

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nové možnosti terapie primární myelofibrózy

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Antonín Vlček**
Osobní číslo: **C19309**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Nové možnosti terapie primární myelofibrózy**
Téma práce anglicky: **New Possibilities Of Treatment Of Primary Myelofibrosis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Patogenezi, symptomatologii a diagnostiku primární myelofibrózy.
2. Současnou terapii a prognózu vývoje onemocnění.
3. Nové možnosti terapie primární myelofibrózy – inhibitory JAK a histonových deacetyláz, hypometylační látky atd.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 18. prosince 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 1. července 2022

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem *Nové možnosti terapie primární myelofibrózy* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23.6. 2022

Antonín Vlček v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád vyjádřil upřímné poděkování vedoucímu bakalářské práce, panu RNDr. Karlovi Královcovi, Ph.D., za jeho trpělivý přístup, cenné rady, připomínky a návrhy, které mi během vypracovávání této bakalářské práce poskytoval. Dále bych rád poděkoval mé rodině za jejich projevanou podporu při studiu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce zpracovává téma nových možností terapie primární myelofibrózy. Jednotlivé kapitoly poskytují vhled do komplexnosti daného onemocnění, zahrnující patogenezi, diagnostiku a symptomatologii. Poslední kapitola, věnovaná terapii, shrnuje nejen dosavadní konvenční přístupy terapie primární myelofibrózy, ale zabývá se také novými možnostmi terapie. Tyto nové možnosti zahrnují inhibitory Janusových kináz, histonových deacetyláz nebo hypometylační látky. Dalšími příklady jsou inhibitory telomerázy, Aurora kinázy A či inhibitory anti-apoptické signalizace.

KLÍČOVÁ SLOVA

primární myelofibróza, myeloproliferativní neoplázie, patogeneze, léčba

TITLE

New Possibilities Of Treatment Of Primary Myelofibrosis

ANNOTATION

This Bachelor thesis deals with the topic of new possibilities of treatment of primary myelofibrosis. Individual chapters provide an insight into the disease complexity, including pathogenesis, diagnostics and symptomatology. The last chapter is dedicated to therapy and summarizes existing conventional treatment approaches of primary myelofibrosis as well as the new treatment possibilities. These new possibilities include Janus kinase inhibitors, histone deacetylase inhibitors or hypomethylating agents. Another examples are inhibitors of telomerase, Aurora kinase A or inhibitors of anti-apoptotic signaling pathways.

KEYWORDS

primary myelofibrosis, myeloproliferative neoplasm, pathogenesis, therapy

OBSAH

ÚVOD.....	13
1 PRIMÁRNÍ MYELOFIBRÓZA	14
1.1 Patogeneze	14
1.1.1 Vliv mutace Janusovy kinázy 2	14
1.1.2 Mutace kalretikulinu	18
1.1.3 Mutace trombopoetinového receptoru	20
1.1.4 Další mutace.....	21
1.1.5 Mutace ASXL1	23
1.1.6 Mutace EZH2.....	24
1.1.7 Mutace SRSF2	25
1.1.8 Mutace izocitrát dehydrogenázy	26
1.1.9 Mutace TET2	27
1.1.10 Vlivy mikroprostředí kostní dřeně	28
2 DIAGNOSTIKA	30
2.1 Diagnostická kritéria	30
2.2 Hodnocení fibrózy kostní dřeně	32
2.3 Prognostické modely.....	33
2.3.1 Mezinárodní prognostické skórovací systémy	33
2.3.2 Mutační prognostický skórovací systém.....	34
2.3.3 Genetický prognostický skórovací systém.....	35
3 SYMPTOMATOLOGIE	36
4 TERAPIE	38
4.1 Současná léčebná terapie	38
4.1.1 Alogenní transplantace krvetvorných buněk	38
4.2 Současná symptomatologická terapie	39
4.2.1 Splenektomie.....	39
4.2.2 Hydroxyurea	40
4.2.3 Interferon alfa.....	41
4.2.4 Danazol	42
4.2.5 Imunomodulační léčiva.....	42
4.3 Nové možnosti terapie	43
4.3.1 Inhibitory Janusových kináz	43

4.3.1.1	Ruxolitinib	43
4.3.1.2	Fedratinib	45
4.3.1.3	Pacritinib	45
4.3.1.4	Momelotinib.....	46
4.3.2	Hypometylační látky	47
4.3.2.1	Azacitidin.....	47
4.3.2.2	Decitabin.....	48
4.3.3	Inhibitory histonových deacetyláz	48
4.3.3.1	Panobinostat.....	48
4.3.4	Inhibitor telomerázy – Imetelstat	49
4.3.5	Inhibitor Aurora kinázy A – Alisertib.....	50
4.3.6	Antagonista inhibitorů apoptózy – LCL161	50
4.3.7	Inhibitor anti-apoptického Bcl-2 proteinu – Venetoclax	51
5	ZÁVĚR.....	52
6	LITERATURA.....	53

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktury Janusových kináz (JAKs) a molekul přenašečů (STATs).....	16
Obrázek 2: JAK/STAT signalizační cesta	16
Obrázek 3: A) asociace mutace v JAK2 s receptory; B) asociace mutace pro CARL	17
Obrázek 4: Ilustrace rozdílu mezi molekulami CALR ^{WT} a CALR ^{mutantní}	19
Obrázek 5: Lokalizace mutací v receptoru pro trombopoetin	21
Obrázek 6: Závislost přežití pacientů s PMF na (ne)přítomnosti mutací určité kategorie	22
Obrázek 7: Závislost doby přežití na mutačním profilu CALR/ASXL1	24
Obrázek 8: Vzorky kostní dřene s patrnými vlákny retikulinu a svazky kolagenu (šipky).....	32
Obrázek 9: Vzory hematopoézy ve slezině; nodulární (A), difuzní (B) a smíšený (C).....	37
Tabulka 1: Kritéria pro diagnostiku prefibrotické PMF (pre-PMF).....	30
Tabulka 2: Kritéria pro diagnostiku primární myelofibrózy se zjevnou fibrotizací (overt-PMF)	31
Tabulka 3: Systém hodnocení stupně fibrózy kostní dřene	32
Tabulka 4: Charakteristika prognostických modelů IPSS/DIPSS/DIPSS-plus	34
Tabulka 5: Prognostický model MIPSS70+ verze 2.0.....	35
Tabulka 6: Prognostický model – geneticky inspirovaný – (GIPSS).....	35

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

MPNs	Myeloproliferativní neoplázie
PMF	Primární myelofibróza
PV	Pravá polycytémie
ET	Esenciální trombocytémie
JAK2	Janusova kináza 2
CALR	Kalretikulin
MPL	Trombopoetinový receptor
BCR-ABL1	Fúzní gen
ASXL1	Polykombní epigenetický faktor
SH2	Src homologie 2
STAT	Přenašeče signálu a aktivátory transkripce
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-kináza/ protein kináza B
RAS/MAPK	Signalizační molekula/ mitogenem aktivovaná protein kináza
PDGF	Růstový faktor odvozený od destiček
TYK2	Tyrozín kináza 2
FERM	Proteinová doména
JH1-7	Janusovy homologní domény 1-7
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
JAK2V617F	Mutace Janusovy kinázy 2
EPOR	Receptor pro erytropoetin
G-CSFR	Receptor pro kolonie stimulující faktor pro granulocyty
KDEL	Signální sekvence

WT	Divoký typ
Bp	Pár bází
HSCs	Hematopoetické kmenové buňky
W515L; K; A; R	Mutace receptoru pro trombopoetin
RWQFP	Amfipatický motiv
EZH2	Metyltransferáza
SRSF2	Faktor sestřihu
IDH1/2	Izocitrát dehydrogenáza 1 a 2
CD34	Znak kmenových buněk
MIPSS70	Prognostický systém
MIPSSv2	Prognostický systém, zkrácené označení pro MIPSS70+ verze 2.0
U2AF1	Faktor sestřihu
AML	Akutní myeloidní leukémie
TET2	Dioxygenáza
RUNX1	Transkripční faktor
TP53	Tumor supresorový gen
SH2B3	Regulační bílkovina
PTPN11	Protein tyrosin fosfatáza
PRC1/2	Polykombní represivní proteinové komplexy 1 a 2
H3K27me2/3	Metylovaný histon
TGF- β	Transformující růstový faktor beta
Pre-mRNA	Prekurzor mediátorové ribonukleové kyseliny
DIPSS	Prognostický systém
2-OG	2-oxoglutarát

D-2-HG	D-2-hydroxyglutarát
NADPH	Redukovaný kofaktor
NADP ⁺	Oxidovaný kofaktor
sAML	Sekundární akutní myeloidní leukémie
MPN-BP	Blastická fáze myeloproliferací
IL-	Interleukin
Gata1	Transkripční faktor
pre-PMF	Prefibrotická primární myelofibróza
overt-PMF	Zjevná primární myelofibróza
IPSS	Prognostický model
MPN-SAF	Dotazník pro hodnocení symptomů
CXCL12	Chemokin
CXCR4	Chemokinový receptor
MMP-2	Metaloproteináza 2
AHSCT	Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk
GvHD	Reakce štěpu proti hostiteli
IFN α	Interferon alfa
FLT3	Receptorová tyrosin kináza
-TTAGGG-	Sekvence dusíkatých bází
cIAP1/2	Celulární inhibitor apoptózy 1 a 2
Bcl-2	Skupina proteinů regulující apoptózu
Bcl-2	Anti-apoptotický protein
BH3	Homologní doména

ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá primární myelofibrózou, jakožto zástupcem z rodiny onemocnění spadající do myeloproliferativních neoplazmat. Jedná se o stav, pro který je typická fibrotizace kostní dřeně, což má za následek její postižení z hlediska morfologie, ale také funkce, spočívající v tvorbě buněk myeloidní, respektive lymfoidní řady.

Dle klasifikace Světové zdravotnické organizace je kategorie myeloproliferativních neoplázií (MPNs) tvořena celkem sedmi onemocněními. Kromě, pro tuto práci stěžejní, primární myelofibrózy (PMF) je zde také zařazena např. pravá polycytémie (PV) nebo esenciální trombocytémie (ET) (Barbui a kol., 2018a; Tefferi, 2021). Samotná incidence těchto onemocnění se pohybuje v rozmezí 0,5 – 2,5 případů na 100 tisíc obyvatel – pro oblast Evropy a Severní Ameriky – což je řadí mezi méně běžná onemocnění, ale s rizikem rozvoje akutní fáze se zvýšeným počtem blastických buněk. Dochází tedy k progresi onemocnění a rozvoji např. akutní myeloidní leukemie (Wilkins, 2021).

V rámci této kategorie tvoří PMF, PV a ET pomyslnou trojici, která si je příbuzná nejen přítomností specifických mutací – především Janusova kináza 2 (JAK2) / kalretikulin (CALR) / trombopoetinový receptor (MPL) – ale také klinickým nálezem. Pacienti mohou získat i jiné mutace, mající vliv na progresi onemocnění nebo leukemickou transformaci (Tefferi, 2021). Pro spolehlivější rozlišení je tedy vhodné využít komplexní zhodnocení kombinace klinických, morfologických a genetických znaků (Barbui a kol., 2018a), jelikož může docházet k rozvoji sekundární myelofibrózy z původně diagnostikované pravé polycytémie a esenciální trombocytémie (Vainchenker a Kralovics, 2017)

Již z historického hlediska se k terapii tohoto onemocnění přistupovalo jako k paliativní péči, kdy dochází k mírnění symptomů s ním spojených. Objev nové léčebné strategie v podobě inhibitorů Janusových kináz přinesl zvýšený zájem a naději (Emanuel a kol., 2012). Přesto do dnešních dní zůstává alogenní transplantace krvetvorných buněk jedinou možností, která může potenciálně zvrátit průběh onemocnění a tím prodloužit život pacienta, ale s relativně vysokým rizikem morbidit (Tefferi, 2021).

Následující strany práce cílí nejen na komplexní popis onemocnění PMF, zahrnující patogenezi, klinický obraz, diagnostiku a dosavadní možnosti léčby, ale důraz je také kladen na nové a moderní přístupy k léčbě primární myelofibrózy, jež by mohly potenciálně pomoci zvrátit progresi stavu, prodloužit přežití a navrátit důstojné žití pacienta.

1 PRIMÁRNÍ MYELOFIBRÓZA

Jak již bylo zmíněno, onemocnění primární myelofibróza se řadí mezi myeloproliferativní neoplázie. V rámci určitého upřesnění se také značí jako BCR-ABL1 (fúzní gen) negativní onemocnění, jehož výrazným rysem je zvýšená tvorba a ukládání retikulinových a kolagenových vláken v prostředí kostní dřeně, což způsobuje její fibrotizaci. Tento proces je výsledkem deregulace na úrovni hematopoetické kmenové buňky. Myelofibróza se může vyskytnout v podobě primárního nebo sekundárního onemocnění (Zahr a kol., 2016). Až u 15 % pacientů s diagnostikovanou ET nebo PV se v časovém horizontu projeví myelofibróza jako sekundární doprovodný znak (Tefferi, 2021). Myelofibróza, myšleno jako primární i sekundární onemocnění, má v rámci své kategorie významný negativní dopad na délku přežití a kvalitu života (Saeidi, 2016). Stejně jako další onemocnění je i primární myelofibróza doprovázena souborem klinických symptomů, které budou zmíněny v dalších textech, včetně možností diferenciální diagnostiky.

1.1 Patogeneze

Mezi významné činitele, které se uplatňují v procesu patogeneze onemocnění primární myelofibrózy se řadí přítomnost somatických mutací, které způsobují klonální proliferaci kmenových hematopoetických buněk (Vainchenker a Kralovics, 2017). Tyto mutace můžeme dělit na ty, které hrají důležitou roli při vzniku onemocnění (JAK2, MPL, CALR) a následně na ty, u kterých se předpokládá doprovodný vliv na progresi a leukemickou transformaci (např. polykombinovaný epigenetický faktor ASXL1) (Tefferi, 2021). Dále se také předpokládá vliv zvýšených hodnot prozánětlivých cytokinů na rozvoj fibrotizace kostní dřeně u pacientů s primární myelofibrózou (Nazha a kol., 2015).

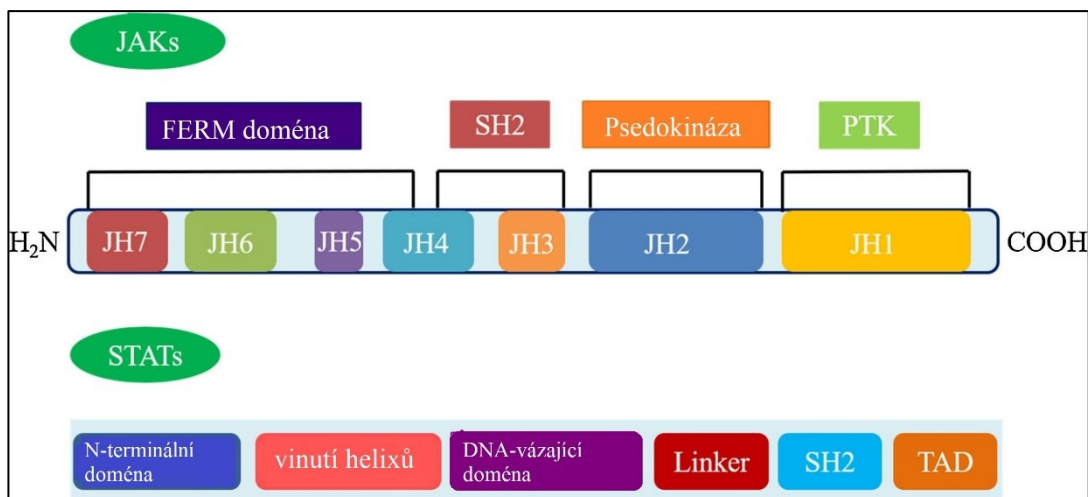
1.1.1 Vliv mutace Janusovy kinázy 2

Janusovy kinázy spadají do skupiny proteinových tyrozin kináz. V rámci této skupiny jsou dále zařazeny do třídy nereceptorových tyrozin kináz, jejichž funkce spočívá v přenosu fosfátové skupiny, pocházející z molekuly adenosin trifosfátu, na hydroxylovou skupinu tyrozinových zbytků patřících substrátů. Tato fosforylace je následně spojena se změnou vlastností, například enzymové aktivity daného substrátu, nebo může docházet k vytváření aktivních míst pro vazbu molekul obsahující Src homologii 2 (SH2). Pro Janusovy kinázy jsou

významným substrátem „přenašeče signálu a aktivátory transkripce“ (STAT) molekuly (Saeidi, 2016). Signalizace může také probíhat pomocí signalizačních drah PI3K/AKT nebo RAS/MAPK (O'Sullivan a Harrison, 2017; Saeidi, 2016; Zahr a kol., 2016). JAK/STAT signalizační cesta asociuje s cytoplazmatickou částí transmembránového receptoru pro cytokiny, jako je erythropoetin nebo trombopoetin (Zahr a kol., 2016), případně s receptory pro růstové faktory – např. růstový faktor odvozený od destiček (PDGF) – a dochází tak k ovlivnění buněčného růstu, proliferace a apoptózy (Saeidi, 2016; Xin a kol., 2020)

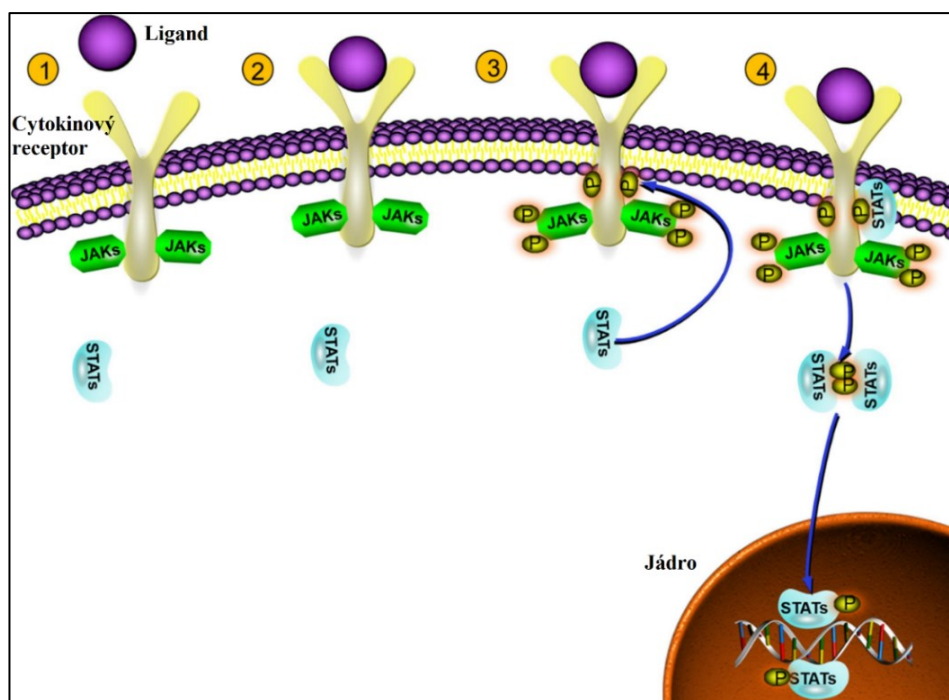
Mezi členy Janusových kináz se řadí tyto zástupci: JAK1, JAK2, JAK3 a tyrozin kináza Tyk2. Zástupce JAK1, JAK2 a Tyk2 můžeme nalézt v celém spektru buněk, kdežto exprese kinázy JAK3 je výlučně v hematopoetických buňkách (Saeidi, 2016; Xin a kol., 2020) V jejich struktuře můžeme nalézt 4 domény: N-terminální FERM oblast, SH2, pseudokinázovou a protein kinázovou doménu (Vainchenker a Kralovics, 2017; Xin a kol., 2020). Případně se jejich struktura rozděluje do oblastí označovaných jako Janusovy homologní domény (JH1 – JH7), kde JH1 homologie představuje protein kinázovou doménu s vlastní katalytickou aktivitou a JH2 homologie zastupuje pseudokinázovou doménu (Saeidi, 2016; Xin a kol., 2020). JH2 doména je zapojena v autoregulačních procesech. V případě výskytu mutace v této části dochází k poruše regulace aktivity příslušné kinázy (Saeidi, 2016). V neposlední řadě se FERM oblast účastní nekovalentní vazby s receptorem (Vainchenker a Kralovics, 2017) a také se zapojuje do její stabilizace (Favoino a kol., 2021). Grafický pohled na uspořádání struktury Janusových kináz je zobrazen na obrázku 1.

