

РОЛЯ НА ХЕПЦИДИНА В ПАТОГЕНЕЗАТА, ТЕЖЕСТТА НА КЛИНИЧНА ИЗЯВА И ПРОГНОЗАТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОФИБРОЗА

Стела Димитрова, Илина Мичева

Клиника по хематология, УМБАЛ „Св. Марина“ Варна,
Медицински университет – Варна

THE ROLE OF HEPcidIN IN THE PATHOGENESIS, SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATION, AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH MYELOFIBROSIS

Stela Dimitrova, Ilina Micheva

Clinic of Hematology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Въведение: Първичната миелофиброза (ПМФ) е миелопролиферативно заболяване, характеризиращо се с костномозъчна фиброза и неефективна екстрамедуларна хемопоеза, водещи до клинични прояви на анемичен синдром, конституционални симптоми и ексцесивна спленомегалия. Редица фактори участват в патогенезата на анемичния синдром при ПМФ, като един от дискутираните е нарушена регулация на желязната обмяна. Доказано по-високите стойности на ключовия регулатор на желязния метаболизъм - пептидният хормон хепцидин при болни с ПМФ, се свързват с тежестта на анемичния синдром, зависимостта от хемотрансфузии и скъсената преживяемост.

Цел: Целта на изследването е да се анализират серумните нива на хепцидин при болни с ПМФ и значението му за клиничното протичане, прогнозата и изхода на заболяването.

Материал и методи: Анализирани са 68 пациенти с ПМФ и 12 здрави контроли. Серумните нива на хепцидин са изследвани по метода ELISA. Резултатите са обработени статистически, като са използвани дисперсионен, сравнителен и корелационен анализи.

Резултати: Средните нива на хепцидин при пациенти с ПМФ са статистически значимо по-високи, в сравнение със здрави контроли (99.05 ng/mL; 20.57 ng/mL; $F=7.95$; $p=0.006$). Високите нива на хепцидин корелират с висок риск по

ABSTRACT

Introduction: Primary myelofibrosis (PMF) is a myeloproliferative disorder characterized by bone marrow fibrosis and ineffective extramedullary hematopoiesis, which presents with anemia, constitutional symptoms, and excessive splenomegaly. A number of factors are involved in the pathogenesis of the anemia in PMF, including impaired iron metabolism regulation. It was found that higher levels of the key regulator of iron metabolism - the peptide hormone hepcidin in patients with PMF, are associated with the severity of the anemia, blood transfusion dependence and decreased overall survival.

Aim: The aim of the study was to analyze the serum levels of hepcidin in patients with PMF and its impact on the clinical course, prognosis, and outcome of the disease.

Materials and Methods: A total of 68 patients with PMF and 12 healthy controls were analyzed. Serum hepcidin levels were measured by ELISA. The results were statistically analyzed by dispersion, comparison, and correlation methods.

Results: Then mean hepcidin levels in patients with PMF were statistically significantly higher compared to healthy controls. (99.05 ng/mL; 20.57 ng/mL; $F=7.95$; $p=0.006$). High levels of hepcidin correlated with high risk according to DIPSS ($p=0.046$), carrier of JakV617F mutation ($p=0.022$), fibrotic phase according to WHO 2016 ($p=0.062$), and the number of blood transfusions per month ($p=0.005$). Higher hepcidin levels were not relevant to overall survival.

DIPSS ($p=0.046$), носителство на JakV617F мутация ($p=0.022$), фибротична фаза по WHO 2016 ($p=0.062$), брой на трансфузии на месец ($p=0.005$). Липсва корелация с преживяемостта на пациентите.

Заклучение: Хепцидинът е биологичен маркер, чието проследяване в хода на МФ би спомогнало за по-точна клинична и прогностична оценка на заболяването.

Ключови думи: хепцидин, миелофиброза, анемия, миелопролиферативни заболявания, железен метаболизъм

Conclusion: Hepcidin is a biological marker the monitoring of which in the course of MF would help for a more accurate clinical and prognostic assessment of the disease.

Keywords: nhepcidin, myelofibrosis, anemia, myeloproliferative diseases, iron metabolism

ВЪВЕДЕНИЕ

Първичната миелофиброза (ПМФ) е миелопролиферативно заболяване, характеризиращо се с костномозъчна фиброза и неефективна екстрамедуларна хемопоеза, водещи до клинични прояви на анемичен синдром, конституционални симптоми и ексцесивна спленомегалия.

