

УДК 616.155.191 – 021.3 + 615.275

ПРОЗАПАЛЬНІ ТА ПРОАГІОГЕННИЙ ЦИТОКИНИ У ХВОРИХ НА СПРАВЖНЮ ПОЛІЦИТЕМІЮ РІЗНОГО ПРОФІЛЮ РИЗИКУ

М.І. Сімонова, О.Й. Даниш, Х.Р. Сусіда, З.В. Масляк

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,
Львів*

Резюме. У статті наведено результати дослідження концентрації *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF* у 34 пацієнтів із справжньою поліцитемією. Хворих було розподілено на дві групи – низького та високого ризику відповідно до клінічних та лабораторних критеріїв. Аналіз даних дослідження свідчить, що у пацієнтів з групи високого ризику концентрації *VEGF*, *TNF- α* і *IL-8* були вищими, що свідчить про їх важливу роль у розвитку тромботичних ускладнень. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем тромбоцитів та концентрацією *VEGF*, *TNF- α* , *IL-6* та *IL-8*, а також між кількістю лейкоцитів та рівнем *IL-6*.

Ключові слова: справжня поліцитемія, цитокіни, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF*.

PROINFLAMMATORY AND PROAIGIOGENIC CYTOKINS IN DIFFERENT RISK GROUP OF PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA

M. Simonova, O. Danysh, Ch. Susida, Z. Maslyak

*SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine»,
Lviv*

Resume. The study presents results of analysis of the levels of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8* and *VEGF* in 34 patients with polycythemia vera. Patients were distributed into low-risk and high-risk groups according to clinical and laboratory criteria. Obtained results show that patients in high group had higher levels of *VEGF*, *TNF- α* and *IL-8*, that gives possibility to suggest important role of the latter in thrombotic complications. Direct correlation between the level of platelets and concentration of *VEGF*, *TNF- α* , *IL-6* and *IL-8*, and between the level of leukocytes and *IL-6* was revealed.

Key words: polycythemia vera, cytokins, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF*.

Вступ. Хронічні мієлопроліферативні неоплазії (ХМПН) – група захворювань кісткового мозку, що характеризуються клональними порушеннями гемопоєзу. Відповідно до класифікації ВООЗ 2008 року до них належать вісім підкатегорій, найбільш частими з яких є: справжня поліцитемія (СП), есенціальна тромбоцитемія (ЕТ), первинний мієлофіб-

роз (ПМФ), хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ). Згідно з останніми дослідженнями, етіологічними чинниками, які запускають патологічний процес при ХМПН, є мутації певних відомих генів. При *BCR-ABL*-негативних ХМПН, зокрема у понад 90% хворих з ідіопатичним мієлофіброзом (МФ) й есенціальною тромбоцитемією та у всіх хворих на справжню поліцитемію, захворювання характеризується пошкодженням одного з трьох основних генів: *JAK2*, *CALR* і *MPL* [1, 5]. Однією з ланок гемопоезу, на які можуть впливати мутовані гени при ХМПН, є цитокіни. Цей факт доведений для мієлофіброзу і стосується фактора некрозу пухлини, фактора росту ендотеліоцитів, інтерлейкінів 6 та 8 [4]. Tefferi і співавтори [7, 8] також вважають, що IL-8, IL2R, IL-12, IL-15 є незалежними прогностичними факторами зниження якості життя хворих на ПМФ, оскільки мають відношення до розвитку тромботичних ускладнень. При СП досить добре досліджена патогенетична роль еритропоєтину, визначення рівня якого використовується як один з критеріїв диференційної діагностики хвороби зі симптоматичними еритроцитозами. Також встановлено, що окремі прозапальні цитокіни необхідні для росту *JAK2V617F* мутованих еритроїдних колоній [2, 3, 9]. Разом з тим, при СП та ЕТ патогенетична роль цитокінів, особливо у їх зв'язку з мутаціями таргетних генів, практично не досліджена [10, 11]. Найбільш помітною є робота E. Rouesselot зі співавторами [6], в якій у 38 пацієнтів з ЕТ і СП описано залежність окремих цитокінів від мутаційного статусу хворих, однак самі автори вказують на необхідність розширених досліджень в цьому напрямі.