STAT molekuly představují důležitý článek v procesu přenosu signálu v rámci JAK/STAT signalizační dráhy. Do této skupiny patří hned několik zástupců, a to: STAT1-STAT4, STAT5A, STAT5B a STAT6. Ve své struktuře mají N-terminální doménu. Dále je zde přítomna DNA-vázající doména, C-terminální trans-aktivační doména, jež je důležitá pro fosforylaci molekuly a také je zde SH2 doména, která vykazuje afinitu k oblastem bohatých na fosforylované tyrozinové zbytky (Favoino a kol., 2021; Xin a kol., 2020). Grafické zpracování STAT molekuly je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Struktury Janusových kináz (JAKs) a molekul přenašečů (STATs), upraveno dle: (Xin a kol., 2020)

Samotný proces přenosu signálu až k jádru je složen z několika po sobě jdoucích kroků: vazba příslušného ligandu zapříčiní dimerizaci receptoru za současné aktivace a *cross*-fosforylace Janusových kináz. Následná fosforylace katalytické domény cytoplazmatické části receptoru dá vzniknout aktivním místům pro vazbu proteinů s SH2 homologií (př. STATs). Po vazbě STATs na receptor jsou také fosforylovány, uvolněny z vazby a poté podstupují dimerizaci. Takto vzniklé dimery jsou transportovány do jádra, kde zahajují transkripci genů. Kromě STATs mohou být do signalizace zapojeny i jiné molekuly obsahující SH2 doménu (Zahr a kol., 2016; Vainchenker a Kralovics, 2017; Xin a kol., 2020; Favoino a kol., 2021). Viz obr. 2.

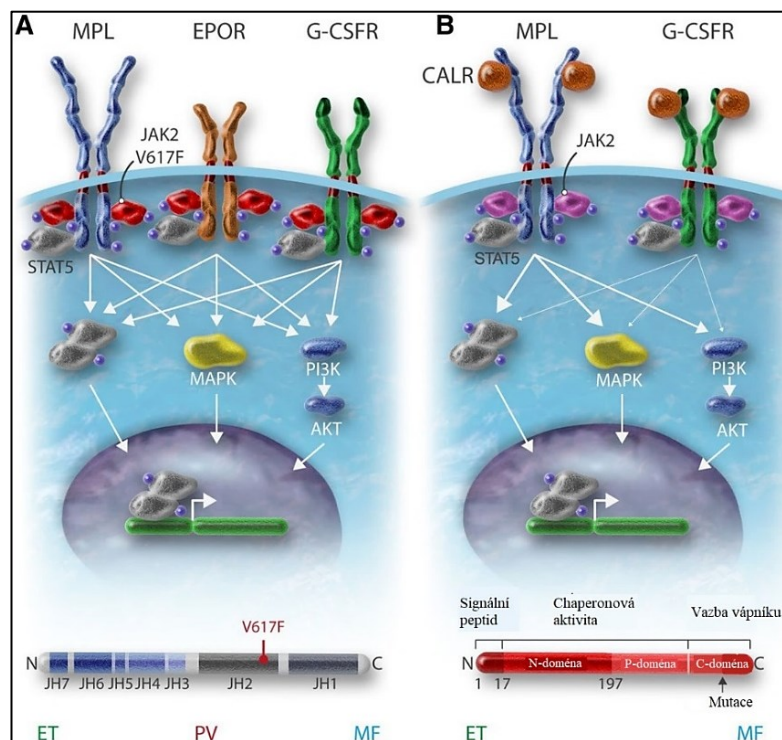


Obrázek 2: JAK/STAT signalizační cesta, upraveno dle: (Xin a kol., 2020)

Jako významná somatická mutace z hlediska patogeneze onemocnění primární myelofibrózy se řadí mutace Janusovy kinázy 2 (JAK2). Tato mutace je lokalizována ve 14. exonu v kodonu 617, kde dochází k záměně aminokyseliny Valinu za Fenylalanin (Vainchenker a Kralovics, 2017; Saeidi, 2016). Výsledkem je porušená regulace aktivity JAK/STAT dráhy, neboť dochází k alteraci pseudokinázové (autoinhibiční) domény (JH2 oblast) (Zahr a kol., 2016). Signalizace probíhá nejen skrze proteiny STAT, ale také systémy PI3K/AKT nebo RAS/MAPK, což má za následek zvýšenou genovou expresi, která ústí ke zvýšené tvorbě buněk myeloidní linie (O'Sullivan a Harrison, 2017)

Mutace JAK2V617F je u pacientů s diagnostikovanou primární myelofibrózou zastoupena přibližně ve 40-60 % (O'Sullivan a Harrison, 2017; Saeidi, 2016; Vainchenker a Kralovics, 2017; Zahr a kol., 2016). Ve studiích, zahrnující pacienty s primární myelofibrózou, byli tito pacienti podrobena genetické analýze na výskyt výše zmíněné mutace. Výsledná procentuální zastoupení pacientů s mutací JAK2V617F odpovídala hodnotám: 58 % (Tefferi a kol., 2014), 54,17 % (Song a kol., 2017), případně 64,7 % (Rumi a kol., 2014), 48,3 % (Maddali a kol., 2021) nebo 57,4 % (Kim a kol., 2015), což koresponduje s výše uvedeným rozmezím.

Obr. 3A) ukazuje na asociaci mutace JAK2V617F s příslušnými receptory pro erythropoetin (EPOR), kolonie stimulující faktor pro granulocyty (G-CSFR) a v neposlední řadě také pro trombopoetinový receptor (MPL).



Obrázek 3: A) asociace mutace v JAK2 s receptory; B) asociace mutace pro CALR, upraveno dle: (Vainchenker a Kralovics, 2017)

1.1.2 Mutace kalretikulinu

Kalretikulin (CALR) představuje endoplazmatický protein, mezi jehož fyziologické funkce patří chaperonová aktivita a vliv na řízení vápníkové homeostázy v buňce. Chaperonová aktivita je zahrnuta v účasti na kontrole kvality nově vznikajících proteinů a jejich skládání (Saeidi, 2016; Vainchenker a Kralovics, 2017; O'Sullivan a Harrison, 2017). Kromě endoplazmatického retikula je možné jej nalézt také v cytoplazmě, jádře a na membráně buněk, kde plní rozmanité funkce (Kielbik a kol., 2021). Strukturně je tento protein tvořen třemi hlavními doménami: N-terminální doména vázající lektin a Zn^{2+} , P-doména bohatá na aminokyselinu prolin s vysoce afinními vazebnými místy pro Ca^{2+} , ale s nízkou kapacitou a v neposlední řadě C-terminální doména, jež váže Ca^{2+} s nízkou afinitou, ale vyšší kapacitou (Saeidi, 2016). Předpokládá se souhra N-terminální domény s repetitivními sekvencemi P-domény, která je zodpovědná za chaperonové vlastnosti molekuly kalretikulinu při procesu skládání proteinů (Kielbik a kol., 2021). Pro grafické zobrazení domén viz obrázek 3B.

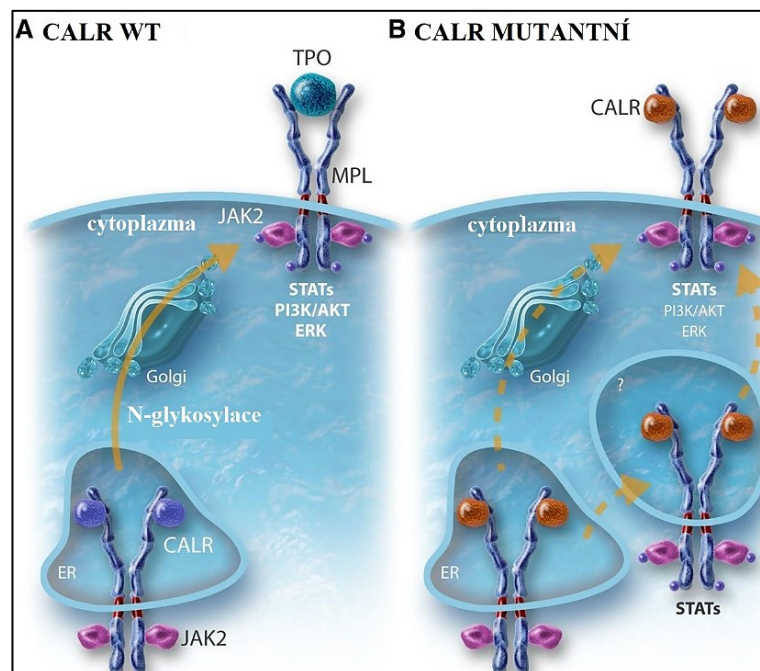
Mutace v proteinu kalretikulinu jsou lokalizovány na exonu 9 a jsou představovány širokým spektrem mutací, které mají za následek inserce nebo delece určitého množství párů bazí (bp). Následná změna čtecího rámce ústí ve změnu C-terminální domény a také ztrátu KDEL signálu, který zajišťuje retenci CALR molekuly v endoplazmatickém retikulu. C-terminální doména je složena z nových pozitivně nabitých aminokyselinových sekvencí mající negativní vliv na vazbu Ca^{2+} iontů (Vainchenker a Kralovics, 2017; Saeidi, 2016; O'Sullivan a Mead, 2019). Pozitivní náboj této domény je také důležitý pro interakci a vazbu CALR na trombopoetinový receptor (Vainchenker a Kralovics, 2017; O'Sullivan a Harrison, 2017). Obrázek 4 ilustruje rozdíl mezi CALR divoký typ (WT) a CALR mutantní.

V důsledku toho, že se mutantní kalretikulin neváže s receptorem pro erytropoetin, není zde spojitost s rozvojem onemocnění polycytémia vera. Naopak je charakteristicky spojován s primární myelofibrózou a esenciální trombocytémií, protože dochází k vazbě na trombopoetinový receptor (MPL). V neposlední řadě se také slabě váže na receptor pro kolonie stimulační faktor pro granulocyty (G-CSFR) (O'Sullivan a Mead, 2019). Obrázek 3B znázorňuje danou asociaci s receptory i možné cesty aktivace genové exprese.

Mezi mutace s nejvyšší frekvencí výskytu u pacientů s diagnostikovanou primární myelofibrózou se řadí dvě základní jednotky. Jedná se o mutaci typu 1, která je charakterizována delecí úseku na exonu 9 v celkové délce 52 párů bazí (bp) (označení *p.L367fs*46*). Druhým zástupcem je mutace typu 2, jež na rozdíl od typu 1 představuje inserci 5-bp segmentu (označení *p.K385fs*47*). Z těchto dvou dominantních zástupců je prevalence, u

pacientů s primární myelofibrózou, vyšší u mutace typu 1 (Vainchenker a Kralovics, 2017; O'Sullivan a Mead, 2019). CALR mutace byla při testování pacientů s PMF detekována ve 25 % případů. Pro skupinu pacientů bez mutace JAK2/MPL byla frekvence výskytu 74 %. Při rozlišení jednotlivých podtypů mutací CALR bylo zjištěno, že mutace typu 1 (delece 52-bp) představovala 78 %, mutace typu 2 (inzerce 5-bp) 14 % a zbytek připadal na méně běžné formy mutací (Tefferi a kol., 2014). Ve studii od Rumi a kol. (2014) byly publikovány obdobné hodnoty. Přestože se vzájemný vztah mutací CALR s ostatními významnými mutacemi – JAK2V617F/MPL – definuje jako vzájemně vylučný (Saeidi, 2016), tak dochází k případům, kdy se pomocí testovacího panelu odhalí pacient s expresí kombinace mutací. Příkladem je pacient ze studie od Tefferi a kol. (2014) s koexpresí mutace pro kalretikulin i Janusovu kinázu 2 (V617F).

U pacientů s mutantním kalretikulinem byl pozorován nižší věk, snížený počet leukocytů, zvýšený počet trombocytů a také nižší výsledná hodnota v rámci skórovacích systémů. Dále byla u pacientů pozorována menší pravděpodobnost rozvoje anémie, trombocytopenie a leukocytózy (Rumi a kol., 2014), případně závislosti na krevních transfuzích (Tefferi a kol., 2014). Kim a kol. (2015) ve své studii také uvádí, že pacienti s mutací CALR vykazovali méně výraznou hypercelularitu kostní dřeně, ale s vyšším počtem megakaryocytů v porovnání s pacienty s mutací v Janusově kináze 2 (V617F).



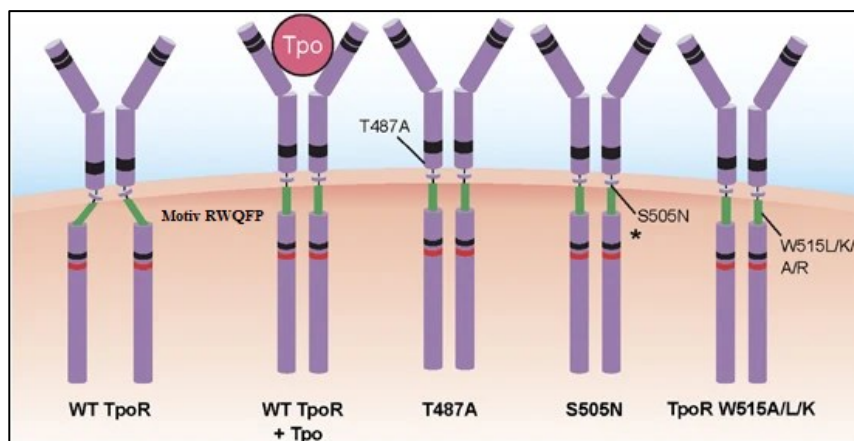
Obrázek 4: Ilustrace rozdílu mezi molekulami CALR^{WT} a CALR^{mutantní}, upraveno dle: (Vainchenker a Kralovics, 2017).

1.1.3 Mutace trombopoetinového receptoru

Trombopoetinový receptor (MPL) je geneticky kódován na chromozomu č. 1. Jedná se o cytokinový receptor, jež po aktivaci patřičným ligandem přenáší signál skrze JAK/STAT systém. Oním ligandem je cytokin trombopoetin, který má po své vazbě na receptor vliv na řadu procesů, které zahrnují například proliferaci a diferenciaci megakaryocytů, ale také udržování populace hematopoetických kmenových buněk (HSCs) (Saeidi, 2016; Qasrawi a Arora, 2021).

S ohledem na výše zmíněné významné mutace v Janusově kináze 2 (V617F) a kalretikulínu se mutace MPL řadí mezi nejméně frekventované (O'Sullivan a Mead, 2019). Mutace v receptoru pro trombopoetin se u pacientů s PMF vyskytují přibližně s frekvencí 3-15 %. Studie od Tefferi a kol. (2014), Rumi a kol. (2014) a Gángó a kol. (2018) odhalily procentuální zastoupení pacientů s mutacemi v MPL rovno 8,3 %, 4 % a 7 %. V rámci molekulární struktury receptoru dochází k postižení kodonu 515 v exonu 10, kdy dochází k záměně aminokyseliny tryptofanu (W), v části sousedící s transmembránovou doménou, za jinou aminokyselinu (Saeidi, 2016). Mezi nejčastější záměny se řadí substituce za leucin (W515L) a lyzin (W515K) (O'Sullivan a Mead, 2019). Mezi další zástupce se také mohou řadit substituce za alanin (W515A) nebo také arginin (W515R) (Saeidi, 2016). Z této substituce následně plyne důvod nadměrné aktivace signalizace, kdy dochází k pozměnění amfipatického motivu RWQFP, jehož je tryptofan součástí, který má úlohu v prevenci spontánní aktivace receptoru (Vainchenker a Constantinescu, 2013). Dochází tedy k rozvoji proliferace buněk při současné nezávislosti na cytokinech (Saeidi, 2016). Obrázek 5 znázorňuje frekventované i méně běžné mutace, včetně lokalizace v rámci receptoru.

Mutace trombopoetinového receptoru jsou asociovány s vyšším věkem (O'Sullivan a Harrison, 2017). Rumi a kol. (2014) a Kim a kol. (2015) ve svých studiích uvádějí věkový medián 64 let, respektive 64,7 let. Z klinického hlediska jsou spojovány s vyššími počty trombocytů a vyšší hladinou erytropoetinu. Dále dochází k pozorování nižšího obsahu hemoglobinu a buněčnosti kostní dřeně. V další řadě se udává výraznější pravděpodobnost vybudování závislosti na transfuzních přípravcích v porovnání s pacienty nesoucí mutaci v JAK2 (Saeidi, 2016). Z výsledků od Tefferi a kol. (2014) a Kim a kol. (2015) vyplývá, že procentuální zastoupení pacientů vyžadující transfuze představuje 48 %, respektive 75 %, kdy rozdíl je patrný nejen v porovnání s pacienty s mutací v Janusově kináze 2 (V617F), ale také v kalretikulínu. Rozdíl mezi těmito autory může být dán rozdílným počtem pacientů, kteří byli ve studiích zahrnuti.



Obrázek 5: Lokalizace mutací v receptoru pro trombopoetin, upraveno dle (Vainchenker a Constantinescu, 2013).

