

# Serumski kalprotektin u Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama

---

**Krečak, Filip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:865252>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Filip Krečak**

**SERUMSKI KALPROTEKTIN U PHILADELPHIA NEGATIVNIM  
MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZMAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2018./2019.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Maja Radman, dr. med.**

**Split, listopad 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Filip Krečak**

**SERUMSKI KALPROTEKTIN U PHILADELPHIA NEGATIVNIM  
MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZMAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2018./2019.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Maja Radman, dr. med.**

**Split, listopad 2019.**

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme.....	2
1.1.1	Esencijalna trombocitemija.....	5
1.1.2	Policitemija vera .....	6
1.1.3	Primarna mijelofibroza .....	7
1.2	Kalprotektin .....	10
1.2.1	Kalprotektin i akutna upala.....	10
1.2.2	Kalprotektin i citoskelet.....	10
1.2.3	Kalprotektin i endotelne stanice.....	10
1.2.4	Kalprotektin i autoimunost .....	11
1.2.5	Kalprotektin i tumori.....	11
1.2.6	Kalprotektin i kardiovaskularni rizik.....	11
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	12
3.	MATERIJALI I METODE .....	14
3.1	Ispitanici.....	15
3.2	Metode .....	15
3.3	Laboratorijske analize.....	16
3.4	Statistička obrada podataka.....	17
3.5	Etička načela .....	17
4.	REZULTATI.....	18
5.	RASPRAVA .....	26
6.	ZAKLJUČCI.....	30
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE .....	32
8.	SAŽETAK .....	39
9.	SUMMARY .....	41
10.	ŽIVOTOPIS.....	43

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Maji Radman, dr. med. na susretljivosti i stručnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala bratu Ivanu na pomoći pri statističkoj obradi podataka.*

*Zahvaljujem se roditeljima za potporu i strpljenje tijekom svih godina studiranja.*

## **1. UVOD**

## 1.1 Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme

Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme (MPN), esencijalna trombocitemija (ET), policitemija vera (PV) i mijelofibroza (PMF), su klonalne bolesti hematopoetske matične stanice koje karakterizira pretjerana proizvodnja granulocita, eritrocita ili megakariocita, česta splenomegalija, varijabilan stupanj fibroze koštane srži, kronično upalno zbivanje i značajan kardiovaskularni (KV) pobol (1,2). To su rijetke bolesti, uglavnom starijih ljudi, s medijanom pojavnosti između 5. i 7. desetljeća života, a incidencija se procjenjuje na 1-5/100 000 ljudi (3)

Osnovna karakteristika MPN jest konstitutivno aktivno JAK/Prijenosnik signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal transducer and activator of transcription, STAT*) stanično signaliziranje. Otkrivena su tri tipa stečenih i međusobno isključujućih aktivirajućih mutacija odgovornih za trajnu aktivaciju JAK-STAT signalnog puta. U oko 98% bolesnika s PV nalazi se mutacija V617F u genu za JAK2 (Janus Kinaza 2), kao i oko 50% bolesnika s ET i PMF (4-6). Dodatno se, kod oko 50% JAK2-V617F-negativnih bolesnika s ET i PMF, mogu naći mutacije u genu za kalretikulin (CALR) (7,8), a u oko 5% bolesnika mutacije u genu za trombopoetinski receptor (MPL) (9,10). Kod preostalih bolesnika (njih oko 5-10%) se ne može naći mutacija ("trostruko negativni" bolesnici).

Glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u MPN su KV komplikacije. Ni jedan oblik liječenja ne utječe na preživljenje ovih bolesnika, stoga je temeljni cilj liječenja spriječiti trombotske komplikacije. Dob viša od 60 godina i ranija tromboza su prepoznati kao glavni rizični čimbenici za buduću trombozu, a kod ET bolesnika, dodatan rizični čimbenik je i prisutnost JAK2-V617F mutacije (11). Načelno, bolesnike s JAK2-V617F mutacijom karakterizira snažna mijeloproliferacija, leukocitoza, eritrocitoza, sklonost trombozama, dok su nosioci CALR mutacija uglavnom mlađe životne dobi, s trombocitozom, nižim brojem leukocita i koncentracijom hemoglobina, nisu skloni trombozama, a češće imaju krvarenja (4-8).

Kronično upalno zbivanje jedna je od karakteristika MPN (12,13), a oboljeli u cirkulaciji imaju povišene razine različitih proupalnih citokina i faktora rasta, poput interleukina (IL)-1, IL-6, IL-8, faktora nekroze tumora-alfa (engl. *Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$* ), transformirajućeg faktora rasta-beta (engl. *Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$* ), vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor, VEGF*) i trombocitnog čimbenika rasta (engl. *Platelet-derived growth factor, PDGF*). Za pojedine

citokine pokazano je kako mogu utjecati na vrijednosti krvne slike, splenomegaliju i određene simptome bolesti, a jedan dio njih ima i negativan utjecaj na preživljenje (14-17). Štoviše, *in vitro* istraživanja su pokazala kako kronično upalno zbivanje, ponajprije TNF- $\alpha$ , „podržava“ klonalnu ekspanziju MPN (18), a uspješnost citoreduktivne terapije pri kontroli krvnih nalaza ne utječe simptome povezane s bolešću (19). Primjena ruxsolitiniba, selektivnog inhibitora JAK2-kinaza, smanjuje neregulirano JAK-STAT stanično signaliziranje, snižava vrijednosti proupalnih citokina u cirkulaciji, veličinu slezene, poboljšava simptome povezane s bolešću i kvalitetu života, uz naznake utjecaja i na ukupno preživljenje kod bolesnika s PMF (20,21). Slično, kod bolesnika s PV, primjena ruxsolitiniba smanjuje potrebu za venepunkcijama i veličinu slezene, dobro kontrolira hematokrit i simptome povezane s bolešću (22).

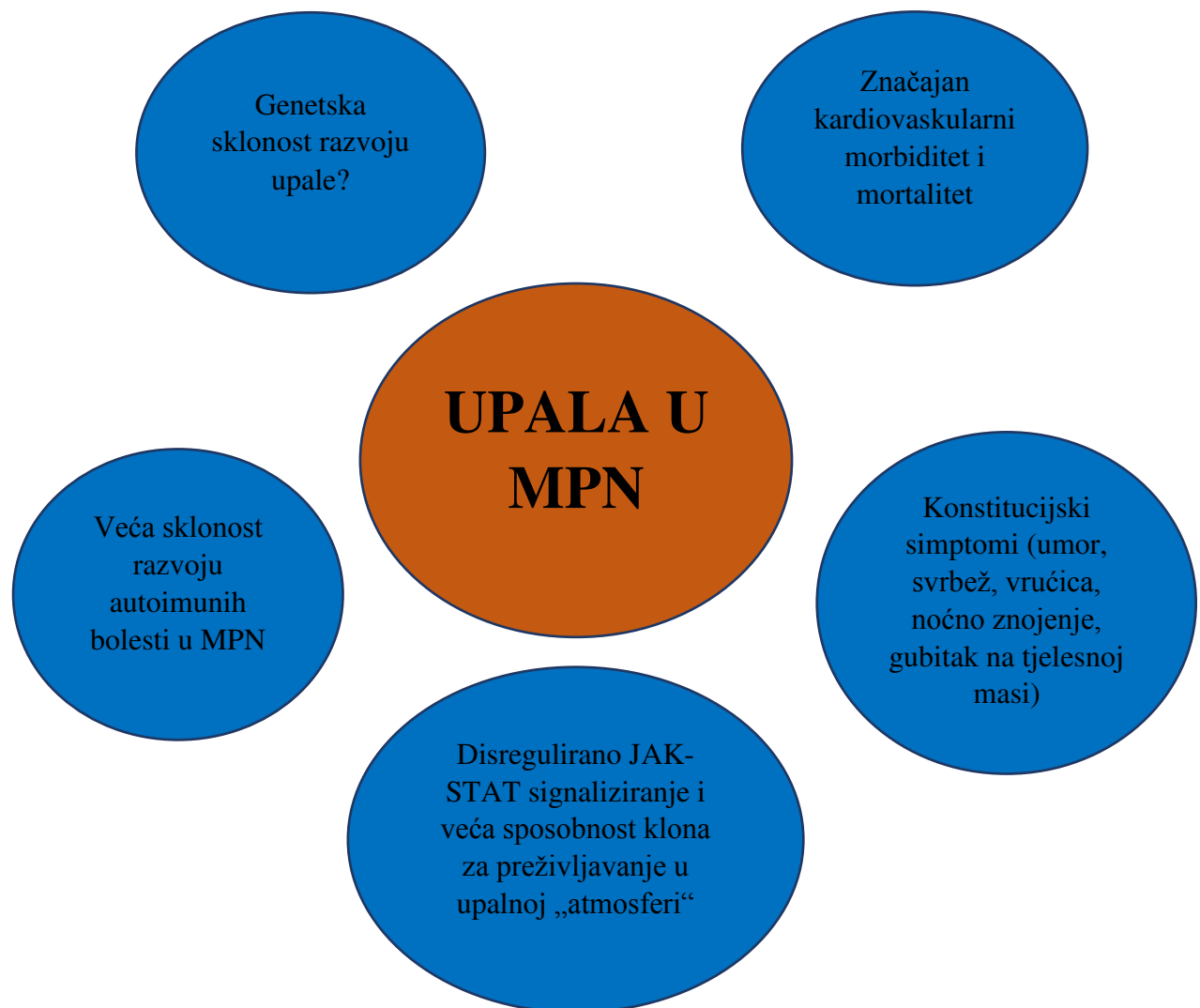
Kronično upalno zbivanje je, barem djelomično, odgovorno i za KV morbiditet i mortalitet bolesnika s MPN. Istraživanja su pokazala kako serumske koncentracije CRP-a, osjetljivog biljega upale, endotelne disfunkcije, oksidacije masnih čestica i stabilnosti aterosklerotskog plaka, u bolesnika s ET i PV koreliraju sa štetnim KV događajima i većim opterećenjem JAK2 alelom (23), a u bolesnika s PMF i s transformacijom u akutnu leukemiju (24). U ovom bi kontekstu konstitutivno JAK-STAT signaliziranje i prateće upalno zbivanje moglo utjecati i na „preuranjenu“ aterosklerozu i trombotske događaje u MPN, ali i na progresiju bolesti i sekundarnu leukemijsku transformaciju.