Мета дослідження. Встановлення взаємозв'язків між окремими прозапальними та проангіогенним цитокінами з профілем ризику у хворих на СП.

Матеріали та методи. Дослідження проведено в 34 хворих на СП. У 27 пацієнтів діагноз підтверджено відповідно до критеріїв ВООЗ 2008, у 4 хворих СП діагностували за критеріями робочої групи з дослідження поліцитемії (PVSG 2005), ще у 3 пацієнтів з тривалістю процесу 14 – 20 років встановлений раніше діагноз підтверджено в рамках дослідження на основі виявлення у них мутації гена *JAK2*. Медіана віку хворих на час діагностування СП становила 58 (37 – 76) років, причому 5 пацієнтів були молодшими за 50 років. На час включення хворих в обстеження середня тривалість СП становила 3 роки, коливаючись від 6 міс. до 20 років.

Дослідження проводилося в заморожених зразках плазми крові для уникнення спотворення результатів внаслідок коливання рівня тромбоцитів. Контролем була плазма 6 здорових осіб. Дослідження концентрації TNF- α , IL-6, IL-8, VEGF проводили за допомогою стандартних наборів: «VEGF людини» (BIOSOURCE, Бельгія), «Фактор некрозу пухлин альфа» (Вектор Бест, Новосибірськ), «Інтерлейкін-8 ІФА – Бест»

(Вектор Бест, Новосибірськ) та «Інтерлейкін -6 ІФА – Бест» (Вектор Бест, Новосибірськ). Результати зчитували на планшетному фотометрі Multiskan EX із подальшим математичним аналізом.

Результати та їх обговорення. Відповідно до клінічних та лабораторних критеріїв усіх хворих було розподілено на групи ризику: низького – 15 хворих та високого – 19 пацієнтів. Високий ризик встановлено у 4 пацієнтів віком <60 років з тромботичними ускладненнями, для решти 15 хворих фактором високого ризику був вік понад 60 років, з яких у 4 також розвинулись тромботичні ускладнення.

Аналіз гематологічних показників залежно від профілю ризику показав, що медіани показників гемоглобіну, еритроцитів, гематокриту та тромбоцитів у хворих високого та низького ризику суттєво не відрізнялись між собою, результати представлені в табл. 1. Єдиним показником, вищим у хворих високого ризику, був рівень лейкоцитів, однак через значні коливання ця різниця не була достовірною.

Таблиця 1 – Показники гемограми у хворих на СП високого та низького профілю ризику

Показники	Групи високого ризику		Група низького ризику	
	М (min-max)	0,25–0,75 квартилі	М (min-max)	0,25–0,75 квантилі
Гемоглобін, г/л	179 (158 – 214)	165,5 – 193	168 (160 – 258)	164,2 – 192,2
Еритроцити, Т/л	6,40 (4,63 – 8,96)	5,49 -7,86	6,54 (5,24 – 9,80)	5,6 – 7,3
Гематокрит, л/л	0,55 (0,47 – 0,64)	0,52 – 0,59	0,49 (0,43-0,62)	0,47 – 0,53
Лейкоцити, Г/л	14,75 (8,70 – 22,80)	12,0 – 16,35	8,70 (6,40 – 23,3)	8,0 – 14,8
Тромбоцити, Г/л	480 (285 – 876)	454,0 – 656,5	414 (232 – 816)	269,7 – 525,2

Відсутність достовірної різниці між двома підгрупами пацієнтів за показниками загального аналізу крові свідчить про те, що при СП гематологічні показники не є однозначним фактором ризику тромботичних ускладнень, а, найімовірніше, має значення пошкодження інших ланок гомеостазу, яке з віком набуває все більшого впливу.

