



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivona Arić Zrna

**MITOHONDRIJSKI GENOM U
BOLESNIKA S KRONIČNIM
MIJELOPROLIFERATIVNIM
NEOPLAZMAMA S MUTACIJOM V617F U
GENU *JAK2***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivona Arić Zrna

**MITOHONDRIJSKI GENOM U
BOLESNIKA S KRONIČNIM
MIJELOPROLIFERATIVNIM
NEOPLAZMAMA S MUTACIJOM V617F U
GENU *JAK2***

DOKTORSKI RAD

Mentorice:

dr. sc. Marina Korolija, viša znanstvena suradnica

prof. dr. sc. Inga Urlić

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Science

Department of Biology

Ivona Arić Zrna

**MITOCHONDRIAL GENOME IN
PATIENTS WITH JAK2 V617F POSITIVE
CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE
NEOPLASMS**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

Marina Korolija, PhD, Senior Research Associate

Inga Urlić, Full Professor

Zagreb, 2026.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Ciljevi istraživanja.....	2
1.2. Hipoteza istraživanja.....	3
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Mijeloproliferativne neoplazme.....	4
2.1.1. Definicija.....	4
2.1.2. Klasifikacija.....	5
2.1.3. Najčešći tipovi MPN-a.....	6
2.1.3.1. Policitemija vera (PV).....	6
2.1.3.2. Esencijalna trombocitemija (ET).....	7
2.1.3.3. Primarna mijelofibroza (PMF).....	8
2.1.4. Pokretačke mutacije MPN-a.....	9
2.1.4.1. Mutacija Janus kinaze JAK2 V617F.....	9
2.1.4.2. Mutacije CALR.....	13
2.1.4.3. Mutacije MPL.....	13
2.2. Mitohondriji.....	14
2.2.1. Mitohondrijska DNA.....	15
2.2.2. Haplogrupe.....	17
2.2.3. Heteroplazmije i homoplazmije.....	18
2.2.4. Broj kopija mtDNA.....	20
2.2.5. Mitohondrijske mutacije i bolesti.....	21
2.2.6. Oksidativni stres i uloga antioksidativnih enzima.....	21
2.2.7. Mitohondriji u karcinomima i MPN-u.....	23
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Materijali.....	24
3.1.1. Biološki materijal.....	24
3.1.2. Kemikalije.....	24
3.1.3. Otopine i pufferi.....	24
3.1.4. Reagensi.....	25
3.1.5. Oprema.....	26
3.1.6. Računalni programi i alati.....	26
3.2. Metode.....	28
3.2.1. Hematološka analiza krvi.....	28
3.2.2. Procjena kliničkih simptoma bolesnika s MPN-om.....	28
3.2.3. Izolacija granulocita.....	28

3.2.4. Izolacija RNA.....	29
3.2.5. Mjerenje koncentracije i čistoće RNA.....	30
3.2.6. Izolacija DNA.....	30
3.2.7. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA	31
3.2.8. Reakcija PCR specifična za alel i vizualizacija umnoženih produkata.....	31
3.2.9. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom JAK2 V617F	32
3.2.10. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom.....	33
3.2.11. Reverzna transkripcija	34
3.2.12. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu.....	34
3.2.13. Mjerenje broja kopija mtDNA.....	35
3.2.14. Sekvenciranje sljedeće generacije pomoću panela za MPN.....	35
3.2.14.1. Prva reakcija PCR	36
3.2.14.2. Druga reakcija PCR.....	36
3.2.14.3. Kvantifikacija i spajanje knjižnica.....	36
3.2.14.4. Denaturacija knjižnica i kontrole PhiX.....	37
3.2.14.5. Sekvenciranje	37
3.2.14.6. Provjera kvalitete sekvenciranja.....	38
3.2.15. Umnažanje mtDNA reakcijom PCR.....	38
3.2.16. Sekvenciranje mtDNA metodom NGS.....	39
3.2.16.1. Tagmentacija mtDNA	39
3.2.16.2. Čišćenje tagmentirane mtDNA.....	39
3.2.16.3. Umnažanje amplificirane mtDNA i indeksiranje	40
3.2.16.4. Pročišćavanje umnoženih knjižnica	40
3.2.16.5. Kvantifikacija i spajanje knjižnica.....	41
3.2.16.6. Denaturacija knjižnica i kontrole PhiX.....	41
3.2.16.7. Sekvenciranje	41
3.2.17. Bioinformatička i statistička obrada podataka	41
4. REZULTATI.....	43
4.1. Karakteristike ispitanika.....	43
4.2. Hematološka analiza periferne krvi.....	44
4.3. Klinički simptomi bolesnika s MPN-om.....	47
4.4. Detekcija mutacije JAK2 V617F primjenom PCR-a specifičnog za alel.....	49
4.5. Provjera specifičnosti PCR-a specifičnog za alel sekvenciranjem	50
4.6. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom JAK2 V617F	51
4.6.1. Udio varijantnog alela mutacije JAK2 V617F mjeren metodom qPCR.....	51
4.7. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom.....	53
4.8. Genska ekspresija mitohondrijskih i antioksidativnih gena.....	54

4.9. Broj kopija mtDNA.....	55
4.10. Raspodjela mitohondrijskih haplogrupa.....	55
4.11. Analiza potencijalno patogenih heteroplazmija pri pragu od 5 %.....	57
4.12. Homoplazmije	58
4.13. Klinički značajne varijante mitohondrijske DNA u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F i zdravih ispitanika.....	58
4.14. Analiza povezanosti kliničkih, hematoloških i molekularnih parametara	61
4.14.1. Analiza kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara	62
4.14.2. Statistički značajne korelacije kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara.....	63
4.14.2.1. Omjer MT/NAO u korelaciji s hematološkim parametrima krvne slike	63
4.14.2.2. Ekspresija gena SIRT3, MT-ND1, CAT i SOD2 u korelaciji sa simptomima određenim upitnikom MPN-SAF TSS.....	63
4.14.2.3. Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s parametrima utvrđenim hematološkom analizom krvi.....	65
4.14.2.4. Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F.....	66
4.14.2.5. Parametri utvrđeni hematološkom analizom krvi u korelaciji s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F.....	66
4.14.2.6. Parametri utvrđeni hematološkom analizom krvi u korelaciji s brojem kopija mtDNA	67
4.14.2.7. Udio varijantnog alela mutacije JAK2 V617F u korelaciji s brojem kopija mtDNA.....	69
5. RASPRAVA.....	70
5.1. Hematološka analiza krvi	70
5.2. Klinički simptomi bolesnika s MPN-om.....	71
5.3. Detekcija i kvantifikacija mutacije JAK2 V617F.....	71
5.4. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom.....	72
5.5. Genska ekspresija mitohondrijskih i antioksidativnih gena.....	73
5.6. Broj kopija mtDNA kod bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F	74
5.7. Mitohondrijske haplogrupe, heteroplazmije i homoplazmije.....	74
5.8. Klinička i potencijalna prediktivna vrijednost mitohondrijskih varijanti u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F.....	76
5.9. Analiza povezanosti kliničkih, hematoloških i molekularnih parametara	77
5.9.1. Analiza kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara	77
5.9.2. Statistički značajne korelacije kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara.....	77
5.9.2.1. Omjer MT/NAO u korelaciji s hematološkim parametrima krvne slike	77
5.9.2.2. Ekspresija gena SIRT3, MT-ND1, CAT i SOD2 u korelaciji sa simptomima određenim upitnikom MPN-SAF TSS.....	78

5.9.2.3. <i>Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s parametrima hematološke analize krvi</i>	78
5.9.2.4. <i>Povezanost intenziteta simptoma MPN-a s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F</i>	79
5.9.2.5. <i>Korelacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F s hematološkim parametrima krvne slike</i>	80
5.9.2.6. <i>Korelacija hematoloških parametara i broja kopija mtDNA</i>	80
5.9.2.7. <i>Korelacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F i broja kopija mtDNA</i>	81
6. ZAKLJUČCI	82
7. LITERATURA	84
8. ŽIVOTOPIS	100

Ovaj doktorski rad izrađen je u Kliničkoj bolnici Dubrava, na Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, pod vodstvom mentorica dr. sc. Marine Korolije, više znanstvene suradnice, i prof. dr. sc. Inge Urlić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

INFORMACIJE O MENTORICAMA

Dr. sc. Marina Korolija diplomirala je i doktorirala na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svoje znanstvene karijere usmjerila se na područje molekularne biologije i genetike, s posebnim naglaskom na analizu DNA, sekvenciranje i primjenu suvremenih molekularnih metoda u biomedicini i forenzičkim istraživanjima.

Zaposlena je u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu kao voditeljica Odjela za sistemsku i regenerativnu biomedicinu Zavoda za znanstvenoistraživačku djelatnost i translacijsku medicinu. Sudjelovala je u brojnim znanstveno-istraživačkim projektima, uključujući istraživanja genetičke podloge bolesti i virusnih infekcija.

Autorica je i koautorica većeg broja znanstvenih radova objavljenih u međunarodnim časopisima te aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. U svom radu koristi suvremene molekularne metode, čime doprinosi razvoju molekularne dijagnostike i genetike u kliničkom i istraživačkom okruženju.

Prof. dr. sc. Inga Urlić diplomirala je i doktorirala na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svoje znanstvene karijere dodatno se usavršavala na međunarodnim institucijama, uključujući University of Connecticut Health Center u Sjedinjenim Američkim Državama.

Zaposlena je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje djeluje u znanstveno-nastavnom zvanju redovite profesorice. Sudjelovala je u brojnim nacionalnim i međunarodnim znanstveno-istraživačkim projektima te je vodila više istraživačkih projekata.

Autorica je i koautorica većeg broja znanstvenih radova objavljenih u relevantnim međunarodnim časopisima te aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. Njezin znanstveni interes usmjeren je na područje molekularne biologije, biologije tumora, matičnih stanica te regenerativne medicine, a aktivno sudjeluje i u mentoriranju diplomskih i doktorskih radova.

Mitohondrijski genom u bolesnika s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama s mutacijom V617F u genu *JAK2*

Ivona Arić Zrna
Klinička bolnica Dubrava
Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) skupina su bolesti koje karakterizira prekomjerna proizvodnja jedne ili više loza hematopoetskih stanica. Najčešći uzrok MPN-a je točkasta mutacija c.1849G>T u genu *JAK2*, koja dovodi do trajne aktivacije signalnog puta JAK-STAT. Razvoj kronične i akutne faze bolesti te povezanost mitohondrijskog genoma s razvojem MPN-a do sada nisu objašnjeni. U ovom istraživanju analizirani su mitohondrijski funkcionalni parametri, razina oksidativnog stresa i slijed mitohondrijske DNA (mtDNA) primjenom sekvenciranja nove generacije. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na poremećaj mitohondrijske funkcije i antioksidativne obrane u bolesnika te povezanost između udjela varijantnog alela i mitohondrijskih parametara. Analiza sekvence mitohondrijskog genoma pokazala je povećano mutacijsko opterećenje u bolesnika, uključujući prisutnost potencijalno patogenih točkastih promjena, uz odsutnost većih strukturnih poremećaja. Iz rezultata proizlazi zaključak da mitohondrijska disfunkcija i narušena redoks ravnoteža predstavljaju važan aspekt patofiziologije MPN-a, dok mtDNA vjerojatno ima modulacijsku, ali ne i primarnu ulogu u oblikovanju fenotipa bolesti. Rezultati upućuju na potrebu za daljnjim istraživanjima prognostičkih biljega u MPN-u.

(100 stranica, 25 slika, 7 tablica, 198 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: mijeloproliferativne neoplazme, mutacija *JAK2* V617F, mitohondrijska DNA, oksidativni stres, haplogrupe, heteroplazmije, homoplazmije

Mentorice: Dr. sc. Marina Korolija, viša znanstvena suradnica
Prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Maja Matulić
izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
dr. sc. Vesna Musani, viša znanstvena suradnica

Mitochondrial genome in patients with JAK2 V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms

Ivona Arić Zrna
Klinička bolnica Dubrava
Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of disorders characterized by the excessive production of one or more hematopoietic cell lineages. The most common cause of MPNs is a point mutation c.1849G>T in the *JAK2* gene, which leads to constitutive activation of the JAK-STAT signaling pathway. The development of chronic and acute phases of the disease, as well as the role of the mitochondrial genome in MPN pathogenesis, remain unclear. In this study, mitochondrial functional parameters, oxidative stress levels, and mitochondrial DNA (mtDNA) sequence were analyzed using next-generation sequencing. The results indicate impaired mitochondrial function and antioxidant defense in patients, as well as an association between the mutant allele burden and mitochondrial parameters. Analysis of the mitochondrial genome sequence revealed an increased mutational burden in patients, including the presence of potentially pathogenic point variants, in the absence of major structural alterations. These findings suggest that mitochondrial dysfunction and disrupted redox balance represent important aspects of MPN pathophysiology, while mtDNA likely plays a modulatory rather than a primary role in shaping the disease phenotype. The results highlight the need for further research to identify prognostic biomarkers in MPNs.

(100 pages, 25 figures, 7 tables, 198 references, original in Croatian)

Keywords: myeloproliferative neoplasms, JAK2 V617F mutation, mitochondrial DNA, oxidative stress, haplogroups, heteroplasmy, homoplasmy

Supervisors: Marina Korolija, PhD, Senior Research Associate
Inga Urlić, Full Professor

Reviewers: Prof. Maja Matulić, PhD
Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD
Vesna Musani, PhD, Senior Research Associate

Popis kratica

- ADP – adenzin difosfat (engl. *Adenosine Diphosphate*)
- AKT – protein kinaza B (engl. *Protein Kinase B*)
- AML – akutna mijeloična leukemija (engl. *Acute Myeloid Leukemia*)
- ASXL1 – protein sličan dodatnom spolnom češlju 1 (engl. *Additional Sex Combs-Like 1*)
- ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)
- BCR::ABL1 – fuzijski gen regije prijelomne točke i Abelsonove tirozin kinaze 1 (engl. *Breakpoint Cluster Region–Abelson Tyrosine Kinase*)
- CALR – kalretikulin (engl. *Calreticulin*)
- CAT – katalaza (engl. *Catalase*)
- CBL – protoonkogen *CBL* (engl. *Casitas B-Lineage Lymphoma*)
- CEL – kronična eozinofilna leukemija (engl. *Chronic Eosinophilic Leukemia*)
- CEL-NOS – kronična eozinofilna leukemija, nespecificirana (engl. *Chronic Eosinophilic Leukemia, Not Otherwise Specified*)
- CML – kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic Myeloid Leukemia*)
- CNL – kronična neutrofilna leukemija (engl. *Chronic Neutrophilic Leukemia*)
- COX – citokrom c oksidaza (engl. *Cytochrome C Oxidase*)
- CYB – citokrom b (engl. *Cytochrome B*)
- dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat (engl. *Deoxyribonucleotide Triphosphate*)
- EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- EPO – eritropoetin (engl. *Erythropoietin*)
- ET – esencijalna trombocitemija (engl. *Essential Thrombocythemia*)
- ETC – lanac transporta elektrona (engl. *Electron Transport Chain*)
- EZH2 – histon-lizin N-metiltransferaza EZH2 (engl. *Enhancer Of Zeste Homolog 2*)
- FAB – Francusko-Američko-Britanska klasifikacija (engl. *French-American-British Classification*)
- FOXO3a – transkripcijski faktor FOXO3a (engl. *Forkhead Box O3*)
- GM-CSF – faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
- GPx – glutation peroksidaza (engl. *Glutathione Peroxidase*)
- HCT – hematokrit (engl. *Hematocrit*)
- HGB – hemoglobin (engl. *Hemoglobin*)
- HIF – hipoksijom inducibilni faktor (engl. *Hypoxia-Inducible Factor*)

HSC – hematopoetske matične stanice (engl. *Hematopoietic Stem Cells*)

HVR – hipervarijabilna regija (engl. *Hypervariable Region*)

HVS – hipervarijabilni segment (engl. *Hypervariable Segment*)

ICC – međunarodna konsenzusna klasifikacija (engl. *International Consensus Classification*)

IDH1 – izocitrat dehidrogenaza 1 (engl. *Isocitrate Dehydrogenase 1*)

IDH2 – izocitrat dehidrogenaza 2 (engl. *Isocitrate Dehydrogenase 2*)

JAK – Janus kinaza (engl. *Janus Kinase*)

JAK1 – Janus kinaza 1 (engl. *Janus Kinase 1*)

JAK2 – Janus kinaza 2 (engl. *Janus Kinase 2*)

JAK3 – Janus kinaza 3 (engl. *Janus Kinase 3*)

JAK-STAT – signalni put Janus kinaze i STAT proteina (engl. *Janus Kinase/Signal Transducer And Activator Of Transcription Pathway*)

JMML – juvenilna mijelomonocitna leukemija (engl. *Juvenile Myelomonocytic Leukemia*)

KRAS – protoonkogen KRAS (engl. *Kirsten Rat Sarcoma Virus*)

LHON – Leberova nasljedna optička neuropatija (engl. *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MCV – srednji volumen eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*)

MCH – srednja količina hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*)

MCHC – srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*)

MDS – mijelodisplastični sindrom (engl. *Myelodysplastic Syndrome*)

MELAS – mitohondrijska encefalomiopatija s laktacidozom i epizodama sličnim moždanom udaru (engl. *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, And Stroke-Like Episodes*)

MF – mijelofibroza (engl. *Myelofibrosis*)

MPC – mitohondrijski piruvatni nosač (engl. *Mitochondrial Pyruvate Carrier*)

MPL – receptor za trombopoetin (engl. *Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene*)

MPN – mijeloproliferativne neoplazme (engl. *Myeloproliferative Neoplasms*)

MPN-SAF TSS – obrazac za procjenu simptoma MPN-a (engl. *Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form Total Symptom Score*)

MPN-U – neklasificirane mijeloproliferativne neoplazme (engl. *Myeloproliferative Neoplasm, Unclassifiable*)

MPV – srednji volumen trombocita (engl. *Mean Platelet Volume*)

MTTL1 – mitohondrijski gen za tRNA leucin 1 (engl. *Mitochondrially Encoded tRNA Leucine 1*)

mtDNA – mitohondrijska DNA (engl. *Mitochondrial DNA*)

mtDNA-CN – broj kopija mitohondrijske DNA (engl. *Mitochondrial DNA Copy Number*)

NAO – nonil akridin narančasti (engl. *Nonyl Acridine Orange*)

ND1–ND6 – podjedinice NADH dehidrogenaze (engl. *NADH Dehydrogenase Subunits*)

NRAS – protoonkogen NRAS (engl. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene*)

NRF-1 – nuklearni respiratorni faktor 1 (engl. *Nuclear Respiratory Factor 1*)

nDNA – nuklearna DNA (engl. *Nuclear DNA*)

OH – ishodište replikacije teškog lanca (engl. *Origin Of Heavy Strand*)

OL – ishodište replikacije lakog lanca (engl. *Origin Of Light Strand*)

OXPHOS – oksidativna fosforilacija (engl. *Oxidative Phosphorylation*)

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PEG-IFN- α – pegilirani interferon alfa (engl. *Pegylated Interferon-Alpha*)

PGC-1 α – koaktivator proliferatora peroksisoma (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*)

PH – promotor teškog lanca (engl. *Promoter Of Heavy Strand*)

PHP5 – potencijalno patogena heteroplazmija 5 % (engl. *Potentially Pathogenic Heteroplasmy 5%*)

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-Kinase*)

PIAS – inhibitori aktiviranih STAT proteina (engl. *Protein Inhibitors Of Activated STAT*)

PL – promotor lakog lanca (engl. *Promoter Of Light Strand*)

PLT – trombociti (engl. *Platelets*)

PMF – primarna mijelofibroza (engl. *Primary Myelofibrosis*)

POLG – DNA polimeraza gama (engl. *DNA Polymerase Gamma*)

RAS – rat sarkom virusni onkogen (engl. *Rat Sarcoma Virus*)

RBC – crvene krvne stanice - eritrociti (engl. *Red Blood Cells*)

RDV – reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

RDW – širina distribucije eritrocita (engl. *Red Cell Distribution Width*)

RUNX1 – transkripcijski faktor RUNX1 (engl. *Runt-Related Transcription Factor 1*)

SF3B1 – podjedinica 1 faktora spajanja 3B (engl. *Splicing Factor 3B Subunit 1*)

SH2 – Src homologija 2 domena (engl. *Src Homology 2*)

SIRT3 – sirtuin 3 (engl. *Sirtuin 3*)

SNP – jednonukleotidni polimorfizam (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

SOCS – supresori signalizacije citokina (engl. *Suppressor Of Cytokine Signaling*)

SOD – superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase*)

SOD1 – citosolna superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase 1*)

SOD2 – mitohondrijska superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase 2*)

SOD3 – izvanstanična superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase 3*)

SRSF2 – faktor spajanja bogat serinom i argininom 2 (engl. *Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2*)

STAT – prijenosnici signala i aktivatori transkripcije (engl. *Signal Transducer And Activator Of Transcription*)

STAG2 – protein STAG2 (engl. *Stromal Antigen 2*)

TCA – ciklus limunske kiseline (engl. *Tricarboxylic Acid Cycle*)

TFAM – mitohondrijski transkripcijski faktor A (engl. *Mitochondrial Transcription Factor A*)

TIA – prolazni ishemijski napad (engl. *Transient Ischemic Attack*)

TPO – trombopoetin (engl. *Thrombopoietin*)

TP53 – tumorski supresorski gen koji kodira protein p53 (engl. *Tumor Protein P53*)

U2AF1 – podjedinica 1 pomoćnog faktora spajanja U2 male nuklearne RNA (engl. *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*)

VAF – udio varijantnog alela (engl. *Variant Allele Frequency*)

vWF – von Willebrandov faktor (engl. *Von Willebrand Factor*)

WBC – bijele krvne stanice (engl. *White Blood Cells*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

ZRSR2 – regulator odgovora na cinkov prst i faktor spajanja bogat serinom/argininom 2 (engl. *Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif and Serine/Arginine Rich 2*)

1. UVOD

Mijeloproliferativne neoplazme (engl. *Myeloproliferative Neoplasms*, MPN) skupina su klonalnih hematoloških poremećaja koji nastaju zbog stečenih genetičkih promjena u hematopoetskim matičnim stanicama. Karakterizira ih prekomjerna proliferacija jedne ili više mijeloidnih loza, što dovodi do povećanog broja eritrocita, leukocita i/ili trombocita u perifernoj krvi (1). Klinički tijek bolesti obilježen je dugotrajnom kroničnom fazom, ali i razvojem ozbiljnih komplikacija poput tromboze, progresije u mijelofibrozu te transformacije u akutnu mijeloičnu leukemiju (2). U podlozi MPN-a najčešće su somatske mutacije u genima uključenima u regulaciju signalnih puteva stanične proliferacije i diferencijacije. Tri najvažnije pokretačke mutacije zahvaćaju gene *JAK2* (engl. *Janus Kinase 2*), *MPL* (engl. *Myeloproliferative Leukemia Virus*) i *CALR* (engl. *Calreticulin*) (3), pri čemu je najčešća točkasta mutacija c.1849G>T u genu *JAK2*, poznata pod nazivom JAK2 V617F (4). Ova mutacija dovodi do trajne aktivacije signalnog puta Janus kinaze, prijenosnika signala i transkripcijskih aktivatora (engl. *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators Of Transcription*, JAK-STAT), što rezultira proliferacijom hematopoetskih stanica neovisno o vanjskim regulatornim signalima te predstavlja ključni patogenetski mehanizam u razvoju MPN-a (5). Osim genetičkih promjena, MPN karakterizira i kronično upalno stanje koje doprinosi progresiji bolesti (6,7). Aktivacija imunoloških stanica, osobito granulocita i neutrofila, dovodi do pojačane produkcije proinflamatornih citokina, proteolitičkih enzima i reaktivnih kisikovih vrsta (8). Neutrofilima imaju važnu ulogu u remodeliranju mikrokruženja koštane srži, pri čemu sudjeluju u mobilizaciji hematopoetskih progenitorskih stanica te mogu doprinijeti razvoju fibroze. Međutim, njihova uloga u patogenezi MPN-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (9). Reaktivne kisikove vrste (RKV) i reaktivne dušikove vrste (RDV) ključni su medijatori oksidativnog stresa, koji nastaje kao posljedica narušene ravnoteže između njihove produkcije i antioksidativnih mehanizama. Povećana razina RKV-a može uzrokovati oštećenje DNA, proteina i lipida, čime doprinosi genomskoj nestabilnosti i progresiji bolesti (6). Mitohondriji predstavljaju glavni izvor RKV-a u stanici te imaju ključnu ulogu u regulaciji oksidativnog stresa i održavanju stanične homeostaze. Osim proizvodnje energije putem oksidativne fosforilacije, sudjeluju i u regulaciji apoptoze, metabolizma i homeostaze kalcija (10). Jedna od posebnosti mitohondrija jest prisutnost vlastitog genoma, mitohondrijske DNA (engl. *Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid*, mtDNA), koja je kružna molekula veličine približno 16,5 kb i nasljeđuje se isključivo majčinskom linijom (11). MtDNA

se replicira neovisno o nuklearnom genomu i prisutna je u velikom broju kopija unutar stanice. Zbog izostanka rekombinacije, ograničenih mehanizama popravka i izloženosti oksidativnom stresu, mtDNA je podložna akumulaciji mutacija (12). Mutacije mtDNA mogu biti prisutne u svim kopijama genoma (homoplazmija) ili samo u dijelu njih (heteroplazmija), pri čemu razina heteroplazmije može varirati među tkivima i pojedincima (11,12). Funkcionalni učinak mutacija ovisi o njihovom udjelu, a prelazak određenog praga može dovesti do poremećaja oksidativne fosforilacije i stanične disfunkcije (13). Osim toga, tijekom starenja dolazi do akumulacije mutacija i promjena u broju kopija mtDNA. Zbog specifičnog načina nasljeđivanja i pojave tzv. mitohondrijskog “uskog grla”, distribucija mutacija može značajno varirati među potomcima (14). Dostupni podaci ukazuju da varijacije u mitohondrijskom genomu mogu modulirati karcinogenezu i utjecati na metabolizam tumorskih stanica (15). Promjene u mtDNA mogu utjecati na proizvodnju RKV-a, redoks ravnotežu i signalne puteve povezane s proliferacijom i preživljavanjem stanica. Unatoč tome, uloga mitohondrijskog genoma u nastanku i progresiji mijeloproliferativnih neoplazmi još uvijek nije dovoljno istražena.

1.1. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj ovog rada je analizirati mitohondrijski genom u bolesnika s JAK2 V617F pozitivnim kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama te ispitati njegovu povezanost s molekularnim i kliničkim značajkama bolesti.

Specifični ciljevi:

- opisati hematološka i klinička obilježja ispitanika
- analizirati mitohondrijski genom primjenom metoda sekvenciranja sljedeće generacije
- odrediti pripadnost ispitanika mitohondrijskim haplogrupama
- identificirati i karakterizirati homoplazmijske i heteroplazmijske varijante mtDNA
- procijeniti mutacijsko opterećenje mitohondrijskog genoma u bolesnika
- ispitati funkcionalno stanje mitohondrija analizom ekspresije mitohondrijskih i antioksidativnih gena
- odrediti relativan broj kopija mtDNA i ispitati njegovu povezanost s obilježjima bolesti
- analizirati povezanost mitohondrijskih genetičkih i funkcionalnih obilježja s kliničkim i molekularnim parametrima bolesti

1.2. Hipoteza istraživanja

Hipoteza istraživanja je da postoji razlika u distribuciji mitohondrijskih haplogrupa te homoplazmijskih i heteroplazmijskih varijanti s patogenim potencijalom u skupini bolesnika s JAK2 V617F pozitivnim kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama u odnosu na opću populaciju.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Mijeloproliferativne neoplazme

2.1.1. Definicija

Istraživanja i kliničko rasuđivanje dr. Williama Damesheka u drugoj polovici dvadesetog stoljeća doveli su do definiranja MPN-a. Nekoliko desetljeća kasnije, utvrđeno je da specifične somatske mutacije u hematopoetskim matičnim stanicama (engl. *Hematopoietic Stem Cell*, HSC) koštane srži uzrokuju prekomjernu proizvodnju određenih tipova krvnih stanica mijeloidne loze (16,17). MPN su klonalni poremećaji koji potječu iz jedne hematopoetske matične stanice zahvaćene štetnom mutacijom, što dovodi do pojačane proliferacije mijeloidnih stanica u koštanoj srži i povećanja broja cirkulirajućih stanica u perifernoj krvi (18). Ovisno o specifičnom tipu MPN-a, dolazi do povećanja broja eritrocita, trombocita ili leukocita (3,16,17). Određivanje tipa MPN-a provodi se na temelju kliničkih značajki, molekularne dijagnostike i morfološke analize biopsije koštane srži (3,17,19,20). Molekularna osnova nastanka MPN-a poznata je u više od 95 % slučajeva, pri čemu se fenotip bolesti može objasniti somatskim mutacijama u genima *JAK2*, *CALR* i *MPL*. Mutacije u navedenim genima dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta JAK-STAT, ključnog za proliferaciju mijeloidnih stanica. U preostalih 5 % slučajeva MPN-a molekularna osnova nije poznata, a takvi se slučajevi nazivaju “trostruko negativnim” MPN-ovima (21). Dodatne mutacije u epigenetskim regulatorima, genima povezanim s popravkom DNA i kontrolom staničnog ciklusa, mogu utjecati na progresiju bolesti i razvoj mijelofibroze ili transformaciju u akutnu leukemiju. Rjeđe se javljaju mutacije gena uključenih u regulaciju spajanja RNA, uključujući faktor spajanja bogat serinom i argininom 2 (*SRSF2*), podjedinicu 1 faktora spajanja 3B (*SF3B1*), pomoćni faktor spajanja U2 male nuklearne RNA 1 (*U2AF1*) i regulator odgovora na cinkov prst i faktor spajanja bogat serinom/argininom 2 (*ZRSR2*). Navedeni geni imaju važnu ulogu u uklanjanju introna i spajanju egzona, a njihove mutacije mogu dovesti do nastanka aberantnih proteina i poremećene diferencijacije hematopoetskih stanica. Mutacije mogu zahvatiti i gene uključene u regulaciju strukture kromatina, epigenetske procese i staničnu signalizaciju, uključujući histon-lizin N-metiltransferazu *EZH2* (*EZH2*), izocitrat dehidrogenazu 1 (*IDH1*), izocitrat dehidrogenazu 2 (*IDH2*), protoonkogen *CBL* (*CBL*), protoonkogen *KRAS* (*KRAS*), protoonkogen *NRAS* (*NRAS*), stromalni antigen 2 (*STAG2*) i tumorski protein p53 (*TP53*), koji mogu dodatno doprinijeti klonalnoj evoluciji i heterogenosti bolesti (19,21).

2.1.2. Klasifikacija

William Dameshek prvi je upotrijebio pojam kroničnog mijeloproliferativnog poremećaja 1951. godine, navodeći da između policitemije vere (engl. *Polycythemia Vera*, PV), esencijalne trombocitemije (engl. *Essential Thrombocytosis*, ET), idiopatske mijelofibroze (engl. *Idiopathic Myelofibrosis*, IMF) i kronične mijeloidne leukemije (engl. *Chronic Myeloid Leukemia*, CML) postoje sličnosti koje uzrokuje promijenjena proliferativna aktivnost u koštanoj srži (16). Na temelju morfoloških karakteristika stanica 1976. godine predložena je prva francusko-američko-britanska (FAB) klasifikacija (17). Slijedila je klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) iz 2001. godine, zatim dopunjena klasifikacija WHO iz 2008., koja je uključila nova saznanja o otkriću mutacija u genima *JAK2*, *MPL* i *CALR*. Revizija klasifikacije WHO iz 2016. godine naglasila je da su, zbog napretka molekularnih metoda i novih genetičkih spoznaja, bile potrebne nadopune postojeće klasifikacije te uključivanje novih kliničkih, prognostičkih, morfoloških, imunofenotipskih i genetskih podataka. Od tada MPN dijelimo na kronične mijeloidne leukemije (engl. *Chronic Myeloid Leukemia*, CML) s prisutnošću fuzijskog gena *BCR::ABL1* (engl. *Breakpoint Cluster Region - Abelson Tyrosine Kinase*), kronične neutrofilne leukemije (engl. *Chronic Neutrophilic Leukemia*, CNL) s povećanim brojem neutrofila, PV povezane s mutacijom *JAK2*, primarne mijelofibroze (engl. *Primary Myelofibrosis*, PMF) koje karakterizira fibroza koštane srži i povećanje slezene, ET s povećanim brojem trombocita, kronične neodređene eozinofilne leukemije (engl. *Chronic Eosinophilic Leukemia, Not Otherwise Specified*, CEL-NOS) i mijeloproliferativne neklasificirane neoplazme (engl. *Myeloproliferative Neoplasm, Unclassifiable*, MPN-U) čija kategorija uključuje slučajeve koji ne odgovaraju drugim podtipovima (3). WHO i ICC (engl. *International Consensus Classification*) 2022. godine objavili su odvojene nove klasifikacije. U petom izdanju klasifikacije WHO dodana je nova kategorija juvenilne mijelomonocitne leukemije (engl. *Juvenile Myelomonocytic Leukemia*, JMML), koja opisuje pedijatrijske slučajeve i prethodno je pripadala kategoriji MDS/MPN (engl. *Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm*). Također, CEL je postala samostalna kategorija bez nesvrstanih podtipova, dok je ostatak klasifikacije ostao nepromijenjen u odnosu na prethodno izdanje (19). U klasifikaciji ICC JMML pripada kategoriji pedijatrijskih poremećaja, PMF je razdvojena na ranu/prefibrotičnu primarnu mijelofibrozu i uznapredovalu primarnu mijelofibrozu, dok su ostale kategorije ostale jednake klasifikaciji WHO iz 2016. godine (20).

2.1.3. Najčešći tipovi MPN-a

2.1.3.1. Policitemija vera (PV)

Policitemija vera (PV) najčešći je tip MPN-ova kod kojih nije prisutan filadelfijski kromosom te je najčešće povezana s mutacijom gena *JAK2* (21). Prvi ju je opisao francuski liječnik Louis Henri Vaquez 1892. godine, a William Dameshek ju je 1951. godine uvrstio u MPN (16,22). Godine 2005. otkrivena je mutacija *JAK2* V617F, specifična za PV (4). Zbog navedene mutacije u HSC, PV karakterizira eritrocitoza (povišen broj eritrocita) uz pojačanu eritropoezu, granulopoezu i trombopoezu u koštanoj srži. Česti simptomi uključuju umor, slabost, vrtoglavicu, glavobolju, crvenilo lica i ekstremiteta te svrbež. Eritrocitoza uzrokuje povećanu viskoznost krvi, što može dovesti do arterijske i venske tromboze (8,16). Aktivirani trombociti mogu uzrokovati makrovaskularne i mikrovaskularne smetnje, poput prolaznog ishemijskog napada (engl. *Transient Ischemic Attack*, TIA) ili eritromelalgije. Među mogućim komplikacijama su i akvageni pruritus uzrokovan aktivacijom bazofila, stečena von Willebrandova bolest te pseudohiperkalijemija zbog ekstremne trombocitoze. Splenomegalija nastaje kao posljedica ekstramedularne hematopoeze i upalne citokinske stimulacije. U rijetkim slučajevima dugotrajna bolest može napredovati do mijelofibroze ili se transformirati u akutnu mijeloičnu leukemiju (8,19,20).

