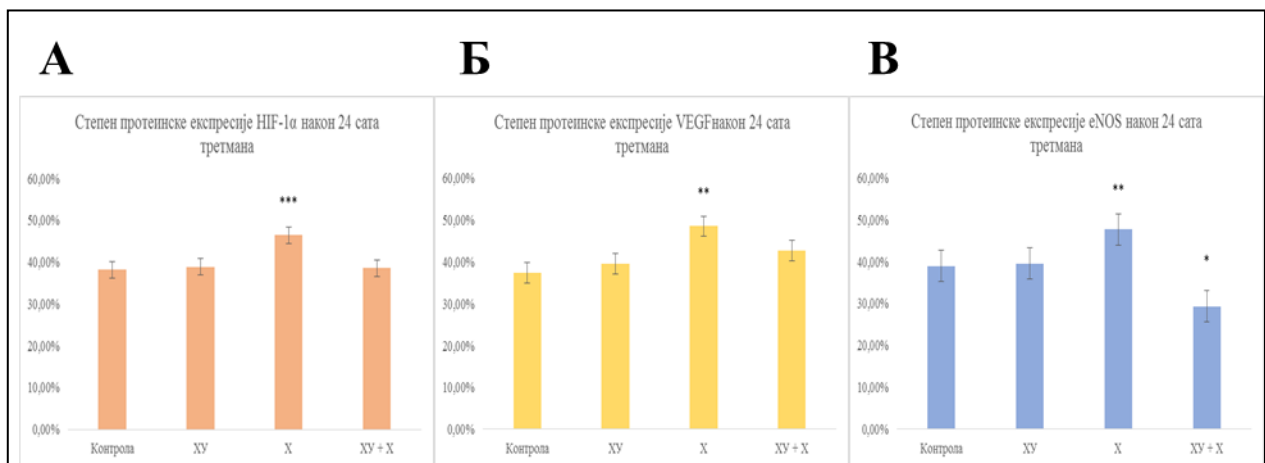
Слика 22. Експресија HIF-1 α , VEGF, eNOS и β -актина у HEL ћелијама након 48 сати третмана (К-контрола, ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.10.5. Степен протеинске експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана добијен применом имуноцитохемијске методе

Испитивање експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS имуноцитохемијском методом рађено је на цитоспин препаратима HEL ћелија. Имуноцитохемијска анализа степена експресије HIF-1 α након 24 сата третмана показала је значајно повећање експресије овог фактора код HEL ћелија које су третиране само хидроксиурејом (**p<0,001). Код осталих група, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у експресији HIF-1 α у односу на контроле (Графикон 45А).

Експресија VEGF такође је значајно повећана код HEL ћелија које су третиране само хидроксиурејом (**p<0,01), док код осталих група нема значајне разлике у односу на контролу у погледу експресије овог фактора (Графикон 45Б).

Имуноцитохемијска анализа степена експресије eNOS је показала значајно повећање експресије код ћелија које су третиране само са хидроксиурејом (**p<0,01). Међутим, код ћелија које су третиране са хидроксиурејом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном дошло је до значајног смањења експресије eNOS у односу на контролу (*p<0,05) (Графикон 45В).



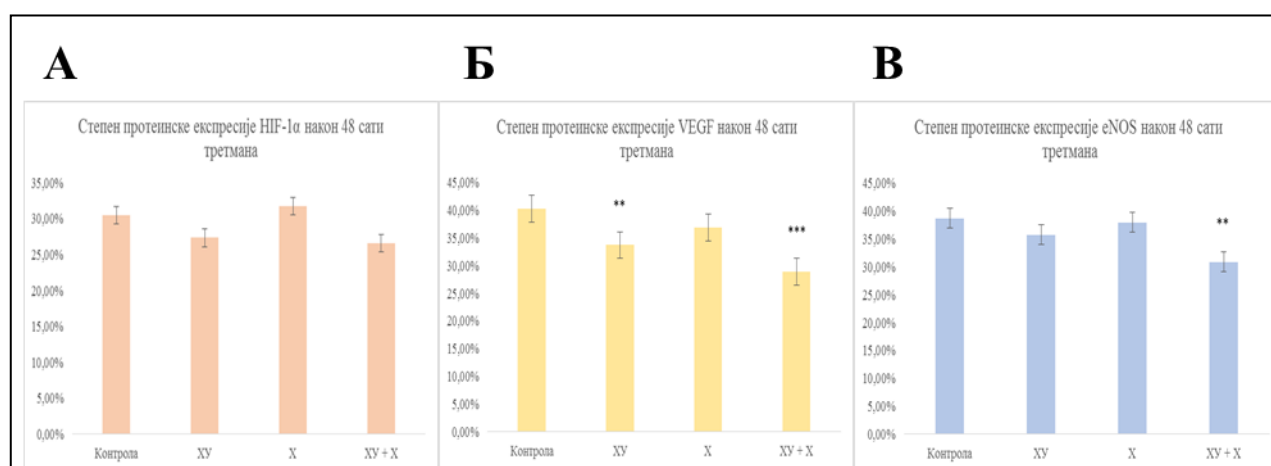
Графикон 45. Протеинска експресија HIF-1 α (А), VEGF (Б) и eNOS (В) након 24 сата третмана са хидроксиурејом (100 μ М) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ М) у HEL ћелијама (XУ-хидроксиуреја, X-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

4.10.6. Степен протеинске експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS након 48 сати третмана добијен применом имуноцитохемијске методе

Имуноцитохемијска анализа степена експресије HIF-1 α након 48 сати третмана показала је да не постоји статистички значајна разлика у погледу експресије HIF-1 α између третираних HEL ћелија и контрола (Графикон 46А).

Анализа експресије VEGF показала је значајно смањење овог фактора код ћелија које су третиране само хидроксиурејом (** $p < 0,01$), као и код ћелија које су третиране са хидроксиурејом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (** $p < 0,001$) (Графикон 46Б).

Анализа експресије eNOS значајно је смањена код ћелија које су третиране комбинацијом хидроксиуреје и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (** $p < 0,01$) док код осталих третираних ћелија статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у експресији eNOS у односу на контролу (Графикон 46В).



Графикон 46. Протеинска експресија HIF-1 α (А), VEGF (Б) и eNOS (В) након 48 сати третмана са хидроксиурејом (100 μ М) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ М) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреја, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)(** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

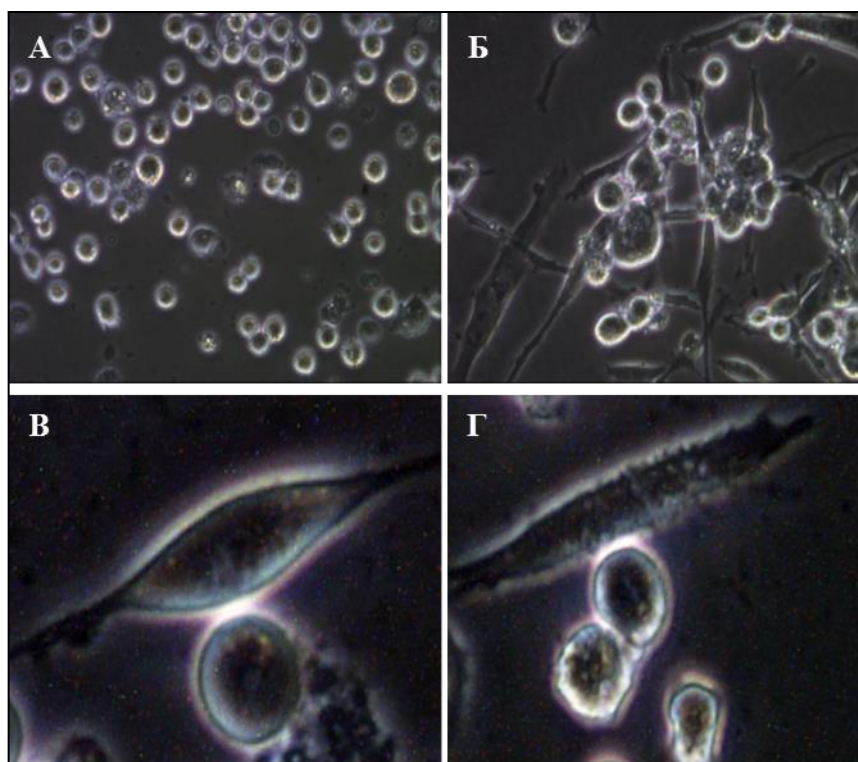
4.11 Степен протеинске експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6

С обзиром на то да је показано да су ендогени нивои IL-6 повећани код пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом као и да постоји позитивна корелација између IL-

6 и ангиогенезе у костној сржи МПН пацијената, наш циљ је био да утврдимо утицај овог цитокина на степен експресије ангиогених фактора код HEL ћелија које поседују JAK2V617F мутацију и у диференцираним макрофазима.

4.11.1. Диференцирање HEL ћелија у макрофаге

Да би испитали утицај IL-6 као и JAK инхибитора на степен експресије ангиогених фактора али и на активацију пролиферативних сигналних путева код макрофага, извршили смо диференцирање HEL ћелија.



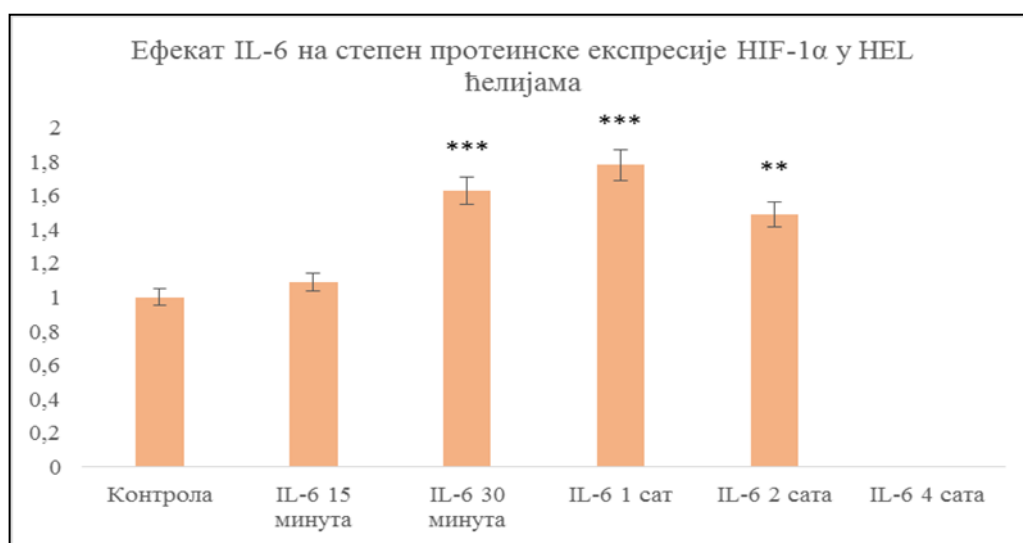
Слика 23. HEL ћелије у суспензији пре и након третмана са ТРА. Контролне HEL ћелије које расту слободно у суспензији (А) (x10) 72 сата након третмана са ТРА, већина ћелија чврсто пријања за подлогу и показује значајно ширење цитоплазме (Б) (x10); издвојени макрофаги (В, Г)(x40)

4.11.2. Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана са IL-6 добијен применом *Western blot* методе

Како би испитали утицај IL-6 на степен експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS фактора у HEL ћелијама извршили смо култивисање са или без IL-6 у току различитог временског периода – 15 минута, 30 минута, 1 сат, 2 сата и 4 сата, и након истека

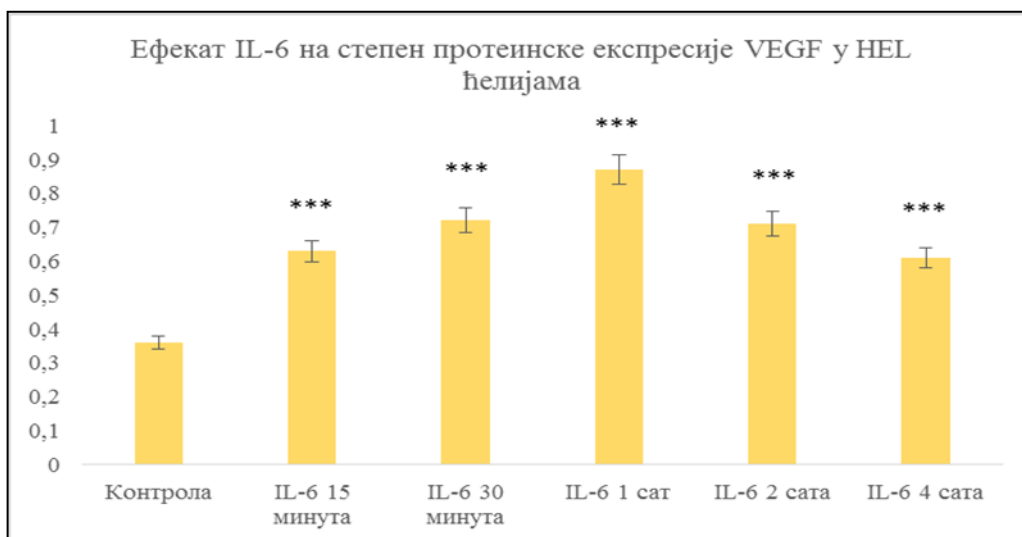
третмана одређивали степен протеинске експресије наведених фактора *Western blot* методом.

Испитивање степена експресије HIF-1 α је показало да након 15 минута третмана са IL-6 не долази до значајне промене у степену експресије овог фактора у односу на контроле. До значајног повећање експресије HIF-1 α долази након третмана у трајању од 30 минута и третмана у трајању од једног сата (**p<0,001), као и након 2 сата третмана (**p<0,01). Након 4 сата третмана, експресија HIF-1 α није детектована (Графикон 47, Слика 24).



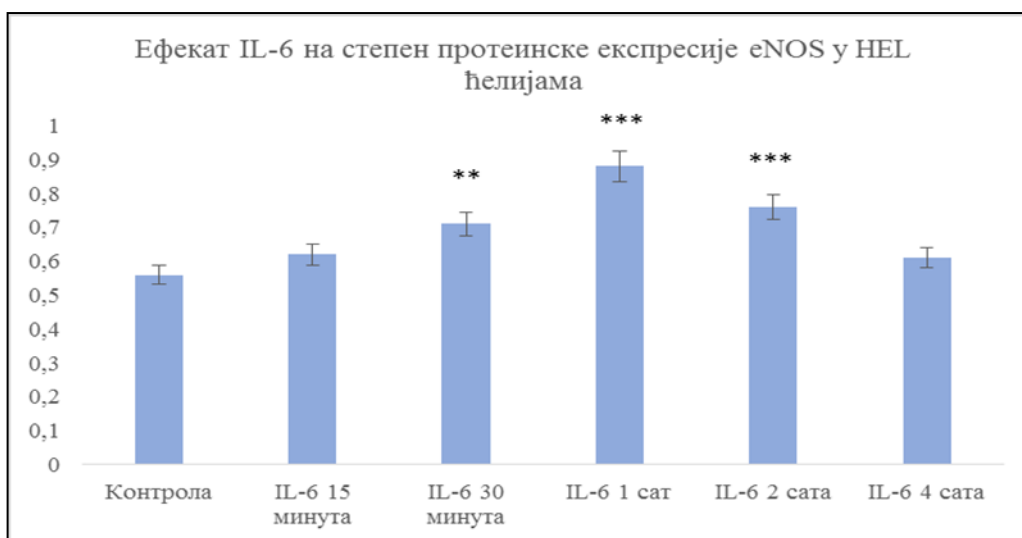
Графикон 47. Експресија HIF-1 α протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала (**p<0,01; ***p<0,001). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Испитивање степена експресије VEGF након третмана HEL ћелија са IL-6 показало је да долази до значајног повећања степена протеинске експресије овог ангиогеног фактора под утицајем IL-6, независно од дужине трајања третмана у односу на контроле (**p<0,001) (Графикон 48, Слика 24).

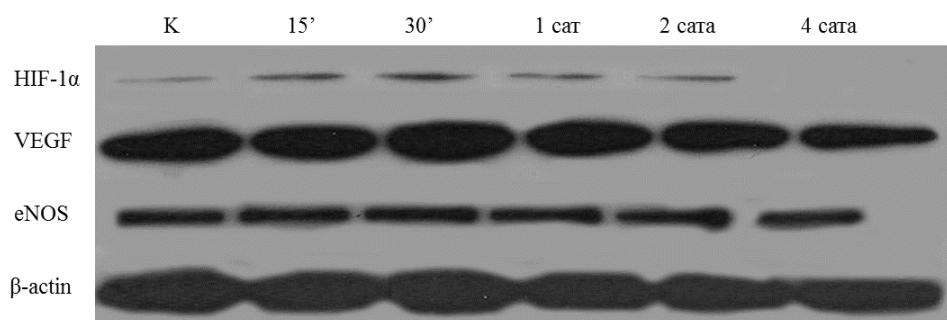


Графикон 48. Протеинска експресија VEGF у HEL ћелијама након третмана са IL-6 у току различитог временског периода (***) $p < 0,001$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Анализа степена експресије eNOS након третмана са IL-6, показала је да се значајно повећање експресије овог фактора дешава већ после 30 минута од третмана са IL-6 (** $p < 0,01$). Највећи ниво експресије дешава се после једног сата и два сата након третмана (***) $p < 0,001$). Четири сата након третмана, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије eNOS у односу на контролу (Графикон 49, Слика 24).



Графикон 49. Експресија eNOS протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала (** $p < 0,01$; ***) $p < 0,001$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

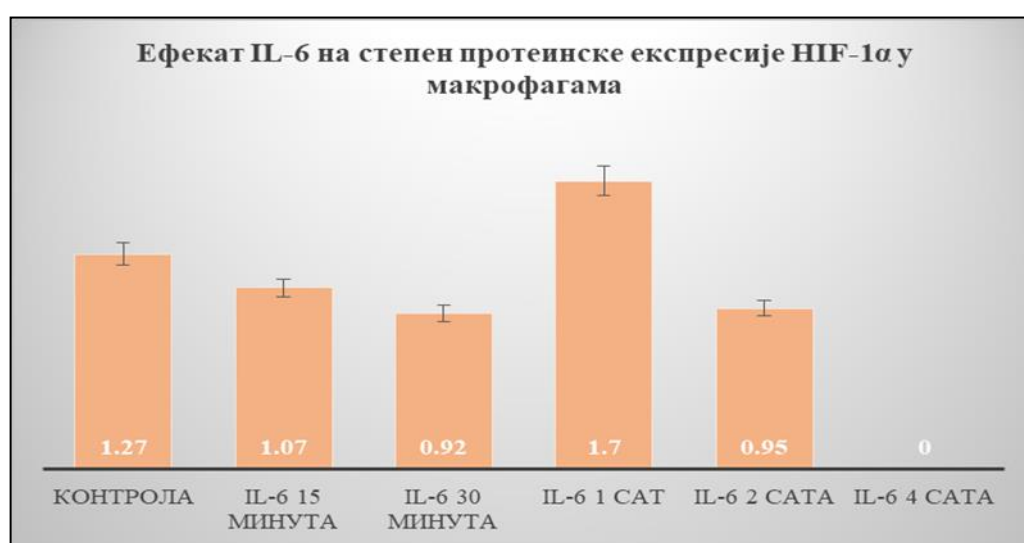


Слика 24. Експресија HIF-1 α , VEGF, eNOS и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала

4.11.3. Степен експресије ангиогених фактора у макрофагама добијен применом *Western blot* методе

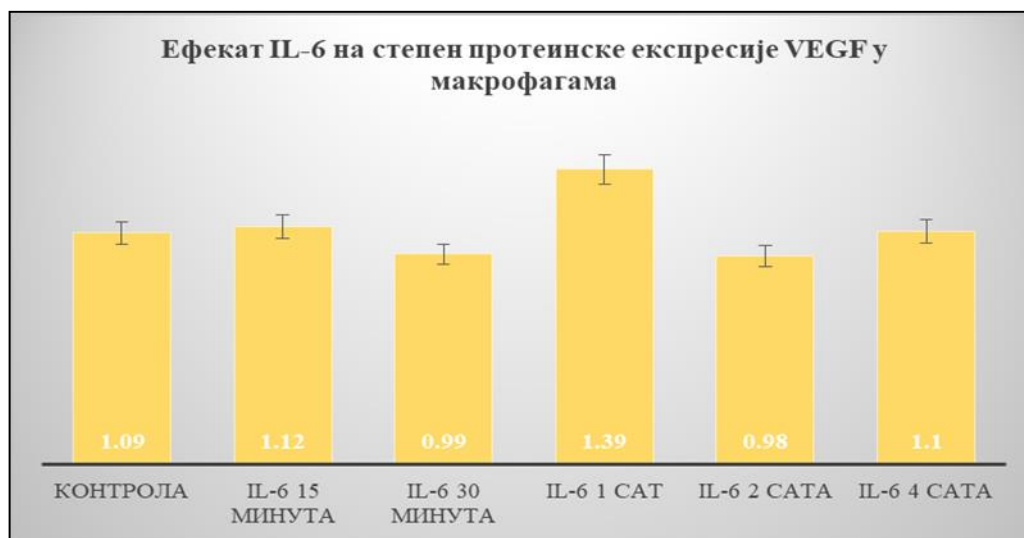
У циљу испитивања потенцијалног ефекта IL-6 на степен експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS, HEL ћелије су диференциране у макрофаге и култивисане са или без IL-6 у току различитих временских периода – 15 минута, 30 минута, 1 сат, 2 сата и 4 сата, и након истека третмана одређиван је степен протеинске експресије наведених фактора *Western blot* методом.

Анализа експресије HIF-1 α у макрофагама након третмана са IL-6 је показала да до повећања експресије овог фактора долази само после третмана у трајању од једног сата, док после четири сата третмана, експресија HIF-1 α није детектована. Међутим, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика ни код једне групе третираних ћелија у односу на контроле (Графикон 50, Слика 25).



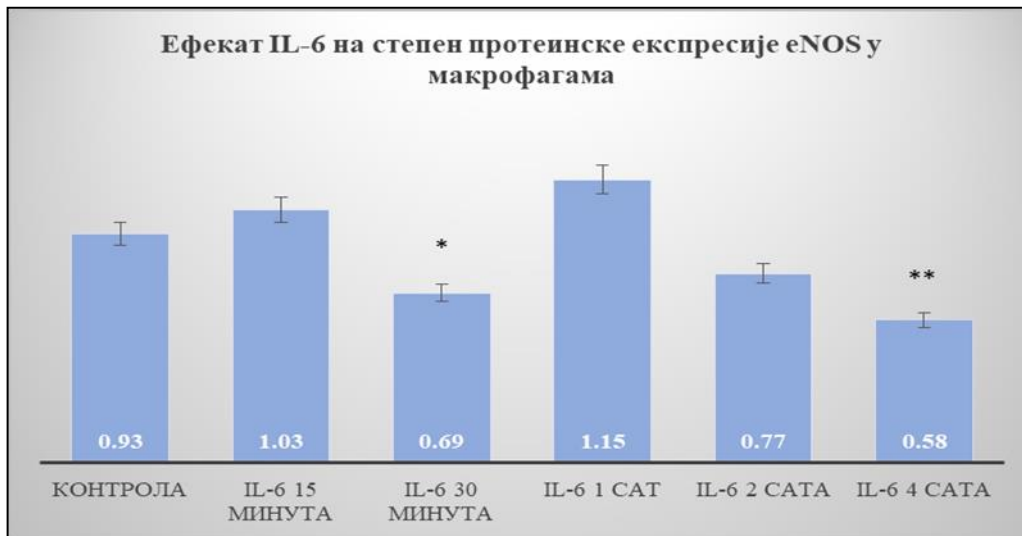
Графикон 50. Експресија HIF-1 α протеина у макрофагама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала. Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Анализа степена експресије VEGF у макрофагама је показала да и у случају овог ангиогеног фактора не постоји значајна разлика у степену експресије између третираних ћелија и контрола (Графикон 51, Слика 25).