При дослідженні цитокинового профілю плазми крові у всіх груп хворих на СП спостерігали статистично значиму різницю між концентрацією VEGF, TNF- α , IL-6 та IL-8 порівняно зі здоровими особами, в той же час

досліджувані показники в окремих пацієнтів коливались у широкому діапазоні (табл. 2). Встановлено суттєве підвищення проангіогенного VEGF та прозапального IL-8 інтерлейкіну у всій групі хворих на СП: медіана VEGF при цьому захворюванні була майже в 2,5 рази вищою порівняно з контрольною групою. Концентрація TNF- α у хворих на СП була, навпаки, меншою вдвічі порівняно зі здоровими, хоча також спостерігались значні коливання окремих показників в межах (4,47–86,69) пг/мл.

Таблиця 2 – Концентрація прозапальних та ангіогенного цитокінів у хворих на СП

Показники	Донори			Хворі на СП		
	Медіана	Min – max	0,25 – 0,75 квартилі	Медіана	Min – max	0,25 – 0,75 квартилі
VEGF, пг/мл	39,84	16,54 130,18	17,29 71,99	92,39	32,40 937,16	75,42 248,70
TNF- α , пг/мл	21,21	7,44 31,05	15,62 30,68	10,96	4,47 86,69	6,86 36,54
IL-6, пг/мл	4,67	3,81 5,88	4,14 5,78	5,70	3,07 11,88	4,32 7,61
IL-8, пг/мл	4,92	3,87 5,68	4,54 5,38	14,94	3,42 87,30	5,0 71,56

Суттєво не відрізнявся від контролю рівень інтерлейкіна-6 при незначних відхиленнях показників окремих осіб (табл. 3). Медіана IL-8 була втричі більшою від показника у здорових. Разом з тим, аналіз рівня досліджуваних цитокінів у хворих високого і низького ризику показав, що між ними існує суттєва різниця стосовно концентрації VEGF, TNF- α та IL-8, але не IL-6 (табл. 3).

Так, медіани концентрації перших трьох цитокінів були в 1,7–2 рази вищими у пацієнтів високого ризику і становили відповідно (132,05; 15,81; 14,94) пг/мл проти (76,76; 7,61; 6,06) пг/мл у хворих низького ризику. Суттєвої різниці в концентрації IL-6 між хворими різного профілю ризику не встановлено. Аналіз рівня VEGF у окремих пацієнтів високого ризику показав, що дуже високі показники (більше від медіани в 3,5 і 7 разів) встановлено у двох пацієнтів, причому хвора з найвищим показником за 4 міс. до обстеження перенесла інфаркт міокарда. У цих же хворих рівень інших цитокінів суттєво не відрізнявся від показників цілої підгрупи.

Проведено дослідження кореляційного зв'язку між окремими цитокінами та лабораторними показниками, оскільки тісна позитивна кореляція

Таблиця 3 – Концентрація прозапальних та ангіогенного цитокінів у хворих на СП низького та високого профілю ризику

Показники	Високий ризик			Низький ризик		
	Медіана	Min – max	0,25–0,75 квартилі	Медіана	Min – max	0,25–0,75 квартилі
VEGF, пг/мл	132,05	32,40 937,16	87,76 – 599,02	76,76	34,22 169,51	64,12 – 146,99
TNF- α , пг/мл	15,81	4,47 86,69	10,71 – 41,37	7,61	4,47 67,37	5,70 – 52,81
IL-6, пг/мл	5,70	3,07 11,88	4,49 – 8,51	5,94	3,81 7,62	4,16 – 7,62
IL-8, пг/мл	14,94	3,42 87,30	5,00 – 71,56	6,06	3,27 8,95	3,61 – 8,83