ПМФ се характеризира с хетерогенна и изменчива клинична изява. Проявява се с различна по тежест анемия, спленомегалия, левкоцитоза, левкопения, тромбоцитоза, тромбоцитопения и наличие на конституционални симптоми. Средната преживяемост на пациентите варира от месеци до години, в зависимост от хода на заболяването и някои прогностични показатели. Значение за преживяемостта имат редица клинични, биологични и пациентски характеристики, които се свързват с по-лоша прогноза - напреднала възраст, цитопения, левкоцитоза, необходимост от кръвопреливания, процент на циркулиращи в периферната кръв бласти, системни симптоми, степен на микросъдова плътност и цитогенетични аномалии. Сигнификантна значимост за общата преживяемост имат 5 основни характеристики на пациентите: възраст над 65 години, стойности на хемоглобина под 100 g/L, левкоцитен брой над $25 \times 10^9/L$, циркулиращи бласти в периферията над 1% и наличие на конституционал-

ни симптоми (немотивирана висока температура, консумативен синдром, обилни нощни изпотявания, упорит сърбеж по кожата и други) (1,2).

Анемията е основна клинична изява на заболяването, повлияваща неблагоприятно неговата еволюция, качеството на живот на болните, възможността за провеждане на адекватно лечение, а оттам и общата преживяемост. Данни от литературата показват, че 38% от пациентите с МФ поддържат нива на хемоглобина под 100 g/L, а 24% от тях са трансфузионно зависими още при поставянето на диагнозата, със задълбочаване тежестта на анемията в хода на заболяването (3).

Развитието на анемия при пациентите с миелофиброза (МФ) се дължи на редица механизми, като понижени костномозъчни резерви, цитокин-медирана костномозъчна недостатъчност, хронична хемолиза, кървене, хемодилуция, секвестрация в слезката, нутритивни нарушения, както и действието на миелосупресивни медикаменти (4,5).

Редица проучвания доказват ролята на хепцидина и желязната дисрегулация в патогенезата на анемията при някои хематологични заболявания, в това число и ПМФ.

Желязната хомеостаза е нарушена предимно при пациенти с МФ с клинично из-

разен анемичен синдром и неефективната екстрамедуларна еритропоеза. Допълнителна роля за нарушената желязна хомеостаза играят повишените нива на инфламаторни цитокини в циркулацията, желязното свръхнатрупване, последица от честите хемотрансфузии и абнормната абсорбция на желязо в тънките черва (3). Обединяването на тези фактори определя вероятната роля на нарушената хепцидинова секреция в развитието на анемичния синдром, прогнозата и еволюцията на заболяването.

ЦЕЛ

Целта на настоящото изследване е да се анализират серумните нива на хепцидин при пациенти с МФ и значението му за клиничното протичане, прогнозата и изхода на заболяването.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В анализа са включени 68 пациенти с първична, постполицитемична и посттромбоцитемична МФ (43 мъже и 25 жени; средна възраст – 67.7 години) и 12 здрави контроли след подписано информирано съгласие. При пациентите са анализирани следните параметри: степен на фиброза в костния мозък, носителство на мутация в Jak2 гена, размер на слезка чрез ехографско изследване, показатели на периферна кръвна картина (хемоглобин, левкоцити, тромбоцити), показатели на желязна хомеостаза (феритин, ТЖСК, серумно желязо). Прямо класификация на Световната здравна организация (WHO 2016) болните са разпределени както следва: първична миелофиброза – фибротична фаза: 27 болни; първична миелофиброза – префибротична фаза: 25 болни; посттромбоцитемична миелофиброза: 7 болни; постполицитемична миелофиброза: 9 болни. Според динамичната интернационална скорингова система (DIPSS) за стратификация на риска 6 болни са висок риск; 35 болни са с интермедиерен 2 риск; 22 болни са с интермедиерен 1 риск; 5 болни са нисък риск. Прямо броя трансфузии, които пациентите получават месечно, са разделени както следва: трансфузионно независими: 40 болни; получаващи

