

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

Милош С. Диклић

**Анализа експресије фактора инфламације
S100A4, S100A8/9, S100A12 у
мијелопролиферативним неоплазмама: веза са
присуством мутације у ЈАК2 гену**

докторска дисертација

Београд, 2020

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Miloš S. Diklić

**Expression analysis of inflammation factors
S100A4, S100A8/9, S100A12 in myeloproliferative
neoplasms: a connection with the presence of
mutation in the JAK2 gene**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ментори:

др **Владан Чокић**, научни саветник
Институт за медицинска истраживања
Универзитет у Београду

др **Гордана Матић**, редовни професор
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

Чланови комисије:

др **Оливера Митровић Ајтић**, виши научни сарадник
Институт за медицинска истраживања
Универзитет у Београду

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

Захвалница:

Др Владану Чокићу, научном саветнику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду захваљујем се на пруженој могућности за израду докторске дисертације и рад у Лабораторији за молекуларну онкологију, на квалитетно осмишљеној тематици дисертације, као и пруженим смерницама и дискусији добијених резултата. Хвала на стрпљењу и предусретљивости.

Др Гордани Матић, редовном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду велико хвала на корисним сугестијама и сталном интересовању за напредовање у изради дисертације. Хвала на дивно и изузетно корисно осмишљеним докторским студијама и могућности да се добијено знање и примени.

Др Оливери Митровић Ајтић, др Тијани Суботички и др Маријани Ковачић хвала на времену, залагању, колегијалности и ангажованости током израде ове докторске дисертације. Велики број експеримената урадили смо заједничким снагама. Хвала на пријатељству и пријатним тренуцима проведеним у научним и забавним дискусијама, на дружењу и атмосфери. Посебно хвала Оливери на изузетној помоћи у сређивању добијених резултата.

Проф. Мирјани Готић и др Данијели Лековић са Клинике за хематологију Клиничког центра Србије захваљујем на помоћи у организовању и сакупљању узорака пацијената.

Др Бојани Белеслин Чокић са Клинике за ендокринологију Клиничког центра Србије хвала на помоћи у одређивању мутационог статуса пацијената и тумачењу добијених резултата, као и бројним корисним саветима везаним за qPCR и секвенцирање.

Др Хуану Сантибањезу хвала на конструктивним и добронамерним сугестијама током писања докторске дисертације.

Колегиницама из групе за молекуларну онкологију, др Драгослави Бикић, др Сунчици Бјелици и др Милицы Тошић, хвала на помоћи у лабораторији и на несебичној подршци коју су ми пружале у току израде ове дисертације.

Посебно се захваљујем својим пријатељима, који су ми незаменљив ослонац и подршка.

Највећу захвалност дугујем својој породици, супрузи Марини, мајци Види и мојој Ани, којој и посвећујем овај докторат, са жељом за њене будуће успехе.

Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у *JAK2* гену

Резиме

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) спадају у групу малигних обољења крви, за које је карактеристична клонална експанзија неопластично трансформисаних хематопоетских прогенитора мијелоидне лозе у костној сржи. У МПН у ужем смислу спадају полицитемија вера (ПВ), есенцијална тромбоцитемија (ЕТ) и примарна мијелофиброза (ПМФ). Код пацијената са МПН основни поремећај представља мутација *JAK2V617F*, која је покретачка мутација у више од 95% пацијената са ПВ и 50-60% пацијената са ЕТ и ПМФ. *JAK2V617F* мутација води конститутивној активацији *JAK2* киназе и расту ћелија независном од цитокина. Као последица, активирани су нисходни сигнални путеви (*JAK2/STAT3*, *PI3K-AKT*, *MAPK*), који су укључени у мијелопролиферацију. Присуство *JAK2V617F* мутације код МПН у хематопоетским ћелијама мења активност сигналних путева значајних за инфламацију, при чему долази до промене настајања реактивних врста кисеоника код неутрофила, промене нивоа инфламаторних цитокина у серуму и измењене реактивности на ове цитокине. Главна одлика хроничне инфламације јесте висок ниво цитокина и хемокина у циркулацији, као и нагомилавање реактивних кисеоничних врста, што доводи до генетичке нестабилности и може бити погодно за настанак и прогресију неоплазми. Код пацијената са МПН уочено је значајно повећање бројних медијатора инфламације, међу којима је и група калцијум везујућих протеина, под називом S100 протеини. Због свог туморигеног и проинфламаторног деловања, протеини S100 фамилије који потенцијално имају највећи ефекат на настанак и развој мијелопролиферативних неоплазми су S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12, јер је у неколико студија показан њихов повишен ниво код МПН.

Циљ истраживања ове дисертације било је испитивање генске експресије и нивоа S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 фактора код МПН пацијената, испитивање утицаја проинфламаторног цитокина *IL-6*, антиинфламаторног цитокина *IL-10*, као и *JAK* инхибитора на нивое ових протеина на моделу хумане HEL 92.1.7 ћелијске линије са *JAK2* мутацијом, као и испитивање сигналних механизма путем којих *IL-6* и *IL-10* остварују своје ефекте на ћелије периферне крви пацијената са МПН и моделу хумане HEL 92.1.7. ћелијске линије.

Резултати ове студије су показали да фактори инфламације показују повећање нивоа, које зависи од присуства *JAK2V617F* мутације код појединачних протеина. Наведено повећање нивоа фактора инфламације указује да код оболелих од МПН постоји хронична инфламација. Третман хидроксиуреом и комбинацијом хидроксиуреа и специфичног *JAK2* инхибитора смањује нивое фактора инфламације у HEL 92.1.7 ћелијској линији, што указује да се испитивани S100 протеини експримирају на *JAK2*-зависан начин.

Проинфламаторни цитокин *IL-6* смањивао је нивое S100 протеина у мононуклеарима пацијената са МПН, а ово смањење код МПН посредовано је *NF-κB* и *PI3K* сигналним путевима. Антиинфламаторни цитокин *IL-10* такође је смањивао нивое S100 протеина, поготово S100A8 и S100A9 код пацијената са ЕТ, али посредовано *PI3K-AKT* сигналним путем. У *IL-6* / *IL-10* посредованој регулацији нивоа S100 протеина код МПН доминирају *NF-κB* и *PI3K* сигнални путеви, док је активација *JAK-STAT* сигналног пута конститутивна.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: мијелопролиферативне неоплазме, хронична инфламација, S100, *IL-6*, *IL-10*, *JAK-STAT*, *NF-κB*, *PI3K-AKT*

НАУЧНА ОБЛАСТ: БИОЛОГИЈА

УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ: БИОНЕМИЈА I МОЛЕКУЛАРНА БИОЛОГИЈА

Expression analysis of inflammation factors S100A4, S100A8/9, S100A12 in myeloproliferative neoplasms: a connection with the presence of mutation in the JAK2 gene

Abstract

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) belong to the group of malignant diseases of the blood, characterized by a clonal expansion of neoplastically transformed hematopoietic progenitors of the myeloid lineage in the bone marrow. MPN in the narrow sense includes polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). In patients with MPN, the underlying disorder is the *JAK2V617F* mutation, which is a driving mutation in more than 95% of patients with PV and 50-60% of patients with ET and PMF. The *JAK2V617F* mutation leads to constitutive activation of JAK2 kinase and cytokine-independent cell growth. As a consequence, downstream signaling pathways (JAK2 / STAT3, PI3K-AKT, MAPK), which are involved in myeloproliferation, are activated. The presence of the *JAK2V617F* mutation in MPN in hematopoietic cells alters the activity of inflammatory signaling pathways, altering the production of reactive oxygen species in neutrophils, altering serum inflammatory cytokine levels, and altering reactivity to these cytokines. The main feature of chronic inflammation is the high level of circulating cytokines and chemokines, as well as the accumulation of reactive oxygen species, which leads to genetic instability and may be suitable for the formation and progression of neoplasms. In patients with MPN, a significant increase in many inflammatory mediators has been observed, including a group of calcium-binding proteins, called S100 proteins. Due to their tumorigenic and pro-inflammatory activity, the S100 family of proteins that potentially have the greatest effect on the formation and development of myeloproliferative neoplasms are S100A4, S100A8, S100A9 and S100A12, as several studies have shown their elevated levels in MPN.

The aim of this dissertation was to investigate the gene expression and levels of S100A4, S100A8, S100A9 and S100A12 factors in MPN patients, study the effect of pro-inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as JAK inhibitors on the levels of these proteins on human HEL 92.1.7 model cell line with a *JAK2* mutation, as well as an examination of the signaling mechanisms by which IL-6 and IL-10 exert their effects on peripheral blood cells of patients with MPN and the human HEL 92.1.7 model cell line.

The results of this study showed that inflammation factors show an increase in levels, which is dependent on the presence of the *JAK2V617F* mutation in individual proteins. This increase in the level of inflammatory factors indicates that patients with MPN have chronic inflammation. Treatment with hydroxyurea and a combination of hydroxyurea and a specific JAK2 inhibitor decreases the levels of inflammatory factor in the HEL 92.1.7 cell line, indicating that the S100 proteins examined are expressed in a JAK2-dependent manner.

The pro-inflammatory cytokine IL-6 decreased S100 protein levels in mononuclear cells of patients with MPN, and this decrease in MPN was mediated by NF- κ B and PI3K signaling pathways. The anti-inflammatory cytokine IL-10 also reduced S100 protein levels, especially S100A8 and S100A9 in patients with ET, but mediated by the PI3K-AKT signaling pathway. IL-6 / IL-10-mediated regulation of S100 protein levels by MPNs is dominated by NF- κ B and PI3K signaling pathways, whereas activation of the JAK-STAT signaling pathway is constitutive.

KEY WORDS: myeloproliferative neoplasms, chronic inflammation, S100, IL-6, IL-10, JAK-STAT, NF- κ B, PI3K-AKT

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SPECIAL TOPICS: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. МИЈЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЕ НЕОПЛАЗМЕ	1
1.1.1. Полицитемија вера.....	2
1.1.2. Есенцијална тромбоцитемија.....	2
1.1.3. Примарна мијелофиброза.....	3
1.2. МОЛЕКУЛАРНИ МАРКЕРИ МПН.....	4
1.2.1. Мутације у генима које утичу на ЈАК-СТАТ сигнални пут	4
1.3. ИНФЛАМАЦИЈА	4
1.3.1. Хронична инфламација у МПН.....	5
1.4. S100 ПРОТЕИНИ	6
1.4.1. Структурне карактеристике S100 протеина	7
1.4.2. Организација генског локуса S100 протеина	9
1.4.3. Пост-транслационе модификације S100 протеина	10
1.4.4. Биолошке функције S100 протеина	10
1.4.4.1. Унутарћелијске функције S100 протеина	11
1.4.4.1.1. Регулација фосфорилације	11
1.4.4.1.2. Модулација ензимске активности	12
1.4.4.1.3. Одржавање облика и покретљивости ћелије	12
1.4.4.1.4. Утицај на сигналне путеве и инфламаторне одговоре	12
1.4.4.1.5. Регулација хомеостазе калцијума	13
1.4.4.1.6. Интеракција S100 са транскрипционим факторима.....	14
1.4.4.1.7. Утицај S100 на ћелијски раст и диференцијацију	14
1.4.4.2. Ванћелијске функције S100 протеина	14
1.4.4.2.1. Регулација инфламаторног одговора.....	15
1.4.4.2.2. Регулација спољашњег пута коагулације крви	15
1.4.4.3. Интеракције S100 протеина независне од присуства калцијума.....	15
1.4.5. S100 протеини у канцерима	15
1.4.6. Улога S100 протеина у неопластичној трансформацији, апоптози и метастазирању	16
.....	16
1.4.7. S100 протеини од значаја за мијелопролиферативне неоплазме	17
1.4.7.1. S100A4	17
1.4.7.2. S100A8/A9	17
1.4.7.3. S100A12	18
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	20
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	21
3.1. ИСПИТАНИЦИ	21
3.2. ДИЗАЈН ЕКСПЕРИМЕНАТА.....	22
3.2.1. Одређивање нивоа експресије гена и нивоа протеина фактора инфламације у периферној крви и костној сржи МПН пацијената.....	22
3.2.2. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6, IL-10 и ЈАК инхибитора на моноклеарне ћелије и гранулоците, као и на HEL 92.1.7. ћелије.....	22
3.2.3. Испитивање деловања хидроксиурес и инхибитора сигналних путева на нивоу фактора инфламације	22
3.3. ЋЕЛИЈЕ И ЋЕЛИЈСКЕ КУЛТУРЕ.....	23
3.3.1. Изолација гранулоцита и моноклеара из периферне крви.....	23
3.3.2. Ћелијска линија.....	23
3.4. АНАЛИЗА ЈАК2V617F МУТАЦИЈЕ.....	24
3.4.1. Реакција ланчаног умножавања ДНК (PCR)	24

3.4.2. Испитивање присуства <i>JAK2V617F</i> мутације	24
3.4.3. Секвенцирање PCR продуката.....	25
3.5 АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ПОМОЋУ РЕАКЦИЈЕ РЕВЕРЗНЕ ТРАНСКРИПЦИЈЕ И „REAL-TIME“ PCR (QPCR) МЕТОДЕ	25
3.5.1. Одређивање експресије <i>S100A4</i> , <i>S100A8</i> , <i>S100A9</i> и <i>S100A12</i> гена применом qRT-PCR методе	27
3.6. АНАЛИЗА НИВОА ПРОТЕИНА.....	28
3.6.1. Western blot анализа нивоа протеина	28
3.6.2. Имуноцитохемијска анализа нивоа протеина	29
3.7. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА.....	29
3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА РЕЗУЛТАТА	31
4. РЕЗУЛТАТИ	32
4.1. НИВО ЕКСПРЕСИЈЕ <i>S100A</i> ГЕНА У ГРАНУЛОЦИТИМА МПН ПАЦИЈЕНАТА	32
4.1.1. Ниво експресије <i>S100A4</i> гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације.....	32
4.1.2. Ниво експресије <i>S100A8</i> гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације.....	33
4.1.3. Ниво експресије <i>S100A9</i> гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације.....	33
4.1.4. Ниво експресије <i>S100A12</i> гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације.....	34
4.2. ПРОТЕИНСКИ НИВО ИНФЛАМАТОРНИХ ФАКТОРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА МПН ОДРЕЂЕН WESTERN BLOT МЕТОДОМ	35
4.2.1 Ниво <i>S100A4</i> протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације	35
4.2.2 Ниво <i>S100A8</i> протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	36
4.2.3. Ниво <i>S100A9</i> протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	37
4.2.4. Ниво <i>S100A12</i> протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	38
4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА ИНФЛАМАТОРНИХ ФАКТОРА КОД МПН ПАЦИЈЕНАТА ПРИМЕНОМ ИМУНОЦИТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ	39
4.3.1. Број имунореактивних <i>S100A4</i> ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	39
4.3.2. Број имунореактивних <i>S100A8</i> ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	41
4.3.3. Број имунореактивних <i>S100A9</i> ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	42
4.3.4. Број имунореактивних <i>S100A12</i> ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на <i>JAK2V617F</i> мутацију	44
4.4. БРОЈ ИМУНОРЕАКТИВНИХ ЋЕЛИЈА ИНФЛАМАТОРНИХ ФАКТОРА КОД МПН ПАЦИЈЕНАТА ДОБИЈЕН ПРИМЕНОМ ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ.....	45
4.4.1. Број имунореактивних <i>S100A4</i> ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације	45
4.4.2. Број имунореактивних <i>S100A8</i> ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство <i>JAK2V617F</i> мутације	47

4.4.3. Број имунореактивних S100A9 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације	48
4.4.4. Број имунореактивних S100A12 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације	50
4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ИНФЛАМАТОРНИХ ФАКТОРА У ПЛАЗМИ МПН ПАЦИЈЕНАТА ДОБИЈЕН ПРИМЕНОМ ELISA МЕТОДЕ	51
4.5.1. Одређивање концентрације S100A8 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе	51
4.5.2. Одређивање концентрације S100A9 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе	52
4.5.3. Одређивање концентрације S100A12 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе	53
4.6. ИСПИТИВАЊЕ НИВОА ФАКТОРА ИНФЛАМАЦИЈЕ <i>IN VITRO</i> НА ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ HEL 92.1.7 ПОСЛЕ ТРЕТМАНА ХИДРОКСИУРЕОМ И СПЕЦИФИЧНИМ JAK2 ИНХИБИТОРОМ 1,2,3,4,5,6-ХЕКСАБРОМОЦИКЛОХЕКСАНОМ	54
4.6.1. Протеински ниво S100A4 после 24 и 48 сати третмана	54
4.6.2. Протеински ниво S100A9 после 24 и 48 сати третмана	56
4.6.3. Протеински ниво S100A12 после 24 и 48 сати третмана	57
4.7. ИСПИТИВАЊЕ НИВОА МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У МОНОНУКЛЕАРИМА МПН ПАЦИЈЕНАТА ПОСЛЕ ТРЕТМАНА СА ИНХИБИТОРИМА И IL-6 СИГНАЛНИХ ПУТЕВА	58
4.7.1. Ниво S100A4 протеина код МПН	59
4.7.1.1. Ниво S100A4 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	59
4.7.1.2. Ниво S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	59
4.7.1.3. Ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	60
4.7.2. Ниво S100A8 протеина код МПН	61
4.7.2.1. Ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	61
4.7.2.2. Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	62
4.7.2.3. Ниво S100A8 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	63
4.7.3. Ниво S100A9 протеина код МПН	64
4.7.3.1. Ниво S100A9 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	64
4.7.3.2. Ниво S100A9 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	65
4.7.3.3. Ниво S100A9 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	66
4.7.4. Ниво S100A12 протеина код МПН	67
4.7.4.1. Ниво S100A12 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	67
4.7.4.2. Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	68
4.7.4.3. Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	69
4.7.5. Ниво NF-κB протеина код МПН	69
4.7.5.1. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	69
4.7.5.2. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	70
4.7.5.3. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6	71
4.8. ИСПИТИВАЊЕ НИВОА S100A МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У <i>IN VITRO</i> УСЛОВИМА НА HEL 92.1.7. ЋЕЛИЈАМА ПОСЛЕ ТРЕТМАНА СА ИНХИБИТОРИМА И IL-6	71
4.8.1. Ниво S100A4 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6	71
4.8.2. Ниво S100A8 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6	72
4.8.3. Ниво S100A9 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6	73
4.8.4. Ниво S100A12 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6	73
4.8.5. Ниво pNF-κB/NF-κB у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6	74
4.9. ИСПИТИВАЊЕ НИВОА ФАКТОРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У МОНОНУКЛЕАРИМА МПН ПАЦИЈЕНАТА ПОСЛЕ ТРЕТМАНА СА АНТИИНФЛАМАТОРНИМ ЦИТОКИНОМ ИНХИБИТОРИМА И IL-10	75
4.9.1. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима МПН пацијената	75
4.9.1.1. Ниво S100A4 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	75

4.9.1.2. Ниво S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	76
4.9.1.3. Ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	76
4.9.2. Ниво S100A8 протеина у моноклеарима МПН пацијената	77
4.9.2.1. Ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	77
4.9.2.2. Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	78
4.9.2.3. Ниво S100A8 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	79
4.9.3. Ниво S100A9 протеина у моноклеарима МПН пацијената	80
4.9.3.1. Ниво S100A9 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	80
4.9.3.2. Ниво S100A9 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	80
4.9.3.3. Ниво S100A9 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	81
4.9.4. Ниво S100A12 протеина у моноклеарима МПН пацијената	82
4.9.4.1. Ниво S100A12 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	82
4.9.4.2. Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	82
4.9.4.3. Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.....	83
4.9.5. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина у моноклеарима МПН пацијената	84
4.9.5.1. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	84
4.9.5.2. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	84
4.9.5.3. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10	85
4.10. ИСПИТИВАЊЕ НИВОА МАРКЕРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У <i>IN VITRO</i> УСЛОВИМА НА HEL 92.1.7.	
ЋЕЛИЈАМА ПОСЛЕ ТРЕТМАНА СА АНТИИНФЛАМАТОРНИМ ЦИТОКИНОМИНХИБИТОРИМА И IL-10.....	86
4.10.1. Ниво S100A4 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10	86
4.10.2. Ниво S100A8 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10	87
4.10.3. Ниво S100A9 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10	88
4.10.4. Ниво S100A12 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10	88
4.10.5. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10	89
5. ДИСКУСИЈА	90
5.1. ОПШТЕ ОСОБИНЕ АНАЛИЗИРАНЕ ГРУПЕ ПАЦИЈЕНАТА СА МИЈЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИМ НЕОПЛАЗМАМА	90
5.2. ХРОНИЧНА ИНФЛАМАЦИЈА КОД МПН	90
5.2.1. Фактори инфламације S100A4, S100A8, S100A A9 и S100A A12 у ћелијама пацијената са МПН	91
5.2.1.1. S100A4	91
5.2.1.2. S100A8/9	92
5.2.1.3. S100A12	92
5.3. УТИЦАЈ ХИДРОКСИУРЕЕ И ЈАК2 СПЕЦИФИЧНОГ ИНХИБИТОРА НА НИВОЕ ФАКТОРА ИНФЛАМАЦИЈЕ У <i>IN VITRO</i> УСЛОВИМА НА ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ HEL 92.1.7	93
5.4. УТИЦАЈ ПРОИНФЛАМАТОРНОГ IL-6 И ЈАК1/2 ИНХИБИТОРА НА НИВО S100 ПРОТЕИНА И АКТИВАЦИЈУ NF-κB СИГНАЛНОГ ПУТА У МОНОКЛЕАРИМА МПН ПАЦИЈЕНАТА И HEL ЋЕЛИЈАМА	93
5.5. УТИЦАЈ АНТИИНФЛАМАТОРНОГ IL-10 И ЈАК1/2 ИНХИБИТОРА НА НИВО S100 ПРОТЕИНА И АКТИВАЦИЈУ NF-κB СИГНАЛНОГ ПУТА У МОНОКЛЕАРИМА МПН ПАЦИЈЕНАТА И HEL ЋЕЛИЈАМА	94
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	95
7. ЛИТЕРАТУРА	96

1. УВОД

1.1. Мијелопролиферативне неоплазме

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) спадају у групу малигних обољења крви, за које је карактеристична клонална експанзија неопластично трансформисаних хематопоеетских прогенитора мијелоидне лозе у костној сржи. Овим болестима придружена је и геномска нестабилност, поремећена регулација сигналних путева и повећана продукција маркера инфламације (Lussana i Rambaldi, 2017). Поред тога, важна карактеристика ових болести јесте и повећана осетљивост на факторе раста, што доводи до повећања броја диференцираних ћелија мијелоидне лозе (еритроцити, гранулоцити, тромбоцити) у периферној крви.

Према класификацији Светске Здравствене Организације (енг. World Health Organization, WHO) из 2016. године, у мијелопролиферативне болести спада седам подкатегија: „Филаделфија“ хромозом негативна (Ph^-) полицитемија вера (енг. polycythemia vera, ПВ), есенцијална тромбоцитемија (енг. essential thrombocythemia, ЕТ) и примарна мијелофиброза (енг. primary myelofibrosis, ПМФ), као и „Филаделфија“ хромозом позитивна (Ph^+) хронична мијелоидна леукемија (енг. chronic myeloid leukemia, ХМЛ), хронична неутрофилна леукемија, хронична еозинофилна леукемија и неклассификоване МПН болести (Barbui и сар., 2017). Назив за ове болести први пут је 1951. године употребио William Dameshek, да би описао групу од четири болести, у које је сврстао ПВ, ЕТ, ПМФ и ХМЛ (Dameshek, 1951). Будући да је ХМЛ окарактерисана присуством фузионог протеина BCR-ABL, који је последица транслокације, („Филаделфија“ хромозом), преостале болести класификују се као мијелопролиферативне болести у ужем смислу.

Једна од основних карактеристика мијелопролиферативних болести јесте хиперсензитивност неопластично трансформисаних ћелија на већи број фактора раста. Ово запажање указује да је за настанак болести одговоран поремећај на нивоу сигнализације преко већег броја рецептора за факторе раста (Вахтер и сар., 2005). Код пацијената са ПВ показано је да колоније еритроидних прогенитора расту и без присуства еритропоетина (Prchal и Axelrad, 1974), као и да су и еритроидни и мијелоидни прогенитори код ових пацијената хиперсензитивни на неколико фактора раста (Röder и сар., 2001), што је касније показано и код особа оболелих од ЕТ и ПМФ (Вахтер и сар., 2005). Фактори који су од значаја за наведене процесе пролиферације обухватају поред еритропоетина и тромбопоетин (Kawasaki и сар., 2001), интерлеукин 3, фактор стимулације колонија гранулоцита, (енг. Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (енг. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF) и инсулину сличан фактор раста 1 (енг. Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1) (Kota и сар., 2008).

Класификација Ph^- МПН заснива се на критеријуму ћелијске линије (гранулоцитна, еритроидна или мегакариоцитна) која је најзаступљенија као последица повећане пролиферације. Поред тога, од великог значаја је и утврђивање степена фиброзе костне сржи, као и остали клинички, лабораторијски и молекуларно генетички параметри. Резултат појачане пролиферације ћелија су леукоцитоза, еритроцитоза или тромбоцитоза, док се хепатоспленомегалија јавља као последица секвестрације вишка ћелија, екстрамедуларне хематопоезе или инфилтрације неопластично трансформисаних ћелија (Shier и George, 2014). Без обзира на то што почетак нерегулисане пролиферације може бити иницијално спор и неуочљив, сви ови клонални поремећаји матичних ћелија имају потенцијал за даљу еволуцију. То се манифестује као постепено повећање степена фиброзе до мијелофиброзе као крајњег стадијума, или као повећање броја бласт ћелија, кроз убрзану фазу (10-19% бласт ћелија) до акутне леукемије (Вахтер и сар., 2005; Iurlo и сар., 2019).

МПН се убрајају у ретке болести, са годишњом инциденцом од 0,38-1,7/100.000 за ЕТ, 0,4-2,8/100.000 за ПВ и 0,1-1/100.000 за ПМФ у европској популацији (Moulard и сар., 2012). Највећи ризик за појаву МПН имају особе од 50 до 60 година старости, међутим могу се јавити и раније током живота (Bellanné-Chantelot, 2006). Преживљавање особа са ЕТ слично је нормалној популацији, код ПВ је нешто скраћено услед тежих компликација, док је просечна дужина преживљавања код ПМФ до 5 година (Passamonti и сар., 2004; Hoffman и Rondelli, 2007). Главне компликације које се могу јавити код пацијената са МПН јесу појава венске тромбозе, често на неубичајним местима (укључујући и тромбозу спланхичне вене), артеријске тромбозе, склоност ка крварењу, као и еволуција у мијелофиброзу (поготово пацијенти са ПВ и ЕТ) и трансформисање у акутну леукемију (Arachchillage и Laffan, 2019). Постоје и форме фамилијарне МПН (Bellanné-Chantelot, 2006).

1.1.1. Полицитемија вера

ПВ је клонални поремећај који настаје у мултипотентним хематопоетским ћелијама и код кога се јавља акумулација морфолошки нормалних еритроцита, леукоцита, тромбоцита и њихових прогенитора. Будући да погађа мултипотентне хематопоетске прогениторске ћелије, основна карактеристика ПВ је трилинијска хиперплазија хематопоетских ћелија (Spivak, 2002). Поред тога, за ПВ је карактеристично снижење нивоа апоптозе и прелазак из фазе пролиферације у фазу трансформације у АМЛ. Костна срж показује хиперцелуларност, а запажа се и повећање укупне запремине крви, као и спленомегалија. Први пут је описана од стране француског лекара Louis Henri Vaquez-а 1892. године, код пацијента са хроничном цијанозом, палпитацијама, вртоглавицом и проширеним венама (Means, 2014). Инциденца појаве ПВ у различитим студијама у оквиру Европске уније креће се од 0,4 до 2,8 на 100.000, при чему је однос мушких и женских пацијената 1,2 до 2,2. Код млађих пацијената доминирају особе мушког пола (Berglund и Zettervall, 1992; Ania и сар., 1994; Policitemia GIS, 1995). Најчешће погађа старију популацију, са максимумом инциденце око 60 година живота, мада се може јавити и раније (40 година или мање), као и касније (око 80 година) (Zhao и сар., 2005; Means, 2014).

Основне карактеристике лабораторијског налаза код ПВ јесу високи нивои хемоглобина, (180-240 g/L), као и велики број морфолошки нормалних еритроцита ($7-15 \cdot 10^{12}/L$), уз вредности хематокрита од 0.55 или више (Means, 2014).

Клиничка слика ПВ подразумева компликације индуковане полицитемијом, као што су хипервискозност, тромбоза и повећање запремине крви. Остале значајне компликације које се јављају касније у току болести јесу развој мијелоидне метаплазије са мијелофиброзом и акутна леукемија (Means, 2014), при чему се трансформација у мијелофиброзу јавља у око 30% случајева (Rumi и сар., 2006), а у АМЛ у 4-8% случајева (Landgren и сар., 2008). Поред мијелофиброзе, јавља се и прогресивно смањење века еритроцита и смањена еритропоеза (Hoffman и Wasserman, 1979). Према новијим студијама, просечна дужина преживљавања код ПВ износи око 14 година (Tefferi и Barbui, 2016).

1.1.2. Есенцијална тромбоцитемија

Аустријски патолози Emil Epstein и Alfred Goedel описали су 1934. године ЕТ, као званично последњу класичну МПН (Epstein и сар., 1934). Она представља пролиферативни поремећај за који је карактеристичан повећан број тромбоцита у периферној крви, обично преко $1000 \cdot 10^9/L$ (Shier и George, 2014) Према класификацији WHO из 2016, четири критеријума се користе за постављање дијагнозе ЕТ, а то су број тромбоцита $\geq 450 \cdot 10^9/L$ који

се одржава у дужем временском периоду, налаз мегакариоцитне пролиферације у костној сржи, са увећаним зрелим мегакариоцитима и без значајног повећања или измене гранулопоезе или еритропоезе, искључивање осталих МПН и молекуларно генетички критеријуми (Barbui и сар., 2017).

ЕТ се може разматрати као клонална и као реактивна болест. Пацијенти са реактивном ЕТ могу обухватати оне са абнормалностима гена за тромбопоетин и имају смањен ризик од настанка тромбозе (Tefferi и Barbui, 2016). Јавља се најчешће код особа старости преко 50 година, међутим може се јавити и знатно раније, али и касније. Однос мушких и женских оболелих је 2:1 (Brière, 2007)

Поред клоналне тромбоцитозе, одређени број пацијената са ЕТ може имати благу спленомегалију, леукоцитозу, микроваскуларне симптоме, тромботичке и хеморагијске компликације и повећани ризик од леукемијске трансформације и прогресије у фиброзу (Tefferi и сар., 2018). Код око 4-8% пацијената долази до леукемијске трансформације, док се фибротична трансформација јавља код око се јавља код 3-15% пацијената (Cerquozzi и Tefferi, 2015). Просечна дужина преживљавања код ЕТ износи око 20 година, при чему најчешћи узрок смрти јесте леукемијска трансформација. Терапија не утиче на спречавање леукемијске трансформације или фибротичне промене, већ делује на спречавање тромботичних компликација, поготово код пацијената са високим ризиком (Tefferi и сар., 2018).

1.1.3. Примарна мијелофиброза

Мијелофиброза представља најтежи облик МПН, код које се функционално ткиво костне сржи замењује фиброзним ткивом, које не продукује крвне ћелије. Први пут је описана 1897. године, од стране немачког лекара Gustav Heuck-a, кроз два случаја леукемије са неуобичајеним налазом у периферној крви и костној сржи (Heuck, 1879). Међународна група за истраживање и третман мијелофиброзе (енг. International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment, IWG-MRT) дефинисала је мијелофиброзу као примарну, која је настала *de novo* и као секундарну, пост-ПВ или пост-ЕТ мијелофиброзу. Поред тога, пацијенти са трансформацијом у акутну леукемију означавају се као ПМФ у бласт фази или пост-ПВ или ЕТ МФ у бласт фази (Mesa и сар., 2007).

ПМФ се јавља после настанка стечених мутација у матичним ћелијама хематопоезе. Као резултат тога, хематопоеза постаје неефикасна, а често се уочава и пролиферација дисфункционалних мегакариоцита. Основне карактеристике ПМФ су фиброза костне сржи праћена депоновањем ретикулина и колагена, неефикасна екстремедуларна хематопоеза и дерегулисана продукција цитокина. Као последица лучења бројних профиброгених, инфламаторних и ангиогених цитокина, јавља се поликлонска фиброза костне сржи, што води настанку прогресивне спленомегалије, а у неким случајевима и хепатомегалије (Komrokji и сар., 2014). Главне компликације укључују портну хипертензију или инфаркте слезине, цитопеније и повећану вероватноћу трансформације у бласт фазу (Tefferi, 2000; Pardanani и сар., 2011). Болест се најчешће уочава тек у каснијој фази, када су анемија и цитопенија већ присутне. Преживљавање пацијената са ПМФ је 31% ниже у односу на одговарајућу популацију, при чему је дужина просечног преживљавања 5 година, иако је за млађе пацијенте могуће дуже преживљавање (Tefferi и сар., 2007). Смртност је најчешће последица инфекција, тромбоза, срчаних компликација или леукемијске трансформације (Tefferi, 2008).

1.2. Молекуларни маркери МПН

Најзначајније откриће у патогенези МПН јесте откриће *JAK2V617F* мутације 2005. године, до када су се остале МПН називале Филадельфија хромозом-негативне мијелопролиферативне болести, за разлику од ХМЛ (Kralovics и сар., 2005). Молекуларни маркер ХМЛ је *Bcr-Abl* фузија, која се цитогентски види као Филадельфија хромозом, односно транслокација дела дужег крака хромозома 9 на остатак дужег крака хромозома 22, тј. t(9;22)(q34;q11) (Levine и сар., 2005). Поред *JAK2V617F* мутације, код МПН утврђено је и присуство других мутација, као што су *MPL* и *CALR*. Уз наведене мутације, код МПН се јављају и различите цитогенетске абнормалности, укључујући тризомију 9, тризомију 8, делеције 20q и 13q. Значај ових маркера за дијагностику МПН није велики, али указује на потенцијалне маркере укључене у патогенезу ових болести (Sever и сар., 2013).

Мутације у *JAK2*, *MPL*, и *CALR* сматрају се покретачким мутацијама класичних *Bcr-ABL1* негативних МПН. Поред присуства ових мутација, дијагностика се ослања на евалуацију хематолошких параметара и биопсију костне сржи (Schischlik и Kralovics, 2017).

JAK2V617F представља „gain-of-function“ мутацију у гену за Јанус киназу 2. Тачкаста мутација у егзону 14 која води измени једне аминокиселине (валин у фенилаланин) је покретачка мутација у више од 95% пацијената са ПВ и 50-60% пацијената са ЕТ и ПМФ (Kralovics и сар., 2005). Поред тога, у 2-5% пацијената са ПВ пронађена је мутација у егзону 12 *JAK2* гена, која погађа остатак K539 и која у мишијим моделима трансплантата костне сржи индукује сличан МПН фенотип као и V617F (Scott и сар., 2007).

1.2.1. Мутације у генима које утичу на ЈАК-СТАТ сигнални пут

JAK2 ген део је фамилије ЈАК киназа, која обухвата четири киназе (*JAK1*, 2, 3 и *TYK2*) и нековалентно је везана за цитокинске рецепторе за тромбопоетин (ТРО), еритропоетин (ЕРО) и фактор стимулације колонија гранулоцита (енг. *granulocyte colony-stimulating factor*, *GCSF*) (Quintas-Cardama и сар., 2011)

Протеини ЈАК фамилије укључују четири домена: FERM, SH2, псеудокиназни (JH2) и тирозин киназни (JH1) домен. JH1 и JH2 имају хомологе секвенце, али JH2 домен нема киназну активност и функционише као негативни регулатор ЈАК протеина (Saharinen и Silvennoinen, 2002). Рецептори за цитокине активирају се везивањем лиганата, а затим долази до трансфосфорилације ЈАК протеина, што привлачи STAT протеине који затим бивају фосфорилисани од стране ЈАК. STAT димеризују и премештају се у нуклеус, где функционишу као транскрипциони фактори који регулишу експресију кључних гена укључених у пролиферацију, диференцијацију или преживљавање. *JAK2V617F* мутација лоцирана је на JH2 домену, што води конститутивној активацији ЈАК2 киназе и расту ћелија независном од цитокина. Коекспресија цитокинских рецептора, као што су *EPOR*, *TPOR/MPL* или *GCSFR*, неопходна је за индукцију трансформације и активацију низводних протеина (Schischlik и Kralovics, 2017).

1.3. Инфламација

Имунитет је сложен процес који се развио у борби против заразних микроорганизама и у нормалним је околностима строго контролисан. Две главне компоненте имунског одговора су урођени одговор, дизајниран тако да се одмах мобилише за уклањање било какве инфекције (Kumar и сар., 2011), и адаптивни имунитет, чија је карактеристика производња антитела, па

је потребно дуже време иницирања, али је специфично за сваки патоген (Voehn, 2011). Урођени имунитет укључује претежно неутрофиле, моноците и макрофаге, мада су макрофаги такође важни у покретању адаптивног имунолошког система (Kumar и сар., 2011). Адаптивни имунски систем посредован је Т и Б лимфоцитима и резултује стварањем антитела која су специфична за поједине патогене (Voehn, 2011).

Инфламација настаје као последица прилива ћелија имунског система урођеног одговора на захваћено подручје и карактерише је локализовано отицање, еритем, бол и топлота (Medzhitov, 2010). Инфламација представља део урођене имуности и посредована је гранулоцитима и упалним цитокинима које ове ћелије ослобађају, а који помажу у контроли локалног оштећења или инфекције ткива. У већини случајева упала је локализована на подручју оштећења, међутим, у многим поремећајима постоји хронична инфламација, код које је имунски систем континуално активан (Chen и сар., 2018).

1.3.1. Хронична инфламација у МПН

Присуство *JAK2V617F* мутације код МПН у хематопоетским ћелијама мења активност сигналних путева значајних за инфламацију, при чему долази до промене настајања реактивних врста кисеоника код неутрофила (Hurtado-Nedelec и сар., 2013), промене нивоа инфламаторних цитокина у серуму (Poucelot и сар., 2015) и измењене реактивности на ове цитокине (Pradhan и сар., 2010). Интересантна је чињеница да малигни клон није једини извор инфламаторних цитокина. МПН ћелије утичу на околне стромалне ћелије у костној сржи и стимулишу их да производе више инфламаторних цитокина који дају предности преживљавања клону МПН у поређењу са нормалним ћелијама. Ово укључује производњу фактора некрозе тумора α (енг. Tumor necrosis factor, TNF), који смањује пролиферативну активност нормалних хематопоетских ћелија, али омогућава мутираним ћелијама да пролиферишу у његовом присуству (Fleischman и сар., 2011). Оваква хронична инфламација подразумева компликације у виду тромбозе, као и напредовање МПН до АМЛ (Hasselbalch и сар., 2012). У присуству хроничне инфламације, учесталост кардиоваскуларних догађаја повећава се и у другим стањима, као што је реуматоидни артритис (Han и сар., 2006), при чему се и сама кардиоваскуларна болест сматра инфламаторном болешћу ендотела (Hansson, 2005). Хронична инфламација је код МПН, поред прекомерне реактивности тромбоцита, хипервискозности због повишеног броја еритроцита и леукоцита и измењених особина крвних судова, посебан проблем за пацијенте (Landolfi и Di Gennaro, 2011). Уз то, хронично инфламаторно окружење доводи до оштећења хематопоетских матичних ћелија, чиме се додатно смањује њихов број и може бити покретач развоја АМЛ (Tam и сар., 2008).

Главна одлика хроничне инфламације јесте висок ниво цитокина и хемокина у циркулацији, као и нагомилавање реактивних кисеоничних врста, што доводи до генетичке нестабилности и може бити погодно за настанак и прогресију неоплазми (Lussana и Rambaldi, 2017). Код пацијената са МПН уочено је значајно повећање бројних медијатора инфламације, као што су и интерлеукин 6 (IL-6), интерлеукин 8 (IL-8) и TNF- α (Luque и сар., 2019). Поред наведених медијатора, са инфламацијом је повезана и група калцијум везујућих протеина, под називом S100 протеини. Ови протеини су последњих година повезани са различитим малигним болестима, међу којима су и МПН. Стварају се у бројним ћелијама, међу којима су и ћелије мијелоидне лозе: моноцити, неутрофили и активирани макрофаги, где учествују у процесима акутне и хроничне инфламације (Goyette J, Geczy, 2011).

1.4. S100 протеини

Калцијум (Ca^{2+}) представља једног од најзаступљенијих других гласника у ћелијама. Укључен је у регулацију бројних процеса, од којих су неки мишићна контракција, ослобађање неуротрансмитера, раст ћелија, транскрипција гена, апоптоза и инфламација (Santamaria-Kisiel и сар., 2006; Ishida и Vogel, 2013; Kaufmann и сар., 2019). Због наведених важних улога које калцијум има, његова концентрација, која се у физиолошким условима креће од 100 nM у стању мировања, до 1 μM у току активног преноса сигнала, под строгом је регулацијом (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).

У ћелију калцијум улази путем волтажно – или рецептор – зависних јонских канала, који се активирају по деполаризацији мембране или везивању лиганда. Поред тога, ендоплазмички ретикулум представља унутарћелијски депо калцијума, одакле се ослобађа посредован активацијом рецептора за инозитол 1,4,5-трисфосфат. Стационарни нивои успостављају се деловањем мембранских пумпи или поновним транспортом у ендоплазмички ретикулум путем Ca^{2+} АТПаза (Barrige и сар., 2003). Највећи део унутарћелијског калцијума везује се за калцијум-везујуће протеине, који за калцијум имају високи афинитет, висок везивни капацитет или специфичне кинетичке особине које омогућавају да нивои и доступност калцијума у цитоплазми буду прецизно подешени. Међутим, најважнији ефекти калцијумом активираних сигналних путева јесу нисходни биолошки догађаји модулисани везивањем калцијума за велики број калцијум сензорних протеина. Највећу групу сензорних протеина чине калцијум везујући протеини са мотивом EF-шаке. У хуманом геному идентификовано је више од 600 чланова ове протеинске фамилије (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).

Структурни мотив EF-шаке има топологију типа хеликс-петља-хеликс, где се јони калцијума координативно везују за лиганде унутар петље. Овај мотив изграђен је од око 40 аминокиселина, организованих у два α -хеликса од по 12 аминокиселина, док остатак чини хидрофобно језгро које стабилизује структуру (Taylor и сар., 1991). Структурна анализа указује да су хелирајући остаци лоцирани у калцијум везујућој петљи између два хеликса и око јона калцијума формирају конзервирану пентагоналну бипирамидну структуру. Најјаче везивање јона калцијума остварује се преко остатака аспартата и глутамата на координативним позицијама, као и глицина на једној од некоординативних позиција (Marsden и сар., 1990). Функционални EF домени јављају се у паровима и неопходни су за формирање правилне структуре протеина и варијације у кооперативности за везивање калцијума (Shaw и сар., 1990). Уобичајена подела калцијум везујућих протеина са доменом EF шаке на сензоре калцијума и регулаторе нивоа калцијума показала се само условном, јер се код великог броја протеина ове функције преклапају, што одсликава њихову значајну улогу у регулацији процеса у којима учествује овај јон (Denessiouk и сар., 2014).

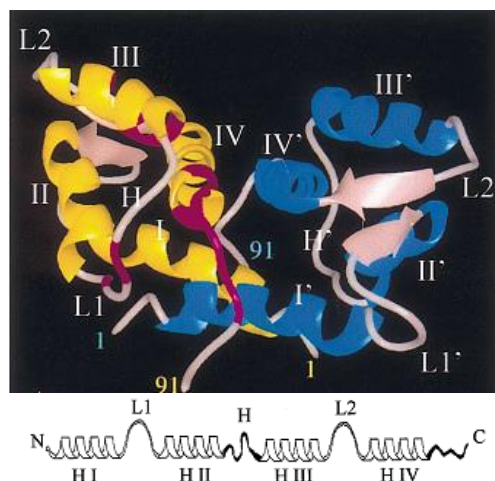
Најбројнију фамилију калцијум везујућих протеина са доменом EF-шаке чини фамилија S100 протеина. Ови протеини су први пут идентификовани од стране Мооре-а 1965. године, у централном нервном систему (Moore, 1965). Назив ових протеина потиче од њихове растворљивости у 100% засићењу амонијум хлорида, који је употребљен за преципитацију (Sedaghat и Notopoulos, 2008). S100 протеини су мали кисели протеини, са молекулским масама 9-13 kDa. Ова протеинска фамилија броји око 25 до сада познатих представника (Donato, 2003). Група од 21 припадника ове фамилије, у коју спадају S100A1-S100A18, трихохијалин, филагрин и репетин, кодирана је кластером гена лоцираним на хромозомском локусу 1q21, који је познат као епидермални диференцијациони комплекс. Остали припадници лоцирани су на хромозомским локусима 4p16 (S100P), 5q14 (S100Z), 21q22 (S100B) и Xp22 (S100G) (Sedaghat и Notopoulos, 2008). На нивоу аминокиселинске секвенце, ови протеини показују идентичност од око 25% до 65%. Најваријабилнији делови секвенце налазе се на Ц-термину и у оквиру линкер региона који повезује два EF-домена (Murtagh и сар., 2012).

S100 протеини јављају се искључиво код кичмењака, док се код нижих организама не јављају (Donato, 2003). Претрага геномских база података не указује на постојање ових

протеина код организама као што су биљке, квасци, *C. Elegans* или *Drosophila*, што указује да су ови протеини филогенетски релативно нови.

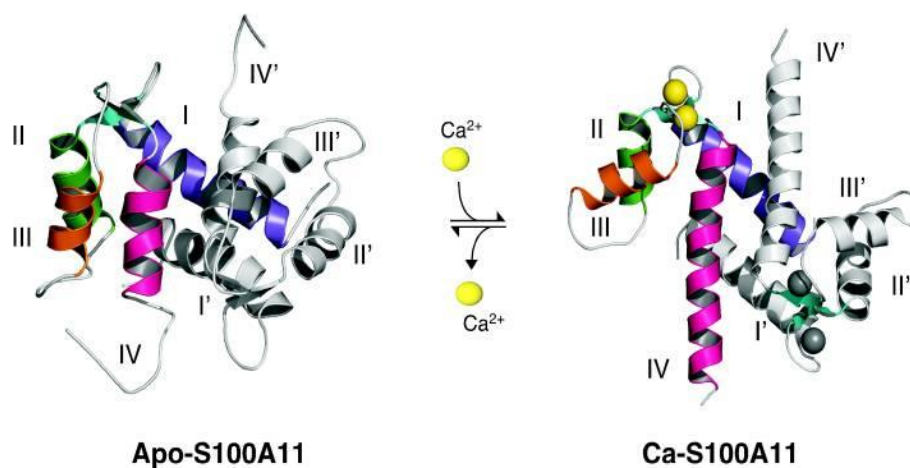
1.4.1. Структурне карактеристике S100 протеина

Главна структурна карактеристика S100 протеина је присуство домена EF-шаке. N-терминални EF домен садржи хеликс I са псеудо калцијум везујућим местом I и хеликс II, који су раздвојени флексибилним линкером од C-терминалног домена. C-терминални домен обухвата хеликс III, калцијум везујуће место II и хеликс IV (слика 1). У свим до сада одређеним структурама, уз изузетак S100G, S100 протеини јављају у облику симетричних димера, у којима сваки димер садржи два EF мотива и према томе, четири калцијум везујућа места (Donato, 2001). C-терминални EF домен садржи место за везивање калцијума које је изграђено од 12 аминокиселина и означава се као канонично, док је N-терминално место изграђено од 14 аминокиселина (Schafer и Heizmann, 1996).



Слика 1. „Ribbon“ модел структуре димера апо-S100 протеина и приказ распореда структурних елемената (преузето из: Donato, 2001)

Поред структуре нешаржираног, апо-S100, утврђене су и структуре протеина шаржираног калцијумом, као и облика везаног за ефекторне протеине. У овим структурама уочава се да протеин пролази кроз значајну конформациону промену при везивању калцијума (слика 2), чиме се хидрофобна површина чини доступном за интеракцију са циљним протеином (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).



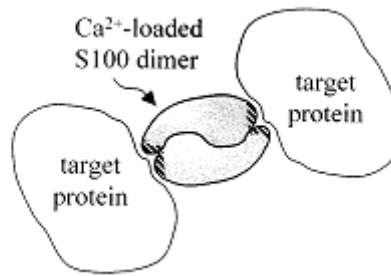
Слика 2. Калцијумом индукована промена конформације S100 протеина (преузето из Santamaria-Kisiel и сар., 2006)

Додирна површина између два мономера у димеру сачињена је из хеликса I и IV, при чему је сваки мономер у посебној конформацији. Однос између хеликса строго је очуван, како у апо-облику, тако и у калцијум-везаном стању. Приликом везивања калцијума, изражена је кооперативност између два везивна места, иако је афинитет оба везивна места скоро идентичан (Linse и Chazin, 1995). Код апо-S100, распоред хеликса III и IV је више затворен, при чему везивање калцијума за хеликс III доводи до реоријентисања и заузимања отворене структуре. То указује да калцијумом индукована конформациона промена резултује излагањем остатака из хеликса III и IV у С-терминалном EF домену и линкер региону, тако да је међусобна интеракција протеина олакшана (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).

Највећи број протеина S100 фамилије у ћелијама формира хомодимере, код којих се мономери држе бројним нековалентним интеракцијама између претходно наведених сегмената. Ово је показано методама као што су NMR спектроскопија и кристалографија X-зрака за протеине S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A10, S100A11, S100A12 и S100B. Изузетак је S100G, који се у ћелијама налази искључиво у облику мономера. Поједини S100 протеини, као што су S100A1/S100B, S100A8/S100A9, S100B/S100A6, S100A1/S100A4 и S100B/S100A11 формирају хетеродимере. У ћелијама, хетеродимер S100A8/S100A9 је преобладајућа форма, при чему овај димер може стварати и мултимере вишег реда, као што су тетрамери или већи олигомери (Chakraborty и сар., 2015).

Везивање калцијума за димерни S100 представља главни механизам посредовања њихових функција, при чему сваки димер везује четири јона калцијума, са релативно ниским афинитетом, који зависи од јонске јачине пуферског система који се користи. Поред тога, поједини S100 могу везати и јоне цинка (Zn^{2+}), на везивно место које је различито од везивног места за калцијум. У неким случајевима, везивање Zn^{2+} за S100 утиче на афинитет за везивање калцијума. Такође, неки од чланова S100 фамилије могу везати и јоне бакра (Cu^{2+}) (Heizmann и сар., 1998).