WHO i ICC definirali su glavne i sporedne laboratorijske i hematološke kriterije za dijagnozu PV. Glavni kriteriji za postavljanje dijagnoze uključuju povišenu koncentraciju hemoglobina (>16,5 g/dL kod muškaraca, >16,0 g/dL kod žena) i/ili povišen hematokrit (>49 % kod muškaraca, >48 % kod žena), odnosno povećanu masu crvenih krvnih stanica. Dodatno, prisutnost mutacije *JAK2* V617F ili mutacije u egzonu 12 gena *JAK2* smatra se ključnim dijagnostičkim pokazateljem. Biopsija koštane srži pokazuje hipercelularnost prilagođenu dobi s hiperplazijom triju linija stanica (eritroidne, granulocitne i megakariocitne), pri čemu su zreli megakariociti bez atipije (19,20). Još nije otkriven lijek za potpuno izlječenje, ali dostupne su terapije i metode za ublažavanje simptoma i prevenciju komplikacija. Prva terapijska mjera je venepunkcija kojom se uklanja standardizirani volumen krvi, oko 400 ml, a postupak se ponavlja u tjednim razmacima do normalizacije hematokrita (23). Hidroksiureja je najčešća citoreduktivna terapija jer inhibira enzim ribonukleotid-reduktazu, čime sprječava sintezu DNA i smanjuje proliferaciju krvnih stanica. Pegilirani interferon-alfa (engl. *Pegylated Interferon-alpha*, PEG-IFN- α) inhibira nekontroliranu proliferaciju stanica koštane srži i smanjuje razinu hemoglobina, hematokrita, leukocita i trombocita, a za razliku od običnog IFN- α , PEG-IFN- α ima produljeno djelovanje zbog vezanja na molekule polietilen-glikola

(23,24). Ruxolitinib, inhibitor JAK2, koristi se za bolesnike koji ne reagiraju na standardne terapije (19,20). Aspirin u dnevnoj dozi od 100 do 200 mg primjenjuje se za prevenciju mikrovaskularnih epizoda, poput prolaznih ishemijskih napada i eritromelalgije, uzrokovanih hiperaktivnim trombocitima (21). Iako bolest nije izrazito agresivna, značajno narušava kvalitetu života zbog čestih venepunkcija i stalnog rizika od tromboze (23). Transformacija PV u akutnu mijeloičnu leukemiju (engl. *Acute Myeloid Leukemia*, AML) javlja se u 7 % slučajeva, dok kemoterapija povećava incidenciju na 20 % (8). Očekivano preživljenje bolesnika s PV iznosi oko 14 godina, ali varira ovisno o dobi, komorbiditetima i terapiji. Bolest može uzrokovati tromboze, mijelofibrozu ili napredovati u AML, što značajno skraćuje preživljenje. Određene terapije, poput dugotrajne primjene hidroksiuree, mogu povećati rizik od AML-a, pa se liječenje prilagođava kako bi se postigla ravnoteža između kontrole bolesti i smanjenja rizika (23,25).

2.1.3.2. Esencijalna trombocitemija (ET)

Esencijalna trombocitemija (ET) klonalni je poremećaj hematopoetskih matičnih stanica koji pripada skupini MPN-ova bez translokacije karakteristične za filadelfijski kromosom (3). Zbog klonske proliferacije atipičnih megakariocita u koštanoj srži dolazi do perzistentne trombocitoze u perifernoj krvi. Glavni dijagnostički kriteriji uključuju povišen broj trombocita ($>450 \times 10^9/L$), dokaz kontinuirane klonske proliferacije megakariocita u koštanoj srži, pri čemu se često nalaze uvećani, zreli megakariociti s hiperlobuliranim jezgrama u gustim nakupinama, te prisutnost mutacija u genima *JAK2*, *CALR* ili *MPL* (21). Sporedni kriterij za dijagnozu je prisutnost klonskog markera ili isključivanje sekundarne (reaktivne) trombocitoze, koja može biti posljedica nedostatka željeza, kroničnih infekcija, upalnih bolesti, neoplazmi, primjene određenih lijekova ili splenektomije (19–21).

ET dijeli pokretačke mutacije s drugim MPN-ovima, pri čemu 50–60 % bolesnika nosi mutaciju *JAK2* V617F, 25–35 % mutaciju *CALR*, a 5–10 % mutaciju *MPL*. Zbog preklapanja simptoma i genetičkih nalaza, diferencijalna dijagnoza ET-a u odnosu na PV i IMF temelji se na smjernicama WHO (26). ET je indolentna bolest s dugim tijekom, a prosječno preživljenje bolesnika iznosi oko 20 godina (3,25). Međutim, u 1,5 % slučajeva može transformirati u AML, dok kemoterapija povećava rizik transformacije do 20 %. Ta je transformacija češća kod starijih bolesnika te u prisutnosti dodatnih citogenetskih abnormalnosti i mutacija (8).

ET može biti asimptomatska, no kod simptomatskih bolesnika tegobe proizlaze iz povišenog broja trombocita i njihove disfunkcije. Najčešći simptomi su tromboza (stvaranje krvnih ugrušaka) i krvarenje (19,21). Arterijske tromboze očituju se kao moždani udar, prolazni

ishemijski napadi ili infarkt miokarda, dok se venske tromboze javljaju kao duboka venska tromboza ili plućna embolija. Mikrovaskularna tromboza, koja zahvaća male krvne žile, uzrokuje glavobolje, promjene vida, vrtoglavicu te bol i crvenilo ruku i stopala (8).

Ekstremna trombocitoza (broj trombocita >1 milijun/mm³) može dovesti do stečene von Willebrandove bolesti (engl. *von Willebrand Disease*, vWD), poremećaja zgrušavanja uzrokovanog smanjenjem funkcionalnih razina von Willebrandova faktora (vWF). Ovaj poremećaj nastaje zbog ubrzane degradacije vWF-a uslijed vezanja na trombocite u velikim količinama ili mehaničkog oštećenja zbog povećane viskoznosti krvi (26). Von Willebrandov faktor ključan je za stabilizaciju faktora VIII i omogućuje trombocitnu adheziju na oštećene krvne žile. Smanjene razine vWF-a narušavaju stvaranje krvnih ugrušaka, povećavajući rizik od krvarenja, koje se najčešće manifestira kao epistaksa (krvarenje iz nosa), modrice ili gastrointestinalno krvarenje (8,27). Liječenje ET-a ovisi o dobi bolesnika, simptomima i prisutnosti čimbenika rizika. PEG-IFN- α preferira se kod mlađih bolesnika (<65 godina) jer pokazuje bolje rezultate i manji rizik dugoročnih nuspojava u odnosu na hidroksiureju, koja se češće koristi kod starijih bolesnika (21). Kod asimptomatskih bolesnika liječenje obično nije potrebno, osim ako su prisutni visok rizik od tromboze, izrazito povišen broj trombocita, prethodni trombotični događaji ili genetske mutacije poput JAK2 V617F. U tim slučajevima preporučuje se hidroksiureja ili niska doza aspirina za smanjenje trombotskog rizika (21,26).

2.1.3.3. Primarna mijelofibroza (PMF)

Primarna mijelofibroza (PMF) najagresivnija je i najrjeđa vrsta MPN-a, a nastaje zbog mutacija u genima *JAK2*, *CALR* i *MPL* (16,17). Karakterizira je abnormalan rast megakariocita i granulocita u koštanoj srži, nakon čega dolazi do povećanja fibroblasta, što uzrokuje fibrozu, zadebljanje koštanih gredica i osteoskleroza. Zbog poremećaja funkcije koštane srži, hematopoeza se premješta izvan nje te se ekstramedularna hematopoeza odvija u slezeni i jetri (19,28). PMF se dijeli na ranu (prefibrotičku) i zrelu mijelofibrozu. Prema ICC, glavni kriteriji za ranu mijelofibrozu uključuju proliferaciju i atipične nakupine abnormalnih megakariocita u koštanoj srži bez značajne retikularne fibroze (stupanj fibroze < 2). Dijagnoza se potvrđuje prisutnošću mutacija u genima *JAK2*, *CALR* ili *MPL*, drugim klonskim markerima ili odsutnošću reaktivne retikulinske fibroze koštane srži, uz isključenje klona *BCR::ABL1* kako bi se eliminirala mogućnost kronične mijeloične leukemije (19). Dodatni kriteriji uključuju anemiju, leukocitozu (više od $11 \times 10^9/L$), opipljivu splenomegaliju i povišene razine laktat dehidrogenaze, pri čemu je za dijagnozu potreban barem jedan od ovih sporednih kriterija (19,20). Glavni kriterij za dijagnozu zrele mijelofibroze je stupanj fibroze 2-3, uz prisutnost

nezrelih krvnih stanica u perifernoj krvi (leukoeritroblastoza) kao dodatni sporedni kriterij (19,28). Mutacije u genu sličnom dodatnom spolnom češlju 1 (*ASXL1*), kao i u genima *SRSF2*, *IDH1/2* i *EZH2* češće su u zreloom PMF-u te dodatno skraćuju preživljenje (8,29). Bolesnici bez mijelofibroze također mogu doživjeti leukemijsku transformaciju ako razviju mutaciju *TP53*, čak i na subklonalnoj razini. Transformacija PMF-a u AML javlja se u 11 % slučajeva, dok kemoterapija povećava incidenciju na 20 % (8). Očekivano preživljenje bolesnika sa zreloom PMF iznosi 7,2 godine, dok kod rane PMF iznosi 17,6 godina (25,29). Tijek bolesti karakterizira progresivno povećanje broja cirkulirajućih stanica CD34+, anemija te promjene u broju leukocita i trombocita. Bolesnici često imaju simptome poput umora, gubitka apetita, gubitka tjelesne mase, povišene tjelesne temperature i noćnog znojenja, što je posljedica prekomjerne proizvodnje upalnih citokina. Ekstramedularna hematopoeza može uzrokovati zatajenje organa, uključujući plućnu hipertenziju i transformaciju u AML (26,28). Jedini potencijalno kurativni oblik liječenja je alogena transplantacija hematopoetskih matičnih stanica, no ona nosi visoku stopu mortaliteta i morbiditeta te se primjenjuje kod mlađih bolesnika. Ostale terapijske opcije su palijativne i uključuju hidroksiureju za citoredukciju, inhibitore JAK za liječenje splenomegalije te pripravke androgena koji potiču eritropoezu, čime se smanjuje potreba za transfuzijama (29).

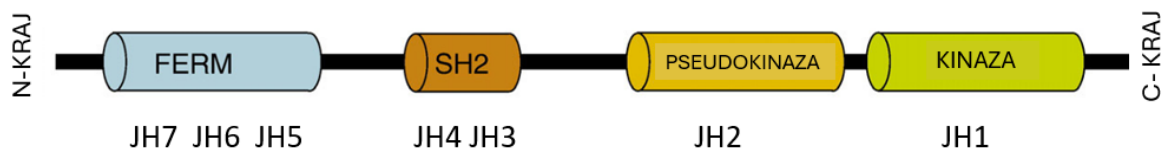
2.1.4. Pokretačke mutacije MPN-a

2.1.4.1. Mutacija Janus kinaze *JAK2 V617F*

Janus kinaze (engl. *Janus-Associated Kinases*, JAK) su obitelj nereceptorskih protein-tirozin kinaza koje djeluju kao posrednici između citokinskih receptora koji se nalaze na površini stanica i procesa fosforilacije tirozina na unutarstaničnim ciljevima, čime omogućuju daljnju signalizaciju (30). Ljudski gen *JAK2* smješten je na kromosomu 9p24 i prvi je put kloniran 1989. iz cDNA dobivene iz mišje hematopoetske stanične linije (31). Obitelj kinaza JAK sastoji se od četiri izoforme, JAK1, JAK2, JAK3 i tirozin kinaze 2 (engl. *Tyrosine Kinase 2*, TYK2) koje su međusobno visoko homologne (32). Proteini JAK imaju ključnu ulogu u normalnoj hematopoezi, pri čemu je JAK2 dominantan u signalizaciji pokrenutoj citokinima tipa I, uključujući eritropoetin (engl. *Erythropoietin*, EPO), faktor stimulacije kolonija granulocitnih makrofaga (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) i trombopoetin (engl. *Thrombopoietin*, TPO) (33,34).

Proteini JAK sastoje se od četiri glavne domene. Na amino terminalnom kraju se nalazi regija FERM čije ime je akronim proteina 4.1, ezrina, radixina i moesina. Slijedi domena SH2 (engl. *Src homology 2*) koja s domenom FERM konstitutivno veže citoplazmatske regije

citokinskih receptora. Pseudokinazna domena JH2 (engl. *Jak-Homology 2*) nema stvarnu aktivnost kinaze, nego ima inhibitorski učinak na domenu JH1 (engl. *Jak-Homology 1*). Domena JH1, koja se nalazi na karboksilnom kraju proteina JAK2, sadrži mjesto vezanja ATP-a i odgovorna je za fosforilaciju tirozinskih ostataka, što je ključno za aktivaciju JAK2 (Slika 1) (30,35–37). Struktura JAK2 još nije potpuno istražena (38).

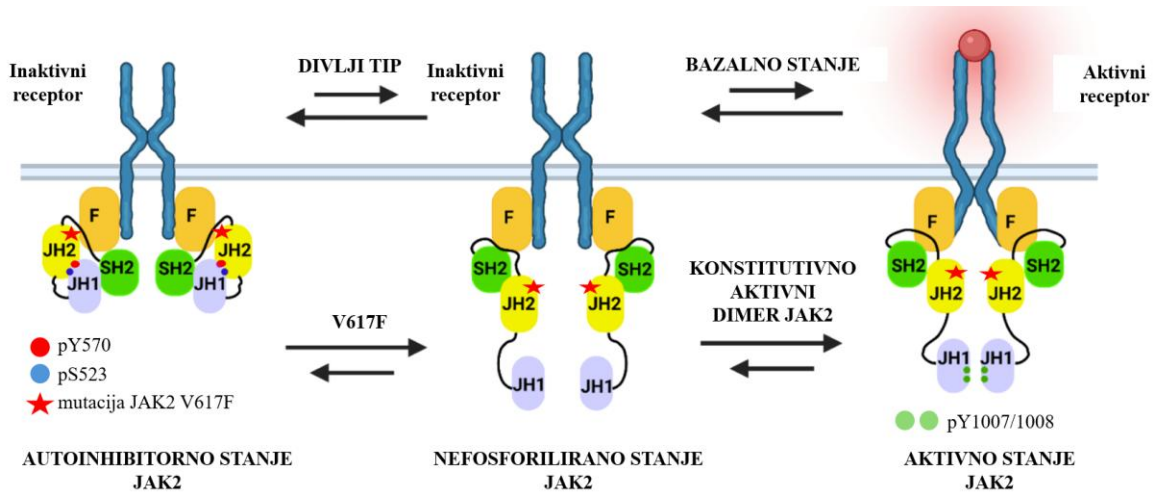


Slika 1. Struktura proteina JAK2. Na N-kraju se nalazi domena FERM (F za 4.1 protein, E za ezrin, R za radixin i M za moesin) koja služi za vezanje kinaze na receptor i sastoji se od domena JH7, JH6 i JH5. Domene JH3-JH7 definirane su kao homologne domene JAK, JH3 i JH4 tvore regiju SH2. Domena JH2 predstavlja pseudokinaznu regiju bez enzimske aktivnosti, a domena JH1 na C-kraju sadrži katalitičko mjesto (preuzeto i prilagođeno prema Smith i sur., 2007 (37)).

U neaktivnom stanju, domena JH2 inhibira domenu JH1 i tirozin kinaznu aktivnost, dok fosforilacija ostataka Ser523 i Tyr570 doprinosi regulaciji funkcije domene JH2 i stabilizaciji interakcije (39). Nakon vezanja citokina na membranski receptor, dolazi do promjene konformacije receptora, što omogućuje približavanje dviju kinaza JAK2 i njihovu aktivaciju. Aktivacija JAK-a započinje kada domena JH1 autofosforilira tirozinske ostatke (Tyr1007 i Tyr1008) na aktivnoj petlji, stabilizirajući aktivno stanje proteina (Slika 2) (40). Nakon aktivacije JAK2 fosforilirani tirozinski ostaci na receptoru postaju vezna mjesta za proteine STAT koji se vežu putem svojih SH2 domena. Fosforilirani proteini STAT dimeriziraju, translociraju se u jezgru i djeluju kao transkripcijski faktori, regulirajući ekspresiju gena uključenih u rast stanica, diferencijaciju, imunološke odgovore i preživljenje. Na ovaj način se izvanstanični signali za rast stanica, diferencijaciju, imunološke odgovore i preživljavanje, prenose putem faktora transkripcije STAT, signalnog puta RAS/MAPK (engl. *Rat Sarcoma Virus/Mitogen - Activated Protein Kinase*) i signalnih puteva PI3K/AKT (engl. *Phosphoinositide-3-Kinase/Protein Kinase B*) (30,38,40,41).

Mutacije u genu *JAK2*, poput *JAK2 V617F*, mogu uzrokovati konstitutivnu aktivaciju proteina JAK2, što rezultira nekontroliranom signalizacijom i prekomjernom proizvodnjom krvnih stanica. Poremećaj regulacije puta JAK-STAT ključni je događaj u raznim hematološkim zloćudnim bolestima (30,41). Pet neovisnih istraživačkih skupina otkrilo je ovu mutaciju 2005. godine. Mutacija G→T na nukleotidu 1849 u egzonu 14 gena *JAK2* uzrokuje zamjenu valina fenilalaninom na poziciji 617 unutar domene JH2, što dovodi do konstitutivne

aktivacije proteina JAK2 i signalnih putova ključnih za razvoj MPN-a (Slika 2). U normalnim uvjetima, domena JH2 ima autoregulacijsku funkciju i sprječava spontanu aktivaciju kinazne domene JH1 proteina JAK2, ali mutacija JAK2 V617F narušava autoregulaciju, što dovodi do konstitutivne aktivacije domene JH1 (4,38,42–45).



Slika 2. Tri glavna stanja proteina JAK2. U autoinhibiranom stanju, protein je zaključan u neaktivnoj konformaciji zbog fosforilacije Ser523 (pS523) i Tyr570 (pY570) u domeni JH2. Nefosforilirano stanje predstavlja prijelaz između neaktivne i aktivne konformacije. U aktivnom stanju, dvije molekule JAK2, povezane s dimerom citokinskog receptora, održavaju se u prostornom položaju koji omogućuje transfosforilaciju aktivacijske petlje JH1, uključujući Tyr1007 i Tyr1008. Na prikazu, pS523 je označen plavom točkom, pY570 crvenom točkom, mutacija V617F crvenom zvijezdom, dok su pY1007/1008 označeni zelenim točkama (preuzeto i prilagođeno prema Gou i sur., 2022. (38)).

Mutacija JAK2 V617F prisutna je u 95 % bolesnika s PV-om te u 50-60 % bolesnika s ET-om i PMF-om, pri čemu homozigotnu mutaciju nosi 25-30 % bolesnika s PV-om i 2-4 % bolesnika s ET-om (42,43). Mutacija JAK2 V617F može nastati uslijed replikacijskih pogrešaka tijekom diobe hematopoetskih matičnih stanica, izloženosti okolišnim čimbenicima (zračenje, toksične kemikalije, kronična upala) ili nakupljanja somatskih mutacija povezanih sa starenjem (30,46).

Udio varijantnog alela (engl. *Variant Allele Frequency*, VAF) predstavlja omjer broja očitavanja sekvenci koje nose određenu varijantu u odnosu na ukupan broj očitavanja na tom mjestu u genomu. Minimalni udio varijantnog alela JAK2 V617F od 1 % dovoljan je za razvoj MPN-a, te igra ključnu ulogu u određivanju kliničkog fenotipa. Viši VAF povezan je s naprednijom bolešću i povećanim rizikom za komplikacije, poput tromboze ili progresije bolesti u MF (47). Fenotipska manifestacija također ovisi o omjeru mutiranog i divljeg tipa JAK2, što su potvrdile studije na transgenim miševima. Niska razina mutacije JAK2 V617F uzrokuje trombocitozu i blagi porast hematokrita (engl. *Hematocrit*, HCT), što odgovara fenotipu ET, dok viša razina

mutacije dovodi do eritrocitoze i leukocitoze bez trombocitoze, karakteristične za PV (48,49). Osim toga, VAF se koristi kao prognostički marker i pokazatelj terapijskog odgovora, pri čemu njegovo smanjenje tijekom liječenja ukazuje na učinkovitost terapije (47,50). Kod bolesnika s PV-om, VAF mutacije JAK2 V617F pozitivno korelira s razinom HCT-a, brojem eritrocita (engl. *Red Blood Cells*, RBC), razinom hemoglobina (engl. *Hemoglobin*, HGB) i brojem leukocita (engl. *White Blood Cells*, WBC), dok povezanost s dobi bolesnika i brojem trombocita (engl. *Platelets*, PLT) nije utvrđena (46). Mutacije u egzonu 12 gena *JAK2* uzrokuju konstitutivnu aktivaciju puta JAK-STAT, što dovodi do izraženije eritrocitoze te manje trombocitoze i leukocitoze u usporedbi s mutacijom JAK2 V617F. Oko 3 % bolesnika s pravom policitemijom ima insercije ili delecije u egzonu 12 gena *JAK2*, što omogućuje aktivaciju kinaze. Fenotip ovih mutacija obično je blaži, ograničen na eritrocitozu, no može se razviti puni fenotip policitemije ili koegzistirati s mutacijom JAK2 V617F (8,42).

Proteini PIAS (engl. *Protein Inhibitors of Activated STAT*) i SOCS (engl. *Suppressor Of Cytokine Signaling Proteins*) ključni su regulatori signalizacije JAK-STAT. Proteini PIAS inhibiraju transkripciju blokirajući vezanje za DNA. PIASx inhibira aktivaciju gena u ljudskim T stanicama stimuliranu s IL-12 i ovisnu o STAT4 (51,52). Proteini SOCS sprječavaju vezanje STAT-a na receptore, smanjuju aktivnost JAK-a te ubrzavaju ubiquitinaciju i degradaciju kompleksa receptora povezanih s JAK-om. Njihova kombinirana aktivnost kontrolira signalizaciju JAK-STAT, no disfunkcija proteina PIAS i SOCS kod MPN-a dovodi do njegove prekomjerne aktivacije. Tada nastaje potreba za terapijskom primjenom inhibitora JAK-a, koji vezanjem za domenu koja veže ATP blokiraju kinaznu aktivnost i sprječavaju STAT signalizaciju (30,53). Ruxolitinib, neselektivni inhibitor JAK1/2, smanjuje simptome, splenomegaliju i citokine, ali može uzrokovati anemiju i trombocitopeniju (54). Svi dosad otkriveni inhibitori JAK-a djeluju palijativno, ublažavajući simptome i komplikacije bolesti, ali ne otklanjaju njezin osnovni uzrok. Zbog toga se intenzivno istražuju inhibitori signalizacije STAT, koji bi mogli pružiti ciljanu terapiju usmjerenu na ključne medijatore unutar signalnog puta JAK-STAT, potencijalno nudeći učinkovitiju kontrolu bolesti (5).

2.1.4.2. Mutacije *CALR*

Šaperon endoplazmatskog retikuluma *CALR* ključan je za pravilno savijanje glikoproteina i održavanje homeostaze kalcija. Sudjeluje u kontroli kvalitete proteina i nizu staničnih procesa, uključujući homeostazu kalcija, eliminaciju pogrešno savijenih proteina, proliferaciju, fagocitozu, apoptozu, staničnu adheziju, imunološki odgovor na rak i signalizaciju (30,55). Mutacije u genu *CALR* (19p13.13), otkrivene 2013. godine metodom sekvenciranja egzoma, druga su najčešća pokretačka promjena, prisutne su u 20–30 % bolesnika s MPN-om. Zastupljenost mutacija *CALR* u PV-u, ET-u i PMF-u varira ovisno o populaciji, a mogu koegzistirati s mutacijom *JAK2* V617F (56–58). U hematopoetskim matičnim i progenitorskim stanicama otkriveno je više od 50 tipova mutacija, od kojih su najčešće delecija od 52 bp i insercija od 5 bp u egzonu 9 (57). Te mutacije uzrokuju pomak okvira čitanja, što dovodi do gubitka sekvence KDEL (lizin-aspartat-glutamat-leucin) i stvaranja abnormalnog C-terminalnog kraja kalretikulina. To dovodi do aktivacije receptora MPL, konstitutivne aktivacije signalizacije *JAK2* i rasta neovisnog o citokinima, što rezultira nekontroliranom proliferacijom megakariocita (55,57–59). Bolesnici s MPN-om koji nose mutacije *CALR* imaju viši broj trombocita i niže razine hemoglobina u odnosu na one s mutacijom *JAK2*. Također, imaju manji rizik od tromboze i dulje ukupno preživljenje (59).

2.1.4.3. Mutacije *MPL*

Gen *MPL* smješten je na kromosomu 1p34, sastoji se od 12 egzona i kodira receptor MPL, receptor za trombopoetin (engl. *Thrombopoietin*, TPO). Trombopoetin stimulira proizvodnju trombocita iz megakariocita vezanjem na receptor MPL, čime aktivira ključne signalne puteve potrebne za trombopoezu (30). Somatske mutacije *MPL* najčešće se javljaju u egzonu 10, pri čemu dolazi do zamjene triptofana s leucinom ili lizinom, rjeđe s argininom ili alaninom, na poziciji 515 u jukstamembranskoj domeni receptora MPL (MPL W515L/K ili W515R/A). Rjeđa mutacija, S505N, nalazi se u transmembranskoj domeni i uzrokuje zamjenu serina s asparaginom. Te mutacije uzrokuju aktivaciju receptora MPL i u odsutnosti trombopoetina, što dovodi do konstitutivne aktivacije signalizacije *JAK-STAT* te posljedične prekomjerne proizvodnje trombocita i drugih krvnih stanica (60,61). Mutacije *MPL* mogu se pojaviti u MPN-u istodobno s mutacijom *JAK2* V617F (60). Mutacija *JAK2* V617F otežava sazrijevanje receptora MPL, povećava udio nezrelih receptora na plazma membrani i potiče njihovu degradaciju. Posljedično dolazi do povišene razina trombopoetina u plazmi zbog smanjenog uklanjanja trombopoetina od strane megakariocita (23,61).

2.2. Mitochondriji

Mitochondriji su citoplazmatski stanični organeli s dvostrukom membranom koji proizvode energiju u obliku adenzin trifosfata (engl. *Adenosine Triphosphate*, ATP) putem oksidativne fosforilacije. Otkrio ih je švicarski fiziolog i anatom Albert von Kölliker 1856. godine, a naziv im je dao Carl Benda 1898. godine (62–64). Vanjsku membranu tvore fosfolipidi i proteini koji odvajaju mitochondrije od citosola. Membrana je propusna za male molekule do 5.000 daltona, uključujući ATP i ADP (engl. *Adenosine Diphosphate*, ADP), čiji je transport omogućen porinskim proteinima koji formiraju kanale. Veće molekule prolaze kroz membranu uz pomoć enzimskog proteina translokaze (62,65). Unutarnju membranu tvore proteini i fosfolipidi, a kardiolipin pridonosi stvaranju unutarnjih nabora zvanih kriste koji dodatno povećavaju njezinu površinu. Unutarnja membrana sadrži pet enzimskih kompleksa, od kojih prva četiri čine lanac transporta elektrona, dok peti, ATP sintaza, katalizira reakciju proizvodnje ATP-a. Svi zajedno sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji (engl. *Oxidative Phosphorylation*, OXPHOS) te omogućuju prijenos metabolita između citosola i mitochondrija. Budući da je nepropusna za ione i male molekule, održava gradijent protona koji pokreće OXPHOS (62,65–67). Intermembranski prostor ima važnu ulogu u sintezi ATP-a, dok unutrašnjost mitochondrija, matriks, sadrži vlastitu DNA, velik broj enzima uključenih u oksidaciju piruvata i masnih kiselina, ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus), molekule RNA, proteine i druge male molekule (62,66,67).

Glavna uloga mitochondrija je pretvaranje produkata metabolizma ugljikohidrata, proteina i masti u CO₂ i vodu putem oksidativne fosforilacije, pri čemu proizvode oko 90 % stanične energije. Osim u proizvodnji energije, mitochondriji sudjeluju u homeostazi kalcija, detoksikaciji amonijaka i reaktivnih kisikovih vrsta, sintezi kolesterola, biosintezi hema i steroida, regulaciji apoptoze te održavanju stanične homeostaze (62,65,66). Metabolizam glukoze započinje u citosolu, gdje se glukoza glikolizom razgrađuje do piruvata, koji zatim ulazi u mitochondrije pomoću mitochondrijskog piruvatnog nosača (engl. *Mitochondrial Pyruvate Carrier*, MPC) (66,67). Unutar mitochondrija, piruvat se oksidira pomoću piruvat dehidrogenaze u acetil koenzim A (engl. *Acetyl Coenzyme A*, Acetil-CoA), dok se masne kiseline razgrađuju do acetil-CoA procesom β-oksidacije. Acetil-CoA zatim ulazi u ciklus limunske kiseline (Krebsov/engl. *The Tricarboxylic Acid*, TCA), gdje se potpuno oksidira do CO₂, uz istovremenu proizvodnju NADH i FADH₂ kroz niz dehidrogenacijskih reakcija (62,65–67). Potom NADH i FADH₂ predaju elektrone lancu transporta elektrona (engl. *Electron Transport Chain*, ETC), koji se odvija na unutarnjoj mitochondrijskoj membrani.

Elektroni se postupno prenose preko proteinskih kompleksa do molekularnog kisika (O_2), pri čemu nastaje voda (62,65,66). Energija oslobođena ovim oksidacijskim reakcijama koristi se za pumpanje protona (H^+) kroz unutarnju membranu, stvarajući elektrokemijski protonski gradijent. Taj gradijent pokreće ATP sintazu (kompleks V), koja fosforilira ADP u ATP (65). Oksidacijom jedne molekule NADH nastaju tri molekule ATP-a, dok oksidacijom jedne molekule $FADH_2$ nastaju dvije molekule ATP-a. Ukupno, iz jedne molekule glukoze u aerobnim uvjetima može nastati oko 30–32 ATP-a, dok oksidacija masnih kiselina proizvodi još veće količine ATP-a, ovisno o duljini lanca masne kiseline (62,65).

2.2.1. Mitohondrijska DNA

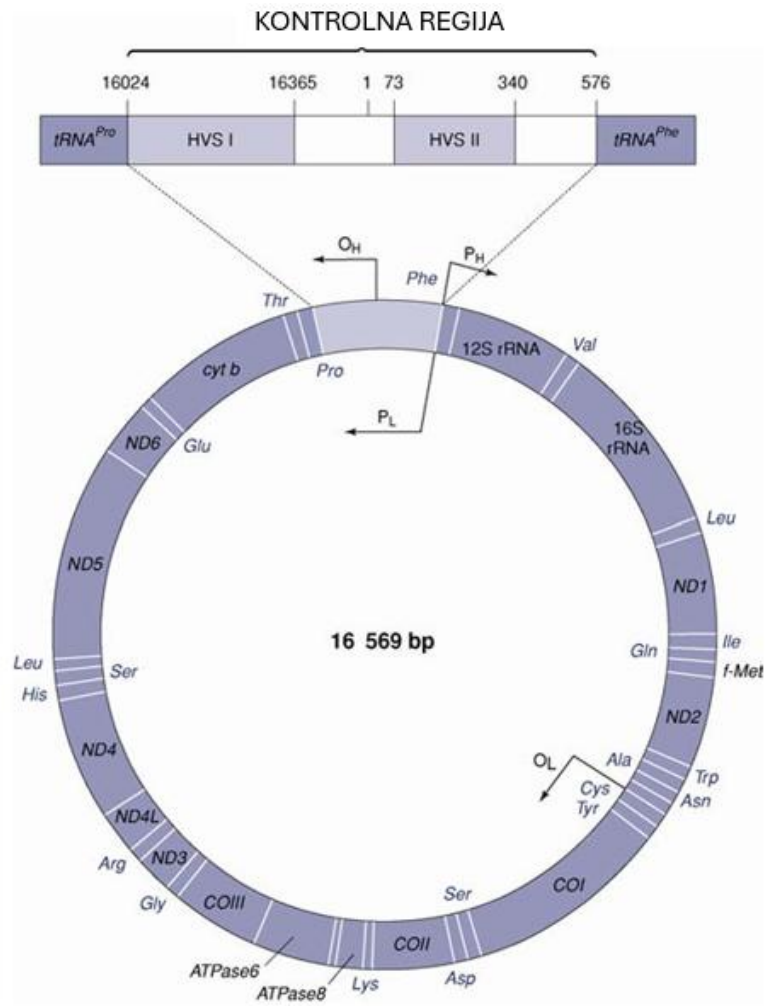
Mitohondriji imaju vlastitu kružnu deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *Deoxyribonucleic Acid*, DNA) koja sadrži približno 16.569 parova baza i replicira se neovisno o jezgri genomu, stvarajući velik broj kopija u svakoj stanici (62,65,68). Teški lanac mtDNA kodira 28 od ukupno 37 gena: dvije ribosomske ribonukleinske kiseline (12S i 16S *Ribosomal Ribonucleic Acid*, rRNA), 14 transportnih ribonukleinskih kiselina (engl. *Transfer Ribonucleic Acid*, tRNA) i 12 polipeptida.

Laki lanac kodira osam tRNA i jedan protein. Ukupno 13 polipeptida koje kodira mtDNA, zajedno s približno 80 nuklearnih gena (engl. *Nuclear Deoxyribonucleic Acid*, nDNA), sudjeluje u OXPHOS. Od tih 13 polipeptida, sedam pripada kompleksu I (engl. *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain*; ND1–ND6, osim ND3), citokrom b pripada kompleksu III (engl. *Cytochrome b*, CYB), tri polipeptida citokrom c oksidaze kompleksu IV (engl. *Cytochrome C Oxidase*; COX1, COX2, COX3), dok kompleks II kodiraju isključivo nuklearni geni. Preostala dva polipeptida (ATP6 i ATP8) sudjeluju u radu ATP sintaze, koja nije dio ETC-a, već katalizira sintezu ATP-a koristeći protonski gradijent stvoren ETC-om (65,68). Zbog svoje kompaktnosti, mitohondrijski genom ima preklapajuće kodirajuće regije, uključujući *MT-ATP6* i *MT-ATP8*, kao i *ND4* i *ND4L* (65).

Jedina nekodirajuća, takozvana kontrolna regija u ljudskoj mtDNA duga je približno 1,1 kb. Kontrolna regija DNA sadrži D-petlju (engl. *Displacement Loop*), koja regulira transkripciju i replikaciju mtDNA te služi kao promotor za oba lanca mtDNA. MtDNA se prikazuje kao dogovoreni kružni sustav koordinata radi lakšeg snalaženja, pri čemu se ishodište, odnosno pozicija 1, nalazi unutar kontrolne regije.

Ova regija sadrži dva hipervarijabilna segmenta (engl. *Hypervariable Region*, HVR), koji se najčešće analiziraju zbog varijabilnosti (HVS I i HVS II) (Slika 3) (65,66,69). Osim D-petlje, mtDNA sadrži i druge nekodirajuće elemente, poput O_L (engl. *Origin of the L*

Strand), koji služi kao ishodište replikacije lakog lanca i smješten je izvan D-petlje (Slika 3) (62,65,70). Mutacije u nekodirajućim regijama poput D-petlje i O_L mogu utjecati na stabilnost i učinkovitost replikacije mtDNA, što je povezano s raznim mitohondrijskim bolestima i starenjem (69,70).



Slika 3. Prikaz organizacije mtDNA. Ljudska mtDNA je kružna dvolančana molekula. Teški lanac (H-lanac) je bogat G bazama, dok je drugi, laki lanac (L-lanac), bogat C bazama. Geni za tRNA označeni su troslovnim nazivom odgovarajuće aminokiseline, dok preostali geni kodiraju proteine, osim dva gena za rRNA. Prikazana su ishodišta replikacije lakog (O_L) i teškog (O_H) lanca, kao i promotori za transkripciju oba lanca (P_L , P_H). Kontrolna regija sadrži dva hipervarijabilna segmenta (HVR), HVS-I i HVS-II. Geni koji se transkribiraju s H-lanca prikazani su izvan kružne strukture, dok su geni koji se transkribiraju s L-lanca prikazani unutar kružne strukture. Strelice označavaju lokacije promotora za inicijaciju transkripcije i replikacije oba lanca (preuzeto i prilagođeno prema Jobling i sur., 2004. (69)).

2.2.2. Haplogrupe

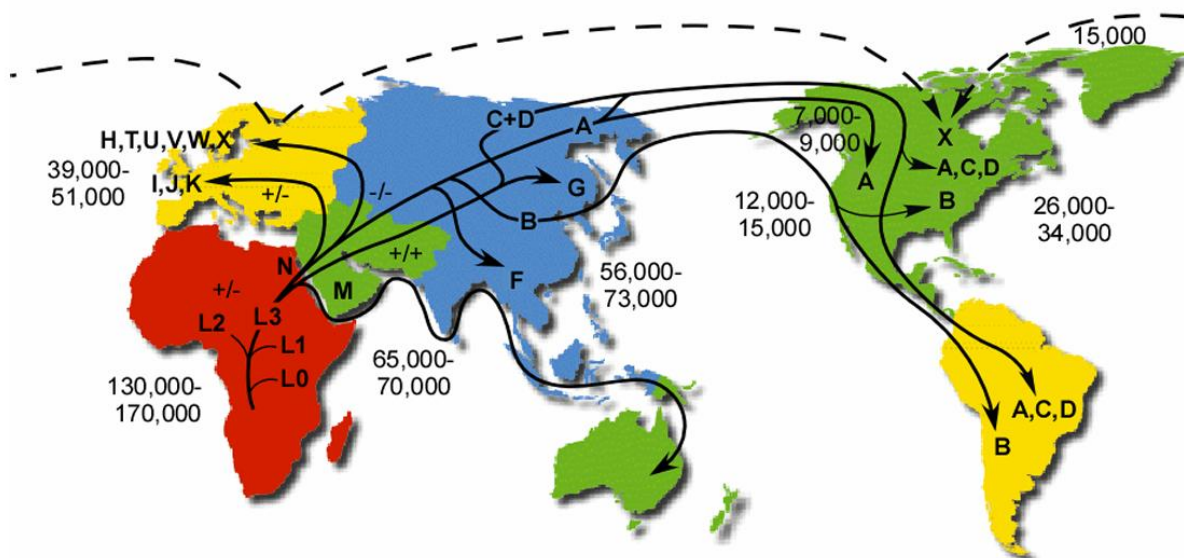
Mitohondrijske haplogrupe predstavljaju skup srodnih haplotipova definiranih specifičnim kombinacijama jednonukleotidnih polimorfizama (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) u mtDNA, koje se prenose isključivo majčinskom nasljednom linijom. One nastaju postupnim nakupljanjem mutacija kroz generacije. Budući da mtDNA ne prolazi kroz rekombinaciju, njezine loze ostaju uglavnom klonalne, a mutacije se nakupljaju predvidivom dinamikom. Mitohondrijske haplogrupe stoga omogućuju vremensko i prostorno praćenje ljudske evolucije (71). Najopsežnije filogenetsko stablo za ljudske mitohondrijske genome obuhvaća 6.401 jedinstvenu haplogrupu s varijabilnom geografskom distribucijom, a sve danas poznate haplogrupe potječu od zajedničke pretkinje iz Afrike (72,73).