Nadalje, iako postoje određeni dokazi da bi osteoklasti u bolesnika s PMF mogli biti klonalni i funkcionalno oštećeni (25), još uvijek se smatra kako su kronično upalno zbivanje, „citokinska oluja“ (ponajprije cirkulirajućih VEGF, PDGF i IL-8) i vrlo složene interakcije između tumorskih stanica i mikrokoliša koštane srži (fibroblasta, osteoblasta i endotelnih stanica), odgovorni za pretjeranu ekspresiju signalnog puta TGF- $\beta$ , faktora rasta s centralnom ulogom u razvoju fibroze koštane srži u MPN (26,27).

Što se tiče upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases, IBD*), velika Švedska epidemiološka istraživanja su pokazala kako u bolesnika s MPN postoji povećan rizik od razvoja Crohnove bolesti. U tim istraživanjima su i druge autoimune bile statistički značajno povezane s rizikom od kasnijeg razvoja MPN, što nam indirektno ukazuju kako bi kronična imuna stimulacija mogla poslužiti kao jedan od „okidača“ MPN (28,29). Nadalje, pokazano je kako se haplotip 46/1 gena za JAK2, rizičnog čimbenika za razvoj MPN, često može naći i u kroničnim upalnim stanjima, uključujući Crohnovu bolest (30,31). Naposljetku,



slično MPN, inhibicija JAK-STAT signalnog puta pokazala se uspješnom i sigurnom i u liječenju refraktornih IBD (32). Slika 1. shematski prikazuje multifaktorijalnu etiologiju upale u MPN i njen utjecaj na značajnije simptome bolesti.



**Slika 1:** Multifaktorijalna patogeneza upale u mijeloproliferativnim neoplazmama i njen utjecaj na važnije simptome bolesti.

### 1.1.1 Esencijalna trombocitemija

Esencijalna trombocitemija (ET) se manifestira izrazitom megakariocitopoezom i posljedičnom trombocitozom. Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) za dijagnozu ET prikazani su u Tablici 1 (33). Kako je već rečeno, u oko 50% bolesnika se nalazi JAK2-V617F, u oko 15-25% CALR, a u oko 5% bolesnika mutacije MPL gena. Preostali bolesnici (njih oko 20%) su „trostruko-negativni“ (1). ET najrjeđe od svih MPN ima simptome povezane s bolešću, a glavne komplikacije predstavljaju tromboze, potom patološka krvarenja uzrokovana povišenim brojem trombocita ( $>1000\ 000/\mu\text{L}$ ) i stečenim nedostatkom von Willebrandova faktora. Ponekad se ET može transformirati u sekundarnu mijelofibrozu (SMF), a vrlo rijetko i u akutnu leukemiju (u oko 5% bolesnika). Glavne komplikacije ET su tromboze, potom patološka krvarenja uzrokovana povišenim brojem trombocita ( $>1000\times 1$ ) i stečenim nedostatkom von Willebrandova faktora, te transformacija u mijelofibrozu i akutnu leukemiju (u oko 5% bolesnika) (34). Citoredukcijsko liječenje (hidroksiureja) potrebno je samo u visokorizičnih bolesnika za razvoj tromboze (te bolesnike definira se kao one koji su već preboljeli trombozu i/ili su stariji od 60 godina i imaju JAK2-V617F mutaciju), a može se razmotriti i kod bolesnika s ekstremnom trombocitozom (11). Kod bolesnika koji ne toleriraju hidroksiureju ili su refraktorni na liječenje, u obzir dolazi primjena anagrelida (35,36), lijeka koji inhibiranjem fosfodiesteraze sprječava sazrijevanje trombocita iz megakariocita, te različitih oblika interferona alfa (37,38), dok se ruksolitinib kod ovih bolesnika nije pokazao boljim od drugih dostupnih lijekova (39).

**Tablica 1:** Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozu esencijalne trombocitemije (33).

<b>Dijagnoza zahtijeva sva četiri velika ili tri velika i jedan mali kriterij</b>
<b>Veliki kriteriji</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Povišen broj trombocita <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li><li>2. Biopstat koštane srži pokazuje uglavnom proliferaciju megakariocita s umnoženim brojem uvećanih, zrelih i hiperlobuliranih megakariocita. Nema značajnijeg umnažanja granulopoeze ili eritropoeze i vrlo rijetko je prisutna retikulinska fibroza</li><li>3. Ne zadovoljava kriterije za policitemiju veru, primarnu mijelofibrozu, BCR-ABL1 pozitivnu kroničnu mijeloičnu leukemiju, mijelodisplastični sindrom ili drugu mijeloidnu neoplazmu</li><li>4. Prisutnost JAK2-V617F, CALR ili MPL mutacije</li></ol>
<b>Mali kriterij</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Prisutnost drugog klonalnog markera, ili u odsutnosti istog, bez dokaza za reaktivnu trombocitozu</li></ol>

### 1.1.2 Policitemija vera

Policitemiju veru (PV) se najčešće prepoznaje pretjeranom produkcijom eritrocita, a može se naći i umjerena leukocitoza i trombocitoza. U usporedbi s ET, ovi bolesnici češće imaju simptome bolesti, ponajprije glavobolju, vrtoglavicu, pojačano znojenje, akvageni svrbež, a lako se primjećuje crvenilo kože i sluznica (pletora). Rjeđe prvi znak bolesti može biti tromboza, najčešće u središnjem živčanom sustavu. Gotovo su svi bolesnici s PV (njih oko 98%) nosioci JAK2-V617F mutacije (1). Dodatno, autonoman rast eritrocita negativnom povratnom spregom uzrokuje sniženu serumsku koncentraciju eritropoetina što se može naći u oko 85% bolesnika (40). Kriteriji SZO za dijagnozu PV prikazani su u Tablici 2 (33). Slično ET, liječenje bolesnika s PV temeljeno je na spriječavanju trombotskih komplikacija. Dob viša od 60 godina i ranija tromboza prepoznati su kao dva najvažnija rizična čimbenika za razvoj novog trombotskog događaja, stoga prisutnost bilo kojeg od tih čimbenika identificira visokorizične bolesnike koje treba liječiti hidroksiurejom. Neovisno o stupnju rizika, svim bolesnicima s PV treba raditi venepunkcije s ciljem održavanja hematokrita < 45%, te malih doza acetilsalicilne kiseline (11). Kod bolesnika refraktornih ili intolerantnih

na hidroksiureju, primjena ruksolitiniba može smanjiti potrebu za venepunkcijama, veličinu slezene i simptome povezane s bolešću (22). Druge opcije liječenja uključuju primjenu interferona alfa-2a (37), a u novije vrijeme, i njegovih pegiliranih („dugodjelujućih“) oblika (41).

**Tablica 2:** Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozu policitemije vere (33).

<b>Dijagnoza zahtijeva prisutnost tri velika ili prva dva velika i jedan mali kriterij**</b>
<p><b>Veliki kriteriji</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemoglobin &gt; 165 g/L u muškaraca, 160 g/L u žena, ili Htc &gt; 49% u muškaraca, 48% u žena, ili povećana masa eritrocita*</li> <li>2. Biopat kostane srži pokazuje hipercelularnost za dob s trilinijskom proliferacijom (panmijelozom) i prominentnom eritroidnom, granulocitnom i megakariocitnom proliferacijom s pleomorfnim, zrelim megakariocitima (različiti u veličini)</li> <li>3. Prisutnost JAK2-V617F ili mutacije u egzonu 12 gena za JAK2</li> </ol> <p><b>Mali kriterij</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Subnormalna razina serumskog eritropoetina</li> </ol>
<p>* masa eritrocita &gt;25% od srednje predviđene vrijednosti</p> <p>**Biopsija kosti nije potrebna ako postoji trajna eritrocitoza; hemoglobin &gt; 185 g/L u muškaraca (hematokrit, 55%) ili 165 g/L u žena (hematokrit, 49.5%, ako su zadovoljeni treći veliki i mali kriterij</p>

### 1.1.3 Primarna mijelofibroza

Primarna mijelofibroza (PMF) je najrjeđa MPN i pokazuje najagresivniji klinički tijek s medijanom preživljenja od 5-6 godina, a karakterizirana je varijabilnim stupnjem fibroze koštane srži, ekstramedularnom hematopoezom s posljedičnom hepatosplenomegalijom, izrazitim konstitucijskim simptomima, leukoeritroblastozom, anemijom, kaheksijom i čestom transformacijom u akutnu leukemiju. Mutacije JAK2-V617F, CALR ili MPL gena nalaze se u oko 90% bolesnika (2). Stupanj fibroze koštane srži utječe na preživljenje bolesnika (42), a gradira se prema trenutno važećem Europskom konsenzusu (43) (Tablica 3.). Često se ET i PV tijekom vremena mogu transformirati u sekundarnu mijelofibrozu (SMF), pa je ponekad

teško, ako nije postojao podatak o ranijem MPN, reći radi li se o SMF ili PMF. Klinički ishodi PMF i SMF, uključujući preživljavanje, su identični (2). Dijagnostički kriteriji PMF prikazani su u Tablici 4.