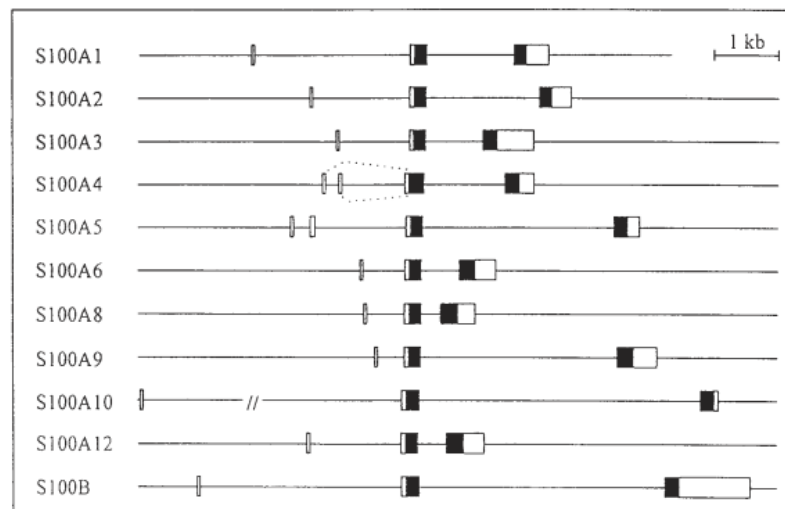
Димеризација S100 протеина неопходна је за њихову биолошку активност. Конформационе промене, до којих долази због везивања калцијума, омогућавају формирање шупљине у сваком од мономера, које су од значаја за калцијум зависно препознавање циљног протеина и интеракцију са њим. По везивању калцијума, конформација сваког од мономера се мења ради акомодирања циљног протеина, при чему S100 димери могу везати циљни протеин са супротних страна. На овај начин, S100 димери функционално умрежавају два хомолога или хетеролога циљна протеина (слика 3).



Слика 3. Модел везивања S100 димера за циљне протеине (Donato, 2001)

1.4.2. Организација генског локуса S100 протеина

Структурна организација *S100* гена веома је конзервирана и генерално се састоји из три егзона (слика 4). Први егзон садржи искључиво 5'-нетранслатирајуће секвенце, док други егзон кодира део 5'-нетранслатирајуће секвенце и N-терминални S100-специфични EF домен. Трећи егзон кодира C-терминални канонични EF домен, као и 3'-нетранслатирајуће секвенце. Изузеци су *S100A4*, који садржи две варијанте првог егзона које се алтернативно сплајсују у зrelu информациону РНК (иРНК), *S100A5* са четири егзона, који су сви присутни у зрелој иРНК и *S100A11*, са јединственом егзон-интрон организацијом (Nakamura и сар., 1998).



Слика 4. Структурна организација хуманих *S100* гена на 1q21 локусу (преузето из Heizmann, 2002)

Бројне абнормалности везане за хромозом 1q21, као што су делеције, реаранжмани или транслокације често су повезане са појавом неопластичних трансформација (Heizmann, 2002; Leclerc, 2011). Будући да је број гена у овом генском кластеру велики, значајно је питање регулације. Карактеристична особина S100 протеина јесте њихова експресија која је специфична за тип ћелија, често повишена или снижена у различитим патолошким стањима. Без обзира на то што су *S100* гени лоцирани у кластеру, не постоји доказ њихове синхронизоване регулације, било на начин који зависи од типа ћелија, ни на начин који условљава образац развића. Показано је да експресија *S100* гена има веома специфичан образац (Elder i Zhao 2002; Cross и сар., 2005). Могућност реактивације транскрипције ових гена у неекспримирајућим ћелијама третманом инхибиторима ДНК метилтрансферазе, као што је 5-аза-цитидин, указала ја на вероватну епигенетичку регулацију транскрипције

(Leśniak, 2011). Промене у експресији S100 протеина обично су карактеристичне за одређени тип малигнитета и стога се могу сматрати маркером малигног поремећаја (Drier и сар., 1987; Leclerc, 2011; Bresnick и сар., 2015).

1.4.3. Пост-транслационе модификације S100 протеина

Пост-транслационе модификације неколико S100 протеина могу да интерферирају са везивањем метала, интеракцијама са циљним протеинима, као и калцијум зависном секрецијом и ванћелијским функцијама или транслокацијом унутар ћелија. Протеини као што су S100A8, S100A9 и S100A11 пост-транслационо су модификовани фосфорилацијом (Van den Bos и сар., 1996; Donato, 2003) а показано је да могу везати и незасићене масне киселине, што је значајно за њихову релокацију или везивање за ћелијску мембрану, на начин сличан калцијум-миристоил „switch“-у других калцијум везујућих протеина, као што је рековерин (Senin и сар., 2002). Фосфорилација протеина S100A1, S100A2, S100A4, S100A6 и S100B утиче на интеракцију ових протеина са доменима тумор супресора p53, што има значајне импликације у неопластичној трансформацији (Van Dieck и сар., 2009). Поред тога, пост-транслационе модификације S100 протеина могу бити и метилација и ацетилација циљних остатака (Raftery и сар., 1996), као и оксидација (Lim и сар., 2009).

Оксидативне модификације цистеинских остатака у S100 протеинима веома су значајне за регулацију њихове активности. Ови аминокиселински остаци високо су конзервирани унутар S100 хомолога међу врстама, а њихова оксидација може бити реверзибилна и ирреверзибилна. Реверзибилност је последица дејства различитих ензима, док су ирреверзибилне модификације конверзија цистеина у остатке сулфенске и сулфонске киселине и нитрозилација тирозина. Током прогресије инфламаторног одговора, ирреверзибилне модификације могу имати патолошки значај (Lim и сар., 2009).

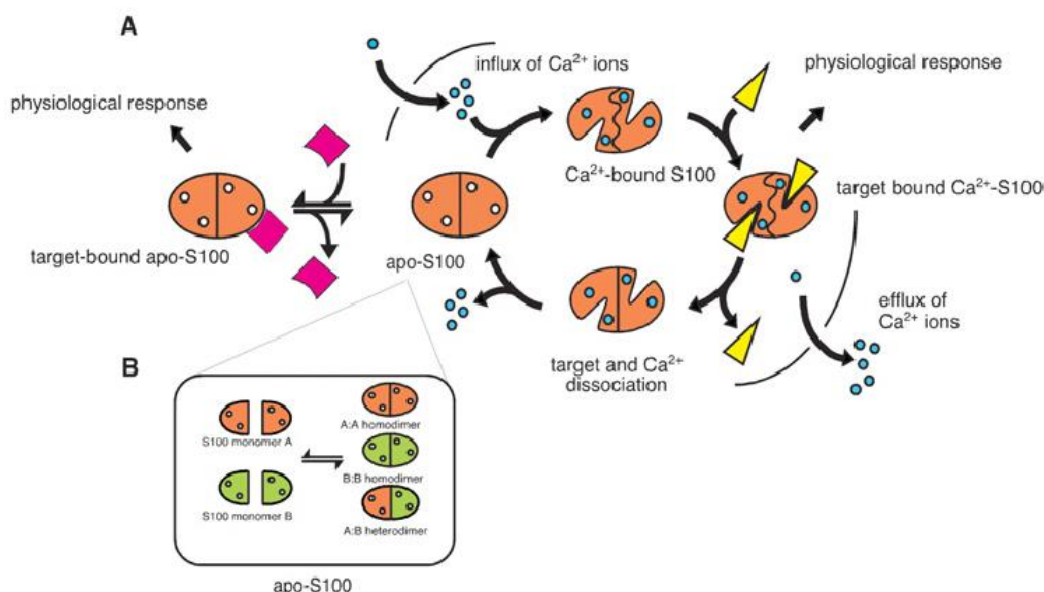
1.4.4. Биолошке функције S100 протеина

За разлику од других калцијум везујућих протеина, експресија S100 протеина је специфична за одређени тип ћелија. Значајно је да, иако се експримирају на начин који је специфичан за поједине типове ћелија, на њихову експресију утичу спољашњи фактори, што указује на комплексну транскрипциону регулацију (Castets и сар., 1997; Xu и Geczy, 2000; Donato, 2003).

Нивои S100 протеина које стварају различите ћелије нису фиксирани, већ се у појединим ћелијама синтетишу у већим количинама, док се у другим не синтетишу. Ово одликава функционалну улогу S100 протеина, тип ћелије у коме се ствара, као и присуство других протеина исте фамилије. Будући да су специфични за одређени тип ћелија, њихов велики број није само последица преклапања, јер се поједини чланови не могу заменити другим. Међутим, постоје примери да неколико S100 протеина има заједничке циљне протеине и према томе, регулишу и идентичне путеве, као и неколико примера у којима су различити S100 протеини укључени у регулацију сличних активности у ћелијама. Разноликост циљних протеина са којима S100 ступају у интеракцију, као и специфичност у стварању одређених чланова S100 фамилије указује на њихову улогу у финој регулацији ефекторских протеина и специфичних корака сигналних путева (Donato, 2003).

Улоге које S100 протеини имају у организму могу се генерално поделити на унутарћелијске и ванћелијске (Donato, 2003). Такође, будући да S100 протеини везују калцијум, интеракције које они остварују могу се поделити према томе да ли су зависне или

независне од присуства јона калцијума (Santamaria-Kisiel и сар., 2006). Унутарћелијске функције ових протеина најчешће су калцијум-зависне. Схематски приказ интеракција које протеини S100 фамилије остварују у зависности од присуства калцијума приказане су на слици 5.



Слика 5. Калцијум зависне и независне интеракције S100 протеина (преузето из Santamaria-Kisiel и сар., 2006)

При ниским концентрацијама калцијума, S100 протеини налазе се у апо-форми, која нема за себе везан калцијум. Када се путем волтажно зависних или лиганд зависних јонских канала повећа концентрација калцијума, S100 протеини везују калцијум и доживљавају конформациону промену, којом се модификују особине њихове хидрофобне површине. Та промена омогућава им да остваре интеракцију са великим бројем циљних протеина и на тај начин доведу до биолошког одговора. Уклањање калцијума деловањем Ca²⁺-АТПаза доводи до дисоцијације калцијума и циљног протеина од S100 и његов повратак у апо-форму. Поред калцијум зависне функције, поједини S100 протеини могу деловати и на калцијум независан начин. Ово се огледа у формирању различитих хомо- и хетеродимера, при чему ниво сваког од типова мултимера зависи од нивоа експресије појединачних S100 у ћелији, као и њиховог афинитета за формирање мултимера (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).

1.4.4.1. Унутарћелијске функције S100 протеина

Унутарћелијске, калцијум-зависне улоге S100 протеина могу се класификовати у следеће функционалне групације (Donato, 2003; Santamaria-Kisiel и сар., 2006):

1. Регулација фосфорилације посредоване протеин киназама;
2. Модулација ензимске активности;
3. Одржавање облика и покретљивости ћелије (деловање на динамику цитоскелета);
4. Утицај на поједине сигналне путеве;
5. Утицај на хомеостазу калцијума;
6. Утицај на транскрипционе факторе;
7. Утицај на ћелијски раст и диференцијацију.

1.4.4.1.1. Регулација фосфорилације

Регулација фосфорилације посредоване протеин киназама путем S100 протеина може се остварити на два начина: блокадом приступа киназа супстратима (Donato, 2003), као и

активацијом фосфопротеин фосфатаза, као што је PP5, које дефосфорилишу циљне супstrate (Yamaguchi и сар., 2012). Ова регулација представља начин финог подешавања активности циљног протеина, пошто је у највећем броју случајева ефекат S100 протеина зависан од нивоа калцијума. То такође представља и пример „cross-talk“ комуникације између цитосолних промена у нивоу Ca²⁺ и фосфорилације протеина. Тако је, на пример, S100A4 зависна инхибиција фосфорилације тешког ланца миозина везана са динамиком цитоскелета у метастатским ћелијама солидних тумора (Kriajevska и сар., 1998), док S100A4 зависна инхибиција фосфорилације p53 доводи до инхибиције p53-зависне активације транскрипције и стога, тумор супресорне активности p53 (Orre и сар., 2013).

1.4.4.1.2. Модулација ензимске активности

S100 протеини укључени су у бројне процесе регулације и модулације ензимске активности у различитим типовима ћелија и ткива. Протеински хетеродимер S100A8/S100A9 модулира активност ензима казеин киназе I и II, два ензима која катализују фосфорилацију топоизомеразе I и РНК полимеразе I и II у ћелијама мијелоидне лозе, што указује на потенцијалну улогу S100A8 и S100A9, као и S100A8/S100A9 хетеродимера у регулацији сазревања и функционисања ових ћелија. Моноцити експримирају S100A8 и S100A9 у раним фазама диференцијације. Експримирају се у инфилтрирајућим моноцитима, али не и у резидентним ткивним макрофагима, што указује да су експресија S100A8 и S100A9, формирање S100A8/S100A9 комплекса и S100A8/S100A9-зависна регулација активности казеин киназе I и II повезани са макрофагима, као финалном функционалном формом ових ћелија и учествују у инфламаторном одговору (Zwadlo и сар., 1988; Passey и сар., 1999).

Протеин S100B укључен је у фосфорилацију тау протеина и модулацију киназне активности NDR киназе и протеин киназе II, а механизам ових инхибиција везан је за директну интеракцију S100 са киназом. Поред тога, ензимска активност алдолаза A и Ц и фосфоглукомутазе модулирана је интеракцијом са S100A1 или S100B, при чему S100B стимулише ензимску активност, а S100A1 делује инхибиторно. Модулација ензимске активности метионил аминокептидазе II (MetAP2) одвија се путем интеракције са S100A4 (Santamaria-Kisiel и сар., 2006). Такође, показано је да S100A1 активира протеин киназу A (PKA) на начин који је независан од цикличног аденозин-монофосфата (сAMP) (Melville и сар., 2017).

S100A10 инхибира цитосолну форму фосфолипазе A2 (PLA2), при чему протеин асоцира са ензимом *in vivo*, а формирање комплекса S100A10/PLA2 резултује смањењем отпуштања арахидоната у култивисаним ћелијама. Ово указује на потенцијалну антиинфламаторну улогу S100A10 (Madureira, 2012).

1.4.4.1.3. Одржавање облика и покретљивости ћелије

Највећи број интеракција S100 протеини остварују са компонентама цитоскелета, укључујући тубулине, интермедијерне филаменте, миозин, тропомиозин и актин. Интеракција протеина S100A1, S100A2, S100A4, S100A6 и S100A11 са елементима цитоскелета представља ефикасан механизам за калцијум-зависно агрегирање мембране и формирање везикула, састављање актинских филамената, интеракцију са миозином IIa i успостављање фокалне адхезије (Goh Then Sin и сар., 2011), као и формирање и функционисање актомиозинске мреже (Gross, 2017). Уз то, S100B контролише динамику микторубула (Sorci, 1998) и регулише екстензију актинских филамената путем интеракције са актин сарпинг протеином (CapZ) (Kilby и сар., 1997).

1.4.4.1.4. Утицај на сигналне путеве и инфламаторне одговоре

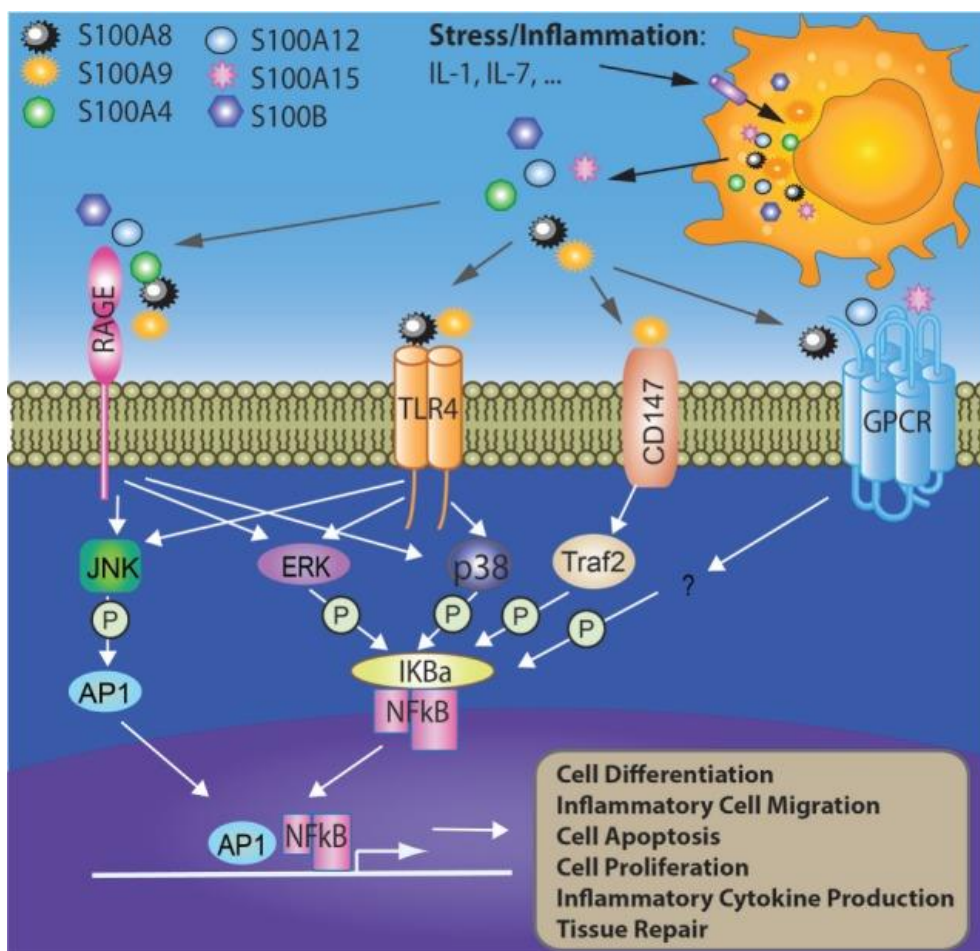
S100 протеини су укључени у ћелијске одговоре на стрес и инфламацију. Везивање S100 протеина за рецепторе на површини ћелије, као што су рецептор за продукте унапредовале гликације (енг. receptor for advanced glycation endproducts, RAGE), рецептори слични Toll-у 4 (енг. Toll-like receptor, TLR4), CD147 и рецептори спрегнути са G-протеином

(енг. G-protein coupled receptor, GPCR) активирају унутарћелијске сигналне путеве посредоване активаторским протеином 1 (енг. activator protein 1, AP1) и NFκB. Активација ових сигналних путева даље доводи до иницијације различитих процеса у ћелији, као што су диференцијација, пролиферација, миграција, инфламација и апоптоза (Xia и сар., 2018). Схематски приказ активације наведених сигналних путева приказан је на слици 6.

1.4.4.1.5. Регулација хомеостазе калцијума

Значајну улогу у регулацији хомеостазе калцијума има S100A1. Овај протеин лоциран је на мембрани саркоплазмског ретикулума попречно-пругастих ћелија скелетних и срчаног мишића, као и перинуклеарним мембранама неколико типова ћелија. Своје функције у овим ћелијама остварује путем везивања за ријаноидински рецептор (енг. Ryanodine receptor, RyR), при чему продужава отворено стање RyR јонског канала (Donato, 2003, Hernández-Ochoa и сар., 2018).

У нервном ткиву, S100B има улогу у регулацији нивоа калцијума, посредно, путем регулације других ефекторских протеина укључених у одржање хомеостазе Ca²⁺. Уз то, показано је да S100B реагује са ефекторским молекулима који активирају фосфолипазу C-γ (енг. phospholipase C—γ, PLC—γ), у присуству арахидоната, при чему настају инозитол трифосфат и диацилглицерол, други гласници који регулишу ниво калцијума у ћелији (Sekiya и сар., 1999).



Слика 6. Улога S100 протеина у активацији сигналних путева у ћелији (преузето из Xia и сар., 2018)

1.4.4.1.6. Интеракција S100 са транскрипционим факторима

Протеини S100 фамилије, као што су S100A1 и S100B, остварују интеракцију са секвенцама за везивање базних хеликс-петља-хеликс транскрипционих фактора (енг. basic helix-loop-helix, bHLH) MyoD и E12. Такође, показано је да у том случају S100A1 инхибира и фосфорилацију MyoD. Везивање ових протеина за bHLH секвенце на MyoD регулисано је N-терминалним секвенцама MyoD, које чине bHLH мотив недоступан S100 протеинима за везивање. На основу наведеног, сматра се да су S100 регулатори активности одређених транскрипционих фактора (Donato, 1999).

1.4.4.1.7. Утицај S100 на ћелијски раст и диференцијацију

Једна од основних карактеристика хуманих малигнух болести јесте дерегулисан ћелијски раст и диференцијација. Будући да су S100 протеини лоцирани на хромозому 1q21 и чине важну компоненту епидермалног диференцијационог комплекса, укључени су у процес терминалне диференцијације епидерма и значајни су за малигне болести (Chen и сар., 2014). Такође, експресија појединих чланова S100 фамилије у корелацији је са диференцијацијом неопластично трансформисаних ћелија, као што је то случај са S100A4 и S100A14 у колоректалном карциному (Wang и сар., 2010). Код појединих типова карцинома, као што је случај са карциномом оралних сквамозних ћелија, више студија је показало да, поред повећане експресије неких S100 у корелацији са диференцијацијом, експресија других S100 може бити и снижена. Показано је да код ових типова карцинома нивои S100A7 расту са степеном диференцијације тумора, док су нивои S100A2, S100A6, S100A8/9, S100A14 и S100A16 снижени (Kubegara и сар., 2016).

Губитак регулације ћелијског циклуса представља главну алтерацију у контроли ћелијске деобе, што води неограниченој пролиферацији. У овај поремећај регулације укључено је и неколико S100 протеина, у које спадају S100A1, S100A4, S100A6, S100A8/A9 и S100A14. Унутарћелијски S100 могу интераговати са p53, утичући на тај начин на p53-посредовану регулацију ћелијског циклуса и пролиферације (Chen и сар., 2014).

Регулација диференцијације мијелоидних прогениторских ћелија у макрофаге и дендритичне ћелије у нормалној хематопоези посредована је S100A9 протеином. Показано је да мијелоидне прогениторске ћелије снижавају експресију S100A9, при чему се диференцирају у макрофаге и дендритичне ћелије (Cheng и сар., 2008). У случају неопластично трансформисаних мијелоидних прогениторских ћелија, долази до прекомерне продукције S100A9 протеина, чиме се онемогућава диференцијација. Као последица, јавља се нагомилавање супресорских ћелија пореклом од мијелоидне лозе (енг. Myeloid derived suppressor cells, MDSC), мешовите групе ћелија која укључује незреле гранулоците, макрофаге, дендритичне ћелије и мијелоидне прогениторе. Повећање њиховог броја јавља се како у хематолошким малигнитетима, тако и у солидним туморима, у микрооколини тумора (Tamburini, 2017). Деловање овог протеина, као и хетеродимера S100A8/A9 на диференцијацију остварује се путем везивања за TLR4 и активацијом сигналних путева као што су MAPK и NFκB (Laouedj и сар., 2017).

1.4.4.2. Ванћелијске функције S100 протеина

Према Donato (2001), ванћелијске функције S100 протеина могу се класификовати као:

1. Регулација инфламаторног одговора
2. Регулација спољашњег пута коагулације крви
3. Трофички и токсични ефекти које S100 остварују у нервном систему

Највећим делом, ванћелијска функција S100 протеина зависи од конкретног представника који се разматра, а ове функције су такође калцијум зависне. Више студија указало је да се одређени S100 протеини лучше у ванћелијску средину и испољаву своје дејство на ендокрини, аутокрини или паракрини начин (Chen и сар., 2014). Ванћелијски S100 могу

бити укључени у регулацију апоптозе, пролиферације, диференцијације и миграције више типова ћелија, укључујући моноците, макрофаге, неутрофиле, лимфоците, миобласте, епителне ћелије, ендотелске ћелије, глатке мишићне ћелије, неуроне и фибробласте (Xia и сар., 2018).

1.4.4.2.1. Регулација инфламаторног одговора

Утицај на инфламаторне одговоре остварује неколико представника S100 фамилије, а могу деловати како из ванћелијске средине, тако и унутар ћелија. По ослобађању у ванћелијски простор, ови протеини укључени су у регулацију хомеостазе имунског система, поастрауматског оштећења ткива и инфламацију. Инфламаторни одговори активирају се везивањем S100 за RAGE и TLR рецепторе, при чему долази до активације NF-κB сигналног пута и продукције проинфламаторних цитокина, миграције неутрофила, моноцита и макрофага (Xia и сар., 2018; Hofmann и сар., 1999). Везивање S100A1, S100A4, S100A6, S100A8/A9, S100A11, S100A12, S100A14, S100B и S100P за RAGE активира сигналне путеве који укључују MAP кинази, NF-κB и фосфатидилинозитол 3-кинази (PI-3K)/АКТ сигнални пут. Ово омогућава S100 протеинима да учествују у регулацији инфламације и са њом повезане неопластичне трансформације (Chen и сар., 2014).

1.4.4.2.2. Регулација спољашњег пута коагулације крви

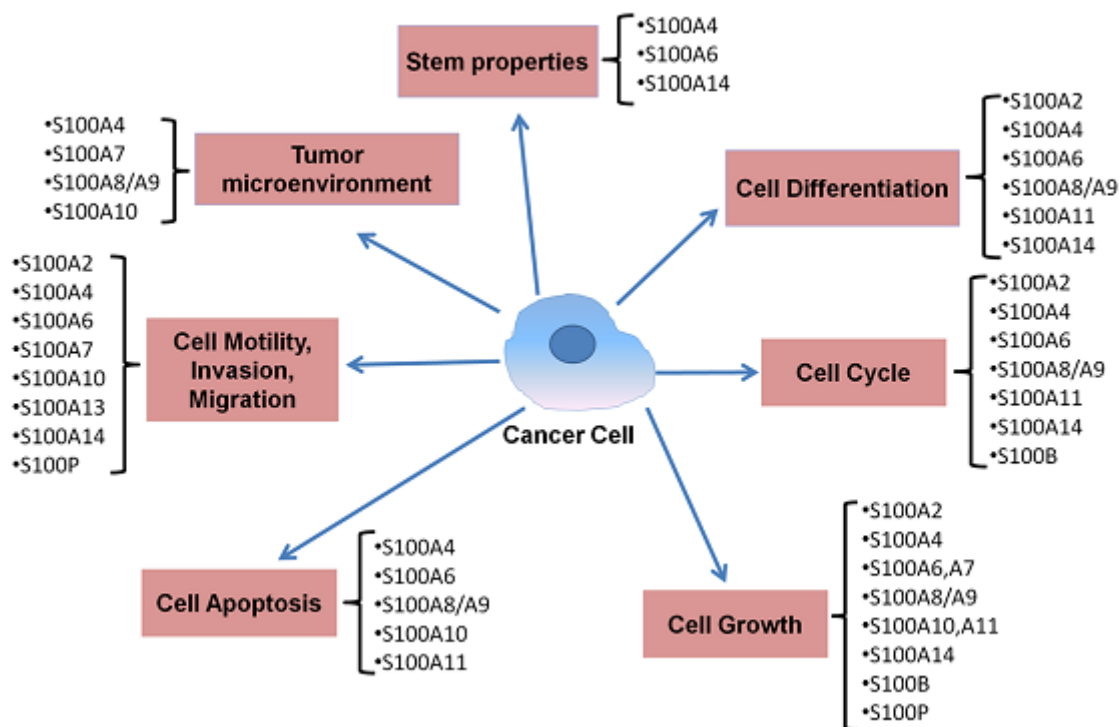
Поједини чланови S100 фамилије, као што је S100A10 учествују у регулацији спољашњег пута коагулације крви везивањем за плазминоген преко његових С-терминалних лизинских остатака и стимулацијом ткивног активатора плазминогена (t-PA). Такође, значајан аспект овог регулаторног механизма јесте и заштита плазмине и t-PA од инактивације α₂-антиплазмином и инхибитором активатора плазминогена тип 1 (Donato, 2001).

1.4.4.3. Интеракције S100 протеина независне од присуства калцијума

Поједини представници S100 протеинске фамилије могу остваривати интеракције са циљним протеинима на калцијум-независтан начин. Најчешћи партнери за овакав вид интеракције са апо-S100 су ензими, као што су гликоген фосфорилаза и трансглутаминаза, као и елементи цитоскелета, као што је изоформа А тешког ланца II немишићног миозина или F-актин (Santamaria-Kisiel и сар., 2006). У случају F-актина, у *in vitro* условима јачина везивања са S100 значајно се повећава по везивању калцијума (Li и сар., 2003), што показује да у *in vivo* условима овакав вид интеракција није од великог значаја (Zhang и сар., 2005). Остали партнери за интеракцију са апо-S100 од значаја за канцерогенезу и инфламацију су p53, липрин β1, карбоксилувани гликани, фосфолипаза A2 и бројни други молекули (Santamaria-Kisiel и сар., 2006).

1.4.5. S100 протеини у канцерима

Основна обележја малигнух болести су неконтролисани раст ћелија и инвазија или метастаза. Овом фенотипу доприносе и аберадна пролиферација ћелија, измена програма диференцијације, губитак нормалне апоптозе, интензивирање ангиогенезе и избегавање имунског одговора на тумор (Weinberg, 2013). Основне функције S100 протеина, као што су утицај на пролиферацију, апоптозу, метастазирање, микрооколину и матичне ћелије тумора, значајно мењају и одређују основне фенотипске карактеристике тумора. Ове функције S100 протеина сумиране су на слици 7.



Слика 7. Функције S100 протеина у току туморигенезе (преузето из Chen и сар., 2014).

1.4.6. Улога S100 протеина у неопластичној трансформацији, апоптози и метастазирању

Везивањем за рецепторе као што су RAGE и TLR4, протеини S100 фамилије доприносе пролиферацији и неопластичној трансформацији. Повишена експресија S100 протеина стимулише раст тумора, док је смањена експресија повезана са смањењем раста тумора. Пример су хумани аденокарцином, остеосарком, ћелије карцинома простате, карцином дојке и плућа код којих је смањење експресије S100A4 довело до смањења раста тумора *in vivo* (Chen и сар., 2014; Grum-Schwensen и сар., 2015; Hou и сар., 2018). Наведени примери, као и бројни други, указују да би S100 протеини могли бити терапијски циљеви у онкогенези.

Поремећаји и превазилажење апоптозе, као строго регулисаног програма ћелијског умирања, једна је од основних стратегија у преживљавању и метастазирању туморских ћелија (Weinberg, 2013). Поједини чланови S100 фамилије протеина, као што су S100A4, S100A6 и S100A8/9 учествују у регулацији апоптозе. Тако на пример, S100A4 делује антиапоптотски, док снижење његове експресије индукује апоптозу и повећава осетљивост на терапију у случају карцинома панкреаса. Ванћелијски S100A8/9 може инхибирати раст различитих типова нормалних ћелија, као што су макрофаги, лимфоцити или фибробласти, док може деловати апоптотски у ћелијама различитих тумора (Chen и сар., 2014).

Метастазе представљају главни узрок смрти највећег броја оболелих од малигнух болести. Комплексни путеви сигнализације, који обухватају туморске ћелије и њихову микрооколину, посредују у инвазији примарног места настанка, преживљавању и ширењу кроз крвоток и прогресивном расту на удаљеном месту у организму (Steeg, 2006; Valastyan и Weinberg, 2011). Процес метастазирања укључује каскаду секвенцијалних догађаја, која обухвата инвазију, миграцију, превазилажење имунског одговора, екстравазацију, ангиогенезу и раст тумора. У бројне кораке у процесу метастазирања укључени су и S100 протеини, од

којих су неки потврђени маркери овог процеса. Тако је на пример, S100A4 маркер епителијално-мезенхималне транзиције (енг. epithelial-mesenchymal transition, EMT), који промовише миграциони фенотип (Garrett и сар., 2006).

1.4.7. S100 протеини од значаја за мијелопролиферативне неоплазме

Протеини S100 фамилије који су потенцијално од највећег значаја за мијелопролиферативне неоплазме због свог туморигеног и проинфламаторног деловања су S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12.

1.4.7.1. S100A4

Првобитни назив за S100A4 био је метастатин, због његове преференцијалне експресије у ћелијама тумора, а касније студије потврдиле су да је његова функција везана за инвазивност и покретљивост туморских ћелија (Leclerc, 2016). Ген за хумани S100A4 лоциран је на хромозому 1q21 и састоји се од четири егзона који кодирају протеин од 101 аминокиселине. Сматра се да је метастаза-индукујући, али не и тумор-иницирајући онкоген (Fei и сар., 2017).

Као унутарћелијски, нуклеусни протеин, S100A4 интерагује са p53 и модулира његову транскрипциону активност. Такође, сматра се да *in vivo*, овај протеин убрзава деградацију p53, што за последицу има убрзан раст тумора. S100A4 такође интерагује са протеинима цитоскелета, као што су немишићни миозин II и тропомиозин, који су укључени у реорганизацију цитоскелета током ћелијске миграције и инвазије. Овај протеин се ослобађа како из нормалних, тако и из туморских ћелија. Нормалне ћелије које луче S100A4 су фибробласти, леукоцити и ендотелске ћелије, а луче га и ћелије карцинома дојке и оваријума, остеосаркома и аденокарцинома. Као ванћелијски протеин, стимулише раст тумора и ангиогенезу на месту метастаза (Boye и Maelandsmo, 2010).

Ванћелијски S100A4 ослобађа се од стране тумора или стромалних ћелија и мења микрооколину тумора, појачавајући прометастатске активности као што је ангиогенеза и различити ефекти на леукоците (Fei и сар., 2017). Интерагује са анексином 2 и RAGE, а интеракција са анексином 2 резултује у формирању плазмине из плазминогена, што води повећаној ангиогенези и формирању капиларима сличних цевчица од стране ендотелских ћелија (Boye и Maelandsmo, 2010). Показано је да сигнализација путем RAGE/S100A4 повећава покретљивост артеријских глатких мишићних ћелија плућа, као и туморигенезу и метастазирање код колоректалног карцинома и карцинома простате (Leclerc, 2016). S100A4 учешћем у молекуларној сигналној мрежи доприноси метастазирању, кроз модулацију како примарног тумора, тако и метастатске нише (Fei и сар., 2017).

1.4.7.2. S100A8/A9

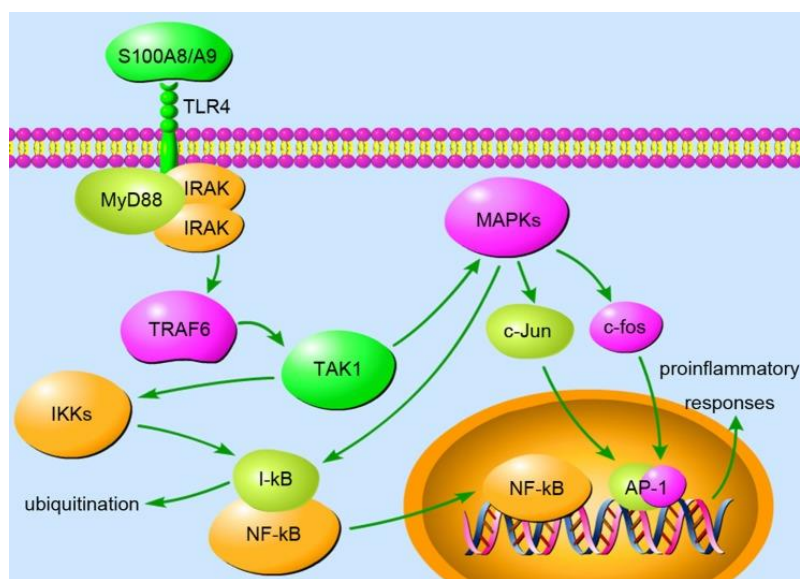
Хумани S100A8 (калгранулин А; MRP8) и S100A9 (калгранулин Б; MRP14) изграђени су од 93 и 113 аминокиселина респективно, док S100A9 има и скраћену форму, са 110 аминокиселина. S100A8 и S100A9 се највећим делом ослобађају од стране неутрофила и моноцита, при чему могу формирати стабилан хетеродимер или хомодимере, како *in vitro*, тако и *in vivo*. Ова два протеина чине око 45% протеинске фракције неутрофила. Под физиолошким условима, постоји значајна залиха ових протеина у неутрофилима и дендритичним ћелијама, док се нижи нивои јављају у моноцитима (Wang и сар., 2018).

S100A8 чини значајан део цитоплазматске фракције неутрофила, око 20%, што указује на значајне улоге (Donato, и сар., 2013). Поред тога, у појединим ћелијама јавља се и у нуклеусу

(Grimbaldeston и сар., 2003). У одговору на проинфламаторне стимулусе, индукује се у макрофагима, дендритичним ћелијама, ендотелским ћелијама малих крвних судова (али не и великих), епителским ћелијама и фибробластима. У макрофагима се може индуковати агонистима TLR, на IL-10 зависан начин, као и оксидативним стресом. Овај протеин је укључен у диференцијацију мијелоидних ћелија и инхибира теломеразну активност значајну за диференцијацију, на калцијум зависан начин. У неутрофилима, смањује p38 MAPK зависну фосфорилацију S100A9, регулишући на тај начин трансендотелијалну миграцију (Donato, и сар., 2013).

S100A9 своје функције испољава у зависности од типа ћелија. Он поништава S100A8-зависно смањење активности теломеразе у мијелоидниом ћелијама, инхибира мијелоидну диференцијацију и нагомилавање MDSC у патолошким одговорима, доприносићи на тај начин расту тумора (Donato, и сар., 2013).

Инфламација индукована инфекцијом један је од главних стимулуса за лучење S100A8/A9. По инфекцији, неутрофили, макрофаги и моноцити интензивно луче S100A8/A9, како би контролисали инфламаторни процес, уз индукцију инфламаторних цитокина, реактивних кисеоничних врста (енг. reactive oxygen species, ROS) и азот монооксида (NO). Један од главних механизма заштите је активирање TLR4 и RAGE посредованих путева. Такође, S100A8/A9 учествује у полимеризацији цитосолног тубулина и реаранжману цитоскелета, што је неопходно за регрутовање неутрофила током инфламаторног одговора. Синтеза и лучење су регулисани механизмом негативне повратне спреге (Wang и сар., 2018). Механизам деловања S100A8/A9 приказан је на слици 8.



Слика 8. Проинфламаторни сигнални путеви активирани са S100A8/A9 (преузето из Wang и сар., 2018)

1.4.7.3. S100A12

S100A12, познат и као калгранулин Ц, MRP6 или EN-RAGE, ствара се и лучи преодминантно у гранулоцитима и представља системски маркер инфламације (Pietzsch и Норрманн, 2009). Ген за хумани S100A12 сачињен је из три егзона, који кодирају протеин дуг 92 аминокиселине. Стварање овог протеина показано је, такође и у моноцитима, међутим, у значајно мањој мери.

У физиолошким условима, експресија S100A12 најзаступљенија је у ткиву где уобичајено има макрофага. Лоциран је преодминантно у цитосолу, али се по интеракцији са

Ca²⁺ транслоцира на мембрану и компоненте цитоскелета. Када се излучи у ванћелијску средину, доприноси урођеном имунском одговору. Активности S100A12 укључују хемотактичку функцију и активацију унутарћелијских сигналних каскада које воде продукцији цитокина и индукцији оксидативног стреса (Meijer и сар., 2012).

S100A12 своју функцију остварује путем везивања за RAGE рецептор. Везивање S100A12 за RAGE праћено је активацијом унутарћелијских сигналних путева, као што су MAP-кинази и NF-κB, што води продукцији инфламаторних цитокина као што су TNF-α, IL-6 и повећана експресија адхезионих молекула ICAM-1 и VCAM-1. Збирни ефекат ових процеса јесте активација лимфоцита, ћелија ендотела, неутрофила и мононуклеарних фагоцита (Meijer и сар., 2012; Kierdorf i Fritz, 2013).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Поред познатог утицаја инфламације и инфламаторних фактора у настанку и прогресији различитих врста солидних тумора, истраживања показала су да ови фактори утичу и на патогенезу хематолошких малигнитета. Код различитих хематолошких малигнитета, укључујући и МПН, описан је повишен ниво фактора инфламације како у периферној крви тако и у узорцима костне сржи. МПН представљају јединствен биолошки модел у коме су повезани клонални развој хематолошких малигнитета и појава хроничне инфламације. Неопластични клон је главни покретач ових инфламаторних процеса, као што доказује куративни ефекат трансплантације алогених матичних ћелија, што доводи не само до комплетног обнављања хематопоезе већ и до регресије процеса фиброзе у костној сржи. На основу наведених чињеница, дефинисан је основни циљ истраживања:

Утврђивање дориноса мутације *JAK2* гена и инфламаторних фактора патогенези МПН.

У оквиру основног општег циља, дефинисани су специфични циљеви истраживања:

- одредити степен присуства мутације *JAK2* код свих МПН пацијената методом ДНК секвенцирања;

- анализирати ниво генске експресије и протеински ниво S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 фактора код МПН пацијената;

- испитати утицај IL-6 проинфламаторног цитокина, IL-10 антиинфламаторног цитокина и JAK инхибитора на ниво генске експресије и протеински ниво фактора инфламације коришћењем хумане ХЕЛ 92.1.7 ћелијске линије са мутацијом у *JAK2* гену у хомозиготном стању, као експерименталног модела;

- испитати сигналне механизме путем којих IL-6 и IL-10 остварују деловање на протеинском нивоу, коришћењем хумане ХЕЛ 92.1.7 ћелијске линије са мутацијом у *JAK2* гену у хомозиготном стању као експерименталног модела;

- испитати сигналне механизме путем којих IL-6 и IL-10 остварују своје ефекте на ћелије периферне крви пацијената са МПН, на протеинском нивоу.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Испитаници

Спровођење ове студије у оквиру израде докторске дисертације одобрено је одлуком Етичког одбора Института за медицинска истраживања и Етичког одбора Клиничког центра Србије. У ову студију укључено је 140 пацијената којима је дијагноза мијелопролиферативних болести постављена и потврђена у Клиничком центру Србије, Институт за хематологију. Дијагноза је постављена у складу са стандардним клиничким параметрима и препорукама ВНО из 2016. године, на основу чега су пацијенти сврстани у подгрупе Ph⁺МПН-ПВ, ЕТ и ПМФ. У групу контрола укључено је 15 здравих особа. Испитаници који су били обухваћени студијом, информисани су о разлогу прикупљања биолошког материјала и дали су писмену сагласност за спровођење свих дијагностичких процедура и узимање материјала за експериментални рад.

Стандардни дијагностички поступак обухватао је постављање комплетне крвне слике, праћење биохуморалног статуса, цитоморфолошке и цитогенетичке анализе, *in vitro* ћелијске културе хематопоетских прогенитора, хистопатолошке анализе биоптата костне сржи и утврђивање присуства и статуса мутације *JAK2* гена. Такође, прикупљени су и демографски параметри: пол и старост пацијената.

Групу пацијената чинило је 57 мушкараца и 83 жена, чија је просечна старост у тренутку постављања дијагнозе износила 61 година (опсег од 22 до 81 године). Контролна група састојала се од 9 мушкараца и 6 жена, просечне старости 51 година (опсег од 29 до 78 година). Од 140 пацијената, 39 је класификовано као ПВ, 48 као ЕТ, док је 53 класификовано као ПМФ. У групи од 39 пацијената са ПВ, 19 је имало *JAK2V617F* мутацију у хомозиготном стању, док је 20 било хетерозиготно. Од 48 пацијената са ЕТ, 20 је било хетерозигот за *JAK2V617F* мутацију, док 28 није имало мутацију. Група пацијената са ПМФ састојала се од 8 пацијената са мутацијом у хомозиготном стању, 19 у хетерозиготном стању, а 26 није имало *JAK2V617F* мутацију.

Дијагностичке процедуре и хистопатолошка дијагностика урађене су у Клиничком центру Србије. За узимање периферне крви пацијената коришћен је „Vacutainer“ систем, са K₂EDTA као антикоагулантним средством и тако добијени узорци допремљени су до Института за медицинска истраживања, где су изоловане ћелије од интереса (гранулоцити и мононуклеари). Имунохистохемијско бојење препарата костне сржи и цитоспин препарата на факторе инфламације S100A4, S100A8, S100A9, S100A12, pNFκB и NFκB извршено је у Лабораторији Групе за молекуларну онкологију, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, где су резултати обрађени и фотодокументовани. Секвенце прајмера који су коришћени за утврђивање присуства *JAK2V617F* мутације и нивоа генске експресије фактора инфламације S100A4, S100A8, S100A9, S100A12 приказани су у табелама 1. и 2., док су примарна и секундарна антитела као и инхибитори сигналних путева и цитокини наведени у табелама 3., 4. и 5.

3.2. Дизајн експеримената

3.2.1. Одређивање нивоа експресије гена и нивоа протеина фактора инфламације у периферној крви и костној сржи МПН пацијената

Да би се одредио ниво генске експресије и протеински ниво маркера инфламације S100A4, S100A8, S100A9, S100A12, pNFkB и NFkB у ћелијама периферне крви МПН пацијената, изоловани су гранулоцити и мононуклеари.. Уз то, код ових пацијената праћени су и нивои наведених протеина у костној сржи.

3.2.2. Испитивање нивоа и механизма деловања IL-6, IL-10 и JAK инхибитора на мононуклеарне ћелије и гранулоците, као и на HEL 92.1.7. ћелије

На HEL 92.1.7 хуманој еритролеукемијској ћелијској линији. прво је испитиван утицај IL-6 као проинфламаторног, а такође и IL-10, као антиинфламаторног цитокина. Утицај ових цитокина праћен је истовремено на мононуклеарима и на ћелијској линији.

HEL ћелије које су претходно култивисане у RPMI 1640 медијуму са NaHCO₃ и L-глутамином, 10% феталним говеђим серумом (енг Fetal Bovine Serum, FBS) и 1% антибиотиком третиране су IL-6 (20 ng/ml), неспецифичним JAK1/2 инхибитором руксолитинибом (1 μM), инхибитором NFkB сигналног пута JSH23 (0,75 μM), као и инхибитором PI3K сигналног пута Ly294002 (50 μM) у току једног часа, после чега је испитиван њихов утицај на ћелијску пролиферацију и апоптозу.

Да би се испитали механизми преко којих делују проинфламаторни IL-6 и антиинфламаторни IL-10, HEL ћелије и мононуклеари третирани су IL-6 (20 ng/ml), IL-10 (30 ng/ml), неспецифичним JAK1/2 инхибитором руксолитинибом (1 μM), JSH23 инхибитором NFkB сигналног пута (0,75 μM), Ly294002 инхибитором PI3 сигналног пута (50 μM) током једног часа, при чему су инхибитори додавани 30 минута пре IL-6 и IL-10. Ниво протеина инфламаторних фактора и сигнални путеви (JAK2/STAT3, PI3K/Akt, NFkB) анализирани су по истеку наведеног времена.

3.2.3. Испитивање деловања хидроксиуреа и инхибитора сигналних путева на нивое фактора инфламације

HEL 92.1.7. еритролеукемијска ћелијска линија коришћена је као модел за испитивање деловања хидроксиуреа и специфичног JAK2 инхибитора 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана. HEL ћелије у RPMI 1640 медијуму са NaHCO₃ и L-глутамином, 10% FBS и 1% антибиотиком, третиране су хидроксиуреом (100 μM), 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μM) и заједно са оба инхибитора, у току 24 и 48 сати. Протеински нивои фактора инфламације анализирани су по истеку третмана.

3.3. Ћелије и ћелијске културе

3.3.1. Изолација гранулоцита и мононуклеара из периферне крви

Узорци периферне крви пацијената и контрола сакупљани су у „Vacutainer“ епруветама (по 30 ml) са K_2EDTA као антикоагулантним средством. Крв је затим разблаживана у односу 1:1,2 фосфатом пуферисаним физиолошким раствором (PBS, pH=7.2, без Ca^{2+} и Mg^{2+}) са додатком 2 mM EDTA финално. На 15 ml лимфоцит сепарационог медијума густине 1,077 g/ml (ЛСМ, лимфопреп, *Lymphocyte Separation Medium, Capricorn Scientific, GmbH, Germany*) наносено је по 35 ml разблажене ћелијске суспензије у епрувети од 50 ml и центрифугирано на 400 g, 35 минута на 20°C, без кочења. Горњи слој плазме са тромбоцитима је пажљиво аспириран тако да слој мононуклеарних ћелија остане очуван у међуфази.

Изолација гранулоцита и мононуклеара. Гранулоцити су изоловани после хипотоне лизе еритроцита сталожених са ЛСМ. На ћелијски талог који садржи еритроците и гранулоците додат је хипотони пуфер за лизу (0.15 M NH_4Cl , 0.1 mM EDTA, 12 mM $NaHCO_3$), а затим су епрувете промешане лаганим извртањем до видљиве лизе еритроцита. Суспензија је центрифугирана на 200 x g два минута, а добијени талог гранулоцита испран је још два пута PBS-ом. Број и вијабилност ћелија одређивана је бојењем са 0.4% раствором Трипан плавог (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Из добијених гранулоцита одмах су изоловани ДНК, РНК и протеини и прављени су цитоспин препарати. Прстен мононуклеара који се издваја у међуфази извучен је пипетом и испиран у раствору PBS-EDTA три пута по 5 минута на 1400 г.

3.3.2. Ћелијска линија

У експериментима у којима је испитиван утицај хидроксиуреа, IL-6, IL-10 и инхибитора на нивое фактора инфламације као и активације сигналних путева у које су IL-6 и IL-10 укључени, коришћена је хумана HEL 92.1.7. ћелијска линија. То је еритролеукемијска ћелијска линија која се спонтано диференцира у еритробласте (Martin и Parayannopoulou, 1982) и поседује *JAK2V617F* мутацију у хомозиготном стању. Гајена је у RPMI 1640 медијуму за култивацију са $NaHCO_3$ и L-глутамином (*Biowest, Nuaille, France*) уз додаток 10% FBS (*Fetal Bovine Serum, Biowest, Nuaille, France*) и 100 јединица/ml пеницилин/стрептомицина (*Biowest, Nuaille, France*) на температури од 37°C, у атмосфери са 5% CO_2 и 100% влажности.

3.4. Анализа *JAK2V617F* мутације

3.4.1. Реакција ланчаног умножавања ДНК (PCR)

Реакција ланчаног умножавања ДНК (енг. polymerase chain reaction, PCR) је метода за селективну *in vitro* амплификацију одређеног сегмента ДНК, која користи пар олигонуклеотидних прајмера комплементарних крајевима секвенце која се амплификује. Прајмери, од којих је један низводни (forward) а други узводни (reverse) су најчешће дуги 15-20 нуклеотида и ограничавају секвенцу која се умножава. Умножавање ДНК фрагмената одвија се кроз поновљене циклусе топлотне денатурације и синтезе нових ланаца, при чему је реакција катализована термостабилном ДНК полимеразом. Реакција ланчаног умножавања састоји се од поновљених корака, у које спадају денатурација, хибридизација прајмера за ДНК матрицу (annealing) и елонгација. Поред матрице и прајмера, за реакцију је неопходно присуство нуклеотида (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) у еквимоларном односу, као и MgCl₂.

3.4.2. Испитивање присуства *JAK2V617F* мутације

За PCR амплификацију (*T3000 Thermocycler, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, Germany*) коришћени су прајмери приказани у табели 1.

Температурни профил PCR реакције:

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

По завршеној PCR реакцији, добијени фрагменти пречишћени су на колони (*QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, USA*) према упутству произвођача. Приликом одређивања присуства *JAK2V617F* мутације, PCR-ом умножени продукти су секвенцирани BigDye Terminator V3.1 комплетом за секвенцирање на ABI PRISM 3130 аутоматизованом ДНК секвенатору (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*), коришћењем AB DNA Sequencing Analysis Software (v 5.2).

Прајмери специфични за мутацију су дужи у односу на „wild“ тип прајмера. У току реакције PCR умножавају се секвенце наведених гена, а том приликом настају и *JAK2V617F* секвенце, које су за три базна пара дуже у односу на „wild“ тип *JAK2* секвенце. Анализа ДНК секвенци показује присуство два различита пика, уколико пацијент има *JAK2V617F* мутацију. Однос наведених пикова (мутираног, са 190 базних парова и немутираног са 187 базних парова) указује на различито алелно оптерећење. Алелно оптерећење мутираног гена је анализирано по формули: Висина пика *JAK2V617F*/ (висина пика „wild“ tip + висина пика *JAK2V617F*) x 100%. У складу са добијеним резултатима, према овој методологији пацијенти су у односу на степен оптерећења *JAK2* подељени у 3 групе: *JAK2wt* (без мутације), *JAK2* хетерозиготи (1-50%) и *JAK2* хомозиготи (≥ 51%).