Evolucijske mutacije dovele su do podjele mtDNA na regionalno specifične haplogrupe. Sve afričke mitohondrijske genetske linije pripadaju makrohaplogrupi L, koja je specifična za afrički kontinent i nastala je prije otprilike 130.000 do 200.000 godina (73,74). Unutar ove makrohaplogrupe izdvajaju se četiri glavne afričke linije: L0, L1, L2 i L3, od kojih je L0 najstarija i zastupljena među Kojanskim narodima dok su L1 i L2 dominantne u populaciji Pigmeja. Haplogrupa L3 odigrala je ključnu ulogu u migracijama jer su se iz nje razvile haplogrupe M i N, koje su napustile Afriku i proširile se diljem svijeta.

Haplogrupa M prvo se proširila južnom Azijom te stigla do Australije (74). Kasnije su njezini potomci migrirali prema sjevernoj Aziji, gdje su u središnjoj Aziji nastale haplogrupe C, D, G i podskupine M (M1–M20) (75,76). Haplogrupa N proširila se u dva smjera. Prvi je vodio kroz Australiju i južnu Aziju do središnje i sjeverne Azije, gdje su iz nje nastale haplogrupe A i Y (76,77). Drugi smjer migracija obuhvaćao je sjevernu Afriku i Europu, gdje su se razvile haplogrupe I, W i X (78). Unutar zapadnog dijela Euroazije, haplogrupa N formirala je submakrohaplogrupu R, koja je imala značajnu ulogu u genetskoj povijesti Europe i Azije. Iz nje su se u Europi razvile haplogrupe H, J, T, U i V, dok su u Aziji iz nje potekle haplogrupe B i F (Slika 4) (77–79).

Haplogrupa H najčešća je i najraznolikija europska linija, s učestalošću od 40–50 %. Haplogrupa H1, nastala prije ~22.500 godina, najzastupljenija je u Europi, posebno u zapadnim regijama, te se proširila u Sjevernu Afriku, Levant, Anatoliju, Kavkaz, Središnju Aziju i Sibir (80). U Hrvatskoj je H najčešća haplogrupa (36 %), a najdominantnije submakrohaplogrupe su H1 i H5 (neobjavljeni populacijski podaci Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja “Ivan Vučetić”).

Haplogrupe su genetske podskupine koje mogu imati različite učestalosti genetskih varijanti povezanih s bolestima, kao što je europska haplogrupa J, koja povećava penetraciju blažih mutacija u Leberovoj nasljednoj optičkoj neuropatiji (*engl. Leber's Hereditary Optic Neuropathy, LHON*), čime se povećava ozbiljnost bolesti (81).

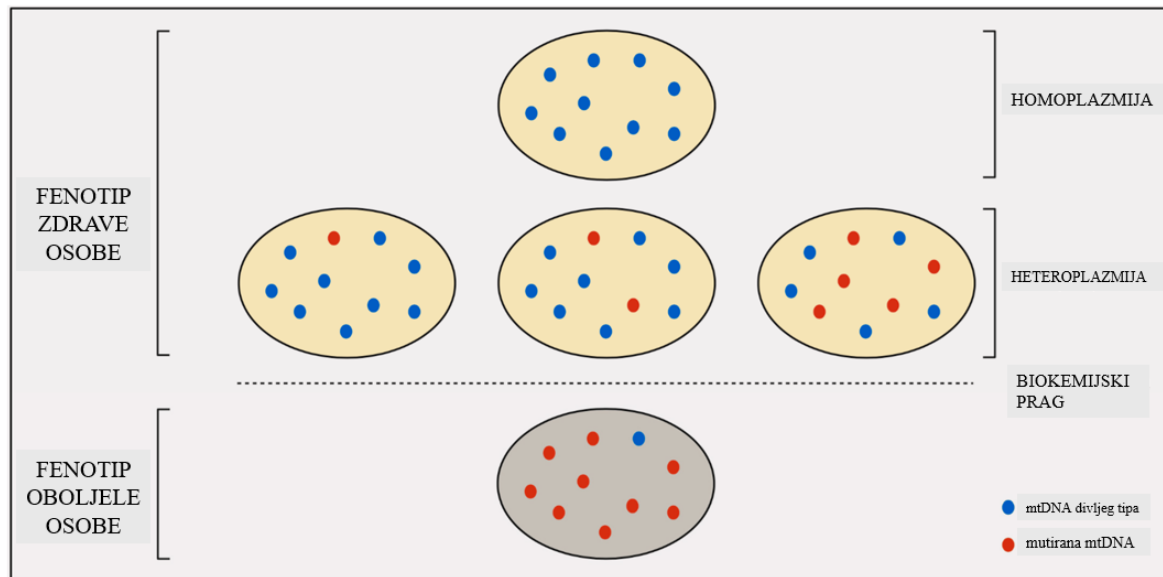


Slika 4. Geografska raspodjela haplogrupa. Sve afričke mtDNA pripadaju makrohaplogrupi L, pri čemu je L0 najstarija, a slijede L1 i L2. Haplogrupa L3, nastala u Africi, bila je preteča haplogrupa M i N, jedinih linija koje su uspješno napustile kontinent. Makrohaplogrupa N proširila se Europom i Azijom, dok je M ostala ograničena na Aziju. Haplogrupe A, C i D migrirale su iz Sibira preko Beringije u Ameriku, dok su B i X dospjele euroazijskim migracijama. Haplogrupa B kasnije se proširila duž obalnih ruta Azije i naselila pacifičko otočje (preuzeto iz MITOMAP, 2012. (79)).

2.2.3. Heteroplazmije i homoplazmije

Unutar svake stanice može se nalaziti nekoliko stotina do nekoliko tisuća mitohondrija, a unutar svakog mitohondrija može postojati više kopija mtDNA što nazivamo poliplazmijom (65). Homoplazmija označava stanje u kojem su sve kopije mtDNA unutar stanice identične, bez obzira sadrže li mutaciju ili ne. Nasuprot tome, heteroplazmija označava prisutnost i mutiranih i nemutiranih kopija mtDNA unutar iste stanice. Međutim, ne uzrokuju sve mutacije mtDNA bolesti, mnoge su mutacije neutralne, a neke varijante mogu čak pružiti selektivnu prednost stanici ili organizmu (12). Patogenost mutacija mtDNA ovisi o njihovoj prirodi i relativnoj brojnosti, pri čemu se mnoge patogene mutacije klinički manifestiraju tek pri visokim razinama heteroplazmije (odnosno postotnom udjelu patogene varijante) (82). Ovaj učinak praga znači da mutacija mora doseći kritičnu razinu u stanici ili tkivu kako bi uzrokovala disfunkciju oksidativne fosforilacije. Stanice mogu tolerirati visok udio mutirane mtDNA prije pojave biokemijskih defekata, pri čemu je prag za štetne učinke obično iznad 80 %, dok je u

tkivima s većom ovisnošću o oksidativnom metabolizmu taj prag niži (Slika 5) (12,83). Heteroplazmija ima ključnu ulogu u izraženosti mitohondrijskih bolesti, jer udio mutirane mtDNA varira među tkivima i članovima obitelji, unatoč isključivo matrilinearnom prijenosu. Te varijacije proizlaze iz nasumične segregacije i selekcije mitohondrija tijekom razvoja, što dovodi do različitih razina mutacijskog opterećenja u stanicama i tkivima (84).



Slika 5. Mitohondrijska heteroplazmija i učinak praga. Stanice mogu podnijeti visok postotak mutirane mtDNA prije nego što biokemijski defekt ili klinički fenotip bolesti postane očit, što se obično događa tek kada mutirane molekule mtDNA postignu visok postotak u stanici (preuzeto i prilagođeno prema Stewart i sur., 2015. (12)).

Tijekom oogeneze dolazi do značajnog smanjenja broja molekula mtDNA, čime nastaje efekt uskog grla. Takvo naglo smanjenje broja kopija mtDNA u stanici može dovesti do brze, ali nasumične promjene razine heteroplazmije. Zbog toga zdrava majka, kod koje je u oociti došlo do povećanja udjela patogene mutacije, može imati potomke pogođene mitohondrijskom bolešću (69). Heteroplazmijska stopa može utjecati na težinu, dob početka i napredovanje mitohondrijskih poremećaja, zbog čega je njezino tumačenje u genetskim analizama ključno za preciznu procjenu povezanosti varijanti mtDNA sa složenim osobinama ili bolestima (85). Različita tkiva i stanice unutar pojedinca mogu imati varijabilne razine heteroplazmije, što dodatno otežava genetske analize. Budući da tkivno specifična heteroplazmija može utjecati na fenotipsku ekspresiju bolesti, njezina integracija u analize ključna je za preciznije razumijevanje genetskih varijacija i njihovih učinaka (86).

2.2.4. Broj kopija mtDNA

Za razliku od nDNA, broj kopija mitohondrijskog genoma (*Mitochondrial DNA Copy Number*, mtDNA-CN) varira unutar iste stanice, među stanicama istog tkiva, te između istih vrsta stanica u različitim fazama razvoja. Osim toga, broj kopija mtDNA varira i među različitim tkivima i među pojedincima, prilagođavajući se bioenergetskim potrebama organizma (87). Mitohondriji obično sadrže dvije do deset kopija mtDNA, dok broj mitohondrija u somatskim stanicama varira od nekoliko stotina do tisuću, ovisno o vrsti tkiva (66). Na varijabilnost mtDNA-CN utječu okolišni čimbenici poput izloženosti toksinima, stresa i patoloških stanja, a njezine promjene povezane su s različitim bolestima i fenotipovima, uključujući neurodegenerativne poremećaje i rak (88–90). S druge strane, genetski čimbenici značajno doprinose varijabilnosti mtDNA-CN, pri čemu se udio nasljednih čimbenika procjenjuje na približno 65 % (90).

Replikacija mtDNA složen je proces koji uključuje više regulatornih proteina. Ključnu ulogu ima mitohondrijski transkripcijski faktor A (engl. *Mitochondrial Transcription Factor A*, TFAM), koji se veže na mtDNA te regulira njezinu replikaciju i stabilnost (91). Studije na životinjskim modelima pokazale su da heterozigotno uklanjanje TFAM-a uzrokuje smanjenje razine mtDNA za približno 50 %, dok njegova prekomjerna ekspresija povećava broj kopija za isti postotak (92). Osim TFAM-a, važan regulator je helikaza Twinkle, koja razdvaja dvostruku uzvojniciu mtDNA, omogućujući njezinu replikaciju djelovanjem DNA polimeraze γ (engl. *DNA Polymerase Subunit Gamma*, POLG). Katalitička podjedinica POLG, poznata kao POLG-A, esencijalna je za mtDNA-CN. Visoke razine metilacije na egzonu 2 gena *POLG* povezane su sa smanjenjem broja kopija mtDNA, što može utjecati na diferencijaciju stanica i razvoj malignih bolesti (88,93).

MtDNA-CN dodatno reguliraju transkripcijski faktori uključeni u mitohondrijsku biogenezu, poput koaktivatora proliferatora peroksisoma (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator*, PGC-1 α), kojeg kodira gen *PPARGC1A*, i nuklearnog respiratornog faktora 1 (engl. *Nuclear Respiratory Factor 1*, NRF-1). Ovi faktori reguliraju ekspresiju gena ključnih za sintezu mitohondrijskih proteina i održavanje mitohondrijske funkcije (94). Dokazano je da mtDNA-CN može korelirati s težinom bolesti, no ta povezanost ovisi o različitim čimbenicima, uključujući heteroplazmiju, metaboličke zahtjeve tkiva i epigenetske regulacijske mehanizme (82).

2.2.5. Mitohondrijske mutacije i bolesti

Mitohondrijske bolesti klinički su heterogena skupina poremećaja uzrokovanih disfunkcijom mitohondrija zbog mutacija u mtDNA i nDNA (95). MtDNA pogađaju točkaste mutacije, delecije, duplikacije i insercije zbog nedostatka rekombinacije. Budući da se mitohondriji nasljeđuju isključivo od majke, jer se mtDNA spermija selektivno degradira tijekom oplodnje i formiranja zigote, u mitohondrijskom genomu ne dolazi do rekombinacije, što onemogućuje popravak mutacija razmjenom genetskog materijala (96). Iako TFAM pomaže u pakiranju mtDNA u nukleoide, pružajući određenu zaštitu, izostanak histona dodatno smanjuje stabilnost mtDNA, čineći je podložnijom oštećenjima u usporedbi s nDNA (97). Osim toga, mtDNA je izložena djelovanju RKV, što potiče nakupljanje mutacija. Iako POLG sudjeluje u replikaciji i popravku mtDNA, njezina relativno visoka stopa pogrešaka, zajedno s nedostatkom rekombinacije i ograničenim mehanizmima popravka, doprinosi postupnoj degradaciji mitohondrijske funkcije (65).

Od otkrića prve mutacije povezane s mitohondrijskim bolestima do danas identificirane su stotine patogenih mutacija mtDNA, koje uzrokuju različite mitohondrijske poremećaje (95,98). LHON jedna je od prvih genetski identificiranih mitohondrijskih bolesti koja nastaje uslijed mutacija u genima *ND1*, *ND4*, *ND6* i *CYB* te uzrokuje iznenadni, bezbolni gubitak vida u mladih odraslih osoba (99). Leighov sindrom, najčešći mitohondrijski encefalomiopatski poremećaj u djece, uzrokovan je mutacijama u nuklearnim i mitohondrijskim genima kompleksa I i IV, što dovodi do disfunkcije OXPHOS. Bolest uzrokuje progresivnu neurodegeneraciju, mišićnu slabost, laktacidozu i respiratorne komplikacije (100). MELAS (engl. *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, And Stroke-Like Episodes*) je mitohondrijska bolest koju karakteriziraju epizode nalik moždanom udaru, demencija, miopatija i laktacidoza, a više od 80 % bolesnika s MELAS-om ima mutaciju m.3243A>G u genu *MTTL1* (101). Velik broj mitohondrijskih bolesti karakterizira teška klinička slika, jer pogađaju vitalne organe koji ovise o velikoj količini energije koju proizvode mitohondriji. Zbog njihove izrazite heterogenosti, kod mitohondrijskih je bolesti česta neadekvatna dijagnostika ili čak cjeloživotni izostanak točne dijagnoze, što posljedično otežava terapijske strategije i istraživanja (102).

2.2.6. Oksidativni stres i uloga antioksidativnih enzima

Oksidativni stres nastaje narušavanjem ravnoteže između proizvodnje RKV-a, RDV-a i djelovanja antioksidacijskih mehanizama koji ih neutraliziraju. Povećana proizvodnja RKV-

a ili smanjena antioksidacijska zaštita može dovesti do oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina, što je povezano sa starenjem i raznim bolestima (62,65,103). Tijekom staničnog disanja i proizvodnje ATP-a, mitohondrijski ETC stvara RKV, uključujući superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilne radikale ($OH\bullet$), koji mogu izravno oštetiti mtDNA (104).

Potencijal mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$) ključan je za pravilno funkcioniranje ETC-a. Njegov porast ili pad može dodatno pojačati oksidativni stres. Visok $\Delta\Psi_m$ usporava protok elektrona, što povećava curenje elektrona na ubikinonskim i semikinonskim mjestima u lancu prijenosa elektrona, kao i na citokromu c. To dovodi do jednovalentne redukcije molekularnog kisika i stvaranja O_2^- (65,66,104). U fiziološkim uvjetima, O_2^- uklanjaju antioksidacijski mehanizmi. Najprije se pretvara u H_2O_2 , a zatim u vodu. Pri visokoj proizvodnji ATP-a, gubitak elektrona se povećava, što rezultira višim razinama O_2^- koje antioksidacijski sustav stanice ne može potpuno eliminirati. Kao rezultat toga, može doći do reakcije između O_2^- i njegovog reduciranog oblika H_2O_2 , kao i do reakcije H_2O_2 s ionima prijelaznih metala. Obje reakcije dovode do stvaranja reaktivnog $OH\bullet$. Ovaj radikal može pokrenuti lipidnu peroksidaciju u mitohondrijskoj membrani što dovodi do promjene konformacije mitohondrijske membrane, inhibicije sinteze ATP-a i aktivacije signalnih puteva za apoptozu (65,105). Pad $\Delta\Psi_m$ može povećati proizvodnju RKV-a, osobito tijekom mitohondrijske disfunkcije ili apoptoze (65,104).

Antioksidacijski enzimi uklanjaju RKV katalitičkim putem. To primarno čine superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase*, SOD), glutation peroksidaza (engl. *Glutathione Peroxidase*, GPx) i katalaza (engl. *Catalase*, CAT). SOD uklanja RKV katalizirajući pretvorbu O_2^- u manje reaktivan H_2O_2 i kisik (105). Izoforma SOD1 smještena je u citosolu i intermembranskom prostoru mitohondrija, SOD2 se nalazi u mitohondrijskom matriksu i odgovorna je za uklanjanje superoksida nastalog u mitohondrijskom elektronskom transportnom lancu, dok se SOD3 izlučuje u izvanstanični prostor. SOD2 je poznata i kao MnSOD, tetramer s manganom kao kofaktorom (106). GPx je antioksidativni enzim koji reducira H_2O_2 i organske hidroperoksidge (lipidne hidroperoksidge), sprječavajući oksidativna oštećenja lipida, proteina i DNA. Pri niskim razinama H_2O_2 , glavnu ulogu u njegovoj razgradnji ima GPx, dok pri visokim koncentracijama djeluje CAT (107,108). CAT je homotetramer, pri čemu svaka podjedinica sadrži hemsku skupinu s atomom željeza (Fe^{3+}) u aktivnom centru, što omogućuje katalizu razgradnje H_2O_2 na vodu i kisik. Katalaza postoji u tri izoenzimska oblika (A, B, C), koji nastaju posttranslacijskim modifikacijama. Najveće koncentracije katalaze nalaze se u peroksisomima, dok je u citosolu prisutna u manjoj mjeri. U mitohondrijima je

rijetka ili odsutna, osim u srcu štakora, gdje je detektirana (109). Osim antioksidativnih enzima, važnu ulogu u oksidativnoj zaštiti imaju sirtuini (SIRT1–SIRT7), NAD⁺-ovisni enzimi koji reguliraju metabolizam, stres, popravak DNA, starenje i redoks ravnotežu, a njihova aktivnost ovisi o razini NAD⁺ i energetske statusu stanice (110). Među njima ističe se deacetilacija posredovana enzimom SIRT3, koja s jedne strane pojačava aktivnost enzima SOD2 u neutralizaciji O₂⁻, dok s druge strane posredno regulira ekspresiju SOD2 i CAT aktivacijom transkripcijskog faktora FOXO3a. SIRT3 je stoga ključan za mitohondrijsku homeostazu i antioksidativnu zaštitu, te ima važnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže u stanici (111,112).

2.2.7. Mitohondriji u karcinomima i MPN-u

Zdrave stanice koriste OXPHOS u mitohondrijima kada imaju dovoljno kisika, dok tumorske stanice, čak i u prisutnosti kisika, pretežno koriste glikolizu kao izvor ATP-a. Ovaj fenomen, poznat kao Warburgov efekt, prvi je opisao Otto Warburg u somatskim tumorima (113,114). Tumorske stanice mogu prilagođavati svoj metabolizam, prelazeći između glikolize i OXPHOS, što im omogućuje preživljavanje i proliferaciju u različitim uvjetima (115). Dokazano je da mutacije mtDNA mogu biti i uzrok i posljedica nastanka tumora. One mogu poremetiti normalne metaboličke procese i potaknuti razvoj tumora, ali također mogu nastati kao odgovor na metaboličke stresove prisutne u tumorskim stanicama (15). Istraživanja provedena na miševima s mutacijom D257A u genu *POLG* kojom je poremećen popravak mtDNA, pokazala su da ova mutacija pogoduje razvoju leukemije (116). Iako se smatralo da je Warburgov efekt specifičan za somatske tumore, novija istraživanja pokazuju da se može primijetiti i u PV gdje je povezan s povećanom aktivnošću HIF-a (engl. *Hypoxia Inducible Factor*). Povećana ekspresija *RUNX1* i *NF-E2* nije specifična za PV i MPN-ove, već je prisutna samo u policitemijama s pojačanom signalizacijom HIF (117). Aktualna istraživanja naglašavaju složenost i potrebu daljnjeg istraživanja poveznica između mutacija mtDNA i specifičnih tipova MPN-a kako bi se bolje razumjeli molekularni mehanizmi koji podupiru njihov razvoj (116).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biološki materijal

U ovom istraživanju analizirano je 66 uzoraka periferne krvi ispitanika oboljelih od MPN-a i 30 uzoraka periferne krvi zdravih ispitanika u kontrolnoj skupini. Svima su uzorkovane po dvije epruvete od 5 mL periferne krvi s EDTA kao antikoagulansom. Uzorci su prikupljeni u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, u razdoblju od svibnja 2023. do prosinca 2024. godine. Krv bolesnika prikupljena je venepunkcijom tijekom rutinske obrade osnovne bolesti, dok su kontrolni uzorci krvi prikupljeni od zdravih ispitanika. Svi bolesnici bili su upoznati s ciljevima istraživanja i potpisali su informirani pristanak. Istraživanje, koje je dio doktorske disertacije, odobrila su dva nadležna povjerenstva: Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu 06. veljače 2024. godine (broj odobrenja: 2024/0206-01) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 23. svibnja 2024. godine (broj odobrenja: 251-59-10106-24-111/50).

3.1.2. Kemikalije

- dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- MitoTracker™ Deep Red FM (MT) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Nonyl Acridine Orange (NAO) (Acridine Orange 10-Nonyl Bromide) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Natrijev hidroksid 1,0 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Etanol apsolutni (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Agaroza u prahu (Bio Reagent)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics)
- Generuler HR DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

3.1.3. Otopine i puferi

- ACK pufer za lizu (otopina amonijevog klorida, kalijevog klorida i natrijevog bikarbonata)
- Fiziološka otopina s fosfatnim puferom PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- voda Ambion bez nukleaza (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- TRIS ACETATE-EDTA BUFFER (TAE puffer) (Bio Reagent)

3.1.4. Reagensi

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka)
- QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka)
- Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Qubit™ dsDNA Broad Range Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Qubit™ RNA Broad Range Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase sa Gold Buffer i MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- polimeraza DNA PrimeSTAR® GXL (TaKaRa, Kusatsu, Japan)
- Reagens D1000 DNA i ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Genomic DNA Reagents i ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- qPCR Brilliant II Probe Master Mix sa ROX-om (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix za qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Pillar oncoReveal Essential MPN Panel (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- Pillar Biosciences Indexing Kit D (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- MagSi-NGS^{PREP} Plus (Magtivio B.V., Vaesrade, Nizozemska)
- Illumina DNA Prep (96 Samples) (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- IDT Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A (96 Indexes, 96 Samples) (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- kontrola PhiX DNA v3 (Illumina®, San Diego, CA, SAD)
- MiniSeq High Output Kit (300 cycles) (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles) (Illumina, San Diego, CA, SAD)

3.1.5. Oprema

- Sysmex XN-1500 (Sysmex, Japan)
- Advia 2120i (Siemens Healthineers, Njemačka)
- Qubit™ 4,0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Spektrofotometar NanoDrop™ UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- MM-Separator M96 P (Magtivio, Berlin, Njemačka)
- MM-Separator M12 + 12P (Magtivio, Berlin, Njemačka)
- Centrifuga ROTANTA 460 R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- Centrifuga MIKRO 200 R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- Centrifuga C1301 Mini (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
- MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker (BioShake, Pekin, Kina)
- Hybex® Microsample Incubator (SciGene, Campbell, CA, SAD)
- MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Eppendorf™ Mastercycler™ X40 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- BD Biosciences FACSLyric™ 3 Laser Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD)
- 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)
- QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- MiniSeq System (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- Horizontalni sustav za elektroforezu Sub-Cell GT System 15x20 (Bio-Rad Laboratories)
- Vizualizacija DNA produkata pomoću UviPure BXT-F26.MX V1, 312 nm (Uvitec, Cambridge, UK)

3.1.6. Računalni programi i alati

- Agilent TapeStation Software 5.1 za Agilent TapeStation sustav (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- QuantStudio 3/5 Real-Time PCR Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 7300 System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)
- BD FACSuite v1.5 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD)

- DRAGEN Bioinformatics Platform (Illumina, San Diego, CA, SAD)
- Franklin™ (Genoox, San Francisco, CA, SAD)
- BBDuk (BBMap v38.87) (Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, SAD)
- BWA-MEM v0.7.12 (Broad Institute, Cambridge, MA, SAD)
- samtools v1.8 (Wellcome Sanger Institute, Hinxton, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- freeBayes v1.1.0 (Garrison i sur., SAD)
- HaploGrep 2 v2.2 (Medicinsko sveučilište Innsbruck, Innsbruck, Austrija)
- PhyloTree (Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Nizozemska)
- MITOMAP (University of California, Irvine, CA, SAD)
- APOGEE2 (bioinformatički alat za predikciju patogenosti varijanti mtDNA)
- R (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija)

3.2. Metode

3.2.1. Hematološka analiza krvi

Mjerenja kompletne krvne slike provedena su iz 200 μL periferne krvi korištenjem automatskih hematoloških analizatora Advia 2120i i Sysmex XN-1500. Svi uzorci analizirani su unutar 2 sata od uzorkovanja radi osiguranja kvalitete i pouzdanosti rezultata. Analizirani hematološki parametri uključuju: broj leukocita, broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, vrijednost hematokrita, prosječni volumen eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), prosječnu količinu hemoglobina u eritrocitima (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), raspodjelu eritrocita po volumenu (engl. *Red Cell Distribution Width*, RDW), broj retikulocita, broj trombocita i vrijednost prosječnog volumena trombocita (engl. *Mean Platelet Volume*, MPV). Također je određena diferencijalna krvna slika, uključujući udio limfocita, monocita, neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita.

3.2.2. Procjena kliničkih simptoma bolesnika s MPN-om

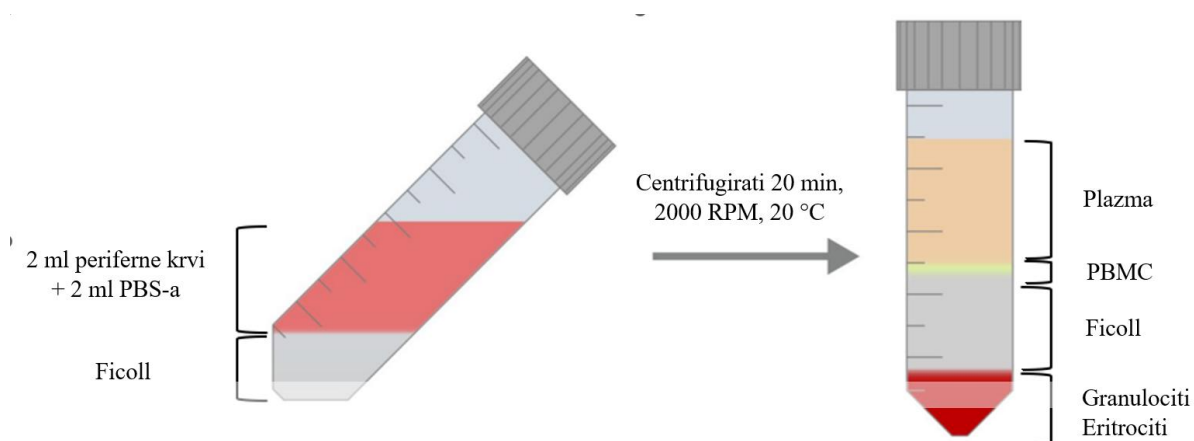
U sklopu prikupljanja podataka svi bolesnici ispunili su obrazac za procjenu simptoma MPN-a (engl. *Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form Total Symptom Score*, MPN-SAF TSS), poznat i kao obrazac MPN10, koji je validiran alat za procjenu simptoma kod bolesnika s MPN-om. Upitnik obuhvaća deset simptoma karakterističnih za ovu bolest, a svaki se simptom ocjenjuje numerički na skali od 0 (nema simptoma) do 10 (najizraženiji mogući simptom). Ocjenjivani simptomi su: zamor, preuranjena sitost, nelagoda u trbuhu, neaktivnost, poteškoće s koncentracijom, noćno znojenje, svrbež (pruritus), bol u kostima, vrućica ($>37,8$ °C) i neželjeni gubitak tjelesne mase u posljednjih šest mjeseci. Ukupan brojčani rezultat (engl. *Total Symptom Score*, TSS) dobiven je zbrajanjem pojedinačnih ocjena te se koristi kao pokazatelj ukupnog simptomatskog opterećenja bolesti. Prikupljeni podaci analizirani su deskriptivno i korišteni za daljnje statističke korelacije s laboratorijskim i genetskim parametrima bolesti.

3.2.3. Izolacija granulocita

Izolacija granulocita provedena je pomoću otopine Histopaque®-1077 prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za Histopaque®-1077](#)). Periferna krv volumena 3 mL razrijeđena je u omjeru 1:1 s PBS-om, nakon čega je smjesa pažljivo nanosena u epruvetu pod kutom od 45° povrhu 3 mL otopine Histopaque gustoće 1,077 g/mL. Epruvete su centrifugirane

pri $400 \times g$, 30 minuta, na sobnoj temperaturi, bez kočnice prilikom zaustavljanja rotora u centrifugi ROTANTA 460 R. Nakon centrifugiranja, granulociti (zajedno s eritrocitima) nalazili su se u donjem sloju ispod otopine Histopaque (Slika 6).

Gornji slojevi su uklonjeni, a preostali sloj s granulocitima prenesen je s pomoću transfer pipete te dvaput ispiran s PBS-om radi uklanjanja ostataka Histopaque-a. Na kraju, talog stanica resuspendiran je u $200 \mu\text{L}$ PBS-a i korišten za izolaciju DNA. Budući da je izolacija granulocita provedena u duplikatu, drugi talog resuspendiran je u 1 mL PBS-a i korišten za izolaciju RNA.



Slika 6. Odvajanje slojeva stanica pomoću Ficolla. Nakon centrifugiranja, dobiveni su slojevi u sljedećem rasporedu (odozgo prema dolje): plazma, sloj perifernih mononuklearnih krvnih stanica (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC), fikol i sloj granulocita i eritrocita.

3.2.4. Izolacija RNA

Izolacija RNA iz granulocita periferne krvi provedena je korištenjem komercijalnog kompleta QIAamp RNA Blood Mini Kit prema uputama proizvođača ([priručnik za komplet QIAamp RNA Blood Mini za izolaciju RNA iz krvi](#)). U 1 mL suspenzije granulocita dodano je 5 mL pufera EL (engl. *Erythrocyte Lysis Buffer*), a smjesa je inkubirana 20 minuta uz lagano miješanje na ledu. Nakon centrifugiranja pri $400 \times g$ tijekom 10 minuta pri 4 °C , supernatant je potpuno uklonjen, a talog resuspendiran u 2 mL pufera EL. Ponovljenim centrifugiranjem i uklanjanjem supernatanta, dobiveni talog tretiran je puferom RLT (engl. *RNA Lysis Buffer*), nakon čega je lizat pohranjen pri -20 °C tijekom jednog dana.

Nakon odmrzavanja, lizat je prenesen u spin-kolonu QIAshredder, koja mehanički homogenizira i pročišćava uzorak. Zatim je dodano $600 \mu\text{L}$ 70% etanola, a dobivena smjesa prenesena je u kolonu QIAamp, koja veže i pročišćava RNA. Kolona je potom isprana puferom RW1 (engl. *RNA Wash Buffer 1*) koji uklanja onečišćenja, uključujući proteine, lipide, DNA i

inhibitorne spojeve. Na kolonu je zatim dodano 80 μL smjese DNaze I i pufera RDD (engl. *DNase Digestion Buffer*) za uklanjanje DNA, smjesa je inkubirana 15 minuta, te ponovno isprana puferom RW1. Kolona je potom dvaput isprana s 500 μL pufera RPE (engl. *RNA Precipitation Ethanol Buffer*) kako bi se uklonili ostaci soli i enzima, a nakon završnog centrifugiranja RNA je eluirana u 50 μL vode bez RNaza.

3.2.5. Mjerenje koncentracije i čistoće RNA

Čistoća RNA određena je pomoću spektrofotometra NanoDrop™ UV-Vis prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za uređaj NanoDrop One](#)). Mjerenje je provedeno nanošenjem 1 μL uzorka na poru uređaja. Omjer vrijednosti apsorbancija u uzorku A260/A280, koji iznosi približno 2,0, ukazuje na čistu RNA bez proteinske kontaminacije. Vrijednost A260/A230, u rasponu od 1,8 do 2,2, ukazuje na odsutnost kontaminanata poput soli, ugljikohidrata ili fenola.

RNA je kvantificirana pomoću kompleta Qubit™ RNA Broad Range Assay Kit i fluorometra Qubit™ 4,0 prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za Qubit RNA BR Assay Kit](#)). Za izradu standardne krivulje, 190 μL reagensa Qubit® RNA BR pomiješano je s 10 μL standarda 1 Qubit® RNA BR u jednoj epruveti i 10 μL standarda 2 Qubit® RNA BR u drugoj epruveti. Svaki uzorak (1 μL) pomiješan je u zasebnoj epruveti s 199 μL reagensa Qubit® RNA BR.

3.2.6. Izolacija DNA

Izolacija genomske DNA iz granulocita periferne krvi provedena je korištenjem komercijalnog kompleta QIAamp DNA Blood Mini Kit prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za komplet QIAamp DNA Mini Kit za izolaciju DNA](#)). Na 20 μL proteinaze K dodano je 200 μL suspenzije granulocita i 200 μL pufera za lizu (engl. *Lysis Solution*, AL), a smjesa je inkubirana 10 minuta pri 56 °C pomoću uređaja Eppendorf ThermoMixer C i ThermoTopa. Nakon toga dodano je 200 μL apsolutnog etanola, a je smjesa prenesena u kolonu QIAamp za pročišćavanje i centrifugirana u centrifugi MIKRO 200 R. Kolona je zatim isprana sa 500 μL pufera AW1 (engl. *Aqueous Wash Buffer 1*), koji uklanja proteine, lizate i denaturirane kontaminante, te s 500 μL pufera AW2 (engl. *Aqueous Wash Buffer 2*), koji uklanja soli i deterdžente iz reakcije. Na kraju je DNA eluirana puferom za eluciju (engl. *Elution Buffer*, AE).

3.2.7. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Čistoća DNA izmjerena je pomoću spektrofotometra NanoDrop™ UV-Vis nanošenjem 1 µL uzorka na poru uređaja. Omjer apsorbancija u uzorku A260/A280 približno 1,8 smatra se optimalnim i ukazuje na čistu DNA bez proteinske kontaminacije (proteini apsorbiraju na 280 nm). Vrijednost A260/A230 u rasponu od 2,0 do 2,2 ukazuje na odsutnost organskih kontaminanata poput soli, ugljikohidrata ili fenola.

Koncentracija DNA izmjerena je pomoću fluorometra Qubit™ 4,0 i kompletom Qubit™ dsDNA Broad Range Assay Kit prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za Qubit dsDNA BR Assay Kit](#)). Za izradu standardne krivulje, 190 µL reagensa Qubit® DNA BR pomiješano je s 10 µL standarda 1 Qubit® dsDNA BR u jednoj epruveti i 10 µL standarda 2 Qubit® dsDNA BR u drugoj epruveti. Svaki uzorak (1 µL) pomiješan je u zasebnoj epruveti s 199 µL reagensa Qubit® dsDNA BR.