Jedini modalitet liječenja kojim se može poboljšati preživljenje i izliječenje bolesnika s PMF jest alogena transplantacija krvotvornim matičnim stanicama. Nasuprot tome, svi trenutno dostupni lijekovi, uključujući ruxsolutinib, imaju uglavnom palijativnu ulogu i nisu pokazali da mogu značajno promijeniti tijek bolesti, smanjiti fibrozu koštane srži ili dovesti do remisije bolesti, ali zato mogu olakšati simptome povezane s bolešću i smanjiti veličinu slezene. Koriste se hidroksiureja, androgeni, prednizon, talidomid, lenalidomid, s varijabilnim učincima (2,11).

**Tablica 3:** Trenutno važeći Europski konsenzus o stupnjevanju fibroze koštane srži (43).

<b>Stupanj 0</b>	Linearna i raštrkana vlakna retikulina bez presijecanja što odgovara normalnoj koštanoj srži
<b>Stupanj 1</b>	Labava mreža retikulinskih vlakana s mnogo presijecanja, pogotovo u perivaskularnim područjima
<b>Stupanj 2</b>	Difuzna i gusta mreža retikulinskih vlakana s opsežnim presijecanjima uz povremene fokalne nakupine kolagena ili fokalnu osteosklerozu
<b>Stupanj 3</b>	Difuzna i gusta retikulinska mreža s opsežnim presijecanjima uz grube depozite kolagena i često udružena s znatnom osteosklerozom

**Tablica 4:** Kriteriji Svjetske zdravstvene organizacije za dijagnozu primarne mijelofibroze (33).

<b>Dijagnoza zahtijeva sva tri velika kriterija i barem jedan mali kriterij</b>
<p><b>Veliki kriteriji</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Prisutnost megakariocitne proliferacije i atipije, praćene retikulinskom i/ili kolagenom fibrozom stupnja 2 ili 3</li><li>2. Ne zadovoljava kriterije za esencijalnu trombocitemiju, policitemiju veru, BCR-ABL1 pozitivnu kroničnu mijeloičnu leukemiju, mijelodisplastični sindrom ili drugu mijeloidnu neoplazmu</li><li>3. Prisutnost JAK2-V617F, CALR ili MPL mutacije, ili u odsutnosti istih, drugog klonalnog markera*, ili bez dokaza reaktivne fibroze**</li></ol>
<p><b>Mali kriteriji</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Anemija koja nije uzrokovana drugim komorbidnim stanjem</li><li>2. Leukocitoza <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li><li>3. Palpabilna splenomegalija</li><li>4. Povišen LDH</li><li>5. Leukoeritroblastoza</li></ol>
<p>* <i>npr. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B.</i></p> <p>**<i>Fibroza KS uzrokovana autoimunom bolešću ili drugim upalnim bolestima, leukemijom vlasastih stanica ili drugom limfoproliferativnom bolešću, metastaskim karcinomom ili toksičnom mijelopatijom</i></p>

## 1.2 Kalprotektin

### 1.2.1 Kalprotektin i akutna upala

Kalprotektin je kalcij i zink vezujući heterodimer S100A8/S100A9 koji ima važnu ulogu u započinjanju i poticanju upale (44). Kalprotektin je agonist endogenih Toll – like receptora 4 (engl. *Toll-like Receptors, TLR*), veže se i na RAGE receptore (engl. *Receptor for advanced glycation end products*) izazivajući kaskadu koja regulira upalu, staničnu proliferaciju i diferencijaciju putem nuklearnog faktora kapa B (engl. *Nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B*). Kalprotektin se u najvećoj koncentraciji nalazi u granulocitima (sačinjava 30 - 60% citosolskih bjelančevina), a u manjoj koncentraciji u monocitima, keratinocitima, mišićnom tkivu i tkivnim makrofagima. Jednom stimulirani, granulociti i monociti izlučuju kalprotektin u ekstracelularni prostor, gdje kalprotektin djeluje mikrobiostatski u akutnoj upali (primarno na gljivice i bakterije) (44-46).

### 1.2.2 Kalprotektin i citoskelet

Kalprotektin se veže za mikrotubule, vimentin, keratinske i aktinske filamente. U prisutnosti kalcija, kalprotektin stimulira tubulinsku polimerizaciju i agregaciju mikrotubula, rezultirajući stabilizacijom tubulinskih filamenata. Interakcija kalprotektina sa mikrotubulima regulirano je MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinase*) signalnim putevima ovisnim o kalciju koji su kritični za migraciju granulocita. „Knockout“ miševi s disfunkcionalnim kalprotektinom (S100A9<sup>-/-</sup>) nemaju sposobnost migracije granulocita s posljedičnim otežanim cijeljenjem rane (44-46).

### 1.2.3 Kalprotektin i endotelne stanice

Kalprotektin se veže na endotelne stanice mehanizmima koji uključuju heparan-sulfat proteoglikane i karboksilirane glikane. U endotelnim stanicama kalprotektin inducira upalni i trombotski odgovor stimulirajući nastanak proupalnih citokina i adhezijskih molekula, čime dovodi do gubitka međustaničnih veza i povećane propusnosti endotela. Zbog uloge u novačenju leukocita, kalprotektin se smatra i DAMP molekulom (engl. *Damage-associated molecular patterns*), koje djeluju kao endogeni signal opasnosti u odsutnosti infekcije i patoloških agensa. Nadalje, kalprotektin utječe i na ekspresiju gena vezanih za apoptozu. Djeluje inhibitorno na antiapoptotske gene, a inducira potentne proupalne gene, poput p53,

bak i bax, te put kaspaze 3 i 9, čime djeluje kao začetnik i poticatelj upalnog odgovora (44-46).

#### **1.2.4 Kalprotektin i autoimunost**

Tijekom intestinalne upale, fekalni kalprotektin otpuštaju intestinalni granulociti, a njegova povišena koncentracija u stolici pomaže u diferenciranju crijevne upale od funkcionalnih poremećaja. U svakodnevnoj kliničkoj praksi, serijska mjerenja fekalnog kalprotektina se koriste za praćenje aktivnosti IBD, ali i za određivanje odgovora na liječenje, te za predviđanje relapsa (47). Isto tako, istraživanja su pokazala kako i serumski kalprotektin u bolesnika s IBD može dobro predvidjeti upalnu opterećenost i ishod bolesti (48).

Povišene razine serumskog kalprotektina opisane su i u serumu i sinoviji bolesnika s reumatoidnim artritismom (RA) i juvenilnim idiopatskim artritismom. Serumske razine kalprotektina u tih bolesnika dobro koreliraju sa aktivnošću bolesti i stupnjom destrukcije zgloba. Slično, u životinjskim modelima artritisa, „knockout“ miševi bez funkcionalnog kalprotektina (S100A9-/-) pokazali su značajno smanjeno oticanje zglobova, te smanjenu leukocitnu infiltraciju (49-50).

#### **1.2.5 Kalprotektin i tumori**

Osim važne uloge u upalnom odgovoru, povišene razine serumskog kalprotektina opisane su i u bolesnika s raznim solidnim tumorima, gdje je moguće da djeluje kao promotor tumorskog rasta (45,46). *In vitro* istraživanja su pokazala da se kalprotektin veže za tumorske stanice kolona, aktivira NF- $\kappa$ B, te inducira staničnu proliferaciju i potiče karcinogenezu (51). Slično, bolesnici s tumorima pluća imaju povišene razine kalprotektina koje koreliraju s lošijim preživljenjem (52-54). Nadalje, čini se da kalprotektin porijeklom iz plućnih makrofaga stimulira stvaranje metastatskih nakupina u plućima (55,56). Naposljetku, tumorski modeli na S100A9 -/- miševima pokazuju smanjeni rast limfoma, ali i sarkoma (57).

#### **1.2.6 Kalprotektin i kardiovaskularni rizik**

Kalprotektin je prepoznat i kao neovisni čimbenik rizika za KV događaje u zdravih osoba. Više serumske koncentracije kalprotektina mogu razlikovati nestabilnih od stabilnih koronarnih arterijskih plakova i infarkta miokarda u akutnom koronarnom sindromu (58).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

**Opći cilj** ovog istraživanja je analizirati serumsku koncentraciju kalprotektina u MPN i njegovu povezanost s kliničkim značajkama bolesti.