3.4.3. Секвенцирање PCR продуката

ДНК је секвенцирана BigDye™ Terminator Version 3.1 Ready Reaction Kit-ом (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*), капиларном електрофорезом на аутоматском секвенатору (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*). Овај комплет омогућава секвенцирање продуката PCR реакције, код којих се поред дидеоксинуклеотида користе и 2',3'-дидеоксинуклеотида. ДНК полимераза катализује синтезу ланца комплементарног ДНК матрици уграђујући нуклеотиде на 3' крај прајмера све док у растући ланац не угради неки од дидеоксинуклеотида. Због недостатка ОН-групе на 3' позицији, дидеоксинуклеотида не могу реаговати са следећим нуклеотидом, тако да њихова уградња у растући низ доводи терминације полимеризације. Реакције се изводе у виду асиметричног PCR (користи се само један прајмер), тако да се добија серија фрагмената различитих дужина који се завршавају дидеоксинуклеотидом. Сваки од 4 дидеоксинуклеотида обележен је различитом флуоресцентном бојом чиме је омогућена детекција фрагмената у секвенатору. Смеша за секвенцирање, финалне запремине 8 µl, састојала се од следећих компоненти: 3-20 ng пречишћеног PCR продукта (дужина 200-1000 bp), 3,2 pmol прајмера за секвенцирање и 3 µl Ready Reaction Mix-a (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA*).

Температурни профил PCR реакције за секвенцирање:

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

Табела 1. Секвенце прајмера за утврђивање присуства JAK2V617F мутације

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

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

Изолација РНК. За одређивање експресије гена, из ћелија је изолована интактна РНК, која је у даљем раду коришћена за добијање комплементарне ДНК (сDNA).

У 0,25 ml суспензије ћелија додано је 0,75 ml TRIzol реагенса (*Applied Biosystems, Life Technologies, CA USA*), при чему су ћелије директно лизирани пропуштањем кроз пипету. Инкубација хомогенизованих узорак на собној температури неопходна је да би се омогућила потпуна дисоцијација нуклеопротеинског комплекса. Хомогенати су затим су центрифугирани на 12.000 g на температури од 4°C у трајању од десет минута. По завршеном центрифугирању, хомогенат је пребачен у нову епрувету а талог одбачен. У сваки узорак је затим додато 0,15 ml хлороформа. Епрувете су снажно мућкане 15 секунди, а потом инкубирани 5 минута на собној температури. Узорци су потом центрифугирани на 12.000 g, на температури од 4°C у трајању

од 15 минута. Хомогенат се после центрифугирања раздвајао у три фазе: доњу, црвену фенол-хлороформ фазу која садржи протеине, белу интерфазу у којој се налази ДНК и горњу водену фазу која садржи РНК. Водена фаза је пажљиво пребацивана у нову епрувету. Сваком узорку РНК додавано је по 0,5 ml 100% изопропанола а потом су инкубирани 10 минута на собној температури и центрифугирани на 12.000 g, на 4°C у трајању од десет минута. После центрифугирања, РНК је издвојена у виду белог талоба на дну епрувете. По одливању супернатанта, РНК талоб је испиран са 1 ml 75% етанола. Узорак је кратко промешан а потом центрифугиран на 7500 g на температури од 4°C у трајању од 15 минута. После одливања супернатанта, РНК талоб је сушен на ваздуху и растваран у води без нуклеаза. Концентрација РНК одређивана је спектрофотометријски (*Nanophotometer P330, Implen, DE*), а узорци су чувани на -80°C до употребе.

Синтеза комплементарне ДНК реверзном транскрипцијом. Синтеза комплементарне ДНК извршена је реверзном транскрипцијом укупне РНК, према упутству произвођача комплета за реверзну транскрипцију (*Maxima First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Fisher Scientific, USA*). Реверзна транскрипцију само информационе РНК омогућена је употребом олиго dT прајмера који комплементарно препознају полиаденински низ на крају информационе РНК. Према протоколу, 5 µg РНК и 1 µl олиго dT прајмера растворени су у води без нуклеаза до укупне запремине од 11 µl а потом им је додавана смеша реагенаса са M-MuLV реверзном транскриптазом, нуклеотиди (dNTP микс), инхибитор рибонуклеазе и пуфер за реверзну транскрипцију. Реакциона смеша запремине 20 µl инкубирана је 10 минута на 25°C а затим 15 минута на 50°C, уз терминацију 5 минута на 85°C у термоблоку апарата MultiGene™ OptiMax (*Labnet international Inc., Edison, USA*). Концентрација cDNA одређивана је спектрофотометријски.

Анализа нивоа генске експресије квантитативним PCR-ом: „REAL-TIME“ PCR (qPCR).

„Real-time“ или квантитативни PCR (qPCR) омогућава квантификовање производа PCR реакције током сваког циклуса PCR, односно у „реалном“ времену. Варијанта qPCR методе код које се као матрица за умножавање специфичних фрагмената користи комплементарна ДНК добијена реверзном транскрипцијом, означава се као qRT-PCR („quantitative RT-PCR“).

У qPCR, интензитет флуоресцентног сигнала који се детектује у сваком циклусу директно је пропорционалан количини производа PCR реакције у датом циклусу. Количину насталог производа могуће је квантификовати току експоненцијалне фазе реакције, када се у току сваког циклуса количина PCR продукта удвостручава.

Технике квантитативног PCR, према типу реагенаса који се најчешће користе су:

1. SYBR Green
2. TaqMan

Најједноставнија техника qPCR јесте релативна квантификација заснована на употреби SYBR Green I интеркалирајуће боје, која се везује за малу бразду дволанчане ДНК. Будући да повећање броја циклуса доводи до повећања количине дволанчане ДНК, долази и до повећања интензитета флуоресцентног сигнала, кога на 520nm емитује SYBR Green I. Основни недостатак ове методологије јесте смањена специфичност и последично могућност детекције димера прајмера, као и детекција неспецифичних производа PCR реакције. Због тога се специфичност реакције проверава анализирањем криве топљења („*melting curve analysis*“).

TaqMan метода заснива детекцију PCR продукта на 5'→3' егзонуклеазној активности термостабилне полимеразе. У овом случају, поред специфичних прајмера, користи се и олигонуклеотидна проба која је комплементарна унутрашњем делу секвенце од интереса. Проба је обележена на 5' крају флуоресцентном репортерском бојом док се на 3' крају налази сузбијајућа боја. Када су репортерска и сузбијајућа боја међусобно блиске и проба интактна, флуоресценција се не емитује. Током амплификације, егзонуклеазна активност полимеразе деградује пробу, што доводи до флуоресцирања репортерске боје. Током циклуса, интензитет флуоресценције ће се повећавати, као последица акумулације слободне репортерске боје.

Количина продуката у qPCR може се изразити као апсолутна вредност или као релативно повећање или смањење количине продукта у односу на референтни. Стога, разликују се два приступа квантификацији PCR продуката:

- апсолутна квантификација, у којој се резултат изражава као апсолутни број копија циљне секвенце. Код овог типа квантификације, резултат се добија поређењем интензитета флуоресценције реакције која садржи циљну секвенцу са стандарном кривом, конструисаном са узорцима познате концентрације (најчешће плазмидна ДНК);
- релативна квантификација, код које се резултат изражава у виду односа количина узорка од интереса и референтног, калибраторског узорка..

Како би се избегле грешке до којих може доћи у току поставке екперимената, неопходно је извршити нормализацију добијених података. Добијени резултати нормализују се према ендогеној контроли, која се амплификује упоредо са секвенцом од интереса. Ендогену контролу представља ген који има стабилну експресију, без обзира на експерименталне третмане.

Релативна квантификација експресије секвенце од интереса се може радити на основу релативне стандардне криве или компаративном ddCt методом (Livak i Schmittgen, 2001), на основу које је у овом раду анализиран степен експресије проинфламаторних фактора.

3.5.1. Одређивање експресије *S100A4*, *S100A8*, *S100A9* и *S100A12* гена применом qRT-PCR методе

Експресија фактора инфламације одређивана је применом qRT-PCR методе на Light Cycler 480 Instrument II „real time“ PCR апарату (*Roche Applied Science, Germany*), употребом SYBR Green технике, а резултати су обрађени компаративном ddCt методом. Као ендогена контрола је коришћен је ген за β -актин. Називи и секвенце прајмера наведени су у табели 2.

Температурни профил реакције:

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

Табела 2. Секвенце прајмера за „real time“ PCR квантификацију гена за *S100A4*, *S100A8*, *S100A9* и *S100A12*

Прајмер	Секвенца (5'-3')
<i>S100A4</i> forward	TGTGTCTTCCTGTCCTGCAT
<i>S100A4</i> reverse	CCCAACCACAATCAGAGGAGT
<i>S100A8</i> forward	GGGATGACCTGAAGAAATTGCTA
<i>S100A8</i> reverse	TGTTGATATCCAACTCTTTGAACCA
<i>S100A9</i> forward	GGTCGAAAAGATCTGCAAAATTT
<i>S100A9</i> reverse	GGTCCTCCATGATGTGTTCTATGA
<i>S100A12</i> forward	CTGTGCATTGAGGGGTTAACATT
<i>S100A12</i> reverse	CGCAATGGCTACCAGGGATA
β -aktin forward	CCTGGCACCCAGCACAAT
β -aktin reverse	GCCGATCCACACGGAGTACT

3.6. Анализа нивоа протеина

3.6.1. Western blot анализа нивоа протеина

Изолација протеина. За изолацију укупних протеина из гранулоцита, мононуклеара и HEL ћелија, коришћен је хладан RIPA пуфер за лизирање, (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 1% натријум деоксихолата, 0,1% SDS, 2 mM EDTA и 50 mM NaF), у који је додат комерцијално припремљен коктељ инхибитора протеаза (1%) (*Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*), као и инхибитор фосфатаза Na-ортованадат (1 mM) и инхибитор металопроотеаза EDTA (5 mM). Однос количине ћелија и пуфера за лизу био је $1 \cdot 10^8$ ћелија на 1 ml RIPA пуфера. После 25 минута инкубације на 4°C, лизати су центрифугирани 15 минута на 10.000 g на 4°C. Издвојени супернатанти чувани су на -80°C до употребе. Концентрација укупних протеина одређена је колориметријски, BCA микрометодом (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*), спектрофотометријским мерењем на 562 nm, на основу стандардне криве добијене употребом познатих концентрација говеђег серум албумина као стандарда.

Електрофореза и електротрансфер. Непосредно пре извођења електрофорезе узорци су помешани са редукујућим пуфером за узорке (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% SDS, 30% глицерол, 5% β -меркаптоетанол и 0,02% бромфенол плаво) у односу 4:1, загревани 5 мин на 95°C, а затим охлађени под млазом воде. Овако припремљени узорци су одмах коришћени за извођење електрофорезе. Узорци су наносени на 12% акриламидни гел дебљине 0,8 mm и раздвајани SDS-PAGE електрофорезом у редукујућим условима (Laemli, 1970), при константном напону од 120 V током 1 часа и 30 минута (*PerfectBlue™ Twin S system, PeqLab GmbH, Germany*). Молекулске масе протеинских фракција су одређиване на основу дужине путовања маркера малих молекулских маса (*Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). По завршеној електрофорези, раздвојени протеини су полусувим електротрансфером (*PerfectBlue™ Semi-Dry Electro Blotter, PeqLab GmbH, Germany*) преношени на поливинилиден дифлуорид мембрану величине пора 0,2 μ m (PVDF, *Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) при 0,08 mA по cm² гела током 45 минута. За трансфер коришћен је Towbin пуфер pH 8,3 (0,025M Tris, 0,192 mM глицин, 10% метанол).

Имуноблот. За блокирање неспецифичног везивања коришћено је 4% раствор обезмашћеног млека у праху са 0,5% Tween 20 у TBS (TTBS). Блокирање мембране изведено је у трајању од једног сата на собној температури. Мембране су затим инкубирана са примарним антителима у одговарајућем разблажењу у TTBS преко ноћи на 4°C, на ротационом шејкеру. Мембране су затим испирани три пута по десет минута у TTBS и инкубиране са секундарним антителима коњугованим са HRP, два сата на собној температури. Мембране су поново испирани у TTBS три пута по десет минута и једном са TBS 10 мин.

Детекција протеина. Антителима обележени протеини визуелизовани су на ChemiDoc™ систему за визуелизацију (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA*), после инкубације мембране са системом реагенаса за појачану хемилуминисценцију (*Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, Bio-Rad, Hercules, USA*) према упутству произвођача. Дензитометријска квантификација интензитета протеинских трака урађена применом Image Lab™ софтвера (v. 6.0.0.25, *Bio-Rad, Hercules, USA*), а вредности добијене за циљне протеине нормализоване су у односу на β -актин. Овако добијене релативне вредности коришћене су за статистичку обраду резултата.

3.6.2. Имуноцитохемијска анализа нивоа протеина

Препарати цитоспинова коришћени су за детекцију протеина у HEL ћелијама, гранулоцитима и мононуклеарима периферне крви. Ћелије су суспендоване у DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biowest, Nuaille, France*) у концентрацији $0,4 \times 10^6/\text{ml}$ медијума. У поступку су коришћени блокови са два цилиндрична отвора испод којих су постављане стаклене плочице. После центрифугирања на 1000 грм у трајању од 5 минута, препарати су 20 минута сушени на собној температури затим фиксирани ацетоном.

У даљем раду примењена је стрептавидин-биотин тростепена метода (*LSAB+/HRP, DAKO, Denmark*) за индиректну детекцију протеина помоћу стрептавидина обележеног пероксидазом рена, према модификованом протоколу Guesdon и сар.(1979). Све процедуре спроведене су према упутству произвођача. Ендогена пероксидаза блокирана је 10 минута на собној температури у 3% воденом раствору водоник пероксида. Инкубација са примарним антителом извршена је у влажној комори током ноћи. Примарни антисеруми растварани су у комерцијалном растварачу (*Cat. No. S0809, DAKO*). У следећем кораку узорци су инкубирани 30 минута на собној температури са биотинизираним анти-зечјим и анти-мишјим имуноглобулинима. Након тога препарати су третирани на собној температури стрептавидинским коњугатом на пероксидазу рена у трајању од 30 минута. Између различитих корака имуноцитохемијског бојења препарати су испирани у 0,01 М фосфатном пуферу, рН 7,4. Употребом DAB+/кита (*Code No. K3468, DAKO*) узорци су десет минута инкубирани у раствору супстрат-хромогена (3,3'-диамино-бензидин тетрахидрохлорид и H_2O_2) на собној температури. После контрастирања Мауег-овим хематоксилином, препарати су монтирани у водени медијум (*Aquatex- OC 261903, Merck, Germany*).

Као негативна контрола имуноцитохемијског бојења паралелно су коришћени узорци испитиваних ћелија који су уместо примарним антителом третирани неимуним серумом.

3.7. Имунохистохемијска анализа

Нивои протеинских маркера инфламације анализирани су на узорцима ткива костне сржи МПН пацијената и контролним узорцима. У ту сврху коришћена је индиректна тростепена стрептавидин-биотин метода детекције (*LSAB+/HRP* кит, *DAKO*).

Пре самог имунохистохемијског бојења ткивни пресеци дебљине 5 μm сушени су 60 минута на температури од 56°C , а затим депарафинисани у ксилену и рехидрирани кроз серију алкохола опадајуће концентрације (100%, 96%, 70%).

Демаскирање антигена. У процесу фиксације и калупљења ткива формалдехид и парафин доводе до стерних промена протеина и формирања интермолекуларних веза. Ово за последицу може имати маскирање антигена тј. смањену специфичност имунохистохемијског бојења. У циљу демаскирања антигена препарати потопљени у цитратни пуфер рН 6 (*Target Retrieval Solution, Code No. S 1700, DAKO*) и загревани у микроталасној рерни (560 W) у току 21 минута. Овај поступак доводи до кидања интермолекуларних веза, уклањања Ca^{2+} помоћу цитрата и обнављања стерне конфигурације антигена.

Поступак бојења. По депарафинизацији препарата и демаскирању антигена, блокирана је ендогена пероксидаза 3% воденим раствором H_2O_2 , десет минута на собној температури. Инкубација пресека са примарним антителом извршена је у влажној комори, на собној температури, током ноћи. Пресеци су после тога инкубирани са биотинизираним анти-зечјим и анти-мишјим имуноглобулинима на собној температури у трајању од 30 минута. Пресеци су затим 30 минута третирани стрептавидином коњугованим са пероксидазом рена,

на собној температури. За испирање препарата током имунохистохемијског бојења коришћен је 0,01 М фосфатни пуфер рН 7,4, а за растварање примарних антисерума комерцијални растварач (*Cat. No. S0809, DAKO*). Употребом DAB+/кита (*Code No. K3468, DAKO*) пресеци су инкубирани на собној температури у раствору супстрат-хромогена (3,3'-диамино-бензидин тетрахидрохлорид и H₂O₂), у трајању од десет минута. После контрастирања Мауер-овим хематоксилином препарати су монтирани у водени медијум (*Aquatex- OC 261903, Merck, Germany*).

Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења.

Препарати мијелопролиферативних неоплазми код којих је експресија биолошких маркера већ раније доказана коришћени су као позитивни контролни узорци. Они су раније вишеструко тестирани и доказано садрже испитиване антигене, а третирани су на исти начин као и узорци пацијената и контролни узорци.

Ткивни узорци испитиваних неоплазми који су бојени паралелно са узорцима на којима се доказује експресија биолошких маркера, али су третирани неимуни серумом уместо примарног антитела коришћени су као негативна контрола имунохистохемијског бојења.

Табела 3. Примарна антитела коришћена за експерименте (WB-Western blot; ICH-имуноцитохемија, IHH- имунохистохемија)

Примарна антитела					
Антиген	Порекло	ММ (kDa)	Метода	Каталошки број	Произвођач
S100A4 (D9F9D)	Зеџ, моноклонско IgG	12	WB, ICH, IHH	13018	Cell Signaling Technology
S100A8 (MRP8) (EPR3554)	Зеџ, моноклонско IgG	11	WB, ICH, IHH	ab92331	Abcam
S100A9 (EPR3555)	Зеџ, моноклонско IgG	13	WB, ICH, IHH	ab92507	Abcam
S100A12	Зеџ, поликлонско IgG	11	WB, ICH, IHH	E-AB-11562	Elabscience Biotechnology
NFκB p65 Antibody (F-6)	Зеџ, поликлонско IgG	65	WB	sc-8008	Santa Cruz
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1)	Зеџ, поликлонско IgG	65	WB	3033	Cell Signaling Technology
beta Actin (937215)	Миш, моноклонско IgG	45	WB	MAB8929	RnD systems

Табела 4. Секундарна антитела коришћена за експерименте (WB-Western blot; ICH-имуноцитохемија, IHH- имунохистохемија)

Секундарна антитела				
Антиген	Порекло	Метода	Каталошки број	Произвођач
HRP коњуговано анти зечје	коза, поликлонско IgG	WB	E-AB-1003	Elabscience Biotechnology
HRP коњуговано анти мишје	коза, поликлонско IgG	WB	31430	Thermo Fisher Scientific

Табела 5. Цитокини и инхибитори сигналних путева коришћени у експериментима

Интерлеукин / инхибитор	Извор	Каталошки број	Произвођач
Хумани рекомбинантни IL-6	<i>E. coli</i>	130-095-365	Miltenyi Biotec
Хумани рекомбинантни IL-10	<i>E. coli</i>	130-093-948	Miltenyi Biotec
LY294002	Синтетички	9901S	Cell Signaling Technology
JSH-23	Синтетички	J4455	Sigma-Aldrich
Ruxolitinib	Синтетички	11609	Cayman Chemical

3.8. Статистичка обрада резултата

Добијени резултати приказани су као средња вредност \pm стандардна девијација. У статистичкој анализи података коришћен је програм SPSS22. За статистичку анализу примењена је једносмерна анализа варијансе (ANOVA), а одговарајући *post hoc* тест (Dunnett's *posttest*) употребљен је у случају статистичке значајности, за процену значајности разлике између испитиваних група. Статистички значајном разликом сматране су следеће вредности: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

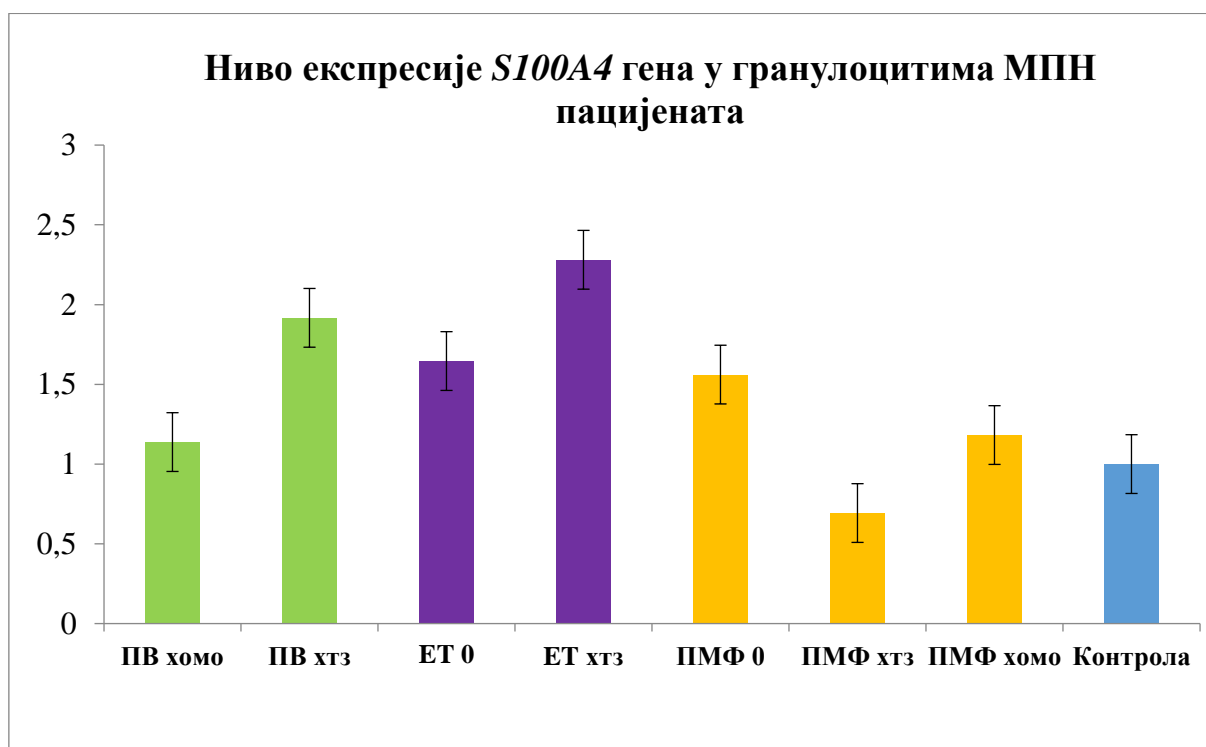
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Ниво експресије *S100A4* гена у гранулоцитима МПН пацијената

Одређивање нивоа експресије *S100A4* гена у гранулоцитима МПН пацијената спроведено је на групама од по 5 пацијената по дијагнози у односу на *JAK2* мутациони статус применом qPCR коме је претходила реверзна транскрипција.

4.1.1. Ниво експресије *S100A4* гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

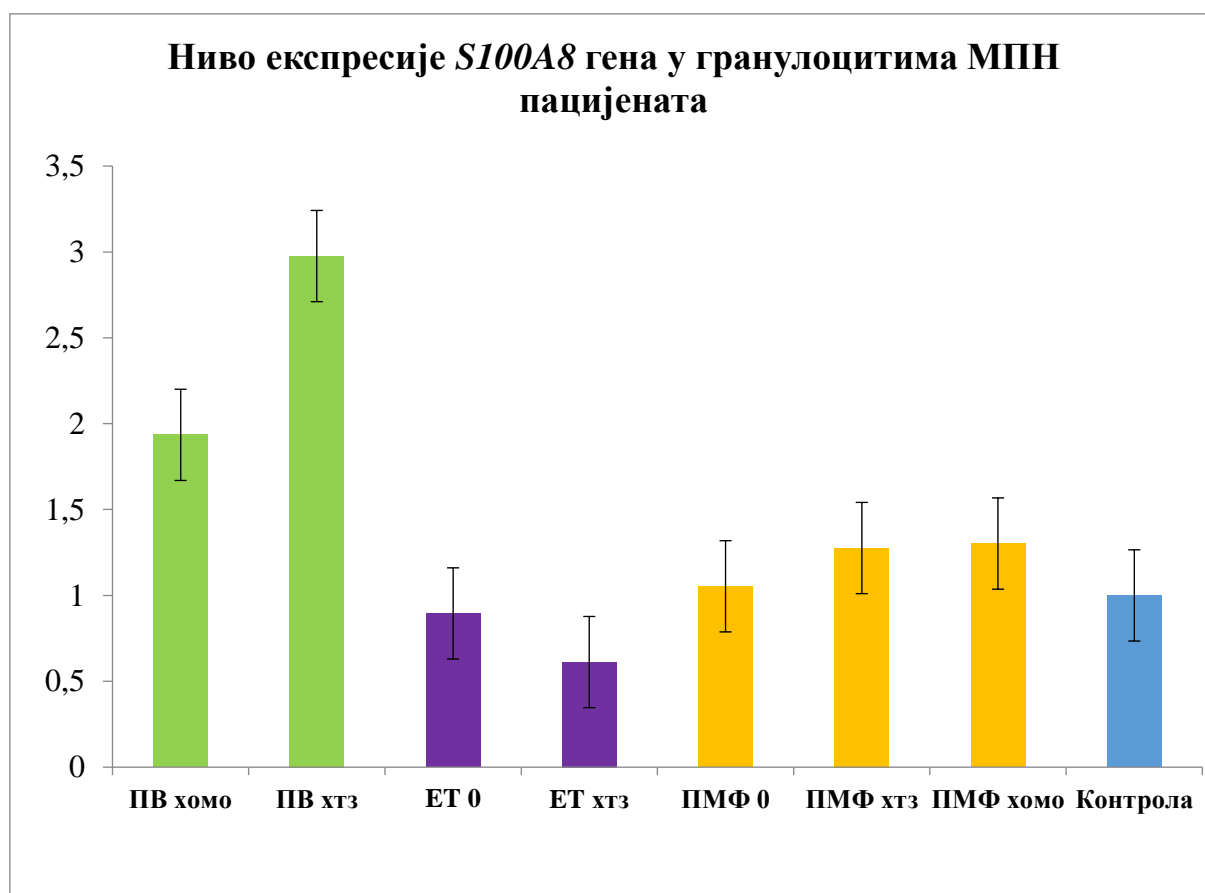
У гранулоцитима пацијената све три различите МПН дијагнозе као и у односу на статус *JAK2V617F*, разлика у експресији *S100A4* у односу на контролу није била статистички значајна (графикон 1). Без обзира на одсуство статистички значајне разлике може се приметити да је ниво генске експресије *S100A4* највећи у групи пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом, затим код ПВ пацијената са хетерозиготним статусом док је најмањи код пацијената са ПМФ хетерозиготним статусом (графикон 1).



Графикон 1. Ниво експресије *S100A4* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације

4.1.2. Ниво експресије *S100A8* гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

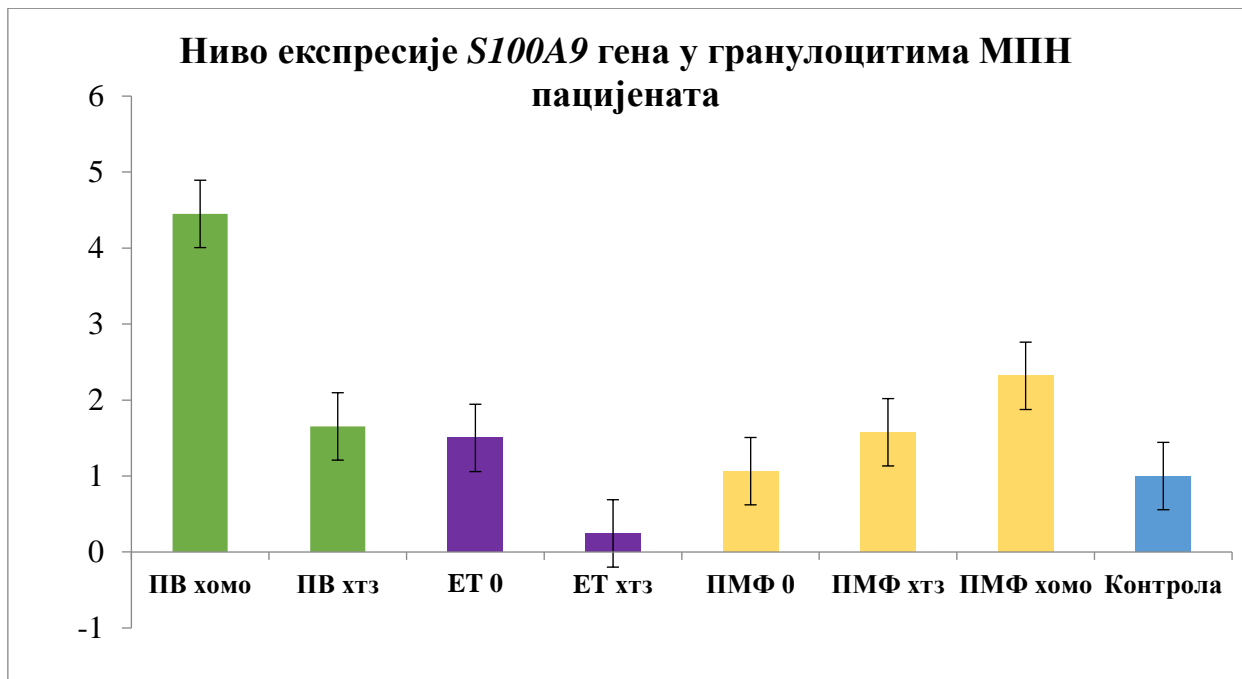
Ниво експресије *S100A8* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације није показао значајну статистичку разлику у односу на контролу (графикон 2). Без обзира на одсуство статистички значајне разлике може се приметити да је ниво генске експресије *S100A8* највећи у групи пацијената са ПВ хетерозиготним статусом, затим код пацијената са ПВ хомозиготним статусом док је најмањи код пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом (графикон 2). Ниво генске експресије *S100A8* у гранулоцитима ПМФ групе пацијената је нешто мало већи у поређењу са контролним узорцима (графикон 2).



Графикон 2. Ниво експресије *S100A8* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације

4.1.3. Ниво експресије *S100A9* гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

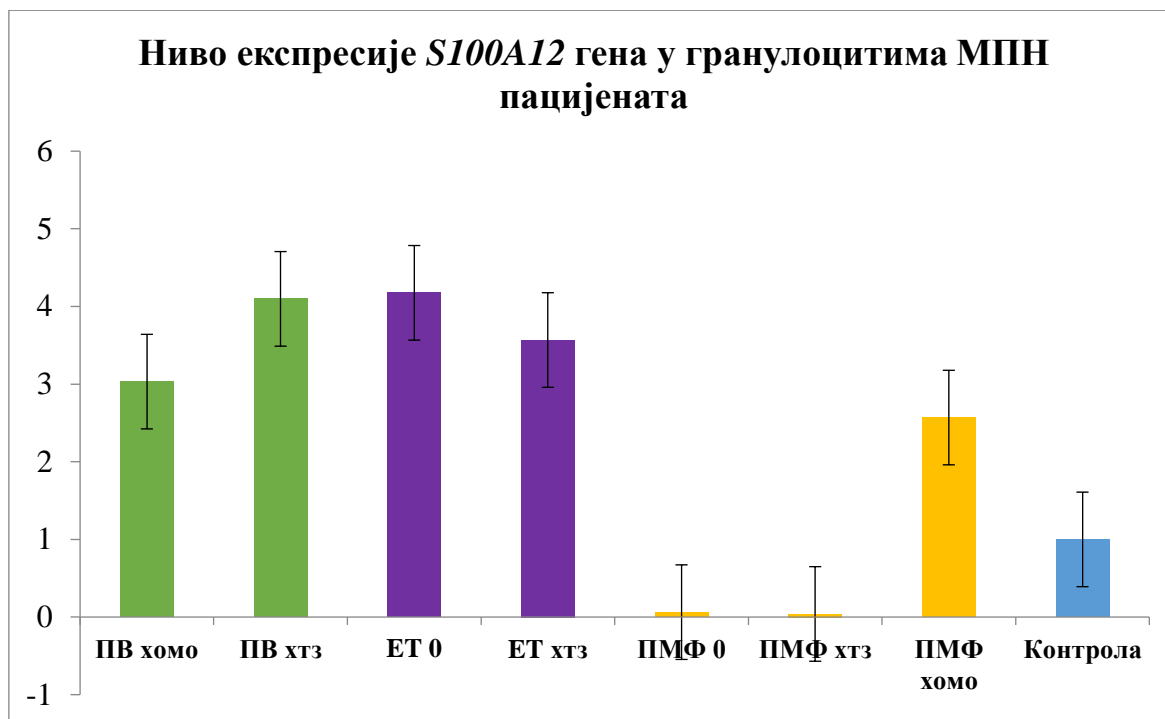
Ниво експресије *S100A9* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације није показао значајну статистичку разлику у односу на контролу (графикон 3). Без обзира на одсуство статистички значајне разлике може се приметити да је ниво генске експресије *S100A9* највећи у групи пацијената са ПВ хомозиготним статусом, затим код пацијената са ПМФ хомозиготним статусом док је најмањи код пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом (графикон 3).



Графикон 3. Ниво експресије *S100A9* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације

4.1.4. Ниво експресије *S100A12* гена у гранулоцитима пацијената са МПН у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

Ниво експресије *S100A12* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације није показао статистички значајну разлику у односу на контролу (графикон 4). Без обзира на одсуство статистички значајне разлике може се приметити да је ниво генске експресије *S100A12* највећи у групи ЕТ пацијената без мутације у *JAK2V617F* гену, затим код пацијената са ПВ хетерозиготним статусом док је најмањи код пацијената са ПМФ (графикон 4).



Графикон 4. Ниво експресије *S100A12* гена у гранулоцитима МПН односу на присуство *JAK2V617F* мутације

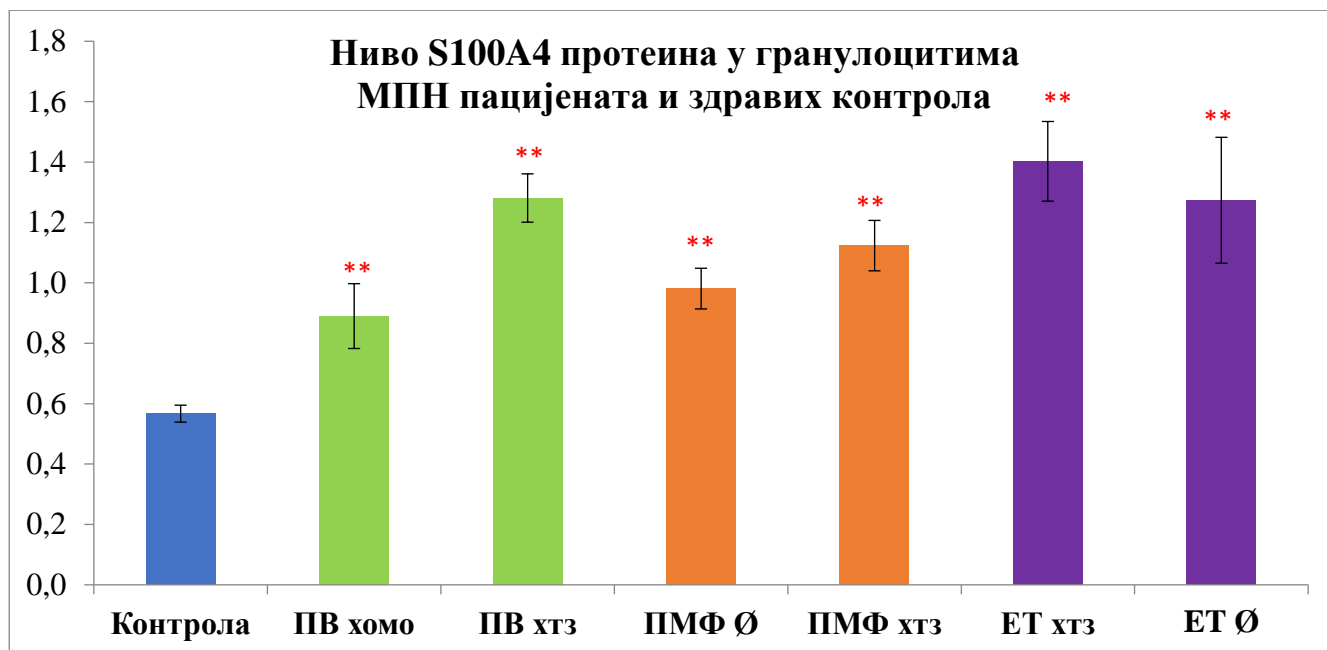
4.2. Протеински ниво инфламаторних фактора код пацијената са МПН одређен *Western blot* методом

Протеински ниво фактора инфламације *S100A4*, *S100A8*, *S100A9* и *S100A12* анализиран је *Western blot* методом у гранулоцитима МПН пацијената, у односу на присуство *JAK2V617F* мутације.

4.2.1 Ниво *S100A4* протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

За *Western blot* анализу нивоа *S100A4* протеина у гранулоцитима пацијената са МПН коришћено је 16 узорак пацијената са ПВ, 16 узорак пацијената са ЕТ, 16 узорак пацијената са ПМФ и 8 здравих контрола. Од тога, за ПВ одабрано је по 8 пацијената са *JAK2V617F* мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, за ЕТ 8 узорак са мутацијом у хетерозиготном стању и 8 без мутације, а такође и за ПМФ (8 без *JAK2V617F* мутације и 8 хетерозигота).

У односу на контролне узорке, нивои *S100A4* протеина показују повећање код свих дијагноза МПН. Код пацијената са ПВ дијагнозом, као и свих пацијената са ЕТ и ПМФ уочава се статистички значајно повећан ниво *S100A4* протеина (** $p < 0,01$), без обзира на присуство *JAK2V617F* мутације (графикон 5).

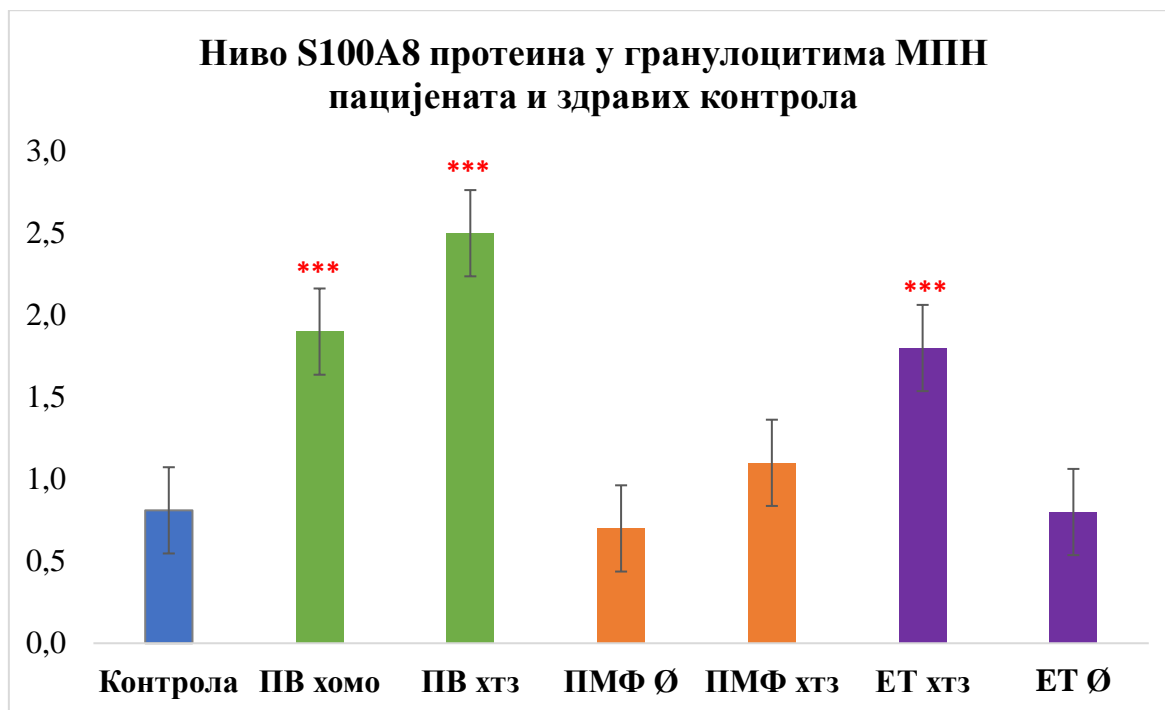


Графикон 5. Ниво S100A4 протеина у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (** $p < 0,01$). За нормализацију резултата коришћен је tERK

4.2.2 Ниво S100A8 протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на *JAK2V617F* мутацију

Western blot анализа нивоа S100A8 протеина у гранулоцитима пацијената са МПН урађена је на 16 узорака пацијената са ПВ, 16 узорака пацијената са ЕТ, 16 узорака пацијената са ПМФ и 8 здравих контрола. При томе, за ПВ одабрано је по 8 пацијената са *JAK2V617F* мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, за ЕТ 8 узорака са мутацијом у хетерозиготном стању и 8 без мутације, а такође и за ПМФ (8 без *JAK2V617F* мутације и 8 хетерозигота).

Код пацијената са ПВ хтз и ПВ хомо дијагнозом уочава се повећање нивоа S100A8, које је у односу на контролну групу статистички значајно (** $p < 0,001$), као и код пацијената са ЕТ са *JAK2V617F* мутацијом у хетерозиготном стању (графикон 6).

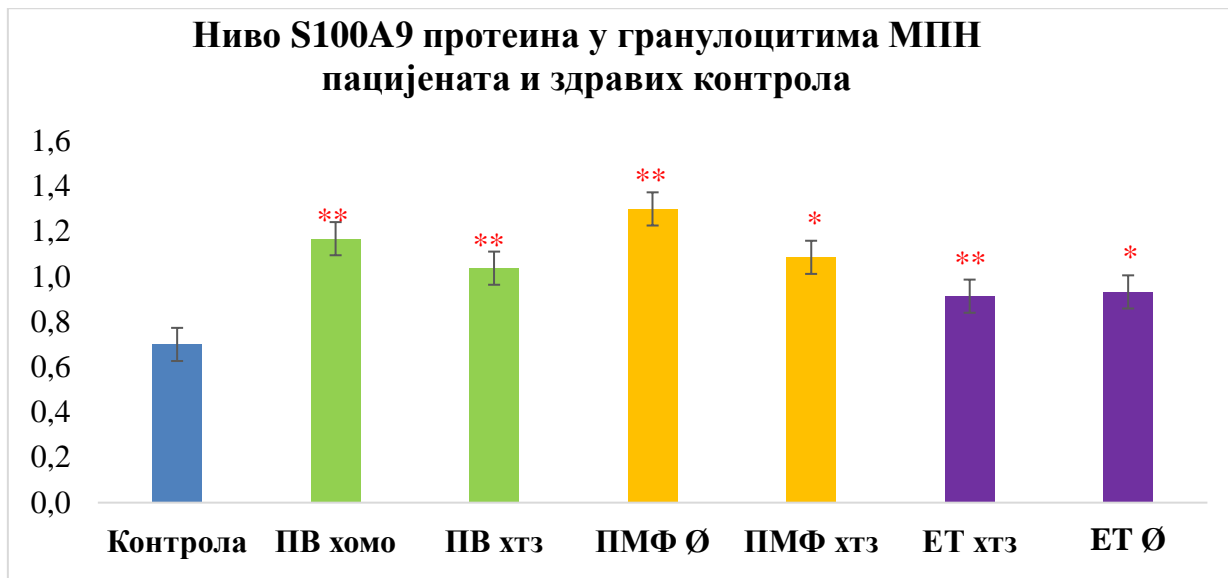


Графикон 6. Ниво S100A8 протеинау гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (***) $p < 0,001$). За нормализацију резултата коришћен је tERK

4.2.3. Ниво S100A9 протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на *JAK2V617F* мутацију

За *Western blot* анализу нивоа S100A9 протеина у гранулоцитима пацијената са МПН коришћено је 16 узорака пацијената са ПВ, 16 узорака пацијената са ЕТ, 16 узорака пацијената са ПМФ и 8 здравих контрола. Од тога, за ПВ одабрано је по 8 пацијената са *JAK2V617F* мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, за ЕТ 8 узорака са мутацијом у хетерозиготном стању и 8 без мутације, а такође и за ПМФ (8 без *JAK2V617F* мутације и 8 хетерозигота).

Код свих МПН пацијената, ниво S100A9 протеина повећан је у односу на здраве контроле. Ниво S100A9 протеина статистички је значајно повећан код пацијената са ПВ дијагнозом (** $p < 0,01$), као и код свих пацијената са ЕТ са *JAK2V617F* мутацијом у хетерозиготном стању (** $p < 0,01$) и ЕТ без *JAK2V617F* мутације ($p < 0,05$), а такође и код ПМФ пацијената без *JAK2V617F* мутације (** $p < 0,01$) и са ПМФ хтз статусом ($p < 0,05$), (графикон 7).

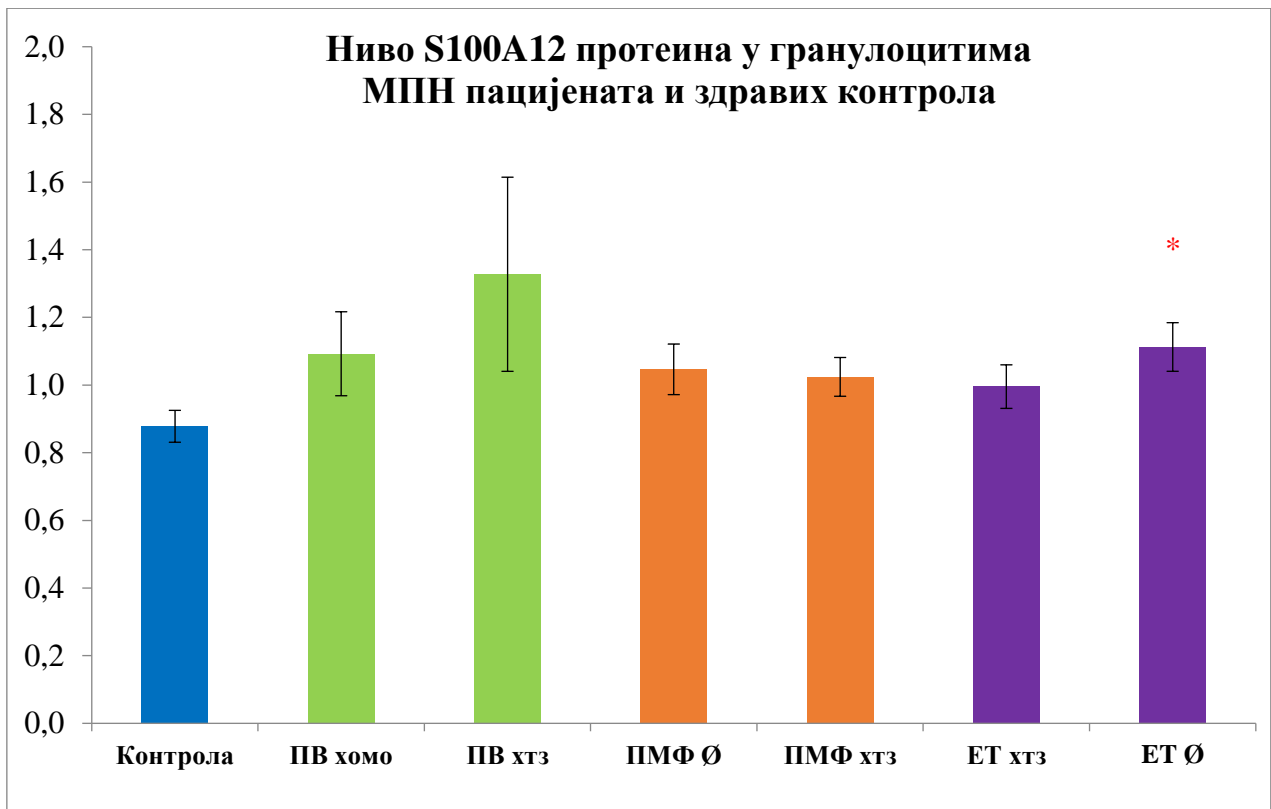


Графикон 7. Ниво S100A9 протеина у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). За нормализацију резултата коришћен је tERK

4.2.4. Ниво S100A12 протеина у гранулоцитима МПН пацијената у односу на *JAK2V617F* мутацију

Western blot анализа нивоа S100A12 протеина у гранулоцитима пацијената са МПН урађена је на 16 узорака пацијената са ПВ, 16 узорака пацијената са ЕТ, 16 узорака пацијената са ПМФ и 8 здравих контрола. При томе, за ПВ одабрано је по 8 пацијената са *JAK2V617F* мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, за ЕТ 8 узорака са мутацијом у хетерозиготном стању и 8 без мутације, а такође и за ПМФ (8 без *JAK2V617F* мутације и 8 хетерозигота).

Код свих МПН пацијената, ниво S100A12 протеина већи је у односу на здраве контроле. Статистичка значајност (* $p < 0,05$) достигнута је једино у групи ЕТ пацијената без *JAK2V617F* мутације, док у свим осталим случајевима ова разлика није била статистички значајна (графикон 8).



Графикон 8. Протеински ниво S100A12 у гранулоцитима МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$). За нормализацију резултата коришћен је tERK

4.3. Одређивање нивоа инфламаторних фактора код МПН пацијената применом имуноцитохемијске методе

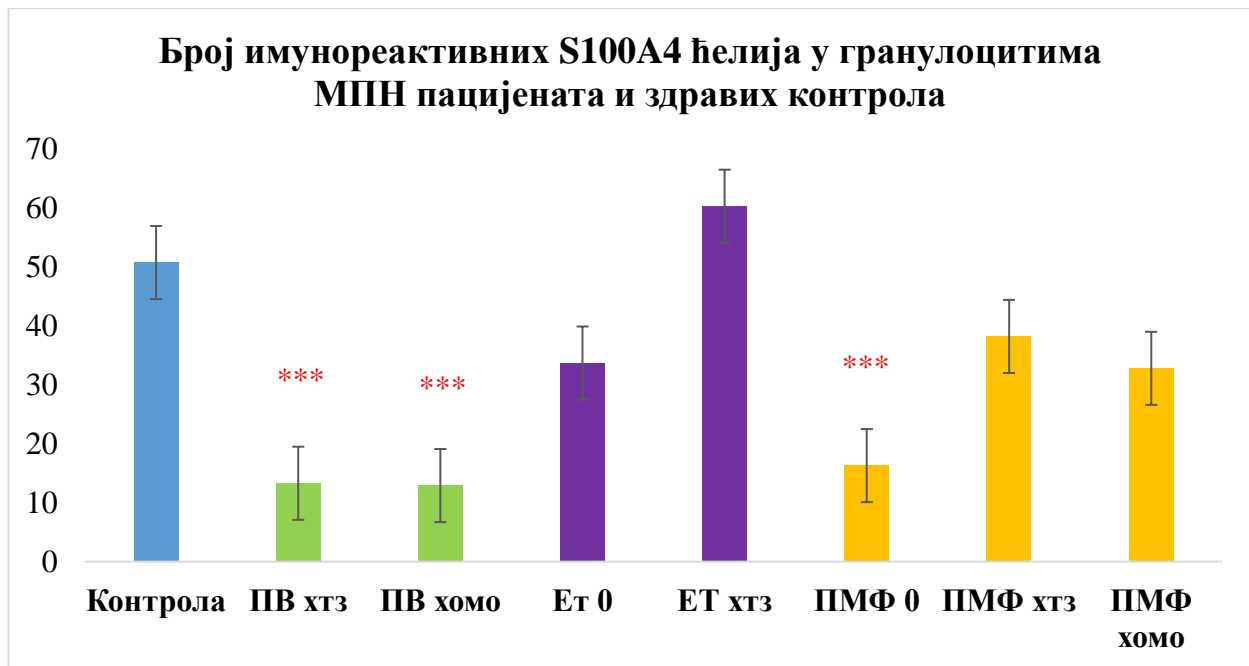
Имуноцитохемијска анализа протеинских нивоа фактора инфламације S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 вршена је на цитоспин препаратима гранулоцита МПН пацијената (по пет узорака цитоспинова у свакој групи) у односу на присуство *JAK2V617F* мутације.