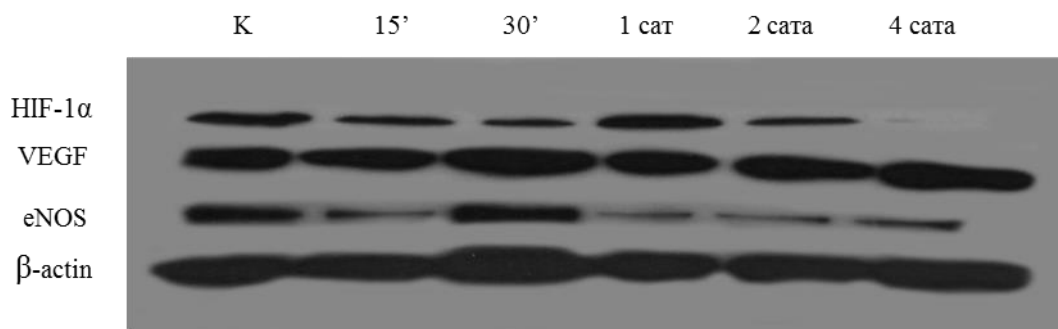


Графикон 51. Експресија VEGF протеина у макрофагама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала. Резултати су нормализовани у односу на β -актин

Анализа експресије eNOS фактора код макрофага показала је да након третмана ових ћелија са IL-6 у трајању од 15 минута и једног сата долази до повећане експресије овог фактора за које међутим статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на контроле. У случају осталих временских третмана долази до смањене експресије eNOS која је највише изражена након третмана од 30 минута (* $p < 0,05$) и 4 сата (** $p < 0,01$) (Графикон 52, Слика 25).



Графикон 52. Експресија eNOS протеина у макрофагама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



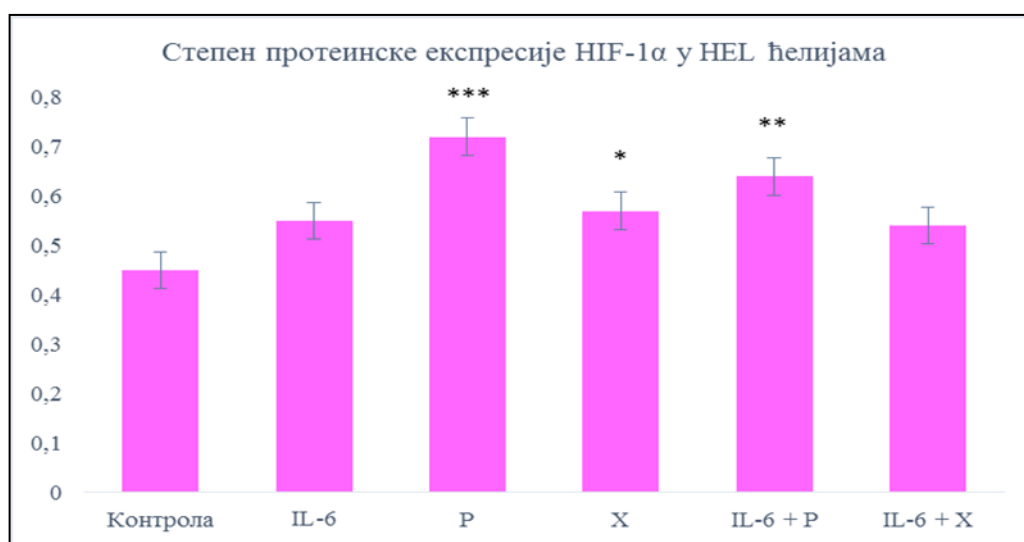
Слика 25. Експресија HIF-1 α , VEGF, eNOS и β -актина у макрофагама након третмана са IL-6 у пет различитих временских интервала

4.12 Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима

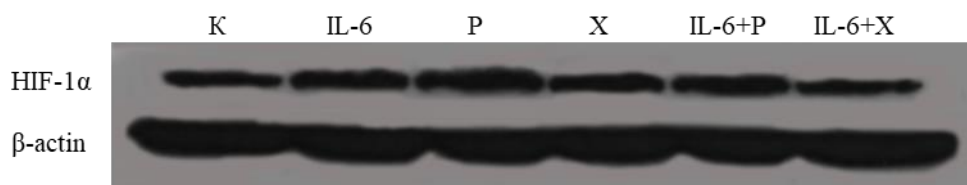
Како би испитали потенцијални ефекат два ЈАК инхибитора, самостално или у комбинацији са IL-6, на степен експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS протеина у HEL ћелијама и макрофагама извршили смо неколико различитих експеримената.

4.12.1. Степен експресије ангиогених фактора у HEL 92.1.7 ћелијама након третмана са IL-6, руксолитинибом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном

Анализа степена експресије HIF-1 α у HEL ћелијама показује значајно повећање експресије овог фактора након третмана са руксолитинибом (***) $p < 0,001$), након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (* $p < 0,05$), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (** $p < 0,01$). Након третмана само са IL-6 или са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана, забележена је повећана експресија HIF-1 α у односу на контроле али статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика (Графикон 53, Слика 26).



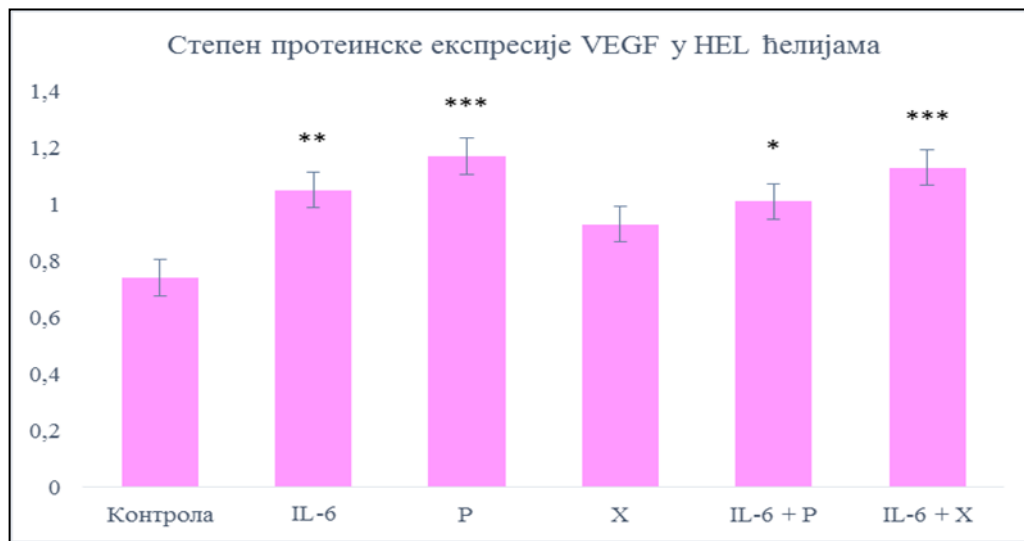
Графикон 53. Експресија HIF-1 α протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



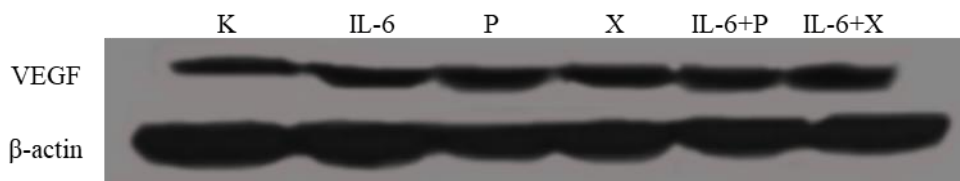
Слика 26. Експресија HIF-1 α и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Анализа степена експресије VEGF протеина је показала да до највећег повећања експресије овог фактора долази након третмана HEL ћелија са руксолитинибом

(*** $p < 0,001$), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (** $p < 0,001$). Такође, значајно повећање експресије VEGF уочено је и после третмана само са IL-6 (** $p < 0,01$), као и после третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (* $p < 0,05$). Након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у експресији VEGF у односу на контроле (Графикон 54, Слика 27).



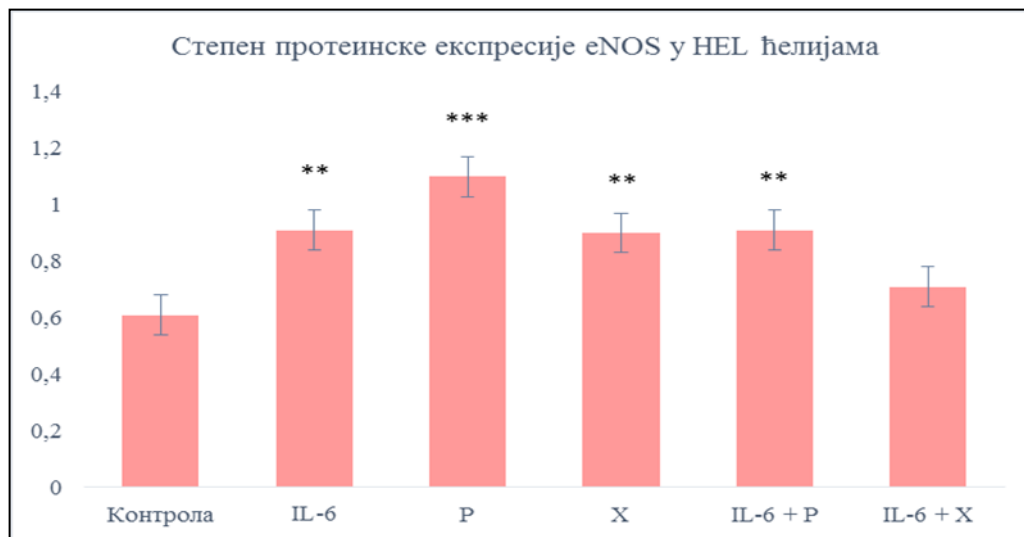
Графикон 54. Експресија VEGF протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



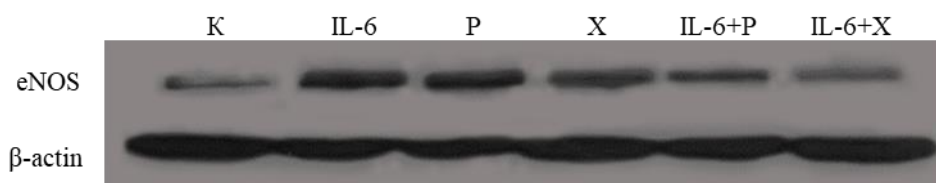
Слика 27. Експресија VEGF и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Анализа степена експресије eNOS је показала да до највећег повећања експресије овог фактора долази након третмана са руксолитинибом (** $p < 0,001$). Значајно повећање експресије такође се дешава и након третмана са IL-6 (** $p < 0,01$), након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (** $p < 0,01$), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (** $p < 0,01$). У HEL ћелијама које су третиране у

комбинацији са IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, статистичка анализа није показала да долази до значајног повећања експресије овог фактора у односу на контролу (Графикон 55, Слика 28).



Графикон 55. Експресија eNOS протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

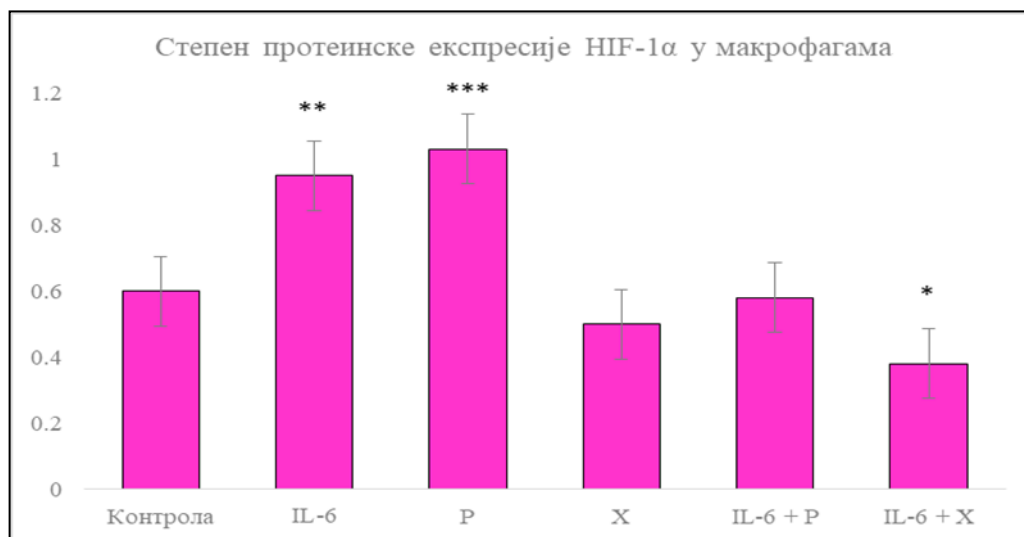


Слика 28. Експресија eNOS и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (K-контрола, P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

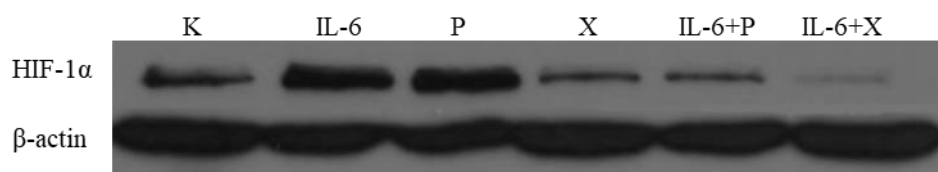
4.12.2. Степен експресије ангиогених фактора у макрофагама након третмана са IL-6, руксолитинибом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном

Анализа степена протеинске експресије HIF-1 α у макрофагама је показала да до значајног повећања експресије овог фактора долази у макрофагама које су третиране са руксолитинибом (*** $p < 0,001$) и IL-6 (** $p < 0,01$). Насупрот томе, код макрофага третираних са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана долази до значајног смањења експресије HIF-1 α (* $p < 0,05$). У осталим групама, статистичка

анализа није показала значајну разлику у степену експресије HIF-1 α у односу на контроле (Графикон 56, Слика 29).

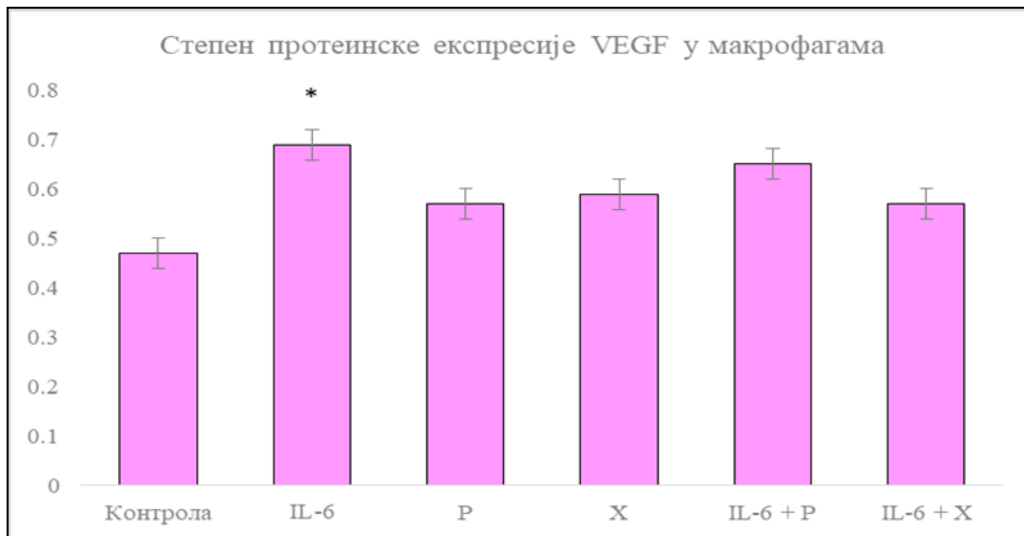


Графикон 56. Експресија HIF-1 α протеина у макрофагама након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

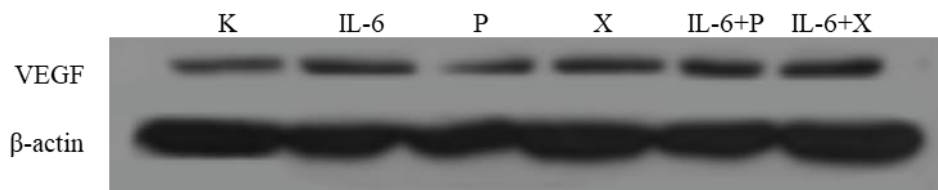


Слика 29. Експресија HIF-1 α и β -актина у макрофагама након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима (К-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Анализа степена експресије VEGF је показала да код свих макрофага долази до повећања експресије овог фактора у односу на контролу. Међутим, статистичка анализа је показала да је повећање експресије значајно једино након третмана са IL-6 (* $p < 0,05$) (Графикон 57, Слика 30).

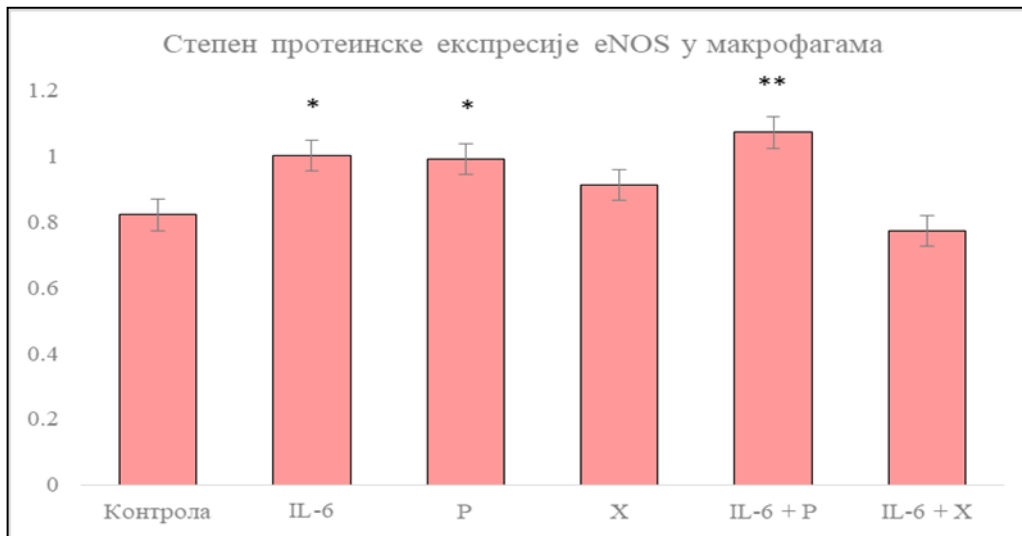


Графикон 57. Експресија VEGF протеина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин

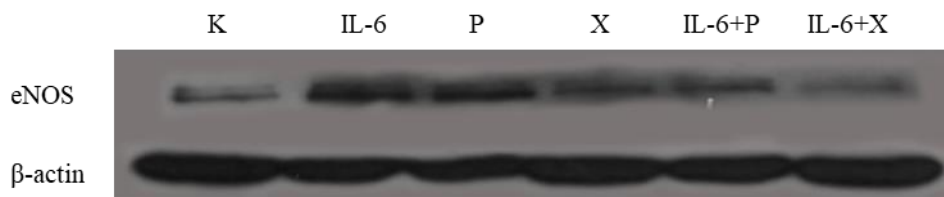


Слика 30. Експресија VEGF и β -актина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (K-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Анализа степена експресије eNOS је показала да до највећег повећања експресије овог фактора у макрофагама долази након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (** $p < 0,01$), као и након третмана само са IL-6 (* $p < 0,05$) или само са руксолитинибом (* $p < 0,05$). У осталим групама, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у степену експресије eNOS у односу на контролу (Графикон 58, Слика 31).



Графикон 58. Експресија eNOS протеина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан). Резултати су нормализовани у односу на β -актин



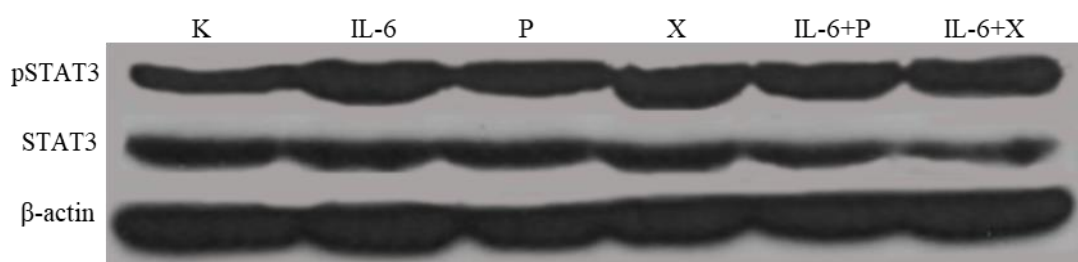
Слика 31. Експресија eNOS и β -актина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (K-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.13 Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у HEL 92.1.7 ћелијама и макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима

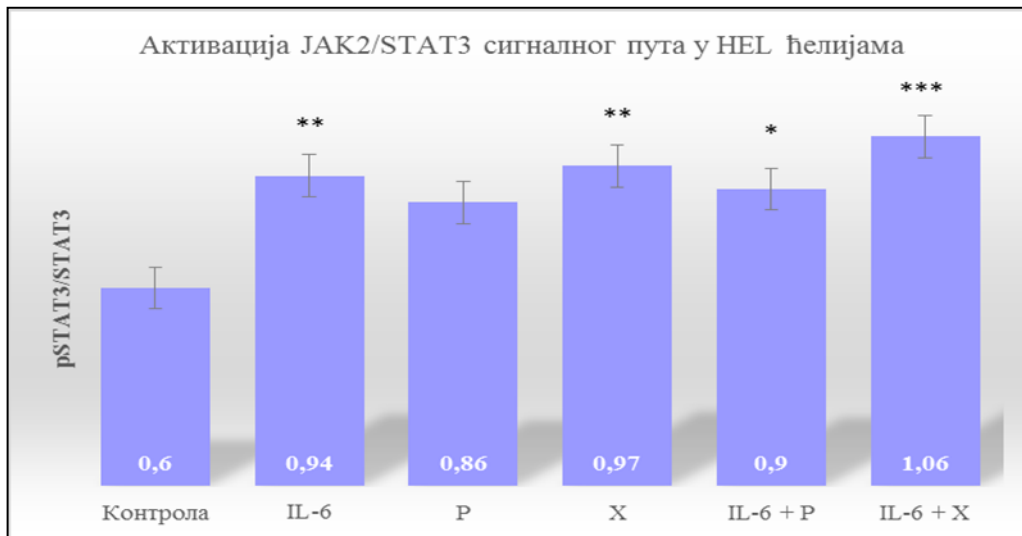
Имајући у виду чињеницу да IL-6 представља цитокин који регулише бројне ћелијске функције као што су пролиферација, активација и диференцијација, у студији је испитиван његов потенцијални ефекат, самостално или у комбинацији са JAK инхибиторима, на JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналне путеве, у HEL ћелијама и макрофагама, за које је познато да могу бити укључени у туморску ангиогенезу.

4.13.1. Активација ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у HEL 92.1.7 ћелијама

У HEL ћелијама испитивана је експресија фосфорилисаног и укупног STAT3 протеина ЈАК2/STAT3 сигналног пута. У свим HEL ћелијама, контролама и оним третираним са IL-6 и ЈАК инхибиторима, показана је јасна експресија фосфорилисаног STAT3 протеина (Слика 32). Квантификацијом протеина показано је да је у свим ћелијама дошло до повећане активности ЈАК2/STAT3 сигналног пута која је најизраженија у HEL ћелијама третираним са IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном (** $p < 0,001$), само са IL-6 или само са 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном (** $p < 0,01$), као и након третмана са IL-6 и руксолитинибом (* $p < 0,05$). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина (Графикон 59).