средно 1 хемотрансфузия/месечно (ХТ/м): 5 болни; 2 ХТ/м: 7 болни; 3 ХТ/м: 4 болни; 4 ХТ/м: 7 болни; 5 ХТ/м: 4 болни; >6 ХТ/м: 1 болен. Пациентите, които са без индикации за лечение към момента на анализа, са 26; лекувани с циторедуктивна терапия: 26 болни (хидроксиурея – 23 болни; интерферон α – 3 болни); лекувани с таргетна терапия (ruxolitinib): 16 болни. При анализиранияте пациенти и здравите контроли са измерени серумни нива на хепцидин-25 по метода ELISA (Wuhan Huamei Biotech Co., Wuhan, P.R. China). Експериментът е проведен според инструкциите за работа на производителя. Статистическата обработка на данните е извършена чрез SPSS версия 20, като са използвани дисперсионен, корелационен, вариационен, регресионен и сравнителен анализ. При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.

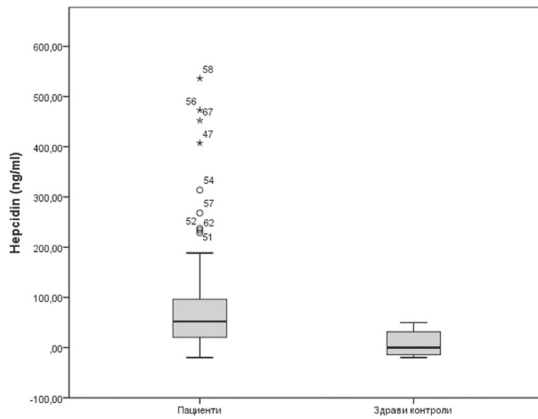
РЕЗУЛТАТИ

Установи се, че средните нива на хепцидин при пациентите с МФ са статистически значимо по-високи в сравнение със здравите контроли ($99.05 \pm 115.99 \text{ ng/mL}$; $20.57 \pm 16.9 \text{ ng/mL}$; $F=7.95$; $p=0.006$) (Фиг. 1).

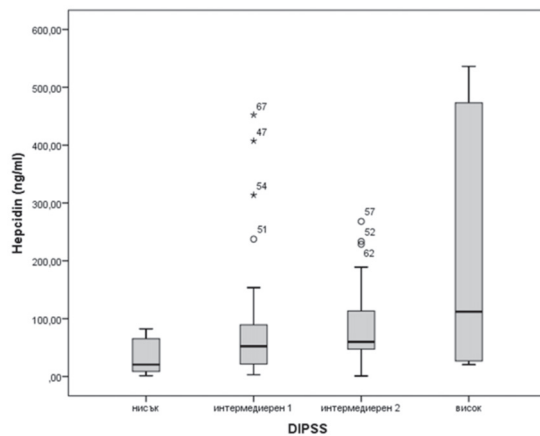
Анализът показва правопрпорционална връзка между стойностите на хепцидин и по-високия риск спрямо DIPSS ($p=0.046$), без това да рефлектира като самостоятелен прогностичен фактор върху общата преживяемост в анализиранията пациентска група (Фиг. 2).

Такава връзка се установи и между по-високи нива на серумен хепцидин и по-голям брой хемотрансфузии месечно ($p=0.005$). Не се установи връзка между стойностите на хепцидина и размерите на слезката, нивата на серумно желязо, феритин, ТЖСК, хемоглобин, левкоцити, тромбоцити и проведеното лечение.

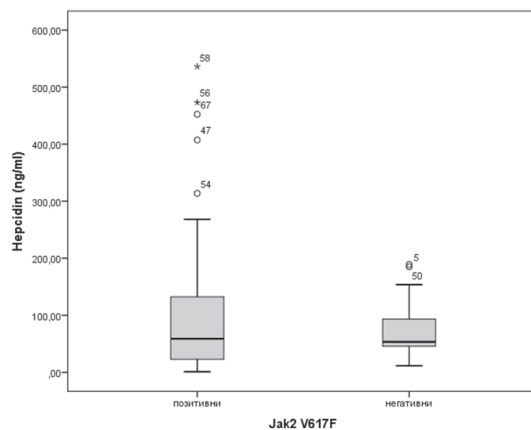
Установи се, че при болни с носителство на Jak2 V617F мутация, нивата на серумен хепцидин са значимо по-високи, в сравнение с Jak2 негативните пациенти ($110.44 \pm 132.9 \text{ ng/mL}$; $79.0 \pm 55.5 \text{ ng/mL}$; $F=5.5$; $p=0.022$) (Фиг. 3).