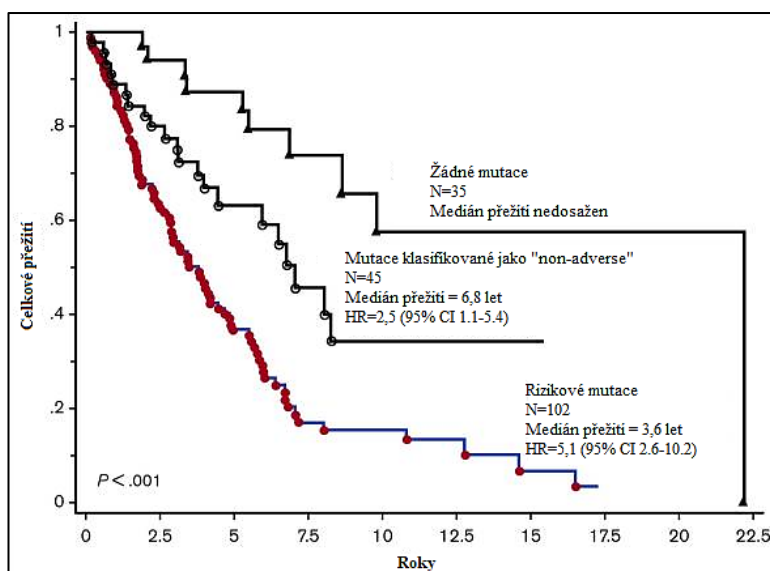
1.1.4 Další mutace

Kromě výše zmíněných mutací JAK2/CALR/MPL mohou být u pacientů s myeloproliferativními neopláziemi nalezeny i jiné mutace. Tyto mutace mohou poskytnout dodatečné prediktivní a prognostické informace. Jejich (ne)přítomnost se řadí mezi parametry ve skórovacích modelech, kdy napomáhají vytváření predikcí doby přežití, případně nutnosti využití alogenní transplantace (Qasrawi a Arora, 2021), neboť mohou ovlivňovat výsledný fenotyp onemocnění a také jeho případný vývoj (O'Sullivan a Mead, 2019). Jejich přítomnost není limitována pouze na primární myelofibrózu, polycytémii veru a esenciální trombocytémii, ale vyskytují se v celém spektru hematologických onemocnění (O'Sullivan a Mead, 2019; Szybinski a Meyer, 2021), což představuje jistou spojnici mezi těmito rozličnými stavy (Vainchenker a Kralovics, 2017). Ze své podstaty se jedná o geny, které hrají důležité úlohy v epigenetických procesech. Může se jednat o geny kódující transkripční faktory, modifikátory histonů a DNA, případně signalizační molekuly a jiné (Vainchenker a Kralovics, 2017; O'Sullivan a Mead, 2019; Garmezky a kol., 2021).

Na skupině pacientů evropské populace s PMF byl demonstrován možný podíl těchto mutací na celkové přežití a transformaci do blastické fáze. V rámci analýzy byly identifikovány mutace v genech epigenetických složek ASXL1, metyltransferázy EZH2 a faktoru sestřihu SRSF2, které měly negativní vliv na délku přežití. Zvýšené riziko rozvoje leukémie bylo nalezeno ve spojitosti genových mutací ASXL1, SRSF2, IDH1 a IDH2 (izocitrát dehydrogenáza 1 a 2). Na tomto základě byli pacienti následně rozděleni na ty, kteří získali alespoň 1 výše zmíněnou mutaci – mutačně vysoce riziková – a na ty, u kterých tyto mutace nebyly detekovány – mutačně nízké riziková. Při následném testování kmenových buněk (CD34+) pacientů z obou skupin byl nalezen jistý genový profil. Při porovnání s nízké

rizikovými pacienty byly u rizikových pacientů nalezeny deregulace genové exprese. U 27 genů došlo ke zvýšení, zatímco u 12 genů pak ke snížení exprese (Vannucchi a kol., 2013). S těmito konkrétními mutacemi se také můžeme setkat v prognostických nástrojích, kde představují jedny z mnoha parametrů, na jejichž základě se pacientovi přiřazují body. Jedná se například o prognostické modely zahrnující mutace, karyotyp a symptomy – MIPSS70 nebo MIPSSv2 (Tefferi, 2021).

Tefferi a kol. (2016) při analýze vzorků 182 pacientů s primární myelofibrózou odhalil, že u 81 % pacientů byla nalezena jiná mutace než JAK2/CALR/MPL. Mezi nejfrekventovanější mutované geny se řadily ASXL1 (36 %), TET2 (dioxygenáza) (18 %), SRSF2 (18 %) a U2AF1 (faktor sestříhu) (16 %). Rozložení jejich výskytu z pohledu JAK2/CALR/MPL bylo obdobné až na výjimku mutace U2AF1, kdy byl zpozorován zvýšený výskyt u pacientů s JAK2 (23 %) v porovnání s CALR/MPL, u nichž byl výskyt nižší než 10 %. Druhou výjimkou byla omezená přítomnost mutace SRSF2 u CALR mutovaných vzorků. Z klinického hlediska byla naznačena spojitost mezi těmito mutacemi a manifestací příznaků, jako je anémie a trombocytopenie. Dále autoři na základě multivariabilní analýzy určili mutace genů ASXL1, SRSF2 a jiné, jako mající negativní/rizikový vliv na celkové přežití a leukemickou transformaci. Obrázek 6 graficky znázorňuje závislost celkového přežití v závislosti na kategorii přítomných mutací.



Obrázek 6: Závislost přežití pacientů s PMF na (ne)přítomnosti mutací určité kategorie, upraveno dle (Tefferi a kol., 2016).

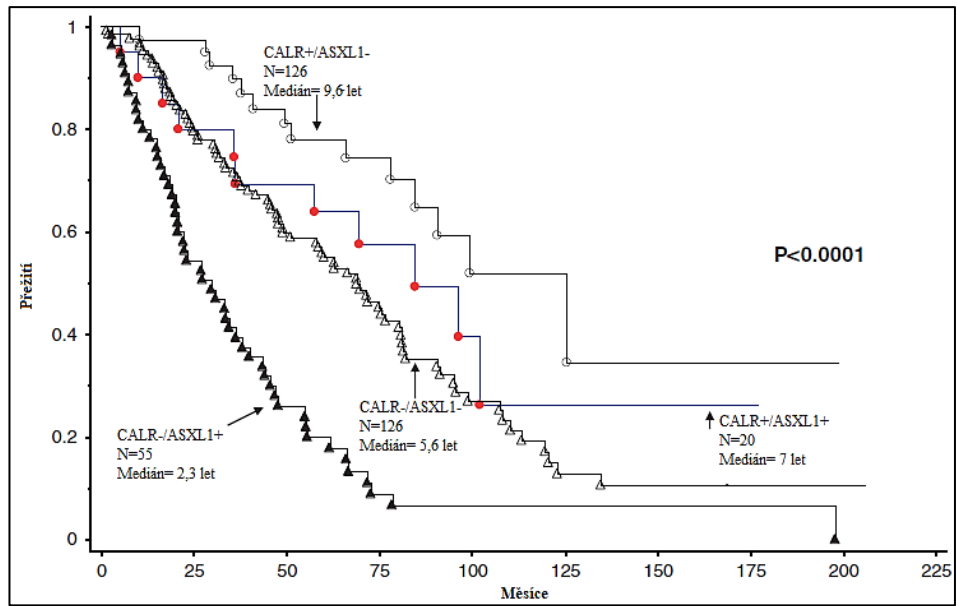
Při sekvenční analýze vzorků pacientů s rozvinutou sekundární akutní myeloidní leukémií (AML), které předcházela diagnóza PMF, byl zjištěn zvýšený záchyt mutací v genech ASXL1 (66,7 %) a SRSF2 (50 %), při porovnání se sekundární AML, která vzešla z příbuzných

myeloproliferací (PV, ET, sekundární MF). Mutace SRSF2 byla spojena se zkráceným celkovým dožitím a také se zvýšeným počtem mutací vztažených na pacienta. Při porovnání spárovaných vzorků pacientů s diagnózou MPN před a po leukemické transformaci byl u SRSF2 mutovaných jedinců čas k této přeměně zkrácen na 51,2 měsíců s ohledem na případy SRSF2 WT, kdy byl čas roven 133,8 měsícům (Venton a kol., 2018). Lasho a kol. (2018) při práci se vzorky pacientů s MPN onemocněním došel k závěru, že mezi nejčastějšími mutantními geny byly zahrnuty ASXL1 (47 %), TET2 (19 %), transkripční faktor RUNX1 (17 %), tumor supresorový gen TP53 (15 %) a také SRSF2 (13 %). V přídě, kdy došlo k porovnání 19 spárovaných vzorků z období chronické/blastické fáze, došlo k selekci mutací, jež byly v blastické fázi získávány v nejvyšších absolutních počtech: ASXL1 (4), EZH2 (4), regulátor SH2B3 (3), TET2 (2), TP53 (2) a fosfatáza PTPN11 (2). V neposlední řadě byly v této studii identifikovány mutace RUNX1 a PTPN11 jako faktory mající vliv na zkrácenou délku života. Na následujících řádcích budou shrnuty mutace, které se v případě onemocnění PMF vyskytují nejčastěji a které jsou také zahrnuty ve skórovacích modelech.

1.1.5 Mutace ASXL1

ASXL1 (z angličtiny *Additional sex comb-like 1*) se zapojuje do procesu řízení genové exprese skrze modifikaci histonů. Při regulaci dochází k interakci mezi ASXL1 s polykombními represivními proteinovými komplexy 1 a 2 (PRC1/2) a dalšími molekulami (Qasrawi a Arora, 2021). ASXL1 má schopnost povolát PRC2 komplex na určité místo díky přímému působení na EZH2 (Vainchenker a Kralovics, 2017). U pacientů s primární myelofibrózou se mutace vyskytuje ve 13-40 % (Garmezzy a kol., 2021). Předpokládá se vliv ASXL1 na schopnosti začlenění EZH2 podjednotky do PRC2 komplexu (Qasrawi a Arora, 2021). PRC2 komplex má katalytickou aktivitu spočívající v metylaci lizinových zbytků na histonu H3 (H3K27me_{2/3}), což má za následek potlačení genové exprese. V případě mutace dochází k porušení procesu metylace, za současného zvýšení exprese regulovaných genů (Qasrawi a Arora, 2021).

Tefferi a kol. (2014) uvádí ASXL1 jako nepříznivý prognostický marker, respektive mutaci kalretikulinu jako příznivý faktor. Z tohoto pohledu byl identifikován mutační profil pacientů, u kterých byla absence CALR mutace, ale přítomnost mutantního ASXL1 (CALR⁻/ASXL1⁺), jako mající výrazný negativní vliv na přežití s mediánem 2,3 let. Obrázek 7 znázorňuje závislost přežití na přítomnosti mutačních profilů CALR/ASXL1.



Obrázek 7: Závislost doby přežití na mutačním profilu CALR/ASXL1, upraveno dle: (Tefferi a kol., 2014).

1.1.6 Mutace EZH2

Jedná se o gen (z angličtiny *Enhancer of zeste homolog 2*) kódující enzym, jež je součástí komplexu PCR2. V tomto komplexu zajišťuje katalytickou aktivitu v procesu trimetylace residuí lyzinu na histonu H3 (H3K27me3), který má vliv na úroveň útlumu transkripční aktivity regulovaných genů (Saeidi, 2016; Vainchenker a Kralovics, 2017; Szybinski a Meyer, 2021). Regulační roli EZH2 bychom také našli v procesech rakovinotvorného bujení, vývoje a obnovy kmenových buněk, případně také v imunitní odpovědi (Huang a kol., 2021). Zastoupení mutace EZH2 je v případě primární myelofibrózy přibližně 5-10 % (Vainchenker a Kralovics, 2017). Ztráta fyziologické funkce je spojována s porušenou erytropoézou (Qasrawi a Arora, 2021). Z pohledu vlivu na život pacienta je zařazen mezi markery zkráceného přežití (Vannucchi a kol. 2013).

Pro zjištění možné kontribuce aberantního EZH2 ve vztahu k myelofibróze byly využity myší modely, kterým byl inaktivován EZH2 za současné exprese mutace JAK2V617F. U myší s tímto mutačním profilem (EZH2⁻/JAK2⁺) bylo pozorováno výrazné snížení erytrocytů, hematokritu i retikulocytů, snížené hodnoty se také týkaly leukocytární frakce. Zatímco počty trombocytů byly významně zvýšeny. Analýzou byla potvrzena zvýšená exprese receptoru MPL na buněčném povrchu kmenových buněk a také megakaryocytů. Předpokládá se nepřímé působení inaktivovaného EZH2 z důvodu absence změn v úrovni metylace genového lokusu pro MPL. Vyšetření retikulínu v kostní dřeni a slezině ukázalo na extenzivní fibrózu. Pro studium přenositelnosti došlo k transplantaci kostní dřene, EZH2⁻/JAK^{V617F} myším

recipientům, kdy bylo pozorováno navození symptomů typických pro myelofibrózu. V sérech myší s transplantovanou $EZH2^-/JAK^{V617F+}$ kostní dřeň byla nalezena vysoká hladina transformujícího růstového faktoru beta 1 (TGF- β 1), u kterého se předpokládá participace v patogenezi MF. V souvislosti s kmenovými buňkami byla zjištěna vysoká míra repopulační schopnosti, včetně přednostní proliferace myeloidní buněčné linie. S ohledem na fyziologickou funkci EZH2 došlo k pozorování odlišných trendů v metylacích v obširném spektru kontrolovaných genů v porovnání s kontrolami. Tyto výsledky nasvědčují kooperaci aberantního EZH2 s JAK2V617F mutací v patogenezi MF i s přihlédnutím k závažnějším projevům a symptomům při porovnání s kontrolními myšími modely (Yang a kol., 2016).

1.1.7 Mutace SRSF2

SRSF2 – faktor sestřihu, jež je bohatý na serin a arginin – se řadí mezi důležité proteiny, které jsou zahrnuty v procesu sestřihu molekul prekurzorové mediátorové ribonukleové kyseliny (pre-mRNA). Běžnou lokalizací pro mutaci se stal kodon P95 (Qasrawi a Arora, 2021). SRSF2 protein v molekule pre-mRNA rozpoznává specifické motivy, na které se následně váže. Přítomná mutace má za následek pozměnění sestřihu cílených pre-mRNA, za současné tvorby rozličných funkčních produktů (Vainchenker a Kralovics, 2017). V případě pacientů s PMF se jeho frekvenční výskyt pohybuje až kolem 18-20 % (Szybinski a Meyer, 2021; Qasrawi a Arora, 2021). Morishita a kol. (2021) na vzorku pacientů japonské populace s diagnostikovanou zjevnou primární myelofibrózou (overt-PMF) poukázal na spojitost mutace SRSF2 (spolu s ASXL1 a EZH2) se skupinou pacientů, kteří byli dle dynamického mezinárodního skórovacího systému (DIPSS) klasifikováni jako riziková. Tato spojitost ústila v rozpoznání mutace SRSF2 jako vysoce rizikové s dopadem na celkové přežití pacientů a řadí se tak mezi negativní prognostické faktory. Závěry z této studie, týkající se mutace SRSF2, byly v souladu se zmíněnými studiemi od Vannucchi a kol. (2013) a Tefferi a kol. (2016), kteří ji charakterizovali obdobně.

1.1.8 Mutace izocitrát dehydrogenázy

Izocitrát dehydrogenázy (IDH) se řadí mezi významné enzymy účastníci se metabolických drah. Jejich fyziologická funkce spočívá v enzymatické přeměně D-izocitrátu na produkt 2-oxoglutarát (2-OG) (Qasrawi a Arora, 2021). Jedná se o oxidativní dekarboxylaci za současné redukce oxidovaného kofaktoru nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP^+) na NADPH. Enzymy se vyskytují ve třech izoformách, ze kterých jsou relevantní pouze homodimery IDH1 a IDH2. Podstata mutací, které se projevují substitucí residuí argininu, je porušení schopnosti tvorby 2-OG, za současného výskytu reakce, která přeměňuje 2-OG na onkometabolit D-2-hydroxyglutarát (D-2HG), při spotřebě redukovaného kofaktoru NADPH (Liu a kol., 2020). Procentuální zastoupení u primární myelofibrózy se pohybuje přibližně mezi 1-5% (Qasrawi a Arora, 2021). Předpokládá se možná interakce D-2HG s epigenetickým aparátem, ve smyslu inhibice, s výslednou hypermetylací DNA. Tyto substituované argininy se pravděpodobně přímo nebo nepřímo účastní na vazbě 2-OG a izocitrátu v aktivním místě enzymu (Liu a kol., 2020).

Tefferi a kol. (2012) při studiu možného významu IDH mutací pracoval se vzorkem 301 pacientů s primární myelofibrózou. Analýzou genů byly IDH mutace zachyceny v celkem 12 případech (4 %), z nichž 7 mělo mutaci v IDH2 a zbylých 5 připadalo na izoformu IDH1. Navíc se ukázalo, že 6 pacientů z této skupiny získalo také mutaci v Janusově kináze 2 (V617F). Z klinického hlediska byl nejpatrnější rozdíl ve věku pacientů při porovnání IDH mutovaných pacientů, kteří byli výrazně starší než pacienti, u kterých nebyla detekována žádná mutace. Z pohledu celkového přežití byla tato perioda nejkratší pro pacienty s IDH mutací (medián 18 měsíců) oproti pacientům s mutacemi v JAK2, MPL nebo bez žádných mutací. Stejný závěr byl i v parametru leukemické transformace, kdy u IDH mutovaných pacientů byla kratší doba pro tuto transformaci. Umocnění vlivu na celkové přežití a leukemickou transformaci představovaly případy pacientů se současným výskytem mutace IDH a JAK2V617F, kdy došlo ke zkrácení jak doby celkového přežití (medián 10 měsíců), tak zvýšení množství transformací při současném rozvoji blastické fáze u 4 pacientů s výskytem IDH/JAKV617F mutace, což činí 67 %. V porovnání s ostatními mutačními profily se jedná o nejvyšší výskyt.

1.1.9 Mutace TET2

TET2 představuje enzym, který je kódován genem stejného značení a který můžeme nalézt na chromozomu č. 4 (Saeidi, 2016; Feng a kol., 2019). Svoji fyziologickou funkcí je zapojen do procesu modulující úroveň metylace DNA, skrze oxidaci 5-metylcytosinu na výsledný produkt 5-hydroxymetylcytosin, jež vede k demethylaci DNA (Saeidi, 2016; Feng a kol., 2019; Qasrawi a Arora, 2021). Tento proces je zajištěn enzymatickou – dioxygenázovou – aktivitou. TET2 pro svoji funkci vyžaduje přítomnost kyslíku, 2-OG a iontů Fe^{2+} . Vazebná místa pro 2-OG a Fe^{2+} ionty jsou obsažena ve dvouvláknové β -helixové doméně, v blízkosti C-terminální části (Feng a kol., 2019).

TET2 mutace jsou charakterizovány jako delece a bodové mutace se ztrátou funkce, které obvykle postihují 1 alelu (Vainchenker a Kralovics, 2017), dále zde mohou být zahrnuty mutace měnící čtecí rámec nebo generující stop kodony (Feng a kol., 2019). Kromě mutací, které zasahují samotný gen TET2, byla popsána spojitost mezi onkometabolitem 2-HG, který vzniká při výskytu mutantních variant enzymů IDH1/2, a funkční inhibicí TET2 enzymu, u kterého vystupuje 2-OG jako důležitý kofaktor (Qasrawi a Arora, 2021). Jejich výskyt může být detekován ve spektru myeloidních onemocnění zahrnující MPN, AML nebo také myelodysplastický syndrom (MDS) (Qasrawi a Arora, 2021). V rámci procentuálního zastoupení v případech pacientů s PMF Tefferi a kol. (2016) při analyzování skupiny 182 pacientů s PMF zjistil přítomnost mutací TET2 v 18 % případů. Venton a kol. (2018) ve vzorku 56 pacientů se sekundární akutní myeloidní leukémií (sAML) objevil mutace TET2 v 11 případech, což představuje 19,6 %. Při zaměření se pouze na sAML, které předcházela PMF, se procentuální zastoupení zvýšilo na 33,3 %. Venton a kol. (2018) ve své práci dále zmiňuje, že pacienti s TET2 mutacemi měli kratší celkové přežití v porovnání s pacienty s divokým typem TET2. Obdobný procentuální výskyt byl publikován také ve studii od Lasho a kol. (2018), kdy TET2 mutace byla identifikována u pacientů s MPN v blastické fázi (MPN-BP) v 19 % případů.