4.3.1. Број имунореактивних S100A4 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на *JAK2V617F* мутацију

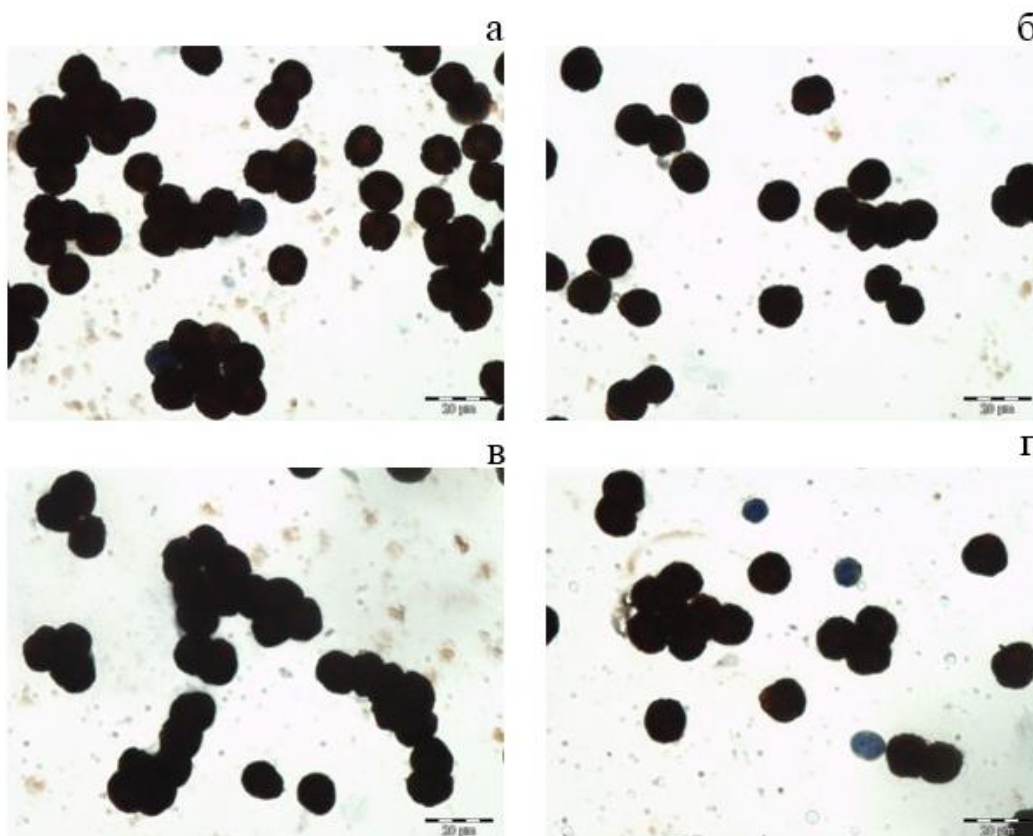
Анализа нивоа S100A4 протеина имуноцитохемијском методом у гранулоцитима МПН пацијената показала је значајно смањење броја S100A4 позитивних ћелија код свих пацијената са ПВ дијагнозом (** $p < 0,001$) (графикон 9, слика 9).

Код ЕТ пацијената није забележена статистички значајна разлика у броју S100A4 имунореактивних ћелија у поређењу са контролама (Графикон 9).

Код ПМФ пацијената, број S100A4 позитивних ћелија значајно смањен код је код пацијената без *JAK2V617F* мутације (** $p < 0,001$) (графикон 9, слика 9).



Графикон 9. Број имунореактивних S100A4 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената и контролних узорака у односу на присуство *JAK2V617F* мутације ($p^{***}<0,001$)

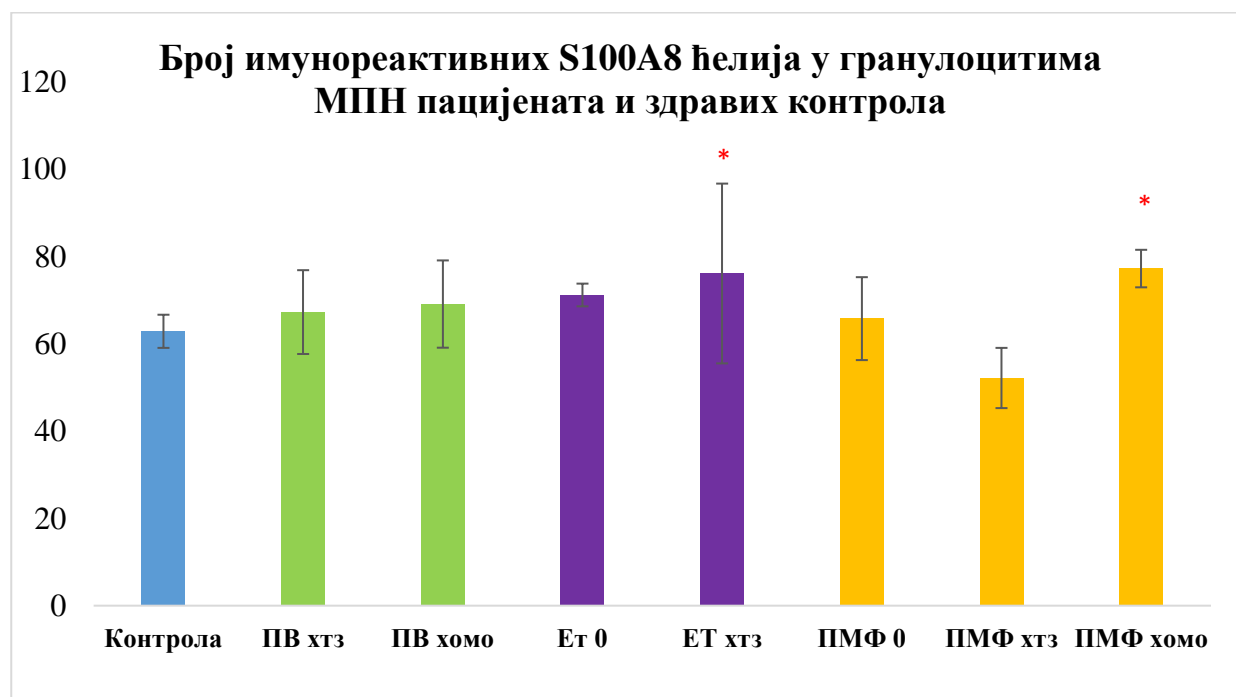


Слика 9. Ниво S100A4 протеина на цитоспин препаратима гранулоцита код контрола (а), ЕТ без мутације (б), ЕТ хтз (в) и ПМФ хтз (г). Увеличање x40 (а,б,в,г).

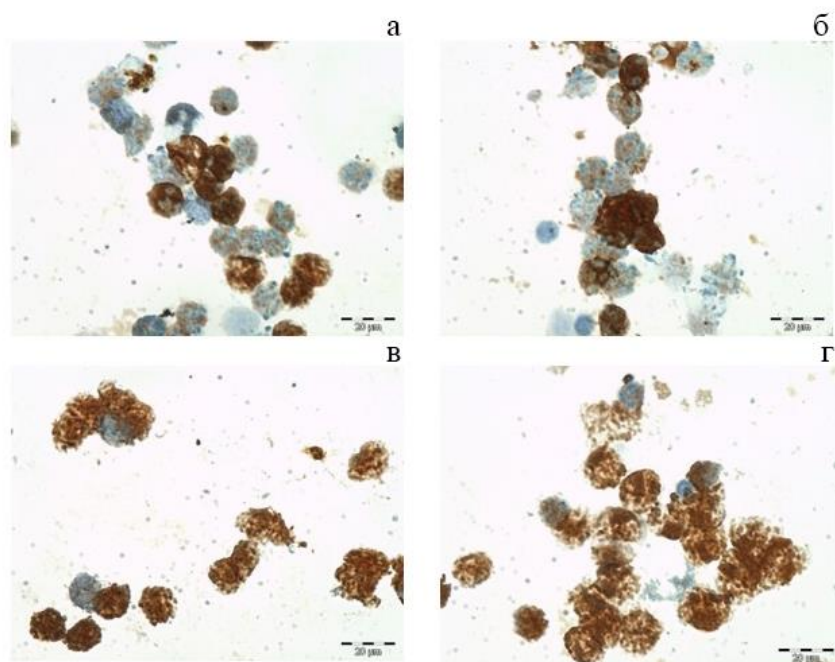
4.3.2. Број имунореактивних S100A8 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа нивоа протеина S100A8 у гранулоцитима МПН пацијената спроведена је на укупно 37 узорка од тога 4 контролна узорка, 10 ПВ пацијената (по 5 хомозигота и хетерозигота), 13 ПМФ (5 узорка без JAK2V617F мутације и по 4 хомо и хетерозигота) и 8 ЕТ узорка (по 4 хомо и хетерозигота).

Статистички значајно већи број S100A8 имунореактивних ћелија забележен је у групи ЕТ хетерозиготних и ПМФ хомозиготних испитаника (* $p < 0,05$), док у свим осталим групама та разлика није била статистички значајна (графикон 10, слика 10).



Графикон 10. Број имунореактивних S100A8 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената и контролних узорка у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$).

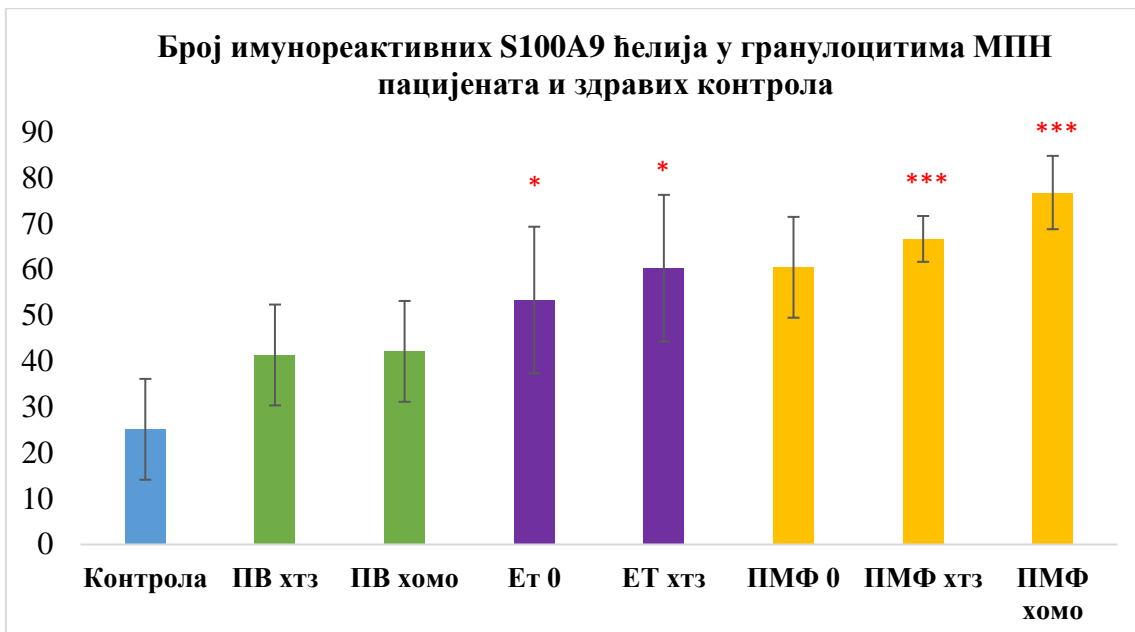


Слика 10. Ниво S100A8 протеина на цитоспин препаратима гранулоцита код контрола (а), ЕТ без мутације (б), ЕТ хтз (в) и ПМФ хомо (г). Увеличање х40 (а,б,в,г).

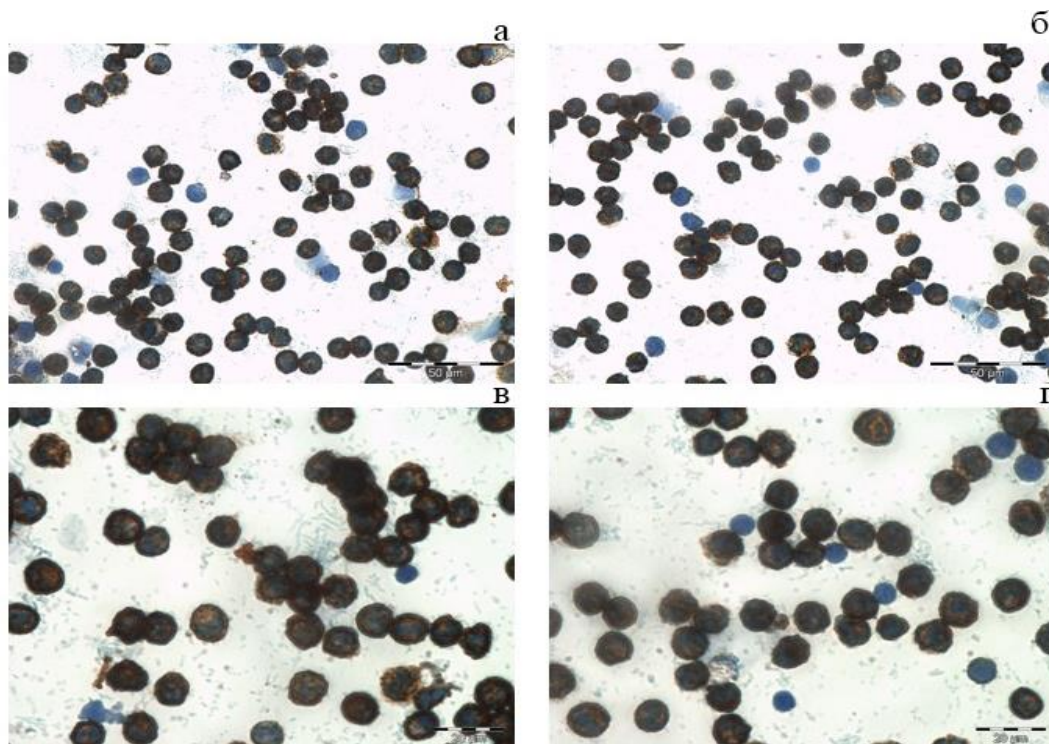
4.3.3. Број имунореактивних S100A9 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

Имуноцитохемијска анализа нивоа S100A9 у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију спроведена је на укупно 35 узорака, од тога 5 контрола, 9 ПВ узорака (4 хомозогота и 5 хетерозигота), 9 ЕТ узорака (5 узорака без JAK2V617F мутације и 4 хетерозигота) и 12 ПМФ узорака (3 узорка без JAK2V617F мутације, 5 узорка са JAK2V617F мутацијом у хетерозиготном и 4 узорка у хомозиготном стању).

У свим групама МПН пацијената забележен је повећан број имунореактивних S100A9 ћелија у односу на контролу (графикон 11, слика 11). У групи ПВ пацијената разлика у броју имунореактивних S100A9 ћелија у односу на контролу није била статистички значајна, док је у групи ЕТ без JAK2V617F мутације и ЕТ хетерозигота забележен статистички значајно већи број имунореактивних ћелија у односу на контролу ($p < 0,05$) (графикон 11, слика 11).



Графикон 11. Број имунореактивних S100A9 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената и контролних узорака у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; *** $< 0,001$).



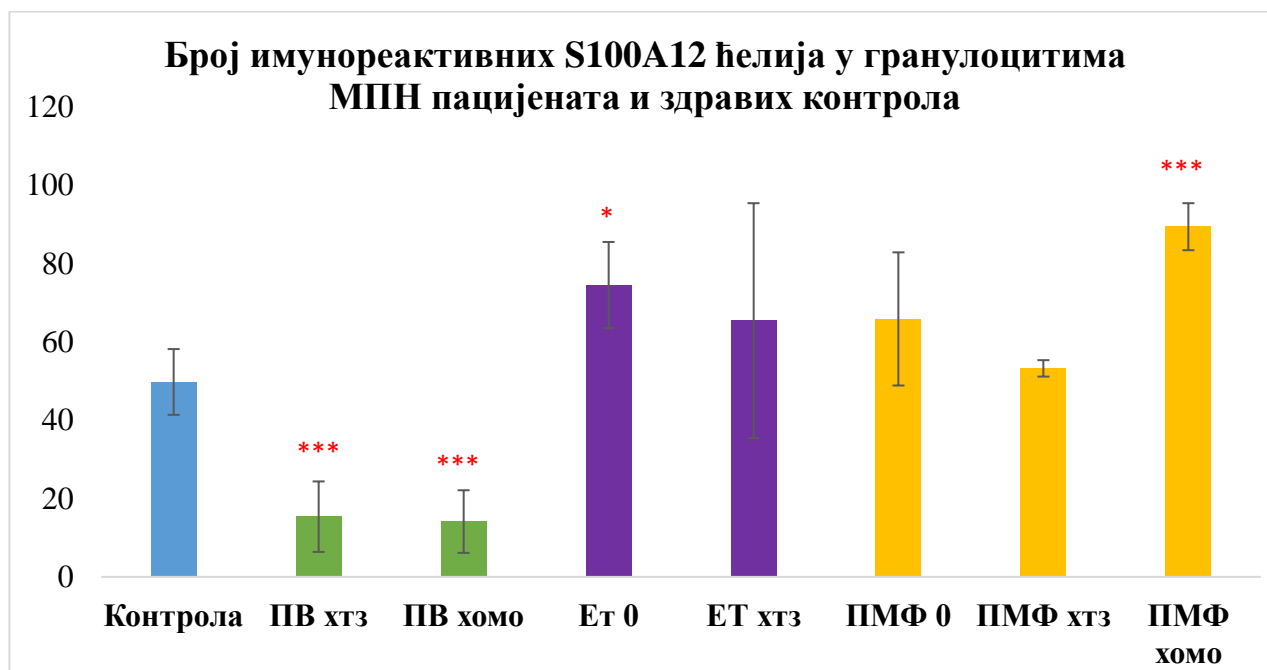
Слика 11. Ниво S100A9 протеина на цитоспин препаратима гранулоцита код ЕТ без мутације (а), ЕТ хтз (б), ПМФ хтз (в) и ПМФ хомо. Увеличање $\times 20$ (а,б); $\times 40$ (в,г).

4.3.4. Број имунореактивних S100A12 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију

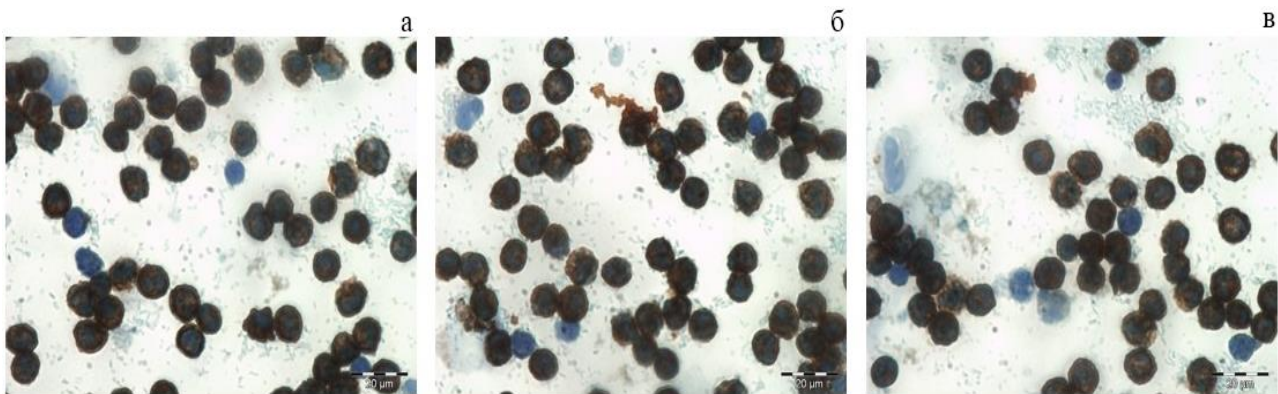
Имуноцитохемијска анализа нивоа S100A12 у гранулоцитима МПН пацијената у односу на JAK2V617F мутацију спроведена је на укупно 40 узорака, од тога 5 контрола, 10 ПВ узорака (5 хомозогота и 5 хетерозигота), 10 ЕТ узорака (4 узорка без JAK2V617F мутације и 6 хетерозигота) и 15 ПМФ узорака (6 узорака без JAK2V617F мутације, 5 узорака са JAK2V617F мутацијом у хетерозиготном и 4 узорка у хомозиготном стању).

У групи ПВ пацијената, број S100A12 позитивних ћелија статистички је значајно смањен код пацијената са JAK2V617F мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању (** $p < 0,001$). Такође, код ПМФ хомозиготних пацијената показана је високо статистички значајна разлика (** $p < 0,001$) у броју S100A12 имунореактивних ћелија у односу на контролну групу (графикон 12, слика 12).

У групи ЕТ пацијената без JAK2V617F мутације број S100A12 позитивних ћелија значајно је повећан ($p < 0,05$) у односу на контролну групу (графикон 12, слика 12).



Графикон 12. Број имунореактивних S100A12 ћелија у гранулоцитима МПН пацијената и контролних узорака у односу на присуство JAK2V617F мутације ($p < 0,05$; ** $p < 0,001$).



Слика 12. Ниво S100A12 протеина на цитоспин препаратима гранулоцита контролног узорка (а), ЕТ без мутације (б) и ПМФ хомо. Увеличање x40 (а,б,в).

4.4. Број имунореактивних ћелија инфламаторних фактора код мпн пацијената добијен применом имунохистохемијске методе

Имунохистохемијска анализа нивоа фактора инфламације S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 спроведена је на узорцима костне сржи МПН пацијената и 5 контролних узорака. За процену нивоа S100A4 протеина извршено је бојење 36 узорка костне сржи од чега 10 узорака ПВ (5 хомозиготних и 5 хетерозиготних), 10 узорака ЕТ (6 без *JAK2V617F* мутације и 4 хетерозиготних), 11 узорака ПМФ пацијената (по 4 узорака без *JAK2V617F* мутације, хетерозиготних и 3 хомозигота) и 5 контрола.

За процену нивоа S100A8 и S100A9 инфламаторног фактора извршено је бојење 37 узорака костне сржи од чега 10 ПВ (по 5 узорака хомозиготних и хетерозиготних), 10 узорака ЕТ (5 без *JAK2V617F* мутације и 5 хетерозиготних), 11 узорака ПМФ пацијената (по 4 хетерозигота и 4 узорка без мутације и 3 хомозигота) и 5 контрола.

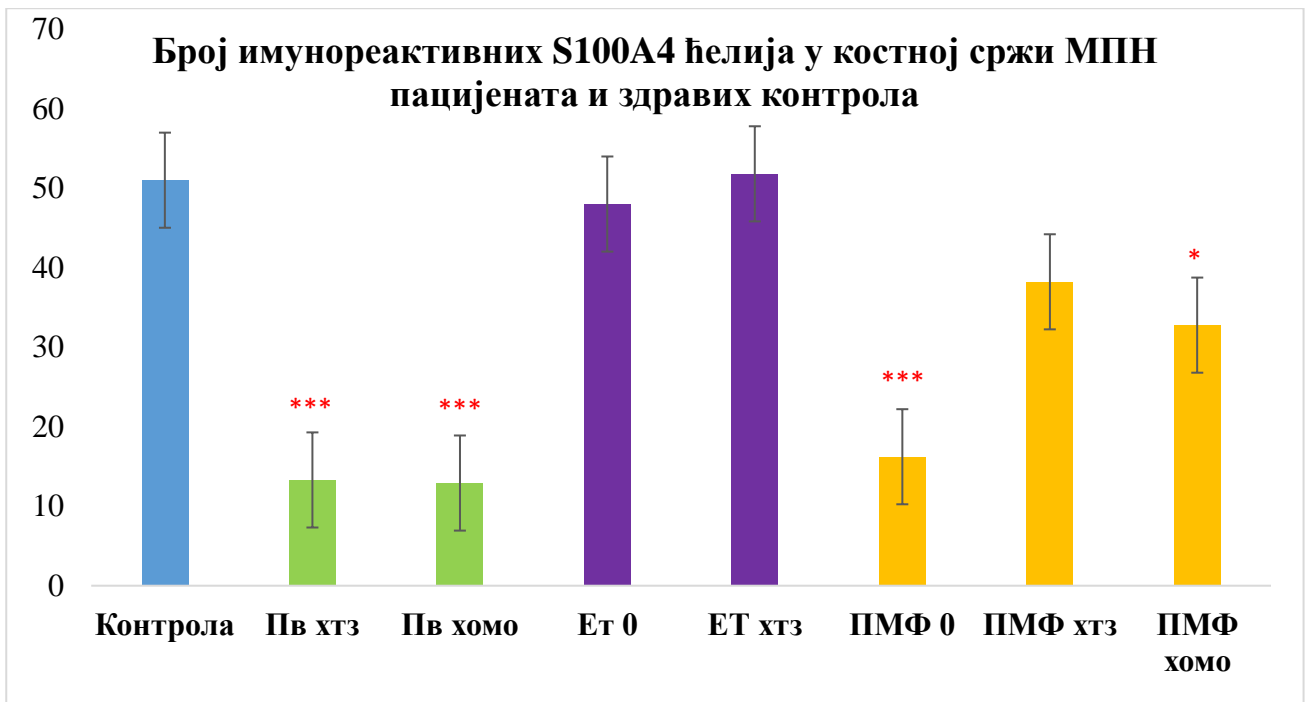
За процену нивоа S100A12 фактора извршено је бојење 43 узорака костне сржи од чега 10 узорака ПВ (5 хомозиготних и 5 хетерозиготних), 10 узорака ЕТ (6 без *JAK2V617F* мутације и 4 хетерозигота), 15 узорака ПМФ пацијената (по 7 узорака хомозиготних и хетерозиготних и 4 узорка без *JAK2V617F* мутације) и 5 контрола.

4.4.1. Број имунореактивних S100A4 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство *JAK2V617F* мутације

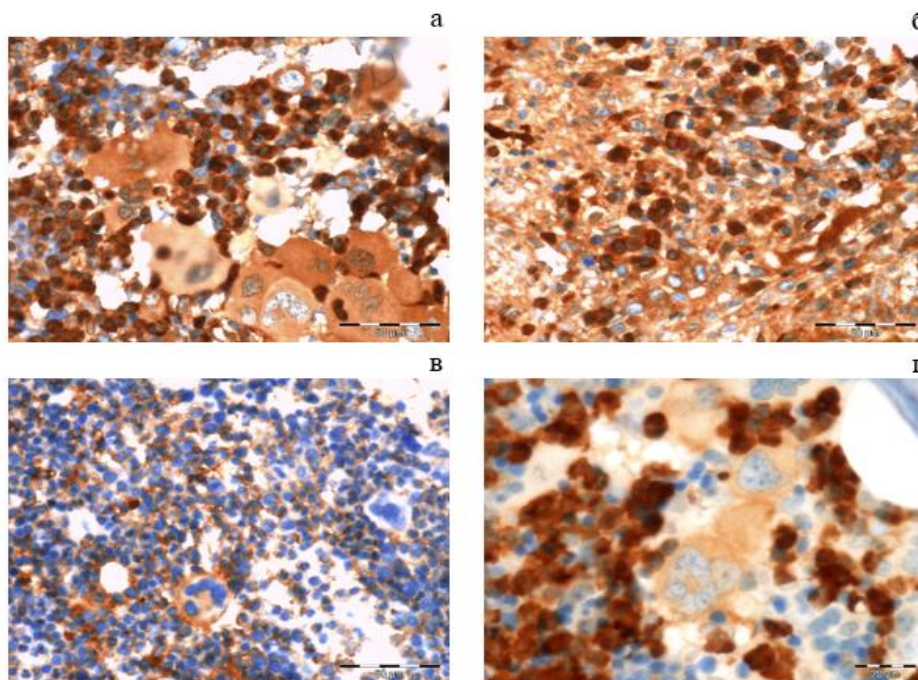
У ћелијама костне сржи МПН пацијената праћен је ниво S100A4 протеина. Имунохистохемијска анализа нивоа S100A4 протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број S100A4 позитивних ћелија значајно смањен код пацијената који су и хомозиготи и хетерозиготи (***p*<0,001) (графикон 13).

Код пацијената са ЕТ дијагнозом ни код једне групе статистичка анализа није показала да постоји значајна разлика у нивоу S100A4 протеина у односу на контроле (графикон 13).

Код пацијената са ПМФ дијагнозом, значајно смањење броја S100A4 позитивних ћелија присутно је код пацијената без *JAK2V617F* мутације (***p*<0,001), док је у групи пацијената са хомозиготним статусом статистичка анализа показала да постоји значајно мањи број S100A4 ћелија у односу на контроле (графикон 13, слика 5).



Графикон 13. Број имунореактивних S100A4 ћелија у узорцима костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



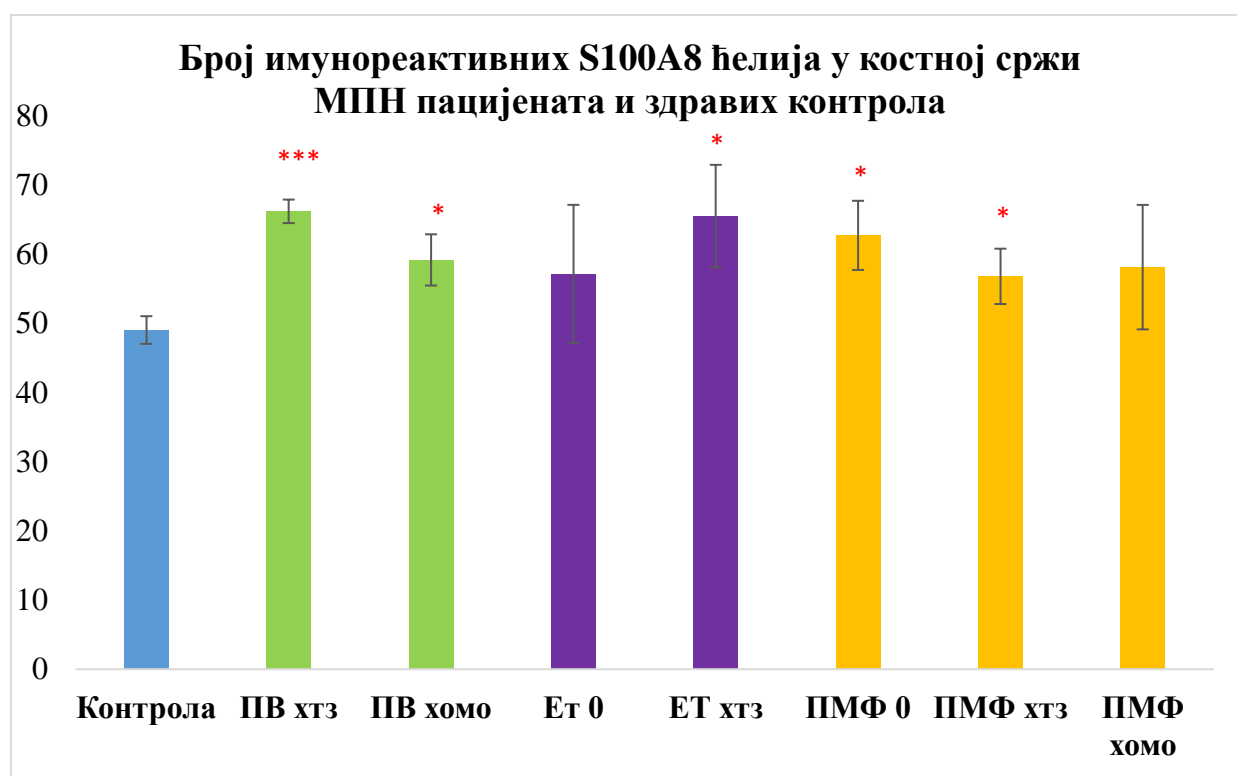
Слика 13. Ниво S100A4 протеина у узорцима костне сржи код ЕТ без мутације (а), ЕТ хтз (б), ПМФ без мутације (в) и ПМФ хтз (г). Увеличање x20 (а,б,в); x40 (г).

4.4.2. Број имунореактивних S100A8 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације

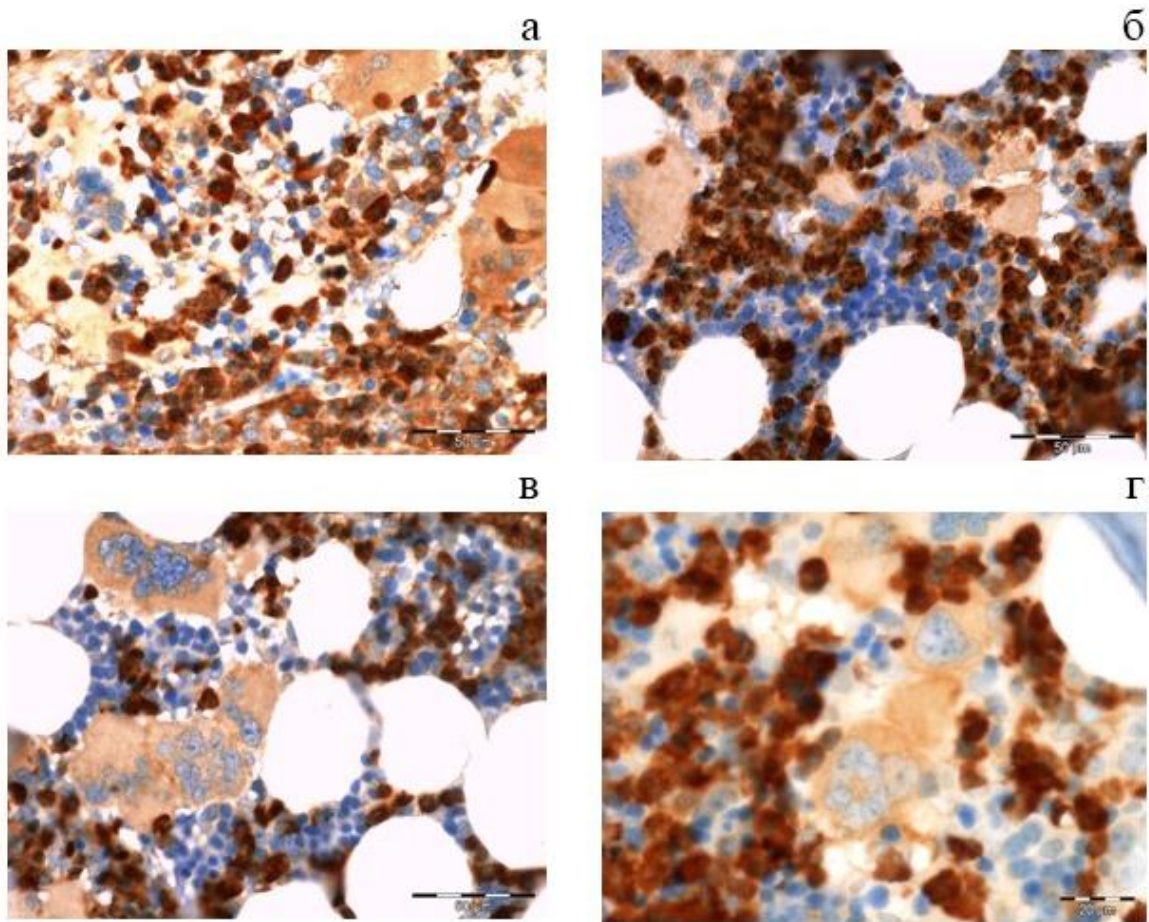
У ћелијама костне сржи МПН пацијената праћен је ниво S100A8 протеина. Имунохистохемијска анализа нивоа S100A8 протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број S100A8 позитивних ћелија високо статистички значајно повећан код пацијената који су и хетерозиготи (** $p < 0,001$) и значајно повећан код пацијената који су хетерозиготи ($p < 0,05$) (графикон 14).

Код пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом забележен је статистички значајно већи број S100A8 ћелија у поређењу са контролним узорцима ($p < 0,05$) (графикон 14).

У групи пацијената са ПМФ дијагнозом без JAK2V617F мутације и у групи пацијената са ПМФ хетерозиготним статусом забележен је статистички значајно већи број S100A8 имунореактивних ћелија у поређењу са контролним узорцима ($p < 0,05$) (графикон 14, слика б).



Графикон 14. Број имунореактивних S100A8 ћелија у узорцима костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације ($p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



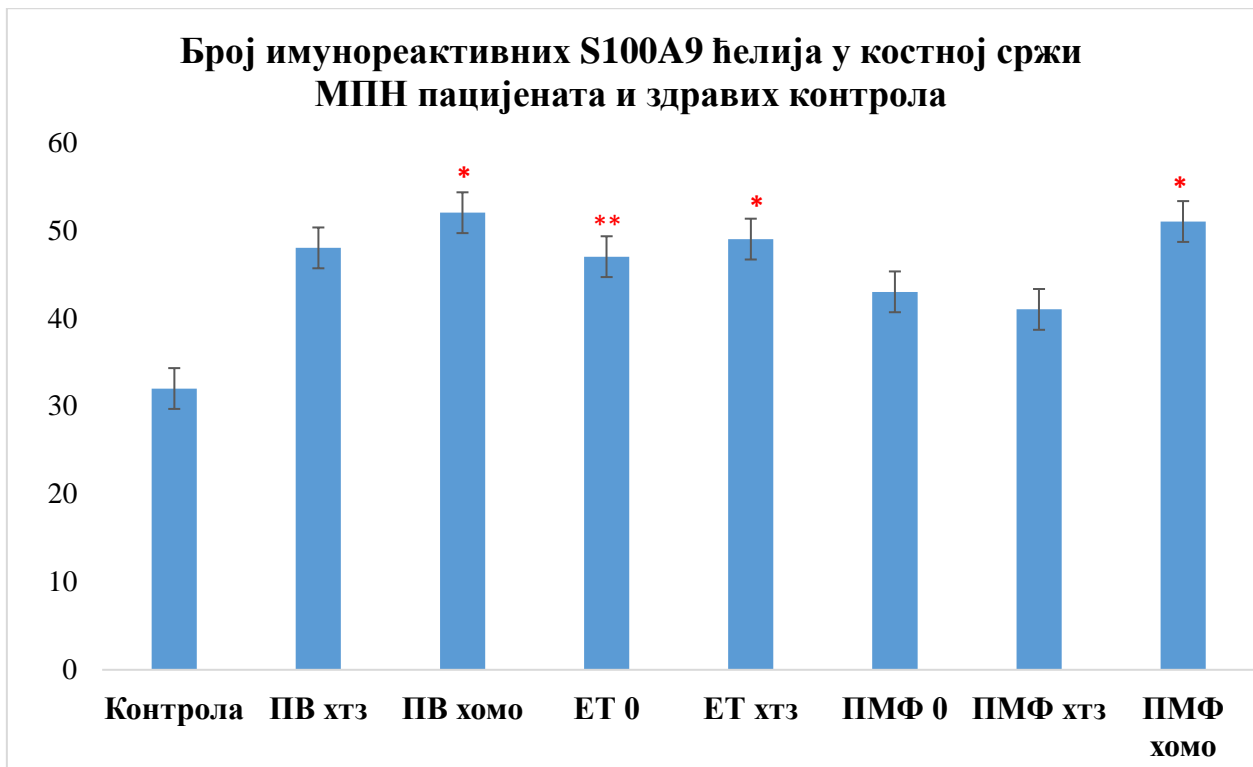
Слика 14. Ниво S100A8 протеина у узорцима костне сржи код ПВ хтз (а), ПВ хомо (б), ПМФ без мутације (в) и ПМФ хтз (г). Увеличање x20 (а,б,в); x40 (г).

4.4.3. Број имунореактивних S100A9 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације

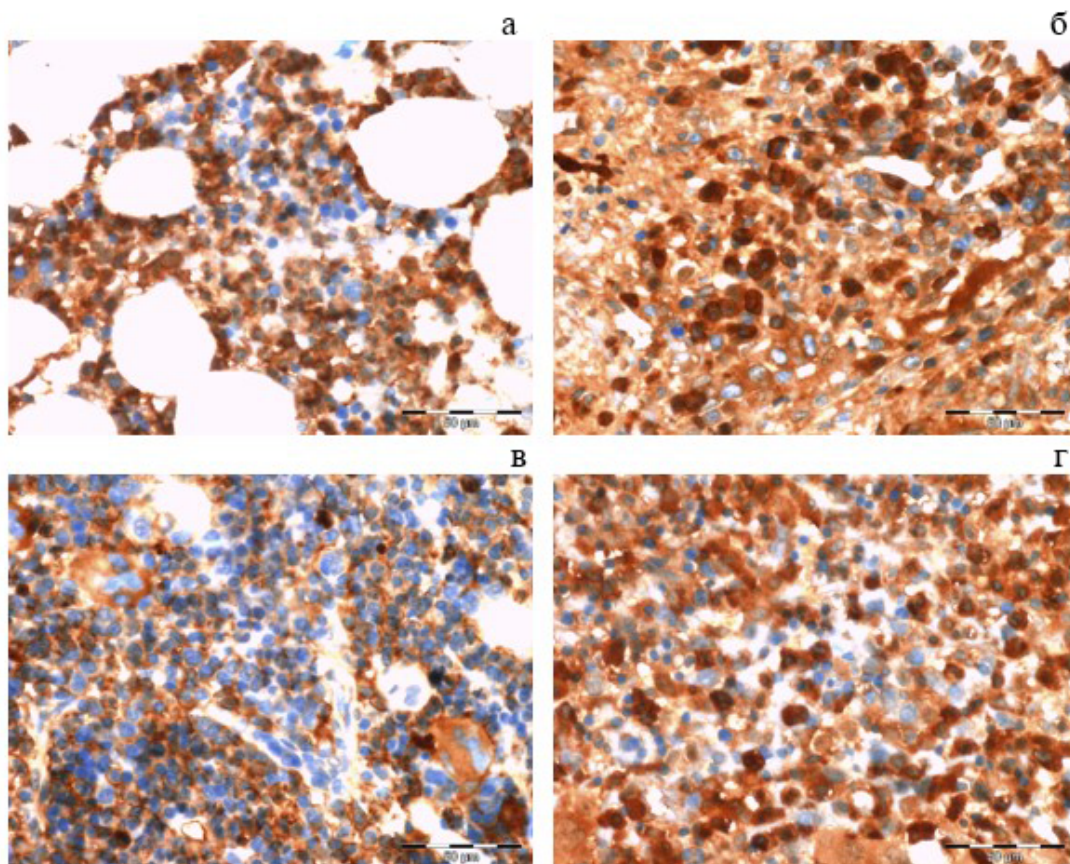
У ћелијама костне сржи МПН пацијената праћен је ниво S100A9 протеина. Имунохистохемијска анализа нивоа S100A9 протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број S100A9 позитивних ћелија статистички значајно повећан код пацијената који су хомозиготи ($*p < 0,05$) (графикон 15).

Код пацијената са ЕТ статусом без мутације забележен је статистички значајно већи број S100A9 ћелија у поређењу са контролним узорцима ($**p < 0,01$), док је у групи испитаника који су били хетерозиготи забележен такође већи ниво S100A9 протеина ($*p < 0,05$) (графикон 15).

У групи пацијената са ПМФ хомозиготним статусом забележен је статистички значајно већи број S100A9 имунореактивних ћелија у поређењу са контролним узорцима ($*p < 0,05$) (графикон 15, слика 7).



Графикон 15. Број имунореактивних S100A9 ћелија у узорцима костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).



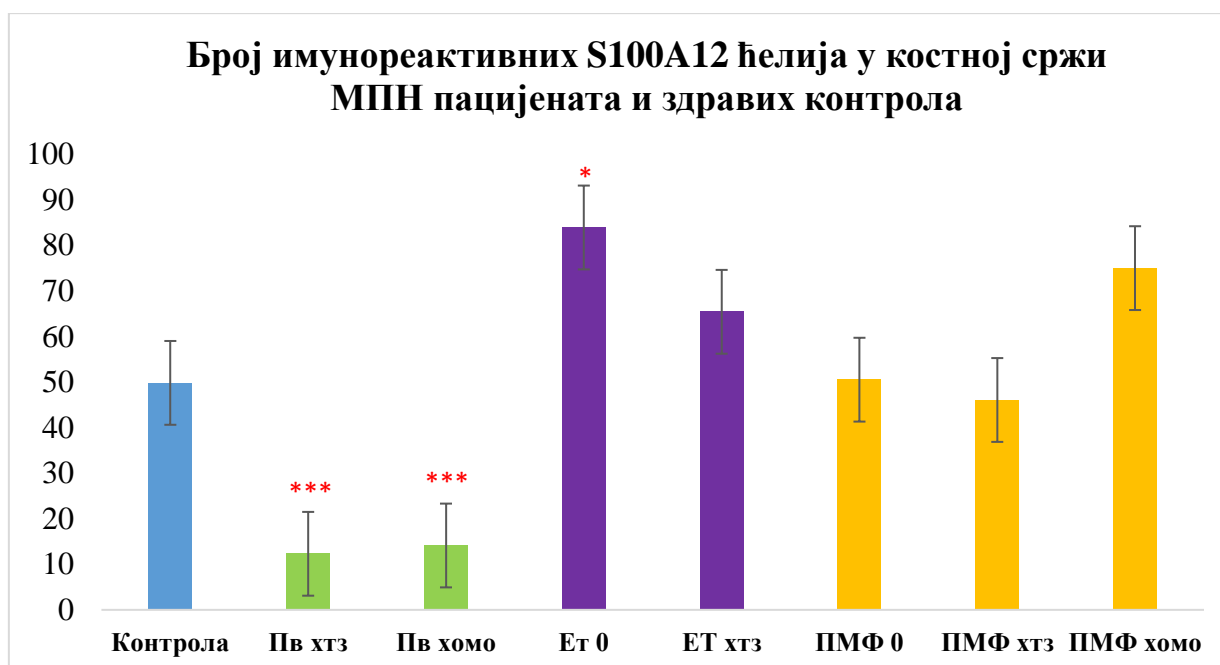
Слика 15. Ниво S100A9 протеина у узорцима костне сржи код ПВ хтз (а), ПВ хомо (б), ПМФ без мутације (в) и ПМФ хтз (г). Увеличање $\times 20$ (а,б,в); $\times 40$ (г).

4.4.4. Број имунореактивних S100A12 ћелија у узорцима костне сржи у односу на присуство JAK2V617F мутације

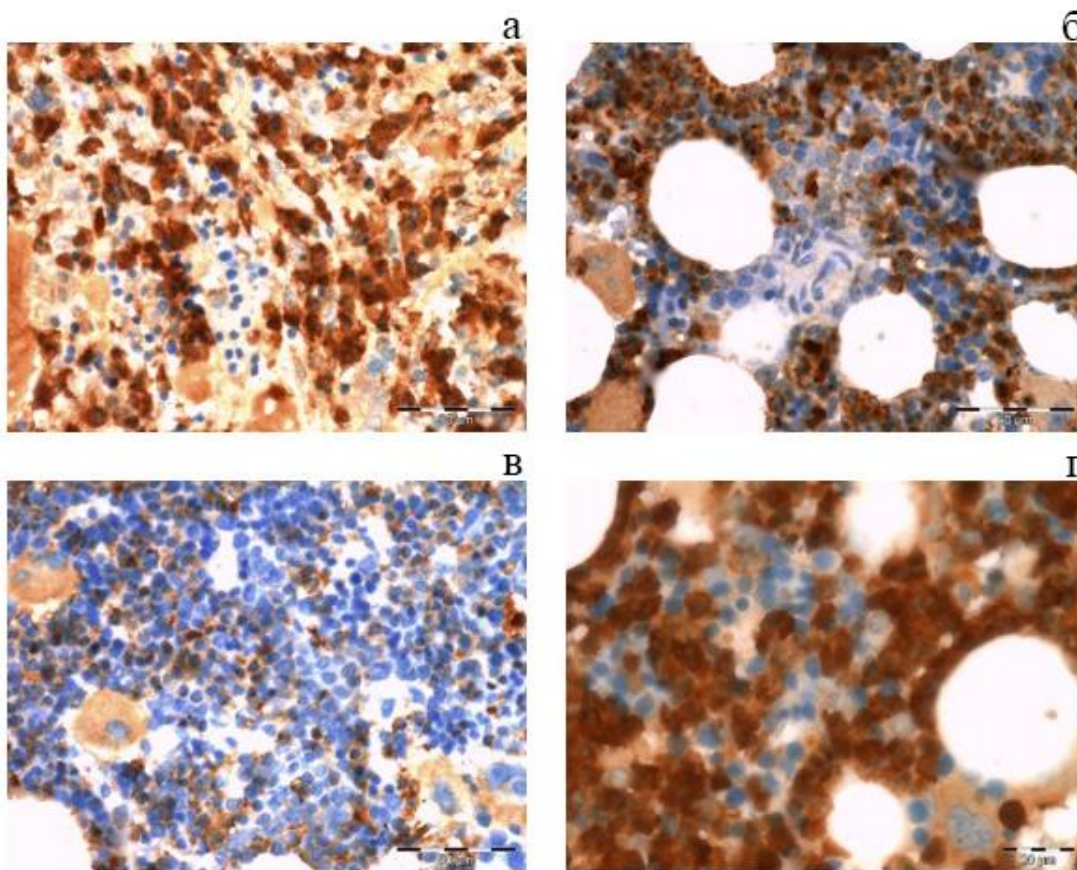
У ћелијама костне сржи МПН пацијената праћен је ниво S100A12 протеина. Имунохистохемијска анализа нивоа S100A12 протеина у ћелијама костне сржи пацијената са ПВ дијагнозом је показала да је број S100A12 позитивних ћелија високо статистички значајно мањи код пацијената који имају како хетерозиготни тако и хомозиготни статус (** $p < 0,001$) (графикон 16).

Код пацијената са ЕТ дијагнозом без JAK2V617F мутације забележен је статистички значајно већи број S100A12 имунореактивних ћелија у поређењу са контролним узорцима (* $p < 0,05$) (Графикон 16, слика 7).

У групи испитаника са ПМФ дијагнозом број S100A12 имунореактивних ћелија није се значајно разликовао у односу на контролу, али је био већи у поређењу са истим (графикон 16).