Фиг. 1. Стойности на хепцидин при пациенти и здрави контроли. Графиката показва по-високи стойности хепцидин (ng/mL) в пациентската група в сравнение със здрави контроли ($p=0.006$)



Фиг. 2. Стойности на хепцидин спрямо DIPSS рисков профил. Графиката показва значимо по-високи стойности на хепцидин (ng/mL) в по-високата рискова група ($p=0.046$)



Фиг. 3. Стойности на хепцидин спрямо носителство на Jak2 V617F мутация. Графиката показва по-високи стойности на хепцидин (ng/mL) при Jak2 позитивните в сравнение с Jak2 негативните пациенти ($p=0.022$)

Хепцидинът не корелира със степените на фиброза в костния мозък. По-високи нива на хепцидин се отчетоха при пациенти с фибротична фаза на ПМФ, в сравнение с префибротична фаза според WHO 2016 без резултът да е статистически значим ($117.3 \pm 138.6 \text{ ng/mL}$; $75.0 \pm 90.1 \text{ ng/mL}$; $F=3.6$; $p=0.062$). Не се установи подобна зависимост в групите болни с посттромбоцитемична и постполицитемична миелофиброза.

ДИСКУСИЯ

Проведеното проучване анализира ролята на хепцидина и ефектите от неговата свръхрегулация в патогенезата, клиничните, молекулярни и биологични характеристики на хетерогенна популация от болни с МФ. Сравнителен анализ на пациентската кохорта и здравите доброволци показва значимо по-високи стойности на хепцидина в групата на болните с МФ. Подобни резултати демонстрира и проучване на Pardanani и сътр. през 2013 година на 203 пациенти с МФ, където също са установени значимо по-високи нива на хепцидин в пациентската група в сравнение със здрави контроли. Високите хепцидинови нива корелират пряко и значимо и с хемоглобин под 100 g/L , необходимост от чести хемотрансфузии, серумен феритин над 500 mcg/L , по-висок DIPSS рисков профил, наличие на циркулиращи бласти, възраст над 65 години и левкоцитен брой под $4 \times 10^9/\text{L}$ (6). Подобно на тези резултати, и при нашите болни се установи право пропорционална зависимост между хепцидиновите нива и по-висок риск спрямо DIPSS, а така също и между високи стойности на хепцидин и по-честите трансфузионни нужди – два показателя, които поотделно и в комбинация повлияват клиничното протичане на заболяването и степента на тежест на изява на свързаните с болестта прояви и симптоми, качеството на живот, прогнозата и очакваната обща преживяемост. За разлика от публикуваните данни, в нашия анализ не се установи съответна значима връзка между нивата на хепцидин и стойностите на хемоглобин, левкоцити,

тромбоцити, както и показатели на желязната хомеостаза.

В експеримента на Pardanani мултивариационен анализ на четири прогностични показатели (нива на хепцидин, феритин, хемоглобин и трансфузионни нужди) разкрива, че повишените нива на хепцидин и феритин и нуждата от чести хемотрансфузии представляват предиктивни фактори за преживяемост при тези болни. При 29% от изследваните пациенти високите стойности на хепцидин и феритин, независимо от международния прогностичен индекс и повишените нива на циркулиращи инфламаторни цитокини, се свързват с по-ниска преживяемост и би могло да се използват като бъдещ прогностичен фактор при ПМФ (6). За разлика от тях, нашият анализ не показва директна връзка между хепцидина и очакваната обща преживяемост в популацията. Идентично на това, ретоспективен анализ на 224 болни с МФ показва, че сред редица предиктивни параметри за обща и свободна от прогресия преживяемост (циркулиращи инфламаторни цитокини, свободни леки вериги в серум, нива на хепцидин и феритин в серум и някои молекулярни маркери) хепцидинът не представлява самостоятелен маркер за по-лоша прогноза при анализирани те болни (7).