Kameda a kol. (2015) při studiu možné kooperace mutací JAKV617F a TET2 na myších modele ukázal, že se u dvojité mutované myši (JAK2/TET2) rozvinuly obdobné symptomy, jako u myši s izolovanou mutací JAK2, ale se závažnějším průběhem. Tyto symptomy zahrnovaly vážnou extramedulární hematopoézu, splenomegalii, prodlouženou leukocytózu, anémii a trombocytózu. V případě JAK2/TET2 mutovaných myší se ukázal výskyt myeloidních buněk ve značném proliferčně aktivním stavu. Kmenové buňky vykazovaly zvýšenou kapacitu pro sebeobnovu jak v případě myší s TET2 mutací, tak u myší

s dvojitou mutací. V neposlední řadě byla pozorována úspěšná kompetice mezi dvojitě mutovanými buňkami a buňkami WT při kompetitivních a sériových transplantacích. U Obou recipientů, kterým byly transplantovány dvojitě mutované buňky JAK2/TET2 s buňkami WT, došlo k rozvoji fenotypu MPN s patřičnými symptomy: extramedulární hematopoéza, fibróza, splenomegalie, atypie megakaryocytů. Toto pozorování dává vzniknout předpokladu vlivu zvýšené schopnosti obnovy mutovaných kmenových buněk při konkurování zdravým buňkám a tím indukovat a zachovávat MPN fenotyp i v případě následných recipientů. V kontrastu s tímto pozorováním buňky s izolovanou JAK2 mutací nebyly schopny navodit MPN fenotyp u následného recipienta. Výstupem této studie je předpoklad zapojení mutace TET2 v zachování MPN fenotypu i jeho akceleraci.

1.1.10 Vlivy mikroprostředí kostní dřeně

Prostředí kostní dřeně má nezastupitelnou roli pro fyziologickou hematopoézu. Možné porušení jeho rovnováhy přispívá k propagaci řady hematologických onemocnění. Myeloproliferativní hematopoetické buňky interagují s ostatními buňkami za současné remodelace dřeňového prostředí, jež v důsledku podporuje progresi stavu (O'Sullivan a Mead, 2019). Mezi ostatní buňky se řadí buňky stromální, endoteliální nebo retikulární, dále se jedná o fibroblasty nebo osteoblasty aj. (Lin a kol., 2016).

Lin a kol. (2016) při studiu myších endoteliálních buněk došli k závěrům, že vaskulární niche obsahující mutované JAK2V617F endoteliální buňky podporuje proliferaci JAK2 mutovaných kmenových buněk (obdobné závěry také v práci od Castiglione a kol. (2021)). Dále bylo pozorováno, že tyto buňky vykazovaly zvýšenou proliferaci a také angiogenezi. V rámci receptorové výbavy endoteliálních buněk byla zaznamenána spojitost mezi receptorem pro trombopoetin a zvýšenou buněčnou expanzí mutovaných kmenových buněk. Pozdější studie od Lin a kol. (2018) přidala další charakteristiku mutovaných endoteliálních buněk, která spočívala v poskytování ochrany JAK2 mutovaným kmenovým buňkám před účinky radiace, kdy se toto předpokládá jako možná příčina výskytu recidivy po léčbě transplantací. Z molekulárního hlediska byly detekovány zvýšené exprese solubilních faktorů vaskulárního niche, které hrají roli při ochraně a regeneraci kmenových buněk po vystavení radiaci. Mazzeo a kol. (2021) zmiňují, kromě radiační ochrany, také možnou podporu mutovaných kmenových buněk při podávání chemoterapeutik, která je zprostředkována při kultivaci s mutovanými endoteliálními buňkami.

Mezi další významné faktory se řadí přítomné růstové faktory (Nazha a kol., 2015) a prozánětlivé cytokiny, u kterých se věří v jejich vliv na rozvoj onemocnění (Zahr a kol., 2016). Tyto cytokiny mohou aktivovat signalizační kaskády a poskytovat tak výhodné podmínky pro neoplastické i další buňky. Konkrétněji se jedná o tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a řadu interleukinů: IL-6, IL-8, IL-2R, IL12 a IL-15 (Venugopal a Mascarenhas, 2021). Jako další je zmiňován transformující faktor beta (TGF- β), který je také přítomen u pacientů s primární myelofibrózou ve zvýšené míře, a který může být produkován jak maligním klonem, tak stromálními buňkami (O'Sullivan a Mead, 2019). Mezi jeho funkce patří stimulace fibroblastů, případně inhibice degradace extracelulární matrix. Jeho zvýšená signalizace ústí například v nadměrnou diferenciaci osteoblastů, nebo setrvání buněk v G1 fázi buněčného cyklu (Zahr a kol., 2016). Transformující faktor beta je, stejně jako tumor nekrotizující faktor alfa, znám jako negativní regulátor fyziologických kmenových buněk (Mead a Mullally, 2017). Svou úlohu v patogenezi můžou sehrát také atypické megakaryocyty s abnormální distribucí molekul selektinů (Garmezy a kol. 2021).

Abnormální megakaryocyty, vyskytující se u pacientů s primární myelofibrózou, vykazují zvýšenou proliferaci a nižší míru podstupování apoptózy. Dále mohou produkovat celou řadu látek, které mohou sehrát roli v patogenezi, jako růstové faktory, transformující růstový faktor beta, destičkový faktor 4, prozánětlivý interleukin-6 a jiné (Melo-Cardenas a kol., 2021). Megakaryocyty pacientů s prefibrotickou a fibrotickou fází primární myelofibrózy exprimují nízké hladiny transkripčního faktoru Gata1, který je důležitý v procesu megakaryopoézy a snížená hladina je, mimo jiné, asociována s poruchou maturace. Výraznější změny v expresi tohoto faktoru byly také zaznamenány při vzniku sekundární myelofibrózy (Sangiorgio a kol., 2021).

Gleitz a kol. (2020) se zabývali další molekulou – destičkovým faktorem 4. Ze studie vyplynuly závěry, že při absenci tohoto faktoru dochází ke zlepšení projevu onemocnění a kostní dřen vykazuje menší míru fibrotizace. Dále dochází ke snížení aktivace mesenchymálních buněk, zánětlivých procesů a také JAK/STAT signalizační dráhy. Autoři pozorovali spojitost mezi stupněm závažnosti fibrózy kostní dřeně a prostorovou expresí destičkového faktoru 4. Předpokládá se schopnost časně diagnostiky i v případě absence fibrózy.

2 DIAGNOSTIKA

2.1 Diagnostická kritéria

Diagnostika primární myelofibrózy se řídí dle zavedených a platných kritérií Světové zdravotnické organizace, které prošly revizí v roce 2016. Primární myelofibróza je dále klasifikována na dvě podjednotky, a to na prefibrotickou a zjevně fibrotickou. Pro samotnou diagnostiku je důležité rozlišit jiná příbuzná onemocnění, která spadají do kategorie myeloidních neoplazmat a mohla by vykazovat obdobné znaky. Příkladně se může jednat o podobnost prefibrotické primární myelofibrózy a esenciální trombocytémie (Tefferi, 2021). Tato potřeba byla také, jako jedna z mnoha, zmíněna v revizi kritérií (Barbui a kol., 2018a). Definovaná kritéria pro diagnostiku primární myelofibrózy, respektive jejich podjednotek, jsou zahrnuta v tabulce č. 1 a 2. Přestože zkoumání morfologie biotického vzorku kostní dřeně zůstává důležitým nástrojem pro diagnostiku, je potřeba neopomenout i ostatních klinických dat, které mohou pomoci zabránit chybné interpretaci (Garmezý a kol., 2021).

Guglielmelli a kol. (2017) ve své studii popsali rozdílné charakteristiky pacientů, kteří byli rozděleni do skupin dle fáze onemocnění – prefibrotická a fibrotická – s užitím revidovaných kritérií Světové zdravotnické organizace. Pacienti s prefibrotickou primární myelofibrózou byly častěji ženy, mladšího věku s vyšší hladinou hemoglobinu, leukocytů a trombocytů, ale s nižším výskytem blastických buněk v periferní krvi. Naopak u pacientů s fibrotickou PMF byla vyšší procenta výskytu anémie a trombocytopenie, ale také kratší celkové přežití a čas pro leukemickou transformaci.

Tabulka 1: Kritéria pro diagnostiku prefibrotické PMF (pre-PMF), zdroj: (Arber a kol., 2016; Barbui a kol., 2018a; Tefferi 2021)

Diagnostická kritéria pro prefibrotickou primární myelofibrózu
Hlavní kritéria
1. Proliferace a atypie megakaryocytů, bez retikulínové/kolagenové fibrózy stupně >1, doprovázena zvýšenou celularitou kostní dřeně, proliferací granulocytů a sníženou erytropoézou
2. Přítomnost JAK2, CALR nebo MPL mutace, případně jiného klonálního markeru, nebo absence reaktivní fibrózy kostní dřeně
3. Nedochozí ke splnění kritérií pro ostatní myeloidní neoplazmata
Vedlejší kritéria
1. Anémie, jež nemá spojitost s komorbidním onemocněním
2. Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9 /l$
3. Hmatatelná splenomegalie
4. Zvýšená hladina laktát dehydrogenázy

Pro diagnostiku prefibrotické primární myelofibrózy je nutná přítomnost všech hlavních kritérií a alespoň jednoho kritéria vedlejšího (Arber a kol., 2016; Barbui a kol., 2018a; Tefferi, 2021). Vzhled atypických megakaryocytů je definován jejich shlukováním, abnormálním poměrem jádro/cytoplazma, hyperchromatickým a nepravidelně překládaným jádrem (Barbui a kol., 2018a; Tefferi, 2021).

Tabulka 2: Kritéria pro diagnostiku primární myelofibrózy se zjevnou fibrotizací (overt-PMF), zdroj: (Arber a kol., 2016; Barbui a kol., 2018a; Tefferi, 2021)

Diagnostická kritéria primární myelofibrózy se zjevnou fibrotizací
Hlavní kritéria
1. Proliferace a atypie megakaryocytů, doprovázena retikulínovou a/nebo kolagenovou fibrózou
2. Přítomnost JAK2, CALR nebo MPL mutace, případně jiného klonálního markeru, nebo absence reaktivní fibrózy kostní dřene
3. Nedochází ke splnění kritérií pro ostatní myeloidní neoplazmata
Vedlejší kritéria
1. Anémie, jež nemá spojitost s komorbidním onemocněním
2. Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9 /l$
3. Hmatatelná splenomegalie
4. Zvýšená hladina laktát dehydrogenázy
5. Leukoerytroblastóza

Pro diagnostiku primární myelofibrózy se zjevnou fibrotizací je taktéž zapotřebí přítomnost všech hlavních a nejméně jednoho vedlejšího kritéria (Arber a kol., 2016; Barbui a kol., 2018a; Tefferi, 2021). Morfologický popis megakaryocytů odpovídá tomu, co bylo popsáno pro prefibrotickou fázi.

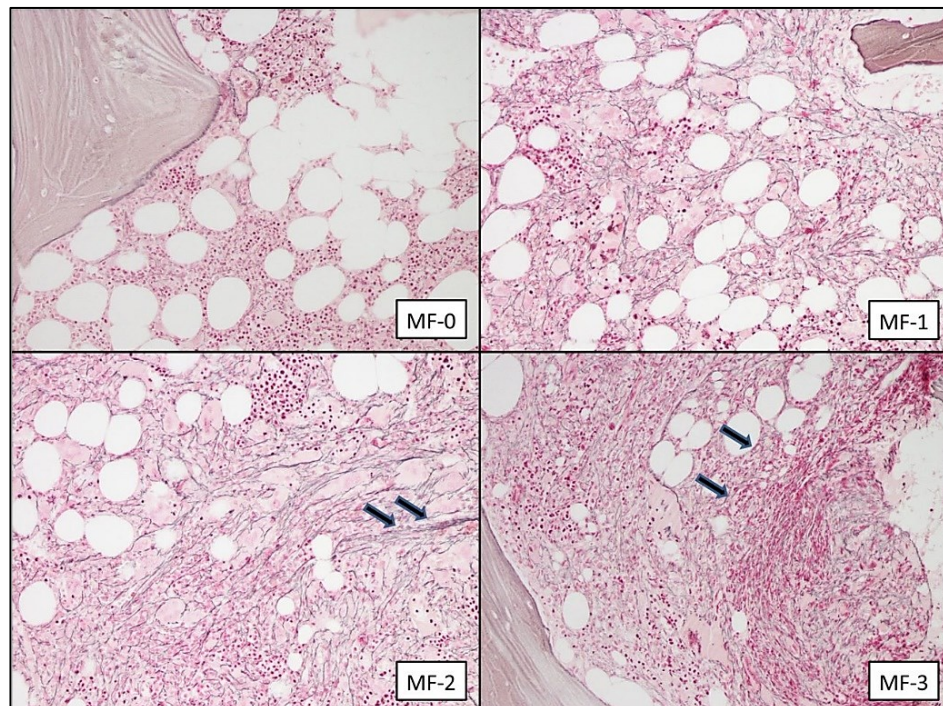
Je potřeba také zmínit úskalí, která mohou nastat při evaluaci morfologie vzorku kostní dřene. Přestože je její interpretace sěžejní, zůstává stále subjektivní, což může ústít v různou míru (ne)shody mezi patologi (Passamonti a Maffioli, 2016). Možné nedostatky v reprodukovatelnosti by mohly být způsobeny chybou identifikace diagnosticky významných znaků, nereprezentativním bioptickým materiálem, chybným zhodnocením celularity kostní dřene s ohledem na věk, nemožnost správného odečtení stupně fibrózy v důsledku barvení nebo nezkušenost hodnotitele (Barbui a kol., 2018a).

2.2 Hodnocení fibrózy kostní dřene

Retikulinová a kolagenní vlákna jsou přirozenou součástí pojivové tkáně a vytvářejí podpůrnou kostru ve stromatu kostní dřene. Nadměrné množství a ukládání těchto pojiv v kostní dřeni je znakem myelofibrózy. Hodnocení probíhá na bioptickém vzorku, který je vystaven barvicím technikám, zvýrazňující hledané komponenty. Pro barvení retikulinu se využívá stříbro, zatímco kolagen je zviditelněn metodou trichrom. Hodnocení je opět závislé na subjektivitě histopatologa, což může být podpořeno preanalytickým zpracováním nebo také nekonzistencí v barvení (Zahr a kol., 2016). Systém hodnocení stupně fibrózy je představen v tabulce 3 a ilustrativní zobrazení jednotlivých stupňů fibrotizace znázorněno na obrázku 8.

Tabulka 3: Systém hodnocení stupně fibrózy kostní dřene, zdroj: (Passamonti a Maffioli, 2016)

Hodnocení fibrózy kostní dřene	
Stupeň	
MF-0	Rozptýlený lineární retikulin bez křížení, jež odpovídá fyziologické kostní dřeni
MF-1	Volnější retikulinová síť s četným křížením, především v perivaskulárním prostoru
MF-2	Difuzní a husté zmnožení retikulinu s rozsáhlým křížením, zřídka ložiska svazků ztlustělých vláken, často konzistentní s kolagenem a/nebo s ložisky osteosklerózy
MF-3	Difuzní a husté zmnožení retikulinu s rozsáhlým křížením, hrubé svazky ztlustělých vláken, obvykle konzistentní s kolagenem, asociované s osteosklerózou



Obrázek 8: Vzorky kostní dřene s patrnými vlákny retikulinu a svazky kolagenu (šipky). Převzato od: (Passamonti a Maffioli, 2016).

Gianelli a kol. (2012) ve své studii uvádějí možnost predikovat přežití pacienta na základě hodnocení stupně fibrózy kostní dřeně. Při porovnání tohoto systému s mezinárodním prognostickým skórovacím systémem (IPSS) byla dokonce uvedena možnost preciznější předpovědi při současném užití obou systémů. Tato simultánní aplikace dovoluje odhalit pacienty jak s extrémně nízkým, tak vysokým rizikem s ohledem na délku přežití. Guglielmelli a kol. (2016) také potvrdili stupeň fibrózy jako prognostický faktor, kdy vyšší hodnoty byly spojovány s hmatatelnou splenomegalií, vyšším věkem, celkovými příznaky, ale také s nižšími hladinami hemoglobinu, leukocytů a trombocytů. Stupeň fibrózy 2 a 3 ukazoval na kratší přežití pacientů, v porovnání se stupněm 1. Autoři také uvádějí relevantnost stupně fibrózy při hodnocení mladších pacientů s nižší rizikovostí.

2.3 Prognostické modely

Prognostické modely představují pro klinické pracovníky nástroj pro určení nevhodnější terapie, která je určena individuálním pacientům (Tefferi a kol., 2018). Samotné vytváření prognóz je ale závislé na odpovídající diagnostice (Garmezzy a kol., 2021). Mezi modely používané v klinické praxi se řadí mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS) a jeho deriváty – dynamický IPSS a dynamický IPSS plus (Rumi a Cazzola, 2017). Charakteristiky uvedeny v tabulce 4.

2.3.1 Mezinárodní prognostické skórovací systémy

Tyto skórovací systémy kombinují proměnné, jež poskytují zařazení pacienta do konkrétní rizikové kategorie s určeným mediánem přežití. Přesto zde nejsou zahrnuty takové proměnné, které by mohly vždy pokrýt genetickou heterogenost primární myelofibrózy (Zahr a kol., 2016). Rozdílem mezi variantami IPSS a DIPSS je v tom, že druhý v pořadí může být použit kdykoliv v průběhu výskytu onemocnění – a nikoliv pouze při prvotní diagnostice – a může také zasáhnout do predikce rizika leukemické transformace (Rumi a Cazzola, 2017).

Tabulka 4: Charakteristika prognostických modelů IPSS/DIPSS/DIPSS-plus, zdroj: (Rumi a Cazzola, 2017)

Prognostické modely			
IPSS (z angličtiny: <i>International prognostic scoring system</i>)			
Rizikové faktory	Body	Riziková kategorie (body)	Medián přežití (roky)
Věk ≥ 65 let	1	Nízká (0)	11,3
Systémové příznaky	1	Střední-1 (1)	7,9
Hemoglobin <10 g/l	1	Střední-2 (2)	4
Leukocyty >25 ×10 ⁹ /l	1	Vysoká (≥3)	2,3
Blastické buňky ≥1%	1		
DIPSS (z angličtiny: <i>Dynamic international prognostic scoring system</i>)			
Rizikové faktory	Body	Riziková kategorie (body)	Medián přežití (roky)
Věk ≥ 65 let	1	Nízká (0)	>20
Systémové příznaky	1	Střední-1 (1-2)	14,2
Hemoglobin <10 g/l	2	Střední-2 (3-4)	4
Leukocyty >25 ×10 ⁹ /l	1	Vysoká (5-6)	1,5
Blastické buňky ≥1%	1		
DIPSS-plus (z angličtiny: <i>Dynamic international prognostic scoring system plus</i>)			
Rizikové faktory	Body	Riziková kategorie (body)	Medián přežití (roky)
Skóre DIPSS	0-3	Nízká (0)	15
Potřeba transfuzí	1	Střední-1 (1)	6,6
trombocyty <100 ×10 ⁹ /l	1	Střední-2 (2-3)	2,9
Nežádoucí karyotyp	1	Vysoká (4-6)	1,3

2.3.2 Mutační prognostický skórovací systém

Tento model je jedním z řady prognostických modelů, u kterých se při jejich sestavování bral zřetel také na výskyt mutací. MIPSS70+ verze 2.0 nezahrnuje do rizikových faktorů pouze rizikové mutace genů, ale také nepříznivou skladbu karyotypu. Mezi dané mutace se například řadí mutace v genech ASXL1 nebo SRSF2 (Tefferi, 2021), tedy mutace, které již byly zmíněny v kapitole zabývající se patogenezi. Případně další změnou je úprava prahových hodnot pro koncentraci hemoglobinu, jež byly stanoveny na základě pohlaví a závažnosti (Tefferi a kol., 2018). Pacienti jsou rozřazeni do 5 rizikových kategorií, u kterých se 10-leté přežití pohybuje od 86 % až k méně než 3 %. U pacientů s vysokým rizikem by měla být zvážena alogenní transplantace (Qasrawi a Arora, 2021). Ucelený přehled všech proměnných z modelu MIPSS70+ verze 2.0 poskytuje tabulka 5.