Графикон 16. Број имунореактивних S100A12 ћелија у узорцима костне сржи МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство JAK2V617F мутације (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



Слика

16. Ниво S100A12 протеина у узорцима костне сржи код контролних узорака (а), ЕТ без мутације (б), ПМФ без мутације (в) и ПМФ хтз. Увеличање x20 (а,б,в); x40 (г)

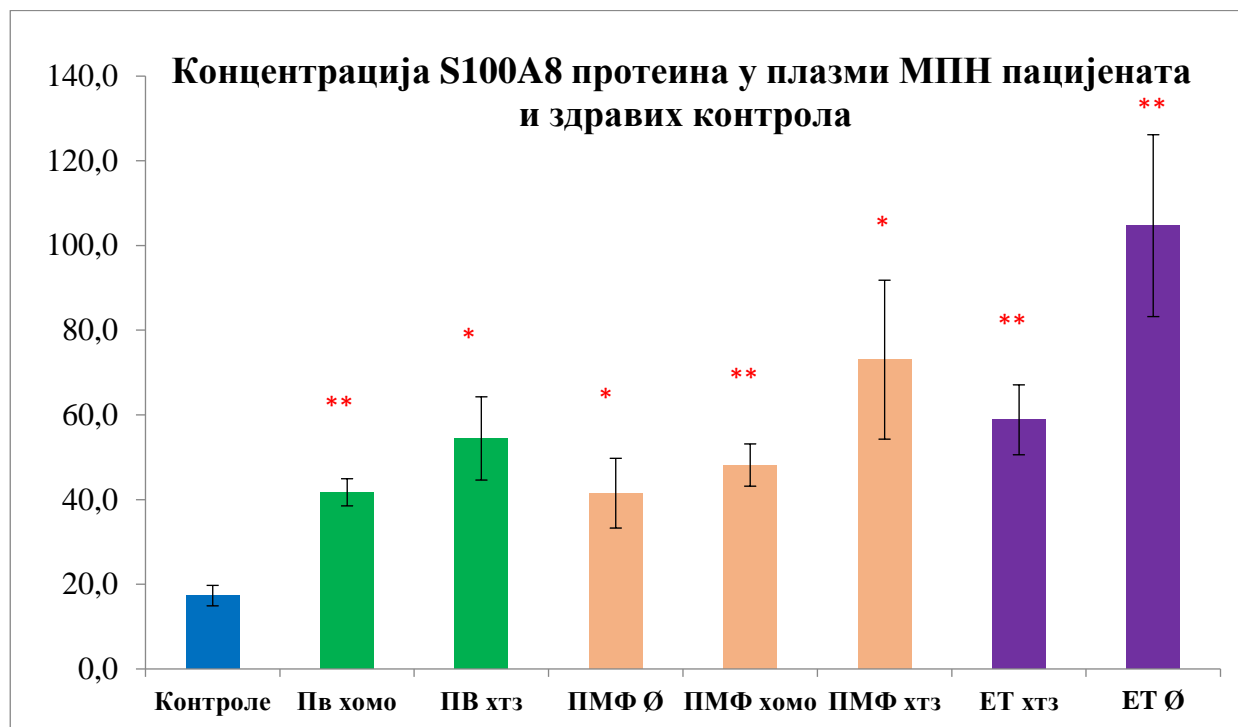
4.5. Одређивање концентрације инфламаторних фактора у плазми МПН пацијената добијен применом ELISA методе

Детекција фактора инфламације S100A8, S100A9 и S100A12 вршена је на узорцима плазме МПН пацијената у односу на присуство *JAK2V617F* мутације. Испитивање је спроведено на укупно 34 узорака МПН пацијената укључујући и контролне узорке. Према дијагнозама и *JAK2V617F* мутационом статусу у студији је учествовало 10 ПВ узорака (по 5 хомозигота и хетерозигота), 14 ПМФ (5 без *JAK2V617F* мутације, 4 хомозигота и 5 хетерозигота) и 10 ЕТ узорака (по 5 хомозигота и хетерозигота).

4.5.1. Одређивање концентрације S100A8 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе

Просечне вредности концентрације S100A8 протеина у плазми свих група МПН пацијената су биле статистички значајно веће у поређењу са контролама (графикон 17). Високо статистички значајно већа концентрација S100A8 протеина забележена је у плазми ПВ хомозиготних, ПМФ хомозиготних, ЕТ хетерозиготних пацијената и ЕТ пацијената без *JAK2V617F* мутације ($p < 0,01$) у односу на контролу, док је у групи ПВ хетерозиготних, ПМФ

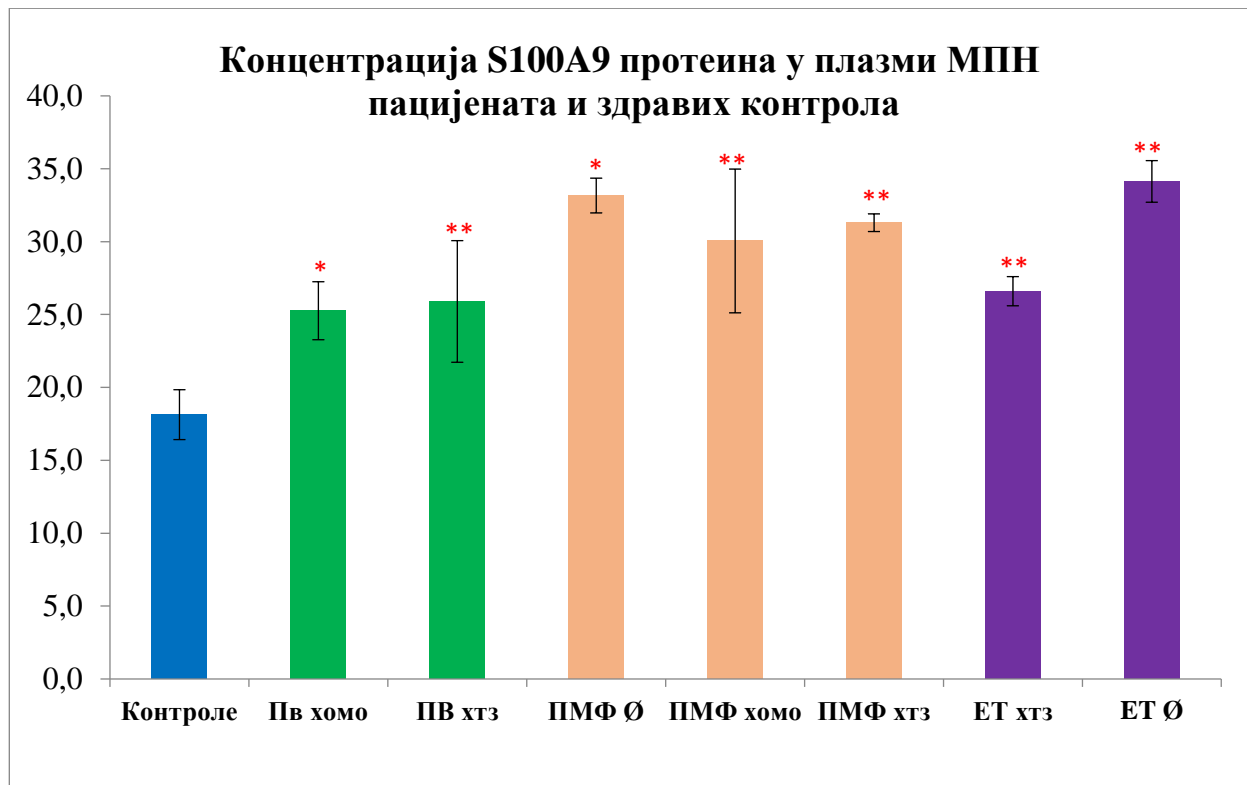
без *JAK2V617F* мутације и ПМФ хетерозиготних забележена значајно већа концентрација S100A8 протеина у плазми у поређењу са контролама ($p < 0,05$) (графикон 17).



Графикон 17. Концентрација S100A8 протеина у плазми МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.5.2. Одређивање концентрације S100A9 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе

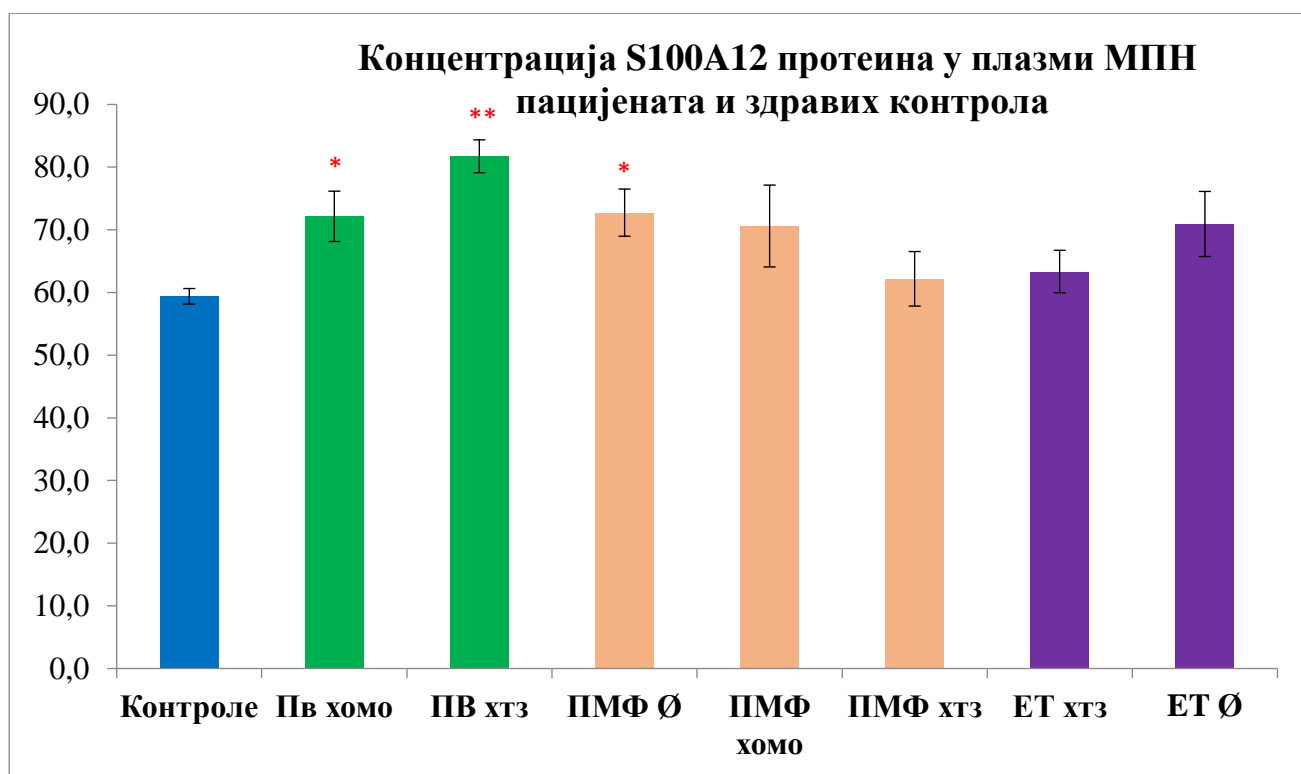
Просечне вредности концентрације S100A9 протеина у плазми свих група МПН пацијената су биле статистички значајно веће у поређењу са контролама (графикон 18). Високо статистички значајно већа концентрација S100A9 протеина забележена је у плазми Пв хетерозиготних, ПМФ хомозиготних и хетерозиготних и у групи ЕТ хетерозиготних пацијената и ЕТ пацијената без *JAK2V617F* мутације ($p < 0,01$) у односу на контролу, док је у групи Пв хомозиготних и ПМФ без *JAK2V617F* мутације забележена значајно већа концентрација S100A9 протеина у плазми у поређењу са контролама ($p < 0,05$) (графикон 18).



Графикон 18. Концентрација S100A9 протеина у плазми МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.5.3. Одређивање концентрације S100A12 протеина у плазми МПН пацијената применом ELISA методе

Просечне вредности концентрације S100A12 протеина у плазми Пв хетерозиготних ($p < 0,01$) и Пв хомозиготних ($p < 0,05$) пацијената је била статистички значајно већа у поређењу са контролним узорцима (графикон 19). Статистички значајно већа концентрација S100A12 протеина забележена је у плазми ПМФ пацијената без *JAK2V617F* мутације ($p < 0,05$) у односу на контролу, док у групи ЕТ пацијената концентрација S100A12 протеина у плазми није била значајно различита у поређењу са контролама (графикон 19).



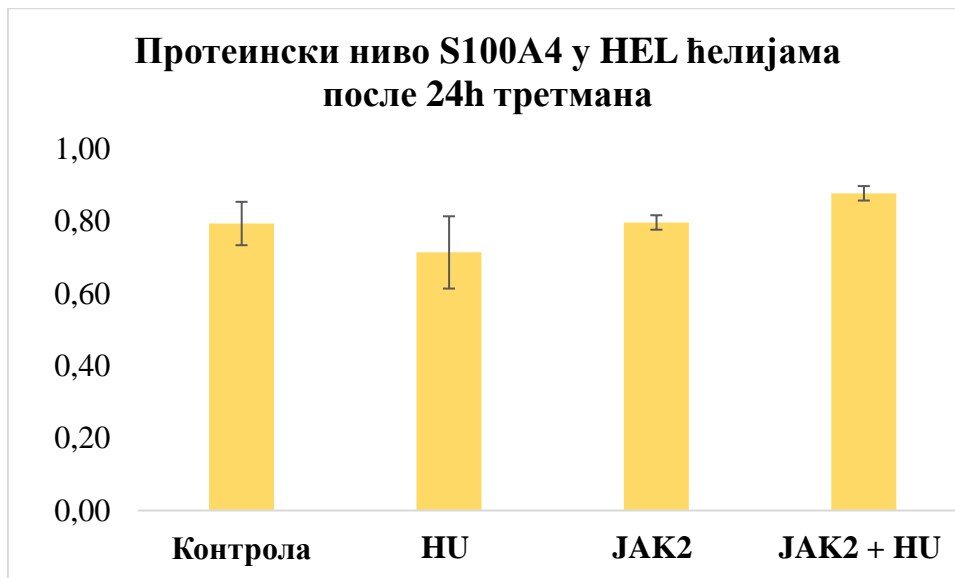
Графикон 19. Концентрација S100A12 протеина у плазми МПН пацијената и здравих контрола у односу на присуство *JAK2V617F* мутације (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.6. Испитивање нивоа фактора инфламације *in vitro* на ћелијској линији HEL 92.1.7 после третмана хидроксиуреом и специфичним JAK2 инхибитором 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном

Да би се испитало деловање хидроксиуреа и специфичног JAK2 инхибитора – 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексана (НВС) на нивое фактора инфламације S100A4, S100A9 и S100A12, HEL 92.1.7 ћелије третиране су хидроксиуреом (100 μM) и НВС-ом (50 μM) – посебно и у комбинацији, у трајању од 24 и 48 сати. Ниво ових маркера испитиван је применом *Western blot* методе. Експеримент је урађен у трипликату.

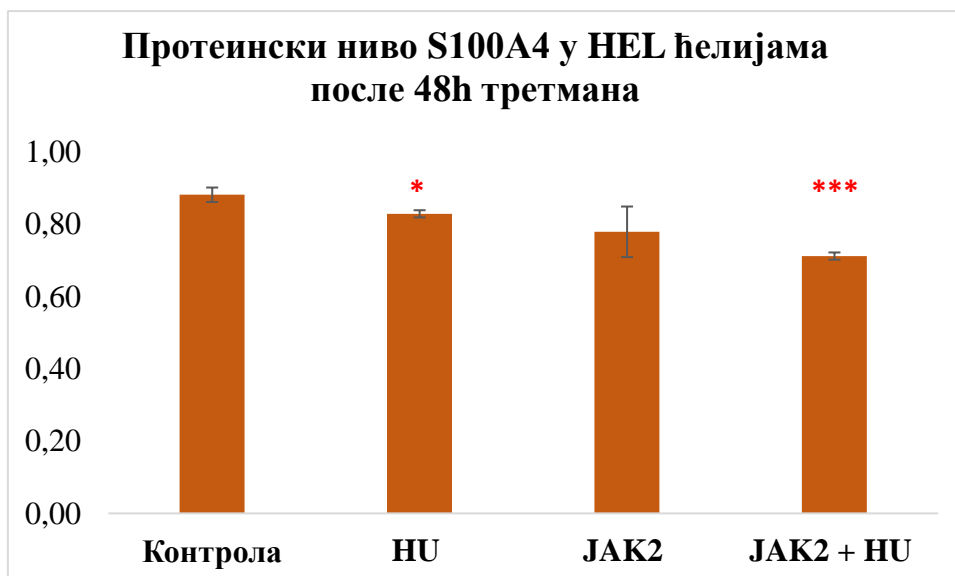
4.6.1. Протеински ниво S100A4 после 24 и 48 сати третмана

У HEL ћелијама 24 часа после третмана, није уочена статистички значајна разлика у нивоу S100A4 у односу на контроле (графикон 20).



Графикон 20. Протеински ниво S100A4 24 часа после третмана са хидроксиуреом (100 μ M) и HBC (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, JAK2-HBC). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. Експеримент је урађен у трипликату.

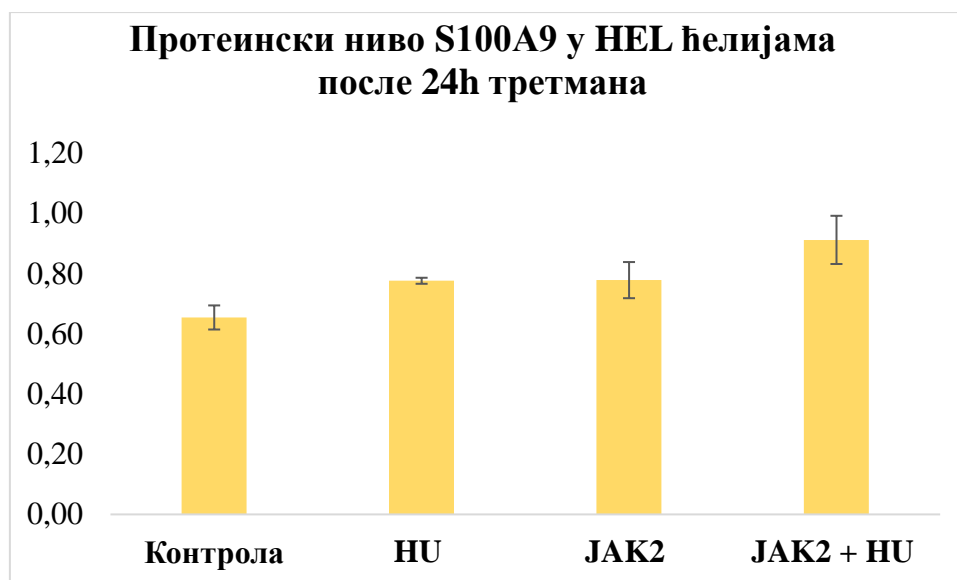
Ниво S100A4 смањен је после 48 сати третмана хидроксиуреом и HBC-ом, као и са њиховом комбинацијом у односу на контроле. Ниво S100A4 смањен је статистички значајно у групи третираној хидроксиуреом у поређењу са контролом ($p < 0,05$), док је у групи која је третирана комбинацијом хидроксиуреа и JAK2 инхибитора забележено високо статистички значајно смањење нивоа S100A4 протеина (графикон 21).



Графикон 21. Протеински ниво S100A4 после 48 сати третмана са хидроксиуреом (100 μ M) и HBC-ом (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, JAK2- HBC). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. Експеримент је урађен у трипликату.

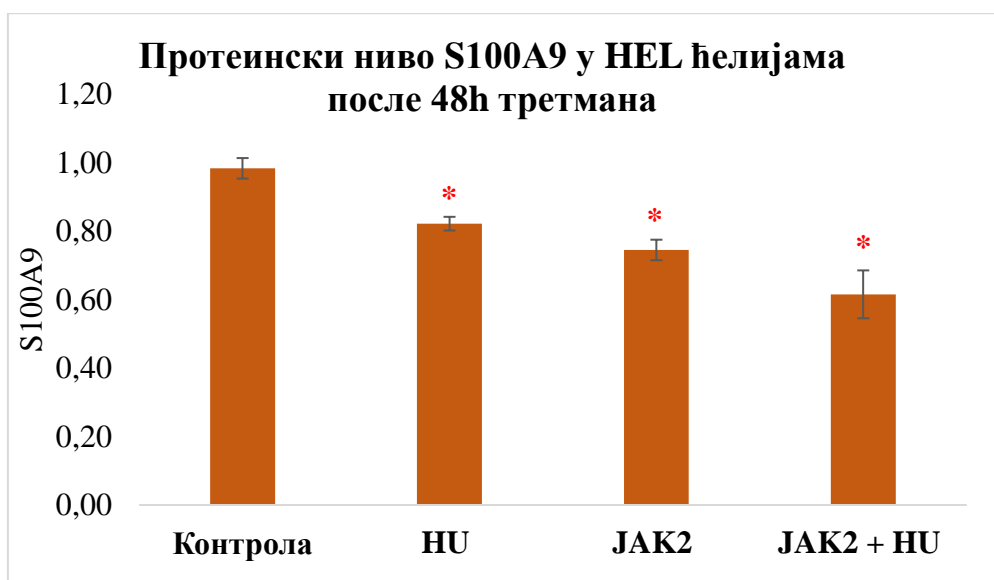
4.6.2. Протеински ниво S100A9 после 24 и 48 сати третмана

У HEL ћелијама после 24 сата третмана, долази до повећања нивоа S100A9 протеина у свим групама у односу на контроле. Статистичка анализа, међутим, није показала да постоји значајна разлика у погледу нивоа S100A9 у односу на контролу (графикон 22).



Графикон 22. Протеински ниво S100A9 после 24 сата третмана са хидроксиуреом (100 μM) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μM) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, , JAK2-НВС). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. Експеримент је урађен у трипликату.

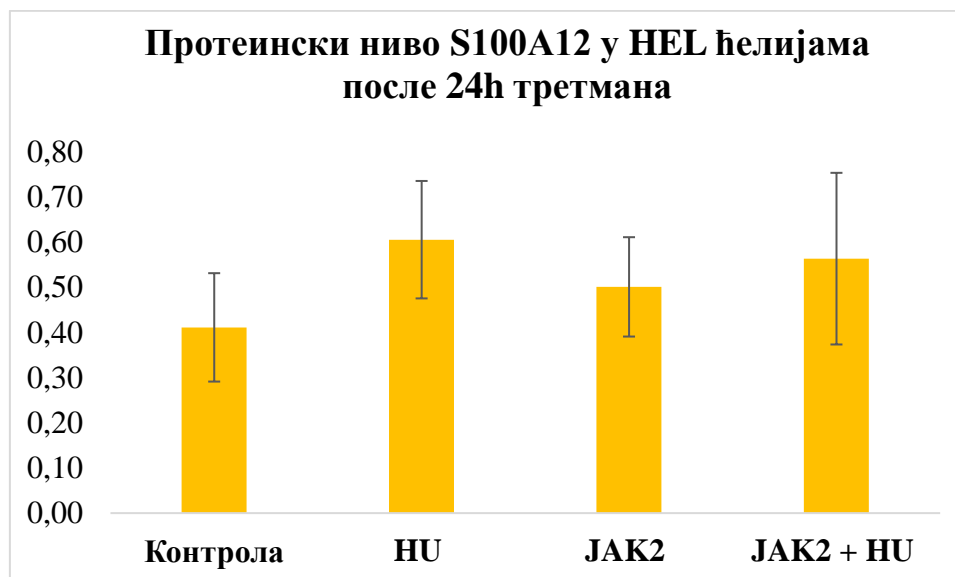
Ниво S100A9 смањен је после 48 сати третмана хидроксиуреом и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, као и са њиховом комбинацијом у односу на контроле. Ниво S100A9 смањен је статистички значајно у свим испитиваним групама у поређењу са контролом ($p < 0,05$) (графикон 23).



Графикон 23. Протеински ниво S100A9 после 48 сати третмана са хидроксиуреом (100 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, ЈАК2-НВС). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. * $p < 0,05$. Експеримент је урађен у трипликату.

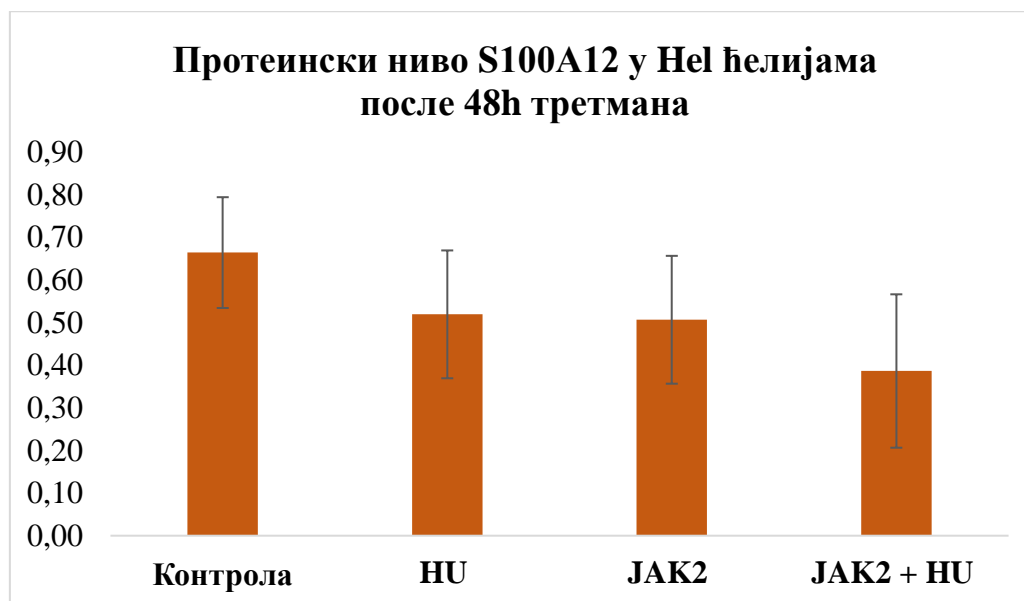
4.6.3. Протеински ниво S100A12 после 24 и 48 сати третмана

У HEL ћелијама после 24 сата третмана, статистичка анализа, није показала да постоји значајна разлика у погледу нивоа S100A12 у односу на контролу (графикон 24).



Графикон 24. Протеински ниво S100A12 после 24 сата третмана са хидроксиуреом (100 μ M) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μ M) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, ЈАК2-НВС). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. Експеримент је урађен у трипликату.

Ниво S100A12 смањен је после 48 сати третмана хидроксиуреом и НВС-ом, као и са њиховом комбинацијом у односу на контроле мада та разлика није била статистички значајна ни у једној поменутој групи (Графикон 25).



Графикон 25. Протеински ниво S100A12 после 48 сати третмана са хидроксиуреом (100 μM) и 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном (50 μM) у HEL ћелијама (ХУ-хидроксиуреа, ЈАК2-НВС). За нормализацију резултата коришћен је β -актин. Експеримент је урађен у трипликату.

4.7. Испитивање нивоа маркера инфламације у мононуклеарима МПН пацијената после третмана са инхибиторима и ИЛ-6 сигналних путева

Испитивање нивоа маркера инфламације у мононуклеарима пацијената са МПН после третмана са инхибиторима и ИЛ-6 спроведено је на укупном узорку од 15 МПН пацијената применом *Western blot* методе.

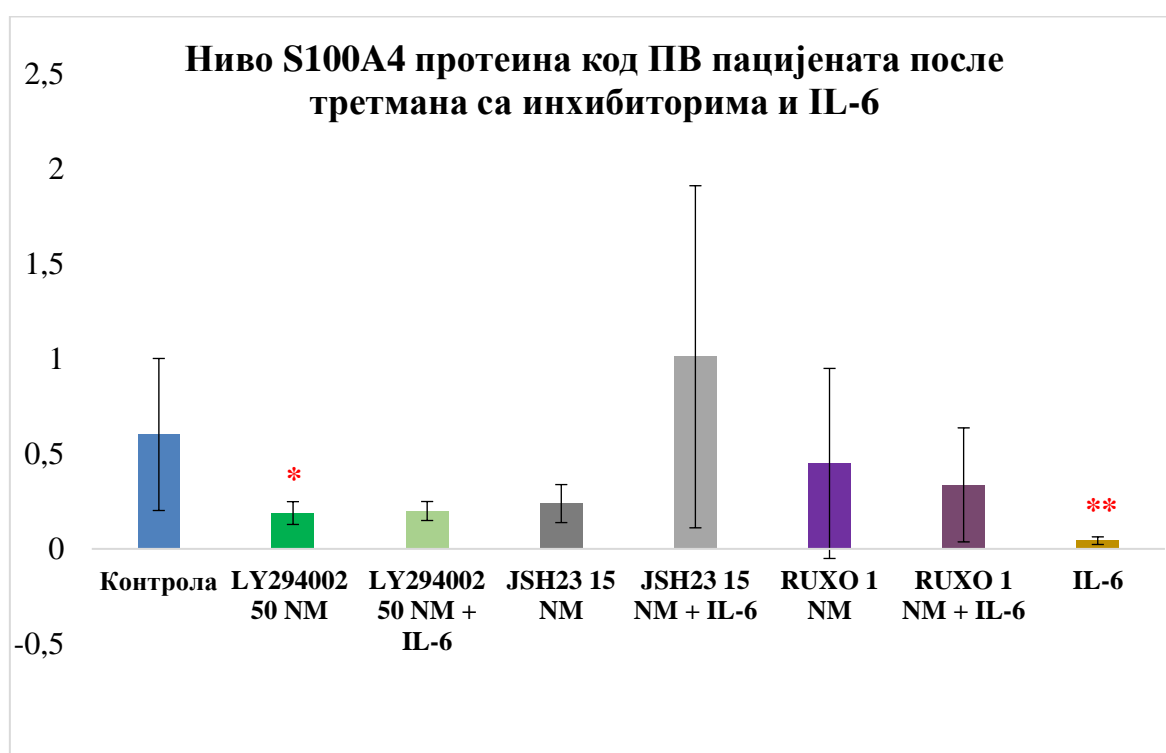
Да би се испитао механизам путем кога ИЛ-6 остварује своје ефекте, мононуклеари су третирани са ИЛ-6 (20 ng/ml) и неспецифичним ЈАК1/2 инхибитором руксолитинибом (1 μM), JSH23 инхибитором NF- κ B сигналног пута (0,75 μM), Ly294002 инхибитором PI3 сигналног пута (50 μM) током 60 минута, при чему су инхибитори додавани 30 минута пре ИЛ-6. По истеку третмана анализирани су сигнални путеви (ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt, NF- κ B), као и ниво инфламаторних фактора.

4.7.1. Ниво S100A4 протеина код МПН

4.7.1.1. Ниво S100A4 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

Ниво S100A4 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показао смањење у свим случајевима изузев после деловања комбинације NF-κB инхибитора (JSH23) и IL-6 где је забележен повећан ниво у односу на контролу (графикон 26).

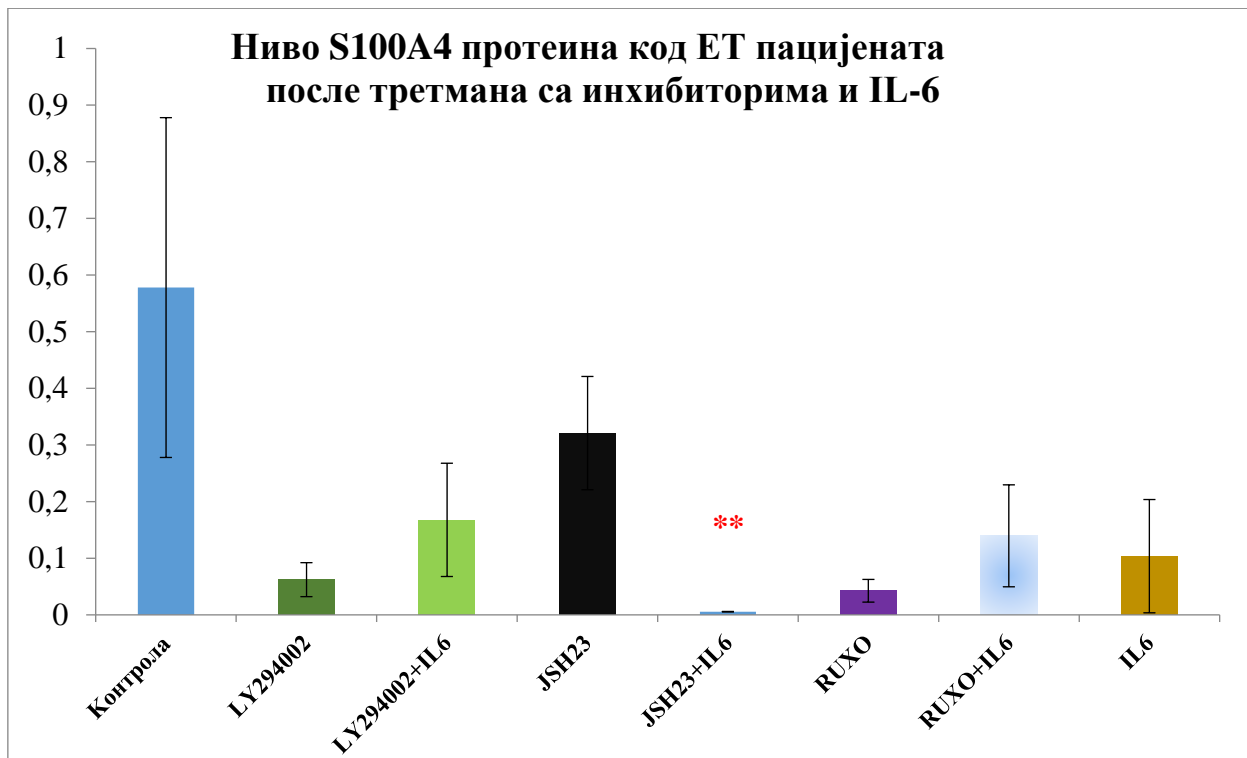
Статистички значајно смањење нивоа S100A4 протеина забележено је после деловања инхибитора PI3 сигналног пута (Ly294002) ($p < 0,05$), као и у односу на деловање проинфламаторног маркера IL-6 ($p < 0,01$) (графикон 26).



Графикон 26. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.7.1.2. Ниво S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

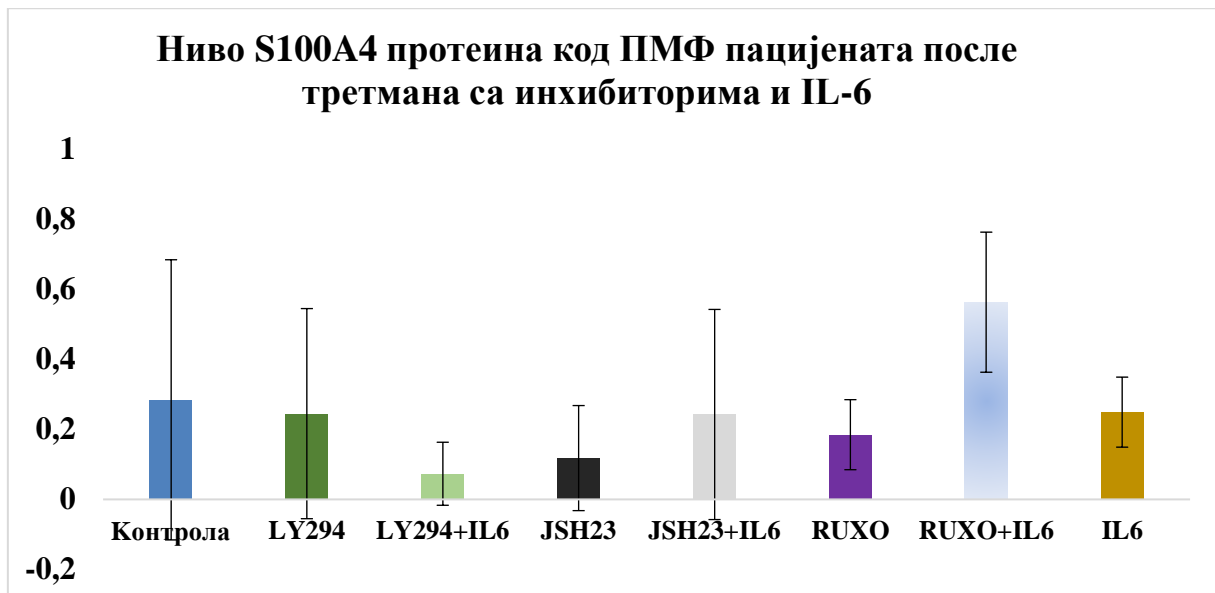
Анализа нивоа S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показала смањење нивоа овог протеина у свим испитиваним комбинацијама у односу на контролу, при чему је статистички значајно смањење забележено само после третмана комбинацијом инхибитора NF-κB сигналног пута (JSH 23) и IL-6 ($p < 0,01$) (графикон 27).



Графикон 27. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са Инхибиторима и ИЛ-6 (** $p < 0,01$).

4.7.1.3. Ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и ИЛ-6

Анализа је показала да је у групи испитаника са ПМФ дијагнозом забележен смањен ниво S100A4 протеина у свим групама осим у случају третмана са комбинацијом ИЛ-6 и ЈАК1/2 инхибитора где је забележен повећан ниво протеина у односу на контролу (графикон 28). Без обзира на забележену разлику статистичка анализа није показала значајну разлику између третираних група и контроле у нивоу S100A4 протеина код испитаника са ПМФ дијагнозом (графикон 28).

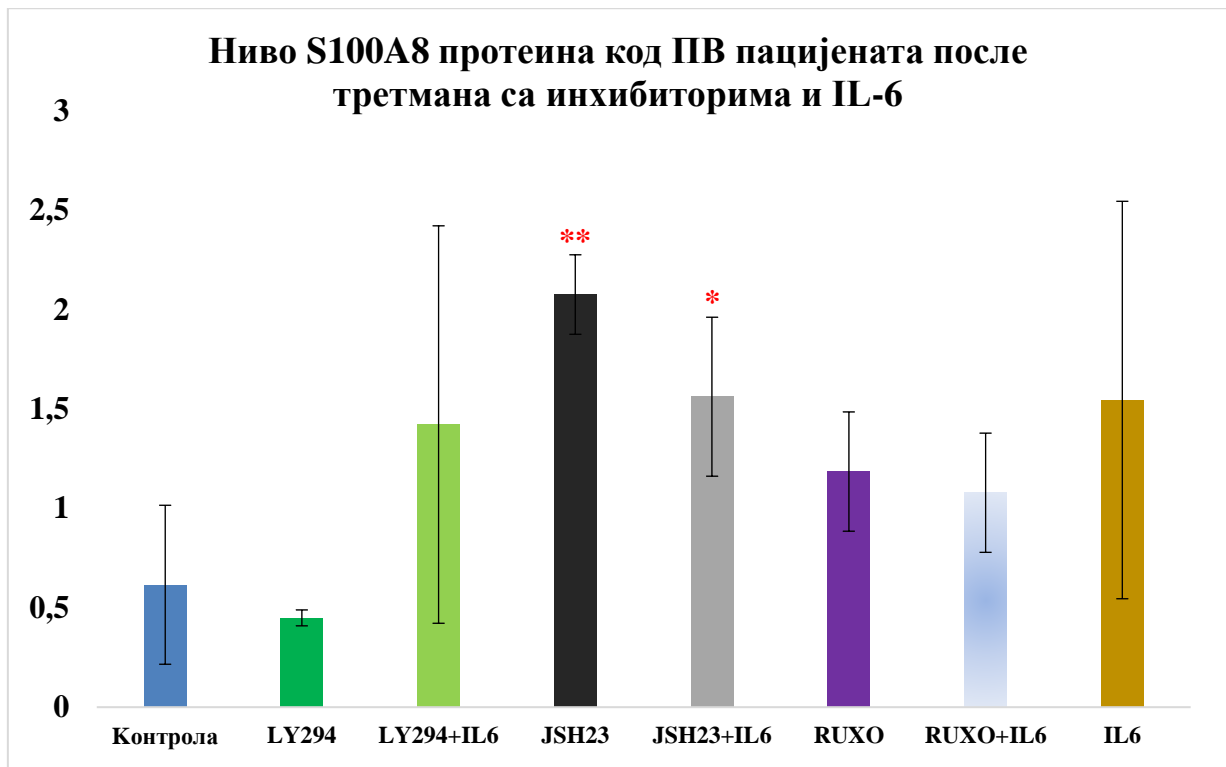


Графикон 28. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.7.2. Ниво S100A8 протеина код МПН

4.7.2.1. Ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

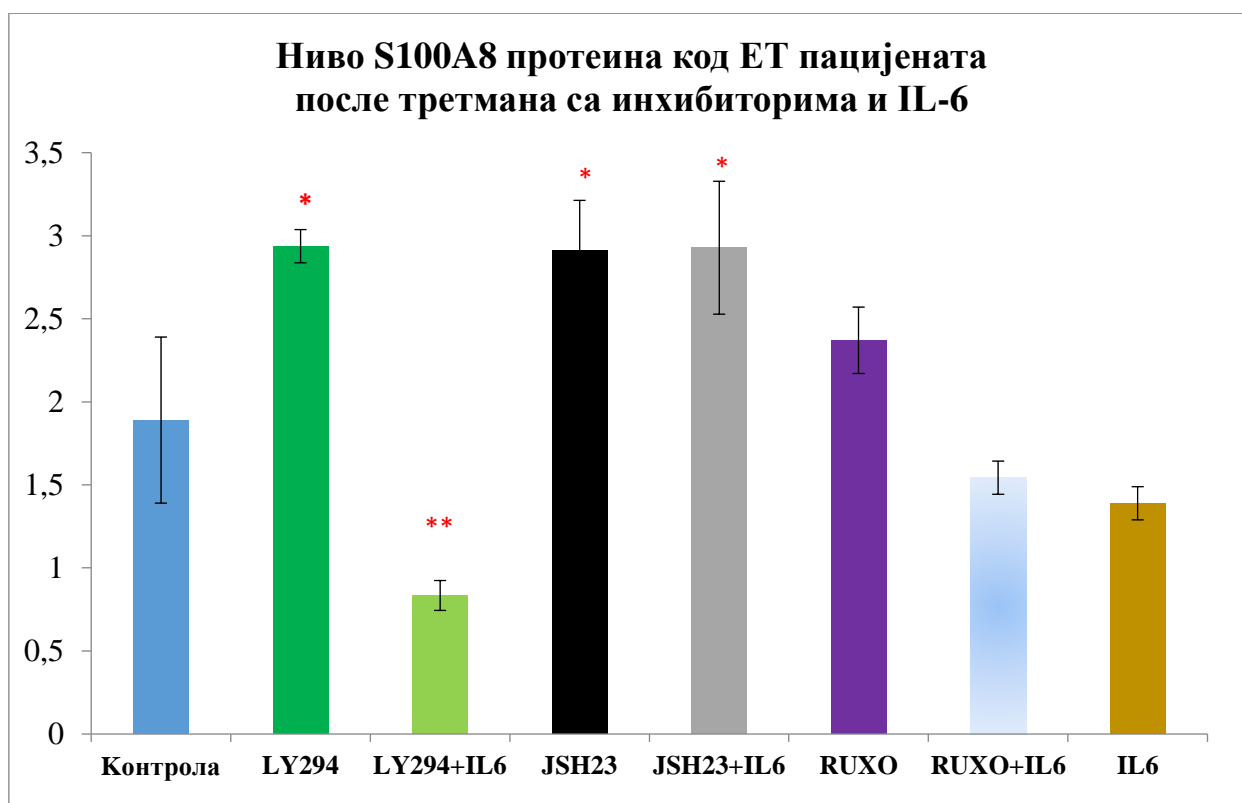
Статистички значајно већи ниво S100A8 протеина је забележен после третмана са JSH23 инхибитором ($p < 0,01$) као и после третмана са комбинацијом JSH23 и IL-6 ($p < 0,05$) (графикон 29). У свим осталим случајевима протеински ниво је био већи у односу на контролу, али та разлика није била статистички значајна (графикон 29).



Графикон 29. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.7.2.2. Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

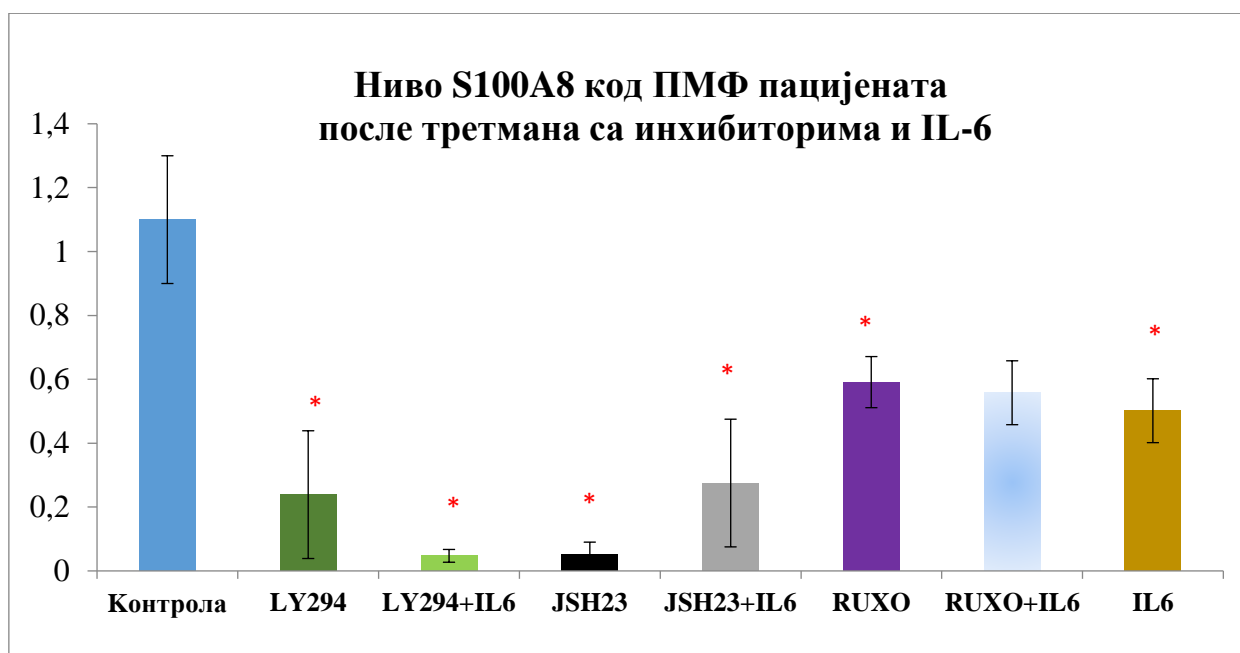
Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је статистички значајно повећан после третмана инхибитора P13 сигналног пута (Ly294002) ($p < 0,05$), NF- κ B сигналног пута (JSH23) као и комбинације инхибитора NF- κ B сигналног пута и IL-6 ($p < 0,05$) (графикон 30). Статистички значајно смањење нивоа S100A8 протеина код ЕТ пацијената забележено је после третмана са комбинацијом инхибитора P13 сигналног пута (Ly294002) и IL-6 ($p < 0,01$) (графикон 30).



Графикон 30. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.7.2.3. Ниво S100A8 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

Ниво S100A8 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је статистички значајно смањен после третмана инхибитора PI3 сигналног пута ($p < 0,05$), као и комбинације овог инхибитора са IL-6 ($p < 0,05$), инхибитором NF- κ B сигналног пута (JSH23) као и комбинације инхибитора NF- κ B сигналног пута и IL-6 ($p < 0,05$), као и после деловања инхибитора JAK1/2 сигналног пута (RUXO) и самог IL-6 (графикон 31). Одсуство статистички значајне разлике забележено је једно у групи ћелија која је третирана са комбинацијом инхибитора JAK1/2 сигналног пута (RUXO) и IL-6, али је и у том случају ниво протеина био мањи у поређењу са контролним узорцима ($p < 0,05$) (графикон 31).

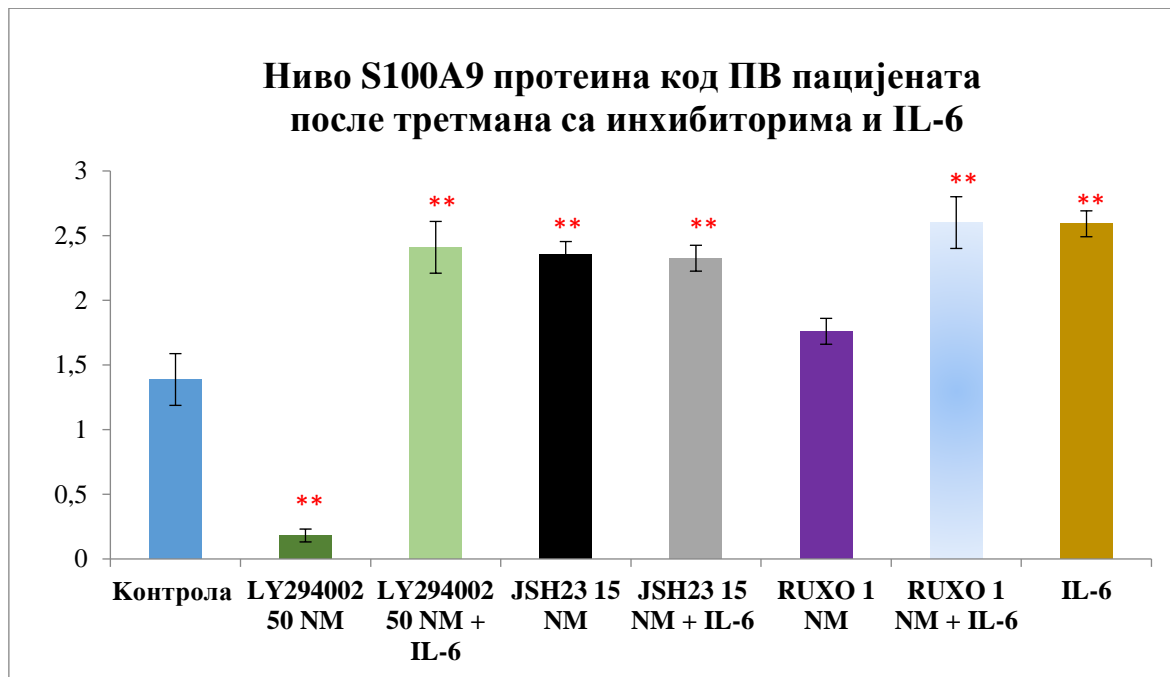


Графикон 31. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$).