3.2.8. Reakcija PCR specifična za alel i vizualizacija umnoženih produkata

Detekcija mutacije JAK2 V617F provedena je reakcijom PCR specifičnom za alel, prema protokolu opisanom u radu Baxter i sur., 2005. (43). Reakcijska smjesa sastojala se od 0,25 µL polimeraze AmpliTaq Gold™ DNA, 2,5 µL odgovarajućeg pufera Gold, 1,5 µL MgCl₂, 0,5 µL smjese dNTP i 16,25 µL vode Ambion bez nukleaza. U smjesu je dodano po 0,5 µmol/L uzvodnih početnica od kojih je jedna specifična za mutaciju JAK2 V617F (JAK2 Fs), druga služi za umnažanje produkta koji se koristi kao unutarnja kontrola (JAK2 Fk) i 1 µmol/L zajedničke nizvodne početnice (JAK2 Rev) (Tablica 1). Ukupni volumen reakcijske smjese od 30 µL sadržavao je 2 µL DNA koncentracije 25 ng/µL. Reakcija je provedena u uređaju MiniAmp™ Plus Thermal Cycler prema sljedećim uvjetima: 10 minuta pri 95 °C; zatim 36 ciklusa od 30 sekundi pri 94 °C, 30 sekundi pri 56 °C i 1 minute pri 72 °C; 10 minuta pri 72 °C; te čuvanje pri 4 °C do vizualizacije.

Tablica 1. Sekvence početnica korištenih u reakciji PCR specifičnoj za alel za detekciju mutiranog (JAK2 V617F) i nemutiranog alela (divlji tip).

Naziv početnice	Sekvenca početnice
JAK2 Fs	5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3'
JAK2 Fk	5'-ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-3'
JAK2 Rev	5'-CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA-3'

JAK2 Fs – uzvodna početnica specifična za mutaciju; *JAK2 Fk* – uzvodna početnica za unutarnju kontrolu; *JAK2 Rev* – zajednička nizvodna početnica.

Dobiveni produkti PCR vizualizirani su pomoću reagensa D1000 DNA i ScreenTapea na uređaju 4150 TapeStation System prema uputama proizvođača ([kratke upute proizvođača za D1000 ScreenTape Assay za sustave TapeStation](#)). Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem 1 µL D1000 molekularnih ljestava i 3 µL odgovarajućeg pufera D1000 za prvu jažicu, dok se za preostale jažice miješalo 1 µL produkta PCR s 3 µL odgovarajućeg pufera D1000. Veličine fragmenata analizirane su pomoću programa Agilent TapeStation Software 5,1 za sustav Agilent TapeStation Systems.

3.2.9. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom JAK2 V617F

Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom JAK2 V617F provedena je tehnikom qPCR (engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) na uređaju 7300 Real-Time PCR System, prema protokolu opisanom u radu Jovanović i sur. 2013. (118). Kvantifikacija je provedena prethodno opisanom tehnologijom TaqMan na granulocitnoj DNA bolesnika s prethodno potvrđenom mutacijom JAK2 V617F, primjenom PCR specifičnog za alel. Na istoj pločici za PCR pripremljene su dvije odvojene reakcije, jedna za kvantifikaciju divljeg tipa, a druga za alel koji nosi mutaciju JAK2 V617F.

Reakcijske smjese sadržavale su: 12,5 µL qPCR Brilliant II Probe Master Mix sa ROX-om, 4 µL vode Ambion bez nukleaza, 1,5 µL zajedničke uzvodne početnice (JAK2 Common Fw), 0,5 µL probe (JAK2 Proba), te 0,5 µL nizvodne početnice za divlji tip (JAK2 Wt Rev) ili za mutantni alel JAK2 V617F (JAK2 Mut Rev) (Tablica 2). Proba je bila označena fluorescentnom bojom 6-karboksifluorescein (FAM) na 5' kraju te tetrametilrodamin bojom (TAMRA) na 3' kraju.

Tablica 2. Sekvence početnica i proba korištenih u analizi qPCR za umnažanje mutiranog (JAK2 V617F) i nemutiranog alela (divlji tip).

Naziv početnice	Sekvenca početnice/probe
JAK2 Common Fw	5'-CTT TCT TTG AAG CAG CAA GTA TGA-3'
JAK2 Wt Rev	5'-GTA GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA TAC-3'
JAK2 Mut Rev	5'-GTA GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA TAA-3'
JAK2 Proba	5'-(6-FAM)-TGA GCA AGC TTT CTC ACA AGC ATT TGG TTT-TAMRA-3'

JAK2 Common Fw – zajednička uzvodna početnica; JAK2 Wt Rev – nizvodna početnica specifična za nemutirani tip; JAK2 Mut Rev – nizvodna početnica specifična za mutirani tip; JAK2 Proba – fluorescentna proba za detekciju sekvence JAK2

Ukupni volumen od 20 μL sadržavao je 5 μL DNA koncentracije 5 ng/ μL koja je mjerena u triplicatu na uređaju 7300 Real-Time PCR System. Reakcija je provedena prema sljedećim temperaturnim uvjetima: 50 °C tijekom 2 minute; 95 °C tijekom 10 sekundi; 50 ciklusa pri 95 °C tijekom 15 sekundi; te 60 °C tijekom 1 minute. Standardna krivulja izrađena je pomoću pet standarda koje je distribuirala sponzorirana europska mreža stručnjaka za molekularnu dijagnostiku MPN i urođenih bolesti sličnih MPN (engl. *EU sponsored Network of Experts on the Molecular Diagnosis of Myeloproliferative Neoplasm (MPN) and MPN-related congenital diseases, MPN&MPNr-Euronet*), čime je omogućena apsolutna kvantifikacija. Standardi su sadržavali fiksni broj od 21 500 kopija divljeg alela te različite količine mutiranog alela V617F: 64.500, 6.450, 645, 64,5 i 0 kopija. Serijskim razrjeđenjem mutiranog alela u omjeru 1:10, uz konstantnu količinu divljeg alela, postignuti su standardi s udjelima mutiranog alela od 75,0 %, 23,0 %, 3,0 %, 0,3 % i 0,0 %. Na taj način omogućena je precizna kvantifikacija različitih udjela mutiranih alela. U obje reakcijske smjese uključene su i negativne kontrole bez DNA. Vrijednosti Ct za mutirani i divlji alel analizirane su pomoću programa 7300 System Software.

3.2.10. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom

Analiza mitohondrijske mase i mitohondrijskog potencijala u granulocitima provedena je protočnom citometrijom. Za analizu je korišten volumen periferne krvi koji je sadržavao 1.500.000 stanica. Potreban volumen izračunat je na temelju ukupnog broja leukocita dobivenih iz krvne slike. Eritrociti su lizirani pomoću pufera ACK inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 500 x g, supernatant je odstranjen, a stanice su resuspendirane u 3 mL fiziološke otopine s PBS-om. Tri epruvete označene su kao MT, NAO i negativna kontrola, a u svaku je raspoređen po 1 mL uzorka sa po 500.000 stanica.

Na stanice su dodane probe MT i NAO, dok je u negativnu kontrolu dodan samo PBS. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, stanice su isprane s 2,5 mL PBS-a, ponovno centrifugirane, a supernatant odstranjen. U svaku epruvetu dodane su po dvije kapi PBS-a, nakon čega su stanice ponovno vorteksirane te analizirane na protočnom citometru BD Biosciences FACSLyric™ 3 Laser Flow Cytometer. Signal MT analiziran je na kanalu APC uz maksimalnu ekscitaciju (λ_{exc}) od 644 nm i maksimalnu emisiju (λ_{em}) od 665 nm. Signal NAO analiziran je na kanalu FL1 uz λ_{exc} od 488 nm i λ_{em} od 535 nm. Uspoređivane su razlike signala MFI (engl. *Mean Fluorescence Intensity*) između bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika.

3.2.11. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju korišten je komercijalni komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit](#)). Reakcijska smjesa sadržavala je: 2 μL 10 \times pufera RT, 0,8 μL 25 \times mješavine dNTP (100 mM), 2 μL nasumičnih početnica 10 \times RT, 1 μL reverzne transkriptaze MultiScribe™, 1 μL inhibitora Rnase i 13,2 μL RNA (koncentracije 300 ng/ μL) razrijeđene vodom bez nukleaza.

Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 μL , a reakcija je provedena na uređaju MiniAmp™ Plus Thermal Cycleru pod sljedećim uvjetima: 25 °C tijekom 10 minuta; zatim 37 °C tijekom 120 minuta; 85 °C tijekom 5 minuta; a potom na 4 °C do završetka ciklusa, nakon čega je cDNA pohranjena na –20 °C do daljnje analize.

3.2.12. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Dobivena cDNA korištena je za kvantifikaciju genske ekspresije u lančanoj reakciji polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR), koja je provedena pomoću uređaja QuantStudio 5. Reakcija je postavljena u triplikatu, uz korištenje smjese TaqMan™ Fast Advanced Master, prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za TaqMan Fast Advanced Master Mix](#)).

Kvantifikacija se temeljila na tehnologiji TaqMan, u kojoj se koriste specifične oligonukleotidne probe označene fluorescentnim molekulama na 5' kraju (engl. *Reporter*) i 3' kraju (engl. *Quencher*), koje omogućuju detekciju signala isključivo tijekom amplifikacije ciljnog gena. Tijekom reakcije PCR, ako je prisutna ciljana DNA, polimeraza Taq cijepa probu, što uzrokuje oslobađanje fluorescentnog signala s 5' kraja probe. Detektor tada mjeri količinu oslobođene fluorescencije, koristeći pasivnu referentnu boju karboksi-x-rodamin (engl. *Carboxy-X-Rhodamine*, ROX) za normalizaciju signala. Ako ciljana DNA nije prisutna, proba ostaje netaknuta i ne dolazi do oslobađanja fluorescencije.

Reakcijska smjesa sadržavala je: 10,0 μL smjese TaqMan Fast Advanced Master (2X), 1,0 μL esaja TaqMan™ (20X), 7,0 μL vode bez nukleaza, a ukupni volumen od 20 μL sadržavao je 2 μL cDNA. Reakcija je provedena prema sljedećim temperaturnim uvjetima: 50 °C tijekom 2 minute; 95 °C tijekom 20 sekundi; 40 ciklusa pri 95 °C tijekom 1 sekunde; te 60 °C tijekom 20 sekundi.

U analizi korišteni su sljedeći eseji TaqMan koji su sadržavali probu i početnice:

- SIRT3 (Hs00953477_m1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- MT-ND1 (Hs02596873_s1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- SOD2 (Hs00167309_m1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- CAT (Hs00167309_m1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- PPARGC1A (Hs00173304_m1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- ACTB (Hs01060665_g1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

Mjeren je broj ciklusa PCR potreban da fluorescentni signal prijeđe zadani prag detekcije (engl. *Cycle Threshold*, Ct) za gen od interesa i unutarnju kontrolu *ACTB*, a vrijednosti su analizirane pomoću programa QuantStudio 3/5 Real-Time PCR.

3.2.13. Mjerenje broja kopija mtDNA

Broj kopija mtDNA u granulocitnoj DNA određen je metodom qPCR koristeći prethodno opisanu tehnologiju TaqMan. Reakcije su provedene u duplikatu za svaki uzorak pomoću proba TaqMan™ na uređaju QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System. Korišteno je 7,5 µL reagensa TaqMan™ Fast Advanced Master za qPCR; 3,5 µL vode Ambion bez nukleaza i 0,75 µL ispitivanih proba dodanih u odvojene reakcije, ali na istoj pločici.

Za kvantifikaciju mitohondrijske DNA korištena je proba TaqMan FAM-obilježena za gen *MT-ND1* (Hs02596873_s1; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), dok je za referentni nuklearni gen korištena također proba TaqMan FAM-obilježena za gen *RPPHI* (Hs03297761_s1; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Ukupni volumen reakcijske smjese od 15 µL sadržavao je 3 µL DNA koncentracije 5 ng/µL. Reakcija je provedena prema sljedećim uvjetima: 2 minute pri 50 °C; 1 minutu i 30 sekundi pri 95 °C; zatim 40 ciklusa od 3 sekunde pri 95 °C i 20 sekundi pri 60 °C. Relativni broj mitohondrijskih kopija u stanici izračunat je kao razlika vrijednosti Ct mitohondrijskog i nuklearnog gena ($\Delta C_t = C_{tMT-ND1} - C_{tRPPHI}$, $RQ = 2^{-\Delta C_t}$).

3.2.14. Sekvenciranje sljedeće generacije pomoću panela za MPN

Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next-Generation Sequencing*, NGS) provedeno je korištenjem reagensa Pillar oncoReveal Essential MPN Panel prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za OncoReveal™ Myeloid panel](#)). Ovaj panel cilja specifične regije unutar triju gena: *JAK2* (egzoni 12–15); *MPL* (egzon 10) i *CALR* (egzon 9). Sekvenciranje se temelji na amplifikaciji posredovanoj inhibicijom matične petlje (engl. *Stem-*

Loop Inhibition Mediated Amplification, SLIMamp®) koja omogućuje istovremenu amplifikaciju više ciljanih regija DNA u jednoj reakciji. Analiza je provedena radi potvrde prisutnosti isključivo mutacije JAK2 V617F te isključenja ostalih pokretačkih mutacija specifičnih za MPN.

3.2.14.1. Prva reakcija PCR

Za pripremu knjižnice korišteno je 60 ng DNA izolirane iz granulocita. U prvom koraku pripremljena je reakcija PCR specifična za gen korištenjem parova početnica specifičnih za ciljane regije pojedinih gena u uređaju MiniAmp™ Plus Thermal Cycler. Reakcija je provedena prema sljedećim uvjetima: 15 minuta pri 95 °C; pet ciklusa po jednu minutu pri 98 °C, dvije minute pri 58 °C, četiri minute pri 60 °C, jednu minutu pri 64 °C i jednu minutu pri 72 °C; 18 ciklusa od 30 sekundi pri 95 °C, tri minute pri 66 °C te završni korak pri 8 °C. Produkti PCR pročišćeni su pomoću magnetnih kuglica MagSi-NGS^{PREP} Plus koje selektivno vežu fragmente DNA određene veličine (između 100 i 1000 bp). Kuglice se ispiru 70 %-tnim etanolom kako bi se uklonili nespecifični ili nepotpuni fragmenti, slobodni nukleotidi, ostaci početnica i soli.

3.2.14.2. Druga reakcija PCR

U drugoj reakciji PCR, svaki je uzorak označen kombinacijom indeksnih adaptera (kratke sintetske oligonukleotidne sekvence koje se vežu na krajeve fragmenata DNA te omogućuju njihovo umnažanje) sastavljenih od 4 µL sekvence i5 (Pi500) i 4 µL sekvence i7 (Pi700), čime se omogućuje jednoznačna identifikacija svakog uzorka tijekom zajedničkog (multipleksiranog) sekvenciranja. Smjesa PCR sadržavala je: 8 µL indeksa (jedinstveni oligonukleotidni identifikatori); 25 µL reagensa Indexing PCR Master; 11 µL vode Ambion bez nukleaza i 6 µL pročišćenog produkta PCR. Reakcija je provedena u uređaju MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema sljedećim temperaturnim uvjetima: dvije minute pri 95 °C; 8 ciklusa od 30 sekundi pri 95 °C, 30 sekundi pri 66 °C, jednu minutu pri 72 °C; pet minuta pri 72 °C te završni korak pri 8 °C. Knjižnice su dvaput pročišćene magnetnim kuglicama MagSi-NGS^{PREP} Plus (Magtivio B.V., Vaesrade, Nizozemska) i 70 %-tnim etanolom.

3.2.14.3. Kvantifikacija i spajanje knjižnica

Koncentracija DNA izmjerena je fluorimetrom Qubit™ 4,0 i kompletom Qubit™ dsDNA Broad Range Assay Kit prema uputama proizvođača ([upute proizvođača za Qubit dsDNA BR Assay Kit](#)). Dobiveni fragmenti vizualizirani su reagensom D1000 DNA i

ScreenTapeom na uređaju 4150 TapeStation System prema uputama proizvođača ([kratke upute proizvođača za D1000 ScreenTape Assay za sustave TapeStation](#)). Reakcijska smjesa za prvu jažicu pripremljena je miješanjem 1 μL molekularnih ljestvi D1000 i 3 μL odgovarajućeg pufera D1000, a za preostale jažice miješanjem 1 μL produkta PCR s 3 μL odgovarajućeg pufera D1000. Veličine fragmenata analizirane su pomoću računalnog programa Agilent TapeStation 5,1 za Agilent TapeStation Systems. Sve knjižnice zatim su svedene na koncentraciju 2 nM. Nakon normalizacije, po 5 μL svake knjižnice spojeno je u jednu epruvetu zapremine 1,5 mL.

3.2.14.4. Denaturacija knjižnica i kontrole PhiX

Istovremeno je denaturirano 5 μL spojenih knjižnica i 5 μL kontrolne DNA PhiX (kontrolna DNA poznate sekvence koja služi za provjeru uspješnosti sekvenciranja i kvalitete dobivenih očitavanja) v3 dodatkom 5 μL 0,1 N natrijeva hidroksida. Denaturirana smjesa knjižnica razrijeđena je do koncentracije 1,6 pM pomoću pufera za hibridizaciju. Ukupni volumen od 500 μL sadržavao je 495 μL razrijeđene knjižnice i 5 % kontrole PhiX (1,6 pM).

3.2.14.5. Sekvenciranje

Pripremljena smjesa sekvencirana je u uređaju MiniSeq System korištenjem kompleta MiniSeq Mid Output Kit (300 ciklusa). U kazetu za sekvenciranje pipetom je dodano 500 μL smjese za sekvenciranje. U aplikaciji Local Run Manager kreirane su upute za sekvenciranje, pri čemu su korišteni navedeni reagensi i pridružene oznake uzoraka njihovoj smjesi indeksa Pillar Biosciences Indexing Kit D. Nakon umetanja kazete, u uređaj je umetnuta i protočna stanica (engl. *Flow Cell*) na kojoj se odvija sekvenciranje. Tijekom sekvenciranja koristi se princip sekvenciranja po sintezi, uz prethodno formiranje klastera na površini protočne stanice. Ciljani fragmenti DNA umnoženi PCR-om izvan uređaja, hibridiziraju na površinu protočne stanice, gdje se provodi premosno umnažanje (engl. *Bridge Amplification*). Ovaj proces omogućuje klonalno umnažanje molekula i formiranje lokaliziranih klastera, neophodnih za detekciju signala tijekom očitavanja. Samo sekvenciranje odvija se pomoću fluorescentno označenih nukleotida s reverzibilnim terminatorima, koji omogućuju očitavanje pojedinačnih nukleotida, uz detekciju fluorescencije. Svaki od četiri deoksiribonukleotida (dNTP) označen je specifičnom fluorescentnom bojom i sadrži reverzibilni terminator 3'-O-azidmetilnu skupinu koji privremeno zaustavlja daljnju sintezu DNA, omogućujući ugradnju samo jedne baze po ciklusu. Nakon inkorporacije, neugrađeni nukleotidi se ispiru, a laserskim očitanjem kamerom detektira se koja je baza dodana. Potom se djelovanjem reagensa TCEP (engl. *Tris(2-*

Carboxyethyl)Phosphine) uklanja fluorofor i terminator, čime se obnavlja slobodna skupina 3'-OH i omogućuje nastavak sinteze u sljedećem ciklusu ([video pregled postupka sekvenciranja](#)). Ova tehnologija omogućuje visoku preciznost i osjetljivost u analizi ciljane sekvence DNA.

3.2.14.6. Provjera kvalitete sekvenciranja

Nakon sekvenciranja potrebno je provjeriti parametre u računalnom programu uređaja, koji ukazuju na kvalitetu sekvenciranja. Jedan od ključnih pokazatelja je ocjena kvalitete (engl. *Q-score*), koja označava pouzdanost identifikacije određene baze tijekom sekvenciranja. Vrijednost Q30 znači da je vjerojatnost pogrešno očitane baze 1 : 1000, odnosno da je postignuta točnost od 99,9 %. Na uređaju se prikazuje parametar % baza \geq Q30, koji označava udio svih očitanih baza s Q-vrijednosti 30 ili višim. Također se prati i gustoća klastera (engl. *Cluster Density*), što predstavlja broj formiranih klastera (umnoženih molekula DNA) na površini protočne stanice, izražen u klasterima po mm². Za kazetu Mid Output optimalna gustoća iznosi 170–220 tisuća klastera/mm². Jedan od važnih parametara je i postotak klastera koji su prošli filter (engl. *Clusters Passing Filter*), što pokazuje koliki je udio klastera bio dovoljno kvalitetan za analizu. Optimalna vrijednost za pouzdano očitavanje iznosi 80–95 %. Dodatno se procjenjuju parametri poput količine generiranih podataka (engl. *Yield*), izražene u gigabajtima (Gbp), te postotka očitavanja koja su se uspješno mapirala na referentni genom (engl. *Alignment Rate*).

3.2.15. Umnažanje mtDNA reakcijom PCR

Za pripremu knjižnica mtDNA provedena je amplifikacija dvaju odsječaka mitohondrijskog genoma pomoću reakcije PCR. Prije umnažanja, koncentracija ukupne DNA izolirane iz granulocita određena je fluorimetrom Qubit™ 4,0 koristeći komplet Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay, prema uputama proizvođača. Na temelju izmjerenih koncentracija izračunati su potrebni volumeni kako bi konačna koncentracija DNA u reakcijskoj smjesi iznosila 0,08 ng/μL, odnosno 2 ng u 25 μL reakcijske smjese. Za amplifikaciju su korištena dva para početnica specifičnih za mitohondrijski genom, čime su generirani preklapajući fragmenti duljine 9,1 kb i 11,2 kb. Sekvence korištenih početnica:

- MTL-F1: 5'-AAA GCA CAT ACC AAG GCC AC-3'
- MTL-R1: 5'-TTG GCT CTC CTT GCA AAG TT-3'
- MTL-F2: 5'-TAT CCG CCA TCC CAT ACA TT-3'
- MTL-R2: 5'-AAT GTT GAG CCG TAG ATG CC-3'

Reakcijska smjesa PCR pripremljena je u ukupnom volumenu 25 μL i sadržavala je:

- 0,5 µL početnica MTL-F1 i 0,5 µL MTL-R1 (10 pM) za fragment od 9,1 kb
- 0,5 µL početnica MTL-F2 i 0,5 µL MTL-R2 (10 pM) za fragment od 11,2 kb
- 0,5 µL polimeraze DNA PrimeSTAR® GXL
- 5 µL puferske otopine PrimeSTAR® GXL
- 2 µL smjese dNTP
- 11,5 µL vode Ambion™ bez nukleaza
- 5 µL normaliziranog uzorka DNA

Uz sve uzorke postavljena je i negativna kontrola (voda Ambion™ bez nukleaza umjesto DNA), korištena kao kontrola kontaminacije. Negativna kontrola nije uključena u postupak sekvenciranja. Reakcije su provedene u uređaju PCR Eppendorf™ Mastercycler™ X40. Za fragment duljine 9,1 kb primijenjen je sljedeći protokol umnažanja: 98 °C, 10 sekundi; 60 °C, 15 sekundi; 68 °C, 9 minuta i 6 sekundi, ukupno 30 ciklusa. Za fragment duljine 11,2 kb korišten je protokol umnažanja: 98 °C, 10 sekundi; 68 °C, 10 minuta također 30 ciklusa. Umnažanje dugih mitohondrijskih fragmenata provedeno je prema preporukama proizvođača enzima PrimeSTAR® GXL, koji je optimiziran za umnažanje dugih i GC-bogatih sekvenci. Priprema knjižnica za NGS provedena je na umnoženim mitohondrijskim fragmentima.

3.2.16. Sekvenciranje mtDNA metodom NGS

3.2.16.1. Tagmentacija mtDNA

Sekvenciranje mtDNA provedeno je korištenjem reagensa Illumina DNA Prep (24 Samples) prema uputama proizvođača ([pregled postupka Illumina DNA Prep](#)). Za izradu knjižnice upotrijebljena je ekvimolarna mješavina produkata PCR, uključujući 350 ng 11,2 kb i 350 ng 9,1 kb fragmenta mitohondrijskog genoma. U prvom koraku pripremljena je tagmentacijska mješavina kombinacijom reagensa BLT (engl. *Bead-Linked Transposomes*) i TB1 (engl. *Tagment Buffer*). Uzorku DNA (30 µL) dodano je 20 µL pripremljene smjese, nakon čega je provedena reakcija dodavanja adaptera (engl. *Tagmentation Program*, TAG) u uređaju MiniAmp™ Plus Thermal Cycler prema sljedećim temperaturnim uvjetima: inkubacija 15 minuta pri 55 °C, potom hlađenje pri 10 °C.

3.2.16.2. Čišćenje tagmentirane mtDNA

Kako bi se reakcija tagmentacije zaustavila, u smjesu je dodano 10 µL pufera TSB (engl. *Tagment Stop Buffer*), nakon čega su uzorci vraćeni u uređaj za PCR. Inaktivacija enzima provedena je programom PTC uz temperaturne uvjete: 15 minuta pri 37 °C, zatim hlađenje pri 10 °C. Slijedila su dva ciklusa ispiranja sa 100 µL pufera TWB (engl. *Tagment Wash Buffer*)

radi uklanjanja viška slobodnih reagensa, uključujući neinkorporirane adaptere, enzime i male fragmente DNA. Fragmenti DNA označeni adapterima ostali su vezani za magnetne kuglice (engl. *Bead-Linked Transposomes*, BLT) čime je omogućeno njihovo selektivno očuvanje za kasniju amplifikaciju.

3.2.16.3. Umnažanje amplificirane mtDNA i indeksiranje

Korak amplifikacije PCR dodaje indeksne adaptere Pillar Biosciences Indexing Kit D, kao i sekvence potrebne za formiranje klastera tijekom sekvenciranja. Za pripremu smjese PCR kombinirano je po 22 µL reagensa EPM (engl. *Enhanced PCR Mix*) i 22 µL vode Ambion bez nukleaza, nakon čega je 40 µL te smjese dodano na suhe magnetne kuglice koje su prethodno vezale fragmente mtDNA. Svaki uzorak označen je jedinstvenom kombinacijom indeksnih adaptera sastavljenih od 4 µL sekvenci i5 (Pi500) i 4 µL sekvenci i7 (Pi700) Pillar Biosciences Indexing Kit D. Reakcija amplifikacije provedena je u uređaju PCR prema temperaturnom protokolu BLT PCR: 3 minute pri 68 °C, zatim 3 minute pri 98 °C, potom 5 ciklusa od 45 sekundi pri 98 °C, 30 sekundi pri 62 °C i 2 minute pri 68 °C, uz završnu ekstenziju od 1 minute pri 68 °C te hlađenje na 10 °C.

3.2.16.4. Pročišćavanje umnoženih knjižnica

Nakon reakcije PCR, pločica je postavljena na magnetski stalak do potpune bistrine otopine (~5 minuta), a zatim je iz svake jažice preneseno 45 µL supernatanta u polipropilensku pločicu Nunc™ 96 DeepWell™. U svaku jažicu dodano je 40 µL vode Ambion bez nukleaza i 45 µL IPB kuglica (engl. *Illumina Purification Beads*), nakon čega su uzorci homogenizirani trešnjom (1600 RPM, 1 minuta) i inkubirani pri sobnoj temperaturi 5 minuta. Tijekom inkubacije, 15 µL reagensa IPB dodano je u novu pločicu MIDI. Potom je 125 µL supernatanta preneseno iz prve ploče u novu ploču s kuglicama IPB i ponovno homogenizirano. Nakon dodatne inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, ploča je vraćena na magnetski stalak do bistrine (~5 minuta), a supernatant pažljivo uklonjen. Slijedila su dva ispiranja s po 200 µL svježe pripremljenog 80 %-tnog etanola, bez miješanja. Zaostali etanol uklonjen je pipetom, a preostala količina ostavljena je da ispari na zraku. Nakon sušenja, ploča je uklonjena s magnetskog stalka te je u svaku jažicu dodano 32 µL pufera RSB (engl. *Resuspension Buffer*). Nakon 2 minute inkubacije, pločica je ponovno postavljena na magnetski stalak (~2 minute), a zatim je 30 µL supernatanta preneseno u novu pločicu za PCR.

3.2.16.5. Kvantifikacija i spajanje knjižnica

Određivanje koncentracije DNA i vizualizacija umnoženih produkata provedeni su kako je prethodno opisano u poglavljima 3.2.7 i 3.2.8. Sve knjižnice zatim su svedene na koncentraciju od 2 nM. Nakon normalizacije, po 5 µL svake knjižnice spojeno je u jednu epruvetu zapremine 1,5 mL.

3.2.16.6. Denaturacija knjižnica i kontrole PhiX

Postupak denaturacije knjižnica i kontrole PhiX proveden je kako je opisano u poglavlju 3.2.14.4. Istovremeno je denaturirano 5 µL spojenih knjižnica i 5 µL kontrolne PhiX v3 dodatkom 5 µL 0,1 N natrijeva hidroksida. Denaturirana knjižnica razrijeđena je na koncentraciju od 1,2 pM pomoću pufera za hibridizaciju. Ukupni volumen od 500 µL sadržavao je 495 µL razrijeđene knjižnice i 5 % kontrole PhiX (1,2 pM).

3.2.16.7. Sekvenciranje

Sekvenciranje je provedeno kako je opisano u poglavlju 3.2.14.5. Sekvenciranje je provedeno pomoću uređaja MiniSeq System korištenjem kompleta MiniSeq High Output Kit (300 ciklusa). U aplikaciji Local Run Manager kreirane su upute za sekvenciranje, pri čemu su korišteni navedeni reagensi i pridružene oznake uzoraka njihovoj smjesi indeksa IDT Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A (96 Indexes, 96 Samples). Nakon umetanja kazete, postavljena je protočna stanica (engl. *Flow Cell*) na kojoj se odvija sekvenciranje. Tijekom sekvenciranja koristi se princip opisan u poglavlju 3.2.14.5., a kvaliteta sekveniranja provjerava se prema poglavlju 3.2.14.6.

3.2.17. Bioinformatička i statistička obrada podataka

Bioinformatička analiza sekvenci mitohondrijske DNA provedena je obradom datoteka FASTQ koje sadrže sirove podatke sekvenciranja i pripadajuće vrijednosti kvalitete očitavanja; uklanjanje adaptera i odbacivanje baza kvalitete $Q < 30$ provedeno je programom BBDuk (BBMap v38.87) (119). Dobiveni očitani sljedovi sravnjeni su s referentnim mitohondrijskim genomom (rCRS) pomoću programa BWA-MEM (v0.7.12) (120), nakon čega su zadržana samo primarna, pravilno uparena i jedinstvena sravnjenja korištenjem programa samtools (v1.8) (121). Određivanje varijanti (engl. *Variant Calling*) provedeno je programom freeBayes (v1.1.0) (122).

Mitohondrijske haplogrupe određene su programom HaploGrep 2 (v2.2) (123) na temelju filogenetskog stabla PhyloTree-mtDNA tree Build 17 (124). Varijante koje definiraju

haplogrupe korištene su za filogenetsku klasifikaciju uzoraka, dok su ostale, homoplazmijske i heteroplazmijske varijante korištene u daljnjim analizama. Za procjenu populacijskih frekvencija varijanti i njihova patogenog potencijala korištena je baza podataka MITOMAP (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>) (125). Varijante s frekvencijom u populaciji jednakom ili manjom od 0,5 % definirali smo kao rijetke. Procjena patogenosti rijetkih varijanti provedena je predikcijskim modelima APOGEE2 (za nesinonimne varijante) i nAPOGEE (za varijante u genima za rRNA i tRNA).

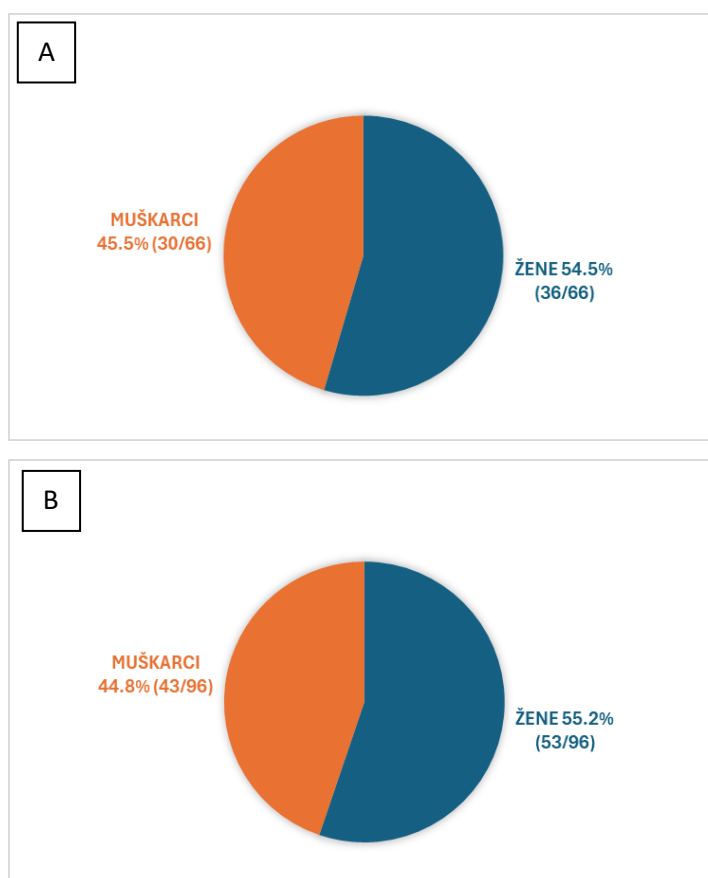
Heteroplazmijske varijante analizirane su pri pragu od 5 % udjela alternativnog alela u ukupnoj populaciji mtDNA. Analizirana je raspodjela varijanti prema funkcionalnim regijama mitohondrijskog genoma (kontrolna regija, protein-kodirajući geni, geni rRNA i tRNA), kao i raspodjela rijetkih i potencijalno patogenih varijanti po genima. Varijante su klasificirane prema njihovoj potencijalnoj kliničkoj relevantnosti. Identificirane varijante klasificirane su kao patogene, vjerojatno patogene i varijante nejasnog kliničkog značenja (engl. *Variant Of Uncertain Significance*, VUS). Unutar te skupine dodatno su izdvojene varijante VUS+, koje upućuju na veću vjerojatnost patogenosti, te varijante VUS–, koje su vjerojatnije benignog učinka. Analizirani su njihov broj i raspodjela među ispitanicima.

Statistička analiza provedena je u programskom jeziku Python (verzija 3.x) unutar okruženja Jupyter, uz korištenje biblioteka *pandas*, *scipy.stats*, *matplotlib* i *seaborn* za obradu podataka i vizualizaciju rezultata. Dodatne analize provedene su u programskom okruženju R. U obradi su korištene metode deskriptivne statistike, uključujući medijan, interkvartilni raspon (IQR), aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju (SD). Normalnost distribucije podataka procijenjena je testom Shapiro–Wilk. Budući da većina varijabli nije slijedila normalnu distribuciju, a veličine uzoraka između skupina nisu bile ujednačene, za usporedbu skupina korišteni su neparametrijski testovi. Za usporedbu dviju nezavisnih skupina primijenjen je Mann–Whitney U test (dvostrani), a za usporedbu više skupina korišten test Kruskal–Wallis. Korelacijska analiza provedena je primjenom Spearmanove ili Pearsonove korelacije, ovisno o distribuciji podataka i prirodi varijabli. Za usporedbu raspodjele haplogrupa korišteni su Pearsonov χ^2 test i Fisherov egzaktni test uz korekciju za višestruka testiranja metodom lažne stope otkrića (FDR), dok je za usporedbu broja varijanti između skupina korišten Wilcoxonov test. Statistička značajnost definirana je vrijednošću $p < 0,05$. Rezultati su prikazani pomoću box-plotova za usporedbu skupina te scatter-plotova s regresijskim linijama za prikaz odnosa između numeričkih varijabli.