Tabulka 5: Prognostický model MIPSS70+ verze 2.0, zdroj: (Tefferi, 2021)

Prognostický model			
MIPSS70+ verze 2.0 (z angličtiny: <i>Mutation and karyotype enhanced prognostic scoring system</i>)			
Genetické proměnné (body)	Klinické proměnné (body)	Riziková kategorie (body)	Medián přežití (roky)
Vysoce rizikový karyotyp (4)	Závažná anémie (2)	Velice nízká (0)	nedosaženo
Nepříznivý karyotyp (3)	Mírná anémie (1)	Nízká (1-2)	16,4
Rizikové mutace v počtu ≥ 2 (3)	Cirkulující blasty $\geq 2\%$ (1)	Střední (3-4)	7,7
Rizikové mutace v počtu 1 (2)	Systémové projevy (2)	Vysoká (5-8)	4,1
Absence CALR typ 1 nebo jí podobné mutace (2)		Velice vysoká (≥ 9)	1,8

2.3.3 Genetický prognostický skórovací systém

Jedná se o zástupce prognostického systému, který ve svých parametrech zahrnuje pouze takové proměnné, které odkazují na přítomnost mutací nebo rizikového/nežádoucího karyotypu, aniž by bral v potaz jiné klinické informace (Tefferi a kol., 2018). Pacienti jsou rozřazeni do 4 kategorií s odpovídajícím 5-letým přežitím, jež nabývá rozptylu 94 % – 14 % (Tefferi a kol., 2018; Qasrawi a Arora, 2021). Všechny parametry zahrnuté v tabulce 6.

Tabulka 6: Prognostický model – geneticky inspirovaný – (GIPSS), zdroj: (Tefferi a kol., 2018; Qasrawi a Arora, 2021)

Prognostický model		
GIPSS (z angličtiny: <i>Genetically inspired prognostic scoring system</i>)		
Rizikové faktory (body)	Riziková kategorie (body)	Medián přežití (roky)
Rizikový karyotyp (2)	Nízká (0)	26,4
Nepříznivý karyotyp (1)	Střední-1 (1)	8
Absence CALR typ 1 nebo jí podobné mutace (1)	Střední-2 (2)	4,2
Mutace ASXL1 (1)	Vysoká (≥ 3)	2
Mutace SRSF2 (1)		
Mutace U2AF1-Q157 (1)		

3 SYMPTOMATOLOGIE

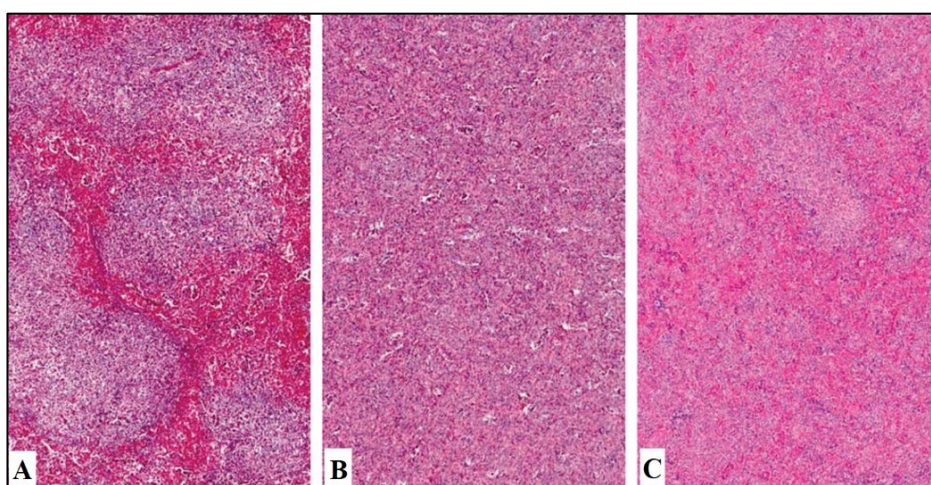
Pacienti, u kterých nacházíme myelofibrózu, jsou vystaveni vysoké zátěži z pohledu vykazovaných symptomů, jež mají přímý dopad na kvalitu života pacienta (Scotch a kol., 2017). Přestože Světová zdravotnická organizace ve svých definovaných kritériích nezahrnuje symptomy, protože nejsou využívány k rozlišení jednotlivých myeloproliferativních neoplázií, přesto mohou pro lékaře představovat jistou formu pomoci (Passamonti a Maffioli, 2016). Samotné symptomy sestávají z rozmanitého spektra zástupců, mezi běžné zástupce se řadí bolesti břicha a kostí, noční poty, svědění, únava nebo horečky a ztráta tělesné hmotnosti (Scotch a kol., 2017), případně může docházet k rozvoji splenomegalie a extramedulární hematopoézy (Emanuel a kol., 2012).

Z časového hlediska byl prvním nástrojem pro zhodnocení dopadu onemocnění na pacienta dotazník hodnotící symptomy myelofibrózy (Emanuel a kol., 2012). Z důvodu omezeného použití pouze pro pacienty s myelofibrózou a nutnosti vytvořit dotazník, jež by pokryl i pacienty s pravou polycytémií a esenciální trombocytémií, byla vytvořena modifikace dotazníku hodnotící symptomy myeloproliferací (MPN-SAF) (Scherber a kol., 2011). Poslední úprava zahrnovala zkrácení dotazníku a implementaci deseti významných a charakteristických symptomů. Zahrnutými symptomy jsou např. noční poty, bolesti kostí, problémy s koncentrací nebo diskomfort v oblasti břicha. Jednotlivé položky jsou bodovány na škále od 0 – 10 (Emanuel a kol., 2012).

Scherber a kol. (2011) v dotazníkových šetření u pacientů s myeloproliferacemi došel k závěru, že zátěž onemocnění byla nejzávažnější pro pacienty s myelofibrózou. Nejběžnějšími projevy pro myelofibrózu, ale také ostatní myeloproliferace, byly únava, snížená kvalita života, nespavost, špatná nálada a sexuální problémy. Nejvyšší prevalence a závažnost pro pacienty s myelofibrózou patřila bolestem břicha, diskomfortu v oblasti břicha, pocitu sytosti a neaktivitě.

Scotch a kol. (2017) identifikovali pacienty s myelofibrózou, která je doprovázena trombocytopenií, jako ty s vyšší zátěží klinických projevů. Mezi symptomy mající větší prevalenci a závažnost se u těchto pacientů řadily únava, neaktivita, pocit sytosti a zhoršená kvalita života. U těchto pacientů byla také pozorována vyšší pravděpodobnost historie trombózy nebo krvácení.

Dalším výrazným rysem myelofibrózy je splenomegalie, jakožto přímý důsledek extramedulární hematopoézy, jež probíhá právě ve slezině (Pizzi a kol., 2016). Výskyt extramedulární hematopoézy je připisován abnormální migraci hematopoetických kmenových buněk a dalších hematopoetických progenitorů v důsledku alterace dřevného mikroprostředí (Prakash a kol., 2012; Pizzi a kol., 2016). Prakash a kol. (2012) při morfoloické examinaci vzorků myeloproliferací po splenektomiích rozdělili extramedulární hematopoézu na tři vzory – a to nodulární (A), difuzní (B) a smíšený (C) (obrázek 9). V nodulárních oblastech se vyskytovala buď panmyelóza nebo erytroidní prekurzory, zatímco v difuzních oblastech byly dominantně prekurzory granulocytů.



Obrázek 9: Vzory hematopoézy ve slezině; nodulární (A), difuzní (B) a smíšený (C); upraveno dle: (Prakash a kol., 2012)

Wang a kol. (2015) poukazují na vliv chemokinu CXCL12 na vznik extramedulární hematopoézy ve slezině. Jeho funkce, společně s odpovídajícím receptorem CXCR4, spočívá v chemoatraktivitě hematopoetických kmenových a progenitorových buněk do dřevných niche. Porušení této interakce vede k migraci těchto buněk do cirkulace (Mendt a Cardier, 2015). V plazmě sleziny, u pacientů s myelofibrózou, došlo k naměření zvýšených hodnot tohoto chemokinu, což je pravděpodobně důvod vzniku a rozvoje extramedulární hematopoézy. Dále se zjistila snížená koncentrace metaloproteinázy 2 (MMP-2), v porovnání s periferní krví, jež je schopna štěpit tento chemokin a což může korelovat s jeho zvýšenou hodnotou. Při provádění migračních zkoušek byly zjištěny zvýšené hodnoty pro myelofibrotickou plazmu sleziny (Wang a kol., 2015).

4 TERAPIE

Současné přístupy k léčbě primární myelofibrózy zahrnují celou škálu léčiv, které adresují přidružené symptomy tohoto onemocnění a za cíl si kladou jejich zmírnění. Jedná se tedy o léky, které necílí na příčinu onemocnění (O'Sullivan a Mead, 2019; Garmezy a kol., 2021; Tefferi, 2021). Dokonce se ukazují takové závěry, že tato paliativní léčba nemá z hlediska účinnosti vliv na prodloužení přežití (Tefferi, 2021). Největší léčebný potenciál spatřujeme v alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (AHSCT), která je však doprovázena významnými riziky (Garmezy a kol., 2021; Tefferi, 2021). Běžně se k terapii primární myelofibrózy přistupuje na základě zhodnocení rizikové kategorie pacienta, věku, ale také manifestujících se symptomů (Kröger a kol., 2015)

4.1 Současná léčebná terapie

4.1.1 Alogenní transplantace krvetvorných buněk

Jak již bylo zmíněno výše, transplantace krvetvorných buněk představuje momentálně jedinou možnost terapie s kurativním účinkem pro pacienty s primární myelofibrózou. Je důležité k této možnosti přistupovat tak, aby byla namířena takovým pacientům, u kterých budou přínosy převyšovat možná rizika spojená s provedením této procedury (Davidson a Gupta, 2021).

U pacientů mladších 70 let, jež byli dle skórovacího systému IPSS, a jeho dynamických derivátů (DIPSS, DIPSS plus), zařazeni do střední-2 a vysoce rizikové kategorie, by měla být brána v úvahu možnost podstoupení transplantace. Zatímco jedinci mladší 65 let v rizikové kategorii střední-1 by měli navíc vykazovat další nepříznivé faktory, příkladně anémii kompenzovanou transfuzemi nebo počet blastických buněk v periferní krvi $>2\%$. Je nutné uvést, že pacienti v blastické fázi onemocnění (počet blastů $\geq 20\%$) nejsou vhodnými kandidáty a transplantace by měla být zvažena při dosažení částečné/úplné remise. U poslední kategorie s nízkým rizikem by pacienti měli být pouze pozorováni a transplantace zde není diskutována, děje se tak pouze v případech, kdy je zaznamenána progresse onemocnění. Rizikovými faktory pro AHSCT mohou být např. velikost sleziny větší než 22 centimetrů či nesoulad v leukocytárních antigenech mezi dárce a příjemcem (Kröger a kol., 2015). Relevantní informace, ve vztahu k rozhodování pro výkon transplantace, může mimo jiné poskytnout také prognostický model MIPPS+ verze 2.0 (Asher a kol., 2020).

Cipkar a kol. (2022) při retrospektivním zhodnocení řady studií vyvinuli model, jež predikuje optimální časové okno, pro jednotlivé rizikové kategorie dle dynamického IPSS, s ohledem na provedení transplantace a její nejpříznivější vliv na délku přežití. Optimální čas pro transplantaci od momentu diagnózy se pohybuje kolem 17 a 10 měsíců pro pacienty z rizikové skupiny střední-2, respektive z vysoce rizikové skupiny. Pozdní transplantace, provedené mimo toto období, mohou být doprovázeny neúspěchem, případně snížením přínosu transplantace s ohledem na délku přežití pacienta.

Keyzner a kol. (2016) ve své kohortě pacientů určili 2-leté celkové přežití pro příjemce transplantátu od nepříbuzného dárce na 38 % a úmrtnost nespojenou se stavy relapsu na 53 %, zatímco u pacientů s příbuzným dárce se jednalo o 75% 2-leté přežití a 21% úmrtnost, která nebyla připisována relapsu onemocnění. Výše zmíněné hodnoty ukazují na nepříznivé výsledky provedení transplantace s nepříbuzným dárce, kdy tento faktor představuje rizikový parametr ovlivňující celkové přežití, dobu onemocnění bez progresu a úmrtnost bez spojení s relapsem.

Robin a kol. (2019) ve své skupině pacientů, kteří podstoupili AHSCT a vykazovali remisi 2 roky po výkonu, určili, že nejčastější příčinou úmrtí byl relaps myelofibrózy, reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) a infekce. 10-ti letá incidence relapsů onemocnění u těchto pacientů činila 21 %. Studie naznačuje protektivní působení GvHD reakce vůči relapsu a mortalitě. Mezi rizikové faktory se řadily vyšší věk, sekundární myelofibróza a mužské pohlaví. Zvýšené riziko relapsu bylo spojováno s nepříbuznými donory krvetvorných buněk a sníženou intenzitou kondicionace. Atagunduz a kol. (2020) pozoroval pozdní relaps u 13,8 % pacientů po více než pěti letech po transplantaci, kdy se jako efektivní opatření ukázalo podání infuzí dárcovských leukocytů, případně opakované provedení alogenní transplantace.

4.2 Současná symptomatologická terapie

4.2.1 Splenektomie

Splenektomie se využívá pro řešení případů splenomegalie, která je výsledkem extramedulární hematopoézy, a neodpovídá na neinvazivní farmakologické přístupy. Mezi indikace se řadí např. diskomfort v oblasti břicha, trombocytopenie nebo závislost na erytrocytárních transfuzních přípravcích (Malato a kol., 2020). Část pacientů může po splenektomii zažívat zhoršení hepatomegalie, trombocytózy, leukocytózy a případně zvýšení počtu blastických buněk (Tefferi a kol., 2017). Je potřeba zmínit, že provedení výkonu s sebou nese rizika v podobě morbidit, mortality nebo transformace onemocnění (Malato a kol., 2020).

Provedení splenektomie má pak pozitivní vliv na symptomatickou nálož, anémii a trombocytopenii (Tefferi a kol., 2017). Jako náhradní řešení pro pacienty, kteří nemohou podstoupit splenektomii, se nabízí ozáření sleziny, jež s sebou také nese možné komplikace (Malato a kol., 2020).

Robin a kol. (2017) pozorovali u pacientů, u nichž byla provedena splenektomie, jako nejčastější komplikace krvácení, trombózy a přítomnost abscesů. Část pacientů musela podstoupit následnou chirurgickou intervenci z důvodu výskytu komplikací po zákroku. Ve výsledku byla u 50 % pacientů po splenektomii přítomna alespoň 1 komplikace.

Tefferi a kol. (2017) pracovali s daty pacientů (n = 120), kteří podstoupili indikovanou splenektomii. Mezi nejčastější důvody patřila: refrakterní splenomegalie, závislost na transfuzních přípravcích, portální hypertenze s ascitem, edémem a gastrointestinálním krvácením. V průběhu pozorování (medián 1,3 roky) bylo registrováno 79 % úmrtí, 28 % trombotických komplikací a 25 % leukemických transformací. Z pohledu rizikových faktorů, jež mají vliv na délku přežití po splenektomii, byly identifikovány věk, počet leukocytů, počet blastických buněk a závislost na transfuzních přípravcích jako rizikové faktory. Každému z těchto parametrů byl přiřazen 1 bod, za vzniku třech kategorií – vysoká, střední a nízká. Vysoce riziková kategorie je charakterizována nejzávažnější prognózou, kdy se žádný pacient nedožil milníku třech let po splenektomii.

4.2.2 Hydroxyurea

Hydroxyurea, jakožto cytoredukční činidlo, je frekventovaně podávané farmakum, které má schopnost adresovat symptomy jako je splenomegalie, bolest kostí nebo leukocytóza a trombocytóza (Martínez-Trillos a kol., 2010). Přestože s příchodem ruxolitinibu její užití pokleslo, stále si zachovává dominantní postavení při zavádění cytoredukční terapie u onemocnění s nízkou rizikovostí (Garmezy a kol., 2021).

Martínez-Trillos a kol. (2010) při observaci pacientů (n = 40), kterým byla podávána hydroxyurea, zaznamenali zlepšení symptomů ve 40 % případů. Medián odpovědávosti na léčbu činil 13,2 měsíců a udržovací denní dávka hydroxyurey byla v rozmezí 500 – 2000 miligramů. Mezi nejčastější vedlejší účinky se řadily novotvorba/ horšení anémie a výskyt vředů v ústech nebo na nohou. Závěrem studie bylo zhodnocení terapie podáváním hydroxyurey jako efektivní s relativně dobrou tolerancí.

Pugliese a kol. (2019) ve své studii poukazují na možnou efektivnost kombinované léčby složené z hydroxyurey a ruxolitinibu. Kombinovaná terapie ústila v lepší klinickou

odpověď v porovnání s monoterapií ruxolitinibu. Byla také pozorována relativně vysoká schopnost normalizace počtu leukocytů a destiček, v porovnání s monoterapií. Mezi vedlejší účinky spojené s kombinovanou terapií se řadilo zhoršení trombocytopenie a případná nutnost krátkého přerušení terapie.

4.2.3 Interferon alfa

Interferon alfa (IFN α) se v léčbě primární myelofibrózy, v různých formách a dávkách, využívá již několik desetiletí. Představuje alternativní přístup k léčbě myelofibrózy s nízkým rizikem. Mezi charakteristiky interferonu alfa se řadí proapoptotické, antiproliferační a imunomodulační vlastnosti (Bewersdorf a kol., 2020). Léčba interferonem zůstává namířena úzké skupině pacientů z důvodu častých výskytů vedlejších účinků a nedostupnosti výsledku srovnávacích studií (Mondello a kol., 2019). Projevy toxicity často vedou k nutnosti přerušení léčebného programu. Nadějnou vyhlídku přinesla nová forma – pegylovaný interferon alfa 2a, u níž se našla nižší toxicita (Ianotto a kol., 2013).

Ianotto a kol. (2013) pozorovali na vzorku pacientů s primární a sekundární myelofibrózou účinky podávaného pegylovaného interferonu alfa 2a. U většiny pacientů bylo pozorováno zlepšení v parametrech počtu leukocytů a trombocytů, v míře splenomegalie a systémových příznaků (jako úbytek na váze, horečky). Zlepšení nastalo také u anémie a potřebě transfuzních přípravků. Jako nejčastější toxický účinek se řadila cytopénie. Negativním prognostickým faktorem, z hlediska odpovídavosti na zavedenou léčbu interferonem, byla rozpoznána míra splenomegalie, kdy se hraniční hodnotou stala velikost >6 centimetrů pod žeberním obloukem.