4.7.3. Ниво S100A9 протеина код МПН

4.7.3.1. Ниво S100A9 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

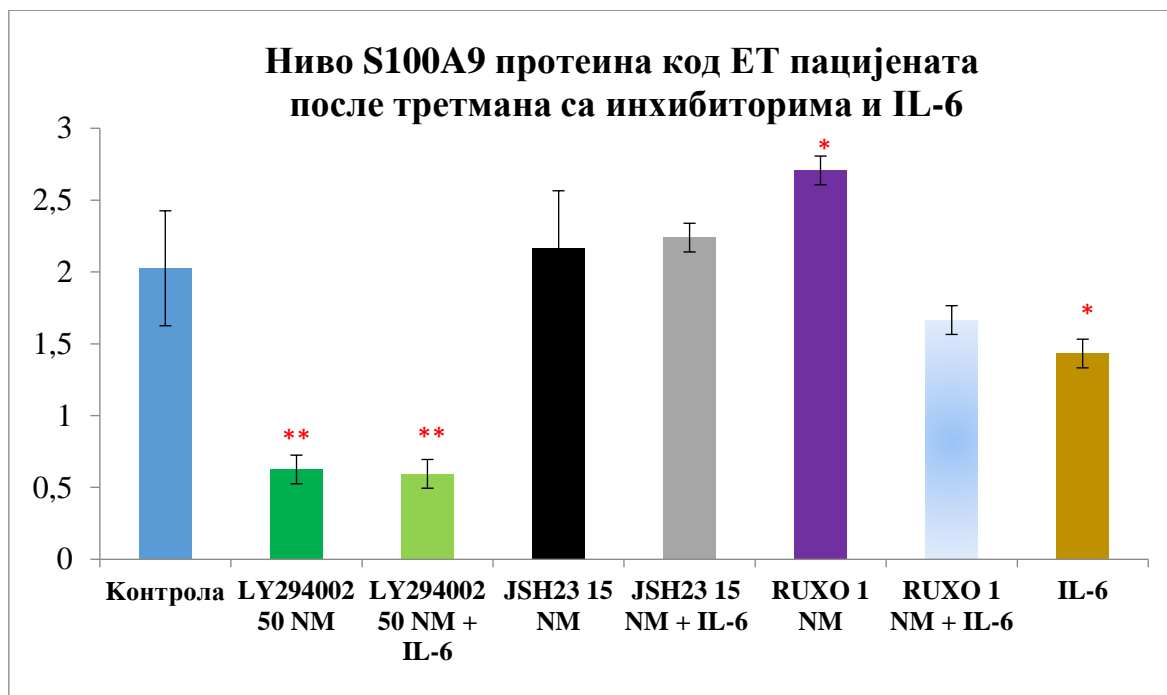
Ниво S100A9 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показао да постоји статистички значајно повећање после третмана инхибитора PI3 сигналног пута (Ly294002) и IL-6 у комбинацији ($p < 0,01$), затим после инхибитора NF- κ B сигналног пута (JSH23) самостално и у комбинацији са IL-6 ($p < 0,01$), као и после деловања комбинације инхибитора JAK1/2 сигналног пута и IL-6 и самосталног деловања проинфламаторног цитокина IL-6 ($p < 0,01$) (графикон 32). Са друге стране, високо статистички значајно смањење нивоа овог протеина је забележено једино после деловања инхибитора PI3 сигналног пута (Ly294002) ($p < 0,01$) (графикон 32).



Графикон 32. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (** $p < 0,01$).

4.7.3.2. Ниво S100A9 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

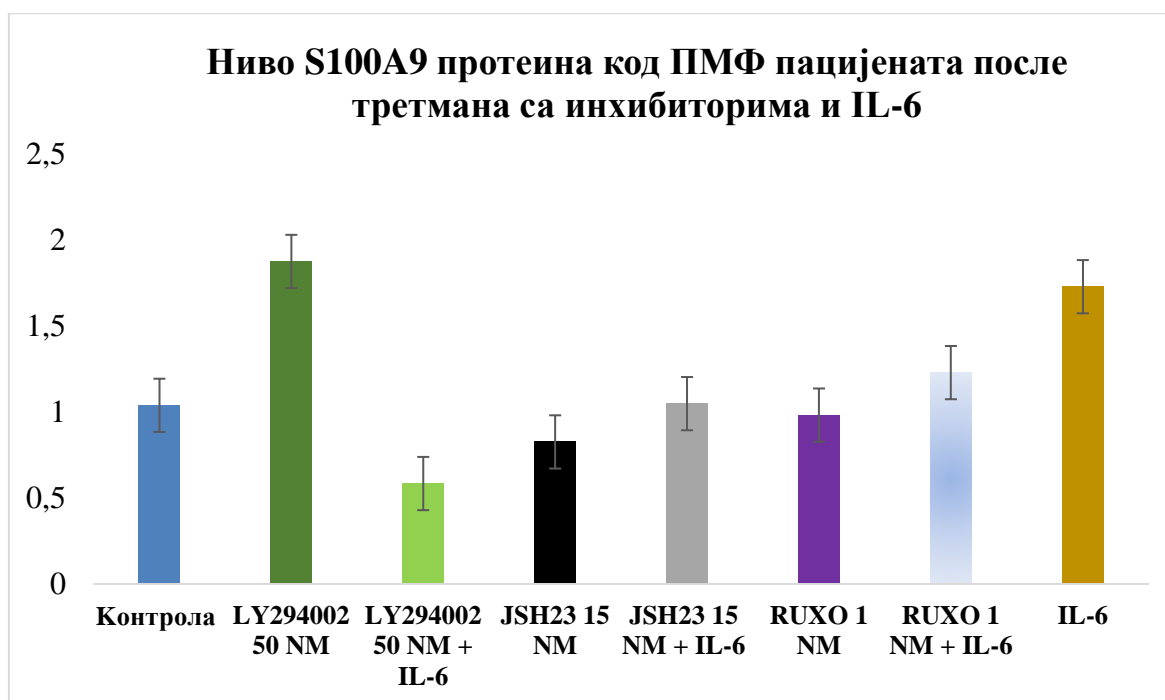
Високо статистички значајно смањење нивоа S100A9 протеина код ЕТ пацијената забележено је после третмана ћелија са инхибитором PI3 сигналног пута (Ly294002) као и после третмана са комбинацијом овог инхибитора и IL-6 ($p < 0,01$), док је статистички значајно повећање нивоа забележено после третмана мононуклеара са инхибитором JAK1/2 сигналног пута ($p < 0,05$) (графикон 33), док је статистички значајно смањење нивоа забележено после деловања самог проинфламаторног цитокина IL-6 ($p < 0,05$) (графикон 33).



Графикон 33. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.7.3.3. Ниво S100A9 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

Ниво S100A9 протеина код ПМФ пацијената није показао статистички значајну разлику у односу на контролну групу испитаника без обзира на тип и комбинацију третмана (графикон 34). Повећање нивоа испитиваног протеина забележено је у групи ћелија после третмана са инхибитором PI3 сигналног пута и после деловања IL-6 (графикон 34).

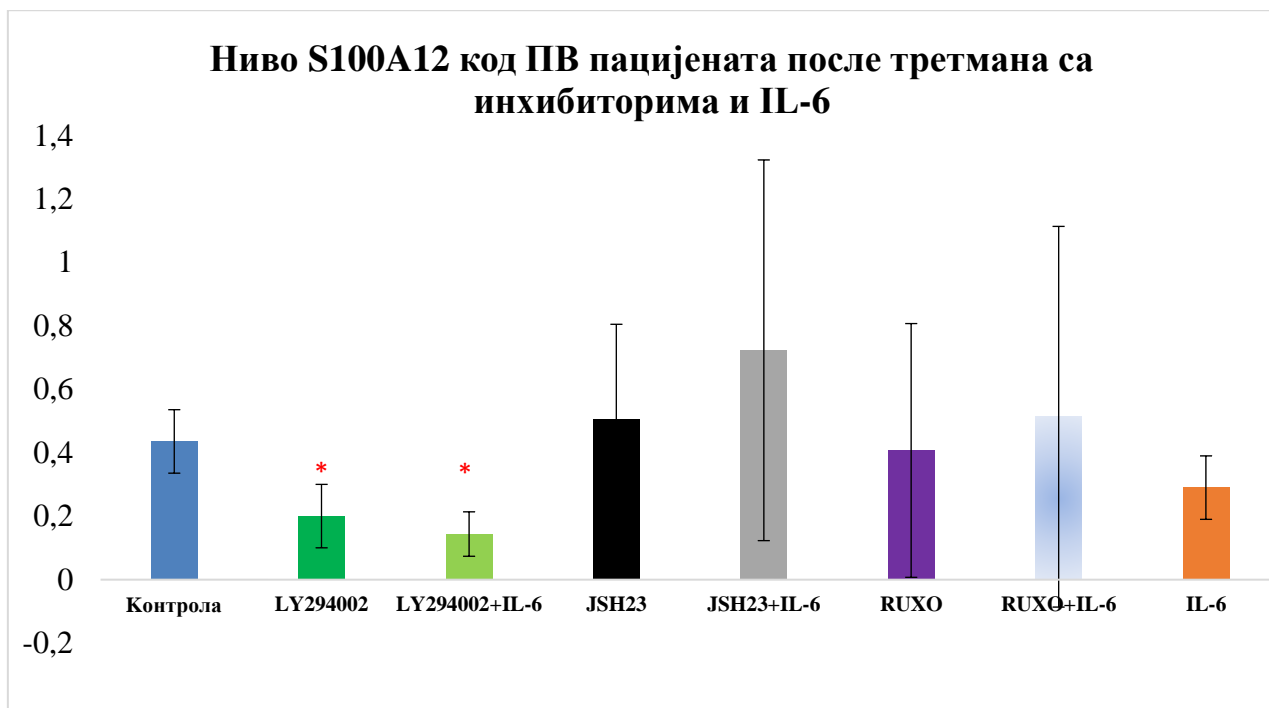


Графикон 34. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.7.4. Ниво S100A12 протеина код МПН

4.7.4.1. Ниво S100A12 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

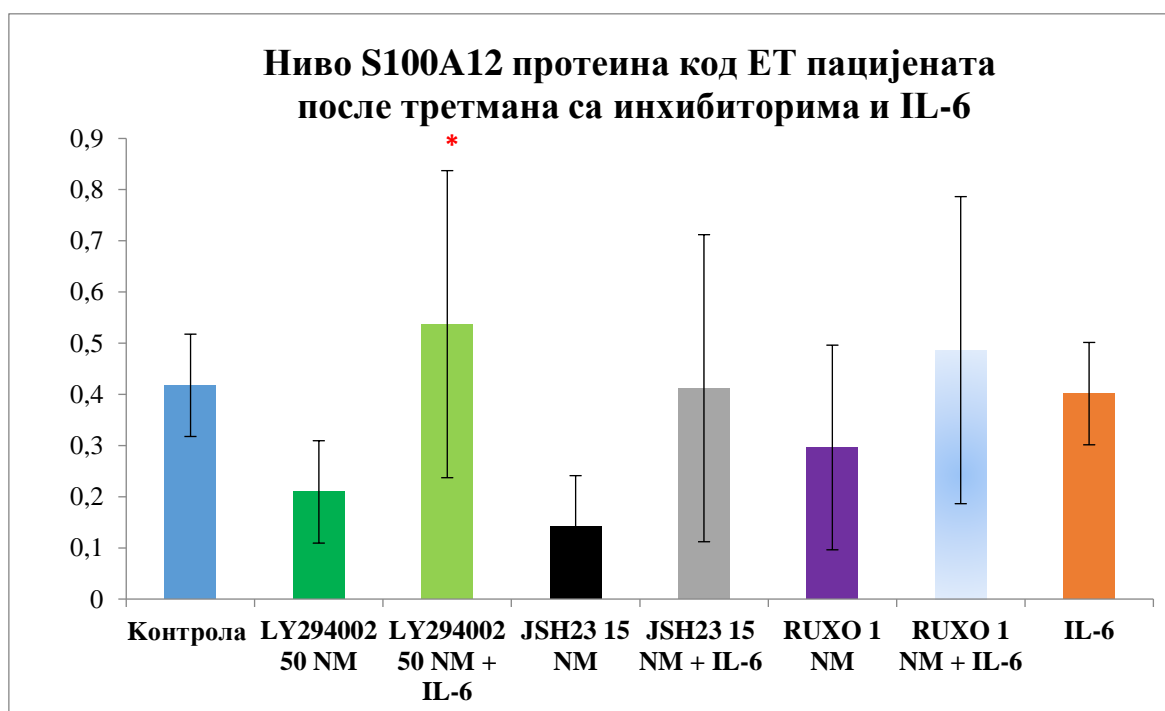
Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показао статистички значајно смањење после третмана ћелија са инхибитором PI3/АКТ сигналног пута, као и са његовом комбинацијом са IL-6 ($p < 0,05$) (графикон 35). У свим осталим испитиваним случајевима ниво протеина се није значајно мењао (графикон 35).



Графикон 35. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$).

4.7.4.2. Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

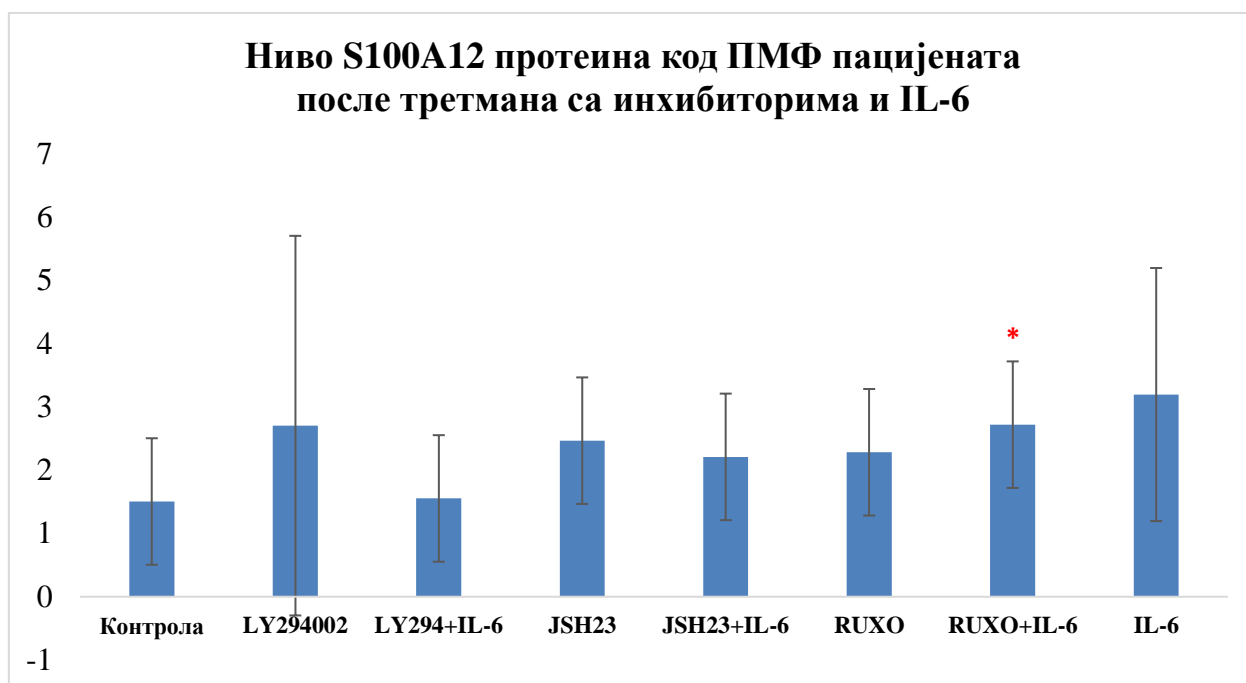
Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показао статистички значајно повећање само после третмана са комбинацијом инхибитора PI3 сигналног пута (Ly294002) и IL-6 (графикон 36).



Графикон 36. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$).

4.7.4.3. Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 је показао статистички значајно повећање само после третмана са комбинацијом комбинације инхибитора JAK1/2 сигналног пута (RUXO инхибитора) и IL-6 ($p < 0,05$) (графикон 37).

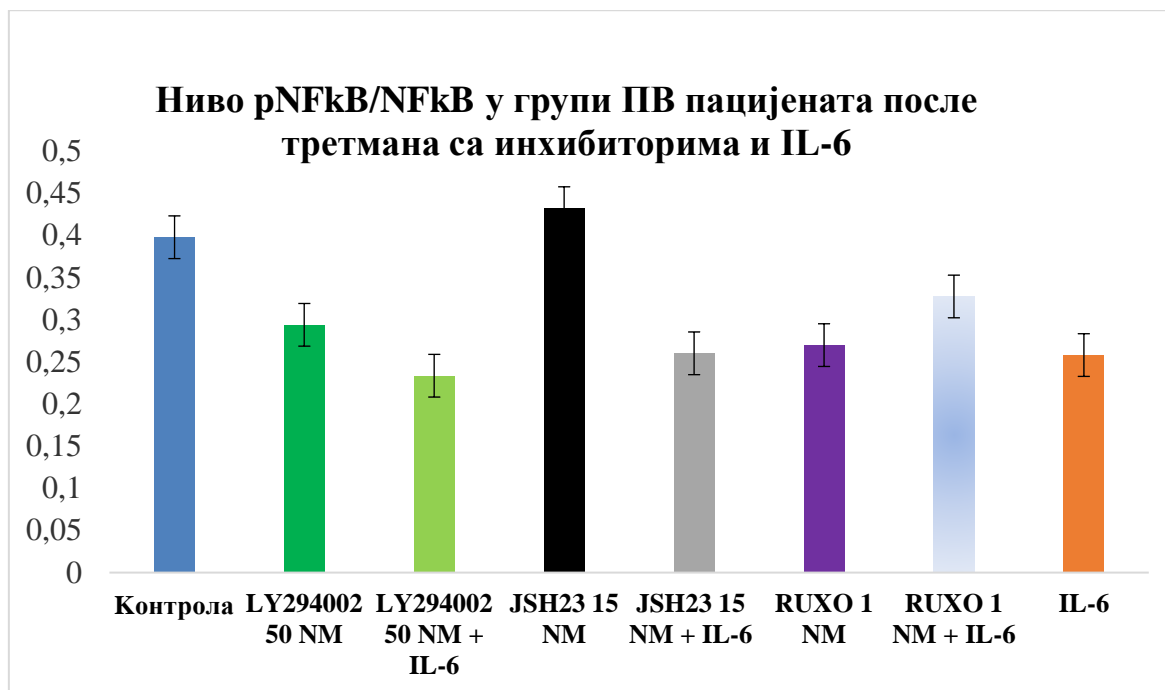


Графикон 37. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$).

4.7.5. Ниво NF-κB протеина код МПН

4.7.5.1. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

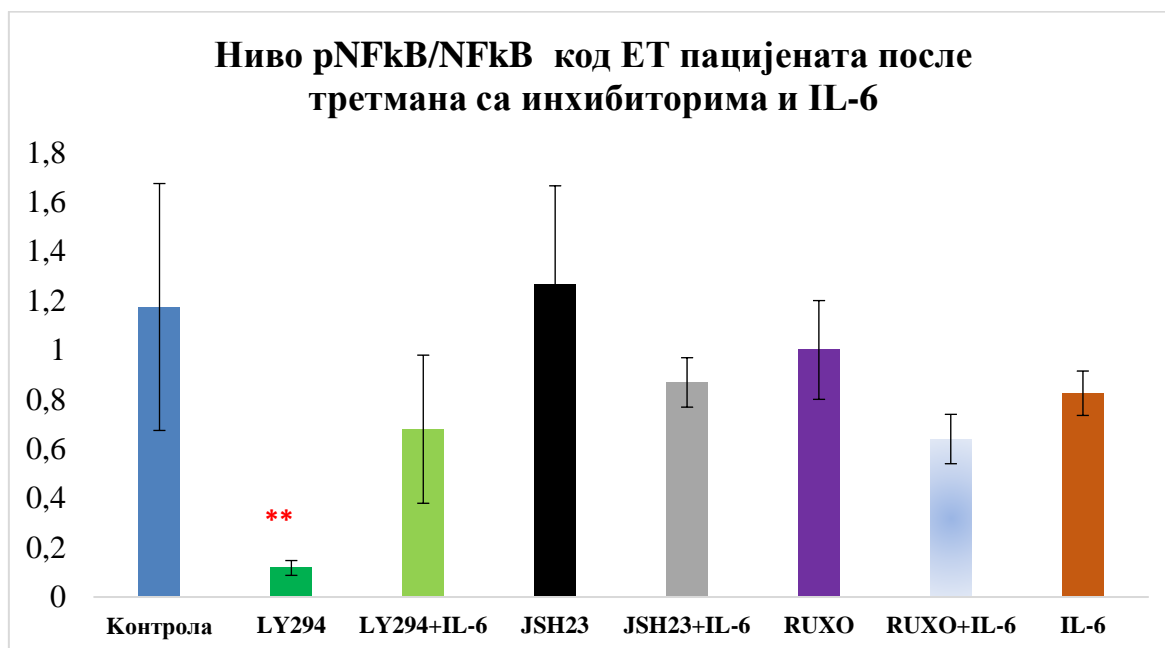
Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 у мононуклеарима МПН пацијената није показао статистички значајну разлику у поређењу са контролним узорцима (графикон 38).



Графикон 38. Ниво pNF-кВ/NF-кВ протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.7.5.2. Ниво pNF-кВ/NF-кВ протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

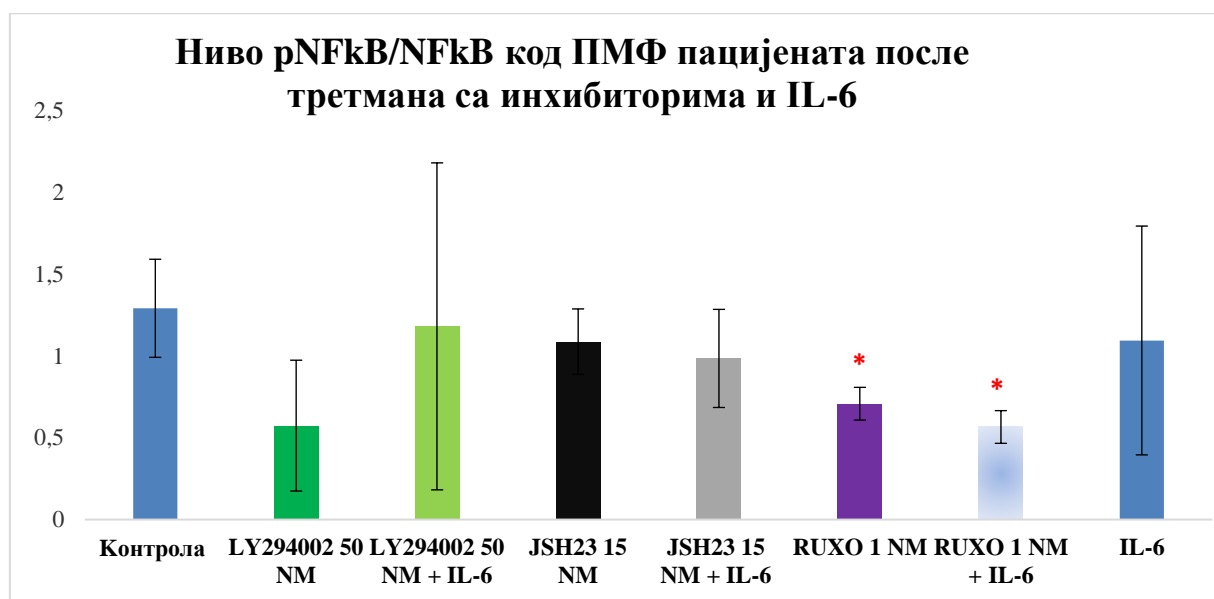
У групи ЕТ пацијената ниво pNF-кВ/NF-кВ протеина био је статистички значајно мањи после третмана са инхибитором PI3 сигналног пута (Ly294002) (**p<0,01) у односу на контролну групу испитаника (графикон 39). У свим осталим случајевима разлика у нивоу овог протеина није била статистички значајна у односу на контролу (графикон 39).



Графикон 39. Ниво pNF-кВ/NF-кВ протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (**p<0,01).

4.7.5.3. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6

У групи ПМФ пацијената ниво рNF-κB/NF-κB протеина био је статистички значајно мањи после третмана са инхибитором ЈАК1/2 сигналног пута (RUXO) (* $p < 0,05$) и његове комбинације са IL-6 (* $p < 0,05$) у односу на контролну групу испитаника (графикон 40). У свим осталим случајевима разлика у нивоу овог протеина није била статистички значајна у односу на контролу (графикон 40).



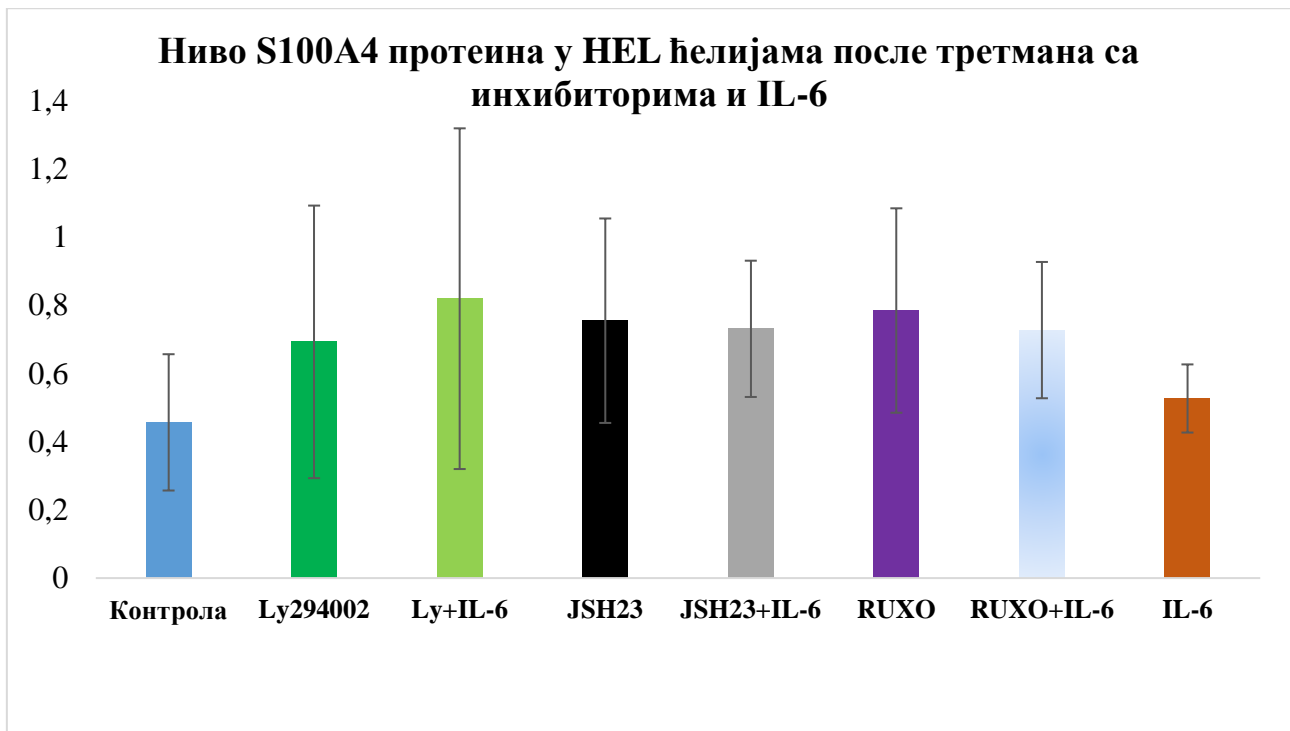
Графикон 40. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-6 (* $p < 0,05$).

4.8. Испитивање нивоа S100a маркера инфламације у *in vitro* условима на HEL 92.1.7 ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

У циљу испитивања утицаја JSH23 као инхибитора NF-κB сигналног пута, Ly294002 као инхибитора PI3 сигналног пута и RUXO као инхибитора ЈАК1/2 сигналног пута, као и проинфламаторног цитокина IL-6 на нивое инфламаторних фактора, HEL 92.1.7 ћелије су третиране JSH23 (0,75 μM), Ly294002 (50 μM) и RUXO (1 μM) – посебно и у комбинацији са IL-6 (20 ng/ml), у трајању од 60 минута. Нивои инфламаторних фактора S100A4, S100A8, S100A9, S100A12 и рNF-κB/NF-κB протеина испитивани су применом *Western blot* методе. Експерименти су поновљени три пута.

4.8.1. Ниво S100A4 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

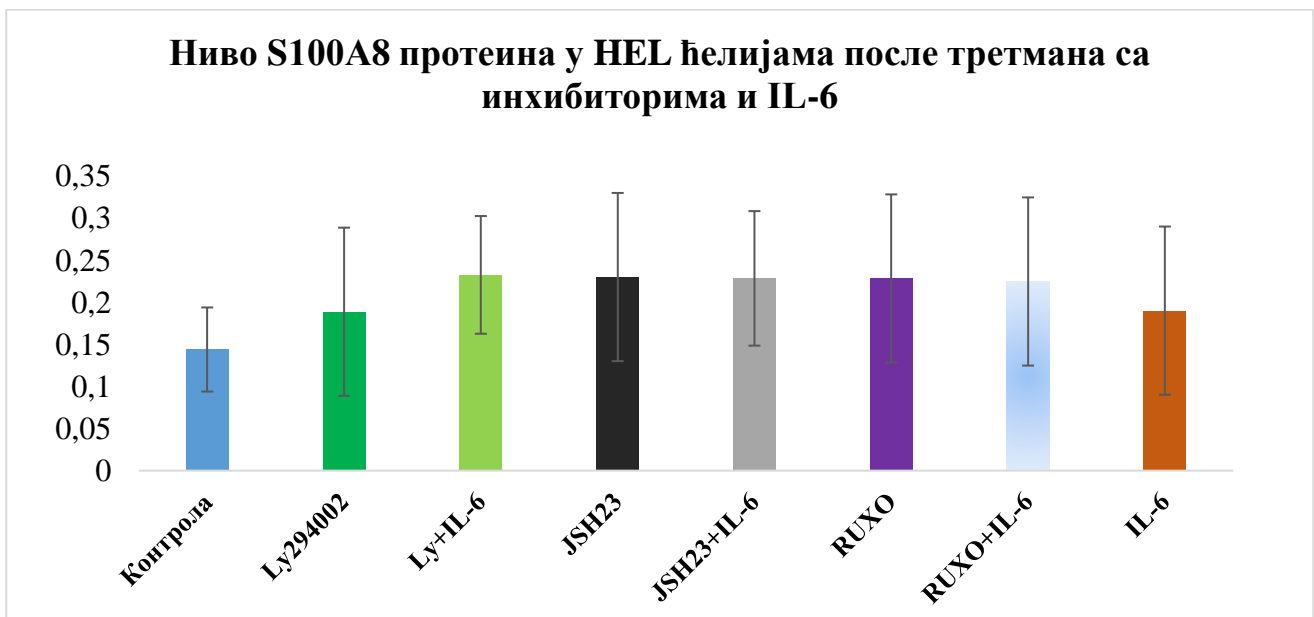
Ниво S100A4 у свим испитиваним групама третираних HEL ћелија у поређењу са контролним узорцима који нису третиран инхибиторима и проинфламаторним цитокином IL-6 није се статистички значајно разликовао (графикон 41).



Графикон 41. Ниво S100A4 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.8.2. Ниво S100A8 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

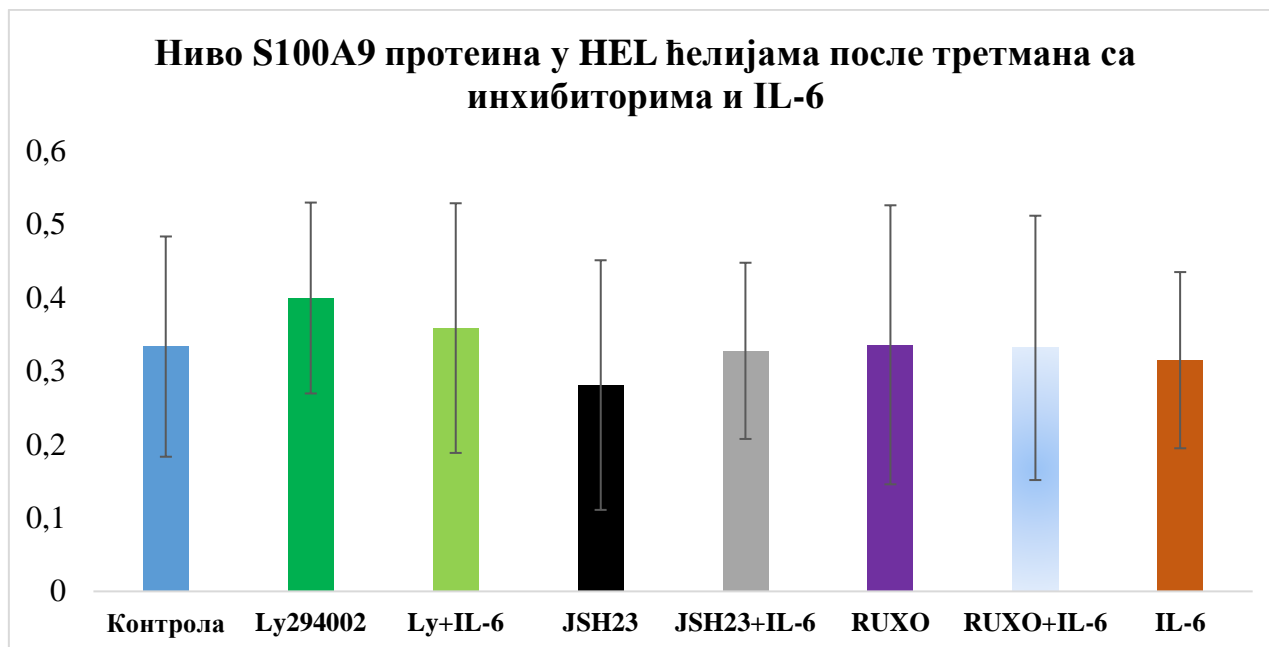
Ниво S100A8 био је већи у свим испитиваним групама третираних HEL ћелија у поређењу са контролним узорцима који нису третиран инхибиторима и проинфламаторним маркером IL-6, али није се разликовао статистички значајно (графикон 42).



Графикон 42. Ниво S100A8 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.8.3. Ниво S100A9 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

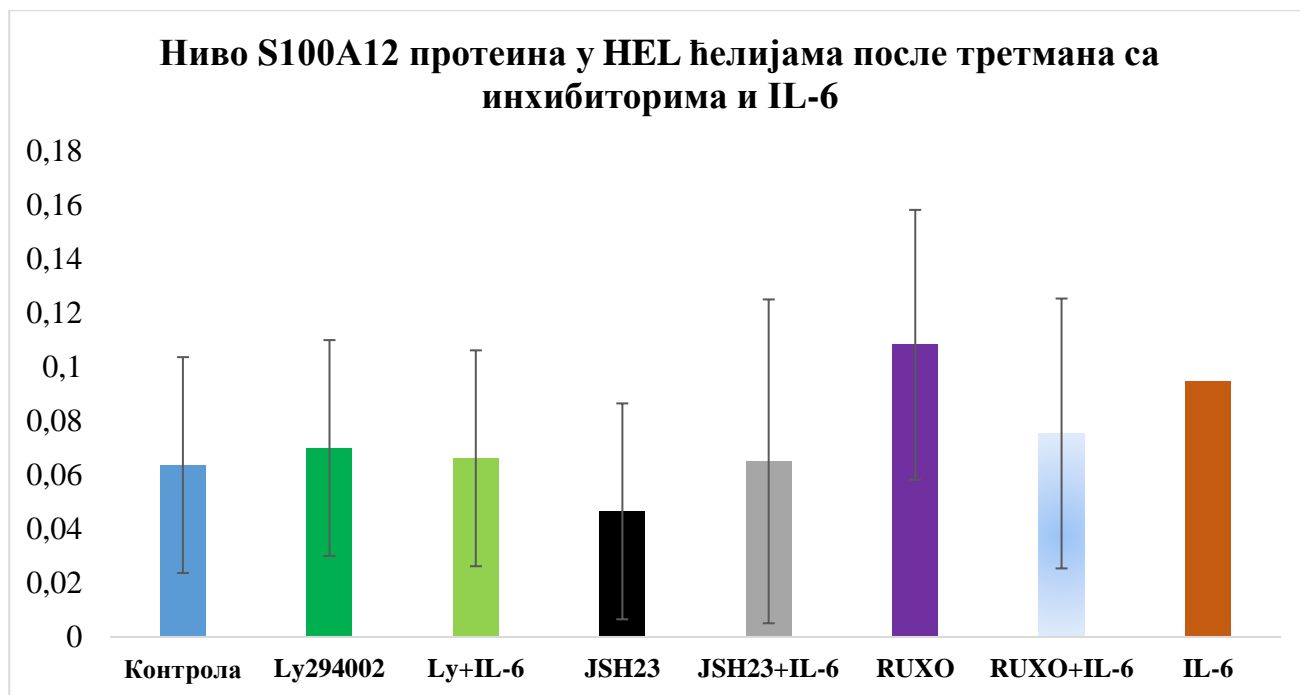
Ниво S100A9 није се статистички значајно разликовао ни у једној испитиваној групи третмана ћелија у поређењу са контролом (графикон 43).



Графикон 43. Ниво S100A9 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.8.4. Ниво S100A12 у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

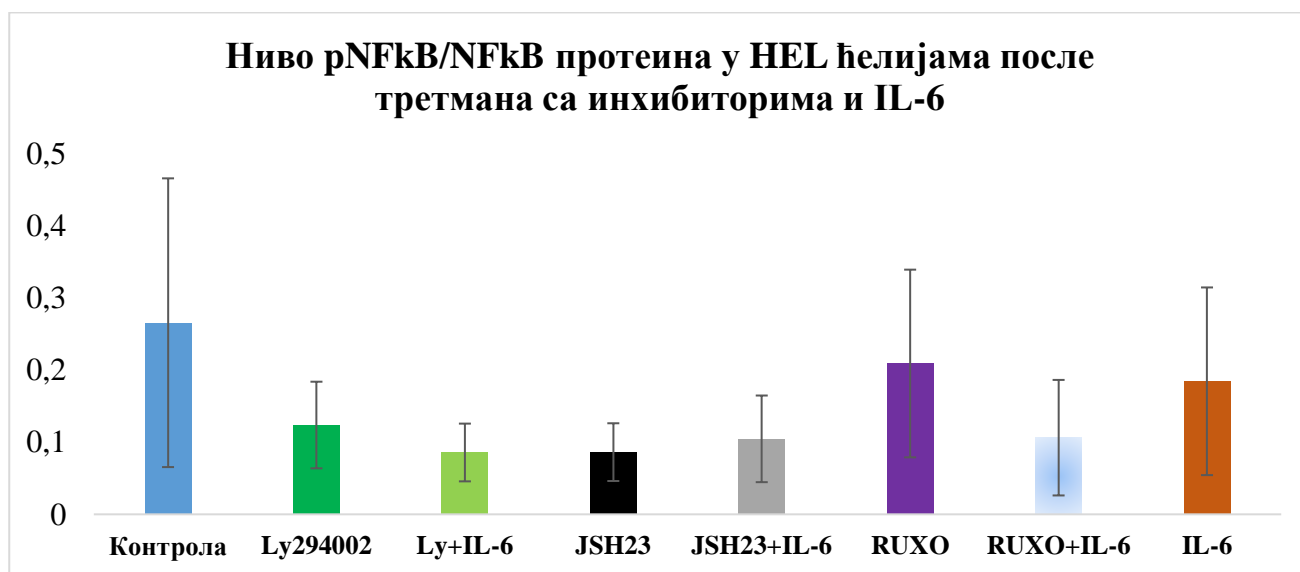
Ниво S100A12 није се статистички значајно разликовао ни у једној испитиваној групи третмана ћелија у поређењу са контролом (графикон 44).



Графикон 44. Ниво S100A12 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6.

4.8.5. Ниво pNF-κB/NF-κB у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6

Ниво pNF-κB/NF-κB био је мањи у свим испитиваним групама третираних HEL ћелија у поређењу са контролним узорцима (графикон 45). Ниво овог протеина није се статистички значајно разликовао ни у једној испитиваној групи третмана ћелија у поређењу са контролом (графикон 45).



Графикон 45. Ниво pNF-κB/NF-κB у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-6.

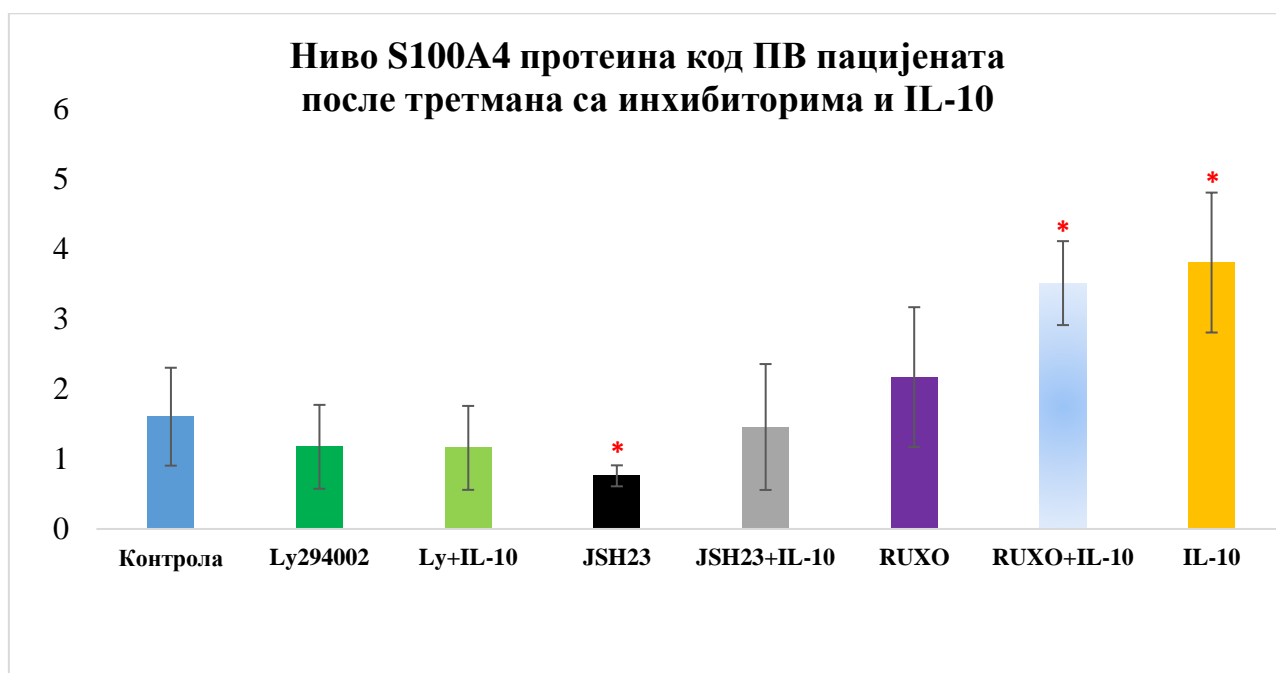
4.9. Испитивање нивоа фактора инфламације у мононуклеарима МПН пацијената после третмана са антиинфламаторним цитокином инхибиторима и IL-10

Испитивање нивоа фактора инфламације у мононуклеарима МПН пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 спроведена је на укупном узорку од 12 (по 4 узорка од све три групе пацијената: ПВ, ЕТ и ПМФ) МПН пацијената применом *Western blot* методе. У циљу испитивања механизма путем којих IL-10 остварује своје ефекте, мононуклеари су третирани са IL-10 (30 ng/ml) и неспецифичним ЈАК1/2 инхибитором руксолитинибом (1 μ M), JSH23 инхибитором NF- κ B сигналног пута (0,75 μ M), Ly294002 инхибитором PI3 сигналног пута (50 μ M) током 60 минута, при чему су инхибитори додавани 30 минута пре IL-10. По истеку третмана анализирани су сигнални путеви (ЈАК2/STAT3, PI3K/Akt, NF- κ B), као и протеински нивои инфламаторних фактора.

4.9.1. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима МПН пацијената

4.9.1.1. Ниво S100A4 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

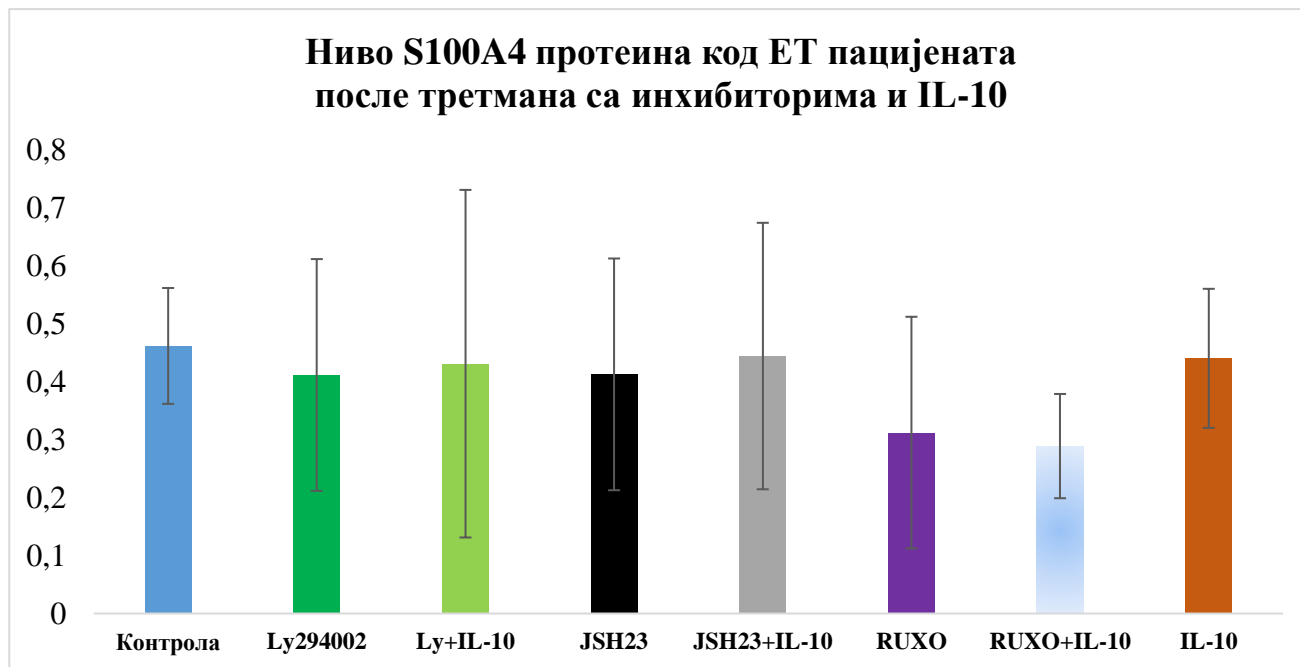
Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 је показао статистички значајно мањи ниво после третмана са инхибитором NF- κ B сигналног пута (JSH23) ($p < 0,05$), док је статистички значајно већи ниво протеина забележен после третмана са инхибитором ЈАК1/2 сигналног пута (RUXO) ($p < 0,05$) и самог IL-10 ($p < 0,05$) у односу на контролу (графикон 46). У свим осталим испитиваним случајевима ниво S100A4 протеина није се значајно разликовао у односу на контролу (графикон 46).



Графикон 46. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* $p < 0,05$).

4.9.1.2. Ниво S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

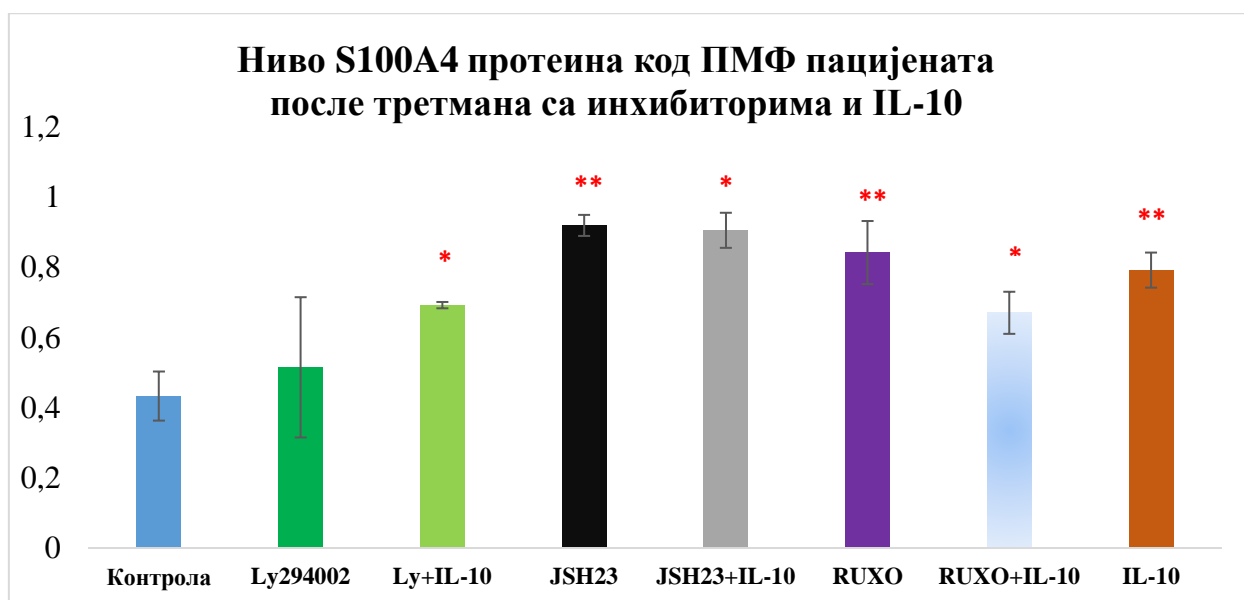
Ниво S100A4 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на контролу (графикон 47).



Графикон 47. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.1.3. Ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је већи у свим испитиваним групама третираних ћелија у поређењу са контролом (графикон 48). После третмана мононуклеара са JSH23 инхибитором ($p < 0,01$), RUXO инхибитором ($p < 0,01$) као и IL-10 ($p < 0,01$) забележен је високо статистички виши ниво S100A4 протеина код ПМФ пацијената, док је после третмана са комбинацијом инхибиторима Ly294002 и IL-10 ($p < 0,05$), JSH23 и IL-10 ($p < 0,05$) и RUXO и IL-10 ($p < 0,05$) забележен такође значајно већи ниво у поређењу са контролним нетретираним узорцима (графикон 48).