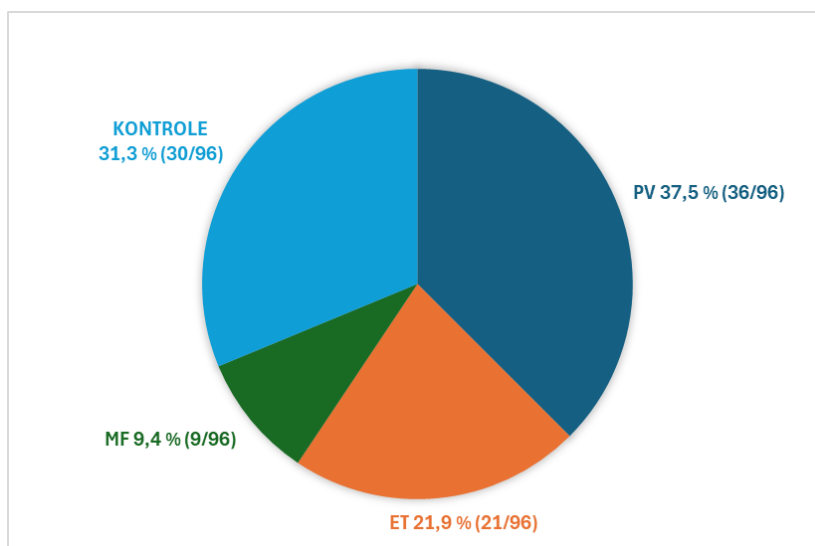
4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 96 ispitanika, od kojih je 66 imalo dijagnosticiran MPN, a 30 su bili zdravi ispitanici kontrolne skupine. Među oboljelima je zabilježen blagi pretežiti udio žena, a sličan omjer spolova zadržan je i nakon uključivanja kontrolne skupine (Slika 7). Prosječna dob svih ispitanika iznosila je 62 godine, a statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u dobi niti u distribuciji spola između oboljelih i kontrolnih ispitanika. Među bolesnicima s MPN-om najzastupljenija dijagnoza bila je policitemija vera, zatim esencijalna trombocitemija, dok je mijelofibroza bila najmanje zastupljena (Slika 8).



Slika 7. Spolna zastupljenost ispitanika. U skupini oboljelih od mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN) sudjelovalo je 54,5 % žena (plavo) i 45,5 % muškaraca (narančasto) (A). U ukupnom uzorku, uključujući i zdrave ispitanike, zabilježeno je 55,2 % žena (plavo) i 44,8 % muškaraca (narančasto) (B).



Slika 8. Raspodjela ispitanika s obzirom na dijagnozu unutar skupine oboljelih. Od ukupno 66 bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN), policitemija vera (PV) je bila prisutna kod 36 ispitanika (37,5 %) (tamno plavo), esencijalna trombocitemija (ET) kod 21 ispitanika (21,9 %) (naračasto) i mijelofibroza (MF) kod 9 ispitanika (9,4%) (zeleno). Zdrava kontrolna skupina uključivala je 30 ispitanika (31,3%) (svijetlo plavo).

4.2. Hematološka analiza periferne krvi

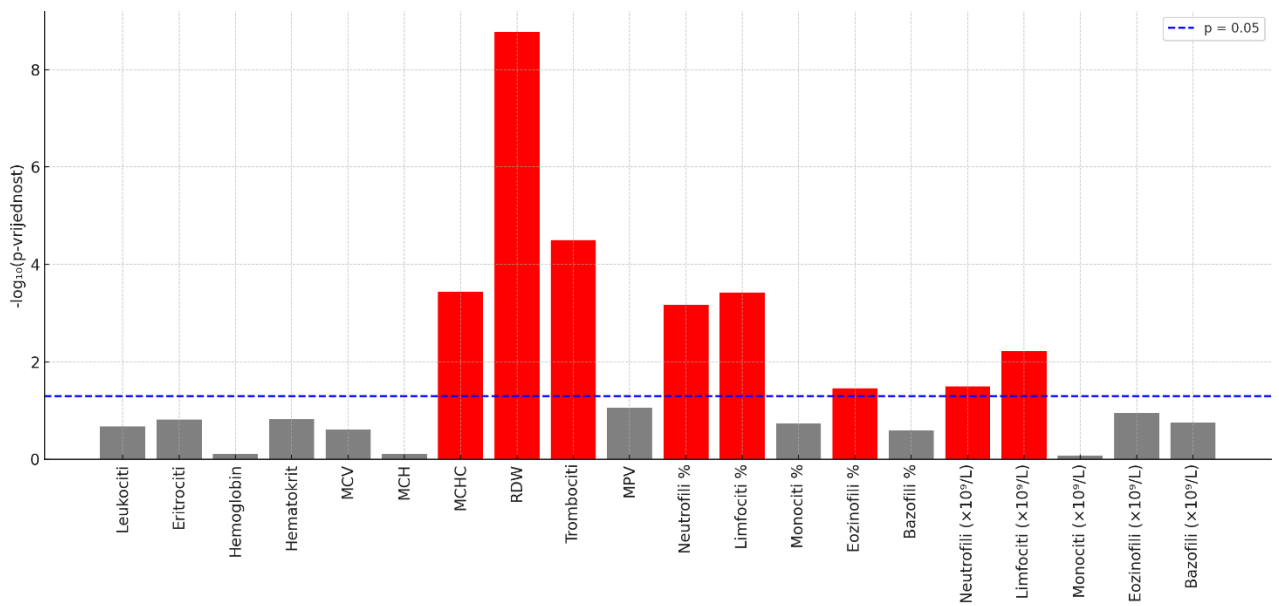
Uzorci krvi svih ispitanika analizirani su hematološki. Normalnost distribucije hematoloških parametara provjerena je testom Shapiro–Wilk, koji je pokazao da većina parametara odstupa od normalne distribucije uz prisutne odudarajuće vrijednosti ($p < 0,05$). Stoga su rezultati prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR).

U usporedbi skupina ispitanika (PV, ET, MF i zdravi ispitanici) uočene su razlike u više hematoloških parametara. Skupina bolesnika s PV imala je više vrijednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita u odnosu na ostale skupine, dok su u skupini ET zabilježene najviše vrijednosti trombocita. Bolesnici s MF imali su povišene vrijednosti leukocita i neutrofila te niže vrijednosti hemoglobina i trombocita u odnosu na PV i ET. Skupina zdravih ispitanika imala je hematološke nalaze unutar referentnih raspona (Tablica 3).

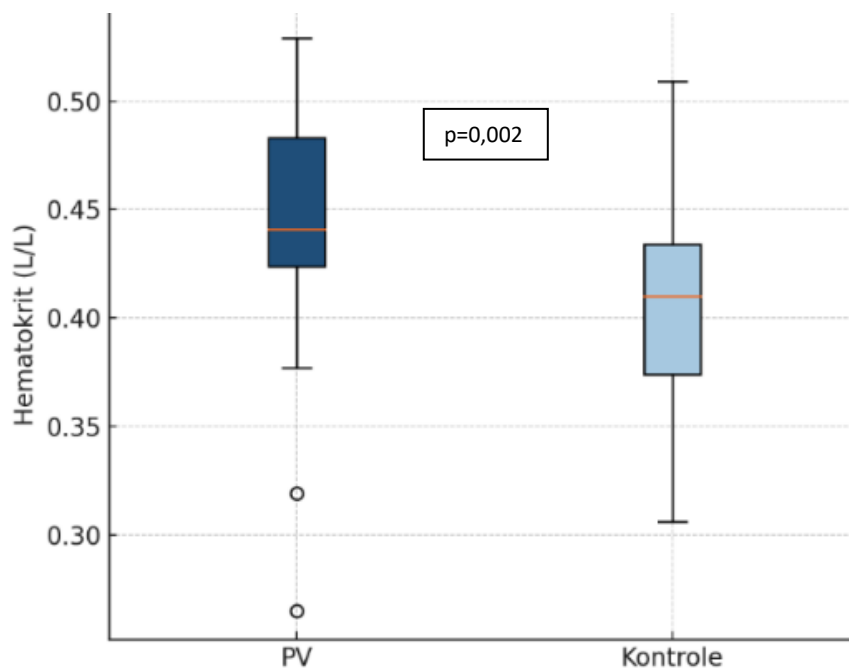
Analizom razlika između bolesnika i kontrola utvrđeno je da većina hematoloških parametara nije pokazala statistički značajne razlike. Statistički značajne razlike zabilježene su za srednju koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (MCHC), raspodjelu volumena eritrocita (RDW), trombocite, neutrofile, limfocite i eozinofile (Slika 9). Iako hematokrit u ukupnoj analizi nije bio statistički značajno različit, u pojedinačnoj usporedbi PV i skupine zdravih ispitanika utvrđena je značajno viša vrijednost u PV skupini (Slika 10).

Tablica 3. Hematološki parametri. Prikaz medijana i interkvartilnog raspona za bolesnike s policitemijom verom (PV), esencijalnom trombocitemijom (ET), primarnom mijelofibrozom (MF) i zdrave ispitanike. Referentne vrijednosti određene su prema važećim referentnim intervalima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava.

Parametar	PV (n=36)	ET (N=21)	MF (N=9)	Zdravi ispitanici (n=30)
Leukociti ($\times 10^9/L$)	7,40 (5,50 – 9,77)	6,80 (5,30–8,50)	11,30 (8,60 – 14,50)	6,75 (5,79 – 7,63)
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4,98 (4,42 – 5,64)	4,37 (3,69 – 4,71)	4,58 (3,84 – 4,73)	4,67 (4,16 – 4,92)
Hemoglobin (g/L)	143 (133,75–150,25)	134 (122–147)	137 (133,75–147)	139,5 (127–145)
Hematokrit (L/L)	0,442 (0,419–0,469)	0,405 (0,383–0,456)	0,418 (0,306–0,451)	0,408 (0,373–0,434)
MCV – Srednji volumen eritrocita (f)	93,4 (82,5–101,7)	94,2 (87,7–104,5)	89,2 (88,3–97,9)	90,4 (86,8–93,9)
MCH – Srednja masa hemoglobina u eritrocitu (pg)	30,2 (25,6–32,9)	31 (27,3–36)	30 (28,1–32,1)	30,4 (29,0–31,8)
MCHC – Srednja koncentracija hemoglobina (g/L)	324 (314,75–333)	332 (317–336)	324 (318–334)	335 (329–340)
RDW – Indeks distribucije eritrocita (%)	16,4 (14,1–18,7)	15,5 (13,6–17,5)	14,9 (14,1–20,0)	13,2 (12,3–14,4)
Trombociti ($\times 10^9/L$)	336 (246–487)	402 (293–465)	503 (328–628)	248 (222–280)
MPV – Srednji volumen trombocita (fL)	9,3 (8,5–9,8)	9,0 (8,4–9,5)	9,3 (8,3–9,7)	9,4 (8,8–9,9)
Neutrofilni granulociti (%)	67,2 (57,8–72,2)	67,3 (61,0–70,5)	72,5 (66,1–76,9)	60,2 (56,8–63,1)
Limfociti (%)	20,6 (17,9–26,5)	24,1 (18,9–30,6)	18,9 (12,3–20,4)	27,9 (23,0–32,2)
Monociti (%)	7,6 (6,3–9,1)	7,9 (6,0–9,2)	7,0 (5,9–8,1)	8,0 (7,2–9,6)
Eozinofilni granulociti (%)	2,1 (1,3–3,6)	1,8 (1,2–3,0)	2,1 (1,2–3,7)	2,8 (1,5–4,0)
Bazofilni granulociti (%)	0,7 (0,5–1,0)	0,7 (0,6–0,9)	0,6 (0,5–0,7)	0,6 (0,4–0,8)
Neutrofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	4,63 (2,96–6,99)	4,42 (3,48–6,12)	6,87 (4,63–11,18)	3,97 (3,18–4,86)
Limfociti ($\times 10^9/L$)	1,51 (1,22–1,87)	1,30 (1,05–1,67)	1,96 (1,35–2,43)	1,77 (1,51–2,14)
Monociti ($\times 10^9/L$)	0,57 (0,48–0,70)	0,49 (0,35–0,72)	0,71 (0,57–0,80)	0,57 (0,49–0,66)
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0,14 (0,09–0,21)	0,13 (0,07–0,19)	0,20 (0,14–0,38)	0,20 (0,13–0,30)
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0,05 (0,03–0,08)	0,05 (0,03–0,06)	0,06 (0,04–0,08)	0,04 (0,03–0,06)



Slika 9. Logaritamski prikaz p vrijednosti hematoloških parametara u usporedbi skupine bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN: policitemija vera – PV, esencijalna trombocitemija – ET i primarna mijelofibroza – MF) i zdravih ispitanika. Parametri iznad linije značajnosti nisu statistički značajni, dok parametri ispod linije predstavljaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$).



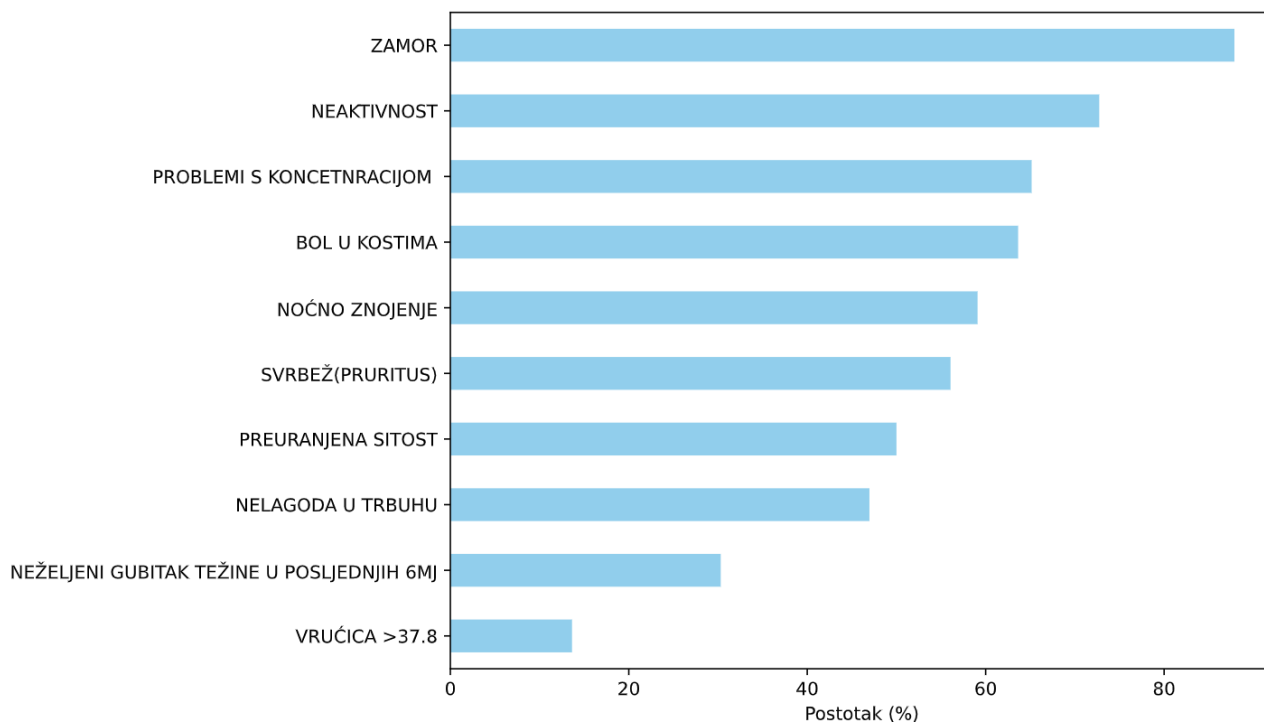
Slika 10. Prikaz vrijednosti hematokrita (Hct) u skupini bolesnika s policitemijom verom (PV) i zdravoj kontrolnoj skupini. Bolesnici s PV imali su statistički značajno više vrijednosti hematokrita u odnosu na zdrave ispitanike ($p = 0,002$; Mann–Whitney U test).

4.3. Klinički simptomi bolesnika s MPN-om

Radi procjene učestalosti i intenziteta simptoma povezanih s MPN-om, u bolesnika je primjenjen upitnik MPN-SAF TSS. Kod većine bolesnika zabilježena je prisutnost simptoma prema upitniku MPN-SAF TSS, pri čemu je više od polovice ispitanika prijavilo većinu procjenjivanih simptoma. Najčešće prijavljeni simptomi bili su zamor, neaktivnost, problemi s koncentracijom, bol u kostima, noćno znojenje, svrbež i preuranjena sitost, dok su simptomi povezani s težim stupnjem bolesti, poput gubitka tjelesne mase, vrućice i nelagode u trbuhu, bili rjeđe prisutni (Slika 11). Najveći intenzitet simptoma zabilježen je za zamor, a zatim za bol u kostima i neaktivnost. Ukupna prosječna vrijednost TSS-a po simptomu iznosila je 2,3 (Tablica 4).

Tablica 4. Simptomi iz MPN-SAF TSS upitnika. Prikazane su srednje vrijednosti (M), standardne devijacije (SD) i interkvartilni rasponi (Q1–Q3) za deset kliničkih simptoma procijenjenih putem MPN-SAF TSS upitnika. Ocjene su dane na skali od 0 (nema simptoma) do 10 (najizraženiji mogući simptom).

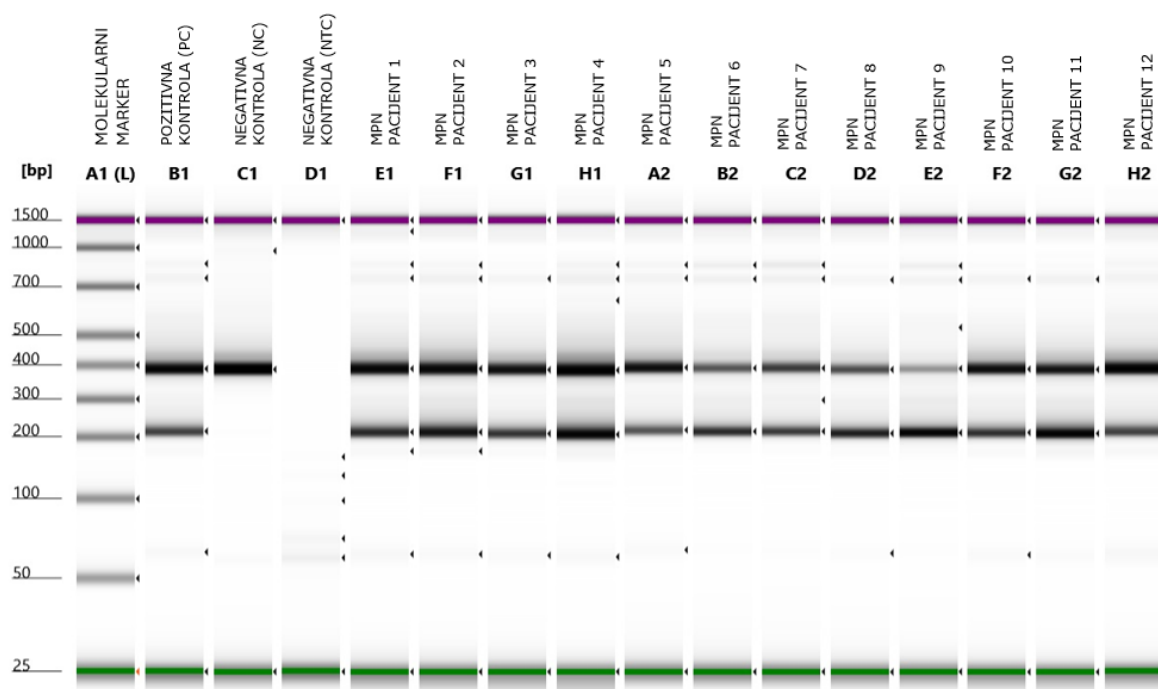
Klinički simptom	Srednja vrijednost (M)	Standardna devijacija (SD)	Interkvartilni raspon (Q1–Q3)
Zamor	4,50	2,80	3,0 – 7,0
Preuranjena sitost	2,14	2,55	0,0 – 4,0
Nelagoda u trbuhu	1,86	2,46	0,0 – 3,75
Neaktivnost	3,30	2,88	0,0 – 5,0
Problemi s koncentracijom	2,55	2,77	0,0 – 4,0
Noćno znojenje	2,56	3,13	0,0 – 5,0
Svrbež (pruritus)	2,38	2,95	0,0 – 4,0
Bol u kostima	3,38	3,23	0,0 – 6,0
Vrućica >37,8	0,39	1,33	0,0 – 0,0
Neželjeni gubitak težine u posljednjih 6 mjeseci	0,89	1,83	0,0 – 1,0
ZBROJ	24	15,13	12,25 – 33,75



Slika 11. Zastupljenost simptoma bolesnika određenih upitnikom za procjenu simptoma MPN-SAF TSS.

4.4. Detekcija mutacije JAK2 V617F primjenom PCR-a specifičnog za alel

Kako bi se potvrdila prisutnost mutacije JAK2 V617F, u uzorcima DNA bolesnika s MPN-om i zdravih ispitanika provedena je analiza PCR specifična za alel. Mutacija JAK2 V617F potvrđena je u svih 66 analiziranih uzoraka bolesnika s MPN-om, dok nije detektirana niti u jednom od 30 uzoraka iz skupine zdravih ispitanika. Produkt PCR veličine 203 bp pojavljuje se isključivo u prisutnosti mutiranog alela, dok se fragment od 364 bp amplificira u svim uzorcima te služi kao interna kontrola uspješnosti PCR reakcije. Negativne kontrole (C1 i D1), uključujući reakcije bez dodane DNA (slijepe probe), nisu pokazale prisutnost amplikona, što potvrđuje specifičnost reakcije i odsutnost kontaminacije. Zbog potpune uniformnosti rezultata među bolesnicima i zdravim ispitanicima, prikazan je jedan reprezentativan primjer elektroforeze (Slika 12).



Slika 12. Elektroforetski prikaz produkata dobivenih metodom PCR specifičnom za alel za detekciju mutacije JAK2 V617F. A1 (L) – molekularne ljestave (engl. *DNA Ladder*), B1 – pozitivna kontrola (PC; uzorak s potvrđenom mutacijom JAK2 V617F), C1 – negativna kontrola (NC; DNA zdrave osobe, bez mutacije), D1 – negativna kontrola bez dodane DNA (NTC; engl. *No Template Control*), E1–H2 – uzorci bolesnika s MPN-om, pozitivni na mutaciju JAK2 V617F.

4.5. Provjera specifičnosti PCR-a specifičnog za alel sekvenciranjem

Radi molekularne potvrde rezultata PCR-a specifičnog za alel i identifikacije ostalih somatskih mutacija povezanih s MPN-om, provedena su dva neovisna sekvenciranja NGS po 48 uzoraka DNA na platformi MiniSeq System korištenjem panela Pillar oncoReveal™ Essential MPN. Oba sekvenciranja uspješno su završila, uz uredne pokazatelje kontrole kvalitete. U prvom sekvenciranju postignuta je visoka kvaliteta podataka. Ukupno 92,75 % baza imalo je vrijednost kvalitete \geq Q30, što označava vjerojatnost pogreške manju od 0,1 % i smatra se standardom visoko pouzdane NGS analize.

Udio očitavanja koja su zadovoljila kriterij “passing filter” (PF), tj. prošla interne filtre kvalitete instrumenta i bila uključena u daljnju analizu, iznosio je 89,76 %. Ukupni prinos sekvenciranja bio je 3,52 gigaparovabaza (Gbp). U drugom ciklusu sekvenciranja dobiveni su usporedivi rezultati: 92,32 % baza \geq Q30, 87,71 % PF očitavanja te ukupni prinos od 3,63 Gbp, što potvrđuje dosljednost kvalitete i reproducibilnost sekvenciranja. Razlike između sekvenciranja bile su minimalne i unutar očekivanih tehničkih varijacija za MiniSeq platformu, što potvrđuje visoku reproducibilnost generiranih podataka. Analiza NGS je potvrdila preliminarne nalaze PCR. Mutacija JAK2 V617F detektirana je u svih 66 bolesnika obuhvaćenih molekularnom analizom, dok nijedan ispitanik iz skupine zdravih ispitanika (n=30) nije pokazivao prisutnost mutacija *JAK2*, *CALR*, *MPL* niti drugih patogenih varijanti obuhvaćenih panelom. U većine bolesnika jedina patogena varijanta bila je JAK2 V617F. U jedne bolesnice zabilježena je dodatna mutacija u genu *CALR*, *CALR* p.L367fs*46, frameshift varijanta koja rezultira promjenom čitanja C-terminalnog dijela kalretikulina. Njen VAF je iznosio 19,31 %, što upućuje na prisutnost subklonalne populacije unutar dominantne klonalne JAK2-pozitivne hematopoeze. Ovaj nalaz predstavlja biološku iznimku unutar analizirane kohorte, ali je u skladu s opisanim rijetkim pojavnostima dvostrukih mutacija u literaturi.

4.6. Kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom JAK2 V617F

U svrhu molekularne potvrde rezultata PCR-a specifičnog za alel i identifikacije ostalih somatskih mutacija povezanih s MPN-om provedena su dva ciklusa sekvenciranja DNA. Oba ciklusa uspješno su završena uz uredne pokazatelje kontrole kvalitete. U prvom sekvenciranju 92,75 % baza imalo je kvalitetu $\geq Q30$, uz 89,76 % očitavanja koja su prošla filter kvalitete i ukupni prinos sekvenciranja od 3,52 gigaparovabaza (Gbp). U drugom sekvenciranju dobiveni su usporedivi rezultati, što potvrđuje dosljednost kvalitete i reproducibilnost postupka sekvenciranja.

Analiza NGS potvrdila je preliminarne PCR nalaze. Mutacija JAK2 V617F detektirana je kod svih bolesnika obuhvaćenih molekularnom analizom, dok nijedan ispitanik iz skupine zdravih ispitanika nije imao prisutne mutacije u genima *JAK2*, *CALR* ili *MPL* niti druge patogene varijante obuhvaćene panelom. Kod većine bolesnika jedina patogena varijanta bila je JAK2 V617F. Kod jedne bolesnice zabilježena je dodatna mutacija u genu *CALR* (*CALR* p.L367fs*46) s varijantnim alelnim udjelom od 19,31 %.

4.6.1. Udio varijantnog alela mutacije JAK2 V617F mjeren metodom qPCR

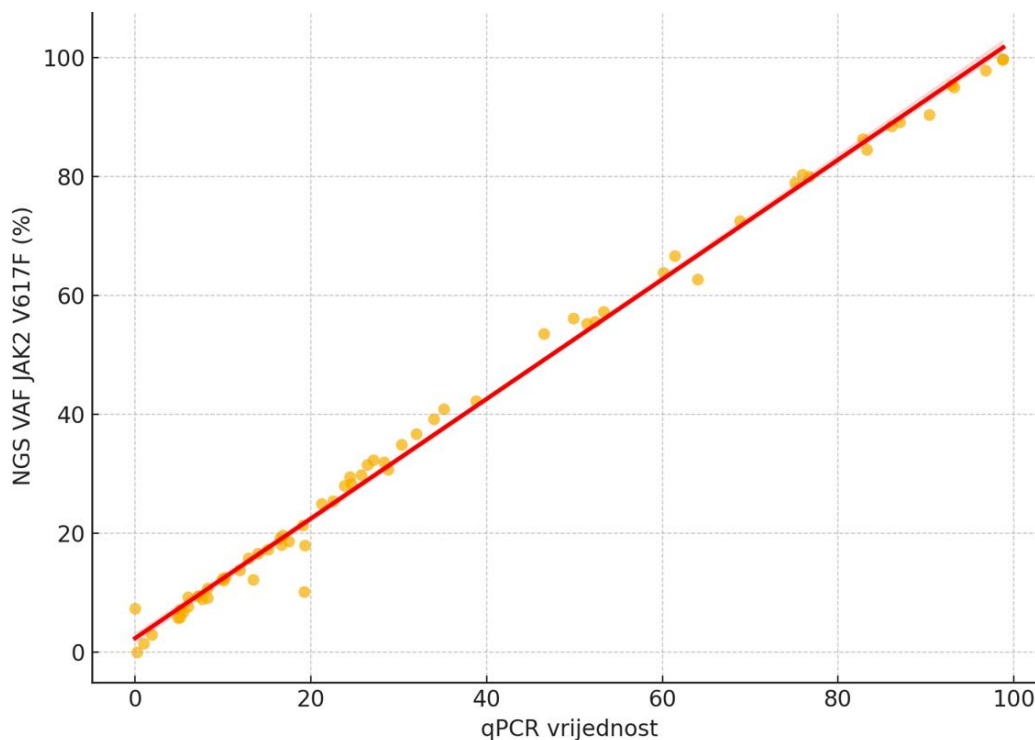
U svrhu određivanja alelnog udjela mutacije JAK2 V617F, kod svih 66 bolesnika s MPN-om s potvrđenom prisutnošću mutacije provedena je analiza qPCR istih uzoraka DNA. Apsolutna kvantifikacija određena je izradom standardne krivulje na temelju referentnih uzoraka s poznatim udjelima mutacije.

Najniža medijanska vrijednost VAF-a zabilježena je u skupini bolesnika s ET-om (15,1 %), dok su više vrijednosti utvrđene u skupinama s PV-om (29,55 %) i MF-om (27,1 %). Unatoč uočenim razlikama, test Kruskal-Wallis nije potvrdio statistički značajnu razliku između dijagnostičkih skupina ($p = 0,129$).

U svih 66 bolesnika s potvrđenom mutacijom JAK2 V617F, kvantifikacija VAF-a provedena je i metodom NGS. Najniža vrijednost medijana VAF-a zabilježena je u skupini s ET-om (17,22 %), dok su više vrijednosti utvrđene u skupinama s PV-om (32,75 %) i MF-om (31,97 %). Unatoč uočenim razlikama, testom Kruskal-Wallis nije potvrđena statistički značajna razlika u VAF-u između dijagnostičkih skupina ($p = 0,142$).

Analizom podudarnosti između vrijednosti VAF-a dobivenih metodama qPCR i NGS utvrđena je visoka korelacija. Korelacija je izračunata na temelju razlika između parova mjerenja dviju metoda, pri čemu je testom Shapiro–Wilk utvrđeno da razlike ne slijede normalnu distribuciju ($p < 0,001$). Sukladno tome, za procjenu povezanosti primijenjen je

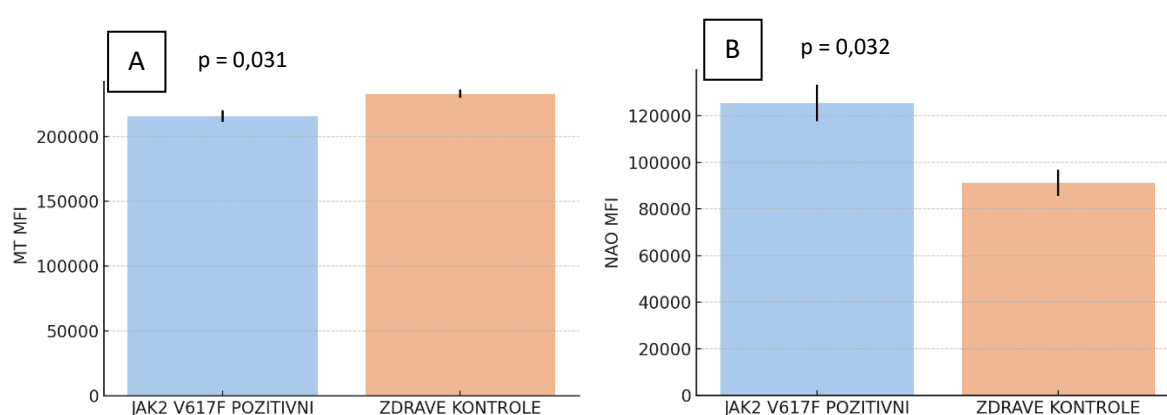
Spearmanov koeficijent rang-korelacije, koji je pokazao snažnu pozitivnu korelaciju između dviju metoda (Spearman $\rho = 0,992$; $p < 0,001$) (Slika 13).



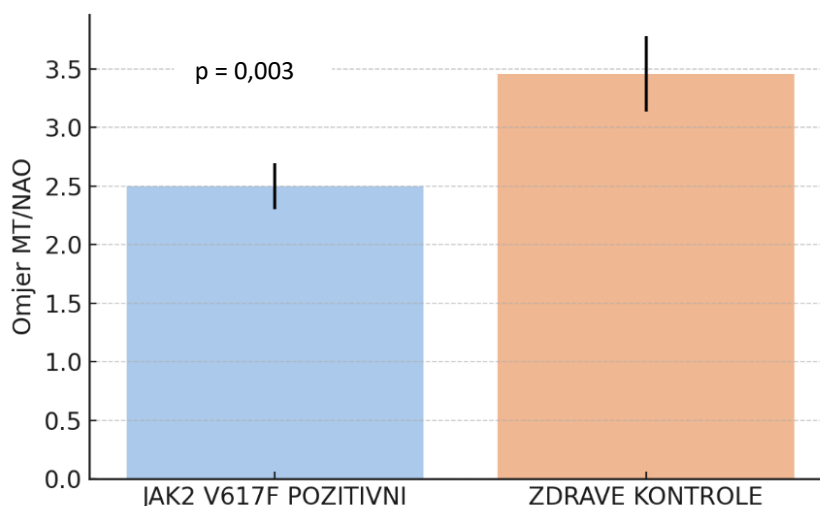
Slika 13. Korelacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F dobivenog metodama kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) i sekvenciranjem nove generacije (NGS). Vrijednost qPCR predstavlja udio kopija mutiranog alela JAK2 V617F u ukupnom broju kopija mutiranog i divljeg alela u pojedinom uzorku, a određena je metodom qPCR. NGS VAF JAK2 V617F predstavlja udio očitavanja mutacije JAK2 V617F u ukupnom broju očitavanja na poziciji mutacije u genomu, a određen je metodom NGS. Crvena linija prikazuje regresijski pravac, a izračunata je snažna pozitivna korelacija (Pearsonov koeficijent korelacije = 0,997; $p < 0,001$).

4.7. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom

Mitohondrijska masa i membranski potencijal, koji odražavaju funkcionalni status mitohondrija, analizirani su određivanjem srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) boja MT i NAO u uzorcima granulocita JAK2 V617F pozitivnih bolesnika i zdravih ispitanika. Vrijednost MFI boje MT bila je statistički značajno niži kod JAK2 V617F pozitivnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike ($p = 0,031$) (Slika 14A). MFI boje NAO pokazao se statistički značajno viši kod JAK2 V617F pozitivnih u odnosu na zdrave ispitanike ($p = 0,032$) (Slika 14B). Omjer signala MT i NAO bio je statistički značajno niži kod bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p = 0,003$) (Slika 15).



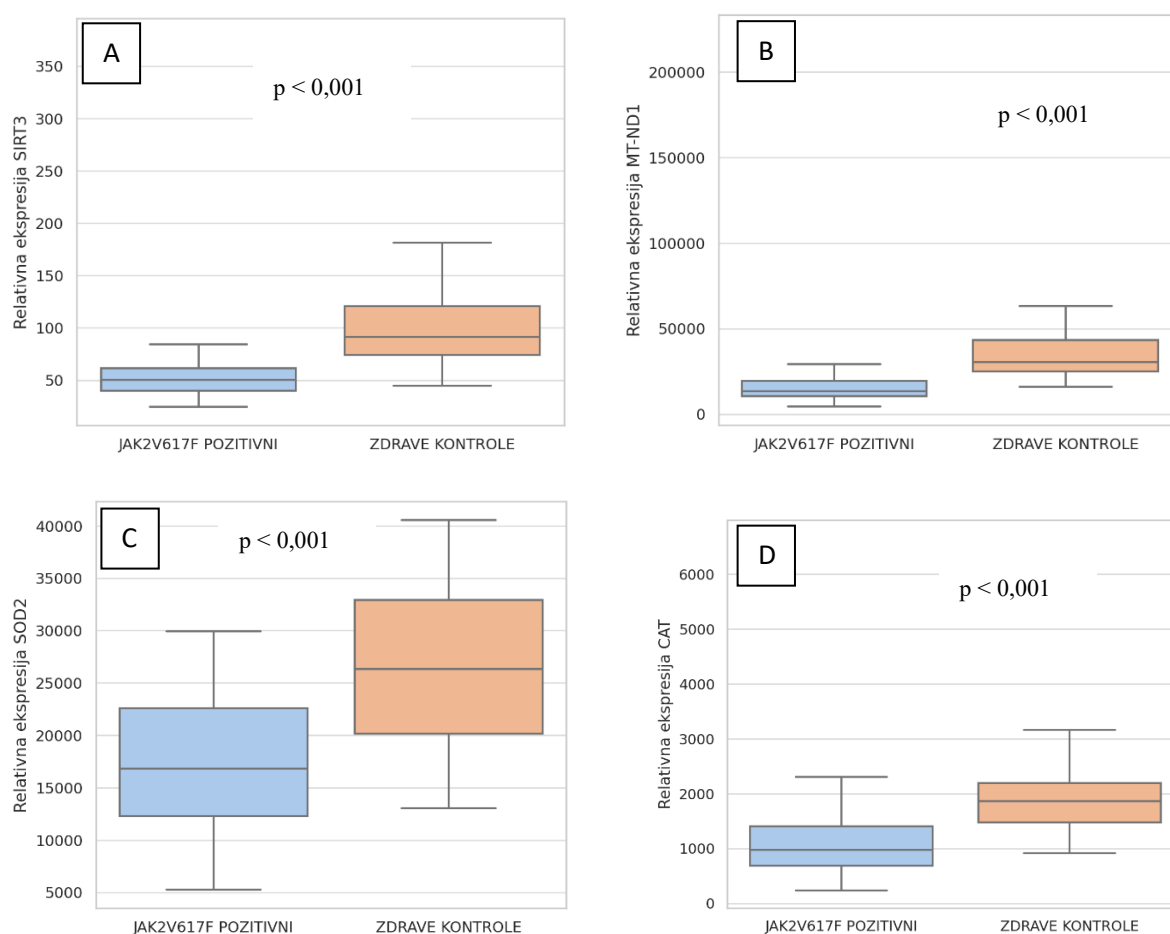
Slika 14. Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (MFI) boje MitoTracker™ Deep Red FM (MT) (A) i boje Nonyl Acridine Orange (NAO) (B) u stanicama bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (test Mann-Whitney U).