Silver a kol. (2017) podávali rekombinantní interferon alfa pacientům s primární i sekundární myelofibrózou ($n = 30$) v brzkých stádiích a nízkou rizikovostí dle DIPPS. U 73 % pacientů došlo ke zlepšení, případně zůstali stabilní. Splenomegalie byla u pacientů s velikostí sleziny >9 centimetrů zredukována alespoň na polovinu u 40 % případů. Častými vedlejšími účinky byly tělesná slabost, bolest svalů, únava, anémie a trombocytopenie. Při vyšetření bioptického materiálu kostní dřeně byla u 12 pacientů snížena celularita a 5 pacientů mělo zlepšení míry fibrózy. Dochází k vyjádření myšlenky, že brzká terapie u pacientů bez charakteristických projevů může přinést benefity.

Sørensen a kol. (2020) ve studii zahrnující také pacienty s myelofibrózou ($n = 18$) studovali účinky kombinované léčby pegylovaným interferonem alfa 2 s ruxolitinibem. Celkově u 56 % pacientů byla pozorována úplná/částečná remise nebo klinické zlepšení.

Dalším pozorováním bylo zlepšení symptomatologické zátěže, normalizace buněčných populací v periferní krvi a redukce alelické zátěže pro mutaci JAK2V617F. Z hlediska toxicity nebo vedlejších účinků byla léčba interferonem zastavena u 37 % pacientů. Nejčastějšími vedlejšími účinky byly anémie, únava, záněty horních dýchacích cest, či leukopénie. Ve výsledku by tato kombinace mohla pomoci pacientům, u kterých jiné přístupy selhaly.

4.2.4 Danazol

Jedná se o semisyntetický androgen, využívaný k léčbě doprovodné anémie při výskytu myelofibrózy. Indikace probíhá u pacientů se zvýšenými hladinami erythropoetinu. U těch pacientů, kde zvýšen není se může indikovat léčba stimulanty erythropoézy jako je právě erythropoetin (Asher a kol., 2020). Výhodou danazolu vůči běžným androgenům je nižší výskyt vážných vedlejších účinků (Cervantes a kol., 2015).

Cervantes a kol. (2015) při studiu účinku danazolu na vzorku pacientů (n = 50) zaznamenali zlepšení anémie ve 30 % případů. Parametr, který koreloval s menší mírou odpovědi na léčbu danazolem, byla závislost na transfuzních přípravcích. Obecně docházelo k dobré toleranci, ale přesto se objevily vedlejší účinky ve formě zvýšených jaterních enzymů, nebo také cholestatické hepatitidy. Autoři zdůrazňují potřebu sledovat tyto parametry a provádět screening na výskyt rakoviny prostaty u mužů.

4.2.5 Imunomodulační léčiva

Označením imunomodulátory se odkazujeme na léčiva thalidomid a jiné příbuzné molekuly – lenalidomid a pomalidomid, mající antiangiogenní a protizánětlivé účinky. Ve svém spektru účinků mohou také působit proapoptoticky, regulovat cytokinové mikroprostředí nebo zasahovat do procesů aktivace buněk imunitního systému (Pemmaraju a kol., 2021a). V terapii primární myelofibrózy se jejich uplatnění nachází v adresování doprovodné anémie (Barbui a kol., 2018b). Dřívější studie odhalily, že ke zlepšení anémie došlo u 29 % pacientů léčených thalidomidem a 22 % při léčbě lenalidomidem. Z důvodu snížení toxického působení, a tedy nutnosti ukončení léčby dochází ke kombinovanému podávání s prednisolonem (Asher a kol., 2020).

Castillo-Tokumori a kol. (2020) hodnotili efektivnost a dopad léčby thalidomidem a lenalidomidem na vzorku 176 pacientů. Došlo ke zjištění, že pro pacienty léčené thalidomidem byla větší pravděpodobnost trombocytopenie a vyššího skóre dle DIPSS-plus. Pacienti z obou

skupin, pro které léčba přinesla klinický benefit, těžili především ze zlepšení anémie. Počet tranzic do stavu bez potřeby transfuzních přípravků byl obdobný pro obě skupiny – thalidomid 11 %; lenalidomid 16 %. Stejně tak počty pacientů s odpovědí na splenomegálii byly téměř totožné – thalidomid 9 % a lenalidomid 11 %. Z hlediska celkového přežití nedošlo k pozorování výrazných odlišností mezi skupinami.

Daver a kol. (2013) při studiu účinku a efektivity pomalidomidu, jakožto derivátu thalidomidu, využili dvě studijní skupiny. První skupině podávali 3 miligramy/den, ale z důvodu vysoké toxicity byla léčba ukončena. Druhé skupině (n = 29) bylo kontinuálně podáváno 0,5 miligramů/den, s dobrou tolerancí, ale relativně slabou odpovídavostí na léčbu – 10 % vykázalo klinické zlepšení v koncentraci hemoglobinu a 2 pacienti z 10 se stali nezávislími na transfuzích. Daver a kol. (2014) zaznamenali, u kombinace pomalidomidu s prednisonem, odpovědi na léčbu v 21 % dle definovaného protokolu.

4.3 Nové možnosti terapie

4.3.1 Inhibitory Janusových kináz

Zavedením léčby inhibitory Janusových kináz dochází ke snaze cílit na konkrétní prvky, jež hrají roli v procesu patogeneze onemocnění. V tomto konkrétním případě se cílí na deregulovanou signalizační kaskádu JAK/STAT s možnou alterací i dalších signalizačních cest. Svými účinky regulují množství prozánětlivých a proangiogenních cytokinů. Benefity, ze kterých pacienti mohou těžit, jsou především zmírnění klinických projevů (El Fakih a Popat, 2015).

4.3.1.1 Ruxolitinib

Ruxolitinib představuje účinný inhibitor Janusovy kinázy 1 a 2. Vazba na Janusovu kinázu 2 probíhá v rámci jejího aktivního stavu, kdy nedochází k rozlišování mezi mutantním a divokým typem. Současná inhibice Janusovy kinázy 1 potencuje účinek ve smyslu redukce prozánětlivých cytokinů, ale s rizikem negativního vlivu na procesy imunitního dohledu (Chu a Pettit, 2022). Ve své skupině se jednalo o první schválený inhibitor pro léčbu myelofibrózy se středním a vysokým rizikem (Garmezey a kol., 2021). Ruxolitinib je doporučován jako léčivo první volby pro případy splenomegálií u myelofibrózy se středním-2 a vysokým rizikem. U pacientů, kteří jsou zařazeni do rizikové skupiny střední-1, je ruxolitinib doporučován jako

první volba v případech výskytu symptomatické splenomegalie. Případně je využíván tam, kde jsou pacienti rezistentní k léčbě hydroxyureou (Barbui a kol., 2018b). Limitujícím faktorem jsou přítomné hematologické toxicity – anémie, trombocytopenie (Chu a Pettit, 2022).

Verstovsek a kol. (2012) prokázali klinický přínos ruxolitinibu, v léčbě symptomů myelofibrózy, při porovnání s placebem. Pacienti s ruxolitinibem (n = 155) vykázali redukcí splenomegalie ($\geq 35\%$) ve 41,9 % případů v porovnání s placebo skupinou (n = 154) s pouhými 0,7 %. U většiny pacientů s ruxolitinibem došlo ke snížení zátěže symptomů. Dále bylo pozorováno zmírnění alelické zátěže mutace JAK2V617F a snížení hladiny prozánětlivých cytokinů. 11 % pacientů, kterým byl podáván ruxolitinib, léčbu ukončilo z důvodu výskytu vedlejších účinků. Nejčastějšími vedlejšími účinky byly anémie, trombocytopenie, únava nebo průjem. Ve výsledky byly dobře kontrolovatelné skrze modifikace v dávkování.

Harrison a kol. (2012) porovnávali efektivitu léčby skupiny pacientů léčených ruxolitinibem (n = 146) oproti skupině, kterým byla podávána nejlepší dostupná léčba (n = 73). Redukce velikosti sleziny ($\geq 35\%$) byla pozorována u ruxolitinibu ve 32 % a 28 % případů při odečtu ve 24., respektive 48. týdnu. Zatímco skupina s nejlepší dostupnou terapií vykázala úspěšnost 0 %. U ruxolitinibu bylo pozorována zlepšení kvality života pacientů se snížením nálože symptomů. Pouze 8 % pacientů s ruxolitinibem ukončilo léčbu z důvodu vedlejších účinků. Nečastějšími vedlejšími účinky byly průjem, anémie, trombocytopenie a edém periferií. Vliv ruxolitinibu na histologický obraz kostní dřeně nebyl pozorován, stejně tak nebyl prokázán pozitivní vliv na celkové přežití.

Cervantes a kol. (2013) zpracovali dlouhodobou analýzu (3 roky) efektivnosti, bezpečnosti a účinku ruxolitinibu na přežití. Byla pozorována zachovaná redukce splenomegalie s vypočtenou pravděpodobností 50 % při odečtu ve 144. týdnu. Studie dále ukázala zlepšenou vyhlídku přežití v případech pacientů léčených ruxolitinibem s vypočtenou pravděpodobností 3-letého přežití 81 %, zatímco skupina s nejlepší dostupnou terapií 61 %. Z pohledu bezpečnosti a toxicity nedošlo k výrazným změnám v porovnání s výše uvedeným.

Harrison a kol. (2016) pozorovali obdobné trendy také v 5-ti leté studii porovnáující ruxolitinib s nejlepší dostupnou terapií. Byla pozorována redukovaná splenomegalie s pravděpodobností 48 %. Zlepšení nebo stabilita v oblasti dřeňové fibrózy byla patrná u 48 % pacientů s ruxolitinibem. Celkové přežití i bezpečnost/tolerance v souladu s výše uvedeným.

4.3.1.2 Fedratinib

Fedratinib představuje dalšího zástupce z rodiny inhibitorů Janusových kináz, v tomto případě s vyšší selektivitou k Janusově kináze 2 v porovnání s ruxolitinibem (Pardanani a kol., 2015) s aktivitou namířenou jak na mutantní, tak divoký typ, který byl v roce 2019 schválen k léčbě dospělých pacientů s myelofibrózou se střední-2 a vysokou rizikovostí (Harrison a kol., 2020), případně také u pacientů, u kterých se vyvinula rezistence nebo intolerance k ruxolitinibu (Tefferi, 2021).

Pardanani a kol. (2015) porovnali účinky fedratinibu s placebem u pacientů s myelofibrózou se středním-2 a vysokým rizikem. Při redukci splenomegalie se fedratinib ukázal jako efektivní s odezvou 36 % (400 mg) a 40 % (500 mg), placebo pouze 1 %. Snížení symptomatologické nálože (≥ 50 %) ve 24. týdnu proběhlo ve 36 % (400 mg), 34 % (500 mg) a u placeba v pouze 7 %. Z důvodu bezpečnosti a výskytu vedlejších účinků bylo podávání fedratinibu přerušeno u 14 % (400 mg) a 25 % (500 mg) pacientů s nejčastějšími projevy trombocytopenie, srdečního selhání, zvracení a průjmů. Z hematologické hlediska byl nejčastějším vedlejším účinkem anémie.

Harrison a kol. (2017) sledovali účinek fedratinibu na pacientech, kteří byli dříve léčeni ruxolitinibem, ale byla u nich potvrzena rezistence nebo intolerance. U 55 % pacientů byla pozorována odpověď na zvětšenou slezinu (redukce ≥ 35 %). Zlepšení symptomů, v rozsahu ≥ 50 %, dosáhla 26 % hodnocených pacientů. Nejběžnějšími vedlejšími projevy byly anémie, trombocytopenie, ale také průjmy, nevolnost a zvracení. Výsledky ukazují přítomnost klinických benefitů pro pacienty, u nichž léčba ruxolitinibem selhala.

Jamieson a kol. (2015) při léčbě fedratinibem také pozorovali zlepšení či stabilizaci morfologie kostní dřeně (stupeň fibrózy) v různých cyklech léčby. Ve dvou případech byla zaznamenána úplná remise (stupeň fibrózy MF-0).

4.3.1.3 Pacritinib

Pacritinib je dalším zástupcem ze skupiny inhibitorů Janusových kináz, cílicí nejen na Janusovu kinázu 2, ale dochází i k ovlivnění receptorové tyrozin kinázy FLT3, kinázy asociované s interleukinem 1 nebo receptoru pro kolonie stimulující faktor 1 (Mesa a kol., 2017a). Potenciál se nachází v indikacích pro pacienty s trombocytopenií, kde využití výše zmíněných inhibitorů – ruxolitinibu a fedratinibu – je spojováno s negativním dopadem na tyto parametry (Chu a Pettit, 2022).

Mascarenhas a kol. (2018) ve své studii prezentují klinické benefity, projevující se na pacientech s trombocytopenií a léčenými pacritinibem s léčebnou dávkou 200 mg/2xdenně. Pacritinib si zachoval dominanci v odpovědích na léčbu v porovnání s nejlepší dostupnou terapií (zahrnující také ruxolitinib). Tyto odpovědi zahrnovali účinek na splenomegalii, zátěž symptomů, ale také na hladinu hemoglobinu a potřebu transfuzí.

Mesa a kol. (2017a) u pacritinibu pozorovali dobrou toleranci i účinky na slezinu a symptomy, kdy zjistili vyšší odpověď na splenomegalii ve skupině s pacritinibem (19 %), bez ohledu na pacienty s vážnou trombocytopenií, oproti nejlepší dostupné terapii (5 %). Dále došlo k výraznému zlepšení skóre monitorující zátěž symptomů. Pouze ve skupině s pacritinibem byla pozorována tranzice do stavu nezávislosti na transfuzích (25 %). Léčba pacritinibem byla do 24. týdne přerušena u 10 % pacientů. Mezi nejčastější vedlejší účinky se řadil průjem, nevolnost, zvracení. Vyskytovaly se také případy anémie a trombocytopenie.

Z důvodu výskytů krvácení a srdečních potíží u pacientů, kteří byli součástí výzkumných studií, se jako bezpečná a efektivní dávka pacritinibu určilo množství 200 mg ve dvou dávkách denně (Gerds a kol., 2020).

4.3.1.4 Momelotinib

Momelotinib je nízkomolekulární inhibitor se specifitou vůči Janusovým kinázám 1 a 2, jehož účinek spočívá v kompetici s molekulami adenosintrifosfátu (Gupta a kol., 2016). Momelotinib svým inhibičním působením cílí také na receptor typu 1 pro aktivin, kdy tato inhibice vede k nižší produkci hepcidinu a lepší dostupnosti železa pro erytropoézu (Oh a kol., 2020). Využití tohoto inhibitoru v léčbě myelofibrózy se soustředí předně na pacienty s anémií (Chu a Pettit, 2022).

Gupta a kol. (2016) prezentovali, že u pacientů, kterým byl podáván momelotinib docházelo k eliminaci splenomegalie, déle byl patrný pozitivní vliv na hladinu hemoglobinu, závislost na transfuzích a na doprovodné symptomy. Působení na hladiny cytokinů bylo nejvíce patrné na interleukinu-6. Léčba byla ukončena v 26,2 % pacientů z důvodu výskytu vedlejších účinků. Nejčastějšími vedlejšími účinky byly průjem, periferní neuropatie, trombocytopenie a závratě. Celkové 2-leté přežití bylo odhadnuto na 88 %.

Mesa a kol. (2017b) porovnali účinek momelotinibu s ruxolitinibem, kdy pozorovali obdobnou odpověď na splenomegalii. V případě redukce symptomů ale převažoval ruxolitinib. Momelotinib zase dominoval při účinku na anémii, kdy méně pacientů z jeho skupinu vykazovalo potřebu podávání transfuzí. Paletu vedlejších účinků tvořila v čele

trombocytopenie, průjem, bolesti hlavy, anémie a další. V souhrnu bylo zjištěno, že více pacientů s momelotinibem bylo charakterizováno se simultánním klinickým zlepšením ve všech třech oblastech: splenomegalie, symptomy a anémie v porovnání s ruxolitinibem. Z tohoto hlediska může momelotinib představovat vhodný léčebný postup, vezmeme-li také v potaz různorodost individuálních potřeb pacientů.

4.3.2 Hypometylační látky

Poruchy epigenetického aparátu mohou přispívat k rozvoji maligního stavu, kdy dochází k aberantní expresivitě tumor supresorových genů. Mechanismus účinku hypometylačních látek spočívá v redukci míry metylace molekul DNA/RNA. Mezi zástupce těchto léčiv se řadí azacitidin a decitabin, jakožto analogy cytosinu, které mají inhibiční působení na DNA-metyltransferázu 1, případně přímý cytotoxický efekt. Konečné působení může mít rozsah od nápravy expresivity genů po apoptózu či buněčnou signalizaci (Agrawal a kol., 2018). Příklady mutací ovlivňující epigenetický aparát uvedeny v kapitole o patogenezi.

4.3.2.1 Azacitidin

Masarova a kol. (2018) testovali kombinaci ruxolitinibu s hypometylační látkou – azacitidinem – na skupině pacientů (n = 46), kdy v 72 % pozorovali předdefinované odpovědi na léčbu. Z toho 21 % odpovědí bylo dosaženo po přidavku azacitidinu. V průběhu studie došlo ke klinickému zlepšení splenomegalie v 62 %, z toho 24 % je připisováno po přidavku azacitidinu. U pacientů byl také pozorováno zlepšení v doprovodných symptomech. Z hlediska anémie nedošlo k výraznému zásahu. Dále došlo ke snížení alelické zátěže mutace JAK2 a v 61,2 % případů došlo ke zlepšení dřevné morfologie. Časté vedlejší účinky představovala anémie, trombocytopenie, ale také neutropenie, infekce a zácpa. Závěr studie naznačuje potenciál této kombinace a její komplementaritu při navození terapeutických účinků, ale pro vytvoření uceleného obrazu je potřeba provést další studie.

4.3.2.2 Decitabin

Badar a kol. (2015) pozorovali benefity vyplívající z léčby pacientů s transformovanou/ akcelerovanou myeloproliferací nebo vysoce rizikovou fází primární myelofibrózy. Odpověď na léčbu u pacientů s transformací byla ve 29 %. V případě akcelerované fáze se benefity léčby ukázaly u 62 % pacientů. Primární diagnóza (PMF, PV, ET) netvořila statistické rozdíly v odpovědích na léčbu. Pacienti s vysoce rizikovou PMF souhrnně dosáhli v 82 % zlepšení parametrů. Jednalo se především o počet blastických nebo krevních buněk. U pacientů s odpovědí na léčbu byla nalezena výhoda v otázce celkové přežití.

Mascarenhas a kol. (2020a) došli k závěru, že kombinace decitabinu s ruxolitinem představuje léčbu s potenciálem u pacientů v akcelerované či leukemické fázi. Celková odpověď na léčbu byla patrná u 44 % pacientů. Déle došlo ke snížení počtu blastických buněk a také ke zlepšení splenomegalie. Vedlejší účinky zahrnovaly únavu, febrilní neutropénii, pneumonie a průjem. Medián celkového přežití pro všechny pacienty činil 9,5 měsíců.