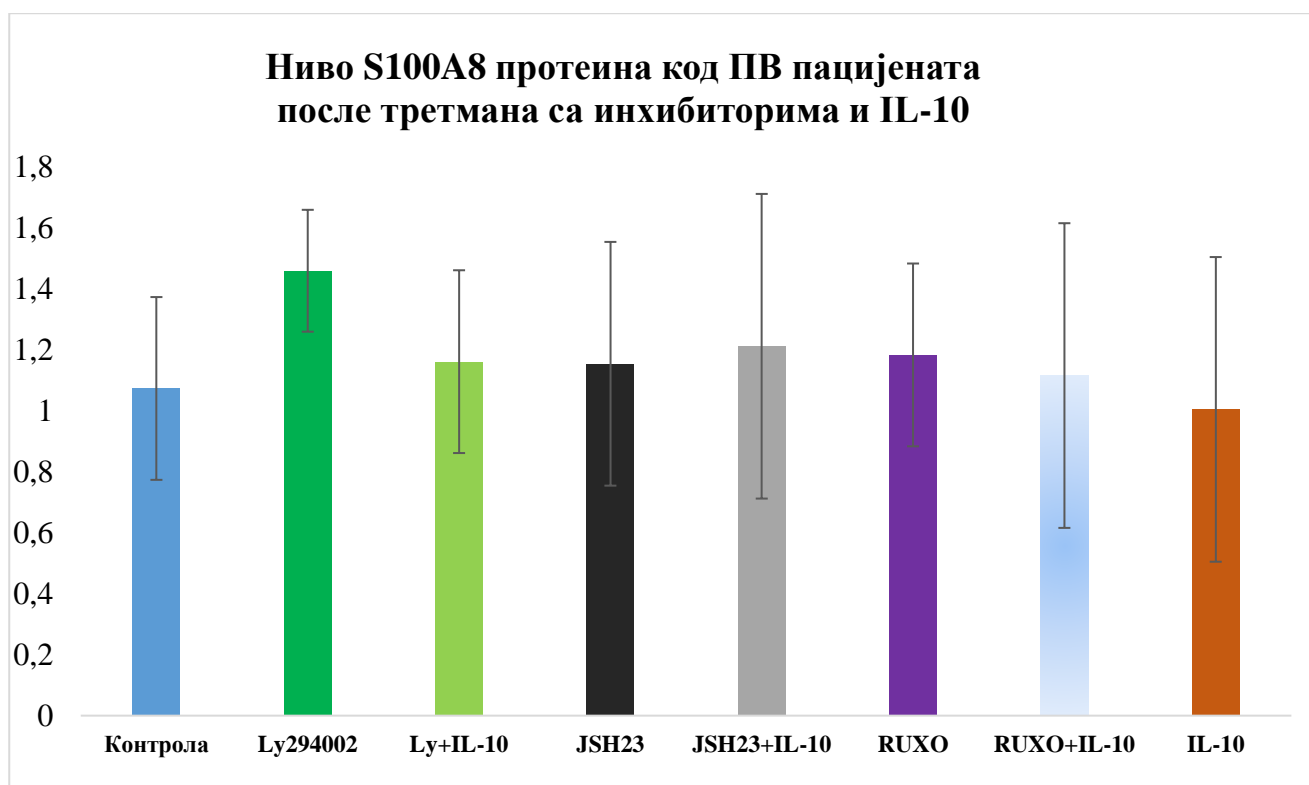


Графикон 48. Ниво S100A4 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.9.2. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима МПН пацијената

4.9.2.1. Ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

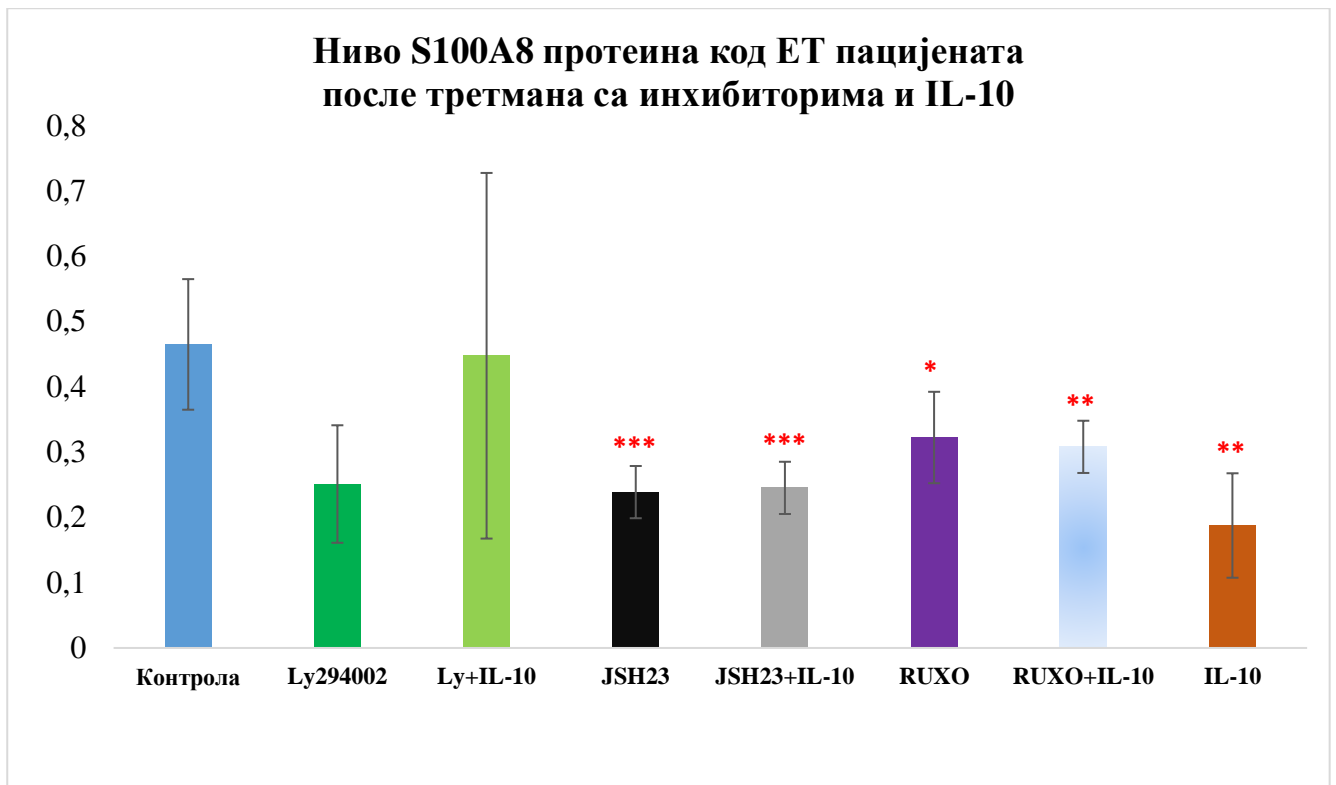
Ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је већи у свим испитиваним категоријама и комбинацијама третмана мононуклеарних ћелија осим у случају третмана са IL-10 где је забележен мањи ниво S100A8 протеина код ПВ пацијената у односу на контролу (графикон 49). Ни у једном испитиваном случају разлика у нивоу S100A8 протеина код ПВ пацијената и контрола није била статистички значајна (графикон 49).



Графикон 49. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.2.2. Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

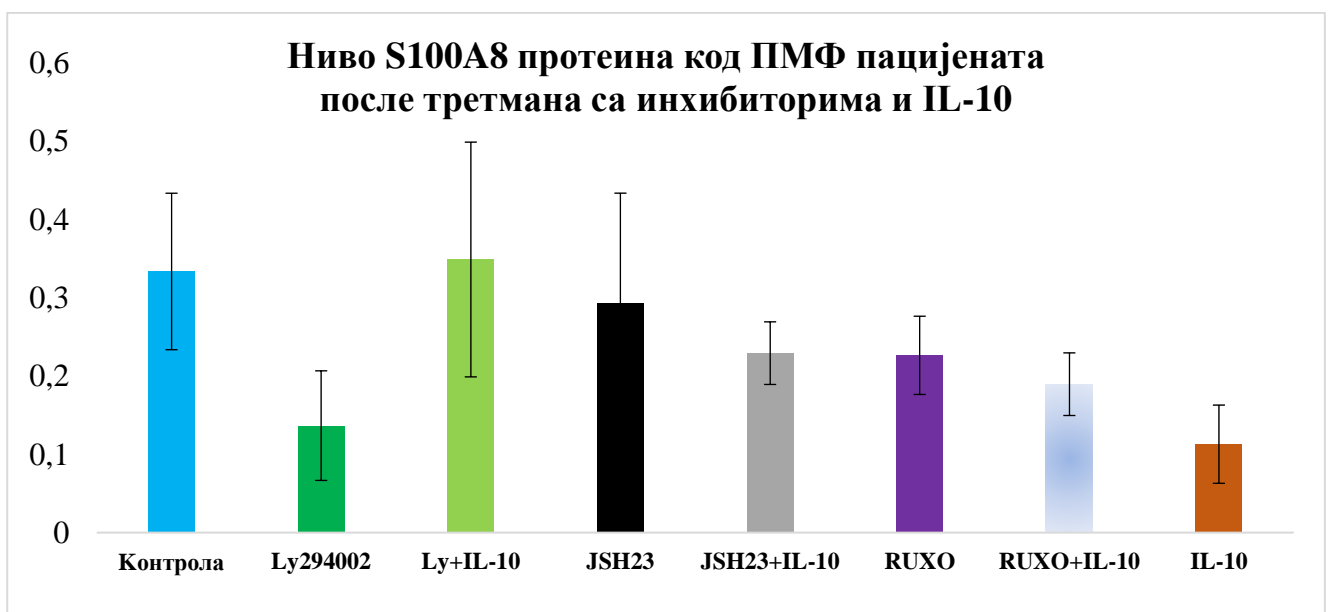
Ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је високо статистички значајно мањи после третмана ћелија са JSH23 инхибитором ($p < 0,001$) и његовом комбинацијом са IL-10 ($p < 0,001$), док је такође значајно смањење нивоа овог протеина забележено и после третмана са IL-10 ($p < 0,01$) и комбинацијом инхибитора RUXO и IL-10 ($p < 0,01$) у односу на контролу (графикон 50). Статистички значајно мањи ниво S100A8 протеина код ЕТ пацијената забележен је и после третмана са инхибитором RUXO ($p < 0,05$) (графикон 50). У свим осталим случајевима ниво протеина није се значајно разликовао у односу на контролу (графикон 50).



Графикон 50. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4.9.2.3. Ниво S100A8 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 51).

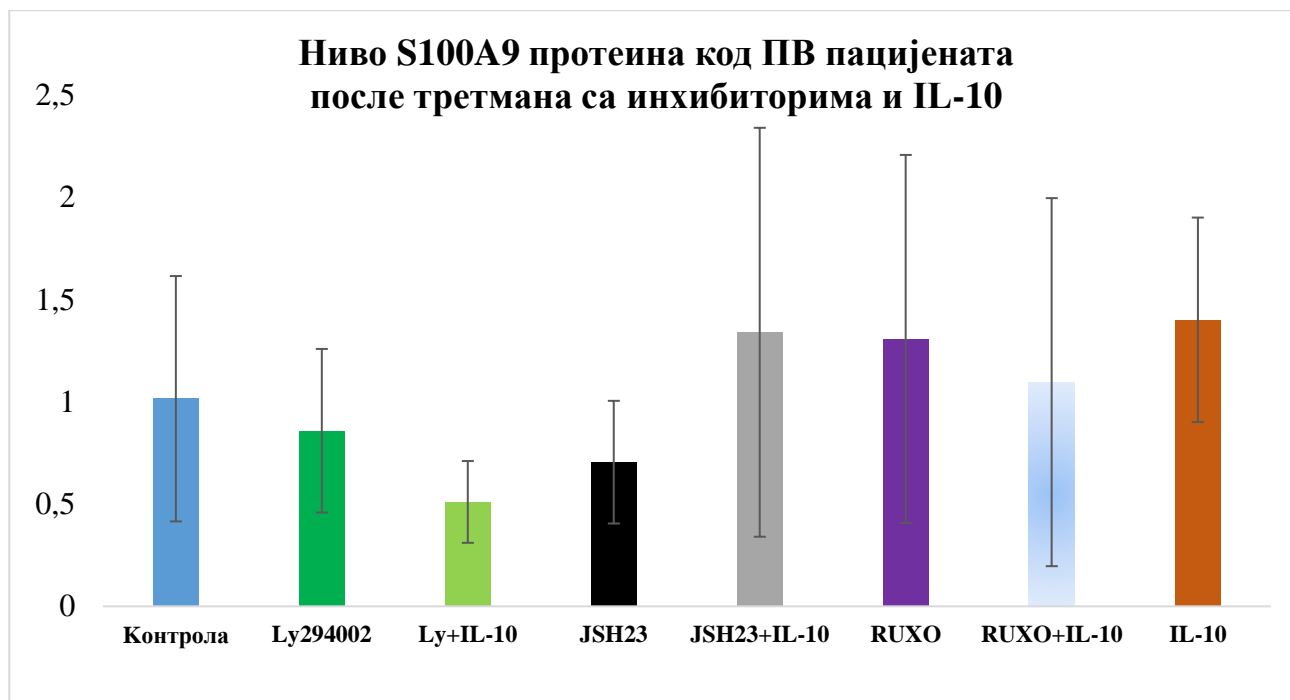


Графикон 51. Ниво S100A8 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.3. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима МПН пацијената

4.9.3.1. Ниво S100A9 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

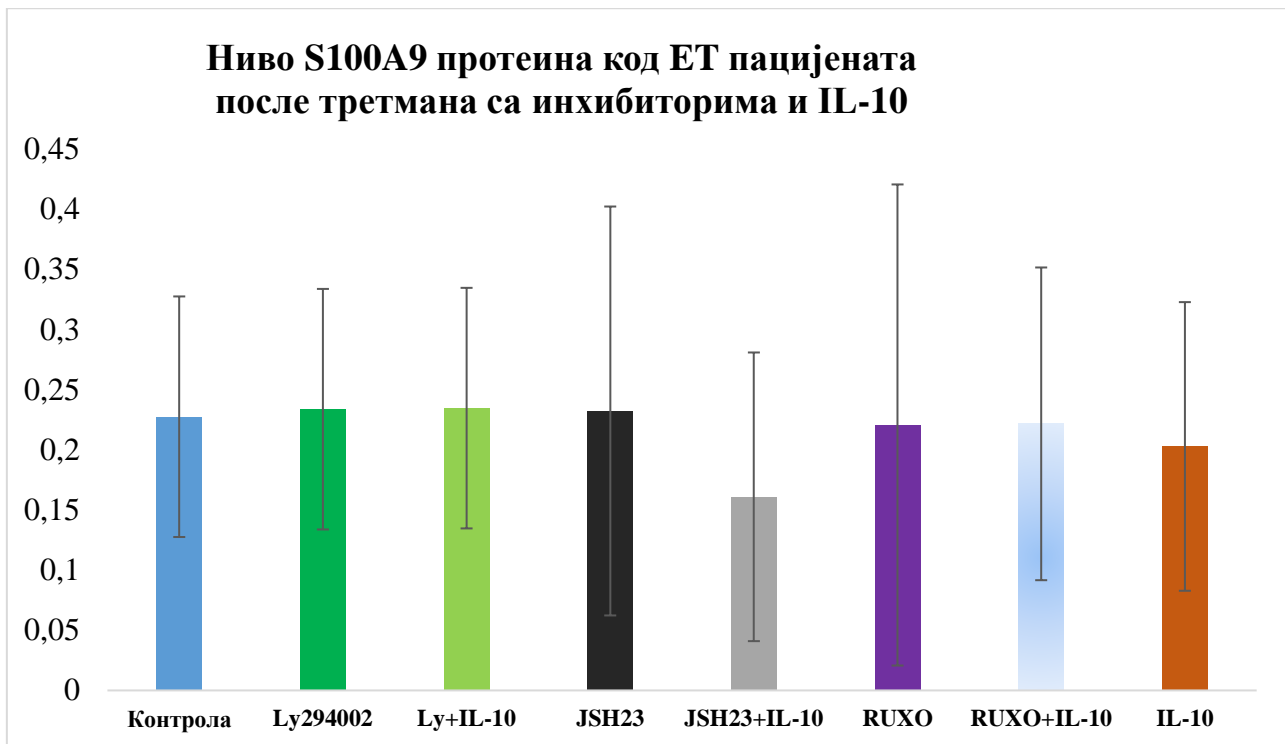
Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 52).



Графикон 52. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.3.2. Ниво S100A9 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

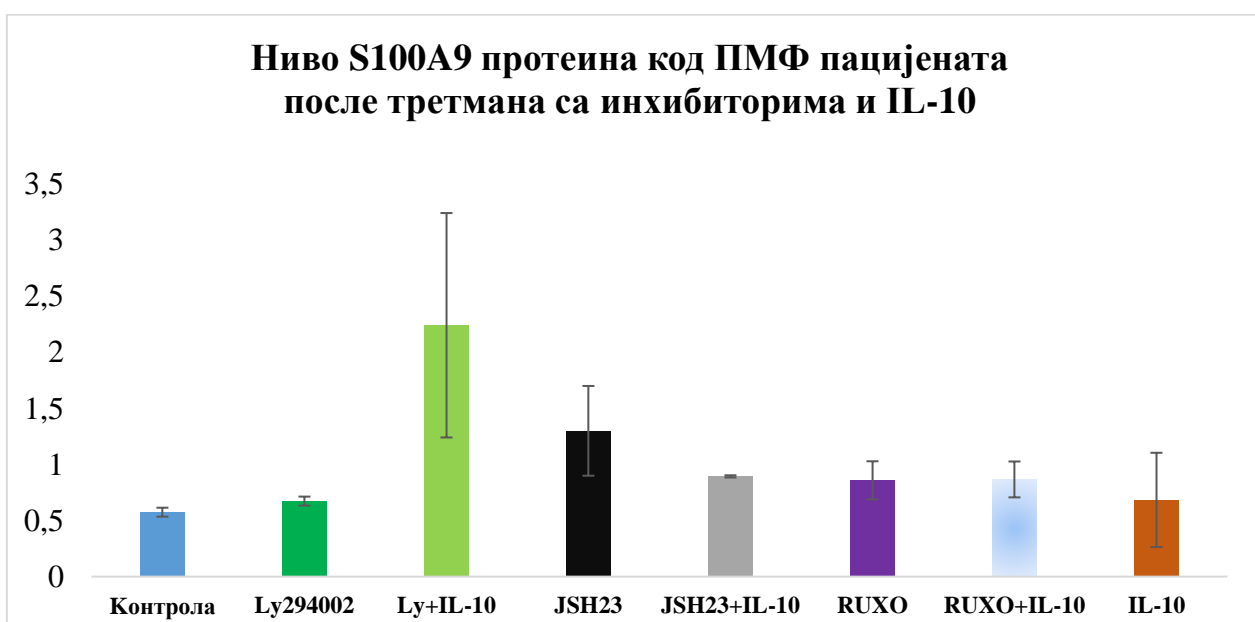
Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 53).



Графикон 53. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.3.3. Ниво S100A9 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 54). У свим групацијама третмана ниво S100A9 протеина је био већи у поређењу са контролама (графикон 54).

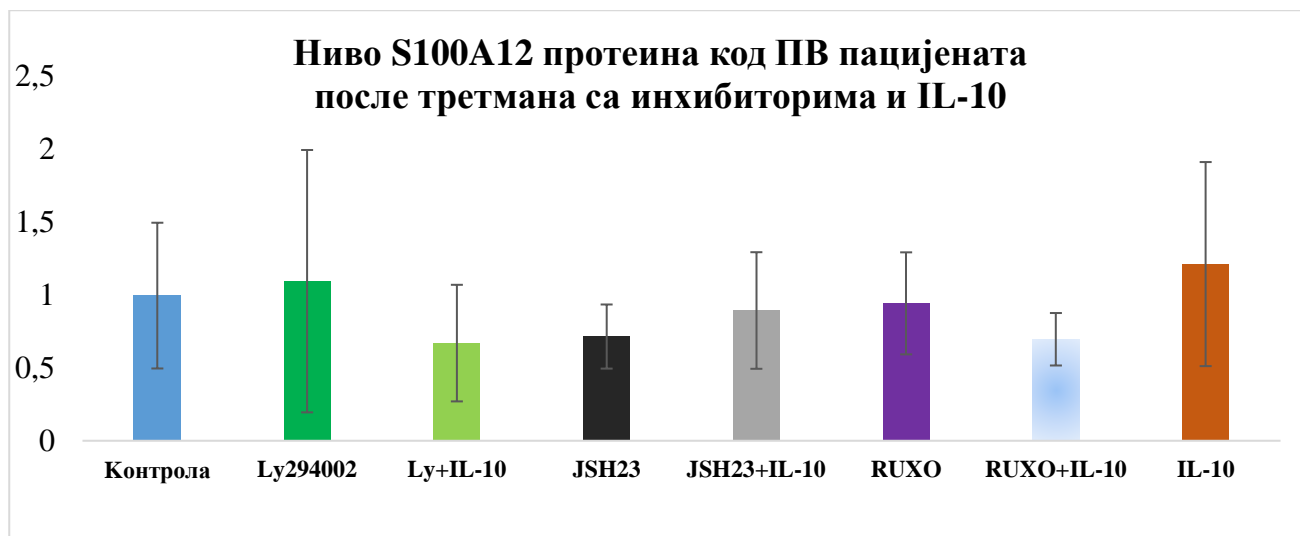


Графикон 54. Ниво S100A9 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.4. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима МПН пацијената

4.9.4.1. Ниво S100A12 протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 55).

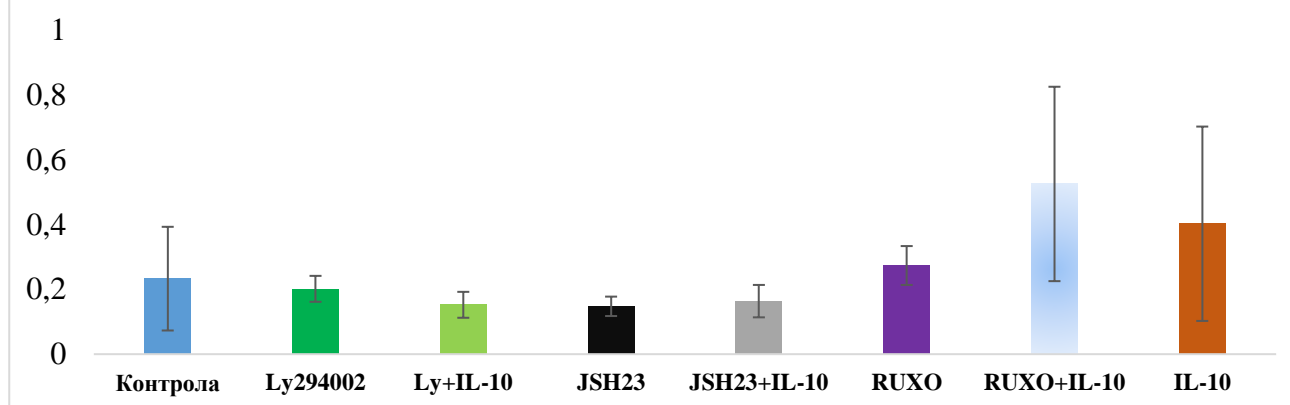


Графикон 55. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.4.2. Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 није показао статистички значајну разлику у односу на ниво овог протеина у контролама (графикон 56).

Ниво S100A12 протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

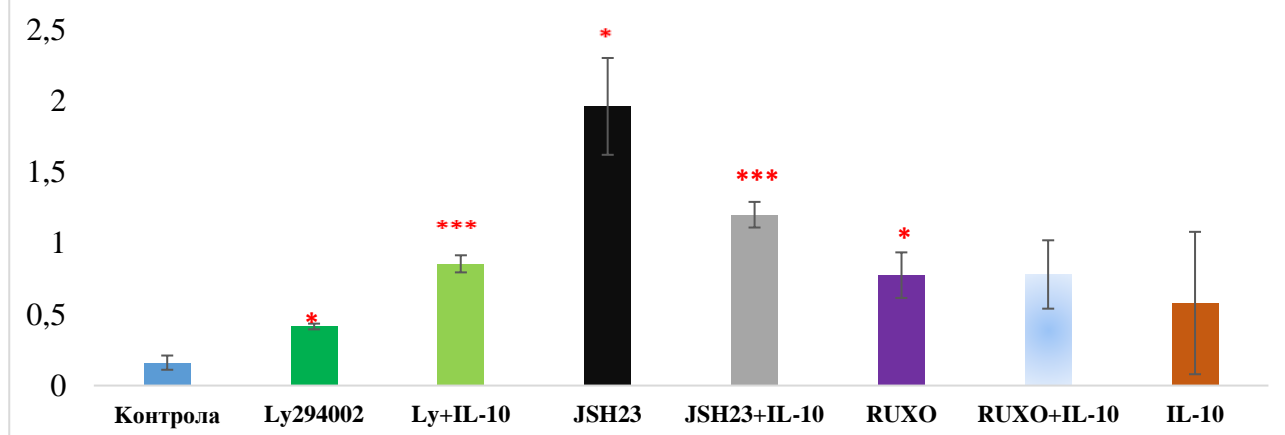


Графикон 56. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.9.4.3. Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је већи у свим третираним категоријама у поређењу са контролом (графикон 57). Високо статистички значајно већи ниво S100A12 протеина забележен је у групи ћелија које су третиране са комбинацијом Ly294002 и IL-10 ($p < 0,001$), као и после третмана са JSH23 и IL-10 ($p < 0,001$) (графикон 57). Статистички значајно већи ниво овог протеина забележен је и у групи ћелија које су третиране са Ly294002 инхибитором ($p < 0,05$), JSH23 инхибитором ($p < 0,05$) и RUXO ($p < 0,05$) (графикон 57). Ниво S100A12 протеина није се статистички значајно разликовао између контрола и ћелија које су третиране са антиинфламаторним IL-10 и комбинацијом RUXO и IL-10 (графикон 57).

Ниво S100A12 протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

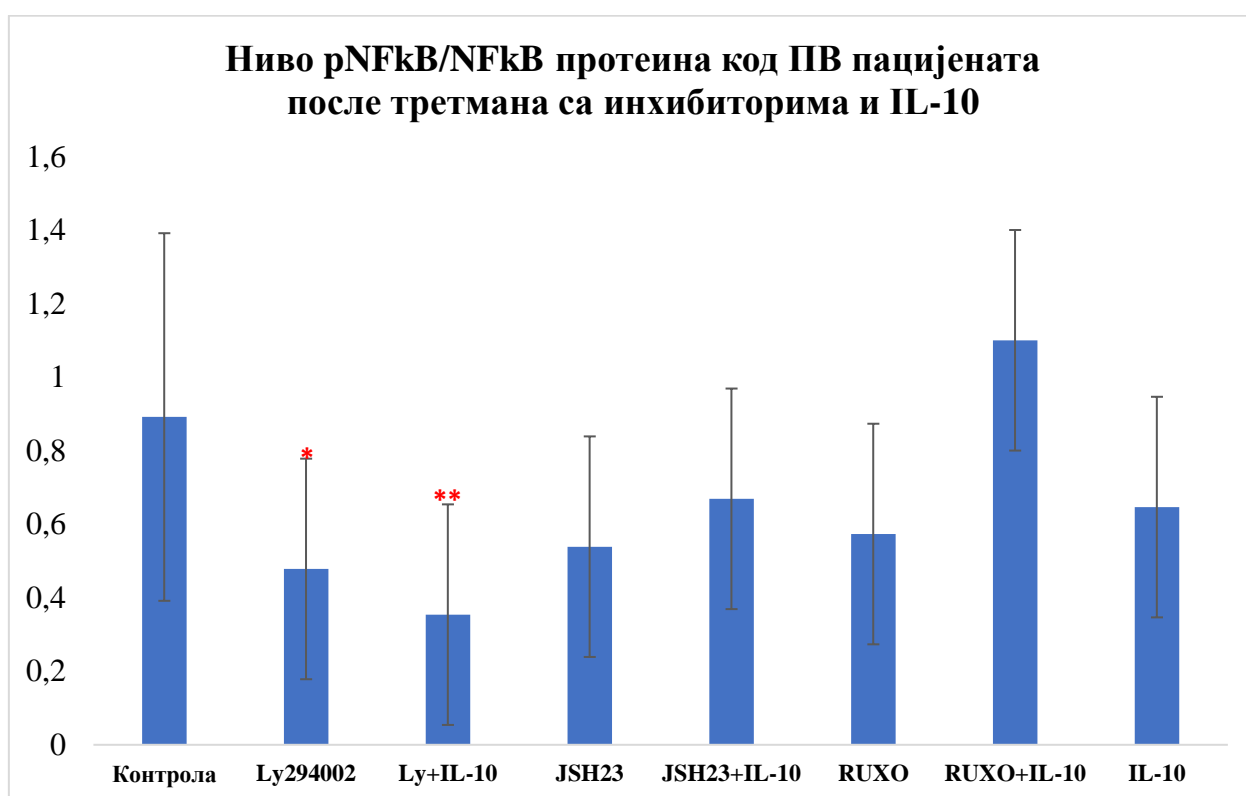


Графикон 57. Ниво S100A12 протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

4.9.5. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина у мононуклеарима МПН пацијената

4.9.5.1. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је мањи у свим третираним категоријама у поређењу са контролом осим у случају третмана са комбинацијом RUXO инхибитора и IL-10 (графикон 58). Високо статистички значајно мањи ниво рNF-κB/NF-κB протеина забележен је у групи ћелија које су третиране са комбинацијом Ly294002 и IL-10 ($p<0,01$), као и после третмана само са Ly294002 ($p<0,05$) (графикон 58).

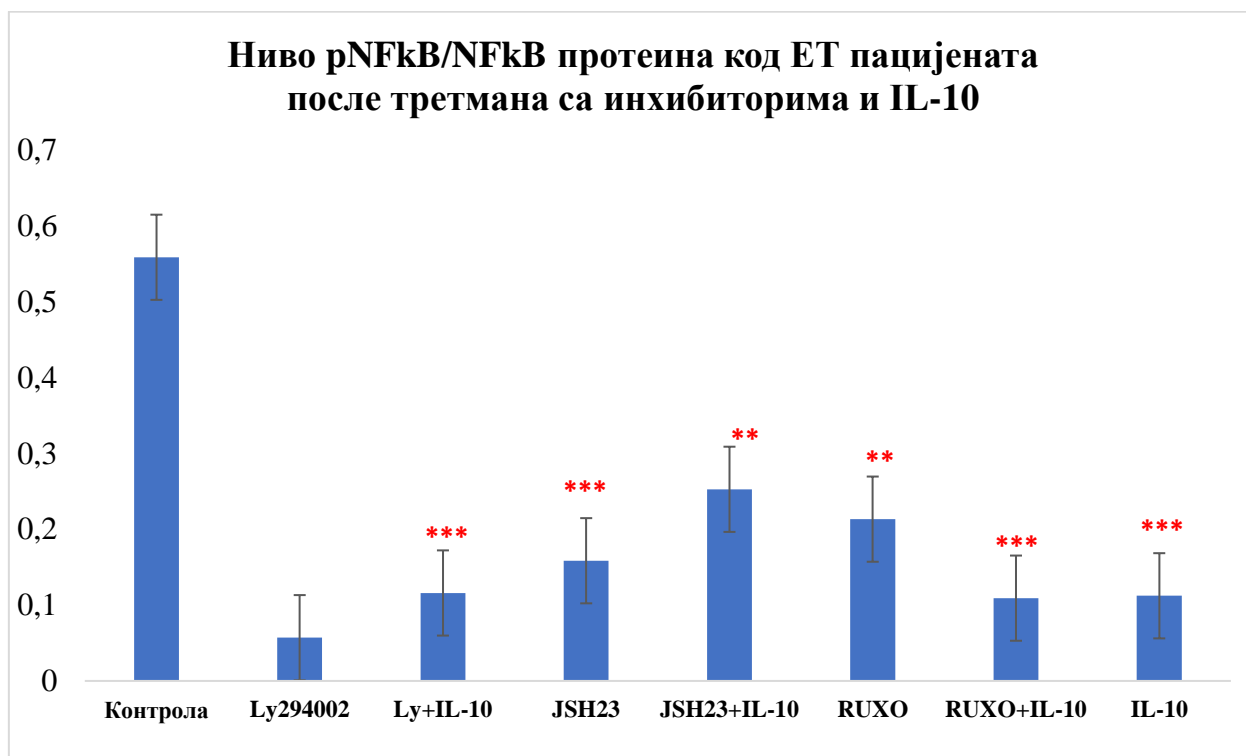


Графикон 58. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина у мононуклеарима ПВ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)

4.9.5.2. Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво рNF-κB/NF-κB протеина код ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је мањи у свим третираним категоријама у поређењу са контролом (графикон 59). Високо статистички значајно мањи ниво рNF-κB/NF-κB протеина забележен је у групи ћелија које су третиране са комбинацијом Ly294002 и IL-10 ($p<0,001$), JSH23 инхибитора ($p<0,001$), IL-10 ($p<0,001$) и комбинације IL-10 и RUXO инхибитора ($p<0,001$) (графикон 59). Статистички значајно смањење нивоа испитиваног протеина забележено је и после третмана

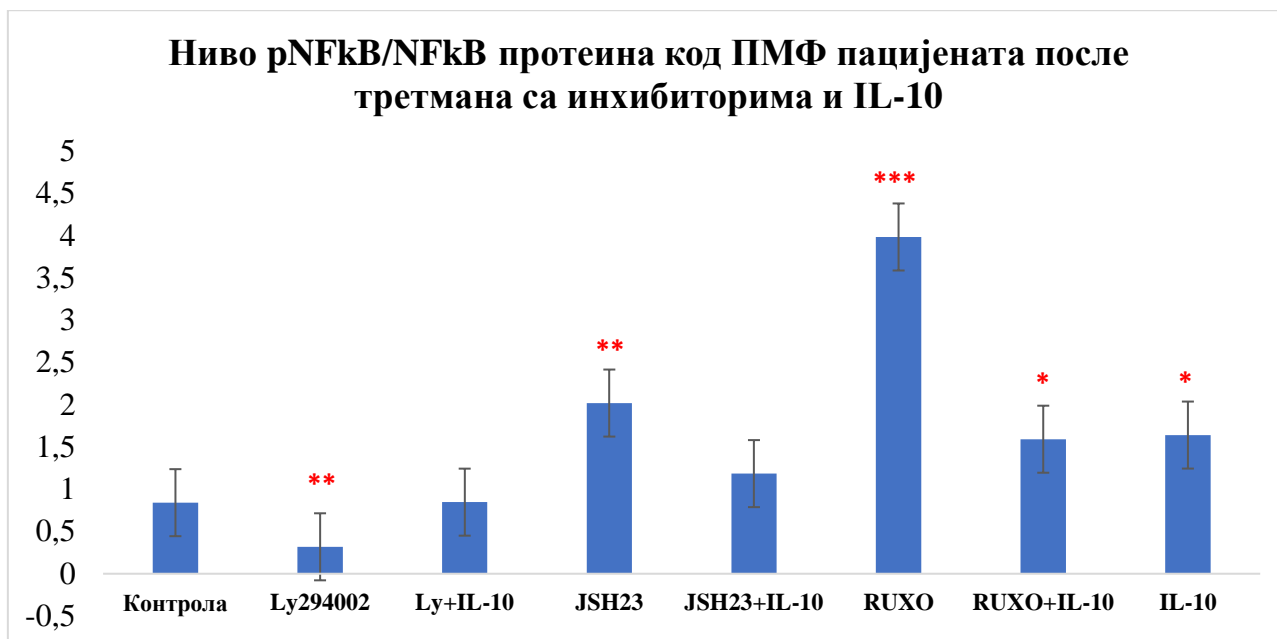
ћелија са RUXO инхибитором ($p < 0,01$) и комбинацијом JSH23 инхибитора и IL-10 ($p < 0,01$) (графикон 59).



Графикон 59. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина у мононуклеарима ЕТ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.9.5.3. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво pNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 био је већи у свим третираним категоријама у поређењу са контролом осим у случају третмана са Ly294002 инхибитором (графикон 60). Високо статистички значајно већи ниво pNF-κB/NF-κB протеина забележен је у групи ћелија које су третиране са RUXO инхибитором ($p < 0,001$) (графикон 60). Статистички значајно повећање нивоа испитиваног протеина забележено је и после третмана ћелија са JSH23 инхибитором ($p < 0,01$), док је значајно смањење забележено после третмана са Ly294002 инхибитором ($p < 0,01$) (графикон 60). Значајно повећање нивоа pNF-κB/NF-κB протеина код ПМФ пацијената забележено је и после третмана са IL-10 и комбинацијом IL-10 и RUXO инхибитора ($p < 0,05$) (графикон 60).



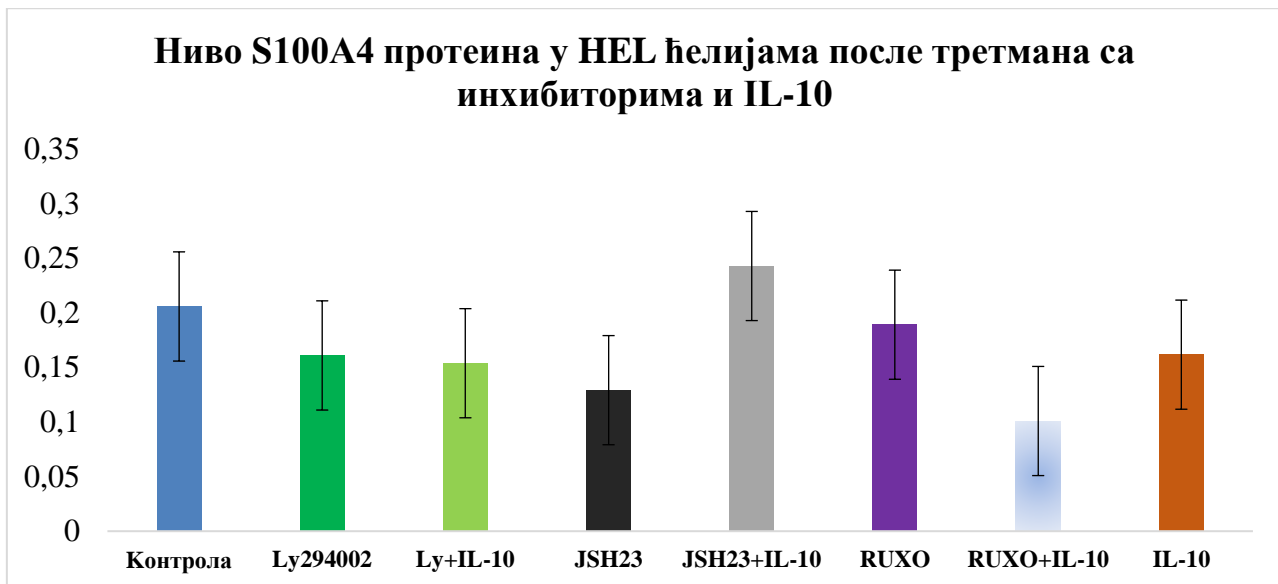
Графикон 60. Ниво рNF-κВ/NF-κВ протеина у мононуклеарима ПМФ пацијената после третмана са инхибиторима и IL-10 (* p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001).

4.10. Испитивање нивоа маркера инфламације у *in vitro* условима на HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са антиинфламаторним цитокиноминхибиторима и IL-10

У циљу испитивања утицаја JSH23 као инхибитора NF-κВ сигналног пута, Ly294002 као инхибитора PI3 сигналног пута и RUXO као инхибитора JAK1/2 сигналног пута, као и антиинфламаторног цитокина IL-10 на нивое инфламаторних фактора, HEL 92.1.7 ћелије су третиране JSH23 (0,75 μM), Ly294002 (50 μM) и RUXO (1 μM) – посебно и у комбинацији са IL-10 (30 ng/ml), у трајању од 60 минута. Нивои инфламаторних фактора S100A4, S100A8, S100A9, S100A12 и NF-κВ протеина испитивани су на протеинском нивоу применом *Western blot* методе. Експерименти су поновљени три пута.

4.10.1. Ниво S100A4 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

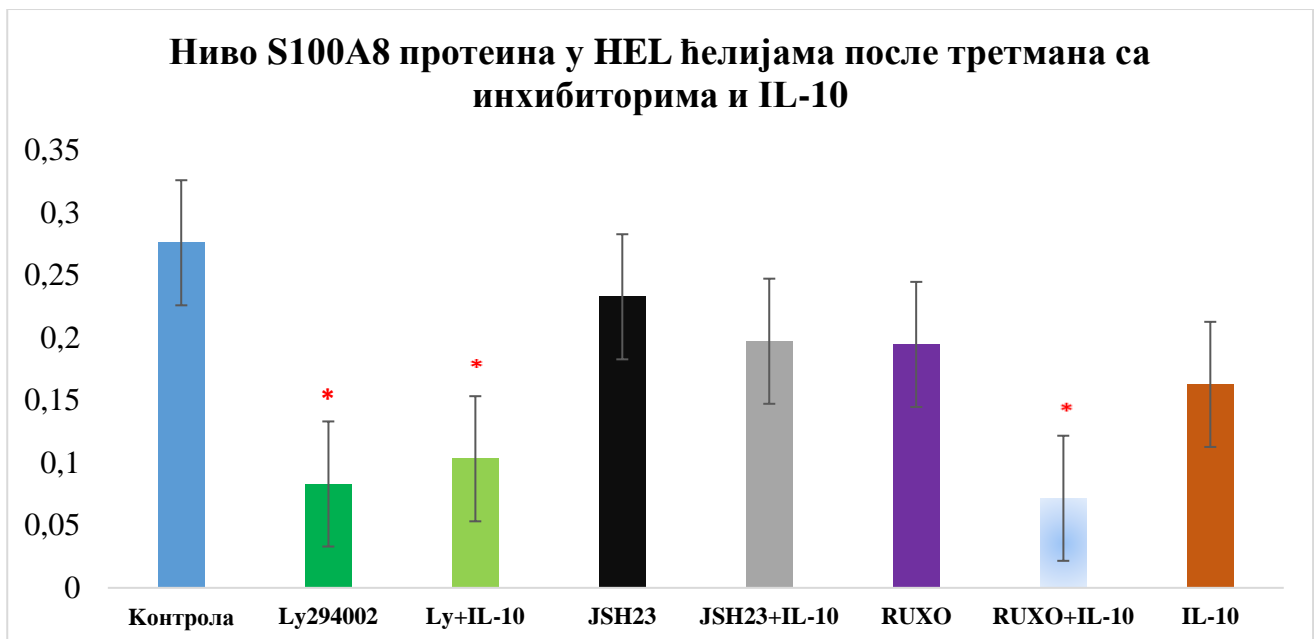
У свим испитиваним случајевима ниво S100A4 протеина није се разликовао статистички значајно у третираним групама у односу на контролу (графикон 61).



Графикон 61. Ниво S100A4 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.10.2. Ниво S100A8 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

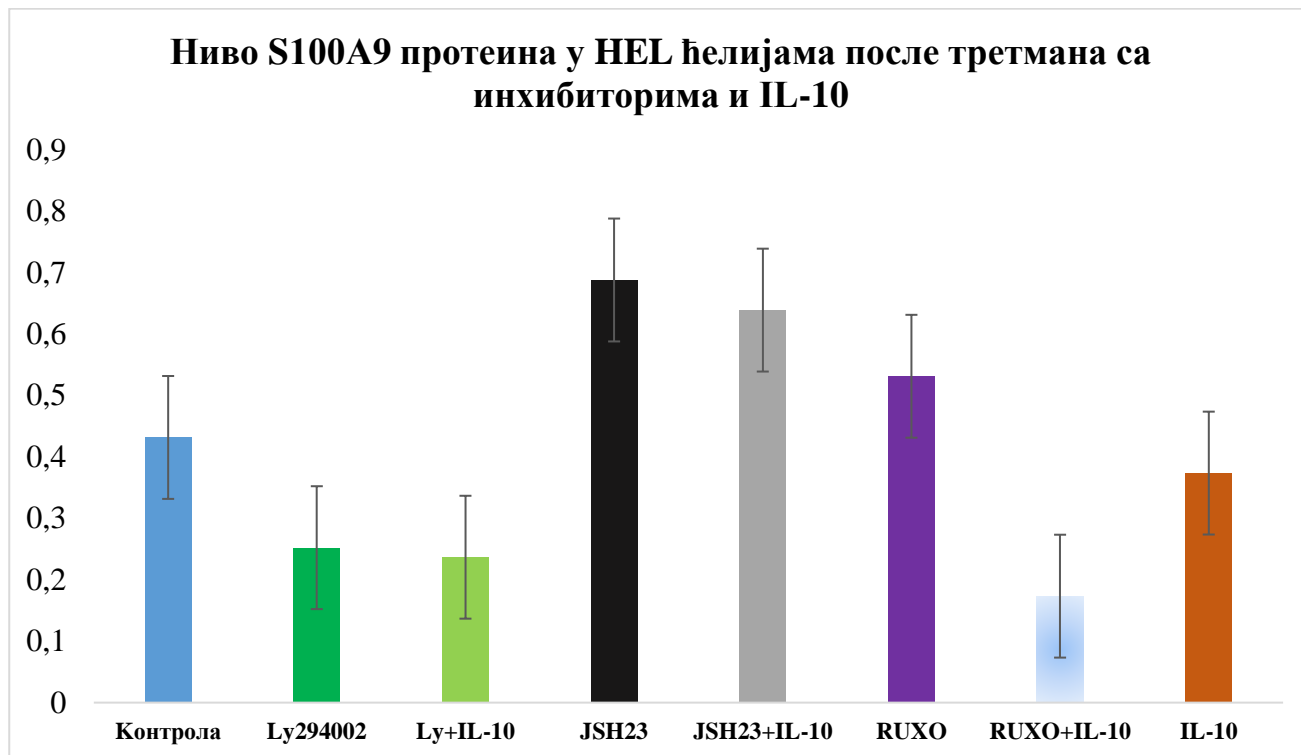
Ниво S100A8 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10 је био мањи у третираним групама ћелија у поређењу са контролним, нетретираним узорцима (графикон 62). Статистички значајно мањи ниво протеина S100A8 детектован је после третмана Ly294002 инхибитора као и његове комбинације са антиинфламаторним маркером IL-10 (графикон 62). Такође, статистички значајно мањи ниво овог протеина забележен је у групи ћелија која је третирана са комбинацијом RUXO инхибитора и IL-10 (графикон 62).



Графикон 62. Ниво S100A8 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.10.3. Ниво S100A9 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

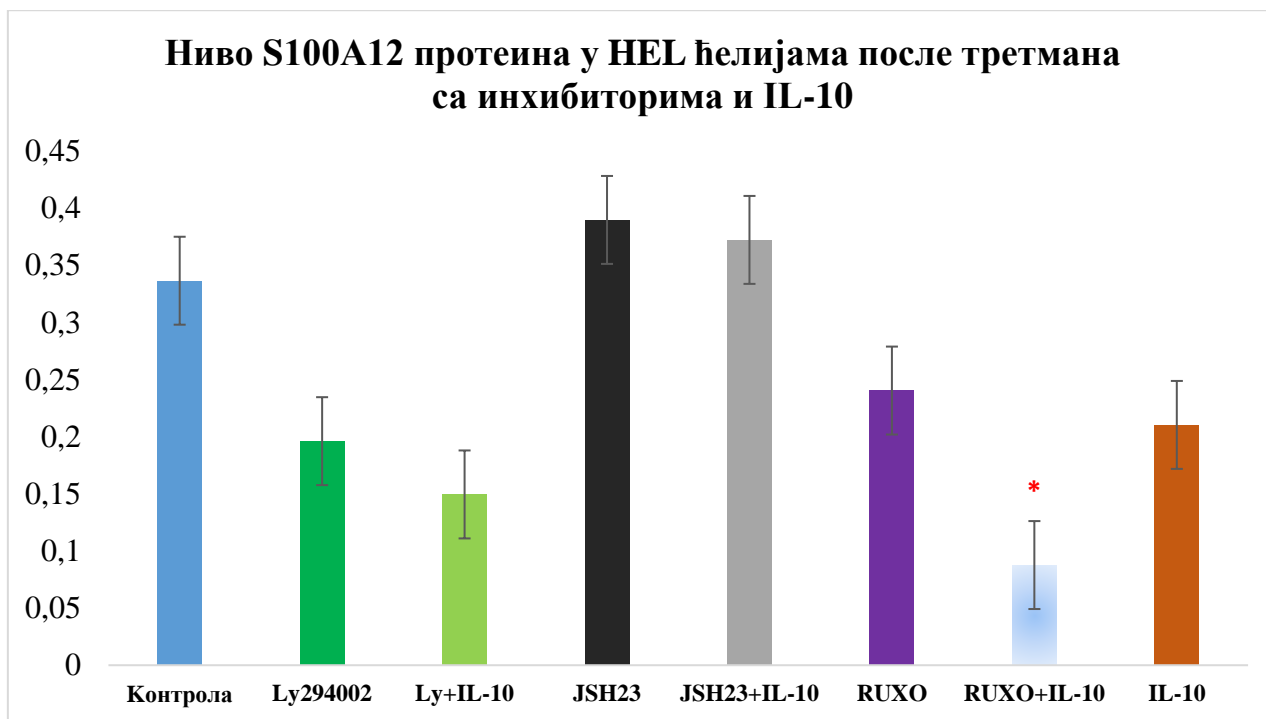
Ниво S100A9 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10 није се статистички значајно разликовао у третираним групама ћелија у поређењу са контролном групом (графикон 63).



Графикон 63. Ниво S100A9 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10.

4.10.4. Ниво S100A12 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

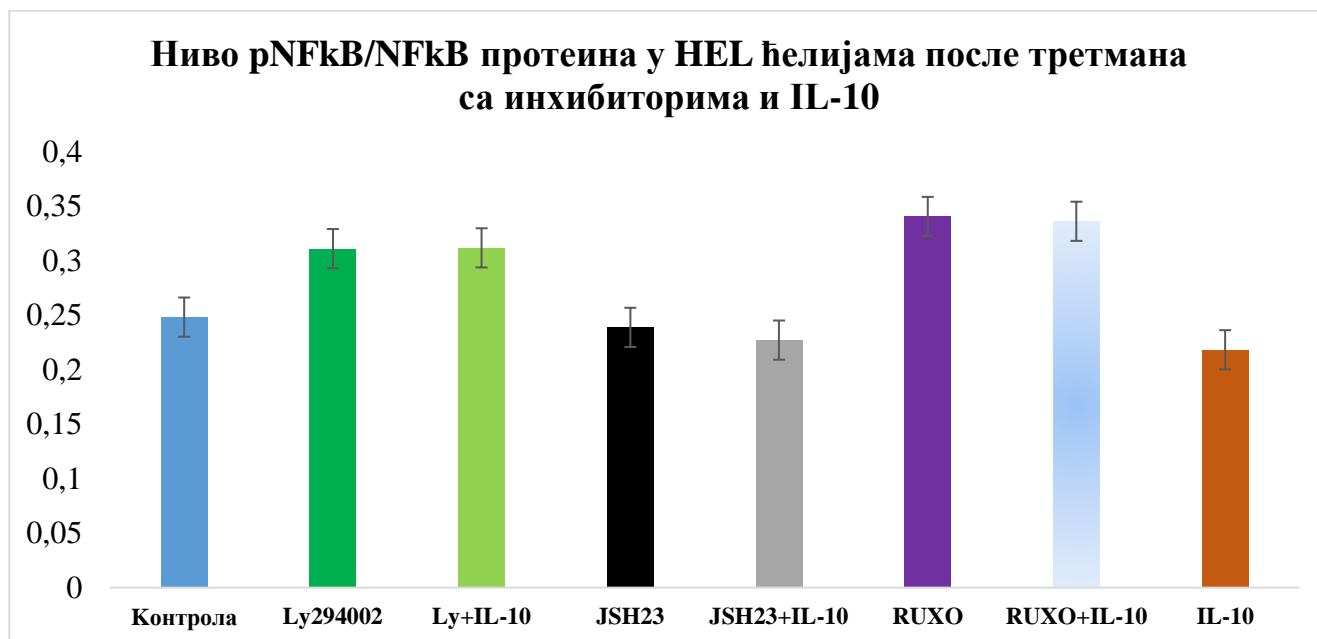
Ниво S100A12 протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10 није се статистички значајно разликовао у третираним групама ћелија у поређењу са контролном групом, изузев у случају третмана ћелија са комбинацијом RUXO инхибитора и IL-10 где је забележено статистички значајно мање испитиваног протеина (графикон 64).



Графикон 64. Ниво S100A12 у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

4.10.5. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10

Ниво pNF-κB/NF-κB протеина у HEL 92.1.7. ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10 није се статистички значајно разликовао у третираним групама ћелија у поређењу са контролном групом (графикон 65).



Графикон 65. Ниво pNF-κB/NF-κB протеина у HEL ћелијама после третмана са инхибиторима и IL-10.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Опште особине анализираних група пацијената са мијелопролиферативним неоплазмама

Мијелопролиферативне неоплазме (МПН) представљају клоналне хематолошке малигнитете које у хроничној фази одликује неконтролисана пролиферација диференцираних хематопоеетских ћелија, при чему је такође присутан и снажан одговор на цитокине и факторе раста, као последица конститутивне активације тирозин киназних сигналних путева (Nangalia и Green, 2017). У МПН убрајају се три болести: полицитемија вера (ПВ), есенцијална тромбocyтемија (ЕТ) и примарна мијелофиброза (ПМФ). Познато је да током трајања болести може доћи до трансформације, при чему су најчешће трансформације из ЕТ у ПВ или ПМФ, из ПВ у ПМФ или трансформација било које од три ентитета у акутну мијелоидну леукемију (АМЛ) (Cerquozzi и Tefferi, 2015), при чему је механизам трансформације сложен и везан за алелско оптерећење, као и стицање додатних мутација током прогресије болести (Moliterno и сар., 2008).