### **Specifični ciljevi**

1. Analizirati serumsku koncentraciju kalprotektina u bolesnika s MPN i u zdravih kontrola,
2. Analizirati sposobnost serumske koncentracije kalprotektina kao novog cirkulirajućeg dijagnostičkog biljega u MPN,
3. Analizirati serumsku koncentraciju kalprotektina u odnosu na JAK2-V617F i KALRETIKULIN mutacijski status,
4. Analizirati serumsku koncentraciju kalprotektina u bolesnika s MPN u odnosu na:
  - apsolutni broj leukocita, granulocita, eritrocita i trombocita, vrijednost hematokrita i koncentraciju hemoglobina,
  - serumski C-reaktivni protein (CRP) i serumsku laktat dehidrogenazu (LDH)
  - prisutnost palpabilne splenomegalije,
  - stupanj fibroze koštane srži,
  - konstitucijske simptome,
  - performans status bolesnika,
  - kardiovaskularne rizične čimbenike.

### **HIPOTEZA**

Budući da dosadašnje spoznaje ukazuju na važnu ulogu kronične upale u patogenezi MPN, hipoteza je kako su cirkulirajuće (serumske) koncentracije kalprotektina, dokazanog biljega sistemske upale, remodeliranja tkiva, ateroskleroze i progresije zloćudnih bolesti, više u bolesnika s MPN u odnosu na zdrave dobrovoljce.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1 Ispitanici**

U istraživanje su uključeni bolesnici kojima je postavljena dijagnoza ET, PV i PMF prema kriterijima SZO iz 2016 (33). Istraživanje je provedeno na Odjelu za internu medicinu Opće bolnice Šibensko-kninske županije. Kao kontrolnu grupu koristili smo dobrovoljne darivatelje krvi. Iz istraživanja smo isključili bolesnike mlađe od 18 godina, trudnice, te bolesnike s akutnim infekcijama, autoimunim i drugim zloćudnim bolestima.

### **3.2 Metode**

Ovo unicentrično istraživanje je dizajnirano kao istraživanje parova (engl. *case-control study*). U trenutku uključivanja u istraživanje bilježeni su podaci o vrsti bolesti, dobi, spolu, duljini trajanja bolesti, JAK2-V617F i CALR mutacijskom statusu, prisutnosti palpabilne splenomegalije, kliničkom performans stadiju mjenom prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG*) (59) (Tablica 5.), konstitucijskim simptomima (umor, vrućica  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ , noćno znojenje, gubitak na tjelesnoj masi  $>10\%$  u proteklih šest mjeseci), kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija), ranije preboljeloj trombozi (arterijskoj ili venskoj), te citoreduktivnom liječenju (hidroksiureja). Stupanj fibroze koštane srži gradiran je prema trenutno važećem Europskom konsenzusu (43).

**Tablica 5:** Klinički performans status prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG*) (59).

<b>Stupanj 0</b>	Asimptomatski (potpuno aktivan, sposoban obavljati bez ikakvih poteškoća sve aktivnosti kojima se bavio i prije bolesti)
<b>Stupanj 1</b>	Simptomatski, ali potpuno ambulatorni pacijent (ograničen u napornim fizičkim aktivnostima, ali sposoban nastaviti posao koji je sjedilački i nije pretjerano zahtjevan kao što su lagani kućanski poslovi ili uredski posao)
<b>Stupanj 2</b>	Simptomatski, < 50% vremena tijekom dana provodi u krevetu ( ambulatorni pacijent koji je sposoban sam se brinuti za sebe, ali je nesposoban izvršavati bilo kakve radne aktivnosti; nije vezan za krevet i >50% vremena koje provodi budan nije ograničen na krevet ili stolac)
<b>Stupanj 3</b>	Simptomatski, >50% vremena provodi u krevetu, ali nije vezan za krevet (sposoban ograničeno brinuti se za sebe, ograničen na krevet ili stolac 50% ili više vremena koje provodi budan)
<b>Stupanj 4</b>	Vezan za krevet (potpuno onemogućen, uopće se ne može brinuti o sebi, u potpunosti ograničen na krevet ili stolac)
<b>Stupanj 5</b>	Mrtav

### 3.3 Laboratorijske analize

Puna krv za određivanje serumskog kalprotektina, kompletne krvne slike, serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i CRP-a uzeta je bolesnicima na dan uključivanja u istraživanje. Centrifugirajući uzorke krvi (3500 okretaja u minuti, ukupno 10 minuta), serum je odvojen od staničnih elemenata. Sve uzorke seruma pohranili smo na -80°C do vremena laboratorijskih analiza.

Serumska koncentracija kalprotektina određena je komercijalno dostupnim kvantitativnim imunoenzimskim testom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) (Bühlmann Laboratories AG®, Schönenbuch, Switzerland). Princip određivanja temelji se na dodavanju uzoraka seruma u mikrotitarsku pločicu koja je prethodno obložena specifičnim antitijelima usmjerenim na kalprotektin, a koncentracija analita određuje se mjerenjem apsorpcije produkta enzimske reakcije, nakon dodavanja poliklonskog antitijela specifičnog za kalprotektina konjugiranog sa enzimom i enzimskog supstrata. Serumska koncentracija kalprotektina izražena je u mikrogramima po mililitru (µg/mL).

### **3.4 Statistička obrada podataka**

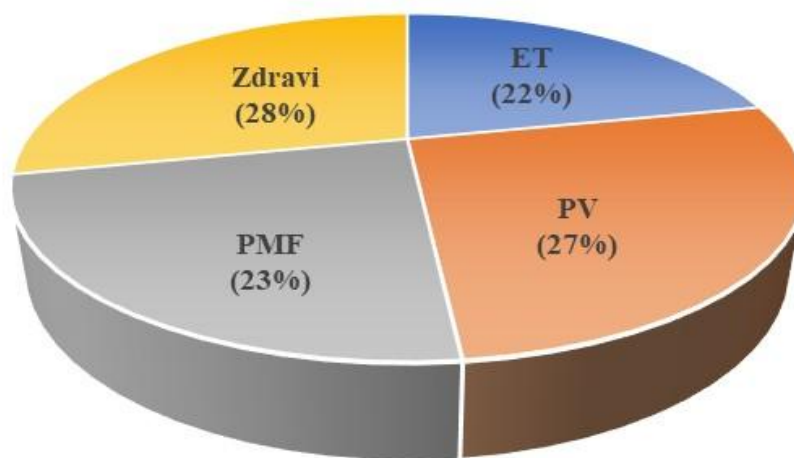
Statističke analize provedene su koristeći licencirani komercijalni statistički program MedCalc Statistical Software® (verzija 19.0.3., Ostend, Belgija). Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički parametri nisu bili normalno distribuirani stoga su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (IQR, prema eng. interquartile range). Kategorijske varijable prikazane su kao broj i postotak. Kategorijske varijable uspoređene su pomoću  $\chi^2$  testa, a numeričke pomoću Mann-Whitney U i Kruskal-Wallis testova. Analiza krivulje svojstva funkcioniranja prijemnika (ROC, prema eng. Receiver Operating Characteristic Curve analysis) korištena je za testiranje osjetljivosti i specifičnosti serumskog kalprotektina i CRP-a kao dijagnostičkih biljega MPN. Spearmanova rank korelacija korištena je za usporedbu vrijednosti serumskog kalprotektina i različitih laboratorijskih varijabli. P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su značajnima u svim analizama.

### **3.5 Etička načela**

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i odobreno od strane Etičkog povjerenstva Opće bolnice Šibensko-kninske županije. Svi sudionici su potpisali informirani pristanak.

#### **4. REZULTATI**

U istraživanje su uključena 43 novodijagnosticirana bolesnika s MPN (13 s ET, 16 s PV i 14 s PMF) i 17 zdravih kontrola. Karakteristike bolesnika prikazane su u Tablici 6., a prikaz udjela pojedinih ispitanika na Slici 2. Medijan dobi zdravih kontrola bio je 67 godina (raspon 60-70), a 10 ih je bilo muškog spola (59%). Nije bilo razlike u dobi i spolu između bolesnika i kontrola ( $p \geq 0,050$  za obje analize).