Slika 15. Omjer intenziteta fluorescencije boje MitoTracker™ Deep Red FM (MT) i Nonyl Acridine Orange (NAO) (MT/NAO) u stanicama bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (test Mann-Whitney U).

4.8. Genska ekspresija mitohondrijskih i antioksidativnih gena

Kako bi se procijenila ekspresija mitohondrijskih i antioksidativnih gena u granulocitima bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F, relativna ekspresija gena *SIRT3*, *MT-ND1*, *SOD2* i *CAT* određena je RT-qPCR metodom i normalizirana prema genu *ACTB*. U usporedbi sa zdravim ispitanicima, bolesnici pozitivni na mutaciju JAK2 V617F pokazali su značajno sniženu relativnu ekspresiju mitohondrijskih (*SIRT3* i *MT-ND1*) i antioksidativnih gena (*SOD2* i *CAT*) u granulocitima ($p < 0,001$) (Slika 16). Statistička analiza provedena je testom Mann–Whitney U za gene koji nisu pratili normalnu distribuciju (*SIRT3*, *MT-ND1*, *CAT*), dok je za *SOD2*, kao jedini normalno distribuiran gen, korišten t-test.



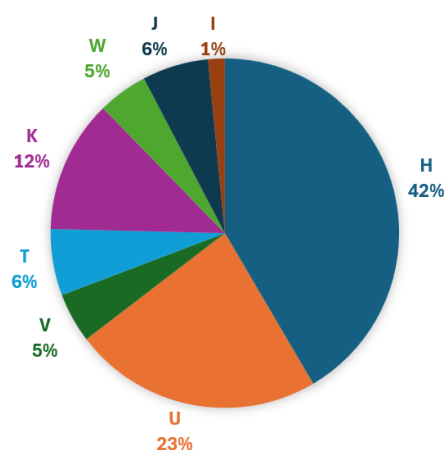
Slika 16. Relativna ekspresija gena *SIRT3*, *MT-ND1*, *SOD2* i *CAT* u granulocitima bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Statistička značajnost razlika između grupa procijenjena je testom Mann–Whitney U za gene *SIRT3*, *MT-ND1* i *CAT*, te t-testom za gen *SOD2* (jedini koji je zadovoljio pretpostavke normalne distribucije). Statistička značajnost: $p < 0,001$ (A–D).

4.9. Broj kopija mtDNA

Kako bi se procijenio relativni broj kopija mtDNA u granulocitima, provedena je kvantitativna analiza uzoraka bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Relativni broj kopija mtDNA u granulocitima određen je metodom qPCR, a rezultati su uspoređeni između skupine bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Analiza vrijednosti ΔCt pokazala je da podaci nisu normalno distribuirani kod bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F (Shapiro-Wilk test, $p = 0,038$), dok su zdravi ispitanici imali normalnu distribuciju ($p = 0,84$). Sukladno tome, korišten je test Mann-Whitney U, koji nije pokazao statistički značajnu razliku u vrijednosti relativne ekspresije koja u ovom kontekstu predstavlja relativni broj kopija mtDNA u odnosu na nDNA (test Mann-Whitney U, $p = 0,63$). Nakon logaritamske transformacije vrijednosti relativne ekspresije, provedena je i analiza Welchovim t-testom, koja također nije pokazala značajnu razliku ($t = 0,47$, $p = 0,64$). Unatoč većoj varijabilnosti broja kopija mtDNA unutar skupine bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F, niti jedna od analiza nije ukazala na statistički značajnu razliku količine mtDNA između skupina.

4.10. Raspodjela mitohondrijskih haplogrupa

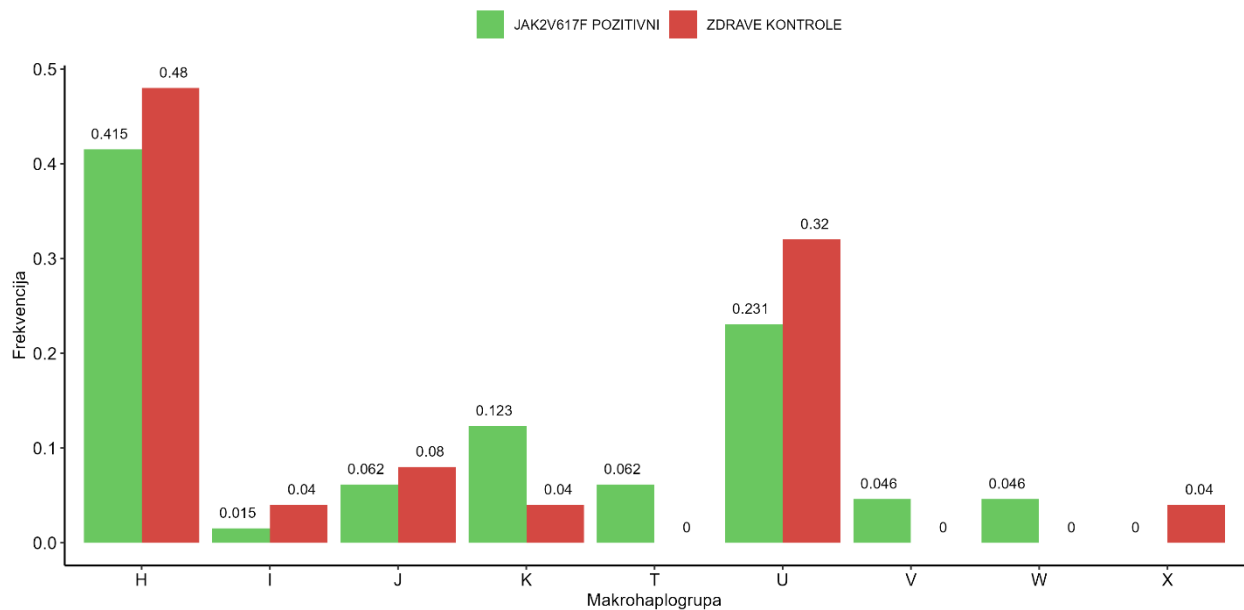
Mitohondrijske makrohaplogrupe određene su analizom sekvenci mitohondrijske DNA u uzorcima bolesnika s potvrđenom mutacijom JAK2 V617F ($N = 65$) radi procjene njihove raspodjele u ispitivanoj skupini. Najzastupljenija je bila makrohaplogrupa H s udjelom od 42 %. Slijedi haplogrupa U koja čini 23 % uzorka, dok je haplogrupa K zastupljena s 12 %. Ostale makrohaplogrupe (T i J po 6,2 %, V i W po 4,6 %, te I s 1,5 %) prisutne su u znatno manjim udjelima. Makrohaplogrupa X nije zabilježena u ispitivanoj skupini (Slika 17).



Slika 17. Distribucija makrohaplogrupa u skupini JAK2 V617F pozitivnih ispitanika ($N = 65$).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli mitohondrijskih makrohaplogrupa između bolesnika s mutacijom JAK2 V617F (N = 65) i zdravih ispitanika (N = 25). U obje skupine dominira makrohaplogrupa H, dok su ostale haplogrupe zastupljene u manjim udjelima, bez jasnog obrasca koji bi razlikovao skupine (Slika 18).

Statistička analiza provedena Pearsonovim χ^2 testom i Fisherovim egzaktnim testom nije pokazala statistički značajne razlike u raspodjeli makrohaplogrupa između bolesnika s mutacijom JAK2 V617F i opće populacije nakon korekcije za višestruka testiranja, niti između zdravih ispitanika i opće populacije.



Slika 18. Usporedna raspodjela mitohondrijskih makrohaplogrupa kod bolesnika s mutacijom JAK2 V617F (N = 65) i zdravih ispitanika (N = 25).

4.11. Analiza potencijalno patogenih heteroplazmija pri pragu od 5 %

Potencijalno patogene heteroplazmije mitohondrijske DNA analizirane su sekvenciranjem mitohondrijskog genoma u uzorcima bolesnika s mutacijom JAK2 V617F i zdravih ispitanika radi procjene mutacijskog opterećenja i funkcionalne raspodjele varijanti. Sve identificirane varijante bile su ograničene na kodirajuće regije mitohondrijskog genoma (geni mRNA, rRNA i tRNA), dok u kontrolnoj regiji nisu zabilježene promjene. Ukupan broj potencijalno patogenih heteroplazmija pri pragu od 5 % (engl. *Potentially Pathogenic Heteroplasmy 5%*, PHP5) bio je veći u skupini bolesnika s mutacijom JAK2 V617F u odnosu na zdrave ispitanike. Slično tome, mutacijsko opterećenje po ispitaniku bilo je više u skupini bolesnika, iako razlika nije dosegla statističku značajnost. U funkcionalnoj raspodjeli varijanti u obje skupine dominirale su sinonimne heteroplazmije, dok su nesinonimne varijante činile manji udio, uz trend većeg broja u bolesnika.

Tranzicije su bile dominantne u obje skupine ispitanika, dok su transverzije bile rjeđe zastupljene. U skupini JAK2 V617F pozitivnih ispitanika transverzije su činile 23,6 % svih detektiranih PHP5 heteroplazmija (13/55). Obrazac raspodjele mutacijskih tipova bio je sličan između skupina, bez statistički značajnih razlika.

Raspodjela varijanti prema učestalosti u populaciji ukazala je na različite obrasce između skupina, pri čemu je u bolesnika udio čestih i rijetkih varijanti bio približno jednak, dok su kod zdravih ispitanika dominirale rijetke varijante. Rijetke heteroplazmije bile su raspoređene duž mitohondrijskog genoma i prisutne u više gena, ponajprije u regijama mRNA, uz manju zastupljenost u genima rRNA i tRNA. Unutar gena RNA, varijante su bile prisutne u oba gena rRNA, s većom zastupljenošću u 16S rRNA u odnosu na gen 12S rRNA, dok je u genima tRNA zabilježen manji broj heteroplazmija. Ukupno gledano, varijante RNA bile su rjeđe u odnosu na varijante u regijama mRNA. Rijetke nesinonimne heteroplazmije bile su raspoređene duž mitohondrijskog genoma bez jasnog grupiranja te su identificirane u genima koji kodiraju proteinske podjedinice respiratornog lanca, uključujući gene kompleksa I, III, IV i V.

4.12. Homoplazmije

Homoplazmijske varijante mitohondrijske DNA analizirane su sekvenciranjem mitohondrijskog genoma u uzorcima bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika radi procjene mutacijskog opterećenja i raspodjele varijanti. Homoplazmijske varijante nisu otkrivene u kontrolnoj regiji mitohondrijskog genoma, već su bile ograničene na kodirajuće regije. Ukupan broj homoplazmija bio je veći u skupini bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F u odnosu na zdrave ispitanike, no opterećenje varijantama po ispitaniku nije se značajno razlikovalo između skupina.

Analiza raspodjele prema učestalosti u populaciji pokazala je sličan udio čestih i rijetkih varijanti između skupina, bez statistički značajnih razlika. U obje skupine zabilježena je izražena dominacija tranzicija u odnosu na transverzije, uz sličan obrazac raspodjele po ispitaniku. Homoplazmije su bile raspoređene duž mitohondrijskog genoma, pretežno u protein-kodirajućim genima (mRNA), uz manju zastupljenost u regijama rRNA i tRNA. Rijetke nesinonimne varijante bile su raspoređene bez uočljivog grupiranja, najčešće u genima *CYB*, *ATP6*, *ND1* i *ND5*.

4.13. Klinički značajne varijante mitohondrijske DNA u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F i zdravih ispitanika

U svrhu procjene učestalosti i raspodjele potencijalno klinički značajnih varijanti mtDNA provedena je analiza mitohondrijskog genoma u bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Od ukupno 66 bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F, patogene varijante mtDNA identificirane su u troje bolesnika, dok su vjerojatno patogene varijante zabilježene u još troje bolesnika, ukupno u šest bolesnika s potencijalno patogenim varijantama. Varijante neodređenog kliničkog značaja (VUS) činile su većinu nalaza, pri čemu su varijante VUS⁻, koje upućuju na veću vjerojatnost benignog učinka, zabilježene u 12 bolesnika, dok su varijante VUS⁺, povezane s većom vjerojatnošću patogenosti, utvrđene u pet bolesnika. U dvojice bolesnika utvrđena je prisutnost višestrukih varijanti, pri čemu su kod jednog detektirane dvije, a kod drugog tri varijante.

U bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F identificiran je veći broj varijanti mtDNA u odnosu na zdrave ispitanike (Tablica 5, Tablica 6), pri čemu su patogene i vjerojatno patogene varijante zabilježene isključivo u skupini bolesnika. Detektirane varijante bile su raspoređene duž mitohondrijskog genoma i obuhvaćale su gene koji kodiraju komponente respiratornog lanca, kao i gene za ribosomske i transfer RNA. U bolesnika su zabilježene i

homoplazmične i heteroplazmične varijante, dok je u skupini zdravih ispitanika pronađen manji broj varijanti bez patogenih promjena.

Tablica 5. Pregled mitohondrijskih varijanti DNA detektiranih u granulocitima bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F, prema poziciji u odnosu na referentnu sekvencu rCRS, s pripadajućim udjelom heteroplazmije i procjenom patogenosti.

Pozicija (rCRS)	Oznaka uzorka	Gen	Referentni alel /varijanta	Alternativni alel	Frekvencija alternativnog alela (%)	Patogenost
901	MPN-38-GR/87	<i>MT-RNR1</i>	G / m.901G>R	A	8,5 %	VUS-
1336	MPN-16-GR/66	<i>MT-RNR1</i>	G / m.1336G>R	A	9,4 %	VUS-
1550	MPN-8-GR/62	<i>MT-RNR1</i>	A / m.1550A>R	G	11,6 %	VUS+
1966	MPN-65-GR/46	<i>MT-RNR2</i>	G / m.1966G>R	A	9,6 %	VUS
2814	MPN-12-GR/80	<i>MT-SHLP5</i>	G / m.2814G>R	A	6,19 %	VUS
2819	MPN-7-GR/72	<i>MT-SHLP5</i>	G / m.2819G>R	A	10,8 %	VUS
3058	MPN-29-GR/54	<i>MT-RNR2</i>	T / m.3058T>Y	C	21,4 %	vjerojatno patogena
4435	MPN-52-GR/72	<i>MT-TM</i>	G / m.4435A>G	-	100 %	patogena
4690	MPN-16-GR/66	<i>MT-ND2</i>	T / m.4690T>K	G	47,3 %	VUS-
5567	MPN-25-GR/71	<i>MT-TW</i>	C / m.5567T>C	-	100 %	patogena
7393	MPN-29-GR/54	<i>MT-CO1</i>	G / m.7393G>R	A	6,3 %	VUS-
8007	MPN-24-GR/81	<i>MT-CO2</i>	G / m.8007G>R	A	42,8 %	VUS+
8348	MPN-50-GR/78	<i>MT-TK</i>	G / m.8348A>G	-	100 %	patogena
9022	MPN-23-GR/68	<i>MT-ATP6</i>	A / m.9022G>A	-	100 %	VUS-
9025	MPN-39-GR/84	<i>MT-ATP6</i>	G / m.9025G>R	A	7,2 %	vjerojatno patogena
9306	MPN-10-GR/59	<i>MT-CO3</i>	T / m.9306T>Y	C	35,7 %	VUS+
9445	MPN-6-GR/54	<i>MT-CO3</i>	G / m.9445G>R	A	14 %	VUS-
9445	MPN-29-GR/54	<i>MT-CO3</i>	G / m.9445G>R	A	13,7 %	VUS-
10192	MPN-14-GR/73	<i>MT-ND3</i>	T / m.10192C>T	-	100 %	VUS-
11084	MPN-64-GR/57	<i>MT-ND4</i>	G / m.11084A>G	-	100 %	VUS-
11696	MPN-30-GR/62	<i>MT-ND4</i>	A / m.11696G>A	-	100 %	VUS-
14180	MPN-33-GR/72	<i>MT-ND6</i>	C / m.14180T>C	-	100 %	VUS-
14486	MPN-41-GR/81	<i>MT-ND6</i>	A / m.14486A>R	G	14,4 %	vjerojatno patogena
15245	MPN-60-GR/43	<i>MT-CYB</i>	A / m.15245G>A	-	100 %	VUS-
15946	MPN-44-GR/68	<i>MT-TT</i>	T / m.15946C>T	-	100 %	VUS-

VUS označava varijante nejasnog kliničkog značenja

VUS+ označava varijante s većom vjerojatnošću patogenosti

VUS- označava varijante s većom vjerojatnošću benignog učinka

Tablica 6. Pregled mitohondrijskih varijanti DNA detektiranih u granulocitima zdravih ispitanika, prema poziciji u odnosu na referentnu sekvencu rCRS, s pripadajućim udjelom heteroplazmije i procjenom patogenosti.

Pozicija (rCRS)	Oznaka uzorka	Gen	Glavni alel /varijanta	Manjinski alel	Granulociti (%)	Patogenost
2649	MPN-82-GR/74	<i>MT-Hum</i>	T / m.2649T>Y	C	47,3 %	VUS-
3398	MPN-83-GR/80	<i>MT-ND1</i>	C / m.3398T>C	-	100 %	VUS+
5561	MPN-77-GR/68	<i>MT-TW</i>	T / m.5561T>Y	C	6,8 %	VUS-
7695	MPN-76-GR/59	<i>MT-CO2</i>	T / m.7695T>Y	C	43,6 %	VUS+

VUS (variant of uncertain significance)

VUS+ označava varijante s većom vjerojatnošću patogenosti

VUS- označava varijante s većom vjerojatnošću benignog učinka

4.14. Analiza povezanosti kliničkih, hematoloških i molekularnih parametara

U svrhu ispitivanja povezanosti između parametara mitohondrijske funkcije, ekspresije gena, hematoloških parametara, simptoma bolesti i VAF-a mutacije JAK2 V617F provedene su Spearmanove korelacijske analize. Analize su provedene isključivo u skupini bolesnika, budući da pojedine varijable nisu bile dostupne u skupini zdravih ispitanika jer se odnose isključivo na obilježja bolesti. Rezultati pokazuju da su neke korelacije bile statistički značajne, dok za pojedine varijable nije utvrđena značajna povezanost (Tablica 7).

Tablica 7. Spearmanove korelacije između parametara mitohondrijske funkcije, ekspresije gena, hematoloških parametara, simptoma bolesti i VAF-a mutacije JAK2 V617F u skupini bolesnika s MPN-om.

Varijabla 1	Varijabla 2	Statistička značajnost
omjer MT/NAO	Broj kopija mtDNA	n.s.
omjer MT/NAO	Ekspresija gena (<i>SIRT3</i> , <i>MT-ND1</i> , <i>SOD2</i> i <i>CAT</i>)	n.s.
omjer MT/NAO	VAF mutacije JAK2 V617F	n.s.
omjer MT/NAO	Hematološka analiza krvi	MCHC ($\rho = -0,252$, $p = 0,041$) Eozinofilni granulociti (%) ($\rho = -0,247$, $p = 0,045$)
omjer MT/NAO	Simptomi procijenjeni upitnikom MPN-SAF TSS	n.s.
Ekspresija gena <i>SIRT3</i> , <i>MT-ND1</i> , <i>SOD2</i> i <i>CAT</i>	Simptomi procijenjeni upitnikom MPN-SAF TSS	<i>SOD2</i> - Nelagoda u trbuhu ($\rho = -0,256$, $p = 0,046$)
Ekspresija gena <i>SIRT3</i> , <i>MT-ND1</i> , <i>SOD2</i> i <i>CAT</i>	Hematološka analiza krvi	n.s.
Ekspresija gena <i>SIRT3</i> , <i>MT-ND1</i> , <i>SOD2</i> i <i>CAT</i>	VAF mutacije JAK2 V617F	n.s.
Ekspresija gena <i>SIRT3</i> , <i>MT-ND1</i> , <i>SOD2</i> i <i>CAT</i>	Broj kopija mtDNA	n.s.
Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS	Hematološka analiza krvi	Zamor – RDW ($\rho = 0,260$, $p = 0,0398$) Nelagoda u trbuhu – MCV ($\rho = -0,300$, $p = 0,0151$) Neaktivnost – RDW ($\rho = 0,320$, $p = 0,0064$) Neaktivnost – Limfociti % ($\rho = -0,320$, $p = 0,0100$) Neaktivnost – Neutrofilni granulociti % ($\rho = 0,270$, $p = 0,0302$) Problemi s koncentracijom – MCV ($\rho = -0,300$, $p = 0,0152$) Problemi s koncentracijom – MCH ($\rho = -0,260$, $p = 0,0318$)

		<p>Svrbež (pruritus) – MCV ($\rho = 0,330$, $p = 0,0049$)</p> <p>Svrbež (pruritus) – MCH ($\rho = 0,330$, $p = 0,0050$)</p> <p>Vrućica ($>37,8$ °C) – Hematokrit ($\rho = -0,290$, $p = 0,0183$)</p> <p>Vrućica ($>37,8$ °C) – Eritrociti ($\rho = -0,280$, $p = 0,215$)</p> <p>Vrućica ($>37,8$ °C) – Hemoglobin ($\rho = -0,270$, $p = 0,0274$)</p> <p>Neželjeni gubitak težine – Monociti % ($\rho = -0,260$, $p = 0,0330$)</p> <p>Zbroj simptoma – Hematokrit ($\rho = -0,240$, $p = 0,0497$)</p> <p>Zbroj simptoma – MCH ($\rho = -0,300$, $p = 0,0134$)</p> <p>Zbroj simptoma – MCV ($\rho = -0,300$, $p = 0,0138$)</p> <p>Zbroj simptoma – Hemoglobin ($\rho = -0,290$, $p = 0,0184$)</p>
Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS	VAF mutacije JAK2 V617F	neaktivnosti - VAF mutacije JAK2 V617F ($\rho = 0,327$, $p = 0,007$)
Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS	Broj kopija mtDNA	n.s.
Hematološka analiza krvi	VAF mutacije JAK2 V617F	<p>RDW – VAF ($\rho = 0,587$, $p = 2,2 \times 10^{-7}$)</p> <p>Neutrofilni granulociti % – VAF ($\rho = 0,573$, $p = 5,0 \times 10^{-7}$)</p> <p>Limfociti % – VAF ($\rho = -0,653$, $p = 2,9 \times 10^{-9}$)</p> <p>MCHC – VAF ($\rho = -0,504$, $p = 1,6 \times 10^{-5}$)</p> <p>Neutrofili $\times 10^9/L$ – VAF ($\rho = 0,427$, $p = 3,5 \times 10^{-4}$)</p> <p>Bazofili $\times 10^9/L$ – VAF ($\rho = 0,365$, $p = 2,6 \times 10^{-3}$)</p> <p>Leukociti – VAF ($\rho = 0,314$, $p = 0,0103$)</p> <p>MCH – VAF ($\rho = -0,324$, $p = 0,0079$)</p> <p>Limfociti $\times 10^9/L$ – VAF ($\rho = -0,307$, $p = 0,0121$)</p> <p>Bazofili % – VAF ($\rho = 0,269$, $p = 0,0288$)</p>
Hematološka analiza krvi	Broj kopija mtDNA	<p>Leukociti – mtDNA ($\rho = -0,335$, $p = 0,0059$)</p> <p>Neutrofilni granulociti % – mtDNA ($\rho = -0,368$, $p = 0,00236$)</p> <p>Limfociti % – mtDNA ($\rho = 0,338$, $p = 0,00557$)</p> <p>Monociti % – mtDNA ($\rho = 0,254$, $p = 0,03938$)</p> <p>Eozinofili $\times 10^9/L$ – mtDNA ($\rho = -0,258$, $p = 0,03675$)</p> <p>Neutrofili $\times 10^9/L$ – mtDNA ($\rho = -0,337$, $p = 0,00572$)</p>
VAF mutacije JAK2 V617F	Broj kopija mtDNA	VAF - broja kopija mtDNA ($\rho = -0,324$; $p = 0,008$)

Prikazane su statistički značajne povezanosti ($p < 0,05$) i neznačajni rezultati (n.s.). Za djelomične odnose prikazane su vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije (ρ) i pripadajuće p-vrijednosti.

4.14.1. Analiza kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara

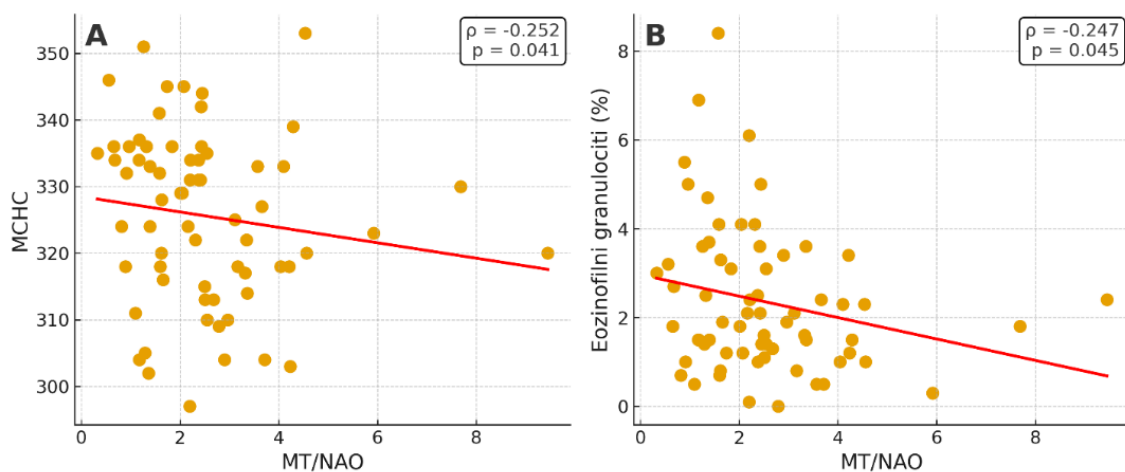
Za većinu hematoloških parametara nije utvrđena statistički značajna povezanost s omjerom MT/NAO, uključujući leukocite, eritrocite, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, RDW te većinu diferencijalnih leukocitnih populacija. Spearmanova korelacijska analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost omjera MT/NAO s brojem kopija mtDNA, ekspresijom analiziranih gena (*SIRT3*, *MT-ND1*, *SOD2* i *CAT*), vrijednostima VAF-a mutacije JAK2 V617F niti s kliničkim parametrima, uključujući pojedinačne simptome i ukupni zbroj

simptoma određen upitnikom MPN-SAF TSS (svi $p > 0,05$). Također, ekspresija analiziranih gena nije pokazala značajnu povezanost s hematološkim parametrima, vrijednostima VAF-a niti s brojem kopija mtDNA. Za većinu analiziranih gena (*SIRT3*, *MT-ND1* i *CAT*) nije utvrđena statistički značajna povezanost s pojedinačnim simptomima niti s ukupnim simptomatskim zbrojem. Analiza povezanosti VAF-a mutacije JAK2 V617F sa simptomima pokazala je da većina ispitivanih simptoma nije bila statistički značajno povezana. Nadalje, analiza povezanosti broja kopija mtDNA s kliničkim simptomima nije pokazala statistički značajne rezultate.

4.14.2. Statistički značajne korelacije kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara

4.14.2.1. Omjer MT/NAO u korelaciji s hematološkim parametrima krvne slike

U svrhu procjene povezanosti hematoloških parametara s pokazateljima mitohondrijske funkcije provedena je korelacijska analiza između laboratorijskih parametara i omjera MT/NAO. Utvrđene su dvije statistički značajne negativne korelacije: srednja koncentracija hemoglobina (MCHC) je pokazala negativnu povezanost s omjerom MT/NAO ($\rho = -0,252$, $p = 0,041$) (Slika 19A). Eozinofilni granulociti (%) također su pokazali slabu negativnu korelaciju s omjerom MT/NAO ($\rho = -0,247$, $p = 0,045$) (Slika 19B).

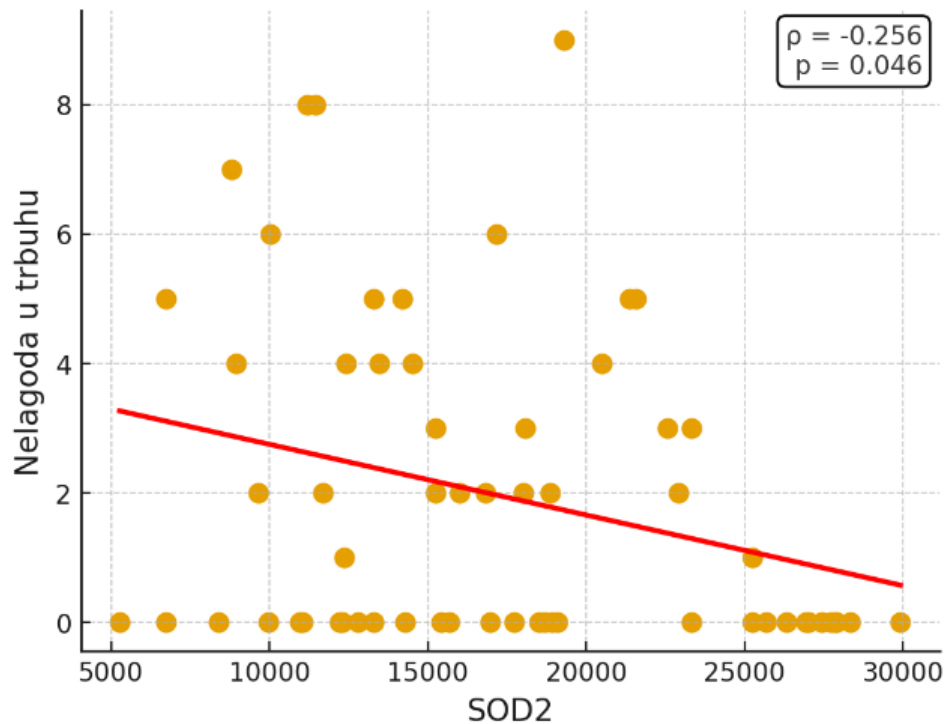


Slika 19. Korelacija omjera MT/NAO sa srednjom koncentracijom hemoglobina (MCHC) (A) i postotkom eozinofilnih granulocita (B). Crvena linija označava linearnu regresiju, a narančaste točke pojedinačne vrijednosti bolesnika.

4.14.2.2. Ekspresija gena *SIRT3*, *MT-ND1*, *CAT* i *SOD2* u korelaciji sa simptomima određenim upitnikom MPN-SAF TSS

Analizirana je povezanost ekspresije gena *SIRT3*, *MT-ND1*, *CAT* i *SOD2* s pojedinačnim simptomima procijenjenima upitnikom MPN-SAF TSS. Za gene *SIRT3*, *MT-ND1* i *CAT* nisu

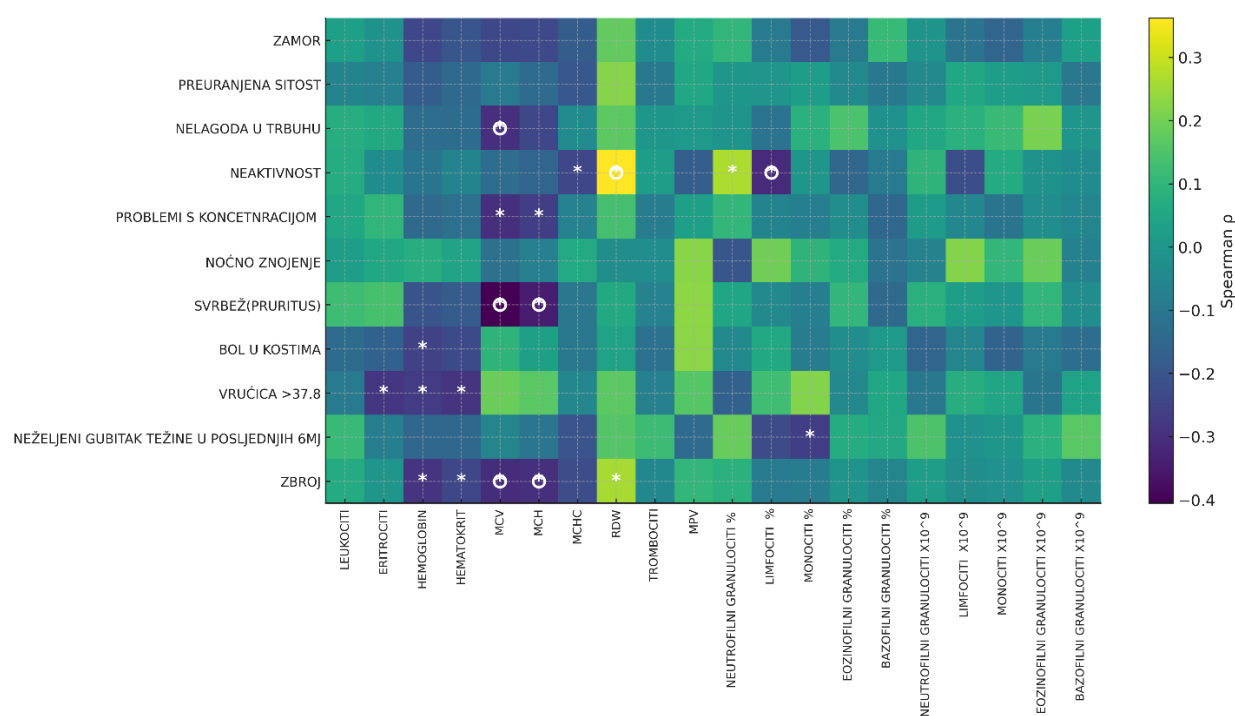
utvrđene statistički značajne korelacije s ispitivanim simptomima. Nasuprot tome, ekspresija gena *SOD2* pokazala je statistički značajnu, ali slabu negativnu korelaciju s intenzitetom nelagode u truhu ($\rho = -0,256$, $p = 0,046$) (Slika 20), pri čemu je viša ekspresija *SOD2* povezana s nižim intenzitetom simptoma. Unatoč postignutoj statističkoj značajnosti, raspršenost podataka ukazuje na ograničenu snagu ove povezanosti.



Slika 20. Korelacija između ekspresije *SOD2* i intenziteta simptoma nelagode u truhu kod bolesnika s MPN. Narančaste točke označavaju pojedinačne vrijednosti ispitanika, dok crvena linija predstavlja linearnu regresiju koja ilustrira smjer i trend odnosa.

4.14.2.3. Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s parametrima utvrđenim hematološkom analizom krvi

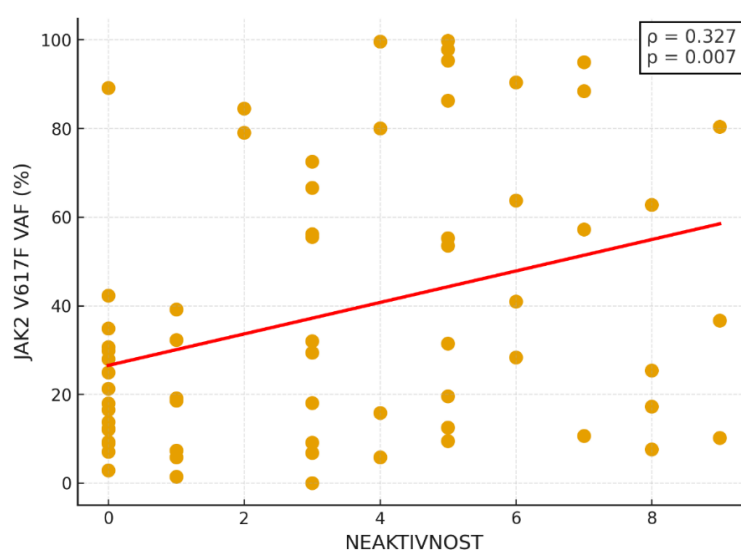
U svrhu procjene povezanosti hematoloških parametara s kliničkim simptomima provedena je korelacijska analiza između laboratorijskih nalaza i ukupnog zbroja simptoma te pojedinačnih simptoma bolesti. Najviše statistički značajnih korelacija između hematoloških parametara i kliničkih simptoma utvrđeno je za simptome neaktivnosti, svrbeža, nelagode u trbuhu, problema s koncentracijom i vrućice, kao i za ukupni zbroj simptoma. MCV je bio najčešće povezan parametar, pokazujući negativne korelacije s nelagodom u trbuhu ($\rho = -0,300$, $p = 0,0151$), problemima s koncentracijom ($\rho = -0,300$, $p = 0,0152$) te ukupnim zbrojem simptoma ($\rho = -0,300$, $p = 0,0138$). Dodatno, svrbež je bio pozitivno povezan s MCV i MCH, neaktivnost s RDW te negativno s udjelom limfocita, dok je vrućica bila negativno povezana s hematokritom, brojem eritrocita i hemoglobinom. Ukupni zbroj simptoma također je pokazao negativne korelacije s prosječnom količinom hemoglobina u eritrocitu (MCH) i hemoglobinom (Slika 21).