Група испитаника укључена у наше експерименте састојала се од 140 пацијената и показивала је одређене специфичности. Наведену групу чинило је 57 мушкараца и 83 жене, чија је просечна старост у тренутку постављања дијагнозе износила 61 година, што је у складу са вредностима које се наводе у литератури, а које износе 60 или више (Moulard и сар., 2014; Rumi и Cazzola, 2017). За нашу групу испитаника карактеристична је индивидуална разлика у старости пацијената, која обухвата опсег од 22 до 81 године.

Основна карактеристика МПН представља присуство *JAK2V617F* мутације, која се према литератури јавља у 95% или више пацијената са ПВ, као и 50-60% пацијената са ЕТ и ПМФ (Kralovics и сар., 2005). У нашем случају, *JAK2V617F* мутација детектована је код свих пацијената са ПВ, 48% пацијената са ЕТ и 50% пацијената са ПМФ. Више од 50% мутираног алела пронађено је код 49% пацијената са ПВ, што је објашњено губитком хетерозиготности, односно појавом мутације у хомозиготном стању. У случају ЕТ, постоји феномен поликлонске хематопоезе, где експанзија *wt* клона није супримирана експанзијом мутираног клона, те се у овом ентитету мутација може наћи у хетерозиготном стању или може бити одсутна (Harrison и сар., 1999; Swierczek и сар., 2015). У нашој групи ЕТ пацијената било је присутно 48% хетерозигота, док је 52% пацијената било без мутације. Код ПМФ пацијената, 51% био је са *JAK2V617F* мутацијом, док је 49 било без мутације.

5.2. Хронична инфламација код МПН

МПН представљају јединствени модел односа између клоналног развоја хематолошког малигнитета и хроничне инфламације. Неопластично трансформисани клон представља главни покретач инфламаторних реакција, што је доказано куративним ефектом алогене трансплантације матичних ћелија, при чему се поново успоставља нормална хематопоеза и долази до повлачења фиброзе (Thiele и сар., 2005). Неопластични клон и диференциране ћелије које од њега потичу представљају главни извор индиректне паракрине секреције инфламаторних цитокина пореклом од нормалних ћелија присутних у микрооколини тумора. Повећани нивои цитокина у циркулацији и нагомилавање реактивних кисеоничних врста води генетичкој нестабилности, која погодује развоју неоплазме и њиховој прогресији (Mantovani и сар., 2008; Candido и Hagemann, 2013).

Међу медијаторе инфламације који су повезани са продуженом мијелопролиферацијом спадају S100 протеини. S100A8, A9 и A12 луче ћелије мијелоидног порекла, док је S100A4

регулатор пролиферације у неоплазмама. S100A4 и A12 стварају се путем активације JAK-STAT сигналног пута, који је конститутивно активан у МПН (Diklic и сар., 2016).

5.2.1. Фактори инфламације S100A4, S100A8, S100A A9 и S100A A12 у ћелијама пацијената са МПН

5.2.1.1. S100A4

Познато је да је S100A4 укључен у процес инвазије и метастазирања малигнух тумора (Fei и сар., 2017), а у неколико студија показано је да је постоји корелација између нивоа S100A4 и лошијег исхода код пацијената оболелих од малигнух болести (Cabezón и сар., 2007). Корелација лошије прогнозе и нивоа S100A4 уочена је у солидним туморима, као што су колоректални карцином и карцином дојке (Gongoll и сар., 2002), као и тумори оваријума, простате, панкреаса, бешике, једњака и жучне кесе, али и „течним“ туморима, као што је леукемија (Chen и сар., 2014; Bresnick и сар., 2015). Код овог типа малигнух болести, од кључног значаја је негативна регулација p53 од стране S100A4, који у овом случају има и улогу позитивног регулатора ћелијске миграције и стимулатора ангиогенезе (Lukanidin и Sleeman, 2012; Gross и сар., 2014).

У нашим испитивањима показано је да између генске експресије S100A4 у гранулоцитима МПН пацијената и контролних узорака нема статистички значајне разлике, иако се највећи нивои генске експресије уочавају код пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом, затим код пацијената са ПВ хетерозиготним статусом док је најмањи код пацијената са ПМФ хетерозиготним статусом. Са друге стране, у студији са акутном мијелоидном леукемијом (АМЛ), показано је да је ниво информационе РНК троструко већи у односу на здраве контроле (Steinbach и сар., 2007). Ово указује на чињеницу да је стопа преживљавања пацијената са АМЛ мања у односу на било који од ентитета МПН (око 28% петогодишње преживљавање за период 2009-2015), посматрано према критеријумима National Cancer Institute (NIH, USA) и Orphanet-a (<https://seer.cancer.gov/>; www.orpha.net/).

На протеинском нивоу, у гранулоцитима МПН показано је статистички значајно повећање нивоа S100A4, код свих МПН, независно од статуса JAK2V617F мутације, у односу на контролну групу. Наши резултати у складу су са испитивањем нивоа S100A4 протеина у АМЛ, спроведеном од стране Alanazi и сар. (2019), у коме је показано да је ниво овог протеина у цитоплазми АМЛ бласта значајно повећана у поређењу са контролним узорцима. Поред тога, у овој студији показано је да је локализација S100A4 у бластима у односу на нормалне CD34⁺ ћелије највећим делом у нуклеусу, што указује на разлику у локализацији у физиолошким и патолошким стањима. Искључивање експресије S100A4 путем РНК интерференције у ћелијским линијама АМЛ довело је до ћелијске смрти путем индукције апоптозе (Liu и сар., 2014; Alanazi и сар. 2019), што указује да би овај протеин могао бити потенцијална мета за терапију канцера, будући да би нетрансформисане ћелије биле сачуване.

Испитивање нивоа S100A4 у ћелијама пацијената са МПН извршено је и имуноцитохемијски, на цитоспин препаратима, као и имунохистохемијски, на препаратима костне сржи. Имуноцитохемијском анализом показано је да је у гранулоцитима МПН број S100A4 позитивних ћелија значајно смањен код свих пацијената са ПВ дијагнозом, као и ПМФ пацијената код којих није детектована JAK2V617F мутација. Код пацијената са ЕТ хетерозиготним статусом уочено је повећање броја имунореактивних ћелија, међутим, без статистички значајне разлике у односу на контролу, а сагласни резултати показани су и имунохистохемијски. Из наведеног може се закључити да алелско оптерећење генерално нема утицаја на генску експресију и ниво S100A4 протеина код пацијената са МПН, при чему нивои S100A4 протеина показују стабино повећање, што је у складу са литературним подацима.

5.2.1.2. S100A8/9

Познато је да је S100A8 укључен у диференцијацију мијелоидних ћелија и регулацију инфламације, док S100A9 стимулише продукцију проинфламаторних цитокина и активира ERK1/2 сигнални пут везивањем за RAGE рецепторе. Уз то, хетеродимер S100A8/9 стимулише раст туморских ћелија активацијом ERK1/2, као и везивањем и сигнализацијом преко RAGE, што доводи до синтезе медијатора инфламације (Ковачић и сар., 2018).

Протеин S100A8 је све чешће препознат као биомаркер у више типова солидних тумора, а такође има важну улогу и у хематолошким малигнитетима, као што су МПН. У болестима као што је акутна мијелоидна леукемија значајан је као потенцијални индикатор слабијег преживљавања (Yang и сар., 2016).

У солидним туморима повишени нивои S100A8/A9 у туморској микросредини или плазми корелира са агресивношћу болести (Cheng и сар., 2008; Miller и сар., 2017), при чему има улогу у регрутовању мијелоидних и супресорских ћелије мијелоидног порекла (енг. myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), које стимулишу раст тумора и омогућавају успостављање метастатске нише (Cheng и сар., 2008; Ichikawa и сар., 2011). Високи нивои S100A8/A9 карактеристични су за инфламаторна стања, при чему хетеродимер делује као хемоатрактански молекул, кога конститутивно експримирају неутрофили, активирани моноцити и макрофаги. Такође, S100A8/A9-позитивне мијелоидне ћелије прве су ћелије које инфилтрирају инфламаторне лезије (Gebhardt и сар., 2006).

У нашим истраживањима, показали смо да је ниво S100A8 протеина, као и S100A9 протеина повећан код свих МПН пацијената, што је такође показано и код пацијената са АМЛ (Stewart и сар., 2018). У случају МПН пацијената, статистички значајно повећање уочава се код ПВ пацијената (и хомозиготног и хетерозиготног стања), као и код ЕТ хетерозигота, при чему су резултати добијени *Western blot* методом у сагласности са имуноцитолошким и имунохистохемијским резултатима. Резултати указују да S100A8 и S100A9 повећани, уз друге инфламаторне маркере, у зависности од алелског оптерећења *JAK2V617F* мутацијом.

Резултати испитивања генске експресије не достижу статистичку значајност, али указују да постоји повећан ниво S100A8 и S100A9 код пацијената са ПВ и ПМФ, што је у складу са тежином клиничке слике код ових болести. У студији Laouedj и сар., 2017, показано је да је висок ниво S100A8 и S100A9 уочен, како у моноцитним АМЛ ћелијама, тако и у мијеломоноцитним ћелијама, као и да се њихов ниво повећава са прогресијом болести, при чему је показана корелација са повећањем броја леукемијских ћелија. Мишеви третирани S100A8 антителом показали су продужено преживљавање и одлагање појаве симптома болести, као и да третман рекомбинантним мишјим S100A9 протеином такође продужава преживљавање. Ово указује да S100A8/A9 може послужити као клинички биомаркер и циљана терапија, како код леукемије, тако и код МПН.

5.2.1.3. S100A12

S100A12 је укључен у инфламаторне одговоре у организму, будући да је показано да се прекомерно експримира у инфламаторним компартментима, као и да се повећани нивои овог протеина могу наћи у серуму особа са различитим инфламаторним и метаболичким стањима, неуродегенеративним поремећајима и малигним болестима (Pietzsch и Horppmann, 2009).

У солидним туморима, као што су карцином желуца и орофарингеални карцином, смањење нивоа S100A12 допринело је туморигенези, док је висок ниво био позитиван прогностички фактор за преживљавање. Код ових карцинома, показано је и да је генска експресија S100A12 била смањена (Li и сар., 2016). Са друге стране, будући да је S100A12 маркер инфламације, значајно је повишена његова концентрација, како у инфламацијом захваћеним ткивима, тако и у крви. Уз то, концентрација у серуму корелира са интензитетом обољења (Pietzsch и Horppmann, 2009). У нашим експериментима, ниво генске експресије био

је повећан у свим МПН изузев ПМФ са хетерозиготним стањем *JAK2V617F* мутације и ПМФ без мутације. Поред тога, протеински нивои такође су били повећани у свим МПН, што је у складу са чињеницом да у костној сржи пацијената са МПН постоји хронична инфламација (Wang и Zuo, 2019).

5.3. Утицај хидроксиуреа и ЈАК2 специфичног инхибитора на нивое фактора инфламације у *in vitro* условима на ћелијској линији HEL 92.1.7

Хидроксиуреа представља цитостатик који се стандардно употребљава као циторедуктивна терапија у фармаколошком приступу лечења пацијената са МПН. Антиинфламаторни утицај хидроксиуреа показан је код пацијената са српастом анемијом, код којих постоји хронична инфламација као последица оштећења ткива због присуства српастих ћелија (Johnson и Telen, 2008; Sarray и сар., 2015). У најновијим студијама показано је да хидроксиуреа има позитиван али не и комплетан утицај на смањење инфламаторних молекула код ових пацијената (Penkert и сар., 2018). У нашим експериментима показано је да у третман хидроксиуреом и комбинацијом хидроксиуреа и специфичног ЈАК2 инхибитора 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексаном, у току 48 часова, доводи до значајног смањења нивоа испитиваних S100 протеина. Чињеница да ЈАК2 специфични инхибитор 1,2,3,4,5,6-хексабромциклохексан доводи до значајнијег снижења нивоа указује да се испитивани S100 протеини експримирају на ЈАК2- зависан начин у овој ћелијској линији.

5.4. Утицај проинфламаторног IL-6 и ЈАК1/2 инхибитора на ниво S100 протеина и активацију NF-κB сигналног пута у мононуклеарима МПН пацијената и HEL ћелијама

IL-6 представља мултифункционални цитокин који је укључен у бројне процесе везане за инфламацију, од индукције протеина акутне фазе, до индукције ћелијског раста и диференцијације (Kishimoto, 2010). За овај цитокин сматра се да представља кључни активатор мијелопоезе, као одговор на хроничне инфламаторне поремећаје, укључујући и МПН (Mirantes и сар., 2014). По везивању за специфични рецептор, IL-6 индукује транскрипцију гена кроз два сигнална пута, ЈАК-STAT и Ras-MAPK (Ogata и сар., 1997; Murray, 2007). МПН пацијенти имају значајно повишен ниво IL-6 у плазми (Casetti и сар., 2018), што је такође потврђено у нашој студији, као и повећан ниво IL-6 у костној сржи, зависан од присуства *JAK2V617F* мутације код пацијената са ЕТ и ПМФ дијагнозом (Ћокић и сар., 2015).

Циљ наших експеримената у овој студији био је утврдити утицај третмана мононуклеарних ћелија пацијената са МПН и HEL ћелија на нивое S100 протеина повезаних са инфламацијом, као и да ли је њихова активација зависна од NF-κB, ЈАК-STAT или PI3K-AKT сигналног пута. У бројним студијама показано је да S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 могу индуковати активацију NF-κB и његову транслокацију у нуклеус (Grotterød и сар., 2010; Donato и сар., 2013). При томе, инхибиција ЈАК1/2 и NF-κB сигналних путева смањивала је серумске нивое инфламаторних цитокина, оптерећење болешћу и довела до реверзије фиброзе у костној сржи (Клерре и сар., 2018). Показано је да S100A8/9 хетеродимер може, уз регулацију пролиферације и диференцијације, активирати продукцију проинфламаторних цитокина, као што је IL-6, IL-8 и TNF-α у активираним моноцитима и другим ћелијама (Sunahori и сар., 2006; Donato и сар., 2013), док је S100A9 посредована активација ћелија значајно смањена инхибицијом NF-κB (Ху и сар., 2013).

Показали смо да је IL-6 генерално смањивао или није утицао на ниво S100 протеина у мононуклеарним ћелијама пацијената са МПН, изузев нивоа S100A9 код ПВ. Инхибитори PI3K (Ly294002) и NF-κB (JSH23) сигналних путева повећали су нивое S100A8 код ЕТ, а IL-6 смањени нивои S100A8 код ЕТ враћени су инхибицијом NF-κB. IL-6 је такође смањивао ниво S100A8 код ПМФ, што је додатно појачано инхибицијом PI3K. IL-6 зависно смањење S100A9

код ЕТ умањено је деловањем NF-κB инхибитора, а појачано PI3K инхибицијом. Инхибиција PI3K, NF-κB, и JAK1/2 сигналних путева деловала је на смањење нивоа S100A8 код ПМФ, док је код ПВ и ЕТ инхибиција PI3K сигналног пута довела до смањења нивоа S100A9. Уз то, нивои овог протеина код ЕТ и ПВ повећани су деловањем JAK1/2 и NF-κB инхибитора, што указује на зависност синтезе S100A9 од ових сигналних путева.

У истим експериментима одређена и деловање IL-6 на активност овог пута код МПН. Показали смо да је IL-6 инхибирао NF-κB сигнализацију код ЕТ и ПМФ, док је инхибиција PI3K довела до смањења активности NF-κB код ЕТ. Инхибиција JAK-STAT сигналног пута неспецифичним инхибитором руксолитинибом активирала је NF-κB сигнални пут код ЕТ.

Наведени резултати указују да је проинфламаторним цитокином изазвано генерално смањење нивоа S100 протеина код МПН посредовано NF-κB и PI3K сигналним путевима.

У HEL ћелијама инхибиција наведених сигналних путева није довела до значајне промене нивоа инфламаторних маркера. Ове ћелије, иако имају JAK2V617F мутацију, показују разлике у односу на ћелије пореклом од пацијената у том смислу да ин недостаје рецептор за IL-6 (Kobayashi и сар., 2016), те је одговор на стимулацију проинфламаторним цитокином изостао.

5.5. Утицај антиинфламаторног IL-10 и JAK1/2 инхибитора на ниво S100 протеина и активацију NF-κB сигналног пута у мононуклеарима МПН пацијената и HEL ћелијама

IL-10 је мултифункционални цитокин који учествује у имунорегулацији и инфламацији. Може блокирати дејство NF-κB и укључен је у регулацију JAK-STAT сигналног пута (Mosser и Zhang, 2008).

Показано је да се поједини S100 протеини појачано синтетишу у присуству IL-10. Таков случај је са S100A8, за који је у литератури показано да се повећава у одговору на IL-10. У садејству са липополисахаридом (ЛПС) и интерфероном-γ, IL-10 довео је до вишеструког повећања нивоа S100A8 код макрофага и ендотелских ћелија (Xu и сар., 2001).

У нашим експериментима, IL-10 изазвао је повећање нивоа S100A4 код ПВ, које се могло блокирати PI3K и NF-κB инхибиторима. Такође, IL-10 довео је до смањења нивоа S100A8, које се могло блокирати NF-κB и JAK1/2 инхибицијом. Уз то, IL-10 довео је до смањења нивоа S100A9 код ЕТ, посредовано PI3K сигналним путем, док су се под дејством IL-10 код ЕТ нивои S100A12 повећали, што се могло спречити PI3K и NF-κB инхибицијом. Инхибитор NF-κB сигналног пута JSH23 повећао је значајно нивое S100A12 код ПМФ, док су код исте болести нивои S100A8 били значајно смањени. У овим експериментима није уочен утицај инхибиције сигналних путева. Активација NF-κB сигналног пута уочена је код ПМФ, под узајамним дејством IL-10 и JAK1/2 инхибитора руксолитиниба. У оба случаја, и код третмана проинфламаторним IL-6 и антиинфламаторним IL-10 код пацијената са ЕТ уочено је смањење нивоа S100A8/9, које је посредовано NF-κB и PI3K сигналним путевима. Супротно PI3K посредованом снижењу S100A8/9, IL-10 је довео до повећања нивоа S100A4 и S100A12 које је посредовано NF-κB сигналним путем. То указује да су NF-κB и PI3K сигнални путеви доминантни у IL-6 / IL-10 посредованој регулацији нивоа S100 протеина код МПН, где је активација JAK-STAT сигналног пута конститутивна.

У експериментима са HEL ћелијама третман са IL-10 и инхибиција наведених сигналних путева није довела до значајне промене нивоа инфламаторних маркера, као ни активације NF-κB сигналног пута.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- Испитивање присуства *JAK2V617F* мутације код пацијената са МПН показало је да се наведена мутација јављала код свих пацијената оболелих од ПВ, 48 % пацијената са ЕТ и 50 % пацијената са ПМФ. Од ПВ пацијената 49 % имало је алелско оптерећење више од 50 %, тј. имало је *JAK2V617F* у хомозиготном стању, док су остали били хетерозиготи. Код ЕТ пацијената, 48 % били су хетерозиготи, док 52 % пацијената није носило мутирани алел. У случају ПМФ пацијената, 51 % био је са *JAK2V617F* мутацијом, док је 49 % било без мутације.
- S100 протеини представљају важне биомаркере хроничне инфламације у МПН, будући да су укључени у активацију ћелијских рецептора и учествују у сигналним путевима.
- Инфламација, анализирана преко нивоа фактора инфламације S100A4, S100A8, S100A9 и S100A12 показује повећање, које зависи од присуства *JAK2V617F* мутације код појединачних протеина. S100A4 повишен је код свих МПН, независно од присуства *JAK2V617F* мутације. S100A8 и S100A9 показују значајно повећање код ПВ пацијената са *JAK2V617F* мутацијом у хомозиготном и хетерозиготном стању, као и код ЕТ хетерозигота. Нивои S100A12 протеина такође су били повећани у свим МПН. Наведено повећање нивоа фактора инфламације указује да код оболелих од МПН постоји хронична инфламација.
- Третман цитостатиком хидроксиуреом и комбинацијом хидроксиуреа и специфичног *JAK2* инхибитора 1,2,3,4,5,6-хексабромоциклохексаном смањује ниво фактора инфламације у HEL 92.1.7 ћелијској линији са *JAK2V617F* мутацијом. Снижење нивоа S100 протеина повезаних са инфламацијом указује да се испитивани S100 протеини експримирају на *JAK2*-зависан начин.
- Проинфламаторни цитокин IL-6 смањивао је нивое S100A8 и S100A9 протеина у мононуклеарима пацијената са ЕТ, што је посредовано NF-κB сигналним путем.
- Антиинфламаторни цитокин IL-10 такође је смањивао нивое S100A8 и S100A9 протеина код пацијената са ЕТ, али посредовано PI3K-AKT сигналним путем.
- NF-κB и PI3K сигнални путеви доминантни су у IL-6 / IL-10 посредованој регулацији нивоа S100 протеина код МПН, где је активација *JAK-STAT* сигналног пута конститутивна.
- Инфламаторни цитокини негативном повратном спрегом регулишу S100A8 и S100A9 мијелоидне протеине који такође учествују у хроничном инфламаторном одговору код МПН.

7. ЛІТЕРАТУРА

Alanazi B, Munje CR, Rastogi N, Williamson AJ, Taylor S, Hole PS, Hodges M, Doyle M, Baker S, Gilkes AF, Knapper S. Integrated nuclear proteomics and transcriptomics identifies S100A4 as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019 Oct 14;1-4.

Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmstead County, Minnesota, residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994;47:89-93

Arachchillage DR, Laffan M. Pathogenesis and management of thrombotic disease in myeloproliferative neoplasms. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2019 Aug 5. Thieme Medical Publishers.

Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Orazi A, Tefferi A. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood cancer journal*. 2018 Feb 9;8(2):15.

Barrige M, Bootman M, Roderick H. Calcium signaling: dynamics, homeostasis, and remodeling. *Nature*. 2003;4:517-29.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*. 2005 Mar 19;365(9464):1054-61.

Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):346-52.

Berglund S, Zettervall O. Incidence of polycythemia vera in a defined population. *Eur J Haematol* 1992;48:20-26

Boehm T. Design principles of adaptive immune systems. *Nature Reviews Immunology*. 2011 May;11(5):307.

Boye K, Maeldandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology*. 2010 Feb 1;176(2):528-35.

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015 Feb;15(2):96-109.

Brière JB. Essential thrombocythemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2007 Dec 1;2(1):3.

Cabezón T, Celis JE, Skibshøj I, Klingelhöfer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Mældandsmo GM, Lukanidin E, Ambartsumian N. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *International journal of cancer*. 2007 Oct 1;121(7):1433-44.

Cacemiro MD, Cominal JG, Tognon R, Nunes ND, Simões BP, Figueiredo-Pontes LL, Catto LF, Traina F, Souto EX, Zambuzi FA, Frantz FG. Philadelphia-negative myeloproliferative

neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. *Hematology, transfusion and cell therapy*. 2018 Jun;40(2):120-31.

Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *Journal of clinical immunology*. 2013 Jan 1;33(1):79-84.

Castets F, Griffin WS, Marks A, Van Eldik LJ. Transcriptional regulation of the human S100 β gene. *Molecular brain research*. 1997 Jun 1;46(1-2):208-16.

Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood cancer journal*. 2015 Nov;5(11):e366.

Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood cancer journal*. 2015 Nov;5(11):e366-.

Chakraborty P, Bjork P, Källberg E, Olsson A, Riva M, Mörgelin M, Liberg D, Ivars F, Leanderson T. Vesicular location and transport of S100A8 and S100A9 proteins in monocytoid cells. *PloS one*. 2015 Dec 14;10(12):e0145217.

Chen H, Xu C, Qing'e Jin ZL. S100 protein family in human cancer. *American journal of cancer research*. 2014;4(2):89.

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018 Jan 23;9(6):7204.

Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *Journal of Experimental Medicine*. 2008 Sep 29;205(10):2235-49.

Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *Journal of Experimental Medicine*. 2008 Sep 29;205(10):2235-49.

Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology*. 2005 Mar;46(3):256-69.

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

Denessiouk K, Permyakov S, Denesyuk A, Permyakov E, Johnson MS. Two structural motifs within canonical EF-hand calcium-binding domains identify five different classes of calcium buffers and sensors. *PLoS One*. 2014 Oct 14;9(10):e109287.

Diklic M, Buac M, Mitrovic O, Beleslin-Cokic B, Suboticki T, Dragoslava D, Cokic V. The S100 proteins as mediators of inflammation are increased in myeloproliferative neoplasm and downregulated by jak2 inhibition. In: *Haematologica* 2016 Jun 1 (Vol. 101, pp. 806-806).

Donato R, Cannon B, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, J Weber D, L Geczy C. Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*. 2013 Jan 1;13(1):24-57.

- Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1999 Jul 8;1450(3):191-231.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*. 2003 Apr 15;60(6):540-51.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001 Jul 1;33(7):637-68.
- Drier JK, Swanson PE, Cherwitz DL, Wick MR. S100 protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinomas. Immunohistochemical comparison with malignant melanoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1987 May;111(5):447-52.
- Elder JT, Zhao X. Evidence for local control of gene expression in the epidermal differentiation complex. *Experimental dermatology*. 2002 Oct;11(5):406-12.
- Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische thrombozythämie bei vascularer Schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocytopenia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol*. 1934; 293:233-48.
- Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget*. 2017 Sep 22;8(42):73219.
- Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S, Vasudevan KB, LaTocha DH, Yang F, Press RD, Loriaux MM. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6392-8.
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Jan 13;281(2):677-80.
- Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2006 Nov 30;72(11):1622-31.
- Goh Then Sin C, Hersch N, Rudland PS, Barraclough R, Hoffmann B, Gross SR. S100A4 downregulates filopodia formation through increased dynamic instability. *Cell adhesion & migration*. 2011 Sep 1;5(5):439-47.
- Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2002 Nov 1;123(5):1478-84.
- Goyette J, Geczy CL. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino acids*. 2011 Oct 1;41(4):821-42.
- Grimbaldeston MA, Geczy CL, Tedla N, Finlay-Jones J, Hart PH. S100A8 induction in keratinocytes by UVA-irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J Invest Dermatol*. 2003; 121:1168-74
- Gross SR, Sin CG, Barraclough R, Rudland PS. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cellular and molecular life sciences*. 2014 May 1;71(9):1551-79.

- Gross SR. The Actomyosin Network and Cellular Motility: A S100A4 Regulatory View into the Process. *Cytoskeleton: Structure, Dynamics, Function and Disease*. 2017 May 17:205.
- Grotterød I, Mælandsmo GM, Boye K. Signal transduction mechanisms involved in S100A4-induced activation of the transcription factor NF- κ B. *BMC cancer*. 2010 Dec;10(1):241.
- Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J, Beck M, Bonefeld CM, Hamerlik P, Guldborg P, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. S100A4-neutralizing antibody suppresses spontaneous tumor progression, pre-metastatic niche formation and alters T-cell polarization balance. *BMC cancer*. 2015 Dec;15(1):44.
- Guesdon JL, Ternynck TH, Avrameas ST. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1979 Aug;27(8):1131-9.
- Han C, Robinson DW, Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology*. 2006 Nov 1;33(11):2167-72.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. 2005 Apr 21;352(16):1685-95.
- Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):417-24.
- Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer?. *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3219-25.
- Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family. In: Vogel H. ed. *Calcium-Binding Protein Protocols 2002* (pp. 69-80). Humana Press.
- Heizmann, C. W. and Cox, J. A. (1998) New perspectives on S100 proteins: a multifunctional Ca²⁺-, Zn²⁺- and Cu²⁺-binding protein family. *BioMetals* 11, 383–397.
- Hernández-Ochoa EO, Melville Z, Vanegas C, Varney KM, Wilder PT, Melzer W, Weber DJ, Schneider MF. Loss of S100A1 expression leads to Ca²⁺ release potentiation in mutant mice with disrupted CaM and S100A1 binding to CaMBD2 of RyR1. *Physiological reports*. 2018 Aug;6(15):e13822.
- Heuck G. Zwei fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut-resp. Knochenmarksbefund. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 1879 Dec 1;78(3):475-96.
- Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *ASH Education Program Book*. 2007 Jan 1;2007(1):346-54.
- Hoffman R, Wasserman LR. Natural history and management of polycythemia vera. *Adv Intern Med* 1979;24:255-285

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999 Jun 25;97(7):889-901.

Hou S, Tian T, Qi D, Sun K, Yuan Q, Wang Z, Qin Z, Wu Z, Chen Z, Zhang J. S100A4 promotes lung tumor development through β -catenin pathway-mediated autophagy inhibition. *Cell death & disease*. 2018 Feb 15;9(3):277.

Hurtado-Nedelec M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T, Belambri SA, Fay M, Cassinat B, Gougerot-Pocidallo MA, Dang PM, El-Benna J. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica*. 2013 Oct 1;98(10):1517-24.

Ichikawa M, Williams R, Wang L, Vogl T, Srikrishna G. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular cancer research*. 2011 Feb 1;9(2):133-48.

Ishida H, Vogel HJ. EF-Hand Proteins. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA, editors. *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 766-75.

Iurlo A, Cattaneo D, Gianelli U. Blast Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: Risk Factors, Biological Findings, and Targeted Therapeutic Options. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jan;20(8):1839.

Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica*. 2008;93(4):481-485.

Kaufmann U, Kahlfuss S, Yang J, Ivanova E, Koralov SB, Feske S. Calcium signaling controls pathogenic Th17 cell-mediated inflammation by regulating mitochondrial function. *Cell metabolism*. 2019 May 7;29(5):1104-18.

Kawasaki H, Nakano T, Kohdera U, Kobayashi Y. Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. *American journal of hematology*. 2001 Nov;68(3):194-7.

Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of leukocyte biology*. 2013 Jul;94(1):55-68.

Kilby PM, Roberts GC, Van Eldik LJ. Identification of the binding site on S100B protein for the actin capping protein CapZ. *Protein science*. 1997 Dec;6(12):2494-503.

Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010;22:347-352.

Kleppe M, Koche R, Zou L, van Galen P, Hill CE, Dong L, De Groote S, Papalexis E, Somasundara AV, Cordner K, Keller M. Dual targeting of oncogenic activation and inflammatory signaling increases therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Cancer cell*. 2018 Jan 8;33(1):29-43.

Kobayashi SS, Vali S, Kumar A, Singh N, Abbasi T, Sayeski PP. Identification of myeloproliferative neoplasm drug agents via predictive simulation modeling: assessing responsiveness with micro-environment derived cytokines. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):35989.

Komrokji R, Padron E, Verstovsek S. Myelofibrosis. U: Greer JP, Arber D, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM, Forester J. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology* (2014). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins Health. P 1734-1745.

- Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008 Oct;22(10):1828.
- Kovačić M, Mitrović-Ajtić O, Beleslin-Čokić B, Djikić D, Subotički T, Diklić M, Leković D, Gotić M, Mossuz P, Čokić VP. TLR4 and RAGE conversely mediate pro-inflammatory S100A8/9-mediated inhibition of proliferation-linked signaling in myeloproliferative neoplasms. *Cellular Oncology*. 2018 Oct 1;41(5):541-53.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
- Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Maitland N, Lomonosov M, Hansen K, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Apr 17;273(16):9852-6.
- Kuberappa, P.H., Bagalad, B.S., Ananthaneni, A., Kiresur, M.A. and Srinivas, G.V., 2016. Certainty of S100 from physiology to pathology. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(6), p.ZE10.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011 Jan 1;30(1):16-34.
- Laemli UK., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227, 680-685
- Lakowski TM, Lee GM, Okon M, Reid RE, McIntosh LP. Calcium-induced folding of a fragment of calmodulin composed of EF-hands 2 and 3. *Protein science*. 2007 Jun;16(6):1119-32.
- Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2199-204.
- Landolfi R, Di Gennaro L. Pathophysiology of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011; 96:183–186.
- Laouedj M, Tardif MR, Gil L, Raquil MA, Lachhab A, Pelletier M, Tessier PA, Barabé F. S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood*. 2017 Apr 6;129(14):1980-90.
- Leclerc E. The Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Malignant Melanoma. In *Brain Metastases from Primary Tumors, Volume 3* 2016 Jan 1 (pp. 119-132). Academic Press.
- Leclerc E. The roles of S100 proteins and RAGE in melanoma. In *Breakthroughs in Melanoma Research* 2011 Nov 14. IntechOpen.
- Leśniak W. Epigenetic regulation of S100 protein expression. *Clinical epigenetics*. 2011 Aug 1;2(2):77-83.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in

- polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell*. 2005 Apr 1;7(4):387-97.
- Li D, Zeng Z, Yu T, Qin J, Wu J, Song JC, Zhou ZY, Yuan JP. Expression and clinical implication of S100A12 in gastric carcinoma. *Tumor Biology*. 2016 May 1;37(5):6551-9.
- Li ZH, Spektor A, Varlamova O, Bresnick AR. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*. 2003 Dec 9;42(48):14258-66.
- Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology*. 2009 Sep;86(3):577-87.
- Linse S, Chazin WJ. Quantitative measurements of the cooperativity in an EF-hand protein with sequential calcium binding. *Protein Science*. 1995 Jun;4(6):1038-44.
- Liu J, Fu S, Xu Y, Zheng Z. RNA interference targeting inhibition of S100A4 suppresses cell growth and promotes apoptosis in human laryngeal carcinoma Hep2 cells. *Mol Med Rep*. 2014;10:1389-94.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001 Dec 1;25(4):402-8.
- Lukanidin E, Sleeman JP. Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth. *In Seminars in cancer biology* 2012 Jun 1 (Vol. 22, No. 3, pp. 216-225). Academic Press.
- Luque LF, Blackmon AL, Ramanathan G, Fleischman AG. Key Role of Inflammation in Myeloproliferative Neoplasms: Instigator of Disease Initiation, Progression, and Symptoms. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2019:1-9.
- Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *Journal of autoimmunity*. 2017 Dec 1;85:58-63.
- Madureira PA, O'Connell PA, Surette AP, Miller VA, Waisman DM. The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *BioMed Research International*. 2012 Oct 14;2012.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 23;454(7203):436.
- Marsden BJ, Shaw GS, Sykes BD. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochemistry and Cell Biology*. 1990 Mar 1;68(3):587-601.
- Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*. 1982 Jun 11;216(4551):1233-5.
- Means, R. Polycythemia Vera. U: Greer JP, Arber D, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM, Forester J. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology* (2014). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins Health. p 1722-1733.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):771-6.

- Meijer B, Geary RB, Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *International journal of inflammation*. 2012;2012.
- Melville Z, Hernández-Ochoa EO, Pratt SJ, Liu Y, Pierce AD, Wilder PT, Adipietro KA, Breysse DH, Varney KM, Schneider MF, Weber DJ. The activation of protein kinase A by the calcium-binding protein S100A1 is independent of cyclic AMP. *Biochemistry*. 2017 Apr 18;56(17):2328-37.
- Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, Levine R, Le Bousse-Kerdiles MC, Wadleigh M, Campbell PJ, Silver RT. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leukemia research*. 2007 Jun 1;31(6):737-40.
- Miller P, Kidwell KM, Thomas D, Sabel M, Rae JM, Hayes DF, Hudson BI, El-Ashry D, Lippman ME. Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast cancer research and treatment*. 2017 Nov 1;166(1):85-94.
- Mirantes C, Passequé E, Pietras EM. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental cell research*. 2014 Dec 10;329(2):248-54.
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Experimental hematology*. 2008 Nov 1;36(11):1480-6.
- Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*. 1965 Jun 9;19(6):739-44.
- Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews*. 2008 Dec;226(1):205-18.
- Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *European journal of haematology*. 2014 Apr;92(4):289-97.
- Moulard O, Mehta J, Olivares R, Iqbal U, Mesa R. Epidemiology of Myelofibrosis (MF), Polycythemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) in the European Union (EU). *Blood*. 2012;120:1744-.
- Murray JI, Tonkin ML, Whiting AL, Peng F, Farnell B, Cullen JT, Hof F, Boulanger MJ. Structural characterization of S100A15 reveals a novel zinc coordination site among S100 proteins and altered surface chemistry with functional implications for receptor binding. *BMC structural biology*. 2012 Dec;12(1):16.
- Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007;178:2623-2629.
- Nakamura T, Hayashi M, Kato A, Sawazaki T, Yasue H, Nakano T, Tanaka T. A Unique Exon–Intron Organization of a Porcine S100C Gene: Close Evolutionary Relationship to Calmodulin Genes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998 Feb 24;243(3):647-52.

Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Hematology* 2014, the American Society of Hematology Education Program Book. 2017 Dec 8;2017(1):470-9.

Ogata A, Chauhan D, Teoh G, et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol.* 1997;159:2212-2221.

Orre LM, Panizza E, Kaminsky VO, Vernet E, Gräslund T, Zhivotovsky B, Lehtiö J. S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene.* 2013 Dec;32(49):5531.

Pardanani A, Vannucchi AM, Passamonti F, Cervantes F, Barbui T, Tefferi A. JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. *Leukemia.* 2011 Feb;25(2):218-25.

Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *The American journal of medicine.* 2004 Nov 15;117(10):755-61.

Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *Journal of leukocyte biology.* 1999 Oct;66(4):549-56.

Penkert RR, Hurwitz JL, Thomas P, Rosch J, Dowdy J, Sun Y, Tang L, Hankins JS. Inflammatory molecule reduction with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. *haematologica.* 2018 Feb;103(2):e50.

Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation?. *Amino acids.* 2009 Mar 1;36(3):381-9.

Policitemia GIS. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995;123(9):656-664

Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, Bailly S, Toussaint B, Mossuz P. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Experimental hematology.* 2014 May 1;42(5):360-8.

Pradhan A, Lambert QT, Griner LN, Reuther GW. Activation of JAK2-V617F by components of heterodimeric cytokine receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 2010 May 28;285(22):16651-63.

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

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

Raftery MJ, Harrison CA, Alewood P, Jones A, Geczy CL. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. *Biochemical Journal.* 1996 May 15;316(1):285-93.

Röder S, Steimle C, Meinhardt G, Pahl HL. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Experimental hematology.* 2001 Jun 1;29(6):694-702.

- Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):680-92.
- Rumi E, Passamonti F, Pietra D, Porta MG, Arcaini L, Boggi S, Elena C, Boveri E, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2006 Nov 1;107(9):2206-11.
- 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):47954-63.
- Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and-independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal*. 2006 May 15;396(2):201-14.
- Sarray S, Saleh LR, Saldanha FL, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015 Mar 1;72(1):43-7.
- Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in biochemical sciences*. 1996;21(4):134-40.
- Schischlik F, Kralovics R. Mutations in myeloproliferative neoplasms—their significance and clinical use. *Expert review of hematology*. 2017 Nov 2;10(11):961-73.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2007 Feb 1;356(5):459-68.
- Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008 Oct;12(4):198.
- Sekiya F, Bae YS, Jhon DY, Hwang SC, Rhee SG. AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C- γ 1 in the presence of arachidonic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 May 14;274(20):13900-7.
- Senin II, Fischer T, Komolov KE, Zinchenko DV, Philippov PP, Koch KW. Ca²⁺-myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca²⁺-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Dec 27;277(52):50365-72.
- Sever M, Quintás-Cardama A, Pierce S, Zhou L, Kantarjian H, Verstovsek S. Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leukemia & lymphoma*. 2013 Dec 1;54(12):2667-70.
- Shaw GS, Hodges RS, Sykes BD. Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science*. 1990 Jul 20;249(4966):280-3.
- Shaw GS, Hodges RS, Sykes BD. Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science*. 1990 Jul 20;249(4966):280-3.
- Shier L, George T. Pathology of the Myeloproliferative Neoplasms. U: Greer JP, Arber D, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM, Forester J. Eds. *Wintrobe's Clinical*

- Hematology (2014). Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins Health. p 1688-1704.
- Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1998 Dec 10;1448(2):277-89.
- Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4272-90.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine*. 2006 Aug;12(8):895.
- Steinbach D, Pfaffendorf N, Wittig S, Gruhn B. PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007 Aug 1;177(1):51-4.
- Stewart HJ, Chaudry S, Crichlow A, Luling Feilding F, Chevassut TJ. BET inhibition suppresses S100A8 and S100A9 expression in acute myeloid leukemia cells and synergises with daunorubicin in causing cell death. *Bone marrow research*. 2018;2018.
- Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2006 Jun;8(3):R69.
- Swierczek S, Lima LT, Tashi T, Kim SJ, Gregg XT, Prchal JT. Presence of polyclonal hematopoiesis in females with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015 Dec;29(12):2432.
- Tam CS, Nussenzveig RM, Popat U, Bueso-Ramos CE, Thomas DA, Cortes JA, Champlin RE, Ciurea SE, Manshouri T, Pierce SM, Kantarjian HM. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1628-37.
- Tamburini J. S100 proteins in AML: differentiation and beyond. *Blood*. 2017 Apr 6;129(14):1893-4.
- Taylor DA, Sack JS, Maune JF, Beckingham K, Quioco FA. Structure of a recombinant calmodulin from *Drosophila melanogaster* refined at 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Nov 15;266(32):21375-80.
- Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*. 2017 Jan;92(1):94-108.
- Tefferi A, Huang J, Schwager S, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution. *Cancer*. 2007; 109:2083-2088.
- Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*. 2018 Jan 10;8(1):1-6.
- Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342:1255-1265

- Tefferi A. Primary myelofibrosis. *Cancer Treat Res.* 2008; 142:29-39.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, Stein G, Hann M, Kaminski A, Rathjen N, Metz KA, Beelen DW, Ditschkowski M, Zander A. Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histology and histopathology.* 2005.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011 Oct 14;147(2):275-92.
- Van den Bos, C., Roth, J., Koch, H.G., Hartmann, M. and Sorg, C., 1996. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca²⁺-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *The Journal of Immunology*, 156(3), pp.1247-1254.
- van Dieck J, Teufel DP, Jaulent AM, Fernandez-Fernandez MR, Rutherford TJ, Wyslouch-Cieszyńska A, Fersht AR. Posttranslational modifications affect the interaction of S100 proteins with tumor suppressor p53. *Journal of molecular biology.* 2009 Dec 18;394(5):922-30.
- Wang HY, Zhang JY, Cui JT, Tan XH, Li WM, Gu J, Lu YY. Expression status of S100A14 and S100A4 correlates with metastatic potential and clinical outcome in colorectal cancer after surgery. *Oncology reports.* 2010 Jan 1;23(1):45-52.
- Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in Immunology.* 2018;9:1298.
- Wang Y, Zuo X. Cytokines frequently implicated in myeloproliferative neoplasms. *Cytokine: X.* 2019 Mar 27:100005.
- Weinberg RA. *The Biology of Cancer: Second International Student Edition.* WW Norton & Company; 2013 May 24.
- Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 proteins as an important regulator of macrophage inflammation. *Frontiers in immunology.* 2018 Jan 5;8:1908.
- Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 proteins as an important regulator of macrophage inflammation. *Frontiers in immunology.* 2018 Jan 5;8:1908.
- Xu K, Geczy CL. IFN- γ and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *The Journal of Immunology.* 2000 May 1;164(9):4916-23.
- Xu K, Yen T, Geczy CL. IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *The Journal of Immunology.* 2001 May 15;166(10):6358-66.
- Xu X, Chen H, Zhu X, Ma Y, Liu Q, Xue Y, Chu H, Wu W, Wang J, Zou H. S100A9 promotes human lung fibroblast cells activation through receptor for advanced glycation end-product-mediated extracellular-regulated kinase 1/2, mitogen-activated protein-kinase and nuclear factor- κ B-dependent pathways. *Clinical & Experimental Immunology.* 2013 Sep;173(3):523-35.
- Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, Tsuchiya M, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R. S100 Proteins Modulate Protein Phosphatase 5 Function a link between Ca²⁺ signal transduction and protein dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry.* 2012 Apr 20;287(17):13787-98.

Yang XY, Zhang MY, Zhou Q, Wu SY, Zhao Y, Gu WY, Pan J, Cen JN, Chen ZX, Guo WG, Chen CS. High expression of S100A8 gene is associated with drug resistance to etoposide and poor prognosis in acute myeloid leukemia through influencing the apoptosis pathway. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:4887.

Zahr AA, Salama ME, Carreau N, Tremblay D, Verstovsek S, Mesa R, Hoffman R, Mascarenhas J. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. 2016 Jun 1;101(6):660-71.

Zhang S, Wang G, Fernig DG, Rudland PS, Webb SE, Barraclough R, Martin-Fernandez M. Interaction of metastasis-inducing S100A4 protein in vivo by fluorescence lifetime imaging microscopy. *European Biophysics Journal*. 2005 Feb 1;34(1):19-27.

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jun 17;280(24):22788-92.

Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. 1988. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol* 72:510–515.

www.seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html

www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=13291&disease=Myeloproliferative-neoplasm&search=Disease_Search_Simple

Прилог – списак скраћеница

- ХМЛ – хронична мијелоидна леукемија
АМЛ – акутна мијелоидна леукемија
ДНК – деоксирибонуклеинска киселина
EDTA (енг. ethylenediaminetetraacetic acid) – етилендиамин-тетрасирћетна киселина
CALR – калретикулин
DAB – диаминобензидин
ЕТ (енг. essential thrombocythemia) – есенцијална тромбозитемија
ERK (енг. Extracellular Signal-Regulated Kinases) – киназа регулисана екстрацелуларним
сигналима
GM-CSF (енг. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) – фактор стимулације
колонија гранулоцита и макрофага
G-CSF (енг. Granulocyte colony stimulating factor) - фактор стимулације колонија
гранулоцита
IGF-1 (енг. Insulin-like Growth Factor 1) - инсулину сличан фактор раста
HRP (енг. Horse radish peroxidase) – пероксидаза рена
IFN- γ – интерферон γ
IL – интерлеукин
JAK - (енг. janus kinase) – солубилне нерецепторске тирозин киназе
LСM (енг. Lymphocyte Separation Medium) – лимфоцит сепарациони медијум;
лимфопреп
МАРК (енг. Mitogen Activated Protein Kinases) – митогеном активирани протеин киназе
NF κ B - нуклеарни фактор κ B
pNF κ B – фосфорилисани нуклеарни фактор κ B
CD (енг. Cluster of differentiation) – површински молекули на ћелијама
TLR4 (енг. Toll-like receptor) – рецептори слични Toll-у 4
RAGE (енг. receptor for advanced glycation endproducts) - рецептор за продукте
узнапредовале гликације
GPCR (енг. G-protein coupled receptor) - рецептори спрегнути са G-протеином
AP1 (енг. activator protein 1) - активаторски протеин 1
RyR (енг. Ryanodine receptor) - ријанодински рецептор
МПН (енг. myeloproliferative neoplasm) – мијелопролиферативне неоплазме
MPL - рецептор тромбопоетина
PI-3K (енг. phosphatidylinositol 3-kinase) - фосфатидилинозитол 3-киназа
PLC γ - (енг. Phospholipase C, gamma) – фосфолипаза Ц
ПМФ (енг. primary myelofibrosis) – примарна мијелофиброза
ПВ (енг. polycythemia vera) – полицитемија вера
РНК – рибонуклеинска киселина
WHO (енг. World health organization) - Светска здравствена организација
TNF (енг. tumor necrosis factor) - фактор некрозе тумора
IWG-MRT (енг. International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment) -
Међународна група за истраживање и третман мијелофиброзе
ТРО – тромбопоетин
ЕРО – еритропоетин
ТРОР – рецептор за тромбопоетин
GCSFR (енг. Granulocyte colony stimulating factor receptor) – рецептор фактора
стимулације колонија гранулоцита
NMR (енг. Nuclear magnetic resonance) – нуклеарна магнетна резонанција
PP5 (енг. Phosphoprotein phosphatase) – фосфопротеин фосфатаза 5
MetAP2 - метионил аминоксептидаза II
сАМР – циклични аденозин монофосфат

PLA2 (енг. Phospholipase A) – фосфолипаза A2
bHLH (енг. Basic helix-loop-helix) - секвенце за везивање базних хеликс-петља-хеликс транскрипционих фактора
MDSC (енг. Myeloid derived suppressor cells) - супресорске ћелије пореклом од мијелоидне лозе
t-PA (енг. Tissue plasminogen activator) - ткивни активатора плазминогена
EMT (енг. epithelial-mesenchymal transition) - епителијално-мезенхимална транзиција
ROS (енг. reactive oxygen species) - реактивне кисеоничне врсте
NO - азот моноксид
ICAM-1 (енг. Intercellular Adhesion Molecule) – унутарћелиски адхециони молекул 1
VCAM-1 (енг. vascular cell adhesion molecule) – васкуларни ћелијски адхециони молекул
FBS (енг. Fetal Bovine Serum) – фетални телећи серум
PBS (енг. Phosphate buffered saline) - фосфатом пуферисани физиолошки раствор
PAGE – електрофореза на полиакриламидном гелу
SDS – натријум додецилсулфат

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Милош Диклић рођен је 16.04.1981. године у Зајечару, где је завршио основну школу „Десанка Максимовић“ и зајечарску Гимназију (природно-математички смер) са одличним успехом. Дипломирао је на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Дипломирани биохемичар 10.02.2009. године са просеком 8,47. Уписао је докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, смер Молекуларна биологија, модул Молекуларна биологија еукариота школске 2011/2012 године и положио све испите са просечном оценом 9,67.

На Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду запослен је од фебруара 2011. као истраживач-приправник, прво у Научноистраживачкој групи за хематологију, а потом у Научноистраживачкој групи за молекуларну онкологију. На пројекту Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“ (2011-2019), који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја ангажован је од 2011. године. Поред тога, био је ангажован и на међународном пројекту „Determination of the mutational landscape and clonal architecture and its application in angiogenesis and thrombosis of MPN patients“ (2014-2016) који је финансирао Swiss National Science Foundation у сарадњи са Department of Biomedicine, University Hospital Basel, Швајцарска. Добитник је награде „Др Јован Вучо“ за најбољи научноистраживачки рад групе Института за медицинска истраживања за 2018. и 2019. годину. Члан је Биохемијског друштва Србије и Српског друштва истраживача рака.

У сарадњи са другим ауторима, до сада је објавио 34 библиографске јединице, од чега 4 рада у водећим часописима међународног значаја (M21), 3 рада у истакнутим часописима међународног значаја (M22), 7 радова у међународним часописима (M23), 15 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу (M34) и 3 саопштења са домаћих скупова штампаних у изводу (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милош Диклић

број индекса Б3006/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у JAK2 гену

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12. фебруар, 2020.

Милош Диклић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милош С. Диклић

Број индекса Б3006/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у JAK2 гену

Ментори Др Владан Чокић, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Др Гордана Матић, редовни професор у пензији, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани Милош С. Диклић

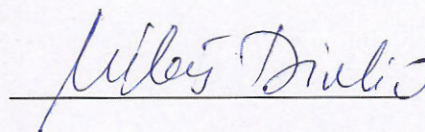
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 12. фебруар 2020



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа експресије фактора инфламације S100A4, S100A8/9, S100A12 у

мијелопролиферативним неоплазмама: веза са присуством мутације у

JAK2 гену

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

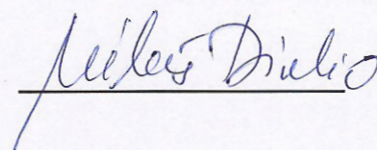
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12. фебруар, 2020



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.