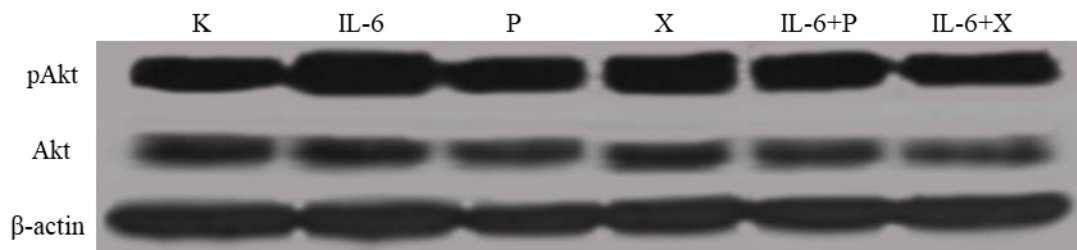


Слика 32. Експресија pSTAT3, STAT3 протеина и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима (K-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

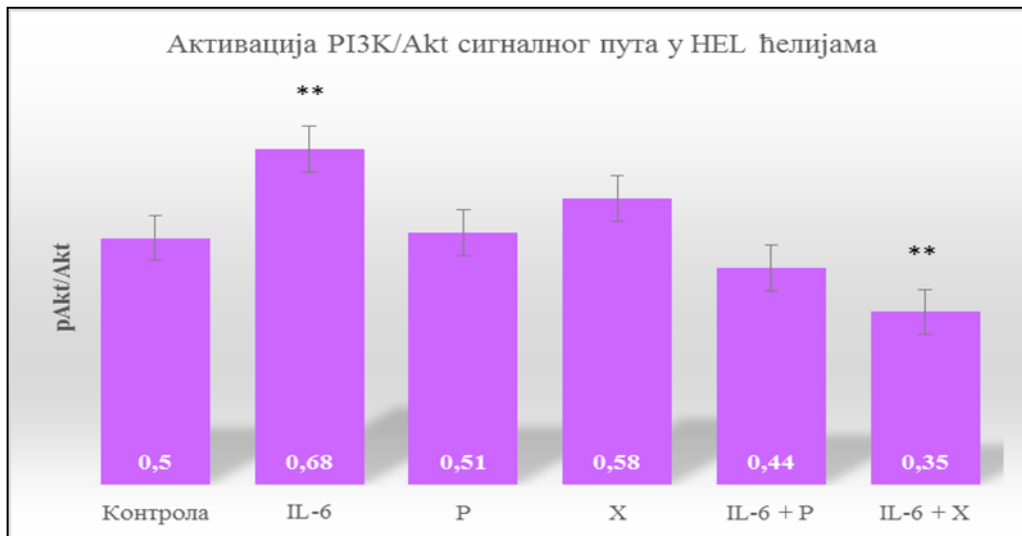


Графикон 59. Однос нивоа експресије pSTAT3/STAT3 протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

Други значајан пут је PI3K/Akt сигнални пут. У HEL ћелијама испитивана је експресија фосфорилисаног и укупног Akt протеина овог сигналног пута. У свим HEL ћелијама показана је јасна експресија фосфорилисаног Akt протеина (Слика 33). Анализом степена експресије протеина је показано да до значајног повећања активности PI3K/Akt пута долази у ћелијама третираним са IL-6 (** $p < 0,01$), док је у ћелијама третираним са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном, дошло до значајног смањења активности PI3K/Akt пута (** $p < 0,01$). У осталим групама, анализом експресије протеина, није пронађена статистички значајна разлика у односу на β -актин који је коришћен као контрола концентрације стављених протеина (Графикон 60).

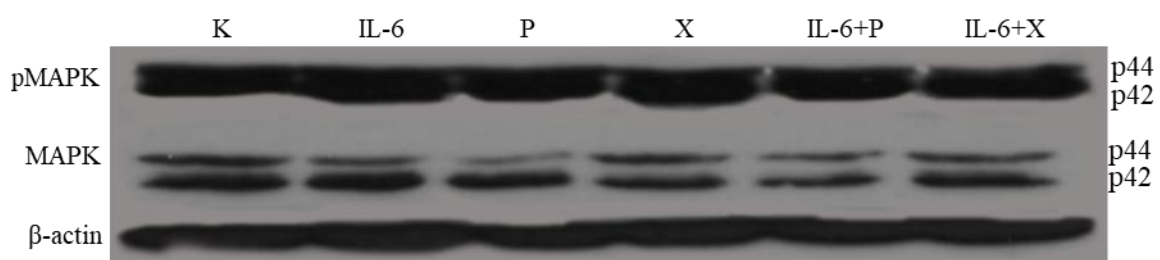


Слика 33. Експресија pAkt, Akt протеина и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

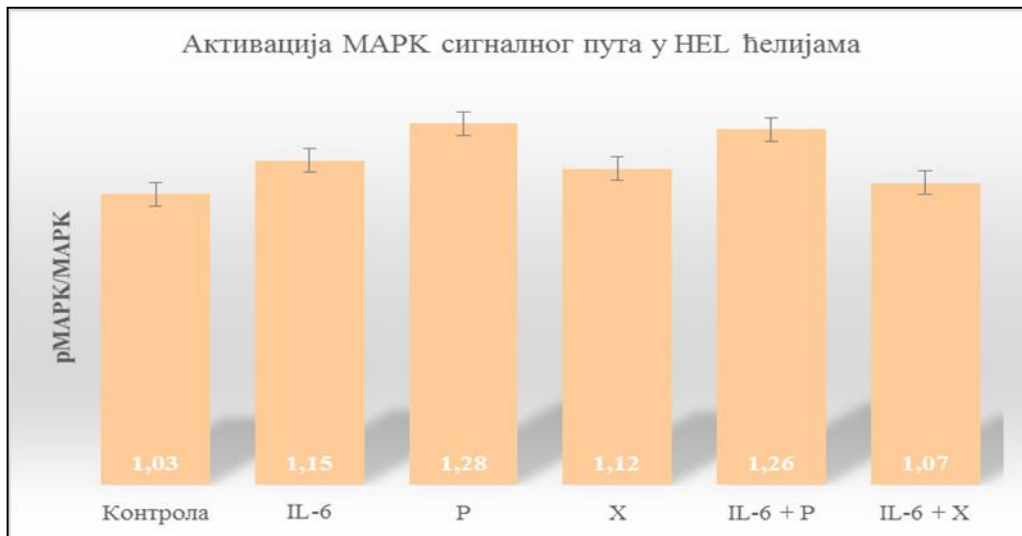


Графикон 60. Однос нивоа експресије pAkt/Akt протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (** $p < 0,01$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

Резултати су такође показали да постоји појачана активност MAPK пута у свим HEL ћелијама (Слика 34). Међутим, када су сабране обе форме MAPK протеина (p44/p42), није пронађена статистички значајна разлика између третираних HEL ћелија и контрола у активацији MAPK пута. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина. (Графикон 61).



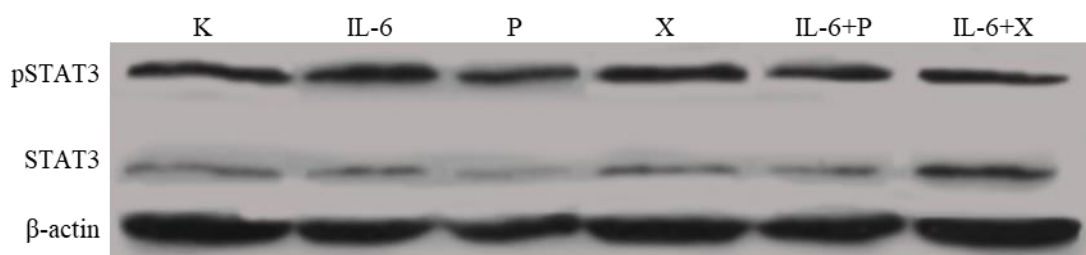
Слика 34. Експресија pMAPK, MAPK протеина и β -актина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)



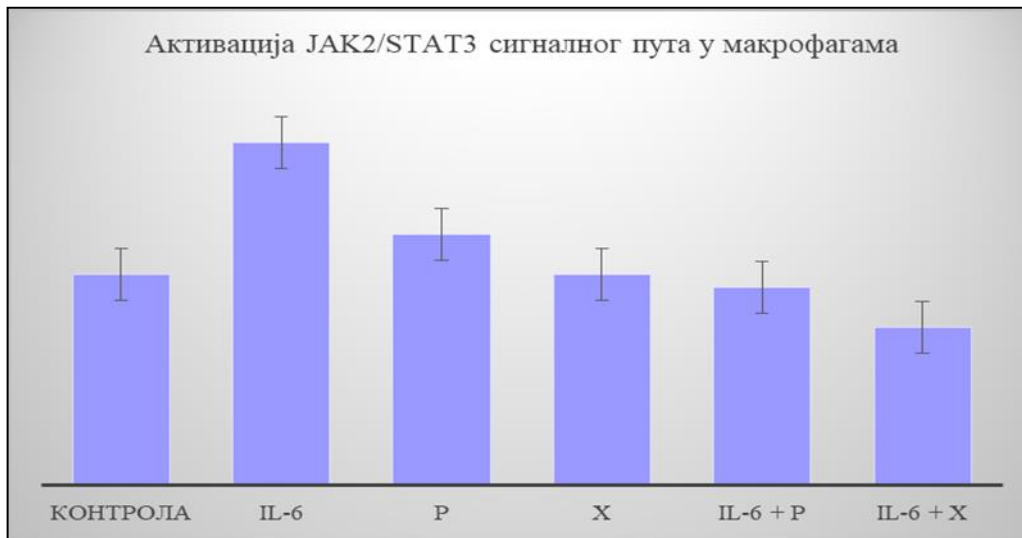
Графикон 61. Однос нивоа експресије pMAPK/MAPK протеина у HEL ћелијама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.13.2. Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева у макрофагама

У макрофагама, као и у HEL ћелијама, испитивана је активација JAK2/STAT3 сигналног пута. Праћена је експресија фосфорилисаног и укупног STAT3 протеина. У свим макрофагама, контролама и третираним са IL-6 и JAK инхибиторима, показана је јасна експресија фосфорилисаног STAT3 протеина (Слика 35). Међутим, квантификацијом експресије протеина није пронађена статистички значајна разлика између третираних макрофага и контрола. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина. (Графикон 62).

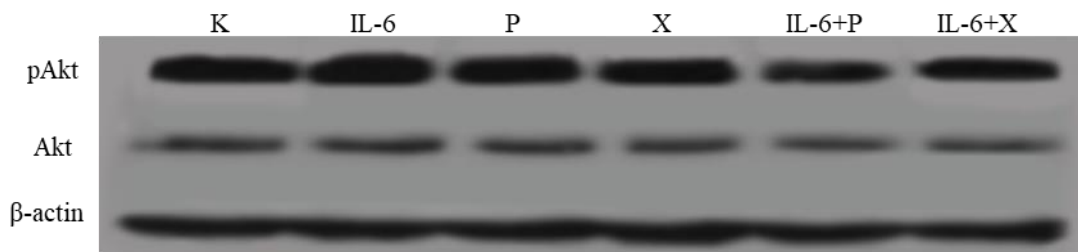


Слика 35. Експресија pSTAT, STAT протеина и β -актина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (K-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

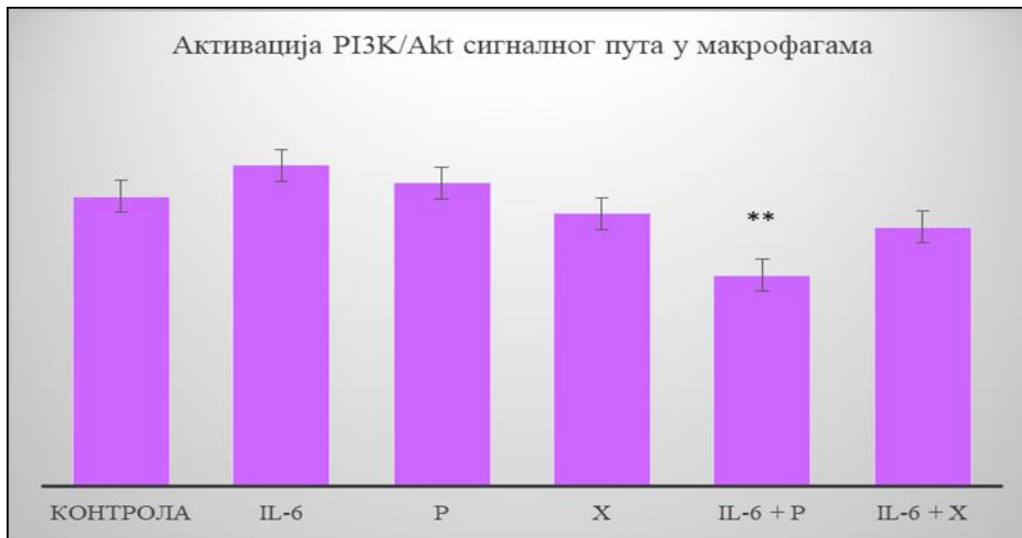


Графикон 62. Однос нивоа експресије pSTAT3/STAT3 протеина у макрофагама након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (Р-руксолитиниб, Х - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Поред тога, испитивана је експресија фосфорилисаног и укупног Akt протеина PI3K/Akt сигналног пута. У свим макрофагама је показана јасна експресија фосфорилисаног Akt протеина (Слика 36). Одређивањем нивоа експресије протеина, показано је да до значајног смањења активности PI3K/Akt сигналног пута долази у макрофагама које су третмане са ИЛ-6 у комбинацији са руксолитинибом (** $p < 0,01$). У осталим групама, одређивањем нивоа експресије протеина, није пронађена статистички значајна разлика. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина (Графикон 63).

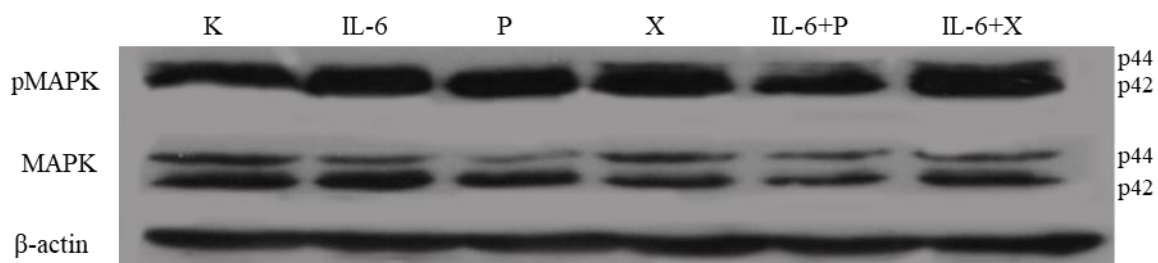


Слика 36. Експресија pAkt, Akt протеина и β -актина у макрофагама након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (К-контрола, Р- руксолитиниб, Х- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

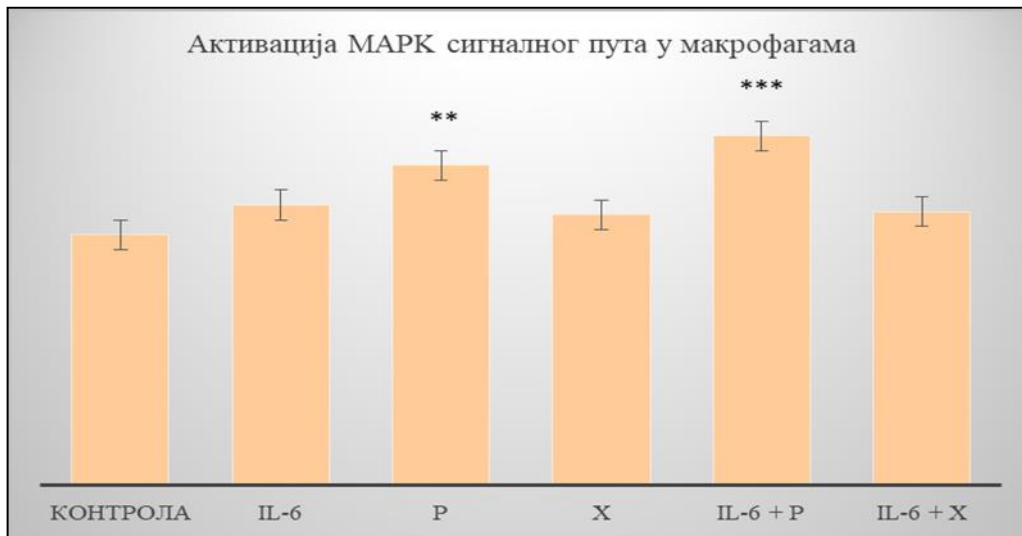


Графикон 63. Однос нивоа експресије pAkt/Akt протеина у макрофагама након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (** $p < 0,01$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

Испитивање активације MAPK сигналног пута у макрофагама показало је да постоји појачана активност овог пута (Слика 37). Одређивањем нивоа експресије протеина, када су сабране обе форме MAPK протеина (p44/p42), показала је да до значајног повећања активности MAPK пута долази у макрофагама које су третиране са IL-6 у комбинацији са руксолитинибом (** $p < 0,001$), као и у макрофагама које су третиране само са руксолитинибом (** $p < 0,01$). У осталим групама, одређивањем нивоа експресије протеина, није пронађена статистички значајна разлика. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина (Графикон 64).



Слика 37. Експресија pMAPK, MAPK протеина и β -актина у макрофагима након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P- руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)



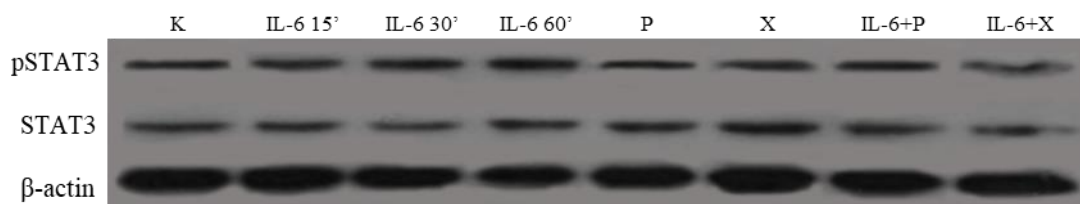
Графикон 64. Однос нивоа експресије рМАРК/МАРК протеина у макрофазима након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.14 Активација ЈАК2/СТАТ3, PI3K/Akt и МАРК сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима

Поред испитивања ефеката ИЛ-6 и ЈАК инхибитора на моделима хуманих ћелија, циљ ове студије био је да се истовремено испита њихов утицај на могућу активацију сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената у *in vitro* условима. Гранулоцити су третиран са ИЛ-6 у различитом временском периоду (15 минута, 30 минута, 1 сат), као и комбинацијом ИЛ-6 и ЈАК инхибитора у трајању 1 сата.

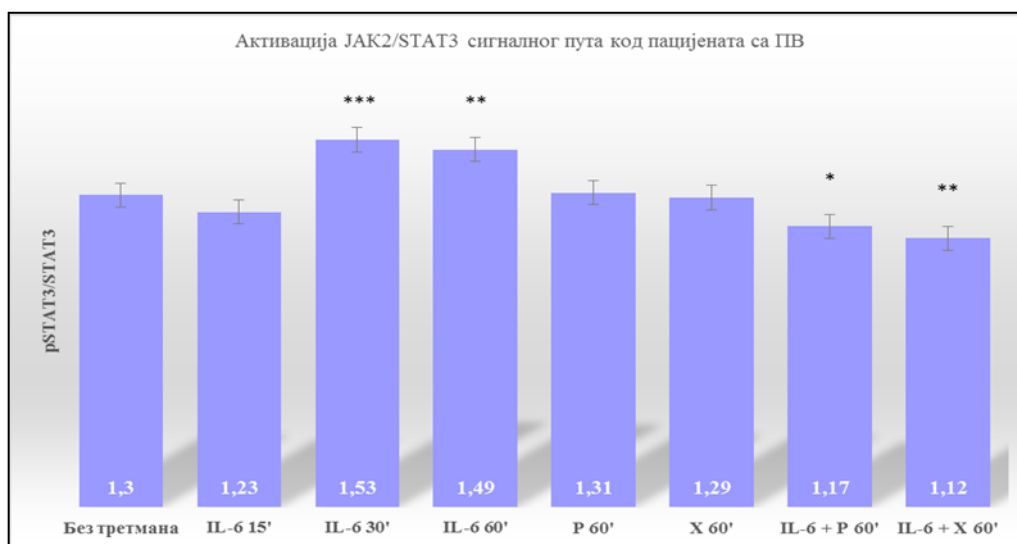
4.14.1. Активација ЈАК2/СТАТ3, PI3K/Akt и МАРК сигналних путева код пацијената са ПВ дијагнозом

У гранулоцитима пацијената са ПВ дијагнозом, најпре је испитивана експресија фосфорилисаног и укупног СТАТ3 протеина ЈАК2/СТАТ3 сигналног пута. У свим гранулоцитима, контролама и третираним са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима показана је јасна експресија фосфорилисаног СТАТ3 протеина (Слика 38). Одређивањем нивоа



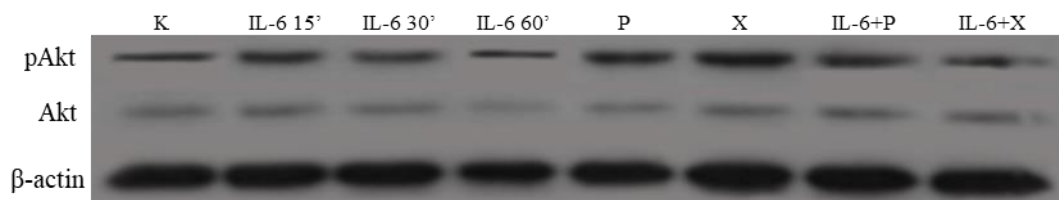
Слика 38. Western blot STAT протеина. Експресија STAT протеина и β -актина у гранулоцитима пацијената са ПВ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, Р- руксолитиниб, Х- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

експресије протеина показано је да до значајног повећања активности овог пута долази након третмана са IL-6 у трајању од 30 минута ($***p < 0,001$) и једног сата ($**p < 0,01$). Насупрот томе, до значајног смањења активности JAK2/STAT3 сигналног пута долази након третмана са IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном ($**p < 0,01$), као и након третмана са IL-6 и руксолитинибом ($*p < 0,05$). У осталим групама, статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у односу на не третиране гранулоците. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина. (Графикон 65).



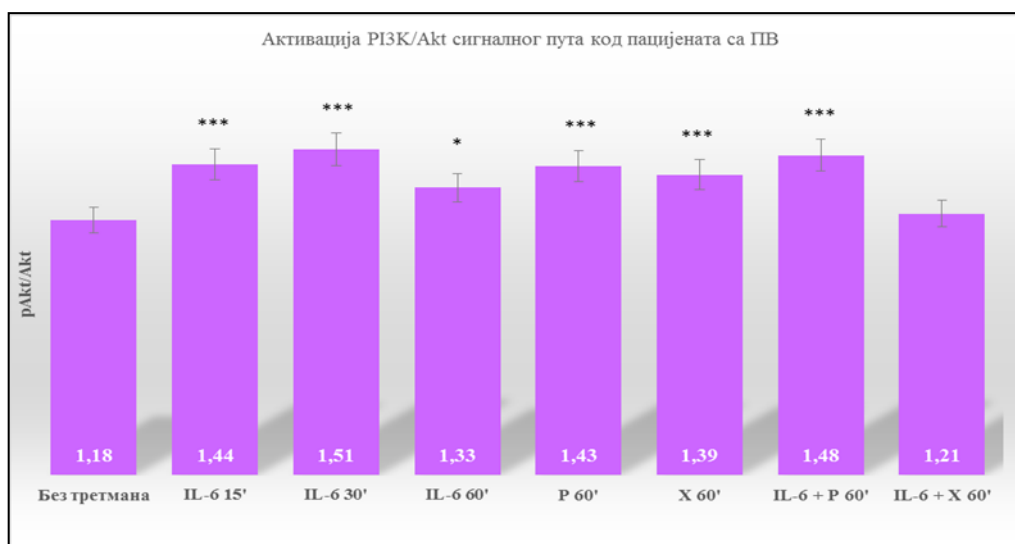
Графикон 65. Однос нивоа експресије pSTAT3/STAT3 протеина код пацијената са ПВ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, Х - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Поред тога, испитивана је експресија фосфорилисаног и укупног Akt протеина PI3K/Akt сигналног пута. У свим гранулоцитима показана је јасна експресија фосфорилисаног Akt протеина (Слика 39).