($r > 0,5$) свідчить про прямий взаємоз'язок між змінами окремих цитокінів та визначених біологічних параметрів. Тісний позитивний взаємозв'язок встановлено між концентрацією в плазмі VEGF і рівнем тромбоцитів ($r = 0,78$). Помірний прямий кореляційний зв'язок встановлено між TNF- α і рівнем тромбоцитів. Тісний кореляційний зв'язок встановлено між концентрацією IL-6 та рівнями лейкоцитів і тромбоцитів (відповідно $r = 0,72$ та $r = 0,97$). Помірний прямий кореляційний зв'язок встановлено між концентрацією IL-8 та рівнем тромбоцитів. Встановлені кореляційні зв'язки підтверджують версію щодо впливу прозапальних та проангіогенного цитокінів на проліферативну активність окремих паростків гемопоєзу.

Висновки

У хворих на СП встановлено зміни продукції ключових прозапальних цитокінів TNF- α , IL-6, IL-8, та проангіогенного VEGF в порівнянні з контрольною групою. Аналіз цих показників залежно від групи ризику показав, що у пацієнтів з високим профілем ризику концентрації VEGF, TNF- α і IL-8 були вищими, що свідчить про їх важливу роль у розвитку тромбоцитарних ускладнень. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем тромбоцитів та концентрацією VEGF, TNF- α , IL-6 та IL-8, а також між кількістю лейкоцитів та рівнем IL-6. Отримані результати співзвучні з даними закордонних авторів і свідчать про роль прозапальних та проангіогенного цитокінів в перебігу СП, а також вказують на можливість використання їх з прогностичною метою.

До прогностичних маркерів, здатних адекватно відображати ризик прогресії хвороби, а також чіткіше окреслити групу високого ризику, відносяться проангіогенний регуляторний фактор VEGF та прозапальний

цитокін ІЛ-8. З часом, отримані результати можуть бути підставою для розробки заходів з профілактики тромбозів у хворих на СП.

Література

1. Соколова М. А. Современные представления о «классических» Рн-негативных хронических миелолиферативных заболеваниях / М.А. Соколова // Клиническая онкогематология. – 2010. – Т. 3., №3. – С. 235-242.
2. Boiocchi L. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms / L. Boiocchi, C. Vener, F. Savi [et al.] // J Clin Pathol. – 2011. – V. 64. – P. 226–231.
3. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F / M. Boissinot, C. Cleyrat, M. Vilaine [et al.] // Oncogene. – 2011. – V. 30. – P. 990–1001.
4. Kvasnicka H. M. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders / H.M. Kvasnicka, J. Tiele // Histol.Histopatol. – 2004. – V 19, N 4. – 1245–1260.
5. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms/ P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 123, № 14. – P. 2220–2228.
6. Cytokine profiles in Polycythemia vera and Essential Thrombocythemia patients: clinical implications/E. Pourcelot, C. Trocme, J. Mondet [et al.] // Exp.Hemathol. – 2014. – V 42, N 5. – P. 360–368.
7. Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms / A. Tefferi, J.W. Vardiman // Leukemia. – 2008. – V. 22. – P. 14–22.
8. Tefferi A. How I treat myelofibrosis / A. Tefferi // Blood. – 2011. – 117(13). – P. 3494-3504.
9. Circulating endothelial cells in essential thrombocythemia and polycythemia vera: correlation with JAK2-V617F mutational status, angiogenic factors and coagulation activation markers / J. Trelński, A. Wierzbowska, A. Krawczyńska [et al.] // International Journal of Hematology. – 2010. – № 6. – P. 792–798.
10. Circulating IL2R, IL-8, IL15 and CXCL10 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis a comprehensive cytokine profiling study/ N. Vaidya, P. Caramazza, C. Finke [et al] //ASH Ann. Meeting Abstracts/ Blood – 2010. – V. 116, N 21. – Abst. 3068.
11. Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis / R. Vaidya, N. Gangat, T. Jimma et al. // American Journal of Hematology. – 2012. – № 11. – P. 1003–1005.

Надійшла 09.11.2017 року