Slika 21. Toplinska karta Spearmanovih korelacija između simptoma određenih upitnikom MPN-SAF TSS i hematoloških parametara u bolesnika s MPN-om pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F (N = 66). Prikazani su koeficijenti korelacije (ρ); svjetlije nijanse označavaju pozitivne, a tamnije negativne korelacije. Statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) označene su zvjezdicom (*), dok su kružnicama označene umjerene i jače korelacije ($\rho \geq 0,30$ ili $\rho \leq -0,30$).

4.14.2.4. Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F

Radi procjene povezanosti mutacijskog opterećenja JAK2 V617F s kliničkim simptomima provedena je korelacijska analiza između vrijednosti VAF-a mutacije JAK2 V617F i pojedinačnih simptoma bolesti. Jedina značajna povezanost utvrđena je između simptoma neaktivnosti i VAF-a mutacije JAK2 V617F. Spearmanov koeficijent korelacije iznosio je $\rho = 0,327$, uz statističku značajnost $p = 0,007$, pri čemu veći mutacijski teret pokazuje tendenciju povezivanja s izraženijom vrijednosti simptoma neaktivnosti (Slika 22).

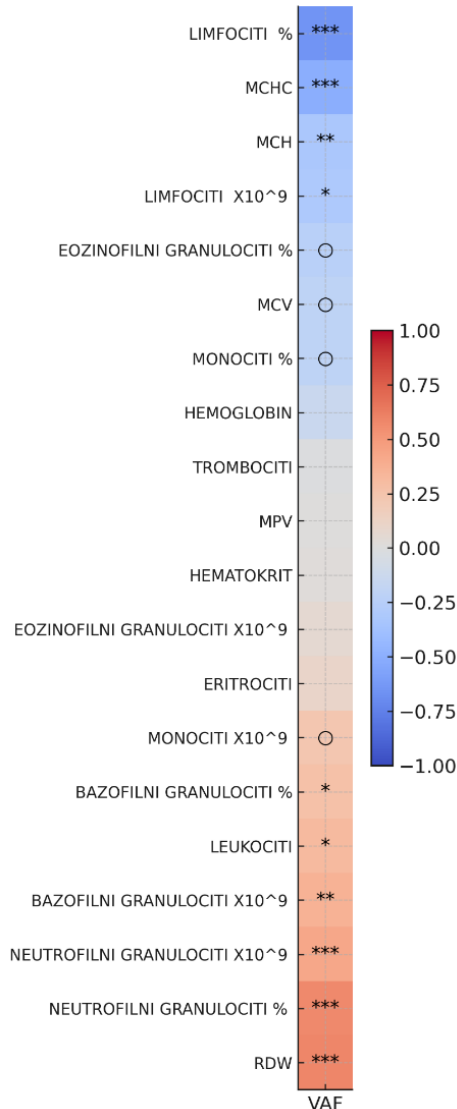


Slika 22. Korelacija između simptoma neaktivnosti određenog upitnikom MPN-SAF TSS i udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F (VAF). Crvena linija predstavlja regresijski pravac, a pojedinačni podatci prikazani su narančastim točkama.

4.14.2.5. Parametri utvrđeni hematološkom analizom krvi u korelaciji s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F

Zbog procjene povezanosti mutacijskog opterećenja JAK2 V617F s hematološkim parametrima provedena je korelacijska analiza između vrijednosti VAF-a mutacije JAK2 V617F i parametara krvne slike. Analiza povezanosti parametara utvrđenih hematološkom analizom krvi s VAF-om mutacije JAK2 V617F pokazala je više statistički značajnih korelacija. Utvrđena je snažna pozitivna korelacija između RDW i VAF-a ($\rho = 0,587$; $p = 2,2 \times 10^{-7}$) i između udjela neutrofilnih granulocita (%) ($\rho = 0,573$; $p = 5,0 \times 10^{-7}$). Pozitivna korelacija zabilježena je i za apsolutni broj neutrofila ($\rho = 0,427$; $p = 3,5 \times 10^{-4}$), bazofila ($X10^9/L$) ($\rho = 0,365$; $p = 0,0026$), ukupne leukocite ($\rho = 0,314$; $p = 0,0103$) te udio bazofila (%) ($\rho = 0,269$; $p = 0,0288$). Suprotno tome, značajne negativne korelacije uočene su za udio limfocita (%) ($\rho = -0,653$; $p = 2,9 \times 10^{-9}$) i apsolutni broj limfocita ($\rho = -0,307$; $p = 0,0121$). Također je utvrđena negativna korelacija između VAF-a i srednje koncentracije hemoglobina

(MCHC) ($\rho = -0,504$; $p = 1,6 \times 10^{-5}$) te prosječne količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) ($\rho = -0,324$; $p = 0,0079$) (Slika 23). Ostali parametri krvne slike nisu pokazali statistički značajne povezanosti s VAF-om mutacije JAK2 V617F.

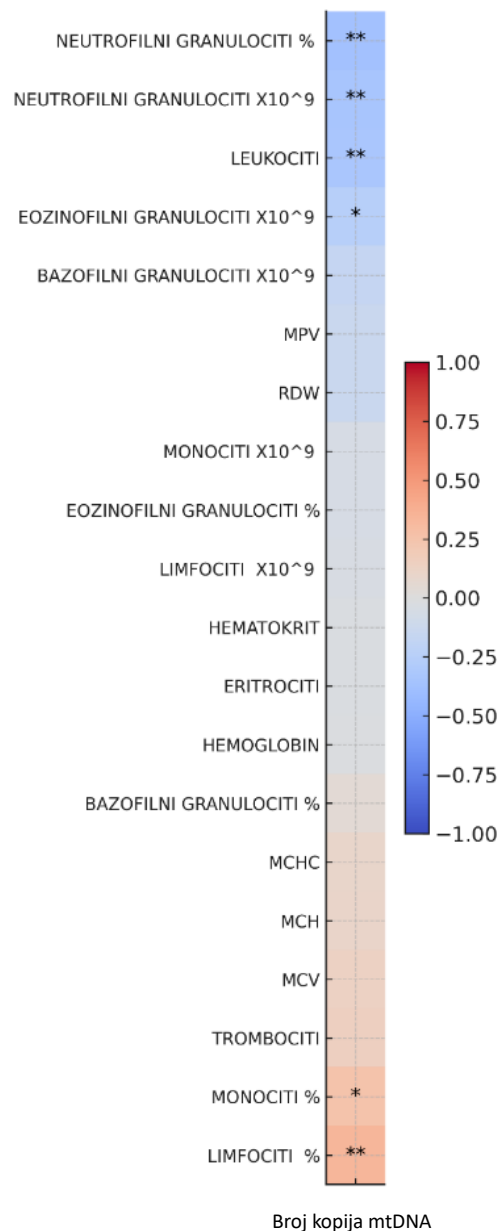


Slika 23. Toplinska mapa korelacija između vrijednosti krvnih parametara i udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F (VAF). Boja polja odražava smjer i jačinu korelacije (crveno = pozitivna, plavo = negativna). Statistički značajne korelacije označene su zvjezdicama prema razini značajnosti, dok je marginalna značajnost prikazana kružićem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ○ $0,05 \leq p < 0,10$ (granična povezanost).

4.14.2.6. Parametri utvrđeni hematološkom analizom krvi u korelaciji s brojem kopija mtDNA

Kako bi se ispitala povezanost broja kopija mtDNA s hematološkim parametrima, provedena je korelacijska analiza između broja kopija mtDNA i parametara krvne slike. Analiza povezanosti parametara utvrđenih hematološkom analizom krvi s brojem kopija mtDNA pokazala je nekoliko statistički značajnih korelacija. Utvrđene su negativne korelacije

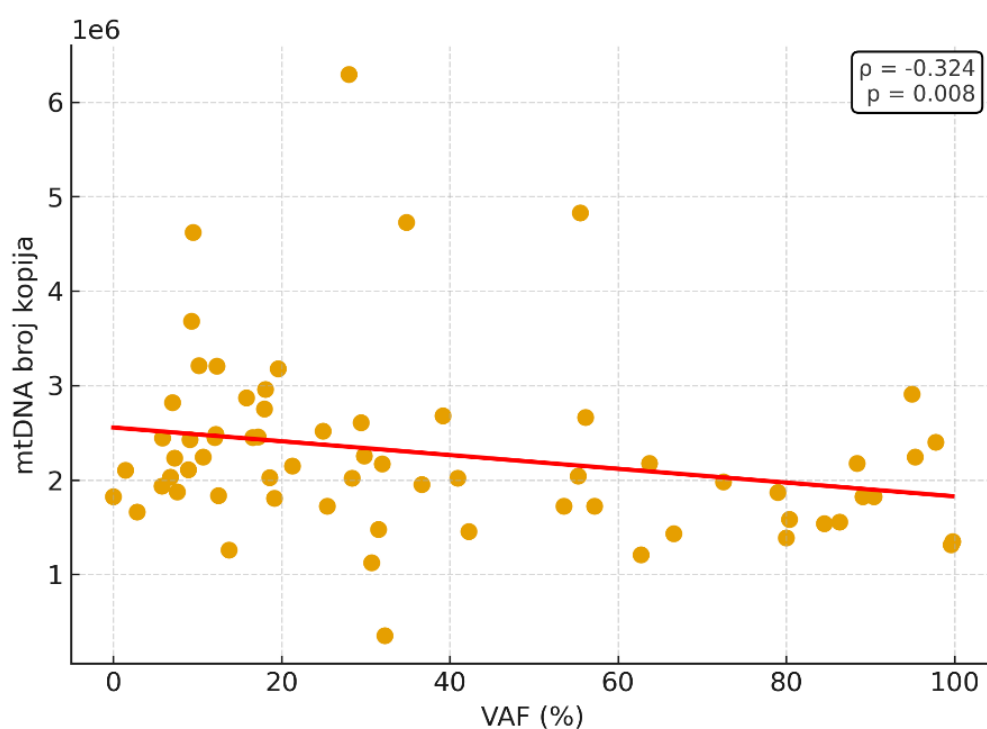
između broja kopija mtDNA i ukupnog broja leukocita ($\rho = -0,335$; $p = 0,0059$), udjela neutrofilnih granulocita ($\rho = -0,368$; $p = 0,0024$), apsolutnog broja neutrofila ($\rho = -0,337$; $p = 0,0057$) te apsolutnog broja eozinofilnih granulocita ($\rho = -0,258$; $p = 0,0368$). Pozitivne korelacije zabilježene su za udio limfocita ($\rho = 0,338$; $p = 0,0056$) i udio monocita ($\rho = 0,254$; $p = 0,0394$). Ostali parametri krvne slike nisu pokazali statistički značajnu povezanost s brojem kopija mtDNA ($p > 0,05$) (Slika 24).



Slika 24. Toplinska mapa korelacija između vrijednosti krvnih parametara i broja kopija mitohondrijske DNA. Boja polja odražava smjer i jačinu korelacije (crveno = pozitivna, plavo = negativna). Statistički značajni odnosi označeni su zvjezdicama prema razini značajnosti, dok su marginalne korelacije prikazane otvorenim kružićem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $\circ 0,05 \leq p < 0,10$ (granična povezanost).

4.14.2.7. Udio varijantnog alela mutacije JAK2 V617F u korelaciji s brojem kopija mtDNA

Spearmanovom korelacijskom analizom ispitana je povezanost između VAF-a mutacije JAK2 V617F i broja kopija mtDNA. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između navedenih varijabli ($\rho = -0,324$; $p = 0,008$) (Slika 25), pri čemu je viši VAF bio povezan s nižim brojem kopija mtDNA. Uočena korelacija ukazuje na umjerenu povezanost između analiziranih parametara, uz vidljivu raspršenost pojedinačnih vrijednosti, što odražava varijabilnost unutar ispitivane skupine.



Slika 25. Korelacija udjela varijantnog alela JAK2 V617F (VAF) i broja kopija mitohondrijske DNA u bolesnika s MPN-om pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F (N = 66). Linearna regresijska linija (crveno) sa Spearmanovim koeficijentom korelacije ($\rho = -0,324$, $p = 0,008$).

5. RASPRAVA

5.1. Hematološka analiza krvi

Hematološki nalazi bolesnika oboljelih od MPN-a (N = 66), analiziranih u ovoj studiji, uglavnom su bili u skladu s prethodno opisanim obilježjima MPN-a, uz određena odstupanja koja vjerojatno odražavaju heterogenost bolesničke populacije. Promjene u krvnoj slici u MPN-ovima ne očituju se ravnomjerno u svim parametrima, već su često specifične za pojedini podtip bolesti i stupanj klonalne proliferacije (126). Povišene vrijednosti RDW-a upućuju na izraženiju anizocitozu, što je u skladu s ranijim nalazima prema kojima poremećena eritropoeza i abnormalna proliferacija progenitornih stanica u MPN-u mogu rezultirati većom varijabilnošću veličine eritrocita, osobito u bolesnika s mijelofibrozo (127).

Zabilježene razlike u parametrima granulocita i trombocita također su u skladu s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da bolesnici s mutacijom JAK2 V617F iskazuju sklonost povećanoj granulopoezi i megakariopoezi, kao odrazu konstitutivne aktivacije signalnih puteva uključenih u proliferaciju i preživljenje mijeloidnih progenitora. Hermouet je opisao povezanost upalnih i proliferacijskih mehanizama s fenotipom MPN-a, dok su Vainchenker i Kralovics detaljno prikazali molekularnu patofiziologiju i učinak mutacije JAK2 V617F na proliferaciju mijeloidne loze (128,129).

Trombocitoza, osobito u ET-u i PV-u, predstavlja jedno od tipičnih hematoloških obilježja MPN-a te je povezana s dijagnostičkom vrijednošću i s povećanim rizikom tromboembolijskih komplikacija (126). Uočena neutrofilija dodatno podupire koncept kronične proliferativne i upalne aktivacije u MPN-u, dok snižene vrijednosti limfocita upućuju na pomak hematopoeze u korist mijeloidne proliferacije (130).

Kod bolesnika s PV-om utvrđen je značajno viši hematokrit u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu s patofiziologijom bolesti i važećim dijagnostičkim kriterijima, prema kojima je povišen hematokrit jedan od glavnih kriterija za dijagnozu PV-a (3,131). Nasuprot tome, izostanak statistički značajnih razlika u ukupnom broju leukocita, eritrocita, osnovnim eritrocitnim indeksima (MCV, MCH) te pojedinim drugim parametrima, poput monocita, bazofila i MPV-a, upućuje na to da se hematološke promjene u MPN-u prvenstveno očituju u određenim krvnim lozama, dok druge mogu ostati relativno očuvane, ovisno o podtipu bolesti i klonalnoj dinamici (8,126).

5.2. Klinički simptomi bolesnika s MPN-om

Nalazi dobiveni analizom bolesnika uključenih u ovo istraživanje u skladu su s dosadašnjim spoznajama o kliničkoj prezentaciji MPN-a, pri čemu većina bolesnika iskazuje više istodobnih simptoma, neovisno o podtipu bolesti. Zamor se ističe kao najčešći i najizraženiji simptom, što je u skladu s prethodnim istraživanjima koja ga povezuju s kroničnom upalnom aktivacijom, poremećajem energetske homeostaze i citokinskom disregulacijom (132–134). Uz zamor, česti simptomi poput neaktivnosti, poteškoća s koncentracijom i bolovima u kostima odražavaju sustavne učinke kronične upalne signalizacije i klonalne mijeloidne proliferacije, koji se smatraju ključnim patobiološkim obilježjima MPN-a (128).

Pruritus i noćno znojenje dodatno se povezuju s citokinskim disbalansom, aktivacijom mastocita i pojačanom signalizacijom JAK-STAT, osobito u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F, te značajno utječu na kvalitetu života (126). S druge strane, simptomi koji se češće povezuju s uznapredovalim stadijem bolesti, poput vrućice, gubitka tjelesne mase i abdominalne nelagode, u ovoj su kohorti bili rjeđe zastupljeni. Ovakav nalaz može odražavati heterogenost ispitivane populacije, ali i činjenicu da intenzitet simptoma ne korelira nužno s morfološkim stadijem bolesti, već je u većoj mjeri određen upalnim i citokinskim profilom bolesnika (135).

Rezultati upitnika za procjenu simptoma mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN-SAF TSS) pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike u intenzitetu simptoma između bolesnika s MF, ET i PV. Dobiveni rezultati podupiru nalaze prema kojima se simptomatsko opterećenje među podtipovima MPN-a često preklapa (136).

5.3. Detekcija i kvantifikacija mutacije JAK2 V617F

Kod svih bolesnika s MPN-om uključenih u molekularnu analizu potvrđena je prisutnost mutacije JAK2 V617F, što predstavlja očekivan nalaz budući da je riječ o najčešćem molekularnom obilježju klasičnih MPN-ova. Mutacija je prisutna u većini bolesnika s PV-om te u značajnom dijelu bolesnika s ET-om i MF-om, što je čini važnim dijagnostičkim markerom (4,43).

U zdravih ispitanika mutacija JAK2 V617F nije detektirana, što je u skladu s njezinom visokom specifičnošću za klonalne MPN-ove (137). U većini bolesnika bila je prisutna kao jedina patogena varijanta. Ipak, identifikacija dodatne varijante kalretikulina s pomakom okvira čitanja (p.L367fs*46) u jedne bolesnice predstavlja rijetku, ali biološki značajnu

iznimku. Iako su mutacije *JAK2* i *CALR* u pravilu međusobno ekskluzivne, njihova istodobna prisutnost opisana je u malom postotku bolesnika te se tumači kao odraz subklonalne heterogenosti i evolucije klonalne arhitekture (56,57). Ovaj nalaz dodatno naglašava prednost pristupa NGS u detekciji rijetkih komutacija s vrijednim dijagnostičkim i prognostičkim značenjem.

Analiza udjela varijantnog alela pokazala je obrasce u skladu s poznatim biološkim razlikama među podtipovima MPN, pri čemu bolesnici s ET-om imaju niže, a bolesnici s PV-om i MF-om više vrijednosti VAF, što odražava stupanj klonalne dominacije mutiranih progenitora (130). Unatoč uočenim brojčanim razlikama u ovoj studiji, statistička značajnost nije postignuta zbog preklapanja vrijednosti VAF među podtipovima uslijed heterogene skupine ispitanika.

Visoka podudarnost između vrijednosti VAF-a dobivenih metodama qPCR i NGS potvrđuje pouzdanost obje tehnike u kvantifikaciji mutacije *JAK2* V617F. Ranija istraživanja pokazala su gotovo savršenu korelaciju između rezultata dobivenih metodama qPCR-a i ddPCR-a te visoku podudarnost između ddPCR-a i NGS-a (130–132). Kombinacija qPCR-a, kao osjetljive metode detekcije, i NGS-a, koji omogućuje širu molekularnu karakterizaciju, predstavlja optimalan pristup u analizi MPN-ova.

5.4. Analiza mitohondrijskih parametara protočnom citometrijom

Mitohondrijske promjene procijenjene mjerenjem intenziteta fluorescencije specifičnih boja pokazale su statistički značajne razlike u intenzitetu signala MFI boja MT, NAO i njihovog omjera između bolesnika pozitivnih na mutaciju *JAK2* V617F i zdravih ispitanika. Dobiveni rezultati upućuju na prisutnost mitohondrijskih promjena povezanih s MPN-om. Mitohondriji, kao ključni regulatori staničnog metabolizma, oksidativnog stresa i apoptoze, često su funkcionalno narušeni u hematološkim malignitetima, uključujući MPN (138,139).

Značajno niži MFI MT kod *JAK2* V617F pozitivnih bolesnika upućuje na smanjen membranski potencijal i narušenu funkciju mitohondrija. Ovaj nalaz može se povezati s promjenama u staničnom metabolizmu uzrokovanim kroničnom aktivacijom signalizacije *JAK-STAT* i posljedičnim energetske reprogramiranjem (140). Suprotno tome, viši signal MFI NAO upućuje na promjene u sastavu ili organizaciji unutarnje mitohondrijske membrane. Budući da se NAO selektivno veže za kardiolipin, povećani signal sugerira promjene količine ili dostupnosti ovog fosfolipida, što može odražavati mitohondrijski stres ili remodeliranje membrane (141). Sniženi omjer MT/NAO ukazuje na neravnotežu između mitohondrijske

funkcionalnosti i mase, što može odražavati akumulaciju disfunkcionalnih mitohondrija ili neadekvatnu kompenzacijsku biogenezu. Takav obrazac narušene mitohondrijske homeostaze karakterističan je za stanja obilježena kroničnom upalom i poremećajem metaboličke regulacije (142). U kontekstu MPN-a, ovi nalazi podupiru koncept da mitohondrijska disfunkcija može imati aktivnu ulogu u patogenezi bolesti, uključujući povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta, genomsku nestabilnost i metaboličke promjene u stanicama (143). Mitohondrijska disfunkcija i narušena antioksidativna obrana ne moraju biti samo posljedica mutacije JAK2 V617F, već mogu imati aktivnu ulogu u patogenezi i progresiji MPN-a.

5.5. Genska ekspresija mitohondrijskih i antioksidativnih gena

Analiza ekspresije gena u uzorcima granulocita bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F pokazala je značajno sniženu ekspresiju gena *SIRT3*, *MT-ND1*, *SOD2* i *CAT* u odnosu na zdrave ispitanike, što upućuje na narušenu mitohondrijsku i antioksidativnu regulaciju u MPN-u. *SIRT3*, kao ključna mitohondrijska deacetilaza uključena u regulaciju oksidativne fosforilacije i redoks homeostaze, pri smanjenoj ekspresiji povezuje se s porastom reaktivnih kisikovih vrsta i smanjenom funkcionalnošću mitohondrijskih enzima (144). Kod stanica s mutacijom JAK2 V617F kronični oksidativni stres mogao bi dovesti do stvaranja metabolički kompromitiranog staničnog okruženja (145). Smanjena ekspresija *MT-ND1* sugerira poremećaj funkcije kompleksa I respiratornog lanca i smanjen kapacitet OXPHOS, što može rezultirati nižom proizvodnjom ATP-a i povećanim curenjem elektrona iz kompleksa I respiratornog lanca, koji prerano reagiraju s kisikom, pri čemu nastaju RKV, osobito superoksid (54,65,146). Istodobno, snižena ekspresija antioksidativnih enzima *SOD2* i *CAT* ukazuje na oslabljenu sposobnost neutralizacije RKV, čime se dodatno pojačava oksidativno opterećenje stanica (138,147,148). Ovakav obrazac smanjene mitohondrijske funkcije i antioksidativne obrane u skladu je s ranijim istraživanjima koja opisuju pojačanu upalnu i metaboličku aktivaciju u JAK2 V617F pozitivnim granulocitima. Haage i sur. pokazali su da neutrofilni s mutacijom JAK2 V617F iskazuju izraženiji upalni i metabolički fenotip, uz pojačanu ekspresiju gena povezanih s odgovorom na IL-1 i promjene u bioenergetskom profilu stanica (148). Zajedno, ovi rezultati upućuju na to da kombinacija poremećaja respiratornog lanca i antioksidativnih mehanizama može stvarati mikrookruženje pogodno za kronični stanični stres, genetsku nestabilnost i klonalnu ekspanziju, što doprinosi progresiji MPN-a (145).

5.6. Broj kopija mtDNA kod bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F

Analiza broja kopija mtDNA kod bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F, u usporedbi s uzorcima zdravih osoba, pokazala je da nema kvantitativnih promjena mitohondrijskog genoma. Kim i suradnici utvrdili su povezanost povećanog broja kopija mtDNA s rizikom razvoja kronične limfocitne leukemije i limfoma malih limfocita, dok su slični nalazi opisani i u pedijatrijskim akutnim leukemijama, gdje je povećan broj kopija mtDNA bio povezan s lošijim kliničkim ishodom i preživljenjem bolesnika (149–152). Iako su u nekim hematološkim malignitetima opisane promjene u broju kopija mtDNA kao odraz mitohondrijskog stresa ili kompenzacijskih mehanizama, rezultati ovog istraživanja sugeriraju da se u JAK2-pozitivnim MPN-ovima mitohondrijska disfunkcija prvenstveno očituje kroz funkcionalne i kvalitativne promjene, uključujući poremećaj membranskog potencijala i oksidativnog statusa.

Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u broju kopija mtDNA između skupina, unutar skupine bolesnika zabilježena je veća raspršenost rezultata, što može odražavati heterogenost mitohondrijskog odgovora među klonalnim populacijama. Takva varijabilnost može biti posljedica razlika u metaboličkim zahtjevima stanica, razini oksidativnog stresa ili dinamici mitofagije, što je već opisano u kontekstu klonalne hematopoeze (153). Uzimajući u obzir i prethodno uočene promjene u mitohondrijskoj funkciji i genskoj ekspresiji u istoj kohorti, ovi nalazi upućuju na to da je mitohondrijska disfunkcija u MPN-u primarno povezana s poremećajem funkcije respiratornog lanca i antioksidativne regulacije, a ne s promjenama u broju kopija mtDNA. Sličan obrazac opisan je i u drugim malignim bolestima, gdje mitohondrijska disfunkcija može biti prisutna unatoč odsutnosti značajnih kvantitativnih promjena mtDNA. Vyas i suradnici navode da metaboličko preusmjeravanje tumorskih stanica često uključuje promjene oksidativne fosforilacije, redoks-ravnoteže i staničnog odgovora na stres, bez nužnih promjena količine mitohondrija ili mtDNA (154).

5.7. Mitohondrijske haplogrupe, heteroplazmije i homoplazmije

Raspodjela mitohondrijskih makrohaplogrupa u bolesnika s MPN-om pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F nije se značajno razlikovala u odnosu na zdrave ispitanike ni opću populaciju, što upućuje na to da osobe s pojedinim haplogrupama nemaju veću sklonost nastanku ili razvoju MPN-a. Dominacija haplogrupe H, uz značajnu zastupljenost haplogrupa U i K, u skladu je s poznatom distribucijom mitohondrijskih haplogrupa u europskim

populacijama, gdje haplogrupa H čini najveći udio, dok su U i K također među najčešćima. Važno je naglasiti da su rjeđe haplogrupe, poput V, W ili X, u pravilu nisko zastupljene u općoj populaciji, pa njihova prisutnost ili izostanak u pojedinim skupinama najvjerojatnije odražava slučajnu raspodjelu u okviru ograničenog uzorka, a ne biološki relevantan obrazac (155,156). Veći broj heteroplazmija i homoplazmija te trend višeg mutacijskog opterećenja po ispitaniku u skupini bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F u skladu je s konceptom povećanog mitohondrijskog stresa i genomske nestabilnosti u MPN-u. Povećanje broja mtDNA promjena može nastati kao posljedica kroničnog oksidativnog stresa. Istodobno, izostanak razlika u broju varijanti po ispitaniku upućuje na heterogenost klonalnih populacija, pri čemu homoplazmijske varijante mogu predstavljati stabilne promjene nastale tijekom klonalne ekspanzije (145,157).

U uzorcima bolesnika s MPN-om i zdravih ispitanika dominirale su sinonimne varijante, što predstavlja očekivan nalaz s obzirom na to da većina varijanti mtDNA nema izravan funkcionalni učinak. Veći broj nesinonimnih varijanti u bolesnika može upućivati na potencijalno funkcionalno relevantne promjene u mitohondrijskim proteinima, osobito onima uključenima u oksidativnu fosforilaciju. Nesinonimne varijante u genima respiratornog lanca mogu utjecati na učinkovitost prijenosa elektrona i povećati stvaranje RKV zbog pojačanog curenja elektrona iz respiratornog lanca. Stewart i Chinnery navode da se heteroplazmijske varijante mtDNA mogu akumulirati i širiti unutar klonalnih staničnih populacija, pri čemu pojedine varijante mogu doseći visoke razine heteroplazmije i pridonijeti funkcionalnim promjenama stanica tijekom razvoja bolesti. Murphy navodi da poremećaji funkcije kompleksa I, osobito u uvjetima povećanog protonskog gradijenta i visokog omjera NADH/NAD⁺, pogoduju stvaranju superoksida i drugih reaktivnih kisikovih vrsta unutar mitohondrija (12,158). Dominacija tranzicija nad transverzijama posljedica je endogenih mutacijskih procesa u mitohondrijskoj DNA, ponajprije deaminacije baza i pogrešaka tijekom replikacije, te predstavlja karakterističan mutacijski potpis koji odražava fiziološke i patofiziološke procese u mitohondrijskom genomu (12). Raspodjela heteroplazmija duž mitohondrijskog genoma, s dominacijom u protein-kodirajućim genima, osobito onima koji kodiraju podjedinice kompleksa I, III, IV i V, ukazuje na to da su ključne komponente respiratornog lanca posebno podložne akumulaciji varijanti. Kompleks I prepoznat je kao jedno od najosjetljivijih mjesta mitohondrijske disfunkcije u različitim bolestima (66). Mala zastupljenost varijanti RNA regije u skladu je s njezinom visokom konzerviranošću i ključnom ulogom u translaciji mitohondrijskih proteina (154).

Ovi rezultati podupiru sve veći broj dokaza o ulozi mitohondrija u patobiologiji mijeloproliferativnih neoplazmi.

5.8. Klinička i potencijalna prediktivna vrijednost mitohondrijskih varijanti u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F

Rezultati ovog istraživanja upućuju na potencijalnu ulogu mitohondrijskog genoma u patogenezi bolesti, osobito kroz utjecaj na mitohondrijsku funkciju i oksidativni stres u bolesnika s mutacijom JAK2 V617F. Uočene su kvalitativne razlike u spektru varijanti mtDNA između bolesnika i zdravih ispitanika, no analiza raspodjele mitohondrijskih makrohlaplogrupa nije pokazala statistički značajne razlike. Uočeni trendovi upućuju na to da mitohondrijska genetska pozadina može modulirati fenotipsku ekspresiju bolesti, ali vjerojatno nije njezin primarni pokretač (159).

Ključni nalaz predstavlja identifikacija patogenih i vjerojatno patogenih varijanti mtDNA isključivo u skupini bolesnika. Ovakav obrazac sugerira da mitohondrijske promjene mogu odražavati selekcijske procese unutar klonalne hematopoeze. Budući da su detektirane varijante smještene u genima koji kodiraju komponente respiratornog lanca, moguće je da doprinose promjenama u staničnom metabolizmu i energetsom statusu stanica, što je jedno od ključnih obilježja tumorske biologije (160).

Dodatno, identificirane varijante zahvaćaju gene uključene u različite funkcionalne razine mitohondrijske biologije, uključujući mitohondrijske gene rRNA (*MT-RNR1*, *MT-RNR2*) i tRNA (npr. *MT-TM*, *MT-TW*, *MT-TK*). Ovakva raspodjela varijanti upućuje na to da nije riječ o izoliranom poremećaju pojedinog dijela mitohondrijske funkcije, već o potencijalno globalnom učinku na mitohondrijsku homeostazu. Posebno je značajna prisutnost patogenih varijanti u genima tRNA, koje mogu imati širok učinak na sintezu mitohondrijskih proteina, te varijanti u genima kompleksa I i ATP sintaze, koje su povezane s promjenama u energetsom metabolizmu stanice.

Prisutnost heteroplazmijskih i homoplazmijskih varijanti dodatno ukazuje na dinamičnu prirodu mitohondrijskog genoma. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike u njihovoj distribuciji između skupina, trend povećanog broja potencijalno patogenih varijanti u bolesnika može upućivati na akumulaciju mitohondrijskih oštećenja tijekom bolesti (12).

Identifikacija patogenih varijanti u podskupini bolesnika otvara pitanje njihove kliničke relevantnosti. Iako veličina uzorka ne omogućuje pouzdanu procjenu povezanosti s kliničkim ishodima, ovi nalazi su u skladu s recentnim studijama koje pokazuju da određene mutacije mtDNA mogu imati prediktivnu vrijednost u malignim bolestima (161). U tom kontekstu, prisutnost takvih varijanti može predstavljati potencijalni rani marker nepovoljnog ishoda, što zahtijeva daljnju validaciju. Sveukupno, ovi rezultati sugeriraju da mitohondrijski genom može

imati ulogu u biološkoj heterogenosti MPN-a te potencijal u molekularnoj stratifikaciji bolesnika. Međutim, relativno mali broj ispitanika i nedostatak longitudinalnih podataka ograničavaju interpretaciju dobivenih nalaza, zbog čega su potrebna daljnja istraživanja na većim kohortama kako bi se razjasnila klinička i prognostička vrijednost mitohondrijskih varijanti.

5.9. Analiza povezanosti kliničkih, hematoloških i molekularnih parametara

5.9.1. Analiza kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara

Unatoč pronađenim statistički značajnim povezanostima, dio analiziranih varijabli nije pokazao korelaciju. Izostanak povezanosti između omjera MT/NAO, kao pokazatelja funkcije mitohondrija, te broja kopija mtDNA, ekspresije mitohondrijskih i antioksidativnih gena te VAF-a mutacije JAK2 V617F upućuje na to da funkcionalni status mitohondrija nije izravno određen pojedinačnim molekularnim parametrima. Ovaj nalaz u skladu je s literaturom koja pokazuje da odnos između mtDNA, genske ekspresije i funkcionalnih pokazatelja mitohondrija nije linearan, već je pod utjecajem složenih regulatornih mehanizama i stanične mikrookoline (88,162–164).

Također, izostanak značajnih korelacija između mitohondrijskih varijabli i simptoma MPN-SAF TSS upućuje na to da subjektivno simptomatsko opterećenje u MPN-ovima ne odražava pojedinačne biološke parametre, već predstavlja rezultat složene interakcije upalnih, metaboličkih i neuroimunoloških procesa (127, 160). Sveukupno, ovi nalazi naglašavaju da se mitohondrijska disfunkcija u MPN-u ne može tumačiti izolirano, već zahtijeva integrirani pristup koji uključuje međudjelovanje genetskih, metaboličkih i kliničkih čimbenika.

5.9.2. Statistički značajne korelacije kliničkih, hematoloških, molekularnih i mitohondrijskih parametara

5.9.2.1. Omjer MT/NAO u korelaciji s hematološkim parametrima krvne slike

U skupini od 66 bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F provedena je analiza povezanosti omjera MT/NAO, kao pokazatelja funkcije mitohondrija, s hematološkim parametrima. Utvrđeno je da za većinu analiziranih parametara nije bilo statistički značajne povezanosti. Takav nalaz upućuje na to da se mitohondrijske promjene u MPN-u mogu odvijati neovisno o standardnim hematološkim vrijednostima te odražavati intracelularne procese koji

nisu nužno vidljivi na razini periferne krvne slike, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (165,166). Negativne korelacije omjera MT/NAO sa srednjom koncentracijom hemoglobina (MCHC) i udjelom eozinofilnih granulocita, iako slabog intenziteta, mogu upućivati na povezanost smanjene funkcije mitohondrija granulocita s promjenama u hematopoetskoj dinamici i imunoregulacijskim procesima. Dobiveni rezultati sugeriraju da mitohondrijska aktivnost može biti povezana sa suptilnim promjenama u pojedinim hematološkim populacijama, osobito u kontekstu kronične upalne aktivacije karakteristične za MPN (167). Iako zahtijevaju daljnju validaciju, ovi nalazi upućuju na mogućnost da pojedini hematološki parametri odražavaju fine aspekte mitohondrijske disfunkcije unutar klonalno proširenih mijeloidnih populacija.