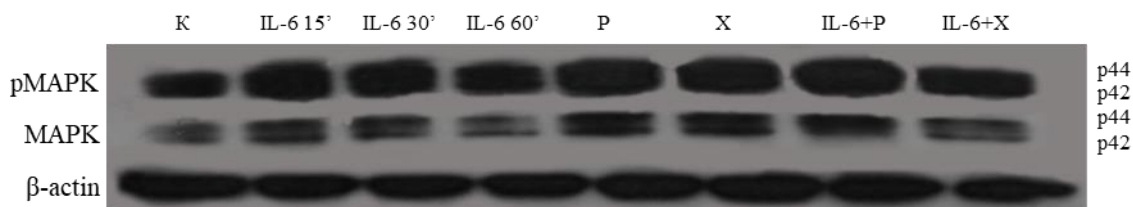
Слика 39. Експресија pAkt, Akt протеина и β -актина у гранулоцитима пацијената са ПИВ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, Р- руксолитиниб, Х- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Квантификацијом протеина, показано је да до значајног повећања активности овог пута долази у свим групама ($*p < 0,05$, $***p < 0,001$), са изузетком гранулоцита који су третирани са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана, где статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у активацији овог сигналног пута у односу на нетретиране ћелије. β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина (Графикон 66).



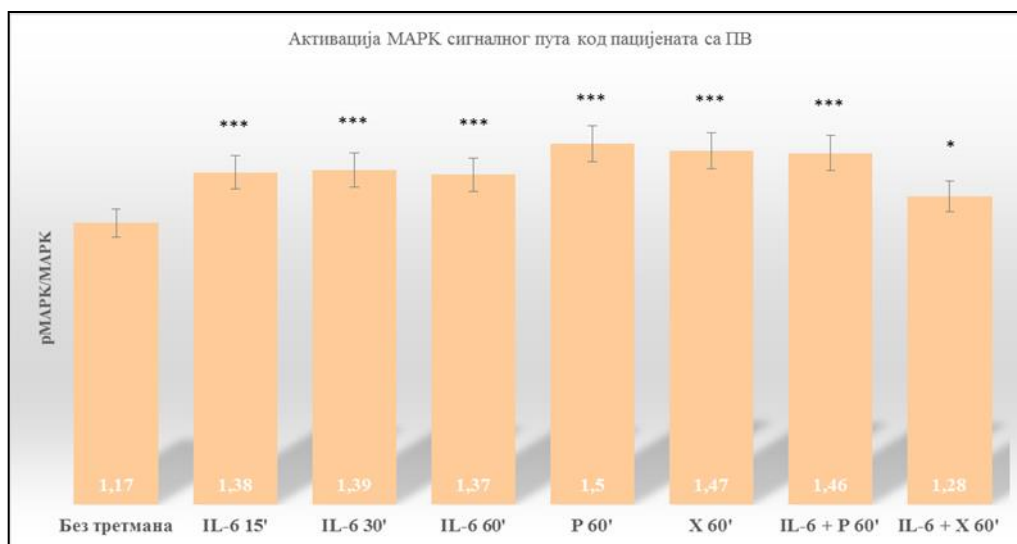
Графикон 66. Однос нивоа експресије pAkt/Akt протеина код пацијената са ПИВ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, Х - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Испитивање активације МАРК сигналног пута у гранулоцитима ПВ пацијената показало је да постоји стимулирана активност овог пута у свим ћелијама (Слика 40).



Слика 40. Експресија рМАРК, МАРК протеина и β -актина у гранулоцитима пацијената са ПВ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (К-контрола, Р-руксолитиниб, Х- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

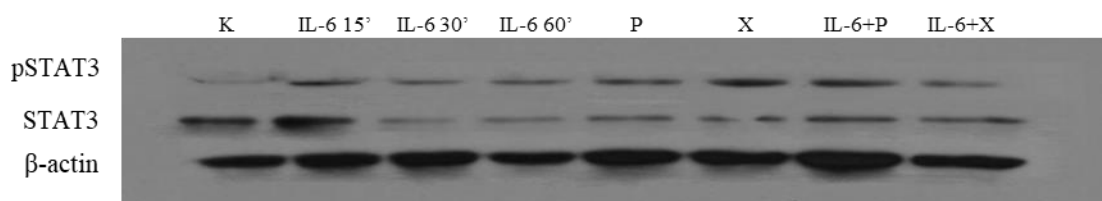
Одређивањем степена експресије протеина, када су сабране обе форме МАРК протеина (р44/р42), показала је да до значајног повећања активности МАРК пута долази код свих третираних гранулоцита у односу на нетретиране ($* < 0,05$, $*** p < 0,001$) (Графикон 67). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



Графикон 67. Однос нивоа експресије рМАРК/МАРК протеина код пацијената са ПВ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима ($* p < 0,05$; $*** p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, Х - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

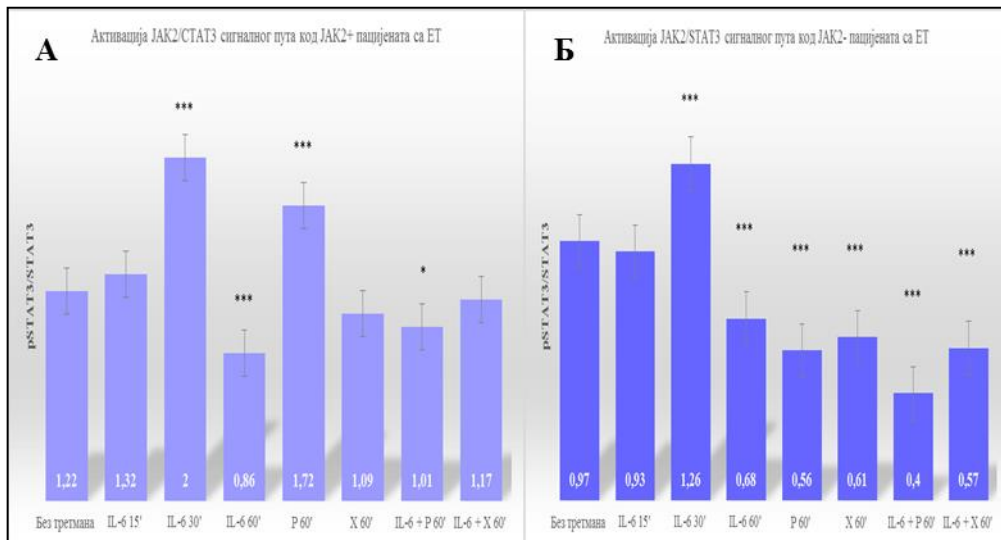
4.14.2. Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код пацијената са ЕТ дијагнозом

У гранулоцитима пацијената са ЕТ дијагнозом, испитивана је експресија фосфорилисаног и укупног STAT3 протеина JAK2/STAT3 сигналног пута. Активација овог пута праћена је истовремено код ЕТ пацијената који су JAK2+, као и код пацијената који су JAK2-. У свим гранулоцитима, контролним и третираним са IL-6 и JAK инхибиторима, показана је јасна експресија фосфорилисаног STAT3 протеина. Одређивањем нивоа експресије протеина код JAK2+ пацијената, показано је да постоји стимулисана активност овог пута у гранулоцитима третираним са IL-6 у трајању 30 минута (**p<0,001), као и након третмана са руксолитинибом у трајању од једног сата (**p<0,001). Насупрот томе, након третмана са IL-6 у трајању од 60 минута долази до значајног смањења активације овог пута (**p<0,001), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (*p<0,05) (Графикон 68А, Слика 41).



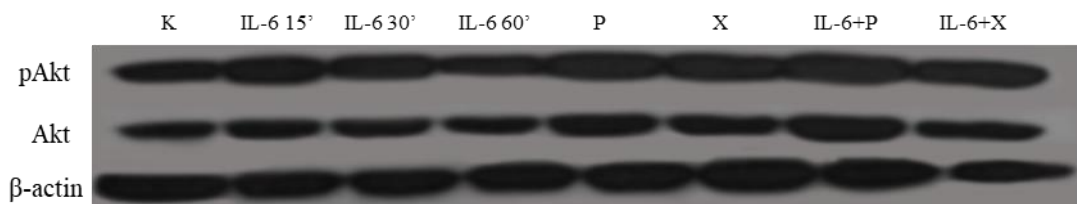
Слика 41. Експресија pSTAT, STAT протеина и β-актина у гранулоцитима JAK2+ пацијената са ЕТ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, Р-руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Код JAK2- пацијената долази до значајног повећања активности JAK2/STAT3 сигналног пута само у гранулоцитима третираним са IL-6 у трајању 30 минута (**p<0,001). У гранулоцитима који су третиран са IL-6 у трајању 15 минута, статистичка анализа није показала да има значајне разлике у активацији овог пута у односу на не третиране гранулоците. Код свих осталих третираних гранулоцита, одређивањем нивоа експресије протеина, показано је да постоји стимулисана активност овог пута (**p<0,001) (Графикон 68Б). β-актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



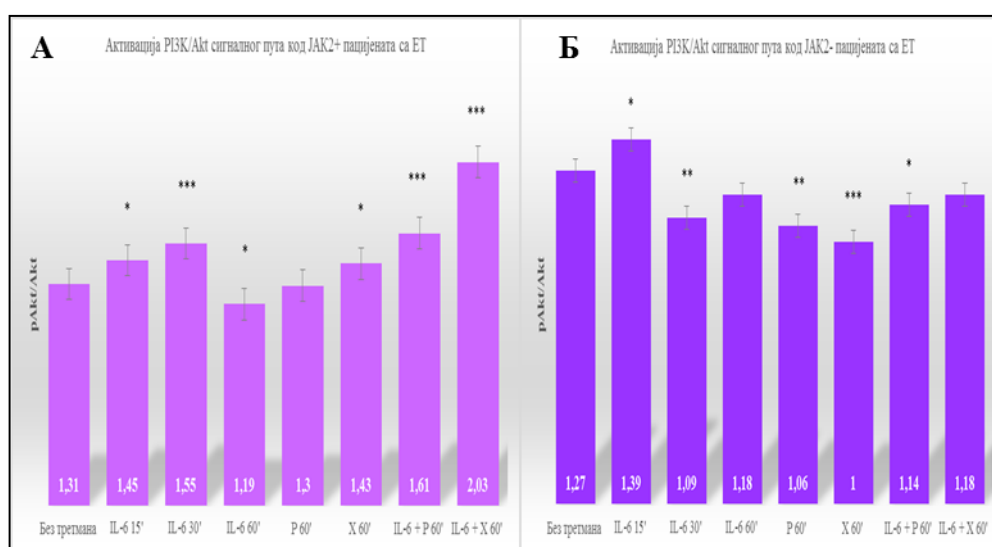
Графикон 68. Однос нивоа експресије pSTAT3/STAT3 протеина код JAK2+ (А) и JAK2- (Б) пацијената са ЕТ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

Поред тога, испитивана је активација PI3K/Akt сигналног пута. У свим гранулоцитима показана је јасна експресија фосфорилисаног Akt протеина (Слика 42). Одређивањем степена експресије протеина, показано је да код JAK2+ пацијената са ЕТ дијагнозом долази до значајног повећања активности овог пута у гранулоцитима третираним са IL-6 у трајању од 30 минута, након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитинибом, као и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном (*** $p < 0,001$). Такође, до стимулисане активности PI3K/Akt сигналног пута долази и након третмана са IL-6 у трајању од 15 минута, као и након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном током 60 минута (* $p < 0,05$). Насупрот томе, након третмана са IL-6 у трајању од једног сата, долази до значајног смањења активности овог сигналног пута (* $p < 0,05$) (Графикон 69А).



Слика 42. Експресија pAkt, Akt протеина и β-актина у гранулоцитима JAK2+ пацијената са ЕТ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, P-руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

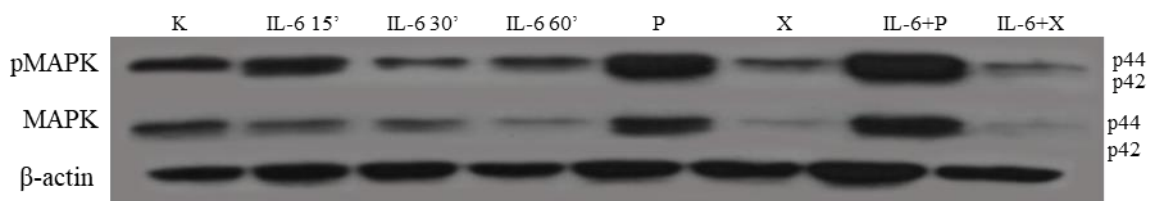
Код ЈАК2- пацијената са ЕТ дијагнозом, до значајног повећања активности PI3K/Akt сигналног пута долази само након третмана са IL-6 у трајању од 15 минута (* $p < 0,05$). Код свих осталих третираних гранулоцита долази до смањене активности овог сигналног пута које је статистички значајно код гранулоцита третираних са IL-6 у трајању од 30 минута, руксолитинибом (** $p < 0,01$), 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (***) $p < 0,001$), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (* $p < 0,05$) (Графикон 69Б). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



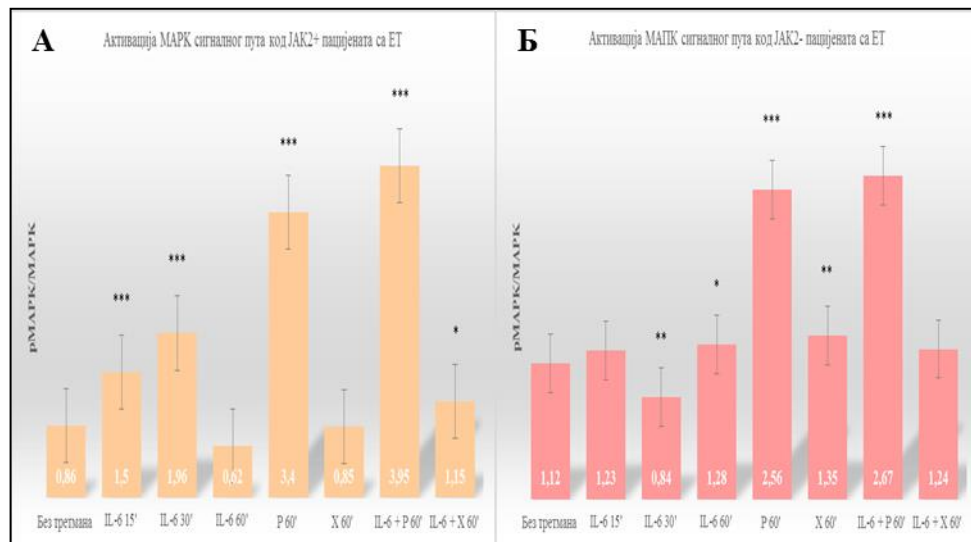
Графикон 69. Однос нивоа експресије pAkt/Akt протеина код ЈАК2+ (А) и ЈАК2- (Б) пацијената са ЕТ након третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Испитивање активације MAPK сигналног пута у гранулоцитима ЕТ пацијената показало је да постоји појачана активност овог пута у свим ћелијама (Слика 43). Одређивањем нивоа експресије протеина, када су сабране обе форме MAPK протеина (p44/p42), показано је да код ЈАК2+ пацијената долази до значајног повећања активности овог пута у гранулоцитима након третмана са IL-6, после 15 и 30 минута, након третмана са руксолитинибом, као и након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (***) $p < 0,001$). Такође до повећане активности MAPK пута долази и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (* $p < 0,05$) (Графикон 70А).

Код пацијената са ЕТ који су ЈАК2-, до значајног повећања активности МАРК пута долази након третмана са руксолитинибом, као и након третмана са комбинацијом ИЛ-6 и руксолитиниба (** $p < 0,001$), након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (** $p < 0,01$), као и након третмана са ИЛ-6 у трајању од једног сата ($p < 0,05$). До значајног смањења активности МАРК пута долази након третмана са ИЛ-6 у трајању 30 минута (** $p < 0,01$) (Графикон 70Б). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



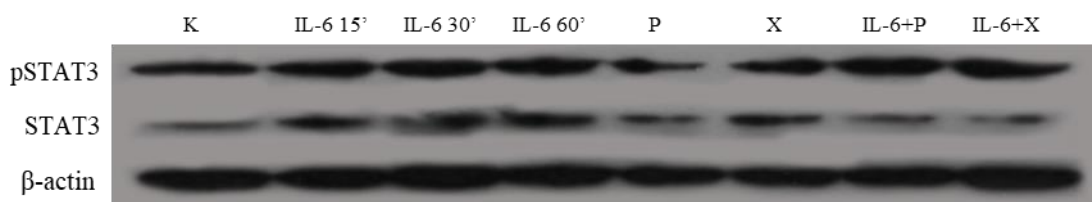
Слика 43. Експресија рМАРК, МАРК протеина и β -актина у гранулоцитима ЈАК2- пацијената са ЕТ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (К-контрола, Р-руксолитиниб, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)



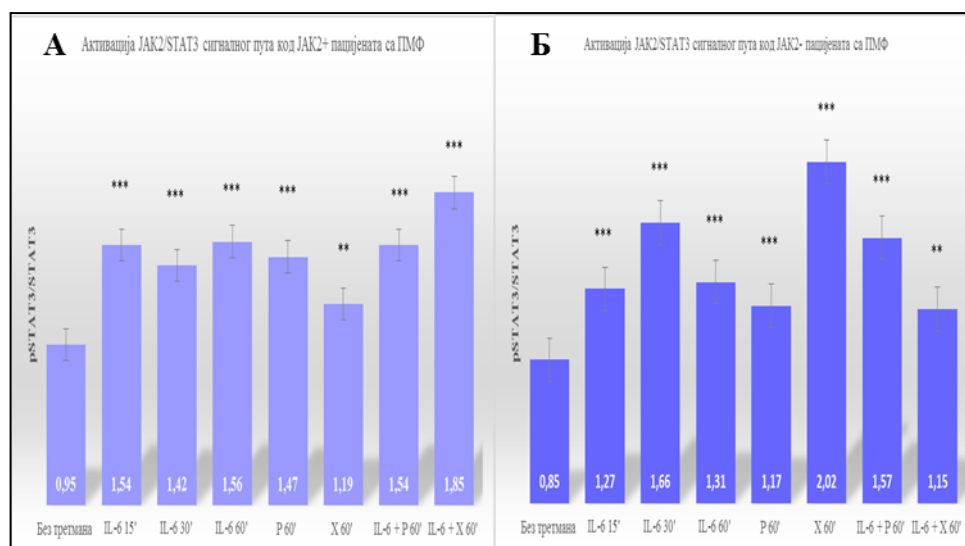
Графикон 70. Однос нивоа експресије рМАРК/МАРК протеина код ЈАК2+ (А) и ЈАК2- (Б) пацијената са ЕТ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, Х-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.14.3. Активација JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код пацијената са ПМФ дијагнозом

Активација JAK2/STAT3 сигналног пута у гранулоцитима пацијената са ПМФ дијагнозом, праћена је упоредо код JAK2⁺ и JAK2⁻ пацијената. У гранулоцитима свих ПМФ пацијената показана је јасна експресија фосфорилисаног STAT3 протеина (Слика 44). Поред тога, показано је да до значајног повећања активности JAK2/STAT3 сигналног пута долази код свих третираних гранулоцита у односу на нетретиране и то и код JAK2⁺ и JAK2⁻ ПМФ пацијената (**p<0,01, ***p<0,001) (Графикон 71А, Б). β-актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.

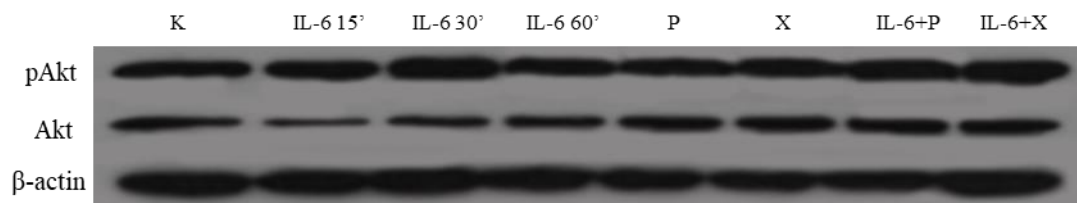


Слика 44. Експресија pSTAT, STAT протеина и β-актина у гранулоцитима JAK2⁺ пацијената са ПМФ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (К-контрола, Р-руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)



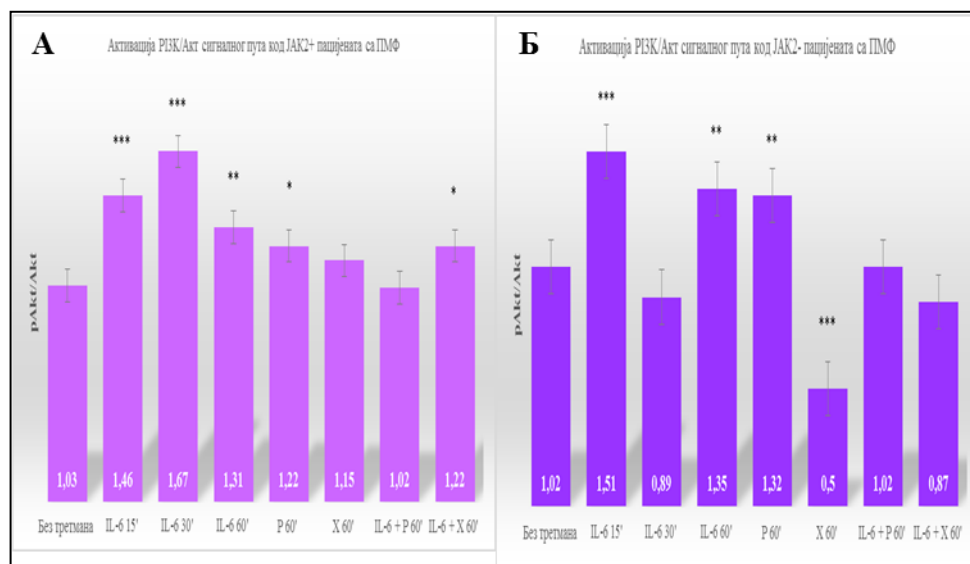
Графикон 71. Однос нивоа експресије pSTAT3/STAT3 протеина код JAK2⁺ (А) и JAK2⁻ (Б) пацијената са ПМФ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (**p<0,01; ***p<0,001) (Р-руксолитиниб, X - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Активација PI3K/Akt сигналног пута је такође испитивана код JAK2+ и JAK2- пацијената. У свим гранулоцитима показана је јасна експресија фосфорилисаног Akt протеина (Слика 45). Одређивањем степена експресије протеина, показано је да код JAK2+ пацијената са ПМФ дијагнозом долази до значајног повећања активности овог пута у гранулоцитима третираним са IL-6 у трајању од 15 и 30 минута (**p<0,001). Поред тога, до повећања активности овог пута долази и након третмана са IL-6 у трајању од 60 минута (**p<0,01), након третмана са руксолитинибом (*p<0,05), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (*p<0,05) (Графикон 72А).