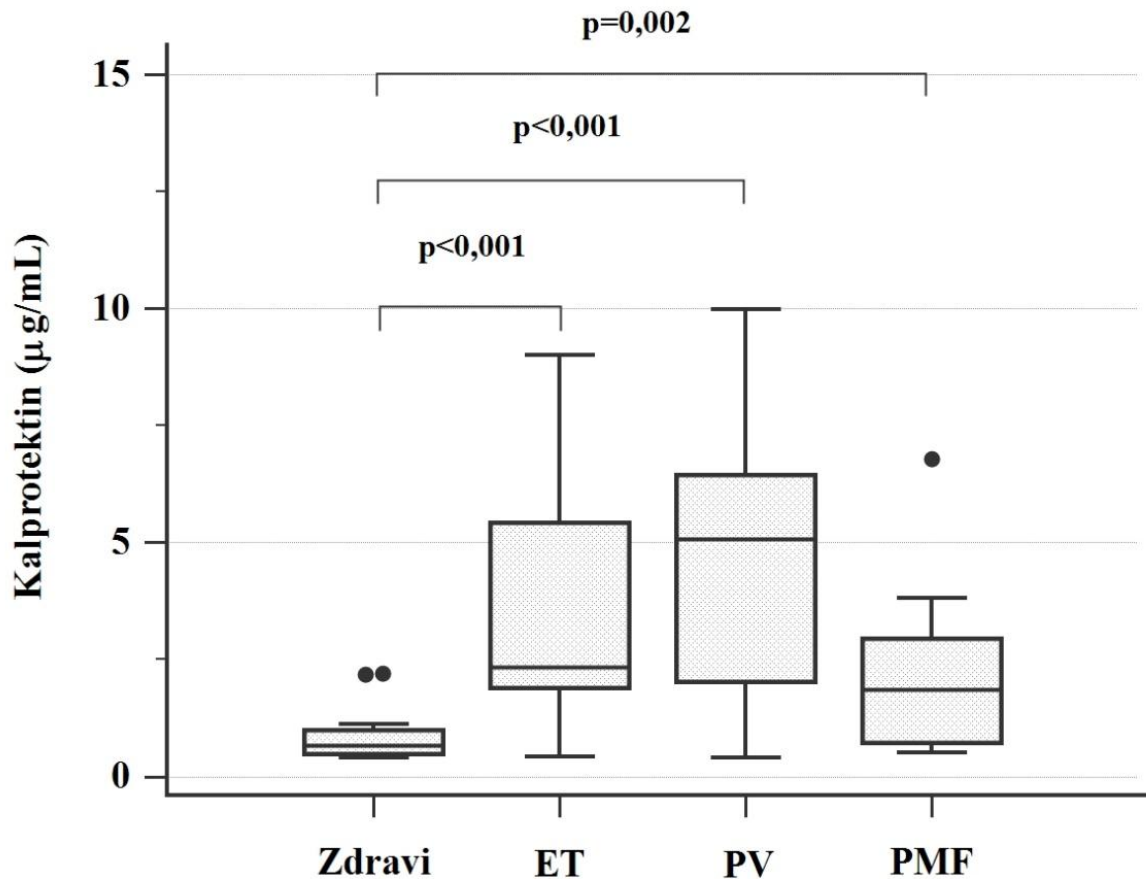
**Slika 5:** Prikaz udjela pojedinih ispitanika. Zdravi – dobrovoljni darivatelji krvi, ET – esencijalna trombocitemija, PV – policitemija vera, PMF – primarna mijelofibroza.



**Tablica 6:** Karakteristike bolesnika.

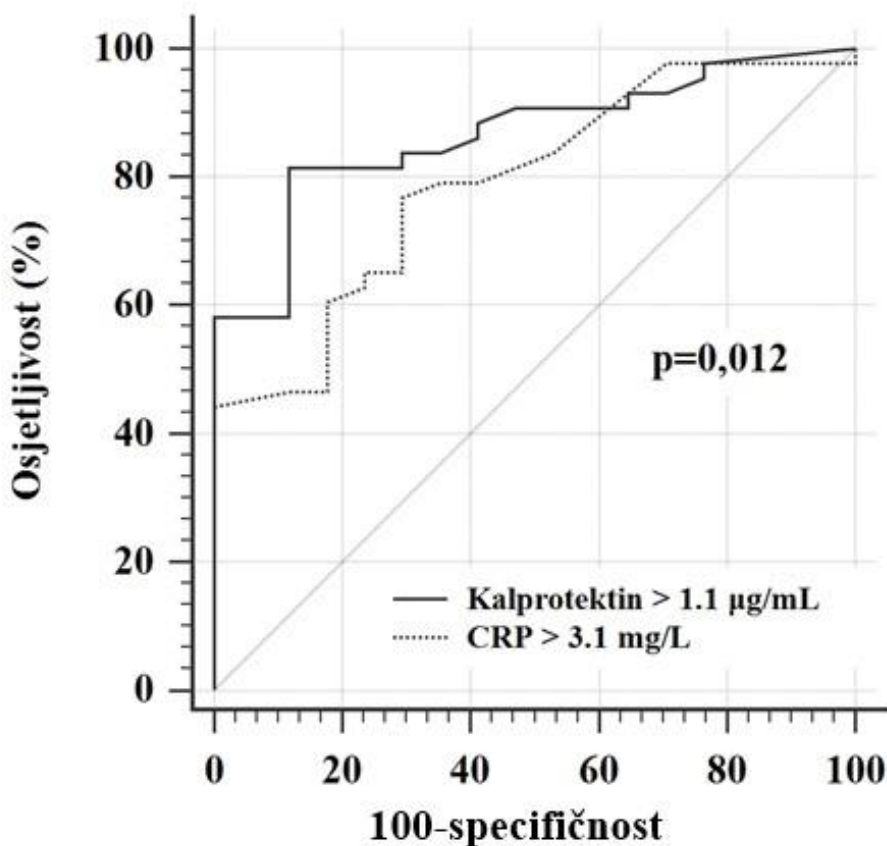
<b>BROJ BOLESNIKA</b>	43
<b>SPOL</b>	
Ženski	23 (53%)
Muški	20 (47%)
<b>Dob (godine)</b>	72 IQR (37-94)
<b>BOLEST</b>	
ET	13 (30%)
PV	16 (37%)
PMF	14 (33%)
<b>MUTACIJSKI STATUS</b>	
JAK2-V617F	37 (86%)
CALR	6 (14%)
<b>STUPANJ FIBROZE KOŠTANE SRŽI</b>	
MF-0	14 (33%)
MF-1	15 (35%)
MF-2	3 (7%)
MF-3	11 (25%)
<b>Leukociti (x10<sup>9</sup>/L)</b>	9 IQR (3,20-55,3)
<b>Granulociti (x10<sup>9</sup>/L)</b>	5,9 IQR (1,11-35,7)
<b>Eritrociti (x10<sup>12</sup>/L)</b>	4,39 IQR (2,17-6,80)
<b>Hemoglobin (g/L)</b>	129 IQR (69-196)
<b>Hematokrit (%)</b>	0,42 IQR (0,21-0,63)
<b>Trombociti (x10<sup>9</sup>/L)</b>	387 IQR (24-1509)
<b>CRP (mg/L)</b>	2,6 IQR (0,21-13)
<b>LDH (IU/L)</b>	277 IQR (132-1925)
<b>Palpabilna splenomegalija ne/da</b>	21 (49%) / 22 (51%)
<b>ECOG performans status (0/1/2/3/4)</b>	12 (28%) / 21 (49%) / 5 (11%) / 4 (9%) / 1 (3%)
<b>Konstitucijski simptomi, ne/da</b>	28 (65%) / 15 (35%)
<b>Ranija tromboza, ne/da</b>	30 (70%) / 13 (30%)
<b>Hidroksiureja, ne/da</b>	11 (26%) / 32 (74%)
<i>IQR=interkvartilni raspon (prema eng. interquartile range), ET=esencijalna trombocitemija, PV=policitemija vera, PMF=primarna fibroza JAK2=Janus Kinaza 2, CALR=kalretikulin, CRP=serumski C-reaktivni protein, LDH= serumska laktat dehidrogenaza, IU/L=internacionalna jedinica po litri (prema eng. international units per liter), ECOG= performans status prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (prema eng. Eastern Cooperative Oncology Group)</i>	

Sva su tri MPN entiteta [ET (medijan 2,32  $\mu\text{g/mL}$ , raspon 0,42-9,00), PV (medijan 5,05  $\mu\text{g/mL}$ , raspon 0,40-9,98) i PMF (1,92  $\mu\text{g/mL}$ , raspon 0,50-23,19)] imali više serumske koncentracije kalprotektina u usporedbi sa zdravim kontrolama (medijan 0,65  $\mu\text{g/mL}$ , raspon 0,40-2,19; ukupni  $p < 0,001$ ) (Slika 3). Nije bilo statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji kalprotektina između bolesnika s ET, PV i PMF ( $p = 0,220$ ).



**Slika 6:** Kutijasti dijagram (engl. „*box plot*“) serumske koncentracije kalprotektina u zdravim kontrola i bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama. Kutije predstavljaju interkvartilni raspon, a horizontalne linije unutar kutija medijane serumskih koncentracija kalprotektina. Točke označavaju netipične vrijednosti serumske koncentracije kalprotektina.

Potom smo ROC krivuljom testirali osjetljivost i specifičnost serumske koncentracije kalprotektina i CRP-a za detekciju bolesnika s MPN. Površina ispod ROC krivulje za serumski kalprotektin je bila 0,867 (STD±0,047, 95% CI 0,775-0,958,  $p < 0,001$ ), a za CRP 0,763 (STD±0,062, 95% CI 0,636-0,864,  $p < 0,001$ ). Prema ROC krivulji, serumska koncentracija kalprotektina  $> 1,1 \mu\text{g/mL}$  je imala osjetljivost od 81,4% i specifičnost od 88,2% za detekciju bolesnika s MPN. Kada smo usporedili dvije krivulje, serumska koncentracija kalprotektina je imala bolju osjetljivost i specifičnost za detekciju bolesnika s MPN u odnosu na CRP ( $p = 0,012$ ) (Slika 4).