5.9.2.2. Ekspresija gena SIRT3, MT-ND1, CAT i SOD2 u korelaciji sa simptomima određenim upitnikom MPN-SAF TSS

U skupini bolesnika pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F analizirana je povezanost ekspresije mitohondrijskih i antioksidativnih gena (*SIRT3*, *MT-ND1*, *SOD2* i *CAT*) s intenzitetom simptoma procijenjenih upitnikom MPN-SAF TSS. Za većinu analiziranih gena (*SIRT3*, *MT-ND1* i *CAT*) nije utvrđena statistički značajna povezanost s pojedinačnim simptomima ni ukupnim simptomatskim opterećenjem. Ovakav nalaz upućuje na to da promjene ekspresije analiziranih gena vjerojatno nisu izravno povezane s intenzitetom kliničke simptomatologije u MPN-u (134). Značajna negativna korelacija između ekspresije *SOD2* i vrijednosti simptoma abdominalne nelagode sugerira povezanost kompromitiranog mitohondrijskog antioksidativnog kapaciteta s izraženijim gastrointestinalnim simptomima. Snižena ekspresija *SOD2* povezana je s povećanom produkcijom reaktivnih kisikovih vrsta i pojačanom upalnom aktivacijom, što može utjecati na visceralnu osjetljivost i upalne procese u gastrointestinalnom sustavu (168,169). Iako vrijednosti simptoma abdominalne nelagode u MPN-u imaju multifaktorijalnu etiologiju, uključujući splenomegaliju, hemodinamske i upalne promjene (136,170,171), ovi nalazi upućuju na moguću ulogu mitohondrijske i antioksidativne regulacije u modulaciji intenziteta simptoma. Dobiveni rezultati zahtijevaju daljnju validaciju, ali sugeriraju potencijalnu povezanost oksidativnog stresa i simptomskog profila MPN-a.

5.9.2.3. Simptomi određeni upitnikom MPN-SAF TSS u korelaciji s parametrima hematološke analize krvi

Simptomatsko opterećenje u MPN-u često nije u potpunosti objašnjeno konvencionalnim laboratorijskim pokazateljima, što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja (172). U našoj kohorti najveći broj statistički značajnih korelacija zabilježen je za vrijednosti

simptoma neaktivnosti, svrbeža, abdominalne nelagode, poteškoća s koncentracijom i vrućice, kao i za ukupno simptomatsko opterećenje određeno upitnikom MPN-SAF TSS.

Od hematoloških parametara, vrijednosti srednjeg volumena eritrocita (MCV-a) bile su najčešće povezane s intenzitetom simptoma, pri čemu su niže vrijednosti MCV-a bile povezane s višim simptomatskim opterećenjem. Negativne korelacije zabilježene su između intenziteta MCV-a i abdominalne nelagode, poteškoća s koncentracijom te ukupnog simptomatskog opterećenja određenog upitnikom MPN-SAF TSS. Ovaj nalaz može upućivati na povezanost poremećaja eritropoeze, uključujući moguće promjene u metabolizmu željeza, s intenzitetom simptoma, što je u skladu s ranijim opažanjima o povezanosti anemije i težine simptomatologije u MPN-u (173). Slično tome, povezanost vrijednosti srednje količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) i hemoglobina s ukupnim simptomatskim opterećenjem dodatno podupire moguću ulogu eritroidne funkcije u modulaciji subjektivnog doživljaja bolesti.

Povišene vrijednosti raspodjele volumena eritrocita (RDW) i smanjeni udio limfocita, povezani s intenzitetom neaktivnosti, mogu odražavati kroničnu upalnu aktivaciju i hematopoetsku disregulaciju. RDW se sve češće prepoznaje kao nespecifičan marker upale i metaboličkog stresa, dok smanjenje udjela limfocita dodatno upućuje na imunološki disbalans karakterističan za MPN (172,174). Intenzitet simptoma vrućice bio je u negativnoj korelaciji s vrijednostima hemoglobina, hematokrita i broja eritrocita, što je u skladu s konceptom anemije kronične bolesti u okviru kronične upalne aktivacije, pri čemu niže vrijednosti eritroidnih parametara mogu biti povezane s izraženijim konstitucijskim simptomima (172).

Važno je naglasiti da su sve utvrđene korelacije bile slabog do umjerenog intenziteta, što potvrđuje da hematološki parametri ne mogu u potpunosti objasniti simptomatsko opterećenje u MPN-u. Ovi nalazi podupiru potrebu za integriranim pristupom procjeni bolesnika, pri čemu kombinacija laboratorijskih pokazatelja i strukturiranih alata za procjenu simptoma pruža potpuniju sliku bolesti (175).

5.9.2.4. Povezanost intenziteta simptoma MPN-a s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F

Većina analiziranih simptoma nije pokazala statistički značajnu korelaciju s udjelom varijantnog alela mutacije JAK2 V617F, dok je jedina značajna povezanost utvrđena za intenzitet simptoma neaktivnosti. Ovakav nalaz upućuje na to da intenzitet simptoma u MPN-u nije izravno određen veličinom klonalnog opterećenja. Utvrđena povezanost intenziteta simptoma neaktivnosti s višim VAF-om može se tumačiti u kontekstu izraženije klonalne

proliferacije i kronične upalne aktivacije. Viši alelni teret povezan je s pojačanom mijeloproliferacijom i povećanim citokinskim opterećenjem, što može pridonijeti izraženijem intenzitetu umora i smanjenoj vrijednosti funkcionalne sposobnosti (176,177). Budući da vrijednosti simptoma neaktivnosti odražavaju smanjenu razinu fizičke aktivnosti i funkcionalnog statusa, ovi nalazi sugeriraju da VAF, osim dijagnostičke i prognostičke vrijednosti, može imati i određenu kliničku relevantnost u interpretaciji pojedinih aspekata simptomskog profila MPN-a (178).

5.9.2.5. Korelacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F s hematološkim parametrima krvne slike

U ovom istraživanju utvrđeno je više statistički značajnih povezanosti između VAF-a mutacije JAK2 V617F i hematoloških parametara, što je u skladu s ulogom alelnog opterećenja kao pokazatelja klonalne proliferacije u MPN-u (179).

Snažna pozitivna korelacija između RDW-a i VAF-a upućuje na to da veće klonalno opterećenje prati izraženija anizocitoza i poremećena eritropoeza, što može odražavati biološki aktivniji oblik bolesti (180). Pozitivne korelacije VAF-a s udjelom i apsolutnim brojem neutrofila te ukupnim brojem leukocita potvrđuju povezanost s izraženijom mijeloidnom proliferacijom, dok pozitivna povezanost s bazofilima dodatno upućuje na širu aktivaciju mijeloidne loze (181,182). S druge strane, negativne korelacije VAF-a s udjelom i apsolutnim brojem limfocita sugeriraju pomak hematopoetske ravnoteže prema mijeloidnoj proliferaciji, uz istodobni imunološki disbalans i kroničnu upalnu aktivaciju (183). Negativne korelacije između VAF-a i eritrocitnih indeksa (MCHC, MCH) ukazuju na složene promjene u eritropoezi povezane s klonalnim opterećenjem, koje mogu biti pod utjecajem metaboličkih poremećaja, terapijskih intervencija i upalnih mehanizama (50). Ovi nalazi sugeriraju da rutinski hematološki parametri mogu pružiti dodatne informacije o biološkom opterećenju bolesti i odražavati dinamiku klonalne proliferacije u MPN-u.

5.9.2.6. Korelacija hematoloških parametara i broja kopija mtDNA

Utvrđene statistički značajne povezanosti između broja kopija mtDNA i hematoloških parametara upućuju na to da mitohondrijski status krvnih stanica odražava obrasce mijeloidne i limfoidne distribucije te upalne aktivnosti u bolesnika s MPN-om (88,184,185). Negativne korelacije broja kopija mtDNA s ukupnim brojem leukocita, udjelom i apsolutnim brojem neutrofila u skladu su s nalazima prema kojima povišena neutrofilija i upalna aktivacija dovode do smanjene mitohondrijske biogeneze i povećanog mitohondrijskog stresa. Aktivirani neutrofili mogu pridonijeti oštećenju i smanjenju količine mtDNA zbog povećane produkcije

reaktivnih kisikovih vrsta i pojačanih upalnih procesa (186–188). Suprotno tome, pozitivne korelacije između broja kopija mtDNA i udjela limfocita te monocita upućuju na njihovu veću ovisnost o mitohondrijskom metabolizmu i reguliranoj biogenezi (189–191). Slaba negativna korelacija s brojem eozinofila može dodatno odražavati promjene u mitohondrijskoj dinamici tijekom upalne aktivacije (192). Iako broj kopija mtDNA može biti pod utjecajem brojnih čimbenika (164,193) naši rezultati upućuju na to da mtDNA odražava obrasce aktivacije i distribucije perifernih leukocita te potencijalno predstavlja pokazatelj mitohondrijskog i upalnog statusa u MPN-u.

5.9.2.7. Korelacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F i broja kopija mtDNA

U ovom istraživanju utvrđena je statistički značajna, ali po intenzitetu slaba do umjerena negativna korelacija između VAF-a mutacije JAK2 V617F i broja kopija mtDNA, što upućuje na to da je veće klonalno opterećenje povezano s manjim brojem kopija mitohondrijskog genoma u granulocitima bolesnika. Ovakav nalaz u skladu je s dokazima da stanice pozitivne na mutaciju JAK2 V617F pokazuju promijenjen mitohondrijski metabolizam, povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i različite oblike mitohondrijske disfunkcije (194,195). Povećano oksidativno opterećenje, karakteristično za MPN, može dovesti do oštećenja mtDNA i smanjenja funkcionalnog broja kopija, čime se dodatno objašnjava uočeni odnos između VAF-a i mtDNA (196,197). Iako nije moguće sa sigurnošću odrediti uzročno-posljedičnu povezanost, ovi nalazi sugeriraju da negativna korelacija između VAF-a i broja kopija mtDNA odražava međudjelovanje klonalne ekspanzije i mitohondrijske disfunkcije. Na ovaj odnos mogu dodatno utjecati čimbenici poput dobi, komorbiditeta i terapije (198).

6. ZAKLJUČCI

1. Hematološka analiza krvi bolesnika kojima je dijagnosticiran MPN, od kojih 36 s policitemijom verom (PV), 21 s esencijalnom trombocitemijom (ET) i 9 s primarnom mijelofibrozom (MF), u usporedbi s 30 zdravih ispitanika pokazala je povećane vrijednosti trombocita, neutrofila i raspodjele volumena eritrocita (RDW) te smanjene vrijednosti srednje koncentracije hemoglobina (MCHC) i limfocita u skupini bolesnika.
2. Ispitanici s MPN-om imali su simptome zamora, neaktivnosti, poteškoća s koncentracijom i boli u kostima, a intenzitet simptoma neaktivnosti bio je izraženiji pri višem alelnom opterećenju mutacije JAK2 V617F.
3. Kod svih bolesnika s MPN-om utvrđena je prisutnost mutacije JAK2 V617F.
4. Kvantifikacija udjela varijantnog alela mutacije JAK2 V617F pokazala je povezanost višeg alelnog opterećenja s višim vrijednostima leukocita, neutrofila, bazofila i raspodjele volumena eritrocita (RDW) te nižim udjelom limfocita, što upućuje na pomak prema mijeloidnoj dominaciji.
5. Analiza mitohondrijskih parametara u granulocitima bolesnika s MPN-om, u usporedbi sa zdravim ispitanicima, pokazala je prisutnost smanjene funkcije mitohondrija, snižene ekspresije mitohondrijskih i antioksidativnih gena te povećanog mutacijskog opterećenja mtDNA u uzorcima pozitivnima na mutaciju JAK2 V617F, što upućuje na poremećenu mitohondrijsku regulaciju i oslabljen antioksidativni odgovor u MPN-u.
6. Kod uzoraka pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F broj kopija mtDNA nije bio promijenjen u odnosu na zdrave ispitanike.
7. Nije bilo razlika u raspodjeli mitohondrijskih haplogrupa između uzoraka pozitivnih na mutaciju JAK2 V617F i zdravih ispitanika. Veći broj mitohondrijskih varijanti u uzorcima pozitivnima na mutaciju JAK2 V617F u odnosu na zdrave ispitanike upućuje na njihov potencijal kao kliničko-predikcijskih biljega u MPN-u.
8. Korelacijska analiza hematoloških parametara i mitohondrijskih obilježja u bolesnika s MPN-om i zdravih ispitanika pokazala je povezanost snižene srednje koncentracije hemoglobina (MCHC) i udjela eozinofila s nižim omjerom MT/NAO u granulocitima, što upućuje na povezanost mitohondrijske funkcije s eritroidnom homeostazom i sastavom granulocitne populacije.
9. Korelacijska analiza ekspresije gena i izraženosti simptoma u bolesnika s MPN-om pokazala je povezanost smanjene ekspresije *SOD2* s izraženijim intenzitetom abdominalne nelagode.

10. Mitohondrijska disfunkcija, dokazana nižim omjerom MT/NAO, bila je povezana sa sniženom koncentracijom hemoglobina u eritrocitima i udjelom eozinofila, što upućuje na povezanost funkcije mitohondrija s eritroidnom homeostazom i sastavom granulocitne populacije.
11. Negativna povezanost između alelnog opterećenja mutacije JAK2 V617F i broja kopija mtDNA upućuje na povezanost klonalnog opterećenja s kvantitativnim promjenama mitohondrija u MPN-u.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da mitohondrijska disfunkcija nije samo posljedica, već aktivan sudionik u patofiziologiji MPN-a, dok mitohondrijska genetska varijabilnost modulira tijek i kliničku ekspresiju bolesti.

7. LITERATURA

1. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*. 2017;130(23):2475–2483.
2. Petruk C, Mathias J. The Myeloproliferative Neoplasm Landscape: A Patient’s Eye View. *Adv Ther*. 2020;37(5):2050–2070.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779–1790.
5. Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*. 2013;1(1):5.
6. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res*. 2013;37(2):214–220.
7. Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as inflammatory diseases: the evidence, consequences, and perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:102476.
8. Spivak JL. Myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2168–2181.
9. Marković D, Maslovarić I, Djikić D, Čokić VP. Neutrophil death in myeloproliferative neoplasms: shedding more light on neutrophils as a pathogenic link to chronic inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1490.
10. Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S96–S102.
11. Stewart JB, Chinnery PF. Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nat Rev Genet*. 2021;22(2):106–118.
12. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*. 2015;16(9):530–542.
13. Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA Lys mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1187–1200.

14. van den Ameele J, Li AYZ, Ma H, Chinnery PF. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;97:156–166.
15. Kopinski PK, Singh LN, Zhang S, Lott MT, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(7):431–445.
16. Dameshek W. Editorial: some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6(4):372–375.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451–458.
18. Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med.* 1979;30:135–143.
19. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7):1703–1719.
20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International consensus classification of myeloid neoplasms and acute leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 2022;140(11):1200–1228.
21. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1607–1616.
22. Vaquez LH. Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistente (on a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis). *Bull Mem Soc Med Hop Paris.* 1892;3:384–388.
23. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia.* 2013;27(9):1874–1881.
24. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia.* 2021;35(12):3339–3351.
25. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(16):2507–2513.
26. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):761–770.

27. Leebeek FWG, Eikenboom JCJ. Von Willebrand's disease. *N Engl J Med*. 2016;375(21):2067–2080.
28. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*. 2017;129(24):3227–3236.
29. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861–1869.
30. Cooper GM, Hausman RE. Stanično signaliziranje. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. p. 639–646.
31. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(5):1603–1607.
32. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000;95(1):19–29.
33. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93(3):397–409.
34. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385–395.
35. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47954–47963.
36. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors—an intimate relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1538–1546.
37. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39(6):795–810.
38. Gou P, Zhang W, Giraudier S. Insights into the potential mechanisms of JAK2V617F somatic mutation contributing distinct phenotypes in myeloproliferative neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1013.
39. McNally R, Li Q, Li K, Dekker C, Vangrevelinghe E, Jones M, et al. Discovery and structural characterization of ATP-site ligands for the wild-type and V617F mutant JAK2 pseudokinase domain. *ACS Chem Biol*. 2019;14(4):587–593.

40. Shan Y, Gnanasambandan K, Ungureanu D, Kim ET, Hammarén H, Yamashita K, et al. Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(7):579–584.
41. Ayaz P, Hammarén HM, Raivola J, Sharon D, Hubbard SR, Silvennoinen O, et al. Structural models of full-length JAK2 kinase [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [cited 2026 Apr 20]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/727727>.
42. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144–1148.
43. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054–1061.
44. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7(4):387–397.
45. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem.* 2005;280(24):22788–22792.
46. Kim DY, Tariq H, Brown AF, Vadlamudi K, Wang Y, Ikoma S, et al. JAK2 V617F mutation allele burden and its correlation with hematologic characteristics in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):5267.
47. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica.* 2014;99(9):1448–1455.
48. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood.* 2008;111(8):3931–3940.
49. Li J, Kent DG, Godfrey AL, Manning H, Nangalia J, Aziz A, et al. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood.* 2014;123(20):3139–3151.
50. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2008;93(1):41–48.
51. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278(5344):1803–1805.

52. Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, et al. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem.* 2003;278(24):21327–21330.
53. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):980–985.
54. Zacharaki D, Ghazanfari R, Li H, Lim HC, Scheduling S. Effects of JAK1/2 inhibition on bone marrow stromal cells of myeloproliferative neoplasm (MPN) patients and healthy individuals. *Eur J Haematol.* 2018;101(1):57–67.
55. Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, Del Cid N. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol.* 2013;34(1):13–21.
56. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379–2390.
57. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391–2405.
58. Kang MG, Choi HW, Lee JH, Choi YJ, Choi HJ, Shin JH, et al. Coexistence of JAK2 and CALR mutations and their clinical implications in patients with essential thrombocythemia. *Oncotarget.* 2016;7(35):57036–57049.
59. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood.* 2014;123(22):e123–e133.
60. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPLW515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108(10):3472–3476.
61. Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KSJ, Betz BL. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *J Mol Diagn.* 2013;15(6):810–818.
62. Cooper GM, Hausman RE. Bioenergetika i metabolizam: mitohondriji, kloroplasti i peroksisomi. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. p. 639–646.
63. Kölliker A. Einige Bemerkungen über die Endigungen der Hautnerven und den Bau der Muskeln. *Z Wiss Zool.* 1857;8:311–325.
64. Benda C. Mitochondria. *Arch Anat Physiol.* 1898;73:397–400.

65. Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics*. 4th ed. London: Academic Press; 2013.
66. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*. 2015;13:89.
67. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018;552:50–59.
68. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457–465.
69. Jobling MA, Tyler-Smith C. *Human evolutionary genetics: origins, peoples and disease*. New York: Garland Science; 2004.
70. Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol*. 2014;56:175–181.
71. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 1987;325(6099):31–36.
72. Dür A, Huber N, Parson W. Fine-tuning phylogenetic alignment and haplogrouping of mtDNA sequences. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5747.
73. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999;238(1):211–230.
74. Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K, Santachiara-Benerecetti AS. Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nat Genet*. 1999;23(4):437–441.
75. Torroni A, Miller JA, Moore LG, Zamudio S, Zhuang J, Droma T, et al. Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the Tibetan population and its adaptation to high altitude. *Am J Phys Anthropol*. 1994;93(2):189–199.
76. Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, et al. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science*. 2005;308(5724):1034–1036.
77. Kivisild T, Tolk HV, Parik J, Wang Y, Papiha SS, Bandelt HJ, et al. The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree. *Mol Biol Evol*. 2002;19(10):1737–1751.
78. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. 1996;144(4):1835–1850.

79. MITOMAP. World migrations [Internet]. 2012 [cited 2025 Mar 29]. Available from: <https://www.mitomap.org/foswiki/pub/MITOMAP/MitomapFigures/WorldMigrations2012.pdf>.
80. Roostalu U, Kutuev I, Loogväli EL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, et al. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol Biol Evol*. 2007;24(2):436–448.
81. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, et al. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA haplogroup background. *Am J Hum Genet*. 2007;81(2):228–233.
82. Grady JP, Pickett SJ, Ng YS, Alston CL, Blakely EL, Hardy SA, et al. mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Mol Med*. 2018;10(6):e8262.
83. Durham SE, Samuels DC, Cree LM, Chinnery PF. Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A→G. *Am J Hum Genet*. 2007;81(1):189–195.
84. Li M, Schröder R, Ni S, Madea B, Stoneking M. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(8):2491–2496.
85. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003;370(3):751–762.
86. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(11):a021220.
87. Guyatt AL, Brennan RR, Burrows K, Guthrie PAI, Ascione R, Ring SM, et al. A genome-wide association study of mitochondrial DNA copy number in two population-based cohorts. *Hum Genomics*. 2019;13(1):6.
88. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett*. 2021;595(8):976–1002.
89. Sanglard LP, Kuehn LA, Snelling WM, Spangler ML. Influence of environmental factors and genetic variation on mitochondrial DNA copy number. *J Anim Sci*. 2022;100(5):skac059.
90. Gentiluomo M, Giaccherini M, Gào X, Guo F, Stocker H, Schöttker B, et al. Genome-wide association study of mitochondrial copy number. *Hum Mol Genet*. 2022;31(8):1346–1355.

91. Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, et al. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9823–9834.
92. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*. 2004;13(9):935–944.
93. Lee W, Johnson J, Gough DJ, Donoghue J, Cagnone GLM, Vaghjiani V, et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1664.
94. Shao D, Liu Y, Liu X, Zhu L, Cui Y, Cui A, et al. PGC-1 β -regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR α . *Mitochondrion*. 2010;10(5):516–527.
95. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331(6158):717–719.
96. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 1999;402(6760):371–372.
97. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell*. 2007;18(9):3225–3236.
98. MITOMAP. A human mitochondrial genome database [Internet]. 2025 [cited 2025 Mar 29]. Available from: <http://www.mitomap.org>.
99. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988;242(4884):1427–1430.
100. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*. 2008;39(4):223–235.
101. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA Leu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*. 1990;348(6302):651–653.
102. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2010;1797(2):113–128.
103. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):617–631.

104. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(2):141–161.
105. Gnaiger E, Aasander Frostner E, Abdul Karim N, Abdel-Rahman EA, Abumrad NA, Acuna-Castroviejo D, et al. Mitochondrial physiology [Internet]. 2020.
106. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583–1606.
107. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:41–61.
108. Lledías F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10630–10637.
109. Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-Herr C. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 1998;48(17):3986–3992.
110. Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013;56:133–171.
111. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell.* 2010;40(6):893–904.
112. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M, et al. SIRT3 interacts with the DAF-16 homolog FOXO3a in the mitochondria and increases FOXO3a-dependent gene expression. *Int J Biol Sci.* 2008;4:291–299.
113. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519–530.
114. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309–314.
115. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(10):669–680.
116. Li-Harms X, Lu J, Fukuda Y, Lynch J, Sheth A, Pareek G, et al. Somatic mtDNA mutation burden shapes metabolic plasticity in leukemogenesis. *Sci Adv.* 2025;11(1):eads8489.
117. Kapralova K, Lanikova L, Lorenzo F, Song J, Horvathova M, Divoky V, et al. RUNX1 and NF-E2 upregulation is not specific for MPNs, but is seen in polycythemic disorders with augmented HIF signaling. *Blood.* 2014;123(3):391–394.
118. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E, Oppliger Leibundgut E, Cassinat B, et al. Establishing optimal quantitative polymerase chain reaction assays for routine

- diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet study. *Leukemia*. 2013;27(10):2032–2039.
119. Cerutti F, Bertolotti L, Goldberg TL, Giacobini M. Taxon ordering in phylogenetic trees by means of evolutionary algorithms. *BioData Min*. 2011;4(1):20.
 120. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–1760.
 121. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–2079.
 122. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing [Internet]. arXiv; 2012 [cited 2026 Apr 20]. Available from: <http://arxiv.org/abs/1207.3907>.
 123. Weissensteiner H, Pacher D, Kloss-Brandstätter A, Forer L, Specht G, Bandelt HJ, et al. HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W58–W63.
 124. Van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009;30(2):E386–E394.
 125. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D823–D828.
 126. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(12):1599–1613.
 127. Kimura K, Ai T, Horiuchi Y, Matsuzaki A, Nishibe K, Marutani S, et al. Automated diagnostic support system with deep learning algorithms for distinction of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms using peripheral blood specimen. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–10.
 128. Hermouet S. Mutations, inflammation and phenotype of myeloproliferative neoplasms. *Front Oncol*. 2023;13:1196817.
 129. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–679.
 130. Mulas O, Mola B, Madeddu C, Caocci G, Macciò A, Nasa GL. Prognostic role of cell blood count in chronic myeloid neoplasm and acute myeloid leukemia and its possible implications in hematopoietic stem cell transplantation. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(10):2493.

131. Reiter A, Gotlib J. Myeloid neoplasms with eosinophilia. *Blood*. 2017;129(6):704–714.
132. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjian JJ, Slot S, Zweegman S, et al. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J Clin Oncol*. 2012;30(33):4098–4103.
133. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders: an international internet-based survey of 1179 patients. *Cancer*. 2007;109(1):68–76.
134. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, et al. The myeloproliferative neoplasm symptom assessment form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood*. 2011;118(2):401–408.
135. Dueck AC, Cleeland CS, Dantzer R, Sloan J, Verstovsek S, Emanuel RM, et al. Cytokine profile changes in 309 myelofibrosis patients: comparison of JAK1/JAK2 inhibitor therapy vs placebo. *Blood*. 2013;122(21):4074.
136. Manz K, Heidel FH, Koschmieder S, Schlag R, Lipke J, Stegelmann F, et al. Comparison of recognition of symptom burden in MPN between patient- and physician-reported assessment: an intraindividual analysis. *Leukemia*. 2025;39(4):864–875.
137. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):573–582.
138. Czegle I, Gray AL, Wang M, Liu Y, Wang J, Wappler-Guzzetta EA. Mitochondria and their relationship with common genetic abnormalities in hematologic malignancies. *Life (Basel)*. 2021;11(12):1351.
139. Di Nottia M, Verrigni D, Torraco A, Rizza T, Bertini E, Carozzo R. Mitochondrial dynamics: molecular mechanisms, related primary mitochondrial disorders and therapeutic approaches. *Genes (Basel)*. 2021;12(2):247.
140. Ling VY, Heidel FH, Bywater MJ. Pathogenesis and management of high molecular risk myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2024;110(4):863–876.
141. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of cardiolipin in mitochondrial function and dynamics in health and disease: molecular and pharmacological aspects. *Cells*. 2019;8(7):728.
142. Kuznetsov AV, Javadov S, Grimm M, Margreiter R, Ausserlechner MJ, Hagenbuchner J. Crosstalk between mitochondria and cytoskeleton in cardiac cells. *Cells*. 2020;9(1):222.
143. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601–2613.

144. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2758–2771.
145. Marty C, Lacout C, Droin N, Le Couédic JP, Ribrag V, Solary E, et al. A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia.* 2013;27(11):2187–2195.
146. Song J, Herrmann JM, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(1):54–70.
147. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1(1):79–98.
148. Haage TR, Charakopoulos E, Bhuria V, Baldauf CK, Korthals M, Handschuh J, Müller P, Li J, Harit K, Nishanth G, Frey S, Böttcher M, Fischer K-D, Dudeck J, Dudeck A, Lipka DB, Schraven B, Green AR, Müller AJ. Neutrophil-specific expression of JAK2-V617F or CALRmut induces distinct inflammatory profiles in myeloproliferative neoplasia. *J Hematol Oncol.* 2024;17(1):1.
149. Hu L, Yao X, Shen Y. Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:35859.
150. Kim C, Bassig BA, Seow WJ, Hu W, Purdue MP, Huang WY, et al. Mitochondrial DNA copy number and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma risk in two prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(1):148–153.
151. Chaudhary S, Ganguly S, Palanichamy JK, Singh A, Bakhshi R, Jain A, et al. PGC1A-driven enhanced mitochondrial DNA copy number predicts outcome in pediatric acute myeloid leukemia. *Mitochondrion.* 2021;58:246–254.
152. Jain A, Bakhshi S, Thakkar H, Gerards M, Singh A. Elevated mitochondrial DNA copy numbers in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a potential biomarker for predicting inferior survival. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(3):e26874.
153. Szybinski J, Meyer SC. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(2):217–236.
154. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and cancer. *Cell.* 2016;166(3):555–566.
155. Brotherton P, Haak W, Templeton J, Brandt G, Soubrier J, Adler CJ, et al. Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origins of Europeans. *Nat Commun.* 2013;4:1764.
156. Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, et al. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet.* 2004;75(5):910–918.

157. Bjørn ME, Hasselbalch HC. The role of reactive oxygen species in myelofibrosis and related neoplasms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:648090.
158. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2008;417(1):1–13.
159. Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat Med.* 2018;24(11):1691–1695.
160. Je BI, Gruel J, Lee YK, Bommert P, Arevalo ED, Eveland AL, et al. Signaling from maize organ primordia via FASCIATED EAR3 regulates stem cell proliferation and yield traits. *Nat Genet.* 2016;48(7):785–791.
161. Hong YS, Pasca S, Shi W, Puiu D, Lake NJ, Lek M, et al. Mitochondrial heteroplasmy improves risk prediction for myeloid neoplasms. *Nat Commun.* 2024;15(1):10133.
162. Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy. *Cell Metab.* 2020;32(3):341–352.
163. Reznik E, Wang Q, La K, Schultz N, Sander C. Mitochondrial respiratory gene expression is suppressed in many cancers. *eLife.* 2017;6:e21592.
164. Castellani CA, Longchamps RJ, Sun J, Guallar E, Arking DE. Thinking outside the nucleus: mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion.* 2020;53:214–223.
165. Fleischman AG. Inflammation as a driver of clonal evolution in myeloproliferative neoplasm. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:606819.
166. Sharma V, Wright KL, Epling-Burnette PK, Reuther GW. Metabolic vulnerabilities and epigenetic dysregulation in myeloproliferative neoplasms. *Front Immunol.* 2020;11:604142.
167. Hermouet S, Bigot-Corbel E, Gardie B. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: role and mechanisms of chronic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:145293.
168. Palma FR, He C, Danes JM, Paviani V, Coelho DR, Gantner BN, et al. Mitochondrial superoxide dismutase: what the established, the intriguing, and the novel reveal about a key cellular redox switch. *Antioxid Redox Signal.* 2020;32(10):701–714.
169. Djikic D, Markovic D, Bogdanovic A, Mitrovic-Ajtic O, Suboticki T, Diklic M, et al. Oxidative and nitrosative stress in myeloproliferative neoplasms: the impact on the AKT/mTOR signaling pathway. *J BUON.* 2018;23(5):1481–1491.
170. Kłos P, Dabravolski SA. The role of mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11673.

171. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:4535194.
172. Tremblay D, Mesa R. Addressing symptom burden in myeloproliferative neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2022;35(2):101372.
173. Khan MA, Naqvi SAA, Camoriano JK, Arana Yi CY, Andres JT, Blocher JL, et al. Predictors of symptom scores in myeloproliferative neoplasms: a real-world retrospective cohort study. *Cancer Med*. 2025;14(23):e71333.
174. Pouillet A, Busque L, Sirhan S, Delage R, Cournoyer G, Chamakhi I, et al. Symptom burden in myeloproliferative neoplasms: clinical correlates, dynamics, and survival impact. *Blood Cancer J*. 2025;15(1):1–10.
175. Langlais BT, Dueck AC, Sater H, Harry T, Geyer HL, Scherber RM, et al. Validation of a modified version of the Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form Total Symptom Score. *J Patient Rep Outcomes*. 2021;5(1):120.
176. Moliterno AR, Kaizer H, Reeves BN. JAK2 V617F allele burden in polycythemia vera: burden of proof. *Blood*. 2023;141(16):1934–1942.
177. Mesa R, Verstovsek S, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, et al. Changes in quality of life and disease-related symptoms in patients with polycythemia vera receiving ruxolitinib or standard therapy. *Eur J Haematol*. 2016;97(2):192–200.
178. Dharmawickreme B, Witharana C. Review: JAK2V617F allele burden in diagnosis and therapeutic monitoring of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Med Health Sci*. 2023;5(1):35–40.
179. Guglielmelli P, Loscocco GG, Mannarelli C, Rossi E, Mannelli F, Ramundo F, et al. JAK2V617F variant allele frequency >50% identifies patients with polycythemia vera at high risk for venous thrombosis. *Blood Cancer J*. 2021;11(12):199.
180. Manz K, Bahr J, Ittermann T, Döhner K, Koschmieder S, Brümmendorf TH, et al. Validation of myeloproliferative neoplasms-associated risk factor RDW as predictor of thromboembolic complications in healthy individuals. *Leukemia*. 2023;37(8):1745–1749.
181. Zhao S, Zhang X, Xu Y, Feng Y, Sheng W, Cen J, et al. Impact of JAK2V617F mutation burden on disease phenotype in Chinese patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Med Sci*. 2016;13(1):85–91.
182. Pieri L, Bogani C, Guglielmelli P, Zingariello M, Rana RA, Bartalucci N, et al. The JAK2V617F mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera. *Haematologica*. 2009;94(11):1537–1545.

183. Barbui T, Ghirardi A, Empson V, Fenili F, Loscocco GG, Condorelli A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as surrogate for JAK2V617F suppression and event-free survival in polycythemia vera. *Blood Cancer J.* 2025;15(1):132.
184. Pyle A, Anugrha H, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Burn D, Hudson G. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2016;38:216.e7–216.e10.
185. Picard M. Blood mitochondrial DNA copy number: what are we counting? *Mitochondrion.* 2021;60:1–11.
186. Xu X, Pang Y, Fan X. Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: from mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):190.
187. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The neutrophil. *Immunity.* 2021;54(7):1377–1391.
188. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med.* 2016;22(2):146–153.
189. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, Sanin DE, et al. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell.* 2016;166(1):63–76.
190. Faas MM, De Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165845.
191. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* 2015;25(7):771–784.
192. Akuthota P, Weller PF. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol.* 2012;49(2):113–119.
193. Rath SP, Gupta R, Todres E, Wang H, Jourdain AA, Ardlie KG, et al. Mitochondrial genome copy number variation across tissues in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(33):e2402291121.
194. Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira D, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, et al. Oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: a new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle.* 2010;9(16):3276–3296.
195. Rao TN, Hansen N, Hilfiker J, Rai S, Majewska JM, Leković D, et al. JAK2-mutant hematopoietic cells display metabolic alterations that can be targeted to treat myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2019;134(21):1832–1846.

196. Sørensen AL, Hasselbalch HC, Bjørn ME, Nielsen CH, Cordua S, Skov V, et al. Elevated levels of oxidized nucleosides in individuals with the JAK2V617F mutation from a general population study. *Redox Biol.* 2021;41:101895.
197. Wulfert M, Küpper AC, Tapprich C, Bottomley SS, Bowen D, Germing U, et al. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol.* 2008;36(5):577–586.
198. Dirani NA, Soufan F, Jebawi KA, Satea Shafeea M, Nasereldeen N, Sabra I, et al. Targeting mitochondrial dysfunction in myeloproliferative neoplasms: current strategies and future directions—a narrative review. *Ann Med Surg (Lond).* 2025;87(11):7430–7439.

8. ŽIVOTOPIS

Ivona Arić Zrna rođena je 1996. godine u Novoj Gradiški. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Novoj Gradiški, gdje je maturirala u općoj gimnaziji. Godine 2015. upisala je prijediplomski studij biologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, a 2018. diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom “*Kontrola kvalitete stanične terapije autolognim keratinocitima kod zacjeljivanja teških opekline*” izradila je u Banci tkiva i stanica Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, pod mentorstvom dr. sc. Marije Zekušić i prof. dr. sc. Inge Urlić. Od 2022. godine zaposlena je na Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava. Iste godine upisala je poslijediplomski doktorski studij. Tijekom dosadašnjeg znanstvenog rada sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Sudjelovala je na Simpoziju studenata doktorskih studija PMF-a u Zagrebu (2023., 2024. i 2025.), Proljetnom KROHEM sastanku (Mali Lošinj, 2023.), 4. hrvatskom biološkom kongresu (Pula, 2022.) te konferenciji HDIR-6: *Targeting Cancer* (Zagreb, 2022.). Također je sudjelovala na Kemomed Science Conference (Ljubljana, 2022.) te kongresima European Hematology Association: EHA 2023 Congress u Frankfurtu i EHA 2025 Congress u Milanu. Bila je panelistica na 1. školi racionalne i sigurne farmakoterapije s međunarodnim sudjelovanjem (Opatija, 2024.) te je aktivno sudjelovala i na 2. školi racionalne i sigurne farmakoterapije (Pula, 2025.).

Kao autorica i koautorica sudjelovala je u objavi dva znanstvena članka:

Lucijanić M, Veić P, **Arić I**, Tupek K, Sorić E, Sabljčić A, Glasnović J, Štoos-Veić T, Krečak I, Kušec R. Higher JAK2 V617F mutant allele burden in patients with chronic myeloproliferative neoplasms is associated with a higher prevalence of chronic kidney disease and unfavorable dynamics of kidney function over time. *Ann Hematol.* 2023;102:1955-1956. doi: 10.1007/s00277-023-05305-3.

Arić Zrna I, Lucijanić M, Gizdić B, Nižetić M, Kušec R, Livun A, Korolija M. Analysis of mitochondrial function and antioxidant capacity in JAK2 V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Period Biol.* 2025;127(3-4):xx-xx.