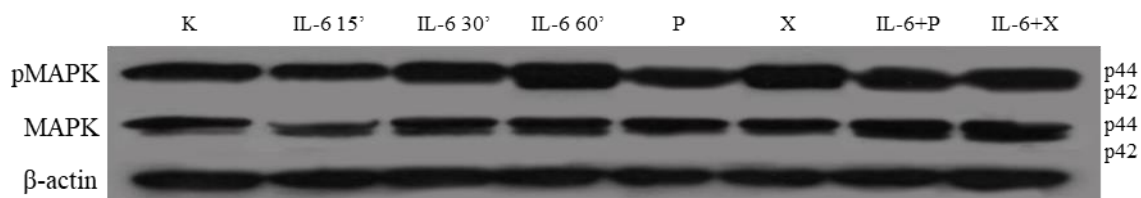
Слика 45. Експресија pAkt, Akt протеина и β -актина у гранулоцитима JAK2+ пацијената са ПМФ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (K-контрола, P-руксолитиниб, X- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Код JAK2- пацијената са ПМФ дијагнозом, до значајног повећања активности PI3K/Akt сигналног пута долази након третмана са IL-6 у трајању од 15 минута (**p<0,001) и једног сата (**p<0,01), као и након третмана са руксолитинибом (**p<0,01). Насупрот томе, до значајног смањења активности овог сигналног пута долази након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (**p<0,001) (Графикон 72Б). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



Графикон 72. Однос нивоа експресије рAkt/Akt протеина код ЈАК2+ (А) и ЈАК2- (Б) пацијената са ПМФ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, Х - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

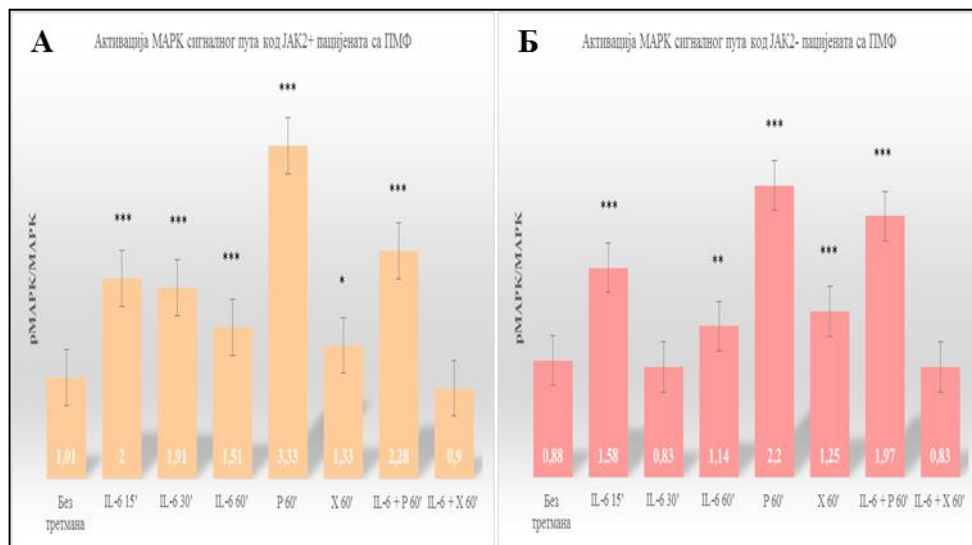
Испитивање активације MAPK сигналног пута у гранулоцитима ПМФ пацијената показало је да постоји појачана активност овог пута у свим ћелијама (Слика 46). Квантификација експресије протеина, када су сабране обе форме MAPK протеина (p44/p42), показала је да код ЈАК2+ пацијената до значајног повећања активности овог пута долази у гранулоцитима након третмана са ИЛ-6, после 15, 30 минута и једног сата (*** $p < 0,001$), као и након третмана са руксолитинибом (*** $p < 0,001$) и након третмана са комбинацијом ИЛ-6 и руксолитиниба (*** $p < 0,001$). Повећање активности MAPK сигналног пута дешава се и након третмана са 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (* $p < 0,05$).



Слика 46. Експресија рМАРК, МАРК протеина и β -актина у гранулоцитима ЈАК2+ пацијената са ПМФ након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима (К-контрола, Р-руксолитиниб, Х- 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

Насупрот томе, до смањења активности овог сигналног пута долази након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, међутим статистичка анализа није показала да има значајне разлике у односу на нетретиране гранулоците (Графикон 73А, Слика 46).

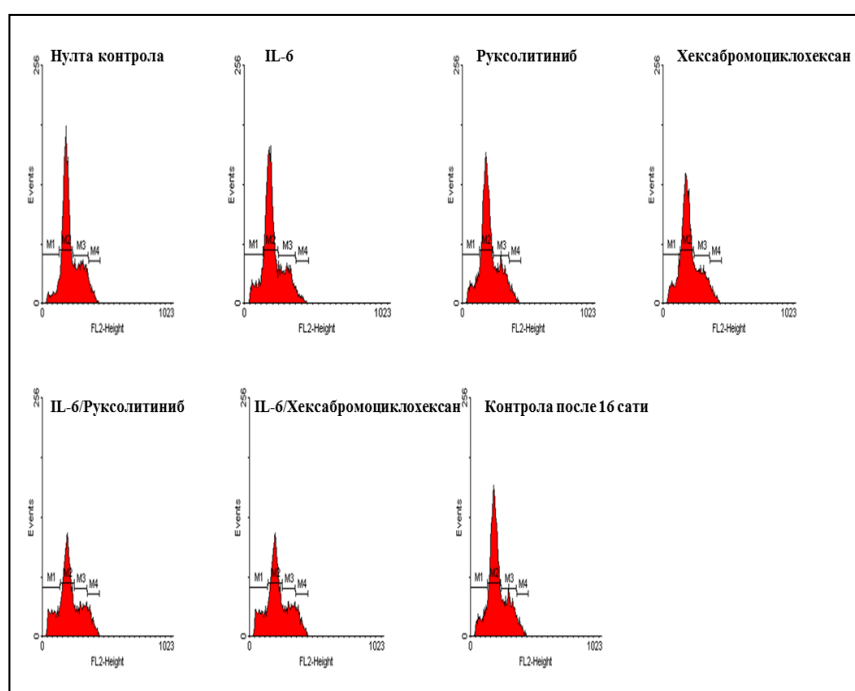
Код JAK2- ПМФ пацијената, до појачане активности MAPK сигналног пута долази након третмана са IL-6 у трајању 15 минута, након третмана са руксолитинибом, 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, као и после третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (**p<0,001). До појачане активности овог пута долази такође и након третмана са IL-6 у трајању од 60 минута (**p<0,01). (Графикон 73Б). β -актин је коришћен као контрола концентрације стављених протеина.



Графикон 73. Однос нивоа експресије pMAPK/MAPK протеина код JAK2+ (А) и JAK2- (Б) пацијената са ПМФ након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

4.15 Степен пролиферације и апоптозе HEL 92.1.7 ћелија након третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима

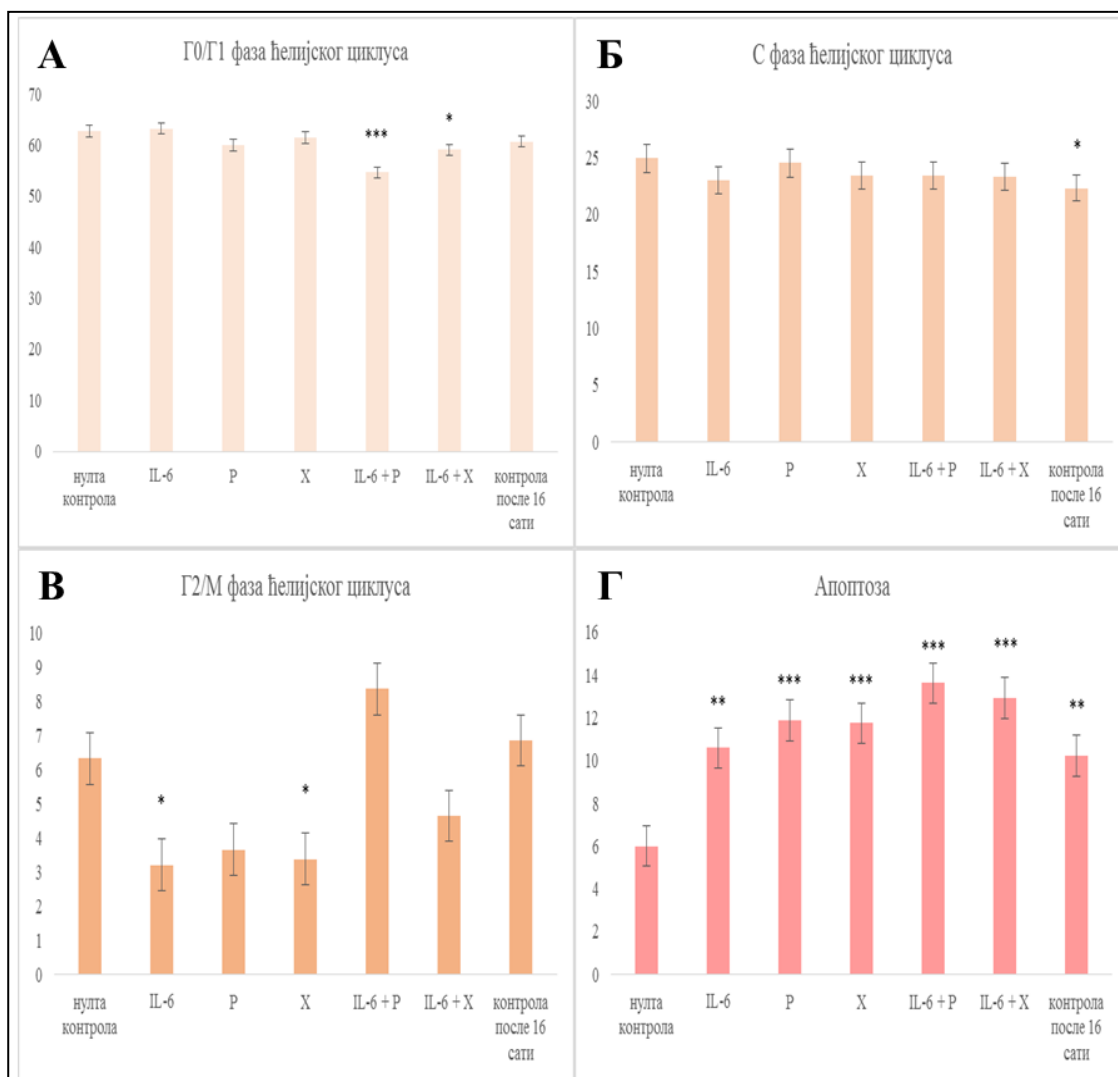
У циљу испитивања ефеката ИЛ-6 и ЈАК инхибитора на степен пролиферације и апоптозе HEL ћелија, праћен је њихов ћелијски циклус. Ћелијски циклус се завршава или деобом ћелије, кроз које она продужава своје трајање или старењем и умирањем, па се тако апоптоза посматра као коначни стадијум диференцијације ћелија.



Слика 47. Ћелијски циклус код HEL ћелија након 16 сати третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима. Приказ репрезентативног хистограма флуоресценце, након бојења пропидијум јодидом, методом проточне цитометрије

Испитивање ћелијског циклуса код HEL ћелија након 16 сати третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима је показало да се највећи број ћелија, без обзира на третман, налази у Г0/Г1 фази ћелијског циклуса (Слика 47). Статистички значајно смањење броја ћелија у овој фази ћелијског циклуса било је код ћелија третираних са комбинацијом ИЛ-6 и руксолитиниба (** $p < 0,001$), као и код ћелија третираних са комбинацијом ИЛ-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана ($p < 0,05$) (Графикон 74А).

У С фази ћелијског циклуса налази се приближно једнак број ћелија свих група, с тим што се код контролних ћелија после 16 сати третмана налазио значајно мањи број ћелија у односу на нулту контролу (* $p < 0,05$) (Графикон 74Б).



Графикон 74. Ћелијски циклус код HEL ћелија након 16 сати третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима. Г0/Г1 фаза (А), С фаза (Б), Г2/М фаза (В), апоптоза (Г) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)(P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

У Г2/М фази ћелијског циклуса се налази најмањи број ћелија код свих група, с тим што је у групи третираних са IL-6 као и са 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном, мањи број ћелија ушао у С фазу у односу на нулту контролу (* $p < 0,05$) (Графикон 74В).

Што се тиче апоптозе, код свих група долази до значајног повећања броја ћелија које улазе у апоптозу у односу на нулту контролу (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Графикон 74Г).

4.16 Степен пролиферације и апоптозе гранулоцита МПН пацијената након третмана са IL-6 и JAK инхибиторима

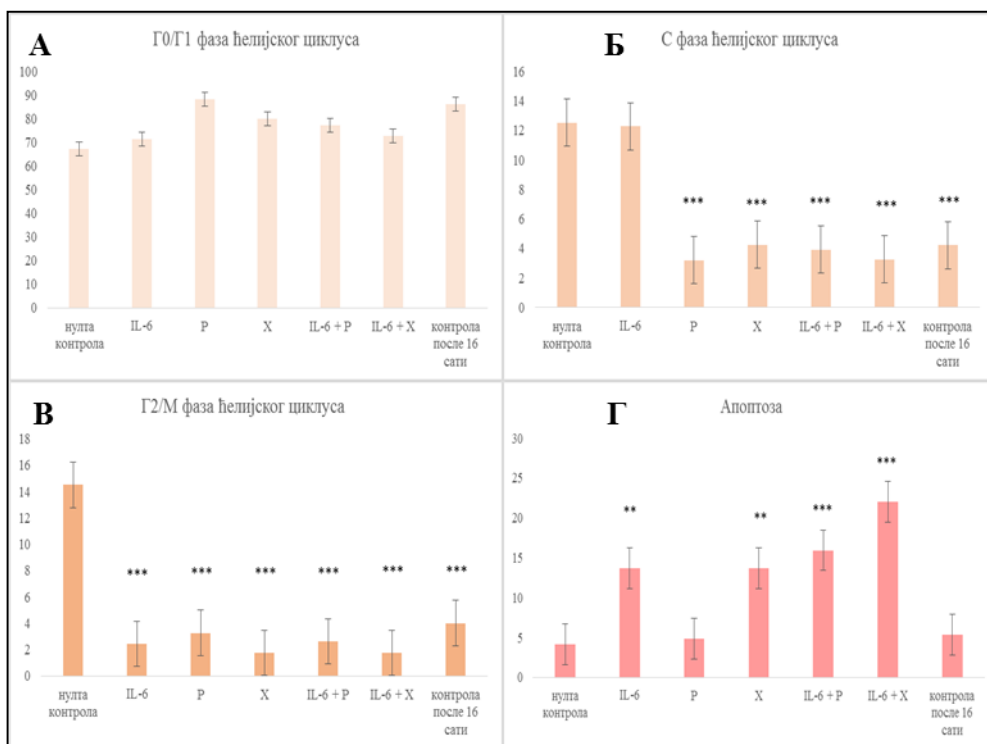
4.16.1. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ПВ дијагнозом

Код пацијената са ПВ дијагнозом испитивање ћелијског циклуса након 16 сати третмана са IL-6 и JAK инхибиторима је показало да се највећи број ћелија, без обзира на третман, налази у G0/G1 фази ћелијског циклуса. Статистичка анализа, међутим, није показала да постоји значајна разлика у погледу броја ћелија које се налазе у овој фази ћелијског циклуса између нултих контрола и третираних гранулоцита (Графикон 75А).

У С фази ћелијског циклуса код свих група гранулоцита, изузев оних који су третирани са IL-6, налази се значајно мањи број ћелија (*** $p < 0,001$) у односу на нулте контроле (Графикон 75Б).

У G2/M фази се налази најмањи број гранулоцита свих група у односу на нулте контроле. Смањен број ћелија у овој фази ћелијског циклуса у односу на нулту контролу је високо статистички значајан (*** $p < 0,001$) (Графикон 75В).

Што се тиче апоптозе, код готово свих група гранулоцита долази до значајног повећања броја ћелија које улазе у апоптозу у односу на нулте контроле (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) са изузетком гранулоцита који су третирани руксолитинибом као и контролних гранулоцита после 16 сати третмана (Графикон 75Г).

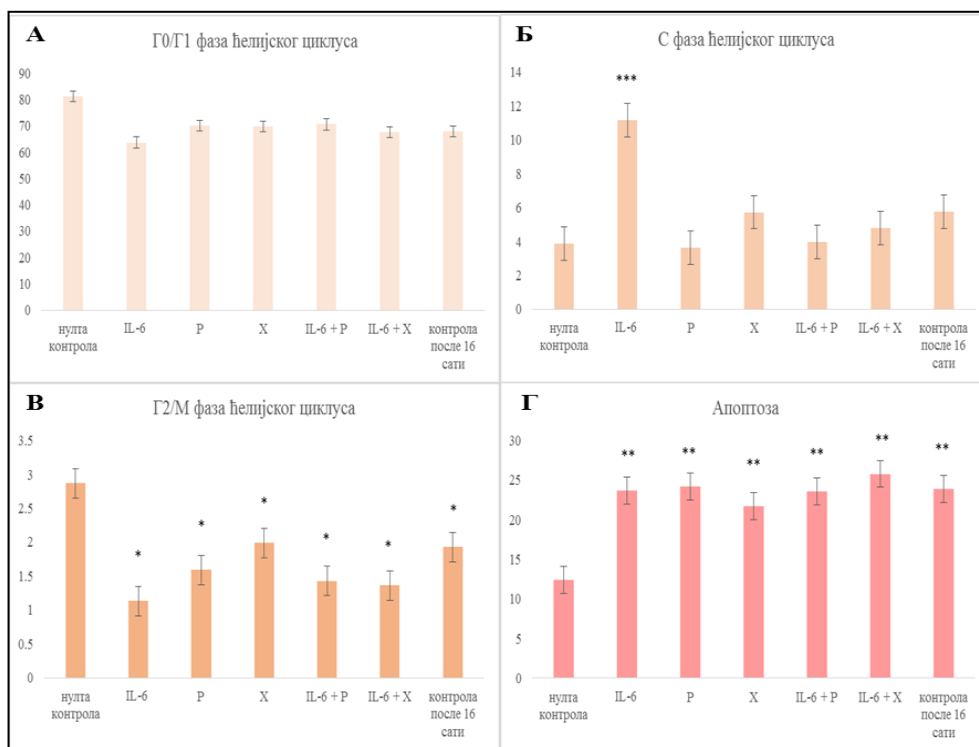


Графикон 75. Ћелијски циклус гранулоцита пацијената са ПВ дијагнозом након 16 сати третмана са ИЛ-6 и ЈАК инхибиторима. Г0/Г1 фаза (А), С фаза (Б), Г2/М фаза (В), апоптоза (Г) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Р-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

4.16.2. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ЕТ дијагнозом

Код пацијената са ЕТ дијагнозом, у Г0/Г1 фази ћелијског циклуса у свим групама се налази мањи број ћелија у односу на нулту контролу, али статистичка анализа није показала да је тај број значајно мањи (Графикон 76А).

Када је у питању С фаза ћелијског циклуса, показано је да само након третмана са ИЛ-6 долази до повећања броја ћелија које улазе у ову фазу, што је високо статистички значајно (** $p < 0,001$) (Графикон 76Б).



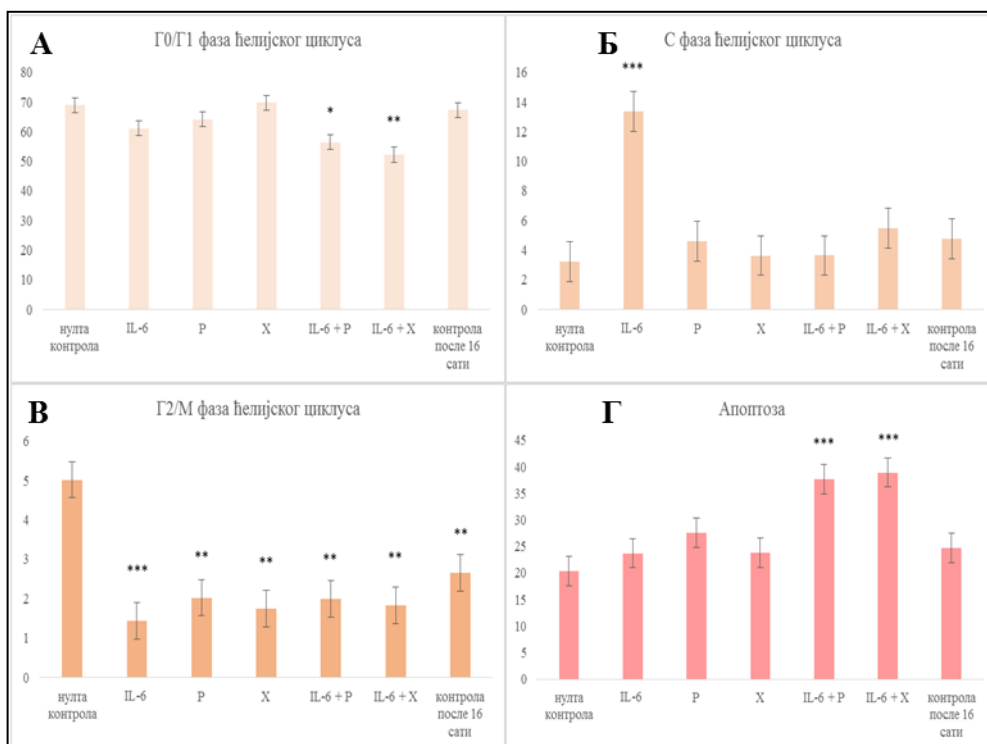
Графикон 76. Ћелијски циклус гранулоцита пацијената са ЕТ дијагнозом након 16 сати третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима. Г0/Г1 фаза (А), С фаза (Б), Г2/М фаза (В), апоптоза (Г) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексан)

У Г2/М фази, забележен је смањен број ћелија у свим групама (* $p < 0,05$) у односу на нулту контролу (Графикон 76В), а на супрот томе у свим групама значајно већи број ћелија улази у апоптозу (** $p < 0,01$) у односу на нулте контроле (Графикон 76Г).

4.16.3. Степен пролиферације и апоптозе у гранулоцитима код пацијената са ПМФ дијагнозом

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, као и код осталих пацијената, највећи број гранулоцита се налази у Г0/Г1 фази ћелијског циклуса. У овој фази до значајног смањења броја ћелија долази након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба (* $p < 0,05$), као и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексана (** $p < 0,01$) (Графикон 77А).

У С фази ћелијског циклуса, долази до значајног повећања броја ћелија које улазе у ову фазу само након третмана са IL-6 (*** $p < 0,001$) (Графикон 77Б).



Графикон 77. Ћелијски циклус гранулоцита пацијената са ПМФ дијагнозом након 16 сати третмана са IL-6 и ЈАК инхибиторима. Г0/Г1 фаза (А), С фаза (Б), Г2/М фаза (В), апоптоза (Г) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (P-руксолитиниб, X-1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан)

У Г2/М фази се, као и код осталих дијагноза, налази најмањи број ћелија. Притом у свим групама долази до значајног смањења броја ћелија које су у овој фази у односу на нулте контроле (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Графикон 77В).

Поред тога, показано је да највећи број ћелија улази у апоптозу након третмана са комбинацијом IL-6 и руксолитиниба, као и након третмана са комбинацијом IL-6 и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (*** $p < 0,001$) (Графикон 77Г).

5. ДИСКУСИЈА

5.1 Мијелопролиферативне неоплазме – опште карактеристике анализираних групе болесника

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) су хронични хематолошки малигнитети који се одликују аутономном пролиферацијом одређених прогенитора хематопоезе и аберантном активацијом тирозин киназних сигналних путева у комбинацији са снажним одговором на цитокине и факторе раста. МПН обухватају 3 ентитета: полицитемију веру (ПВ), есенцијалну тромбоцитемију (ЕТ) и примарну мијелофиброзу (ПМФ). Оне показују значајну фенотипску мимикрију, где може доћи до фенотипске промене од ЕТ у ПВ, као и до еволуције у мијелофиброзу (пост-ПВ/пост-ЕТ мијелофиброза) (*Cervantes и сар.*, 2013).

Наша група испитаника састојала се од 160 пацијената са МПН и показала је неке значајне карактеристике. Просечна старост испитаника је била 63 године, што је у складу са познатим литературним подацима по којима се ово обољење сматра болешћу старијег животног доба (особе преко 60 година). Оно што нашу групу испитаника чини специфичном јесте индивидуална разноликост старости пацијената чији се опсег кретао од 27 до 90 година.

Важно обележје ових болести је присуство “missense“ ЈАК2V617F мутације код све три болести, с том разликом што је проценат заступљености мутације по болестима различит. По литератури, проценат заступљености мутације код ПВ је 97%, код ЕТ 50-60% а код ПМФ 55-60% (*Kralovics и сар.*, 2005). Значајна карактеристика наших испитаника јесте то да је ЈАК2V617F мутација детектована у високом проценту и то код свих ПВ пацијената, као и код 53% ЕТ и 61% ПМФ. Од укупног броја анализираних ПВ пацијената, чак 39% је имало више од 50% мутираног алела што се објашњава чињеницом губитка хетерозиготности и довођењем мутације у хомозиготно стање. За разлику од ПВ и ПМФ, код ЕТ постоји поликлонална хематопоеза и показано је да *wt* клон није супримиран постојањем мутираног клона, као и да је појава митотичке рекомбинације ретка (*Scott и сар.*, 2006). Тако су и у нашој групи ЕТ пацијената присутни само хетерозиготи. Од укупног броја анализираних ПМФ пацијената, ЈАК2V617F мутација је била присутна у високом проценту, међутим проценат гранулоцита у којима је мутација присутна у хомозиготном стању је дупло мањи (17%) у односу на гранулоците у којима је мутација присутна у хетерозиготном стању (34%).