4.3.3 Inhibitory histonových deacetyláz

Histonové deacetylázy katalyzují odejmutí acetylového zbytku z aminoskupiny lyzinu histonů, za současného zisku pozitivního náboje, který vede ke zvýšené vazbě negativně nabitého vlákna DNA k histonům. Deacetylase histonů je obecně spojována se supresí genové exprese. Inhibitory histonových deacetyláz způsobují zvýšenou acetylaci histonů, a tedy umožňují aktivní transkripci. Interakce s těmito inhibitory není omezena pouze na histony, ale i další proteiny. Konečné účinky mohou být rozmanité – genová exprese, buněčná diferenciaci (Suraweera a kol., 2018).

4.3.3.1 Panobinostat

Mascarenhas a kol. (2017) při hodnocení pacientů s myelofibrózou, léčených panobinostatem, zjistili 36% frekvenci odpovědích na léčbu. Hodnocení pacienti (n = 8) vykázali 34% medián redukce splenomegalie. Zlepšení symptomů se týkalo systémových příznaků, diskomfortu v oblasti břicha nebo únavy. Změna morfologie kostní dřeně nebyla zjištěna. Častými vedlejšími účinky byla trombocytopenie, anémie či průjem a jiné. Průměrné snížení mutační zátěže JAK2 po 6 měsících bylo 6,8 %. Účinnost a tolerance je spojována s nižšími dávkami, kdy je možné lék podávat po delší dobu.

Mascarenhas a kol. (2020b) testovali kombinovanou terapii složenou z panobinostatu a ruxolitinu, kdy zjistili přítomnost klinického zlepšení ve 40 % případů. Ve 33 % případů došlo ke zmenšení objemu (≥ 35 %), nebo redukci velikosti sleziny (> 50 %). Pacienti také pociťovali úlevu od symptomů. Dále bylo pozorováno zlepšení ve stupni fibrotizace kostní dřevě a také v její celularitě. Vedlejšími účinky byla mimo jiné anémie, průjem a infekty horních dýchacích cest. V této skupině nebyl zaznamenán výskyt trombocytopenie nebo neutropenie ve spojitosti s kombinovanou léčbou.

4.3.4 Inhibitor telomerázy – Imetelstat

Imetelstat představuje oligonukleotidový konjugát, jehož cílovou strukturou je RNA templát, nacházející se v molekule telomerázy. Tímto tedy dochází k inhibici její enzymatické aktivity, spočívající v syntéze specifické sekvence dusíkatých bazí (-TTAGGG-), a posléze buněčné proliferace (Tefferi a kol., 2015). Imetelstat svým účinkem cílí také na maligní kmenové buňky. Ve vyvrážděných somatických buňkách se fyziologicky nachází v neaktivním stavu, zatímco u maligních buněk byla prokázána její aktivace (Wang a kol., 2018).

U pacientů ($n = 33$), kterým byl podáván imetelstat, proběhla v 21 % úplná nebo částečná remise. U všech pacientů s úplnou remisí také došlo k rezoluci dřevěné morfologie. V 80 % pacientů s leukocytózou došlo k jejímu odbourání nebo zřetelné redukci. 100 % pacientů s trombocytózou zažilo vyřešení symptomů nebo výrazné zlepšení. Odstranění či zlepšení přítomné leukoerytroblastózy proběhlo v 81 % případů. Pro 81 % pacientů s cirkulujícími blasty (v počtu ≥ 1 %) došlo k vymizení těchto buněk nebo ke zlepšení. 31 % pacientů se závislostí na transfuzích se stalo nezávislými, v délce alespoň třech měsíců (Tefferi a kol., 2015).

Mascarenhas a kol. (2021) publikovali o výskytu klinických benefitů u pacientů, jež zažili relaps či rezistenci k inhibitorům Janusových kináz, kteří byli léčeni imetelstatem. Dávkování 9,4 mg/kg ukazovalo na vyšší potenciál léčby. U pacientů byl ve 24. týdnu snížen objem sleziny i zátěž symptomů. 2-leté přežití činilo 57,5 %, dále se 25 % závislých pacientů stalo nezávislými na transfuzích. Zlepšení alespoň o 1 stupeň v rámci fibrotizace dřevě proběhlo u 40,5 % hodnocených účastníků. Imetelstat také pozitivně působil na mutační alelickou zátěž. S léčbou byly nejčastěji spojeny trombocytopenie, anémie, neutropenie, nevolnosti a průjem. Imetelstat představuje novou možnost léčby s potenciálem zvrátit klinické manifestace a pomoci pacientům s vysokým rizikem a nemožností léčby JAK inhibitory, pro které chybí alternativní strategie. Momentálně dochází k provádění dalších studií.

4.3.5 Inhibitor Aurora kinázy A – Alisertib

Aurora kináza A spadá do rodiny serin/threonin kináz, jež je nezbytnou součástí pro buněčnou mitózu. Její úlohu můžeme nalézt při maturaci centrozómu, sestavování mitotického vřeténka či má spojitost s kontrolními body buněčného cyklu. Inhibiční působení ústí ve ztrátu schopnosti autofosforylace a její následné funkčnosti, což pro buňku v důsledku končí navozením apoptózy. V přítomnosti malignit byla nalezena ve zvýšených koncentracích (Bavetsias a Linardopoulos, 2015). Zvířecí modely myelofibrózy ukázaly, že inhibice této kinázy způsobila polyploidizaci, maturaci a apoptózu aberantních megakaryocytů (Gangat a kol., 2019).

Alisertib v klinické studii měl schopnost zredukovat velikost sleziny, ale také míru zátěže symptomů a závislost na transfuzích. Zlepšení stupně fibrózy kostní dřeně alespoň o jeden stupeň bylo patrné v 71 % hodnocených pacientů. Profil vedlejších účinků zahrnoval trombocytopenii, neutropénii, anémii, a jiné. Zlepšení bylo také adresováno alelické mutační zátěži. Dalším pozorováním byl pozitivní efekt na morfologii aberantních megakaryocytů, jež jsou typickým znakem, se zvýšeným histochemickým barvením na přítomnost transkripčního faktoru Gata1. Alisertib vykázal potenciál s dobrou tolerancí, kdy je potřeba provést další studie (Gangat a kol., 2019).

4.3.6 Antagonista inhibitorů apoptózy – LCL161

Molekula LCL161 se řadí mezi antagonisty inhibitorů apoptózy, kdy dochází k obnovení tohoto mechanismy v maligních buňkách, které ji dokáží potlačit. LCL161 se principálně váže na celulární inhibitory apoptózy – především cIAP1, cIAP2 – kdy indukuje jejich degradaci s výsledným navozením apoptózy zprostředkované kaspázami a tumor nekrotizujícím faktorem alfa (Pemmaraju a kol., 2021b).

LCL161 podávány pacientům s myelofibrózou, ve středním nebo vysokém riziku, způsobil odezvu ve 30 % případů. U 73 % z hodnocených pacientů pro splenomegálii se v různém měřítku objevilo zlepšení. U pacientů byly také pozorovány klinický účinek na anémii. Častými vedlejšími účinky byly nevolnost, únava, závratě, trombocytopenie a anémie. Technikou western blot byly zjištěny snížené hladiny inhibitorů apoptózy (cíle LCL161) s dominancí pro dlouhodobě odpovídající pacienty, zatímco pacienti, kteří na léčbu neodpovídali měli hodnoty spíše zvýšené. V budoucnu by léčivo mohlo být podáváno pacientům, u kterých JAK inhibitory nebyly účinné (Pemmaraju a kol., 2021b).

4.3.7 Inhibitor anti-apoptického Bcl-2 proteinu – Venetoclax

Bcl-2 skupina proteinů (odvozeno od B buněčného lymfomu), hraje důležitou roli v procesu aktivace apoptózy vnitřní cestou, která končí permeabilizací mitochondriální membrány s uvolněním cytochromu-c a aktivováním kaspáz. Za fyziologického stavu dochází k balancování pro-apoptických a anti-apoptických složek, zatímco u maligních stavů může být tato rovnováha porušena za současného snížení citlivosti k navození apoptózy. Venetoclax se řadí mezi inhibitory anti-apoptického proteinu Bcl-2, kdy se váže na jeho homologní doménu (BH3) namísto pro-apoptických molekul s BH3 homologií, které mohou spolu s dalšími složkami podpořit iniciaci apoptózy (Wei a kol., 2020).

Venetoclax byl podáván, spolu s hypometylačními látkami, skupině pacientů (n = 32) v blastické fázi myeloproliferace. Celkem 9 pacientů bylo před progresí diagnostikováno s primární myelofibrózou a ostatní pacienti se sekundární myelofibrózou nebo PV a ET. Navození kompletní/nekompletní remise proběhlo u 57 % pacientů s primární myelofibrózou. Častým doprovodným znakem byla pancytopenie. V celé skupině byla pozorována slabší odpověď ve spojení s JAK2 mutací, nízkou hladinou hemoglobinu, trombocytózou a dřívější léčbou hydroxyureou. Medián celkového přežití činil 9 měsíců pro pacienty s (ne)kompletní remisí. Tato kombinace představuje potenciál pro léčbu blastické fáze myeloproliferací, kde vyhlídky na přežití jsou výrazným způsobem kompromitovány (Gangat a kol., 2021).

5 ZÁVĚR

Strany této bakalářské práce se zabývají myeloproliferativním onemocněním primární myelofibrózou, jakožto závažným stavem, který výrazným způsobem kompromituje kvalitu život pacienta, a to nejen klinickými manifestacemi, ale také zkrácením délky života. K samotnému onemocnění bylo přistoupeno komplexně, a proto výše zmíněné kapitoly popisují patogenezi, diagnostiku, ale také symptomatologii primární myelofibrózy.

Závěrečná kapitola zahrnuje terapeutické možnosti léčby primární myelofibrózy. Zmíněny jsou nejen konvenční terapeutika, ale také nové léčebné přístupy, které vycházejí z objevů molekulárních znaků onemocnění a jsou tedy cílenější. Nicméně do dnešních dní je léčba především paliativní a jedinou ryze kurativní možností zůstává transplantace krvetvorných buněk.

Ve výčtu terapeutických přístupů najdeme nejen využití farmakologických intervencí, ale také možný invazivní přístup. Z nových možností terapie představují největší klinický přínos inhibitory Janusových kináz. Některým pacientům však pomohou málo, nebo prakticky vůbec. Z toho důvodu je důležitá neustálá badatelská práce při vyhledávání nových účinnějších a bezpečnějších terapeutik či kombinací, ze kterých by mohli benefitovat i tito pacienti. Výše zmiňovaná léčiva, která jsou v současnosti ve stádiu testování, vykazují vysoký terapeutický potenciál i v případech, kdy předchozí léčba selhala, nebo u pacientů v pokročilých stádiích nemoci. V klinickém testování bylo pozorováno zmírnění příznaků onemocnění, redukce míry fibrotizace a mutační zátěže, a dokonce také případy remise onemocnění. Svými účinky se jedná především o epigenetické regulátory, inhibitory anti-apoptické signalizace, inhibitory replikace DNA a inhibitory zasahující do procesu mitózy. Zmíněná potenciální terapeutika tak cílí na porušené regulační a signalizační mechanismy, jejichž funkce jsou důležité pro zachování integrity organismu.

6 LITERATURA

AGRAWAL, Khushboo, Viswanath DAS, Pankhuri VYAS a Marián HAJDÚCH, 2018. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*. **188**, 45-79, DOI:10.1016/j.pharmthera.2018.02.006.

ARBER, Daniel A., Attilio ORAZI, Robert HASSERJIAN, et al., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. **127**(20), 2391-2405, DOI:10.1182/blood-2016-03-643544.

ASHER, Samir, Donal P. MCLORNAN a Claire N. HARRISON, 2020. Current and future therapies for myelofibrosis. *Blood Reviews*. **42**, DOI:10.1016/j.blre.2020.100715.

ATAGUNDUZ, Isik Kaygusuz, Maximilian CHRISTOPEIT, Francis AYUK, Gaby ZECK, Christine WOLSCHKE a Nicolaus KRÖGER, 2020. Incidence and Outcome of Late Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myelofibrosis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. **26**(12), 2279-2284, DOI:10.1016/j.bbmt.2020.09.006.

BADAR, Talha, Hagop M. KANTARJIAN, Farhad RAVANDI, et al., 2015. Therapeutic benefit of decitabine, a hypomethylating agent, in patients with high-risk primary myelofibrosis and myeloproliferative neoplasm in accelerated or blastic/acute myeloid leukemia phase. *Leukemia Research*. **39**(9), 950-956, DOI:10.1016/j.leukres.2015.06.001.

BARBUI, Tiziano, Ayalew TEFFERI, Alessandro M. VANNUCCHI, et al., 2018b. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. **32**(5), 1057-1069, DOI:10.1038/s41375-018-0077-1.

BARBUI, Tiziano, Jürgen THIELE, Heinz GISSLINGER, Hans Michael KVASNICKA, Alessandro M. VANNUCCHI, Paola GUGLIELMELLI, Attilio ORAZI a Ayalew TEFFERI, 2018a. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer Journal*. **8**(2), DOI:10.1038/s41408-018-0054-y.

BAVETSIAS, Vassilios a Spiros LINARDOPOULOS, 2015. Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology*. **5**, DOI:10.3389/fonc.2015.00278.

BEWERSDORF, Jan Philipp, Smith GIRI, Rong WANG, et al., 2020. Interferon Therapy in Myelofibrosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. **20**(10), e712-e723, DOI:10.1016/j.clml.2020.05.018.

CASTIGLIONE, Melissa, Haotian ZHANG, Kenneth KAUSHANSKY a Huichun ZHAN, 2021. Cell competition between wild-type and JAK2V617F mutant cells in a murine model of a myeloproliferative neoplasm. *Experimental Hematology*. **100**, 52-62, DOI:10.1016/j.exphem.2021.06.003.

CASTILLO-TOKUMORI, Franco, Chetasi TALATI, Najla AL ALI, et al., 2020. Retrospective Analysis of the Clinical Use and Benefit of Lenalidomide and Thalidomide in Myelofibrosis. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. **20**(12), e956-e960, DOI:10.1016/j.clml.2020.07.006.

CERVANTES, Francisco, Alessandro M. VANNUCCHI, Jean-Jacques KILADJIAN, et al., 2013. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*. **122**(25), 4047-4053, DOI:10.1182/blood-2013-02-485888.

CERVANTES, Francisco, Ignacio M. ISOLA, Alberto ALVAREZ-LARRÁN, Juan-Carlos HERNÁNDEZ-BOLUDA, Juan-Gonzalo CORREA a Arturo PEREIRA, 2015. Danazol therapy for the anemia of myelofibrosis: assessment of efficacy with current criteria of response and long-term results. *Annals of Hematology*. **94**(11), 1791-1796, DOI:10.1007/s00277-015-2435-7.

CIPKAR, Christopher, Srishti KUMAR, Kednapa THAVORN a Natasha KEKRE, 2022. Optimal Timing of Allogeneic Stem Cell Transplantation for Primary Myelofibrosis. *Transplantation and Cellular Therapy*. **28**(4), 189-194, DOI:10.1016/j.jtct.2022.01.018.

DAVER, Naval, Aditi SHASTRI, Tapan KADIA, et al., 2013. Modest activity of pomalidomide in patients with myelofibrosis and significant anemia. *Leukemia Research*. **37**(11), 1440-1444, DOI:10.1016/j.leukres.2013.07.007.

DAVER, Naval, Aditi SHASTRI, Tapan KADIA, et al., 2014. Phase II study of pomalidomide in combination with prednisone in patients with myelofibrosis and significant anemia. *Leukemia Research*. **38**(9), 1126-1129, DOI:10.1016/j.leukres.2014.06.015.

DAVIDSON, Marta B. a Vikas GUPTA, 2021. Application of Stem Cell Therapy in Myelofibrosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **35**(2), 391-407, DOI:10.1016/j.hoc.2020.12.004.

EL FAKIH, Riad a Uday POPAT, 2015. Janus Kinase Inhibitors and Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. **15**, S34-S42, DOI:10.1016/j.clml.2015.02.034.

EMANUEL, Robyn M., Amylou C. DUECK, Holly L. GEYER, et al., 2012. Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs. *Journal of Clinical Oncology*. **30**(33), 4098-4103, DOI:10.1200/JCO.2012.42.3863.

FAVOINO, Elvira, Marcella PRETE, Giacomo CATAACCHIO, Piero RUSCITTI, Luca NAVARINI, Roberto GIACOMELLI a Federico PEROSA, 2021. Working and safety profiles of JAK/STAT signaling inhibitors. Are these small molecules also smart?. *Autoimmunity Reviews*. **20**(3), DOI:10.1016/j.autrev.2021.102750.

FENG, Yimei, Xiaoping LI, Kaniel CASSADY, Zhongmin ZOU a Xi ZHANG, 2019. TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair. *Frontiers in Oncology*. **9**, DOI:10.3389/fonc.2019.00210.

GANGAT, Naseema, Christian MARINACCIO, Ronan SWORDS, et al., 2019. Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. *Clinical Cancer Research*. **25**(16), 4898-4906, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-1005.

GANGAT, Naseema, Paola GUGLIELMELLI, Natasha SZUBER, et al., 2021. Venetoclax with azacitidine or decitabine in blast-phase myeloproliferative neoplasm: A multicenter series of 32 consecutive cases. *American Journal of Hematology*. **96**(7), 781-789, DOI:10.1002/ajh.26186.

GÁNGÓ, Ambrus, Réka MÓZES, Zsófia BOHA, et al., 2018. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research*. **65**, 42-48, DOI:10.1016/j.leukres.2017.12.005.

- GARMEZY, Benjamin, Jordan K. SCHAEFER, Jessica MERCER a Moshe TALPAZ, 2021. A provider's guide to primary myelofibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Blood Reviews*. **45**, DOI:10.1016/j.blre.2020.100691.
- GERDS, Aaron T., Michael R. SAVONA, Bart L. SCOTT, et al., 2020. Determining the recommended dose of pacritinib: results from the PAC203 dose-finding trial in advanced myelofibrosis. *Blood Advances*. **4**(22), 5825-5835, DOI:10.1182/bloodadvances.2020003314.
- GIANELLI, Umberto, Claudia VENER, Anna BOSSI, et al., 2012. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Modern Pathology*. **25**(9), 1193-1202, DOI:10.1038/modpathol.2012.87.
- GLEITZ, Hélène F. E., Aurélien J. F. DUGOURD, Nils B. LEIMKÜHLER, et al., 2020. Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood*. **136**(18), 2051-2064, DOI:10.1182/blood.2019004095.
- GUGLIELMELLI, Paola, Annalisa PACILLI, Giada ROTUNNO, et al., 2017. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*. **129**(24), 3227-3236, DOI:10.1182/blood-2017-01-761999.
- GUGLIELMELLI, Paola, Giada ROTUNNO, Annalisa PACILLI, et al., 2016. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *American Journal of Hematology*. **91**(9), 918-922, DOI:10.1002/ajh.24442.
- GUPTA, Vikas, Ruben A. MESA, Michael W.N. DEININGER, et al., 2016. A phase 1/2, open-label study evaluating twice-daily administration of momelotinib in myelofibrosis. *Haematologica*. **102**(1), 94-102, DOI:10.3324/haematol.2016.148924.
- HARRISON, C N, A M VANNUCCHI, J-J KILADJIAN, et al., 2016. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. **30**(8), 1701-1707, DOI:10.1038/leu.2016.148.
- HARRISON, Claire N, Nicolaas SCHAAP, Alessandro M VANNUCCHI, et al., 2017. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *The Lancet Haematology*. **4**(7), e317-e324, DOI:10.1016/S2352-3026(17)30088-1.