**Slika 7:** Odnos osjetljivosti i specifičnosti serumske koncentracije kalprotektina i serumskog CRP-a za dijagnozu bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama.

Viša serumska koncentracija kalprotektina je korelirala sa starijom životnom dobi (>60 godina;  $p=0,007$ ), JAK2-V617F mutacijom ( $p=0,011$ ), CRP-om ( $\rho=0,672$ ,  $p<0,001$ ) (Slika 5), konstitucijskim simptomima ( $p=0,006$ ), lošijim performans statusom (ECOG  $\geq 2-4$ ;  $p<0,001$ ), KV rizičnim čimbenicima ( $p=0,005$ ) i potrebom za hidroksiurejom ( $p=0,004$ ). Nakon što smo iz analiza isključili bolesnike s PMF, MPN entitet opterećen najvišim upalnim zbivanjem, ove su asocijacije i dalje bile značajne ( $p<0,005$  za sve analize). Serumska koncentracija kalprotektina nije korelirala sa spolom, apsolutnim brojem leukocita, granulocita, eritrocita i trombocita, vrijednošću hematokrita, koncentracijom hemoglobina i LDH, preboljelom trombozom ili prisutnošću palpabilne splenomegalije,

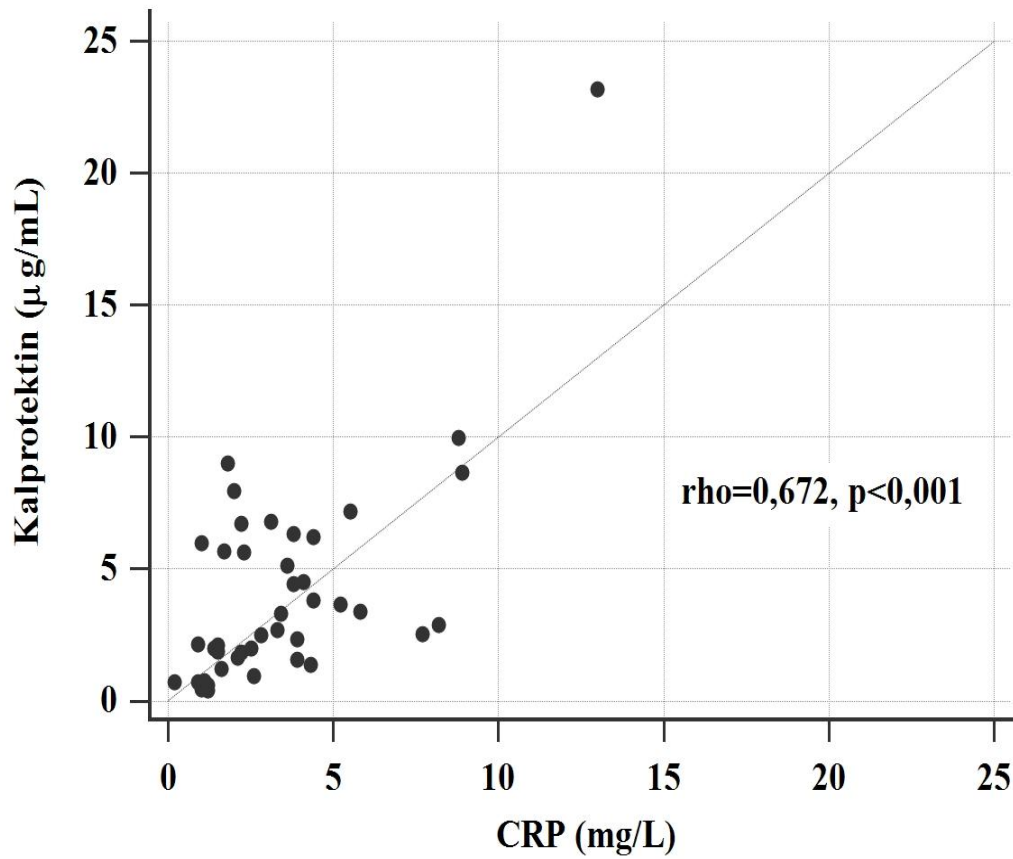
Potom smo analizirali karakteristike bolesnika koju su imali serumsku koncentraciju kalprotektina jednaku kontrolama (tu smo koncentraciju definirali kao onu dobivenu ROC krivuljom, tj.  $\leq 1,11 \mu\text{g/mL}$ ). Ovim smo pristupom identificirali osam bolesnika (1 s ET, 3 s PV i 4 s PMF). Medijan dobi ovih bolesnika bio je 72 godine (raspon 43-80), a troje ih je bilo muškog spola. Pet ih je imalo JAK-V617F, a preostalo troje CALR mutaciju. Nije bilo razlike između ovih bolesnika naspram onih s višim serumskim koncentracijama kalprotektina ( $>1,11 \mu\text{g/mL}$ ) u odnosu na dob, spol, mutacijski i performans status ili potrebu za hidroksiurejom. Ipak, ni jedan bolesnik s niskom koncentracijom kalprotektina nije imao konstitucijske simptome ili raniju trombozu ( $p<0,050$  za obje analize),

Iako nije bilo razlike u serumskoj koncentraciji kalprotektina između ET, PV i bolesnika s PMF, dodatno smo analizirali postoji li razlika u serumskoj koncentraciji kalprotektina između bolesnika bez fibroze koštane srži (MF-0), u odnosu na one s fibrozom koštane srži (MF-1-3). Četrnaest bolesnika (9 s ET i 4 s PV) nije imalo znakova fibroze koštane srži (Tablica 6.). Ovi su bolesnici imali nižu koncentraciju kalprotektina u odnosu na one koji su imali fibrozu koštane srži ( $p=0,024$ ). Slično, više serumske koncentracije kalprotektina zabilježene su u bolesnika s ET i PV koji su imali retikulinsku fibrozu koštane srži (MF-1) u odnosu na one koji ju nisu imali ( $p<0,001$ ). Korelacije serumske koncentracije kalprotektina s kliničkim značajkama bolesnika s MPN sumarno su prikazane u Tablici 7.

**Tablica 7:** Korelacije serumskih koncentracija kalprotektina s kliničkim značajkama bolesnika s MPN.

Varijabla	Kalprotektin > 1.11 µg/mL	Kalprotektin ≤ 1.11 µg/mL
Dob	<i>p=0,007</i>	n.z.
Spol	n.z.	n.z.
JAK2-V617F	<i>p=0,011</i>	n.z.
Fibroza koštane srži	<i>p=0,024</i>	n.z.
Palpabilna splenomegalija	n.z.	n.z.
Konstitucijski simptomi	<i>p=0,006</i>	<i>p&lt;0,001</i>
ECOG performans status 2-4	<i>p&lt;0,001</i>	n.z.
Ranija tromboza	n.z.	<i>p&lt;0,001</i>
KV rizični čimbenici	<i>p=0,005</i>	n.z.
Hidroksiureja	<i>p=0,004</i>	n.z.
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	n.z.	n.z.
Granulociti (x10 <sup>9</sup> /L)	n.z.	n.z.
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	n.z.	n.z.
Hemoglobin (g/L)	n.z.	n.z.
Hematokrit (%)	n.z.	n.z.
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	n.z.	n.z.
CRP (mg/L)	<i>p&lt;0,001</i>	n.z.
LDH (IU/L)	n.z.	n.z.

*ECOG= Klinički performans status prema kriterijima Istočne kooperativne onkološke grupe (prema eng. Eastern Cooperative Oncology Group), KV=kardiovaskularni, CRP=C-reaktivni protein, LDH=laktat dehidrogenaza, n.z. = bez statističke značajnosti*



**Slika 5:** Korelacija serumske koncentracije kalprotektina s CRP-om u bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama.

## **5. RASPRAVA**

Koliko nam je poznato, ovo istraživanje je prvo koje je analiziralo serumsku koncentraciju kalprotektina u bolesnika s hematološkim neoplazmama. Svi su bolesnici s MPN imali statistički značajno povišene serumske koncentracije kalprotektina u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 2). Međutim, nismo pronašli statistički značajnu razliku u serumskoj koncentraciji kalprotektina između bolesnika s ET, PV i PMF. Navedeno ograničava mogućnost serumskog kalprotektina u diferencijaciji pojedinih entiteta unutar MPN spektra. S druge strane, rezultati pokazuju da serumska koncentracija kalprotektina  $>1,11 \mu\text{g/mL}$  ima vrlo visoku osjetljivost (81,4%) i specifičnost (88,2%) za detekciju bolesnika s MPN (Slika 3). Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu serumskog kalprotektina kao novog cirkulirajućeg dijagnostičkog biljega MPN, što može biti korisno u svakodnevnom kliničkom radu kada je klinička prezentacija MPN nejasna. Tipičan primjer može biti „trostruko negativan“ bolesnik s trombocitozom i ekvivokalnim nalazom bioptata koštane srži. U ovom slučaju, povišeni serumski kalprotektin bi mogao „podržati“ dijagnozu ET. Naravno, tijekom dijagnostičkog postupka je potrebno isključiti infekcije, konkomitantne autoimune poremećaje i solidne tumore, no tako se i postupa u svakodnevnom kliničkom radu. Rezultati ovog istraživanja nisu definitivni, stoga su potrebne dodatna istraživanja na većem broju bolesnika s MPN kako bi utvrdile optimalnu prijelomnu vrijednost serumskog kalprotektina za detekciju MPN. Navedena istraživanja bi mogla razjasniti i ulogu serumskog kalprotektina u diferenciranju pojedinih entiteta unutar MPN spektra.