У једној објављеној студији детаљно је анализиран утицај пола као модификујућег фактора који утиче на заступљеност мутације, као и на количину мутираног алела код мушкараца и жена (*Stein* и сар., 2010). Слично као и у овој студији, у нашој групи пацијената са ЕТ преовладавају жене (70%), док у групи са ПВ доминирају мушкарци (56%). Међутим, за разлику од ове студије у којој код ПМФ доминирају мушкарци, у нашој групи ПМФ пацијената доминирају жене (61%).

Значајан корак у разумевању патогенезе МПН представља откриће соматске мутације у гену за CALR који кодира калретикулин, калцијум-везујући протеин повезан са ендоплазмним ретикулумом (*Klampfl* и сар., 2013). Присуство мутације у гену за CALR код оболелих од МПН, искључује присуство JAK2 мутације и обрнуто, тако да процена ове мутације значајно побољшава дијагностички приступ за ЕТ и ПМФ пацијенте. Према литератури, проценат заступљености ове мутације код ЕТ је 20-30% а код ПМФ 25-35% (*Langabeer* и сар., 2015). Код наших пацијената са постављеном дијагнозом ЕТ, мутација у гену за CALR је детектована код 31,9%, као и код 31,7% ПМФ пацијената. Иако последице присутва ове мутације још увек нису у потпуности испитане, CALR мутациони статус може да пружи информације о клиничком фенотипу и прогнози болести. Истраживања су показала да ЕТ и ПМФ CALR-мутирани пацијенти имају мањи ризик од тромбозе, нижи хемоглобин и дужу стопу преживљавања него пацијенти са JAK2 мутацијом (*Klampfl* и сар., 2013).

5.2 Ангиогенеза код МПН

Добро је познато да се раст солидних тумора састоји од аваскуларне и накнадне васкуларне фазе (*Ribatti* и сар., 1999). Под претпоставком да ова каснија фаза зависи од ангиогенезе и ослобађања ангиогених фактора, стицање ангиогене способности може да се посматра као израз неопластичне трансформације ка туморском расту и метастази. Практично сви солидни тумори напредују кроз ове две фазе (*Ribatti.*, 2009).

Како су костна срж и лимфни органи доминантна места акумулације тумора код хематолошких малигнитета, у почетку се није веровало да је ангиогенеза релевантна код ових тзв. „течних тумора“, за разлику од солидних. Заправо, пошто се хематолошки тумори не развијају као компактни, потреба за ангиогенезом није толико очигледна као у солидним туморима. Међутим, повећана микроваскуларна густина у костној сржи и лимфним чворовима може бити од значаја за обезбеђивање кисеоника и

хранљивих материја малигним ћелијама. Штавише, повећана маса ендотелних ћелија је важна за производњу цитокина и фактора раста који делују на малигне ћелије промовишући њихову пролиферацију или преживљавање. Како малигне ћелије производе ангиогене факторе и експримирају рецепторе за њих, функционалне аутокрине петље такође су важне у хематолошким малигнитетима (*Ribatti.*, 2009).

Бројне клиничке студије су показале да је степен ангиогенезе или ниво ангиогених фактора у корелацији са степеном болести, прогнозом или одговором на терапију (*Rajkumar* и сар., 2002). Према томе, ти подаци сугеришу да индукција ангиогенезе у хематолошким туморима има патофизиолошки значај за напредовање болести.

5.2.1. Ангиогени фактор HIF-1 α код МПН

Испитивање генске експресије HIF-1 α код МПН пацијената показало је повећану експресију овог фактора у гранулоцитима пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом, независно од присуства JAK2 мутације, док је његова експресија код пацијената са ПМФ дијагнозом смањена у односу на здраве контроле. У CD34⁺ прогениторским ћелијама свих МПН пацијената, генска експресија овог фактора је већа у односу на здраве контроле и такође је већа у односу на генску експресију у гранулоцитима. Испитивање генске експресије HIF-1 α у односу на мутацију у гену за CALR показало је да у гранулоцитима ЕТ пацијената нема разлике у експресији у односу на контроле, док је у гранулоцитима ПМФ пацијената експресија значајно смањена, независно од присуства мутације у гену за CALR. Поред тога, испитивање протеинске експресије HIF-1 α у гранулоцитима и CD34⁺ ћелијама МПН пацијената показало повећану експресију овог фактора код свих МПН пацијената независно од JAK2 или CALR мутационог статуса. Повећана експресија HIF-1 α сматра се лошим прогностичким фактором у солидним туморима (*Bangoura* и сар., 2007). Генерално, повећана експресија овог фактора у корелацији је са растом тумора и отпорности на терапију, што доводи до погоршања болести (*Mimeault* и сар., 2013). Код леукемија, прекомерна експресија HIF-1 α представља маркер лоше прогнозе и хемотерапијског исхода. Резултати наше студије у сагласности су са претходно приказаном повећаном експресијом HIF-1 α фактора код акутне мијелоидне леукемије (АМЛ) (*Forristal* и сар., 2015), акутне промијелоцитне леукемије (АПЛ) (*Coltella* и сар., 2014), акутне лимфоцитне леукемије (АЛЛ) (*Forristal* и сар., 2015) и хроничне мијелоидне леукемије

(ХМЛ) (*Chen и сар.*, 2015). Код АМЛ и мијелодиспластичних синдрома показано је да су јачина болести и преживљавање управо под утицајем HIF-1 α фактора (*Song и сар.*, 2014).

Имунохистохемијска испитивања степена експресије HIF-1 α протеина су показала да је он прекомерно експримиран у великом броју примарних канцера и метастаза у поређењу са нормалним ткивима (*Hellwig-Burgel T и сар.*, 2005). Поред тога показано је да ниво HIF-1 α корелира са појачаном акумулацијом p53, bcl-2 експресијом и Ki67 индексом (*Zhong и сар.*, 1999). У нашој студији, осим у периферној крви, степен експресије HIF-1 α протеина је праћен и у костној сржи МПН пацијената. Праћена је експресија цитоплазматског тј. укупног као и експресија нуклеусног тј. активiranог HIF-1 α протеина. Експресија оба HIF-1 α протеина повећана је код готово свих МПН пацијената. У односу на CALR мутациони статус, није било значајне разлике у степену експресије HIF-1 α протеина између ЕТ и ПМФ пацијената и здравих контрола.

С обзиром на изузетно велики прогностички и дијагностички значај HIF-1 α биолошког маркера код великог броја различитих туморских промена, можемо закључити да се његов значај у овој студији огледа у чињеници да је повећана експресија забележена и на генском и на протеинском нивоу код сва три типа МПН. Нарочито је уочљива висока експресија овог маркера у CD34⁺ ћелијама и гранулоцитима у односу на ћелије костне сржи код испитаника са МПН, што указује на значај инфламаторних гранулоцита у развоју ангиогенезе. Имајући у виду да HIF-1 α може да има и прогностички значај, а директно је повезан са повећаним степеном ангиогенезе туморских промена, може се закључити да је висок ниво експресије код МПН пацијената, нарочито у групи ПВ и ПМФ указује на лош и агресиван ток болести и вероватно краће преживљавање. Велики број студија је показао да су хипоксичне туморске ћелије отпорније на зрачење и хемиотерапију, као и да поседују велики потенцијал за инвазију, метастазе и морталитет пацијената. Такође је показано да HIF-1 посредује у тој отпорности (*Semenza и сар.*, 2003). Према томе, инхибиција HIF-1 α активности представља важну компоненту у терапији ангиогенезе.

5.2.2. Ангиогени фактор VEGF код МПН

У овој студији пратили смо експресију VEGF ангиогеног фактора на генском и протеинском нивоу код МПН пацијената, у односу на JAK2 мутациони статус као и у односу на присуство мутације у гену за CALR. Наши резултати су показали да је

генска експресија значајно смањена у гранулоцитима свих МПН пацијената, независно од JAK2 мутационог статуса. У CD34⁺ ћелијама, експресија VEGF је значајно већа него у гранулоцитима, али и поред тога је значајно смањена код пацијената са ПВ и ЕТ, док је код ПМФ повећана у односу на контроле, али није достигла статистичку значајност. Испитивање генске експресије у односу на CALR мутациони статус је показало да је у гранулоцитима свих ЕТ и ПМФ, пацијената значајно смањена експресија VEGF док је у CD34⁺ ћелијама значајно већа експресија VEGF детектована само код ПМФ пацијената који имају мутацију у гену за CALR. Насупрот генској експресији, протеинска експресија VEGF повећана је код готово свих МПН пацијената и то независно од присуства JAK2 мутације или мутације у гену за CALR.

Резултати наше студије су у складу са налазима претходних студија (*Maktouf* и сар., 2011; *Alonci* и сар., 2008; *Panteli* и сар., 2007). У овим студијама такође је показана повећана експресија VEGF код МПН пацијената. Према овим ауторима, висока концентрација VEGF, као и позитивна корелација између овог фактора и густине капилара у костној сржи може указати на повећану ангиогенезу и предиспозицију за развој тромбоемболијских догађаја. Тачан механизам који активира експресију VEGF-а у хематолошким туморима још увек није познат, али је очекивано да буде сличан онима у солидним туморима (*Frater* и сар., 2008). Током протеклих година, код болесника са различитим хематолошким туморима, показано је да је ниво експресије VEGF/VEGF рецептора (VEGFR) повезана са смањеним преживљавањем и нижим степеном ремисије (*Aguayo* и сар., 2002). Једна новија студија је показала повећан ниво експресије VEGF-а у плазми болесника са МПН, као и да је највећа вредност овог фактора присутна код болесника са ПВ а најнижа код болесника са ЕТ дијагнозом (*Leković* и сар., 2017).

Степен ангиогенезе у костној сржи често корелира са тежином болести, прогнозом и лечењем. Ћелије, цитокини и фактори раста који одржавају физиолошку ангиогенезу у нормалној костној сржи нису избалансирани у неопластичној костној сржи. Поред тога, туморске ћелије костне сржи регулишу неколико фактора, укључујући VEGF и IL-6, производећи аутокрине и паракрине ефекте на више типова ћелија стимулишући ангиогенезу и већу прокрвљеност (*Medinger* и *Passweg*., 2014). У неким хематолошким малигнитетима показана је директна корелација између повећаних концентрација VEGF и других ангиогених фактора, са повећањем микроваскуларне густине у костној сржи (*Aguayo* и сар., 1999). У нашој студији, испитивање експресије VEGF протеина у костној сржи МПН пацијената, у односу на

JAK2 мутациони статус, показало је претежно смањење експресије VEGF. Повећана експресија забележена је само код ЕТ и ПМФ хетерозигота, али није достигла статистичку значајност. Такође, испитивање експресије у односу на CALR мутациони статус је показало смањење експресије код свих ЕТ и ПМФ пацијената, независно од присуства мутације у гену за CALR.

Хипоксија је снажан стимулус лучења VEGF. У хипоксичним условима, VEGF ген представља главни циљ HIF-1 α транскрипционог фактора који активира његову транскрипцију (Shih и сар., 1998). У нашој студији тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна негативна корелација између протеинске експресије VEGF и HIF-1 α код ПВ хомозиготних пацијената, као и код ПМФ хетерозиготних пацијената.

Значај VEGF и његових путева у хематолошким малигнитетима, укључујући и МПН, огледа се у томе што се анти-ангиогене терапије највише базирају на инхибицији везивања VEGF за његов рецептор користећи неутралишућа антитела против лиганда или рецептора, затим растворљиве рецепторе, мале инхибиторне молекуле или се користе терапије усмерене против тирозин-киназне активности VEGF рецептора. Нови агенси су тренутно у различитим фазама клиничког развоја и истраживању у МПН (Medinger и Passweg., 2014).

5.2.3. Ангиогени фактор eNOS код МПН

Међу бројним изоформама NOS, eNOS представља примарну форму која је укључена у ангиогенезу. Из тог разлога, у овој студији пратили смо експресију eNOS на генском и протеинском нивоу у гранулоцитима и CD34⁺ ћелијама, као и у костној сржи МПН пацијената у односу на JAK2 мутациони статус као и у односу на присуство мутације у гену за CALR. Показано је да је генска експресија eNOS у гранулоцитима и CD34⁺ ћелијама повећана код већине МПН пацијената, независно од JAK2 мутационог статуса. Насупрот томе, у CD34⁺ ћелијама код свих ЕТ и ПМФ пацијената, независно од присуства мутације у гену за CALR, експресија eNOS је мања у односу на контроле, што је посебно изражено код ЕТ пацијената који поседују ову мутацију. Такође, наши резултати су показали да је и протеинска експресија eNOS значајно повећана код свих МПН пацијената независно од JAK2 или CALR мутационог статуса. Поред тога, тест Pearson-ове корелације је показао да постоји статистички значајна позитивна корелација између протеинске експресије VEGF и eNOS код свих пацијената са ПВ и

већине пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом. Ови резултати су у складу са претходним студијама које су показале да VEGF индукује експресију eNOS у хуманим ендотелним ћелијама пупчане вене (енг. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC*) као и да VEGF индукује продукцију NO повећавајући експресију и активност NOS ензима *in vitro* (Hood и сар., 1998). Показано је такође да хемотаксични ефекат VEGF на ендотелне ћелије зависи од ендотелне NO синтазе (Murohara и сар., 1999). Да NO има кључну улогу као низводни медијатор VEGF говоре и резултати да су мишеви који немају eNOS отпорни на VEGF-индуковану ангиогенезу (Murohara и сар., 1998). Поред тога, наши резултати су показали да код ЕТ пацијената без JAK2 мутације постоји значајна негативна корелација између протеинске експресије eNOS и HIF-1 α . Раније студије су показале да је повећан ниво HIF-1 α протеина повезан са излагањем егзогеном азот оксиду и реактивним кисеоничним врстама (енг. *reactive oxygen species, ROS*) у различитим ћелијама и ткивима (Brune и сар., 2007). Показано је такође да фармаколошке и генетичке манипулације које повећавају *in vitro* ROS и продукцију азот оксида, утичу на стабилност HIF-1 α протеина (Brune и сар., 2007). При томе је наглашен значај локалне концентрације као и дужина трајања изложености азот оксиду као факторима који дефинишу стабилизацију HIF-1 α протеина (Thomas и сар., 2008).

Праћење експресије eNOS у костној сржи МПН пацијената, показало је да је ниво eNOS протеина повећан код готово свих МПН пацијената, што је посебно изражено код пацијената са ПМФ дијагнозом. Експресија eNOS значајно је смањена само код ЕТ пацијената без JAK2 мутације. У односу на мутацију у гену за CALR, није показана значајна разлика у погледу експресије између пацијената и контрола. Тест Pearson-ове корелације такође је показао да постоји статистички значајна позитивна корелација између протеинске експресије eNOS и VEGF у ћелијама костне сржи код ПМФ пацијената без JAK2 мутације.

У погледу повезаности функција NO, VEGF и HIF-1 α постоје опречни извештаји. Поред студија у којима је показано да NO утиче на повећање експресије VEGF (Chin и сар., 1997), постоји и неколико другачијих извештаја. Tsurumi и сарадници (1997) су показали да NO доносор, натријум нитропрурид (енг. *sodium nitroprusside, SNP*) нисходно регулише активност VEGF промотора и његову синтезу у васкуларним ћелијама глатких мишића (енг. *vascular smooth muscle cell, VSMC*) ометајући везивање AP-1 транскрипционог фактора. Друге студије су показале да NO инхибира хипоксичну индукцију VEGF гена путем слабљења HIF-1 везујуће активности и спречавањем акумулације HIF-1 α протеина у VSMC и туморским

ћелијским линијама (*Huang* и сар., 1999; *Liu* и сар., 1998). Постоје такође и студије у којима је показано да NO индукује синтезу VEGF и у условима нормоксије. Показано је да NO донори, изузев SNP, индукују експресију VEGF кроз јачање HIF-1 везујуће активности и акумулацију HIF-1 α протеина у ћелијским линијама тумора (*Kimura* и сар., 2000). Оваква контрадикторна улога NO на експресију VEGF и HIF-1 α по свему судећи зависи од експерименталних услова. Утицај NO или NO донора на експресију VEGF може зависити од апсолутне концентрације NO, фармаколошке активности NO донора, количине доступног кисеоника, као и врсте ћелија на којима се врше експерименти.

5.3 β -катенин и PPAR γ фактори у костној сржи МПН пацијената

Иако је улога β -катенина у хематолошким болестима (хронична и акутна мијелоидна леукемија, мултипли мијелом и др.) показана (*Moskalev* и сар., 2012), његова улога код МПН до сада није пуно испитивана. У овој студији, испитивали смо улогу β -катенина и PPAR γ у патогенези МПН. У литератури постоје две студије о улози β -катенина код МПН. *Serinsöz* и сарадници су први показали повећану експресију β -катенина у мегакариоцитима код МПН (*Serinsöz* и сар., 2004). Друга студија, коју су извршили *Jauregui* и сарадници је открила да је експресија β -катенина повећана у цитоплазматском региону мегакариоцита код ПВ и ЕТ у поређењу са ПМФ и ЦМЛ (*Jauregui* и сар., 2008). Бојење нуклеуса није примећено ни у једној од студија. Нуклеусна локализација β -катенина представља меру активације Wnt сигналног пута, мада цитоплазматска акумулација такође може бити оцењена као индиректни индикатор. У складу са претходним студијама и наша студија је показала да је експресија β -катенина значајно повећана код пацијената са ПВ дијагнозом у односу на пацијенте са ЕТ и ПМФ дијагнозом, као и да постоји значајно повећање експресије овог фактора код пацијената са ЕТ дијагнозом у односу на пацијенте са ПМФ дијагнозом. Код пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом је присутно снажно бојење у мегакариоцитима, што може упућивати да β -катенин има значајну улогу у тромбопоези ПВ и ЕТ. Поред тога, у једној студији је показано да PDGF и bFGF индукују β -катенин/TCF пут за васкуларну ћелијску пролиферацију преко модулације цикллина D1 и p21 (*Chen* и сар., 2014). У нашој студији, такође је детектовано бојење у васкуларним ендотелним ћелијама костне сржи пацијената са ПМФ дијагнозом, тако да се може

претпоставити да Wnt/ β -катенин сигнални пут има значајну ангиогену улогу у патогенези ПМФ. Поред тога, наша студија је показала да, за разлику од β -катенина, PPAR γ показује другачији образац експресије. Пре свега, код свих МПН пацијената присутан је јако мали број PPAR γ -имунопозитивних ћелија и то претежно мегакариоцита. Поред тога, највећи број PPAR γ -имунопозитивних ћелија је откривен код пацијената са ПМФ дијагнозом, док је код пацијената са ЕТ дијагнозом тај број био најмањи. У литератури постоје подаци који говоре о антагонизму између β -катенин пута и PPAR γ што је у складу са подацима наше студије. Антагонизам између β -катенин пута и PPAR γ утврђена је у различитим ћелијским типовима, као што су адипоцити (*Gerhold* и сар., 2002) и хепатоцити (*Sharma* и сар., 2004). Такође је показано да PPAR γ супримира Wnt/ β -катенин сигнални пут током адипогенезе и обрнуто, активација Wnt/ β -катенин сигналног пута инхибира експресију PPAR γ (*Takada* и сар., 2009).

Показано је да је конститутивна стабилизација β -катенина у стромалним ћелијама костне сржи повезана са развојем мијелопролиферативних болести (*Kode* и сар., 2014), што указује да Wnt сигнализација у стромалним ћелијама мора бити фино подешена за координисану регулацију микроокружења хематопоеетске активности. Имуномодуларни лек талидомид има антиангиогени ефекат путем нисходне регулације bFGF и VEGF. Новије студије су показале да он као самостални лек има значајан ефекат код ПМФ али да се лоше подноси при високим дозама. Међутим, такође је показано да када се користи у комбинацији са Wnt инхибиторима постоји синергистички ефекат на ћелије мијелома (*Kim* и сар., 2011). Ови резултати указују да циљање Wnt/ β -катенин сигналног пута у комбинацији са имуномодулаторним лековима, може представљати ефикасан приступ за лечење ПМФ.

5.4 Пролиферација у костној сржи МПН пацијената

Сва три ентитета МПН – ПВ, ЕТ и ПМФ представљају клоналне поремећаје матичне ћелије костне сржи које карактерише пролиферација једне или више линија еритроидне, мијелоидне или мегакариоцитне ћелијске линије. Ова пролиферација резултује повећањем броја еритроцита, гранулоцита или тромбоцита у периферној крви. У овој студији извршили смо анализу експресије Ki67 маркера у костној сржи МПН пацијената, с обзиром да Ki67 има широку примену као индикатор

пролиферативног капацитета у другим хематолошким малигнитетима. Наши резултати показују да је пролиферативни индекс, у оквиру МПН пацијената, највећи код пацијената са ПМФ а најмањи код пацијената са ЕТ дијагнозом, што упућује на то да пацијенти са ПМФ дијагнозом имају најтежи ток болести. Наши резултати су у складу са претходним студијама у којима је показано да се код МПН пацијената Ki67 маркер експримира и до 2,7 пута више у поређењу са контролама (*Malherbe* и сар., 2016). Такође је показано да је експресија Ki67 претежно нуклеарна и то у мегакариоцитима МПН пацијената (*Malherbe* и сар., 2016).

5.5 Ултраструктурне карактеристике костне сржи МПН пацијената

Испитивање ултраструктурне грађе костне сржи МПН пацијената путем електронске микроскопије показало је да пацијенте са ПВ дијагнозом карактерише панмијелоza, иако су еритроцити далеко најбројније ћелије. Поред великог броја зрих еритроцита, показано је и присуство нормобласта, ћелија мијелоидне линије као и тромбоцита. Код пацијената са ЕТ дијагнозом упадљива карактеристика јесте присуство великих мегакариоцита са сложеним системом демаркационих мембрана на периферији ћелије, које омогућавају регионалну поделу цитоплазме истицањем области за одвајање тромбоцита. Пацијенте са ПМФ дијагнозом, поред ћелија еритроидне и мијелоидне лозе, карактерише појава фиброznих влакана измађу крвних елемената. У претходним студијама такође није пронађено релевантно повећање фиброznих влакана при дијагностиковању ЕТ (*Georgii* и сар., 1996), али је показано да код ПВ, мање од 20% пацијената може имати одређени степен мијелофиброзе. Овако низак проценат се значајно разликује од више од 80% пацијената са ПМФ код којих се мијелофиброза може уочити већ по успостављању дијагнозе (*Georgii* и сар., 1996).

Разликовање 3 МПН подтипа у раној фази болести је веома важно због различитог ризика од тромбоемболијских компликација код ПВ, као и ниже стопе преживљавања ПМФ у односу на ЕТ пацијенте (*Wilkins* и сар., 2008). Резултати студије која је обухватила преко 1500 пацијената са ПВ су показали да неповољни прогностички параметри за укупно преживљавање представљају већа старост, појава венске тромбозе, присуство леукоцитозе и патолошког кариотипа (*Teffer* и сар., 2013). Око 30% пацијената са ПВ дијагнозом развија током времена мијелофиброзу, познату као пост-ПВ мијелофиброза, док се леукемијска трансформација дешава код 10% ових

пацијената (*Cervantes* и сар., 2013). Код пацијената са ЕТ присуство фиброзе је изузетно ретко и јавља се код јако малог броја пацијената (<10%), што је познато као пост-ЕТ мијелофиброза (*Cervantes* и сар., 2013). Пацијенти са префибротичном ПМФ имају мало компликација. Међутим током болести, степен ретикулинске фиброзе се повећава у костној сржи и слезини што резултује појавом колагенске фиброзе са остеосклерозом и смањеном хематопоезом (*Cervantes* и сар., 2013).

Наша студија, као и претходне, је показала да код свих МПН пацијената долази до пролиферације мегакариоцита који поседују сегментисане нуклеусе и формирају кластере у костној сржи (*Briere* и сар., 1997). Показано је да мишеви са недостатком *Gata 1* у мегакариоцитима имају повећан број незрелих мегакариоцита и озбиљну фиброзу у костној сржи (*Vannucchi* и сар., 2002). Такође је показано да код пацијената са ПМФ, мегакариоцити излучују повећане количине фибротичног цитокина TGF- β (*Ciurea* и сар., 2007). Међутим, у којој мери су мегакариоцити потребни за мијелофиброзу и да ли је циљање мегакариоцитне линије довољно да спречи болест до сада није утврђено. За сада не постоје терапијске опције, осим трансплантације, да се спречи развој фиброзе или заустави њено напредовање.