В нашия анализ се доказва, че носителство на Jak2 мутация корелира право пропорционално с високите хепцидинови нива. Jak2 има съществена роля в активиране на хепцидин-феропортин пътя на регулация на желязната метаболитизъм. Механизмите на повишена активация на Jak2 гена се обсъждат в генезата на анемия при хронично възпаление, като той допринася за свръхекспресията на хепцидин и произлизащия от това функционален желязен дефицит (8). Тези познати механизми на патогенезата на анемията, свързана с хронично възпаление (участието на провокираната от Jak2 повишена транскрипция на хепцидиновия ген, стимулацията на хепцидинова секреция под влияние на инфламаторни импулси и др.), биха могли да допринесат и за

възникване и задълбочаване на анемичния синдром и при болни с МФ (6,9). Неслучайно се обсъжда и ролята на таргетна терапия (Jak инхибитори) в повлияването на хепцидиновата секреция и възникващите от нея патологични процеси на желязна дисрегулация и неефективна еритропоеза при болни с МФ (10). Получените резултати не доказват разлика в серумните нива на хепцидин спрямо проведеното лечение. Това може да се дължи на хетерогенността на пациентската кохорта, както и на едновременния анализ на данни. Липсват данни в литературата за връзка на хепцидина с тежестта на фиброза в костния мозък. Интерес представлява установената от нас връзка на по-високи нива на хепцидин в групата на болни с фибротична фаза на ПМФ. По-задълбочено, проспективно проучване в хода на клинично наблюдение би спомогнало за по-добро разбиране на механизмите, повлияващи еволюцията, протичането и изхода при пациенти с МФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хепцидинът е биологичен маркер с определено значение за клиничното протичане, еволюцията и прогнозата на пациенти с МФ. Правилното му, нееднозначно, комплексно тълкуване в контекста на конкретен клиничен модел, би спомогнало за по-точна оценка на изхода от заболяването.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou A, Oh ST. Prognostication in MF: from CBC to cytogenetics to molecular markers. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27(2):155-64. doi: 10.1016/j.beha.2014.07.008.
2. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, Guglielmelli P, Pungolino E, Caramella M, Maffioli M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M, Tefferi A. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010;115(9):1703-8. doi: 10.1182/blood-2009-09-245837.

3. Tefferi A, Mesa RA, Pardanani A, Hussein K, Schwager S, Hanson CA, et al. Red blood cell transfusion need at diagnosis adversely affects survival in primary myelofibrosis-increased serum ferritin or transfusion load does not. *Am J Hematol.* 2009;84(5):265-7. doi: 10.1002/ajh.21391.
4. Kanasakia M, Higuchib T, Kawamoto K, Koyamada R, Okada O. Acquired β thalassemia as an etiology of microcytic anemia in primary myelofibrosis. *J Hematol.* 2015;4(1):148-50. doi: 10.14740/jh190w.
5. Leitch HA, Chase JM, Goodman TA, Ezzat H, Rollins MD, Wong DH, et al. Improved survival in red blood cell transfusion dependent patients with primary myelofibrosis (PMF) receiving iron chelation therapy. *Hematol Oncol.* 2010;28(1):40-8. doi: 10.1002/hon.902.
6. Pardanani A, Finke C, Abdelrahman RA, Lasho TL, Tefferi A. Associations and prognostic interactions between circulating levels of hepcidin, ferritin and inflammatory cytokines in primary myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2013;88(4):312-6. doi: 10.1002/ajh.23406.
7. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Abdelrahman R, Hanson C, Tefferi A. Serum ferritin level at referral provides independent prognostic information for overall survival in primary myelofibrosis. *Blood.* 2013; 122(21):2824. doi: 10.1182/blood.V122.21.2824.2824
8. De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3800-5. doi: 10.1073/pnas.0900453106. Epub 2009 Feb 20. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7583-6.
9. Strati P, Pemmaraju N, Estrov Z, Cardenas-Turanzas M, Pierce S, Newberry KJ, et al. Clinical significance of microcytosis in patients with primary myelofibrosis. *Leuk Res.* 2014;38(10):1212-6. doi: 10.1016/j.leukres.2014.08.007.
10. Oh S, Talpaz M, Gerds A, Gupta V, Verstovsek S, Mesa R et al. Heparin suppression by momelotinib is associated with increase iron availability and erythropoiesis in transfusion-dependent myelofibrosis patients. *Blood.* 2018; 132 (Suppl_1):4282. doi: 10.1182/blood-2018-99-111349.

Адрес за кореспонденция:

Стела Димитрова
 УМБАЛ „Св. Марина“
 бул. Христо Смирненски 1
 9000 Варна
 e-mail: stelladimitrova@abv.bg