Kalprotektin uglavnom luče granulociti, stoga bi JAK-STAT-inducirana aktivacija granulocita mogla biti odgovorna za povišene serumske koncentracije kalprotektina u MPN. Zanimljivo, serumska koncentracija kalprotektina nije bila povezana s parametrima „snažnije“ mijeloproliferacije (leukocitozom, eritrocitozom, trombocitozom, hematokritom, hemoglobinom, LDH ili prisutnošću palpabilne slezene). S druge strane, postoji jasna veza između kronične upale i konstitucijskih simptoma u MPN bolesnika (12,13), a određeni su citokini (npr. IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i povezani s prisutnošću vrućice, noćnog znojenja, umora ili gubitka težine (17). Nadalje, pokazano je kako MPN simptomi mogu utjecati i na svakodnevne životne aktivnosti, odsustva s posla, bolovanja, ali i na potrebu za ranim umirovljenjem i invalidninom (60). Štoviše, konstitucijski simptomi negativno utječu na preživljenje bolesnika s MPN (14-16). U ovom istraživanju serumska koncentracija kalprotektina je bila povezana s prisutnošću konstitucijskih simptoma, lošijim performans statusom, višim CRP -om i potrebom za liječenjem hidroksiurejom. U svakodnevnom kliničkom radu, ovi parametri su dobar pokazatelj upalnog stanja i tumorskog optrećenja u



MPN. U ovom bi kontekstu povišena serumska koncentracija u MPN primarno zrcalila kronično upalno stanje, ne nužno i „jačinu“ mijeloproliferacije.

Kronično upalno stanje u MPN je odgovorno i za razvoj fibroze koštane srži, potencijalno smrtonosne sekundarne komplikacije kod bolesnika s ET i PV (26,27). U kroničnim upalnim zbivanjima, upalu tipično započinje TLR koji prepoznaje DAMP. TLR aktivira članove NF- $\kappa$ B obitelji koji su povišeni u hematopoetskim i stromalnim stanicama u koštanoj srži. Uz to, povišena aktivnost TLR inducira proizvodnju citokina poput TNF- $\alpha$  i IL-6 koji potiču mijeloproliferaciju, dakle stvaraju uvjete pogodne za zloćudnu transformaciju, ali i tlo pogodno za upalno remodeliranje tkiva, tj. fibrozu. Kalprotektin se ponaša kao endogeni TLR ligand i DAMP molekula i u stanju je započeti i amplificirati upalni odgovor (61). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su povišene serumske koncentracije kalprotektina u bolesnika s MPN povezane s prisutnošću retikulinskih vlakana i/ili fibroze koštane srži. Iako je ovo istraživanje ograničeno malim brojem bolesnika, spekuliramo da bi kalprotektin, kroz poticanje upalom pokrenutog tkivnog popravka, mogao imati i važnu ulogu u poticanju fibroze koštane srži. Dodatna istraživanja na većem broju bolesnika s MPN su potrebna kako bi se potvrdili ovi rezultati, ali i razjasnila potencijalna uloga kalprotektina u promoviranju fibroze koštane srži. Navedena istraživanja bi mogla definirati i potencijalnu ulogu serumskog kalprotektina kao novog cirkulirajućeg biljega „fibrotične“ transformacije MPN.

Postoji veza između kronične upale i glavne komplikacije MPN, tromboembolije. Pokazano je kako kronična upala ima važnu ulogu u promoviranju ateroskleroze (62), a godinama je poznato kako su određene autoimune bolesti (npr. RA i sistemski eritemski lupus) sklone „preuranjenoj“ aterosklerozi i znatnom KV morbiditetu (63,64). Isto tako, kronično upalno stanje utječe i na razvoj inzulinske rezistencije i šećerne bolesti, značajnih rizičnih čimbenika za razvoj KV bolesti (65). U kontekstu MPN, konstitutivna aktivacija leukocita, s formacijom leukocit-trombocit kompleksa, dodatan je čimbenik u patogenezi KV komplikacija. Štoviše, leukocitoza se smatra jednim od rizičnih čimbenika za razvoj tromboze, ali i za lošije preživljenje u MPN (66). Zanimljivo, nismo pronašli povezanost serumske koncentracije kalprotektina i leukocita, granulocita i trombocita, no serumska koncentracija kalprotektina je korelirala s CRP-om, dokazanim rizičnim čimbenikom za razvoj štetnih KV događaja u MPN (23), ali i sa starijom dobi i KV rizičnim čimbenicima. Ovi rezultati ukazuju kako bi povišena serumska koncentracija kalprotektina u bolesnika s MPN mogla zrcaliti i vaskularno „starenje“ i endotelnu disfunkciju u podlozi razvoja KV

bolesti. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se razjasnila uloga kalprotektina u promoviranju KV komplikacija u MPN. Navedena istraživanja bi mogla definirati može li kalprotektin pomoći u ranoj identifikaciji bolesnika s višim KV rizikom.

Ograničenja ovog istraživanja predstavljaju unicentričnost, ograničen broj bolesnika i procjena veličine slezene palpacijskim metodama. Bez obzira, rezultati ukazuju na to da bi serumski kalprotektin mogao biti novi biljeg upalnog stanja u MPN. Dodatna istraživanja na većem broju bolesnika su potrebna kako bi se razjasnila uloga kalprotektina u patogenezi MPN. Navedena istraživanja bi mogla definirati i ulogu kalprotektina kao nove terapijske mete u MPN. Lijekovi koji blokiraju vezivanje kalprotektina na svoje receptore su već proizvedeni i odobreni za ljudsko testiranje, otvarajući nove opcije za liječenje bolesnika s MPN.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Sva tri entiteta unutar MPN spektra (ET, PV i PMF) imaju povišene serumske koncentracije kalprotektina u odnosu na zdrave kontrole.
2. Serumska koncentracija kalprotektina  $>1,11 \mu\text{g/mL}$  ima vrlo dobru osjetljivost (81,4%) i specifičnost (88,2%) za detekciju bolesnika s MPN.
3. Više koncentracije serumskog kalprotektina koreliraju s parametrima povezanim s kroničnim upalnim zbivanjem (starijom dobi, CRP-om, lošijim performansom statusom, konstitucijskim simptomima i KV rizičnim čimbenicima).
4. Viša serumska koncentracija kalprotektina povezana je s prisutnošću retikulinskih vlakana i/ili fibroze koštane srži u MPN, što ukazuje na potencijalnu ulogu kalprotektina u upalnom remodeliranju tkiva, tj. fibrozi koštane srži
5. Rezultati naglašavaju ulogu kalprotektina u patogenezi MPN, a ovo istraživanje i kliničke korelacije koje smo dokazali, mogli bi pomoći i u identificiranju novih terapijskih pristupa kod ovih bolesnika.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2019;94(1):133-43.
2. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(12):1551-60.
3. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol.* 2014;92(4):289-97.
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C i sur. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144-8.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ i sur. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell.* 2005;7(4):387-97.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR i sur. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1779-90.
7. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD i sur. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379–90.
8. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC i sur. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.*
9. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A i sur. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood.* 2004;103 (11):4198–200.
10. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M i sur. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108 (10):3472–6.
11. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R i sur. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia.* 2018;32(5):1057-69.
12. 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; 119:3219-25.

13. Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as Inflammatory Diseases: The Evidence, Consequences, and Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:102476.

14. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1356-63.

15. Vaidya R, Gangat N, Jimma T, Finke CM, Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2012; 87(11):1003-5.

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

17. Geyer HL, Dueck AC, Scherber, Mesa RA. Impact of Inflammation on Myeloproliferative Neoplasm Symptom Development. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:284706.

18. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S i sur. Tumor necrosis factor-alpha facilitates clonal expansion of JAK2V617F-positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6392-8.

19. Grunwald MR, Burke JM, Kuter DJ, Gerds AT, Stein B, Walshauer MA i sur. Symptom Burden and Blood Counts in Patients With Polycythemia Vera in the United States: An Analysis From the REVEAL Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(9):579-84.e1.

20. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF i sur. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799–807.

21. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V i sur. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787–98.

22. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti i sur. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2015;372(5):426-35.

23. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Vannucchi AM, Barosi G, Antonioli E i sur. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011;96(2):315–8.

24. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Guglielmelli P, Salmoiraghi S, Rosti V i sur. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(10):2084-6.
25. Veletic I, Manshouri T, Multani AS, Yin CC, Chen L, Verstovsek S i sur. Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *Blood*. 2019; 133(21):2320-4.
26. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao ZJ, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF- $\beta$ . *Stem Cell Investig*. 2016;3:5.
27. Zahr AA, Salama ME, Carreau N, Tremblay D, Verstovsek S, Mesa R i sur. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. 2016;101(6):660-71.
28. Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Bjorkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010;95(7):1216-20.
29. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br J Cancer*. 2009;100(5):822-8.
30. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD i sur. Genomewide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
31. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR i sur. Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat Res*. 2010;690(1):108-15.
32. Olivera P, Danese S, Peyrin-Biroulet L. JAK inhibition in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(7):693-703
33. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau M i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-405.
34. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L i sur. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124:2507-13.
35. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D i sur. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005;353:33-45.



36. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM i sur. Anagrelide compared to hydroxyurea in WHOclassified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013; 121(10):1720-8.
37. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshour T, Luthra R, Estrov Z, Pierce i sur. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2009;27:5418-24.
38. Cassinat B, Verger E, Kiladjian JJ. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2014;371:188-9.
39. Harrison CN, Mead AJ, Panchal A, Fox S, Yap C, Gbandi E i sur. Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide. *Blood*. 2017;130:1889-97.
40. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N i sur. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004;89:1194-8.
41. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, Krochmalczyk D, Gercheva L, Egyed M i sur. Ropoginterferon Alfa-2b Induces High Rates of Clinical, Hematological and Molecular Responses in Polycythemia Vera: Two-Year Results from the First Prospective Randomized Controlled Trial. *Blood*. 2017;130:320.
42. Lekovic D, Gotic M, Perunicic-Jovanovic M, Vidovic A, Bogdanovic A, Jankovic G i sur. Contribution of comorbidities and grade of bone marrow fibrosis to the prognosis of survival in patients with primary myelofibrosis. *Med Oncol*. 2014;31(3):869.
43. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90:1128-32.
44. DBB Dhas, BV Bhat, DB Gane. Role of Calprotectin in Infection and Inflammation. *Curr Pediatr Res* 2012;16(2): 83-94.
45. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm Res*. 2018;67(10):801-12.
46. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557-66.
47. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:21–29.

48. Kalla R, Kennedy NA, Ventham NT, Boyapati RK, Adams AT, Nimmo ER i sur. Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(12):1796-1805.
49. Van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Slöetjes A, Lafeber FP, Lems WF i sur. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (2012) 64:1466–76.
50. Schelbergen RF, De Munter W, Van Den Bosch MH, Lafeber FP, Sloetjes A, Vogl T i sur. Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* (2016) 75:218–25.
51. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J i sur. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2008;29:2035–43.
52. Wang T, Huo X, Chong Z, Khan H, Liu R, Wang T. A review of S100 protein family in lung cancer. *Clin Chim Acta*. 2018;476:54-9.
53. Blanco-Prieto S, Vázquez-Iglesias L, Rodríguez-Girondo M, Barcia-Castro L, Fernández-Villar A, María Isabel Botana-Rial MI, i sur. Serum Calprotectin, CD26 and EGF to Establish a Panel for the Diagnosis of Lung Cancer. *PLoS One*. 2015;10(5): e0127318.
54. Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2011;32(4):641-6.
55. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumor-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol*. 2006;8:1369–75.
56. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K i sur. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol*. 2008;10: 1349–55.
57. Cheng P, Corzo CA, Luetke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM i sur. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med*. 2008;205: 2235–49.
58. Pedersen L, Nybo M, Poulsen MK, Henriksen JE, Dahl J, Melholt J. Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14: 96.

59. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET i sur. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649-55.
60. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S i sur. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *BMC Cancer.* 2016;16(1):167.
61. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9(6):7204–18.
62. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(2):99-106.
63. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Asanuma Y, Sokka T i sur. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;61(11):1580-5.
64. Hahn BH. Systemic lupus erythematosus and accelerated atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2003;349(25):2379-80.
65. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004;25(1):4-7.
66. Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2009;94(11):1484–8.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je istražiti serumsku koncentraciju kalprotektina u bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN) i procijeniti njegove kliničke korelacije.

**Ispitanici i metode:** Koristeći ELISA test izmjerili smo razine serumskog kalprotektina u 43 bolesnika s MPN [13 sa esencijalnom trombocitemijom (ET), 16 s policitemijom verom (PV) i 14 s primarnom mijelofibrozo (PMF)] i u 17 zdravih kontrola.

**Rezultati:** Sva tri entiteta unutar MPN spektra imala su više serumske koncentracije kalprotektina u usporedbi sa kontrolnom grupom ( $p < 0,001$ ). Međutim, nije bilo razlike u razini serumskog kalprotektina između bolesnika s ET, PV i PMF ( $p = 0,220$ ). Prijelomna vrijednost kalprotektina  $> 1,11 \mu\text{g/mL}$  ima osjetljivost od 81,4% i specifičnost od 88,2% za detekciju bolesnika s MPN (AUC 0,867,  $\text{STD} \pm 0,047$ , 95% CI 0,775-0,958,  $p < 0,001$ ). Više koncentracije serumskog kalprotektina povezane su sa starijom dobi ( $p = 0,007$ ), CRP-om ( $p < 0,001$ ), lošijim performansom statusom ( $p < 0,001$ ), konstitucijskim simptomima ( $p = 0,006$ ), potrebom za liječenjem hidroksiurejom ( $p = 0,004$ ), retikulinskom fibrozom koštane srži ( $p < 0,001$ ) i kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima ( $p = 0,005$ ). Serumski kalprotektin nije korelirao sa spolom, mutacijskim statusom, brojem leukocita, granulocita i trombocita, hemoglobinom, hematokritom ili prisutnošću palpabilne splenomegalije.

**Zaključci:** Povišene koncentracije serumskog kalprotektina u bolesnika s MPN vjerojatno odražavaju stanje kronične upale, ne nužno i stupanj mijeloproliferacije. Dodatna istraživanja na većem broju bolesnika s MPN su potrebna kako bi potpuno razjasnila ulogu kalprotektina u patogenezi MPN, ali i njegove prognostičke posljedice.

## **9. SUMMARY**

**Diploma Thesis Title:** Serum calprotectin in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms

**Objectives:** The aim of our study was to investigate serum calprotectin levels in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) and to assess its clinical correlations.

**Patients and Methods:** Using ELISA test we measured serum calprotectin levels in 43 MPN patients [13 essential thrombocythemia (ET), 16 polycythemia vera (PV) and 14 primary myelofibrosis (PMF)] and in 17 healthy controls.

**Results:** All three MPN disorders (ET, PV and PMF) had higher serum calprotectin levels when compared to controls ( $p < 0.001$ ). However, there was no difference in serum calprotectin levels between ET, PV and PMF patients ( $p = 0.220$ ). According to the ROC curve analysis, when the cut-off value of calprotectin is  $> 1.11 \mu\text{g/mL}$ , serum calprotectin has a sensitivity of 81.4% and specificity of 88.2% for detection of patients with MPNs (AUC 0.867,  $\text{SE}_{\text{err}} \pm 0.047$ , 95% CI 0.775-0.958,  $p < 0.001$ ). Higher serum calprotectin levels were associated with older age ( $p = 0.007$ ), higher CRP ( $p < 0.001$ ), poor performance status ( $p < 0.001$ ), constitutional symptoms ( $p = 0.006$ ), the need for hydroxycarbamide therapy ( $p = 0.004$ ), reticulin fibrosis ( $p < 0.001$ ) and the presence of cardiovascular risk factors ( $p = 0.005$ ). Serum calprotectin did not correlate with sex, mutational status, leukocyte, granulocyte and platelet counts, hemoglobin and hematocrit levels, or the presence of palpable splenomegaly.

**Conclusions:** Elevated serum calprotectin levels in patients with MPNs might primarily reflect the state of chronic inflammation, not necessarily the extent of myeloproliferation. Further studies are needed to elucidate the role of calprotectin in the pathogenesis of MPN's, as well as its prognostic implications.

## **10. ŽIVOTOPIS**



## **OSOBNI PODACI**

**Ime i prezime:** Filip Krečak

**Datum rođenja:** 15. veljače 1992.

**Mjesto rođenja:** Šibenik, Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Glavičine 10, 22010, Šibenik – Brodarica

**Email:** fkrecak@gmail.com

## **OBRAZOVANJE**

1998 – 2006 – Osnovna škola „Brodarica“, Šibenik

2007 – 2010 – Opća gimnazija „Antuna Vrančića“, Šibenik

2012 – 2019 – Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Medicina

## **ZVANJA I VJEŠTINE**

- Aktivno korištenje engleskog jezika
- Pasivno korištenje njemačkog
- Poznavanje latinskog jezika
- Vozačka dozvola kategorije B

## **AKTIVNOSTI**

**Objava znanstvenog rada:** Krečak I, Krečak F, Gverić-Krečak V i sur. Serum calprotectin: A circulating biomarker of the inflammatory state in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Blood Cells Mol Dis. 2019;79:102344. (kao dio diplomskog rada)

**Objava znanstvenog rada:** Krečak I, Gverić-Krečak V, Lapić I i sur. Circulating YKL-40 in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Acta Clin Belg. 2019;:1-8.

**Objava znanstvenog rada:** Krečak I, Krečak F, Gverić-Krečak V. High red blood cell distribution width might promote thrombosis in essential thrombocythemia in polycythemia vera. Blood Cells Mol Dis. 2019 (U tisku).