5.6 Ефекат хидроксиуреје на експресију ангиогених фактора код МПН пацијената

Хидроксиуреја представља стандардну циторедуктивну терапију која се користи у лечењу пацијената са МПН. Њен антиангиогени ефекат описан је у српастој анемији (*Lopes* и сар., 2015). У нашој студији је код 15 МПН пацијената (по 5 из сваке групе – ПВ, ЕТ и ПМФ) након 6 месеци лечења са хидроксиурејом извршена реevaluација експресије ангиогених фактора у гранулоцитима. Наши резултати показују да је степен експресије сва три ангиогена фактора - HIF-1 α , VEGF и eNOS значајно смањен у гранулоцитима свих МПН пацијената, након терапије са хидроксиурејом, што поспешује терапијски значај хидроксиуреје јер ангиогенеза доприноси развоју мијелофиброзе као крајњег неповољног стадијума болести (*Lekovic* и сар., 2016, *Campbell* и сар., 2005). Наши резултати су у складу са студијом у којој је показано да након 6 месеци лечења хидроксиурејом код МПН пацијената долази до значајног смањења VEGF и bFGF у плазми (*Lekovic* и сар., 2016). Поред тога, на HEL ћелијској линији, извршили смо и *in vitro* испитивања утицаја хидроксиуреје и специфичног

ЈАК2 инхибитора – 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана, самостално или у комбинацији, у трајању од 24 и 48 сати, на степен експресије ангиогених фактора. Наши резултати су показали да третман хидроксиурејом није успео да смањи експресију ангиогених фактора у HEL ћелијама након продуженог третмана од 24 и 48 сати, изузев VEGF након 48 сати. Третман специфичним ЈАК2 инхибитором довео је до повећања експресије ангиогених фактора након 24, али не и после 48 сати третмана. Заједнички третман хидроксиурејом и ЈАК2 инхибитором довео је до повећања експресије ангиогених фактора након 24 сата третмана, док је након 48 сати дошло до смањења експресије HIF-1 α и eNOS. Поред фактора ангиогенезе који су изразито смањени у гранулоцитима пацијената оболелих од МПН након третмана са хидроксиурејом, показано је да хидроксиуреја смањује оптерећење ЈАК2V617F мутацијом код ПВ и ЕТ пацијената само током третмана, али не и након прекида терапије (*Ricksten* и сар., 2008, *Besses* и сар., 2011). Међутим, друга студија није показала значајно смањење оптерећења ЈАК2V617F мутацијом током третмана са хидроксиурејом (*Larsen* и сар., 2009). Оптерећење ЈАК2V617F мутацијом је повезано са развојем мијелофиброзе код ПВ, али не и са појавом акутне мијелоидне леукемије (АМЛ) (*Passamonti* и сар., 2010, *Koren-Michowitz* и сар., 2012). Интересантно је да и поред интензивних клинички студија, цитостатик хидроксиуреја још увек представља терапију избора код МПН.

5.7 Ефекат ИЛ-6 и ЈАК1/2 инхибитора на ћелијски циклус и активацију ЈАК2/STAT3, MAPK и PI3K/Akt сигналних путева у гранулоцитима МПН пацијената и HEL ћелијама

ИЛ-6 представља мултифункционални цитокин за који се претпоставља да је важан активатор мијелопоезе, као одговора на хроничне инфламаторне поремећаје, укључујући и МПН (*Mirantes* и сар., 2014). Показано је да је ниво ИЛ-6 повећан код пацијената са ПМФ (*Panteli* и сар., 2005), а такође је показана и позитивна корелација између ИЛ-6 и ангиогенезе у костној сржи МПН пацијената (*Tefferi* и сар., 2011). Наша група је такође показала повећан ниво ИЛ-6 у плазми као и у костној сржи МПН пацијената, где је показана зависност од присуства ЈАК2V617F мутације код пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом (*Čokić* и сар., 2015).

У овој студији наш циљ је био да прво утврдимо утицај ИЛ-6 на степен експресије ангиогених фактора на HEL ћелијској линији са JAK2V617F мутацијом, као и у диференцираним макрофазима, у току различитог временског периода (15 минута, 30 минута, 1 сат, 2 сата и 4 сата). Наши резултати показују да се код HEL ћелија значајно повећање степена протеинске експресије HIF-1 α и eNOS фактора дешава након 30 минута, 1 сат и 2 сата третмана са ИЛ-6, док је степен протеинске експресије VEGF значајно повећан у свим временским тачкама. Међутим, у случају сва три фактора, највеће повећање степена експресије се дешавало након третмана са ИЛ-6 у трајању од 1 сата. Код диференцираних макрофага је показано, да иако постоји генерални тренд опадања степена протеинске експресије сва три фактора, највеће повећање експресије се такође дешавало након третмана у трајању од 1 сата са ИЛ-6.

Да би се испитала JAK-STAT зависност у активности ИЛ-6, у следећој фази смо користили JAK1/2 инхибитор руксолитиниб, као и специфични JAK2 инхибитор хексабромциклохексан, током првог сата инкубације. Руксолитиниб је неспецифични JAK1/2 инхибитор који доводи до значајног смањења вредности инфламаторних цитокина у ПМФ (ИЛ-1R, MIP-1, TNF- α , VEGF, ИЛ-6 и ИЛ-8), што је праћено редукцијом конституционалних симптома код 46% болесника, и волумена слезине $\geq 35\%$ код 59% болесника (Koppikar и сар., 2012). Ефикасност лека је независна од JAK2 мутационог статуса. За разлику од њега, 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан представља специфични JAK2 инхибитор за који је показано да је веома потентан инхибитор аутофосфорилације JAK2 (Sandberg и сар., 2005). О њему генерално има јако мало литературних података. Наши резултати су показали да су оба JAK1/2 инхибитора блокирала ИЛ-6 стимулацију експресије HIF-1 α у HEL ћелијама и диференцираним макрофазима, али не и експресију VEGF. Само специфични JAK2 инхибитор хексабромциклохексан је смањио ИЛ-6 стимулацију експресије eNOS протеина и у HEL ћелијама и у диференцираним макрофазима. Дакле, из ових резултата се може закључити да је повећање експресије ангиогеног фактора HIF-1 α посредовано JAK1/2 путем, док је eNOS протеина посредовано само преко JAK2 пута, и у HEL ћелијама и у диференцираним макрофазима.

Осим испитивања експресије ангиогених фактора, пратили смо такође и ефекат ИЛ-6 и JAK инхибитора на активацију JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигналних путева код HEL ћелија и диференцираних макрофага али исто тако и у гранулоцитима МПН пацијената. Наши резултати су показали да стимулација JAK2/STAT3 и MAPK сигнализације са ИЛ-6 није спречена JAK1/2 инхибиторима, док је PI3K/Akt

сигнализација блокирана са оба JAK1/2 инхибитора – и руксолитинибом и хексабромоциклохексаном у HEL ћелијама. Код диференцираних макрофага, активација JAK2/STAT3 и PI3K/Akt пута са IL-6, значајно је смањена са оба JAK инхибитора, док је стимулација MAPK пута са IL-6 појачана руксолитинибом.

Код МПН пацијената, током једносатног третмана гранулоцита са IL-6, активација JAK2/STAT3 и PI3K/Akt сигнализације показала је континуирани пораст код пацијената са ПВ и ПМФ али не и ЕТ дијагнозом, са падом после једног сата. Активирање MAPK сигнализације са IL-6 континуирано је повећано у гранулоцитима пацијената са ПВ, а редуковано у гранулоцитим пацијената са ПМФ и ЕТ дијагнозом после једног сата инкубације. Да би испитали утицај присуства JAK2V617F мутације на стимулацију сигналних путева од стране IL-6, поредили смо активирање сигналних путева код пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, са и без JAK2V617F мутације. Наши резултати су показали да присуство JAK2 мутације значајно и стабилно повећава активацију JAK2/STAT3 пута у гранулоцитима пацијената са ЕТ, а само повремено у гранулоцитима пацијената са ПМФ дијагнозом. Што се тиче PI3K/Akt сигнализације, присуство JAK2 мутације значајно повећава њено активирање само након 30 минута третмана у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом. Активација MAPK сигнализације такође је појачана у односу на присуство JAK2 мутације у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, са највећом разликом после 30 минута и обрнутим ефектом само код ЕТ пацијената након једног сата инкубације.

Поред тога, наши резултати су показали да су оба JAK инхибитора и руксолитиниб и хексабромоциклохексан спречили IL-6 активацију JAK2/STAT3 пута у гранулоцитима пацијената са ПВ дијагнозом након једног сата инкубације, као и да је фосфорилација PI3K/Akt и MAPK путева појачана руксолитинибом а слабо инхибирана хексабромоциклохексаном. У гранулоцитима пацијената са ПМФ дијагнозом је показано да на IL-6 активацију JAK2/STAT3 сигнализације не утиче ниједан JAK инхибитор, док је MAPK сигнализација повећана неспецифичним JAK1/2 инхибитором (1,6 пута) и смањена специфичним JAK2 инхибитором (1,6 пута). Такође, IL-6 није успео да активира MAPK сигнални пут у гранулоцитима пацијената са ЕТ дијагнозом, али је зато овај сигнални пут у великој мери појачан (3,5 пута) током једног сата упоредног третмана руксолитинибом. У односу на JAK2V617F статус, показано је да је присуство мутације подржало превенцију специфичног JAK2 инхибитора IL-6 инхибиције JAK2/STAT3 сигнализације, док је одсуство мутације додатно инхибирало JAK2/STAT3 сигнализацију (1,75 пута) од стране руксолитиниба.

Оба ЈАК инхибитора, у комбинацији са ИЛ-6, стимулисала су Р13К/Акт сигнализацију (до 1,7 пута) код ЈАК2 мутираних ЕТ пацијената, али не и код пацијената без ЈАК2 мутације. Штавише, руксолитиниб углавном стимулише МАРК сигнализацију (до 6,5 пута) независно од присуства мутације код пацијената са ЕТ дијагнозом, док хексабромоциклохексан благо стимулише овај сигнални пут само код ЈАК2 позитивних пацијената са ЕТ. У гранулоцитима пацијената са ПМФ дијагнозом је показано да је активација ЈАК2/STAT3 са ИЛ-6 (1,6 пута) додатно повећана са оба ЈАК инхибитора и то независно од ЈАК2 мутационог статуса. Активација Р13К/Акт сигнализације са ИЛ-6 (1,4 пута) блокирана је руксолитинибом код ЈАК2 мутираних ПМФ пацијената, док је са оба инхибитора блокирана код ПМФ пацијената без ЈАК2 мутације. Оно што је интересно је да је активација МАРК сигнализације са ИЛ-6, појачана у присуству руксолитиниба (до 1,6 пута) али редукована са хексабромоциклохексаном (до 1,7 пута) код свих пацијената са ПМФ, независно од ЈАК2 мутационог статуса.

Поред ефекта ИЛ-6 и ЈАК инхибитора на активацију пролиферативних сигналних путева, у овој студији смо такође пратили и њихов утицај на ћелијски циклус у НЕЛ ћелијама као и у гранулоцитима МПН пацијената. Наши резултати показују да оба ЈАК инхибитора, у комбинацији са ИЛ-6, значајно смањују проценат НЕЛ ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, док је руксолитиниб поништио ИЛ-6 редукцију НЕЛ ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса након 16 сати инкубације. Слично томе, оба ЈАК инхибитора додатно су смањила проценат гранулоцита ЈАК2 позитивних ПМФ пацијената у G0/G1 фази током третмана са ИЛ-6, што није постигнуто код ЈАК2 негативних ПМФ пацијената. Поред тога, код свих ПМФ пацијената, уочава се појачана апоптоза гранулоцита након 16 сати третмана са ИЛ-6 и оба ЈАК инхибитора. Велико повећање процента гранулоцита ПМФ и ЕТ пацијената утврђено је у С фази ћелијског циклуса након третмана са ИЛ-6, што је готово у потпуности укинута од стране оба ЈАК инхибитора. ИЛ-6 индуковано заустављање ћелијског циклуса у С фази такође је примећено и у гранулоцитима ПВ пацијената и такође је инхибирано са оба ЈАК инхибитора.

У нашој студији смо показали да су инфламацијом стимулисани ангиогени фактори и сигнални путеви укључени у ћелијску пролиферацију, апоптозу и ангиогенезу, истовремено регулисани ЈАК1/2 инхибицијом. У претходној студији је показано да активирани стромални фибробласти производе ИЛ-6 који доводи до појачане продукције VEGF и ангиогенезе (*Nagasaki* и сар., 2014). Такође, показано је да

STAT3 посредује у мијелоидно зависној туморској ангиогенези код мишева (*Kujawski* и сар., 2008). Поред тога, IL-6 повећава STAT3 фосфорилацију а VEGF повећава MAPK фосфорилацију у ендотелним ћелијама (*Gopinathan* и сар., 2015). Поред STAT3 активације VEGF гена и туморске ангиогенезе (*Klein* и сар., 2014), IL-6 такође повећава STAT3 ДНК-везујућу активност и експресију VEGF (*Xu* и сар., 2005). Ови подаци су у складу са нашим резултатима да IL-6 повећава експресију VEGF и STAT3 фосфорилацију у HEL ћелијама, као и STAT3 фосфорилацију код пацијената са ПВ и ПМФ дијагнозом. IL-6 смањује ниво хумане eNOS иРНК као и ниво протеина у ендотелним ћелијама путем фосфорилације STAT3 и последичног везивања у промотору eNOS-а (*Saura* и сар., 2006). Насупрот томе, IL-6 повећава ниво iNOS протеина, ниво NO и фосфорилацију STAT3, што је блокирано JAK2 инхибицијом у миоцитима (*Yu* и сар., 2003). Наши резултати показују да IL-6 повећава ниво eNOS протеина у HEL ћелијама и диференцираним макрофазима. Поред тога, STAT3 је неопходан за IL-6-индуковану и PI3K/Akt посредовану повећану експресију HIF-1 α , док активација Akt1 и STAT3 са IL-6 је праћена индукцијом и HIF-1 α и VEGF, као и туморске ангиогенезе (*Xu* и сар., 2005). Ми смо уочили да су повећање протеинског нивоа HIF-1 α са IL-6 и активирани Akt сигнализација посредовани JAK2 активацијом у HEL ћелијама. Активација Akt сигнализације такође је JAK2 посредована код пацијената са ПВ и ПМФ и под утицајем је JAK2V617F мутационог оптерећења.

IL-6 стимулише пролиферацију ћелија мултиплог мијелома, док PI3K инхибиција блокира IL-6-индуковану G1/S транзицију и застој у G1 фази ћелијског циклуса (*Hideshima* и сар., 2001). IL-6 индукција ћелија у G1 фази довољна је да индукује улазак у S фазу и спречи апоптозу (*Côté* и сар., 2005). Такође је показано да IL-6 повећава пролиферацију култивисаних хепатоцита и проценат ћелија у S фази преко активације JAK2/STAT3 и MAPK путева (*Suh* и сар., 2008). Наши резултати показују да IL-6 генерално повећава застој циклуса у S фази у гранулоцитима МПН пацијената, кроз JAK1/2 контролу. JAK2/ STAT3 пут се активира са IL-6, где се IL-6 рецептори ослањају на тирозин киназе JAK1/2, које се повезују са цитоплазматским репом gp130 и директно фосфорилишу STAT3, изазивајући транслокацију активираних STAT3 димера у нуклеус (*Yu* и сар., 2014). Активирани STAT3 повећава пролиферацију и туморску инфламацију, док инхибира апоптозу (*Klein* и сар., 2014). Према нашим резултатима IL-6 индукује смањену апоптозу, која је у великој мери појачана JAK1/2 инхибицијом. IL-6 индукована фосфорилација MAPK и Akt је делимична и није спречена инхибицијом PI3K и MAPK сигнализације у ћелијама мултиплог мијелома,

док изазивање активације STAT3 са IL-6 није спречено помоћу MAPK и PI3K инхибиције (Hideshima и сар., 2001). IL-6 активира MAPK и PI3K сигнализацију док је присуство растворљивог IL-6 рецептора неопходно за STAT3 фосфорилацију (Fahmi и сар., 2013). Ми смо показали да JAK1/2 инхибиција у великој мери активира MAPK сигнализацију у гранулоцитима ЕТ и ПМФ пацијената претходно третираних са IL-6, док индивидуална JAK2 инхибиција редукује MAPK активацију.

Клинички регистрован инхибитор IL-6, силтуксимаб, анти-L-6 антитело, у великим насумичним студијама различитих канцера, није показао никакву ефикасност, упркос потпуне инхибиције продукције Ц-реактивног протеина (енг. *C-reactive protein*, *CRP*) и почетне краткорочне инхибиције ћелијске пролиферације (Rossi и сар., 2015). Поред тога, спонтано формирање мегакариоцитних колонија код ЕТ и ПВ, такође није значајно смањено третманом са анти-IL-6 антителом (Li и сар., 1994). Делеција STAT3 незнатно смањује еритроците и вредност хематокрита, док повећава тромбоците, неутрофиле и значајно смањује преживљавање JAK2V617F knock-in мишева (Yan и сар., 2015). Делеција STAT3 у хематопоетским ћелијама из JAK2V617F мишева повећава тромбоцитозу и скраћује укупно преживљавање (Grisouard и сар., 2015). У ранијим студијама је показано да је фосфорилација STAT3 значајно већа у JAK2 позитивној групи МПН пацијената, него у JAK2 негативној, без значајне позитивне корелације између JAK2V617F алелског оптерећења и pSTAT3 вредности (Risum и сар., 2011). Повећана фосфорилација STAT3 примећена је у костној сржи ПВ и ЕТ, док је редукована код ПМФ, без обзира на присуство JAK2 мутације (Teofili и сар., 2007). Ми смо показали да је, IL-6 индукована инхибиција STAT3 фосфорилације опозвана JAK2 инхибицијом код JAK2 позитивних или додатно ослабљена JAK1/2 инхибицијом код JAK2 негативних ЕТ пацијената. Насупрот томе, IL-6 индукована активација STAT3 фосфорилације додатно је појачана JAK2 односно JAK1/2 инхибицијом код JAK2 позитивних односно JAK2 негативних ПМФ пацијената. JAK2V617F мутација је повезана са знатно повећаним нивоима фосфорилације STAT3 и Akt у мегакариоцитима и у мањој мери у другим хематопоетским ћелијама (Grimwade и сар., 2009). Ми смо показали да је IL-6 инхибиција Akt сигнализације напротив стимулирана JAK1/2 инхибицијом само у гранулоцитима JAK2 позитивних ЕТ пацијената. Међутим, IL-6 активација Akt сигнализације спречена је JAK1/2 инхибицијом код ПМФ, независно од JAK2 статуса.

6. ЗАКЛЮЧЦИ

- Испитивањем заступљености JAK2V617F мутације код оболелих од МПН је показано да је ова мутација била присутна код свих пацијената који болују од ПВ, 53% пацијената који болују од ЕТ и 61% пацијената који болују од ПМФ. Поред тога, мутација у гену за CALR присутна је код 31,9% пацијената који болују од ЕТ као и 31,7% пацијената који болују од ПМФ.
- Ангиогенеза, анализирана преко експресије HIF-1 α , VEGF и eNOS фактора, повећана је код свих МПН пацијената, независно од присуства JAK2V617F или мутације у гену за CALR. Експресија сва три фактора је већа у гранулоцитима у односу на ћелије костне сржи или CD34+ ћелије, што указује на значај инфламаторних гранулоцита у развоју ангиогенезе.
- Стандардно лечење применом хидроксиуреје код МПН пацијената има антиангиогени потенцијал у смислу смањења сва три ангиогена фактора – HIF-1 α , VEGF и eNOS у гранулоцитима.
- Експресија β -катенина значајно је повећана код пацијената са ПВ дијагнозом у односу на пацијенте са ЕТ и ПМФ дијагнозом. Код пацијената са ПВ и ЕТ дијагнозом присутно је снажно бојење у мегакариоцитима, што може упућивати да β -катенин има значајну улогу у тромбопоези ПВ и ЕТ. Код пацијената са ПМФ дијагнозом детектовано је бојење у васкуларним ендотелним ћелијама костне сржи па се може претпоставити да Wnt/ β -катенин сигнални пут има значајну ангиогену улогу у патогенези ПМФ.
- PPAR γ показује другачији образац експресије у односу на β -catenin. Највећи број PPAR γ -имунопозитивних ћелија присутан је код пацијената са ПМФ, а најмањи код пацијената са ЕТ дијагнозом. Поред тога, код свих МПН пацијената, присутан је јако мали број PPAR γ -имунопозитивних ћелија и то претежно мегакариоцита. Ови подаци указују да Wnt/ β -катенин сигнални пут инхибира експресију PPAR γ , као и да циљање Wnt/ β -катенин сигналног пута може представљати ефикасан приступ за лечење ПМФ.
- Проллиферативни индекс, праћен преко Ki67-позитивних ћелија у костној сржи МПН пацијената, значајно је већи код пацијената са ПМФ у односу на пацијенте са ПВ и ЕТ дијагнозом. Ови резултати показују да пацијенти са овом дијагнозом имају најтежи ток болести.
- JAK1/2 инхибитори блокирају IL-6 стимулацију експресије HIF-1 α , али не и експресију VEGF, у HEL ћелијама и диференцираним макрофагима, док JAK2

инхибитор смањује IL-6 стимулацију експресије eNOS фактора. Ови резултати показују да је повећање експресије HIF-1 α посредовано JAK1/2 путем а eNOS само преко JAK2 пута.

- IL-6 активација JAK2/STAT3 и PI3K/Akt сигнализације показује континуирани пораст у гранулоцитима пацијената са ПВ и ПМФ дијагнозом, док је активирање MAPK сигнализације са IL-6 континуирано повећано у гранулоцитима пацијената са ПВ а редуковано у гранулоцитима пацијената са ПМФ и ЕТ дијагнозом. Присуство JAK2V617F мутације значајно повећава активацију JAK2/STAT3, PI3K/Akt и MAPK сигнализације у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом.
- Неспецифична JAK1/2 инхибиција снажно стимулише MAPK сигнализацију у гранулоцитима пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом, за разлику од специфичне JAK2 инхибиције. Овај парадокс се може објаснити различитим молекуларним механизмом инхибиције између JAK1/2 инхибитора – руксолитиниба и JAK2 инхибитора - 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана. 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан редукује JAK2 тирозин киназну аутофосфорилацију инхибирајући лиганд зависну активацију, док руксолитиниб делује као АТР – компетитивни инхибитор JAK2 тирозин киназне активације низводних путева.
- IL-6 зауставља гранулоците МПН пацијената у С фази ћелијског циклуса, стимулишући репликацију ДНК и спречавајући апоптозу, преко JAK1/2 стимулације. Истовремено, JAK1/2 инхибиција смањује апоптозу у JAK2V617F позитивним а повећава у JAK2V617F негативним гранулоцитима пацијената са ПМФ.
- Фактори ангиогенезе стимулисани инфламацијом су повећани код МПН и смањују се применом хемиотерапије. Инфламација стимулише ДНК репликацију и JAK1/2 зависну пролиферацију, карактеристично појачану код МПН.

7. ЛИТЕРАТУРА

Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer res.* 2010; 70:447-452.

Aguayo A, Estey E, Kantarjian H et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 1999; 94:3717-3721.

Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, et al. Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2002; 95:1923-1930.

Alonci A, Allegra A, Bellomo G, et al. Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematol Oncol.* 2008; 26:235-239.

Amano K, Matsubara H, Iba O, et al. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension.* 2003; 41:156-62.

Amit-Cohen BC, Rahat MM, Rahat MA. Tumor cell-macrophage interactions increase angiogenesis through secretion of EMMPRIN. *Front Physiol.* 2013;4:178.

Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, et al. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J.* 2014;462(1):1-13.

Bangoura G, Liu Z-S, Qian Q, et al. Prognostic significance of HIF-2alpha/EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:3176–3182.