- HARRISON, Claire N., Nicolaas SCHAAP, Alessandro M. VANNUCCHI, et al., 2020. Fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib: An updated analysis of the JAKARTA2 study using stringent criteria for ruxolitinib failure. *American Journal of Hematology*. **95**(6), 594-603, DOI:10.1002/ajh.25777.
- HARRISON, Claire, Jean-Jacques KILADJIAN, Haifa Kathrin AL-ALI, et al., 2012. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*. **366**(9), 787-798, DOI:10.1056/NEJMoa1110556.
- HUANG, Jinhua, Hongwei GOU, Jia YAO, Kaining YI, Zhigang JIN, Masao MATSUOKA a Tiejun ZHAO, 2021. The noncanonical role of EZH2 in cancer. *Cancer Science*. **112**(4), 1376-1382, DOI:10.1111/cas.14840.
- CHU, Lisa a Kristen PETTIT, 2022. Advances in Janus-Associated Kinase Inhibitor-Based Therapies for Philadelphia Chromosome–Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Advances in Oncology*. **2**(1), 179-194, DOI:10.1016/j.yao.2022.02.013.
- IANOTTO, Jean-Christophe, Françoise BOYER-PERRARD, Emmanuel GYAN, et al., 2013. Efficacy and safety of pegylated-interferon α -2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *British Journal of Haematology*. **162**(6), 783-791, DOI:10.1111/bjh.12459.
- JAMIESON, Catriona, Robert HASSERJIAN, Jason GOTLIB, et al., 2015. Effect of treatment with a JAK2-selective inhibitor, fedratinib, on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *Journal of Translational Medicine*. **13**(1), DOI:10.1186/s12967-015-0644-4.
- KAMEDA, Takuro, Kotaro SHIDE, Takumi YAMAJI, et al., 2015. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood*. **125**(2), 304-315, DOI:10.1182/blood-2014-04-555508.
- KEYZNER, Alla, Sarah HAN, Samantha SHAPIRO, et al., 2016. Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Chronic and Advanced Phase Myelofibrosis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. **22**(12), 2180-2186, DOI:10.1016/j.bbmt.2016.08.029.
- KIELBIK, Michal, Izabela SZULC-KIELBIK a Magdalena KLINK, 2021. Calreticulin—Multifunctional Chaperone in Immunogenic Cell Death: Potential Significance as a Prognostic Biomarker in Ovarian Cancer Patients. *Cells*. **10**(1), DOI:10.3390/cells10010130.

- KIM, Seon Young, Kyongok IM, Si Nae PARK, Jiseok KWON, Jung-Ah KIM a Dong Soon LEE, 2015. CALR, JAK2, and MPL Mutation Profiles in Patients With Four Different Subtypes of Myeloproliferative Neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*. **143**(5), 635-644, DOI:10.1309/AJCPUAAC16LIWZMM.
- KRÖGER, N M, J H DEEG, E OLAVARRIA, et al., 2015. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. **29**(11), 2126-2133, DOI:10.1038/leu.2015.233.
- LASHO, Terra L., Mythri MUDIREDDY, Christy M. FINKE, et al., 2018. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Advances*. **2**(4), 370-380, DOI:10.1182/bloodadvances.2018015875.
- LIN, Chi Hua Sarah, Kenneth KAUSHANSKY a Huichun ZHAN, 2016. JAK2V617F-mutant vascular niche contributes to JAK2V617F clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. **62**, 42-48, DOI:10.1016/j.bcmed.2016.09.004.
- LIN, Chi Hua Sarah, Yu ZHANG, Kenneth KAUSHANSKY a Huichun ZHAN, 2018. JAK2V617F -bearing vascular niche enhances malignant hematopoietic regeneration following radiation injury. *Haematologica*. **103**(7), 1160-1168, DOI:10.3324/haematol.2017.185736.
- LIU, Shuang, Tom CADOUX-HUDSON a Christopher J. SCHOFIELD, 2020. Isocitrate dehydrogenase variants in cancer — Cellular consequences and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Chemical Biology*. **57**, 122-134, DOI:10.1016/j.cbpa.2020.06.012.
- MADDALI, Madhavi, Uday Prakash KULKARNI, Niveditha RAVINDRA, et al., 2021. Mutation profile in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: A single-center experience from India. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. **2021**, DOI:10.1016/j.hemonc.2021.03.002.
- MALATO, Alessandra, Elena ROSSI, Mario TIRIBELLI, Francesco MENDICINO a Novella PUGLIESE, 2020. Splenectomy in Myelofibrosis: Indications, Efficacy, and Complications. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. **20**(9), 588-595, DOI:10.1016/j.clml.2020.04.015.

- MARTÍNEZ-TRILLOS, Alejandra, Anna GAYA, Margherita MAFFIOLI, Eduardo ARELLANO-RODRIGO, Xavier CALVO, Marina DÍAZ-BEYÁ a Francisco CERVANTES, 2010. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Annals of Hematology*. **89**(12), 1233-1237, DOI:10.1007/s00277-010-1019-9.
- MASAROVA, Lucia, Srdan VERSTOVSEK, Juliana E. HIDALGO-LOPEZ, et al., 2018. A phase 2 study of ruxolitinib in combination with azacitidine in patients with myelofibrosis. *Blood*. **132**(16), 1664-1674, DOI:10.1182/blood-2018-04-846626.
- MASCARENHAS, J., B.K. MARCELLINO, M. LU, et al., 2020b. A phase I study of panobinostat and ruxolitinib in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Leukemia Research*. **88**, DOI:10.1016/j.leukres.2019.106272.
- MASCARENHAS, John O., Raajit K. RAMPAL, Heidi E. KOSIOREK, et al., 2020a. Phase 2 study of ruxolitinib and decitabine in patients with myeloproliferative neoplasm in accelerated and blast phase. *Blood Advances*. **4**(20), 5246-5256, DOI:10.1182/bloodadvances.2020002119.
- MASCARENHAS, John, Lonette SANDY, Min LU, et al., 2017. A phase II study of panobinostat in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Leukemia Research*. **53**, 13-19, DOI:10.1016/j.leukres.2016.11.015.
- MASCARENHAS, John, Rami S. KOMROKJI, Francesca PALANDRI, et al., 2021. Randomized, Single-Blind, Multicenter Phase II Study of Two Doses of Imetelstat in Relapsed or Refractory Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*. **39**(26), DOI:10.1200/JCO.20.02864.
- MASCARENHAS, John, Ronald HOFFMAN, Moshe TALPAZ, et al., 2018. Pacritinib vs Best Available Therapy, Including Ruxolitinib, in Patients With Myelofibrosis. *JAMA Oncology*. **4**(5), DOI:10.1001/jamaoncol.2017.5818.
- MAZZEO, Christopher, Moqing QUAN, Helen WONG, Melissa CASTIGLIONE, Kenneth KAUSHANSKY a Huichun ZHAN, 2021. JAK2V617F mutant endothelial cells promote neoplastic hematopoiesis in a mixed vascular microenvironment. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. **90**, DOI:10.1016/j.bcmed.2021.102585.

MEAD, Adam J. a Ann MULLALLY, 2017. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*. **129**(12), 1607-1616, DOI:10.1182/blood-2016-10-696005.

MELO-CARDENAS, Johanna, Anna Rita MIGLIACCIO a John D. CRISPINO, 2021. The Role of Megakaryocytes in Myelofibrosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **35**(2), 191-203, DOI:10.1016/j.hoc.2020.11.004.

MENDT, Mayela a Jose E. CARDIER, 2015. Role of SDF-1 (CXCL12) in regulating hematopoietic stem and progenitor cells traffic into the liver during extramedullary hematopoiesis induced by G-CSF, AMD3100 and PHZ. *Cytokine*. **76**(2), 214-221, DOI:10.1016/j.cyto.2015.05.004.

MESA, Ruben A, Alessandro M VANNUCCHI, Adam MEAD, et al., 2017a. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Haematology*. **4**(5), e225-e236, DOI:10.1016/S2352-3026(17)30027-3.

MESA, Ruben A., Jean-Jacques KILADJIAN, John V. CATALANO, et al., 2017b. SIMPLIFY-1: A Phase III Randomized Trial of Momelotinib Versus Ruxolitinib in Janus Kinase Inhibitor–Naïve Patients With Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*. **35**(34), 3844-3850, DOI:10.1200/JCO.2017.73.4418.

MONDELLO, Patrizia, Cristian DI MIRTO, Salvatore CUZZOCREA, Carmela ARRIGO, Michael MIAN a Vincenzo PITINI, 2019. Interferon Alpha Has a Strong Anti-tumor Effect in Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. **19**(8), e489-e495, DOI:10.1016/j.clml.2019.03.027.

MORISHITA, Soji, Tomonori OCHIAI, Kyohei MISAWA, et al., 2021. Clinical impacts of the mutational spectrum in Japanese patients with primary myelofibrosis. *International Journal of Hematology*. **113**(4), 500-507, DOI:10.1007/s12185-020-03054-x.

NAZHA, Aziz, Joseph D. KHOURY, Raajit K. RAMPAL a Naval DAVER, 2015. Fibrogenesis in Primary Myelofibrosis: Diagnostic, Clinical, and Therapeutic Implications. *The Oncologist*. **20**(10), 1154-1160, DOI:10.1634/theoncologist.2015-0094.

OH, Stephen T., Moshe TALPAZ, Aaron T. GERDS, et al., 2020. ACVR1/JAK1/JAK2 inhibitor momelotinib reverses transfusion dependency and suppresses hepcidin in myelofibrosis phase 2 trial. *Blood Advances*. **4**(18), 4282-4291, DOI:10.1182/bloodadvances.2020002662.

- O'SULLIVAN, Jennifer a Adam J. MEAD, 2019. Heterogeneity in myeloproliferative neoplasms: Causes and consequences. *Advances in Biological Regulation*. **71**, 55-68, DOI:10.1016/j.jbior.2018.11.007.
- O'SULLIVAN, Jennifer M. a Claire N. HARRISON, 2017. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **451**, 71-79, DOI:10.1016/j.mce.2017.01.050.
- PARDANANI, Animesh, Claire HARRISON, Jorge E. CORTES, et al., 2015. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis. *JAMA Oncology*. **1**(5), DOI:10.1001/jamaoncol.2015.1590.
- PASSAMONTI, Francesco a Margherita MAFFIOLI, 2016. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. *Hematology*. **2016**(1), 534-542, DOI:10.1182/asheducation-2016.1.534.
- PEMMARAJU, Naveen, Bing Z. CARTER, Prithviraj BOSE, et al., 2021b. Final results of a phase 2 clinical trial of LCL161, an oral SMAC mimetic for patients with myelofibrosis. *Blood Advances*. **5**(16), 3163-3173, DOI:10.1182/bloodadvances.2020003829.
- PEMMARAJU, Naveen, Natalie C. CHEN a Srdan VERSTOVSEK, 2021a. Immunotherapy and Immunomodulation in Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **35**(2), 409-429, DOI:10.1016/j.hoc.2020.12.007.
- PIZZI, Marco, Usama GERGIS, Felicia CHAVIANO a Attilio ORAZI, 2016. The effects of hematopoietic stem cell transplant on splenic extramedullary hematopoiesis in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. **9**(3), 96-104, DOI:10.1016/j.hemonc.2016.07.002.
- PRAKASH, Sonam, Ronald HOFFMAN, Sharon BAROUK, Y Lynn WANG, Daniel M KNOWLES a Attilio ORAZI, 2012. Splenic extramedullary hematopoietic proliferation in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: heterogeneous morphology and cytological composition. *Modern Pathology*. **25**(6), 815-827, DOI:10.1038/modpathol.2012.33.
- PUGLIESE, Novella, Claudia GIORDANO, Davide NAPPI, et al., 2019. Adding hydroxyurea in combination with ruxolitinib improves clinical responses in hyperproliferative forms of myelofibrosis. *Cancer Medicine*. **8**, 2802-2809, DOI:10.1002/cam4.2147.

- QASRAWI, Ayman a Ranjana ARORA, 2021. Molecular Profile of BCR-ABL1 Negative Myeloproliferative Neoplasms and Its Impact on Prognosis and Management. *Advances in Molecular Pathology*. **4**, 65-79, DOI:10.1016/j.yamp.2021.06.001.
- ROBIN, Marie, Liesbeth C. DE WREEDE, Christine WOLSCHKE, et al., 2019. Long-term outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica*. **104**(9), 1782-1788, DOI:10.3324/haematol.2018.205211.
- ROBIN, Marie, Maryem ZINE, Sylvie CHEVRET, et al., 2017. The Impact of Splenectomy in Myelofibrosis Patients before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. **23**(6), 958-964, DOI:10.1016/j.bbmt.2017.03.002.
- RUMI, Elisa a Mario CAZZOLA, 2017. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. **129**(6), 680-692, DOI:10.1182/blood-2016-10-695957.
- RUMI, Elisa, Daniela PIETRA, Cristiana PASCUTTO, et al., 2014. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. **124**(7), 1062-1069, DOI:10.1182/blood-2014-05-578435.
- SAEIDI, Kolsoum, 2016. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **98**, 375-389, DOI:10.1016/j.critrevonc.2015.11.004.
- SANGIORGIO, Valentina Fabiola Ilenia, Anna NAM, Zhengming CHEN, Attilio ORAZI a Wayne TAM, 2021. GATA1 downregulation in prefibrotic and fibrotic stages of primary myelofibrosis and in the myelofibrotic progression of other myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research*. **100**, DOI:10.1016/j.leukres.2020.106495.
- SCOTCH, Allison H., Heidi KOSIOREK, Robyn SCHERBER, et al., 2017. Symptom burden profile in myelofibrosis patients with thrombocytopenia: Lessons and unmet needs. *Leukemia Research*. **63**, 34-40, DOI:10.1016/j.leukres.2017.10.002.
- SCHERBER, Robyn, Amylou C. DUECK, Peter JOHANSSON, et al., 2011. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): International Prospective Validation and Reliability Trial in 402 patients. *Blood*. **118**(2), 401-408, DOI:10.1182/blood-2011-01-328955.

- SILVER, Richard T., Ariella C. BAREL, Elena LASCU, et al., 2017. The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- α (rIFN α) treatment in early myelofibrosis. *Cancer*. **123**(14), 2680-2687, DOI:10.1002/cncr.30679.
- SONG, Jinming, Mohammad HUSSAINI, Hailing ZHANG, et al., 2017. Comparison of the Mutational Profiles of Primary Myelofibrosis, Polycythemia Vera, and Essential Thrombocytosis. *American Journal of Clinical Pathology*. **147**(5), 444-452, DOI:10.1093/ajcp/aqw222.
- SØRENSEN, Anders Lindholm, Stine Ulrik MIKKELSEN, Trine Alma KNUDSEN, et al., 2020. Ruxolitinib and interferon- α 2 combination therapy for patients with polycythemia vera or myelofibrosis: a phase II study. *Haematologica*. **105**(9), 2262-2272, DOI:10.3324/haematol.2019.235648.
- SURAWEERA, Amila, Kenneth J. O'BYRNE a Derek J. RICHARD, 2018. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Frontiers in Oncology*. **8**, DOI:10.3389/fonc.2018.00092.
- SZYBINSKI, Jakub a Sara C. MEYER, 2021. Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **35**(2), 217-236, DOI:10.1016/j.hoc.2020.12.002.
- TEFFERI, A, T JIMMA, N H SULAI, T L LASHO, C M FINKE, R A KNUDSON, R F MCCLURE a A PARDANANI, 2012. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia*. **26**(3), 475-480, DOI:10.1038/leu.2011.253.
- TEFFERI, A, T L LASHO, C M FINKE, et al., 2014. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. **28**(7), 1472-1477, DOI:10.1038/leu.2014.3.
- TEFFERI, Ayalew, 2021. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*. **96**(1), 145-162, DOI:10.1002/ajh.26050
- TEFFERI, Ayalew, Mythri MUDIREDDY, Naseema GANGAT, Curtis A. HANSON, Rhett P. KETTERLING, Animesh PARDANANI a David M. NAGORNEY, 2017. Risk factors and a prognostic model for postsplenectomy survival in myelofibrosis. *American Journal of Hematology*. **92**(11), 1187-1192, DOI:10.1002/ajh.24881.

- TEFFERI, Ayalew, Paola GUGLIELMELLI, Animesh PARDANANI a Alessandro M. VANNUCCHI, 2018. Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*. **8**(8), DOI:10.1038/s41408-018-0109-0.
- TEFFERI, Ayalew, Terra L. LASHO, Christy M. FINKE, Yoseph ELALA, Curtis A. HANSON, Rhett P. KETTERLING, Naseema GANGAT a Animesh PARDANANI, 2016. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Advances*. **1**(2), 105-111, DOI:10.1182/bloodadvances.2016000208.
- TEFFERI, Ayalew, Terra L. LASHO, Kebede H. BEGNA, et al., 2015. A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*. **373**(10), 908-919, DOI:10.1056/NEJMoa1310523.
- VAINCHENKER, W a S N CONSTANTINESCU, 2013. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. **32**(21), 2601-2613, DOI:10.1038/onc.2012.347.
- VAINCHENKER, William a Robert KRALOVICS, 2017. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. **129**(6), 667-679, DOI:10.1182/blood-2016-10-695940.
- VANNUCCHI, A M, T L LASHO, P GUGLIELMELLI, et al., 2013. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. **27**(9), 1861-1869, DOI:10.1038/leu.2013.119.
- VENTON, Geoffroy, Frédéric COURTIER, Aude CHARBONNIER, et al., 2018. Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*. **93**(3), 330-338, DOI:10.1002/ajh.24973.
- VENUGOPAL, Sangeetha a John MASCARENHAS, 2021. Current Clinical Investigations in Myelofibrosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **35**(2), 353-373, DOI:10.1016/j.hoc.2020.12.003.
- VERSTOVSEK, Srdan, Ruben A. MESA, Jason GOTLIB, et al., 2012. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*. **366**(9), 799-807, DOI:10.1056/NEJMoa1110557.
- WANG, Xiaoli, Cing Siang HU, Bruce PETERSEN, et al., 2018. Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. *Blood Advances*. **2**(18), 2378-2388, DOI:10.1182/bloodadvances.2018022012.

- WANG, Xiaoli, Sool Yeon CHO, Cing Siang HU, Daniel CHEN, John ROBOZ a Ronald HOFFMAN, 2015. C-X-C motif chemokine 12 influences the development of extramedullary hematopoiesis in the spleens of myelofibrosis patients. *Experimental Hematology*. **43**(2), 100-109.e1, DOI:10.1016/j.exphem.2014.10.013.
- WEI, Yunxiong, Yaqing CAO, Rui SUN, et al., 2020. Targeting Bcl-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology*. **10**, DOI:10.3389/fonc.2020.584974.
- WILKINS, Bridget S., 2021. Myeloproliferative neoplasms. *Diagnostic Histopathology*. **27**(9), 373-379, DOI:10.1016/j.mpdhp.2021.06.003.
- XIN, Ping, Xiaoyun XU, Chengjie DENG, et al., 2020. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*. **80**, DOI:10.1016/j.intimp.2020.106210.
- YANG, Yue, Hajime AKADA, Dipmoy NATH, Robert E. HUTCHISON a Golam MOHI, 2016. Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. **127**(26), 3410-3423, DOI:10.1182/blood-2015-11-679431.
- Zahr, A. A., M. E. Salama, N. Carreau, D. Tremblay, S. Verstovsek, R. Mesa, R. Hoffman a J. Mascarenhas, 2016. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. **101**(6), 660-671, DOI:10.3324/haematol.2015.141283.