Barbui T, Barosi G, Grossi A, et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for the Bone Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2004; 89:215-32.

Baskin R, Majumder A, Sayeski PP. The recent medicinal chemistry development of JAK2 tyrosine kinase small molecule inhibitors. *Current Medicinal Chemistry.* 2010; 17:4551-58.

Beleslin-Čokić BB, Čokić VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. 2004; 104:2073-80.

Besses C, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, et al. Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. *Br J Haematol*. 2011; 152(4):413-9.

Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, et al. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*. 2005; 208:177-92.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:309-314.

Briere J, Kiladjian JJ, Peynaud-Debayle E. Megakaryocytes and platelets in myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol*. 1997; 10:65-88.

Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991; 138:213-21.

Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovascular Res*. 2007; 75:275-282.

Burkitt MJ, Raafat A. Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in the management of myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006; 107:2219-22.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005; 366:1945-53.

Castro-Malaspina H. Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. *Prog Clin Biol Res*. 1984; 154:427-454.

Cervantes F, Alvarez-Larran A, Talarn C, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol.* 2002; 118:786-90.

Cervantes F, Marinez-Trillos A. Myelofibrosis: an update on current pharmacotherapy and future directions. *Exp Opin Pharmacother.* 2013; 14:873-84.

Chen H, Shen Y, Gong F, Jiang Y, Zhang R. HIF- α promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation by upregulating p21 expression. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 72:179–183.

Chen Q, Zhuang Q, Mao W, et al. Inhibitory effect of cryptotanshinone on angiogenesis and Wnt/b-catenin signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Integr Med.* 2014; 20:743-750.

Chin K, Kurashima Y, Ogura T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 1997; 15:437–442.

Choi KS, Bae MK, Jeong JW, et al. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003; 36:120-7.

Chou MT, Wang J, Fujita DJ. Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem.* 2002; 3:32.

Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2007; 110:986-993.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127:469–480.

Coltella N, Percio S, Valsecchi R, et al. HIF factors cooperate with PML-RAR α to promote acute promyelocytic leukemia progression and relapse. *EMBO Mol Med.* 2014; 6:640–650.

Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum free medium. *Blood*. 1994; 83:99-112.

Côté S, Lemieux R, Simard C. The survival of IL-6-dependent myeloma cells critically relies on their capability to transit the G1 to S phase interval of the cell cycle. *Cell Signal*. 2005; 17(5):615-24.

Čokić VP, Mitrović Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, et al. Proinflammatory cytokine IL-6 and JAK-STAT signaling pathway in myeloproliferative neoplasms. *Mediat Inflamm*. 2015; ID453020.

Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry of the breast. In: Diagnostic Immunohistochemistry, Dabbs DJ (ed), Churchill, Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2002; pp 536-58.

Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, et al. Polycythemia vera.II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood Rev*. 1992; 80:891-899.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951; 6:372-375.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013; 14:986-995.

de Freitas RM, da Costa Maranduba CM. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: an overview. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(5):348-353.

Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische thrombozythamie bei vascularer schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol*. 1934; 293:233-48.

Fahmi A, Smart N, Punn A, et al. p42/p44-MAPK and PI3K are sufficient for IL-6 family cytokines/gp130 to signal to hypertrophy and survival in cardiomyocytes in the absence of JAK/STAT activation. *Cell Signal*. 2013; 25(4):898-909.

Fernandez-S'anchez R, Berzal S, S'anchez-Nino M-D, et al. AG490 promotes HIF-1 α accumulation by inhibiting its hydroxylation. *Curr Med Chem*. 2012; 19(23):4014–4023.

Forristal CE, Brown AL, Helwani FM, et al. Hypoxia inducible factor (HIF)-2 α accelerates disease progression in mouse models of leukemia and lymphoma but is not a poor prognosis factor in human AML. *Leukemia*. 2015; 29:2075–2085.

Frater JL, Kay NE, Goolsby CL, et al. Dysregulated angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia: morphologic, immunohistochemical and flow cytometric evidence. *Diagn Pathol*. 2008; 3:16.

Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol*. 2007; 435:403–419.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:2604-9.

Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 2001;20(20):2499-2513.

Garcia-Bates TM, Lehmann GM, Simpson-Haidaris PJ, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the treatment of hematological malignancies. *PPAR Res*. 2008; 2008:834612.

Georgii A, Buhr T, Buesche G, et al. Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma*. 1996; 20:15–29.

Gerhold DL, Liu F, Jiang G, et al. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology*. 2002; 143:2106-2118.

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev*. 2004; 18:2183-2194.

Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, et al. Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol*. 2005; 129:138-150.

Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344:1084-1086.

Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, et al. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res*. 2015; 75(15):3098-3107.

Grimwade LF, Happerfield L, Tristram C, et al. Phospho-STAT5 and phospho-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2009; 147:495-506.

Grisouard J, Shimizu T, Duek A, et al. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. *Blood*; 2015; 125(13):2131-2140.

Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787-798.

Harrison C. JAK inhibitors and myelofibrosis, einstein and ruxolitinib. *Haematologica*. 2015;100(4):409-411.

Hasselbalch HC. Perspectives on the impact of JAK inhibitor therapy upon inflammation-mediated comorbidities in myelofibrosis and related neoplasms. *Exp Rev Hemat*. 2014; 7(2):203–216.

Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al. Review: hypoxia-inducible factor -1 (HIF-1): a novel transcriptional factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* 2005; 25(6):297-310.

Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, et al. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene.* 2001; 20(42):5991-6000.

Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of Stat3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000; 19:2548-2556.

Hoermann G, Greiner G, Valent P. Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:869242.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche et al. VEGF upregulates eNOS message, protein and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 273(3Pt2):H1054-1058.

Huang LE, Willmore WG, Gu J, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem.* 1999; 274:9038–9044.

James C, Mazurier F, Dupont S, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood.* 2008; 112:2429-2438.

Jauregui MP, Sanchez SR, Ewton AA, et al. The role of b-catenin in chronic myeloproliferative disorders. *Hum Pathol.* 2008; 39:1454-1458.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 2001; 12:363-369.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996; 271(4 Pt 1): C1172-C1180.

Jung JE, Lee HG, Cho IH, et al. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J*. 2005; 19:1296-1298.

Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:51

Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*. 2004; 279:2550-2558.

Kim Y, Schmidt M, Endo T, et al. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway with the antifungal agent ciclopirox olamine in a murine myeloma model. *In Vivo*. 2011; 25:887-893.

Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2003; 50:49-59.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*. 2000; 95:189–197.

Klein JD, Sano D, Sen M1, et al. STAT3 oligonucleotide inhibits tumor angiogenesis in preclinical models of squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9(1):e81819.

Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014; 506:240-244.

Koren-Michowitz M, Landman J, Cohen Y, et al. JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53(11):2210-2213.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352:1779-1790.

Kroger N, Mesa RA. Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. *Leukemia*. 2008; 22:474-486.

Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, et al. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118(10):3367-3377.

Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, et al. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood.* 2008; 112:2199-2204.

Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, et al. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol.* 2015; 95(4):270-279.

Larsen TS, Pallisgaard N, de Stricker K et al. Limited efficacy of hydroxyurea in lowering of the JAK2 V617F allele burden. *Hematology.* 2009; 14(1):11-5.

Leković D, Gotić M, Skoda R, et al. Bone marrow microvessel density and plasma angiogenic factors in myeloproliferative neoplasms: clinicopathological and molecular correlations. *Ann Hematol.* 2017; 96(3):393-404.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7:387-397.

Levy DE, Darnell Jr JE. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9):651–662.

Li Y, Hetet G, Maurer AM, et al. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br J Haematol.* 1994; 87(3):471-476.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(8):627–644.

Liu Y, Christou H, Morita T, et al. Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene *via* the 5' enhancer. *J Biol Chem.*1998; 273:15257–15262.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:781-810.

Long MW, Heffner CH, Williams JL, et al. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest*. 1990; 85:1072-1084.

Lopes FC, Traina F, Almeida CB, et al. Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea. *Haematologica*. 2015; 100:730-739.

Lucet IS, Fantino E, Styles M, et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood*. 2006; 107:176-183.

Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123:2220-2228.

Maktouf C, Bounemra A, Mahjoub S, et al. Evaluation of serum VEGF levels in untreated erythrocytosis patients. *Pathol Biol (Paris)*. 2001; 59: 240-242.

Malherbe JA, Fuller KA, Arshad A, et al. megakaryocytic hyperplasia in myeloproliferative neoplasms is driven by disordered proliferative, apoptotic and epigenetic mechanisms. *J Clin Pathol*. 2016; 69:155-163.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454:(7203):436-444.

Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(12):2168-2178.

Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*. 1982; 216:1233-1235.

Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2001; 11:293-299.

Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 2009;8(8):1168-1175.

Mertens C, Darnell JE, Jr. SnapShot: JAKSTAT signaling. *Cell*. 2007; 131:612.

Mesa RA, Miller CB, Mascarenhas JO, et al. Hydroxyurea Treatment History and Quality of Life in Patients with Polycythemia Vera: Results from the MPN Landmark Survey in the United States. *Blood* 2015;126:4077.

Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med.* 2013; 17:30–54.

Mirantes C, Passegué E, Pietras EM. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res.*2014; 329(2):248–254.

Mondet J, Hussein K, Mossuz P. Circulating Cytokine Levels as Markers of Inflammation in Philadelphia Negative Myeloproliferative Neoplasms: Diagnostic and Prognostic Interest. *Mediators of Inflammation.*2015;2015:670580.

Moskalev EA, Luckert K, Vorobjev IA, et al. Concurrent epigenetic silencing of wnt/b-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer.* 2012; 12:213.

Murate T, Saga S, Hotta T, et al. The close relationship between DNA replication and the selection of differentiation lineages of human erythroleukemia cell lines K562, HEL and H1 into either erythroid or megakaryocytic lineages. *Exp Cell Res.* 1993; 208:35-43.

Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998; 101:2567-2578.

Murohara T, Witzensichler B, Spyridopoulos I, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1156-1161.

Murray J. Myeloproliferative disorders. *Clin Med.* 2005; 5(4):328-332.

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*. 2014; 110(2):469-478.

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405.

O'Shea JJ, Park H, Pesu M, et al. New strategies for immunosuppression: interfering with cytokines by targeting the Jak/Stat pathway. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17(3):305-311.

Panteli K, Bai M, Hatzimichael E, et al. Serum levels and bone marrow immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematology*. 2007; 12:481-486.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006; 108:3472-3476.

Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13:S61-75.

Pemmaraju N, Kantarjian H, Kadia T, et al. Phase I/II study of the Janus kinase (JAK)1 and 2 inhibitor ruxolitinib in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2015; 15(3):171-176.

Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med*. 1974; 290:1382.

Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J, et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10:127-140.

Rahat MA, Hemmerlein B, Iragavarapu-Charyulu V. The regulation of angiogenesis by tissue cell-macrophage interactions. *Front Physiol*. 2014;5: 262.

Rajkumar SV, Mesa RA, Tefferi A. A review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematologic malignancies. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2002; 11:33–47.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. (prevod sa engleskog jezika: *Pharmacology 5th ed. Elsevier Science*, 2003). Data status, Beograd, 2005; 208-216; 603-608.

Riabov V, Gudima A, Wang N, et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014 Mar 5;5:75.

Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review. *Neoplasia*. 1999; 1:293–302.

Ribatti D. Is angiogenesis essential for the progression of hematological malignancies or is it an epiphenomenon? *Leukemia*. 2009; 23:433–434.

Ricksten A, Palmqvist L, Johansson P et al. Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008; 93(8):1260-1261.

Risum M, Madelung A, Bondo H, et al. The JAK2V617F allele burden and STAT3- and STAT5 phosphorylation in myeloproliferative neoplasms: early prefibrotic myelofibrosis compared with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *APMIS*. 2011; 119(8):498-504.

Rossi JF, Lu ZY, Jourdan M, Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(6):1248-1257.

Rumi E, Passamonti F, Pietra D, et al. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer*. 2006;107:2206-2211.

Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, Gaudin F, et al. IL-24 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Engaged into the Cell Cycle through Dephosphorylation of STAT3 and Stabilization of p53 Expression. *J Immunol*. 2008; 181(9):6051-6060.

Sakano K, Oikawa S, Hasegawa K, et al. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92:1166-1174.

Sandberg EM, Ma X, He K, et al. Identification of 1,2,3,4,5,6-Hexabromocyclohexane as a Small Molecule Inhibitor of Jak2 Tyrosine Kinase Autophosphorylation. *J Med Chem*. 2005; 48:2526-2533.

Santos FPS, Kantarjian HM, Jain N et al. Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*. 2010; 115:1131-1136.

Saura M, Zaragoza C, Bao C, et al. Stat3 mediates interleukin-6 inhibition of human endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*. 2006; 281(40):30057-30062.

Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, et al. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood Rev*. 2006; 108:2435-2437.

Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007; 356:459-468.

Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, et al. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal*. 2017;15:23.

Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Mol Med*. 2001; 7:345-350.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (10):721-732.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219:983-985.

Serinsöz E, Neusch M, Büsche G, et al. Aberrant expression of b-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004; 126:313-319.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; 376:62-66.

Sharma C, Pradeep A, Wong L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem*. 2004; 279:35583-35594.

Shi J, Chen J, Yeleswaram S, et al. An open-label assessment of the effects of CYP3A4 inhibitors on the PK/PD of INCB018424 in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*. 2009; 49(Abstr. 10).

Singh A, Xu YJ. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel)*. 2016;7(11). pii: E99.

Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(2):136-154.

Song K, Li M, Xu X-J, et al. HIF-1 α and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15:1823–1829.

Stein BL, Williams DM, Wang NY, et al. Sex differences in the JAK2V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2010; 95:1090-1097.

Stern JE. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signaling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004; 84:197-215.

Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007; 28(12):551– 558.

Suh HN, Lee SH, Lee MY, et al. Role of interleukin-6 in the control of DNA synthesis of hepatocytes: involvement of PKC, p44/42 MAPKs, and PPARdelta. *Cell Physiol Biochem.* 2008; 22(5-6):673-684.

Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPAR gamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5:442-447.

Tefferi A, Huang J, Schwager S, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution. *Cancer.* 2007; 109:2083-2088.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposal and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood.* 2007; 110:1092-1097.

Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood.* 2011; 117(13):3494-3504.

Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia.* 2010;24:1128-38

Tefferi A. Primary myelofibrosis. *Cancer Treat Res.* 2008; 142:29-39.

Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *Journal of Clinical Oncology.*2011; 29(10):1356–1363.

Temerinac S, Klippel S, Strunck E, et al. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood.* 2000; 95:2569-2576.

Teofili L, Martini M, Cenci T, et al. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood*. 2007; 110(1):354-359.

Teofili L, Martini M, Luongo M, et al. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2002; 20:4249-4254.

Thakur R, Mishra DP. Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy. *J Cell Mol Med*. 2013; 17:449-456.

Thiele J. Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disease. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(2):261-280.

Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biol Med*. 2008; 45:18-31.

Tippeswamy T, McKay JS, Quinn JP, et al. Nitric oxide, a biological double-faced janus-Is this good or bad?. *Histol Histopathol*. 2006; 21:445-458.

Vainchenker W, Leroy E, Gilles L, et al. JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Res*. 2018;17(7):82.

Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*. 2002; 100:1123-1132.

Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa R, et al. Safety and efficacy of a JAK1 and JAK2 inhibitor, INCB018424, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010; 363:1117-1127.

Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *American Society of Hematology: Education Program*. 2009; 636-642.

Virchow R. Die Krankhaften Geschwulste. August Hirschwald: Berlin. 1863, pp1-255.

Weerasinghe P, Li Y, Guan Y, et al. T40214/PEI complex: a potent therapeutics for prostate cancer that targets Stat3 signaling. *Prostate*. 2008; 68:1430-1442.

Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*. 2008; 111:60-70.

Xu Q, Briggs J, Park S, et al. Targeting STAT3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*. 2005; 24:5552-5560.

Yan D, Jobe F, Hutchison RE, et al. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice. *Leukemia*. 2015; 29(10):2050-61.

Yang J, Liao X, Agarwal MK, et al. Unphosphorylated Stat3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NfκB. *Genes Dev*. 2007; 21:1396-1408.

Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(11):736-746.

Yu X, Kennedy RH, Liu SJ. JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278(18):16304-16309.

Zhang Z, Wu L, Wang J, et al. Correction: Opposing Effects of PI3K/Akt and Smad-Dependent Signaling Pathways in NAG-1-Induced Glioblastoma Cell Apoptosis. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205391.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1α expression by the epidermal growthfactor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*. 2000; 60:1541-1545.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999; 59:5830-5835.

Medinger M, Passweg J. Role of tumor angiogenesis in hematological malignancies. *Swiss Med Wkly.* 2014; 144:w14050.

Прилог – Списак скраћеница

AML – акутна мијелоидна леукемија

AP-1 – транскрипциони фактор

bFGF (енг. *basic fibroblast growth factor*) - базични фактор раста фибробласта

CALR - калретикулин

DAВ – ди-амино-бензидином

ДНК – деоксирибонуклеинска киселина

ЕЦМ - екстрацелуларног матрикса

EDTA (енг. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – етилендиаминтетрасирћетна киселина

EGF (енг. *epidermal growth factor*) - епидермални фактор раста

EGF (енг. *epidermal growth factor*) - фактор раста епидерма

EGFR (енг. *epidermal growth factor receptor*) - рецептор епидермалног фактора раста

ЕПО - еритропоетин

ЕТ (енг. *essential thrombocythemia*) – есенцијална тромбоцитемија

eNOS - ендотелна азот оксид синтетаза

EPOR - рецептор еритропоетина

ERK (енг. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*) – киназа регулисана

екстрацелуларним сигнаlima; сигнални молекули

FAD - флавин аденин динуклеотида

FDA (енг. *US Food and Drug Administration*) - Америчке администрација за храну и лекове

FMN - флавин мононуклеотид

G-CSFR (енг. *Granulocyte colony – stimulating factor receptor*) – рецептор фактора стимулације раста гранулоцитних колонија

GM-CSF (енг. *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) – фактор стимулације раста гранулоцитно-макрофагних колонија

HGF (енг. *hepatocyte growth factor*) - фактор раста хепатоцита

HIF-1 (енг. *Hypoxia-inducible factor 1*) - Хипоксија индуцибилни фактор 1; транскрипциони фактор

ХМЛ – хронична мијелоидна леукемија

HRE (енг. *hypoxia responsive elements*) - хипоксија-одговорни елементи у генима

HRP (енг. *Horse radish peroxidase*) – пероксидаза рена

HUVEC (енг. *Human umbilical vein endothelial cells*) - хумане ендотелне ћелије изоловане из умбиликалне вене

IFN- γ – интерферон γ

IGF-1 (енг. *Insulin-like Growth Factor 1*)- инсулину сличан фактор раста 1

IL - интерлеукин

iNOS – индуцибилна азот оксид синтетаза

IRES (енг. *internal ribosome entry site*) - унутрашње рибозомско улазно место

ЈАК - (енг. *janus kinase*) - нерецепторских тирозин киназа

ЛОH (енг. *loss of heterozygosity*) - губитак хетерозиготности

ЛСМ (енг. *Lymphocyte Separation Medium*) – медијум за раздвајање лимфоцита; лимфопреп

МАРК (енг. *Mitogen Activated Protein Kinases*) – митогеном активирани протеин киназе

МВД - микроваскуларна густина

ММП (енг. *matrix metalloproteinase*) - матриксне металопротеиназе

МПН (енг. *myeloproliferative neoplasm*) – мијелопролиферативне неоплазме

MPL - рецептор тромбопоетина

NF-E2 (енг. *nuclear factor erythroid-derived 2*) - једарни фактор еритроидне лозе

NF- κ B - нуклеарни фактор κ B; транскрипциони фактор

nNOS - неурална азот оксид синтетаза

NO - азот оксид

NOS (енг. *Nitric oxide synthase*) - азот оксид синтетаза

NOX-1 - хем-оксигеназа -1

NRP-1 – неуропилин, некиназни рецептор

PDGF (енг. *Platelet-derived growth factor*) – тромбоцитни фактор раста

PGF (енг. *placental growth factor*) - плацентни фактор раста

PHD (енг. *prolyl hydroxylase*) - пролил-хидроксилаза

PI (енг. *Propidium Iodide*) – пропидијум јодид

PI-3K (енг. *phosphatidylinositol 3-kinase*) - фосфатидилинозитол 3-киназа

PLC- γ (енг. *Phospholipase C, gamma 1*) – фосфолипаза Ц

ПМФ (енг. *primary myelofibrosis*) – примарна мијелофиброза

PPAR γ (енг. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) - Пероксизом пролифератор-активирани рецептор гама; транскрипциони фактор

PRV1 - полицитемија рубра вера 1

PTEN (енг. *Phosphatase and tensin homolog*) - тензин делетирани хомолог хромозома 10

ПВ (енг. *polycythemia vera*) – полицитемија вера

РНК – рибонуклеинска киселина

SCF (енг. *Stem Cell Factor*) – фактор матичних ћелија

SPARC (енг. *secreted protein acidic and rich in cysteine*) -

STAT3 (енг. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) – преносник сигнала и активатор транскрипције; транскрипциони фактор

СЗО - Светска здравствена организација

TAMs (енг. *Tumor-associated macrophages*) - макрофази повезани са тумором

TNF (енг. *tumor necrosis factor*) - фактор некрозе тумора

TPA (енг. *Tetradecanoyl phorbol acetate*) - тетрадеканоил форбол ацетат

VEGF (енг. *vascular endothelial growth factor*) - фактор раста васкуларног ендотела

VEGFR1 (Flt1, енг. *vascular endothelial growth factor receptor 1*) – рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 1

VEGFR2 (KDR, енг. *vascular endothelial growth factor receptor 2*) – рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 2

VHL (енг. *von Hippel-Lindau*) - E3 лигазни комплекс

Биографија аутора

Тијана Суботички је рођена 12. априла 1979. године у Београду. Основну школу Марија Бурсаћ као и 5. београдску гимназију завршила је у Београду са одличним успехом. На Биолошком факултету, Универзитета у Београду (група Општа биологија, смер Хистологија и ембриологија) дипломирала је 02.јула 2008. године са просечном оценом 9,06. Дипломски рад „Катехоламини у тимусу пацова током старења“ урадила је на Институту за имунолошка истраживања „Бранислав Јанковић“ на Торлаку у Београду и одбранила са оценом 10. Докторске студије на истом факултету, студијски програм Биологија ћелија и ткива, уписала је шк. 2010/2011. године и положила све испите са просечном оценом 9,42.

Од јуна 2011. године запослена је у истраживачком звању, прво као истраживач приправник, а потом од фебруара 2014. као истраживач сарадник на Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду у Научноистраживачкој групи за молекуларну онкологију. У току досадашњег научноистраживачког рада била је ангажована на пројекту „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ (2011-2019), који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја. Поред тога била је ангажована на међународном пројекту „Determination of the mutational landscape and clonal architecture and its application in angiogenesis and thrombosis of MPN patients“ (2014-2016) који је финансирао Swiss National Science Foundation у сарадњи са Department of Biomedicine, University Hospital Basel, Швајцарска. Боравила је на Одсеку за биомедицину у Универзитетској болници у Базелу, Швајцарска, 2017. године у оквиру једномесечног стручног усавршавања. Добитник је награде за најбољи рад Института за медицинска истраживања у 2018. години.

До сада је у сарадњи са другим ауторима објавила 31 библиографску јединицу: 5 радова у водећим часописима међународног значаја (M21), 3 рада у истакнутим часописима међународног значаја (M22), 8 радова у међународним часописима (M23) и 15 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Тијана М. Суботички**

Број индекса **Б3017/2010**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 α и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 24. децембар 2018.године.

Суботички Т.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Тијана М. Суботички**

Број индекса **Б3017/2010**

Студијски програм **Биологија ћелија и ткива**

Наслов рада

Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 α и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR

Ментори **Др Оливера Митровић Ајтић**, научни сарадник,

Институт за медицинска истраживања,

Универзитет у Београду

Др Маја Чакић Милошевић, доцент

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 24. децембар 2018. године

Суботички Т.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа експресије eNOS и ангиогених фактора HIF-1 α и VEGF у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутација у генима за JAK2 и CALR

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 24. децембар 2018. године

Суботићки ЈП.

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.