

Rozprawa doktorska

Ocena eryptozy i wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u chorych na czerwienicę prawdziwą i nadpłytkowość samoistną

Paweł Kopka

Promotor: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Chojnowski
Promotor pomocniczy: dr n. biol. Paulina Sicińska

Zakład Zaburzeń Hemostazy
Katedra Hematologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2019

STRESZCZENIE

Czerwieńca prawdziwa (PV) i nadpłytkowość samoistna (ET) należą do przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych (MPN Ph-ujemnych), które charakteryzują się nadprodukcją dojrzałych, sprawnych funkcjonalnie komórek krwi oraz upośledzeniem apoptozy na poziomie macierzystych komórek krwiotwórczych. Dotychczas nie przeprowadzono badań oceniających apoptozę krążących komórek krwi wywodzących się z klonu nowotworowego, w tym erytrocytów, w przypadku których programowana śmierć komórki nosi nazwę eryptozy. Jednym z ważnych czynników proeryptotycznych jest stres oksydacyjny, o którym wiadomo, że odgrywa także istotną rolę w patofizjologii MPN Ph-ujemnych. W ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w zakresie poznania molekularnego podłoża MPN Ph-ujemnych, zapoczątkowany odkryciem w 2005 r. mutacji w obrębie genu kinazy tyrozynowej Janus 2 – JAK2V617F, obecnej u prawie wszystkich pacjentów z PV i ok. 55% z ET. Inną cechą wspólną MPN Ph-ujemnych jest zwiększone ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych, które w razie pojawienia się mają istotny wpływ na przebieg kliniczny i rokowanie. Poza brakiem badań oceniających rolę eryptozy w patogenezie i przebiegu naturalnym PV i ET, nie ma również danych literaturowych dotyczących zależności między poziomem stresu oksydacyjnego a nasileniem eryptozy jak również nt. związku tych zjawisk z wystąpieniem powikłań zakrzepowo-zatorowych u chorych na PV i ET. Do chwili obecnej nie zbadano również wpływu na eryptozę i stres oksydacyjny hydroksymocznika (HU) – stanowiącego podstawowy lek w terapii cytoredukcyjnej PV i ET – oraz obecności mutacji JAK2V617F. Dlatego w pracy podjąłem się oceny poziomu eryptozy i równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej zarówno u nieleczonych jak i leczonych cytoredukcyjnie chorych na PV i ET. Postanowiłem również poddać analizie zależności pomiędzy nasileniem eryptozy a stresem oksydacyjnym oraz wpływ tych procesów na występowanie powikłań zakrzepowo-zatorowych. Ponadto u chorych na ET oceniałem wpływ obecności mutacji JAK2V617F na eryptozę i równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem próbek krwi 37 pacjentów z ET i 24 z PV, zarówno leczonych, jak i dotychczas nie stosujących HU. Grupę kontrolną stanowiło 13 zdrowych ochotników o strukturze wieku i płci zbliżonej do grupy badanej. Wyizolowane erytrocyty wykorzystywano do: oceny morfologii komórki za pomocą pomiaru rozproszenia światła w detekcji czołowej (parametr FSC) i bocznej (parametr SSC) oraz oznaczenia

markerów eryptozy (aktywności kalpain, eksternalizacji fosfatydyloseryny – PS) z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych przy użyciu cytometru przepływowego BD LSR II. Za pomocą metod spektrofotometrycznych oznaczono także parametry stresu oksydacyjnego: erytrocytarne stężenie zredukowanego glutationu (GSH), aktywność erytrocytarnych enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx), jak również peroksydację lipidów osoczowych (TBARS) oraz całkowitą pojemność antyoksydacyjną osocza (TAC).

W pracy wykazano, że u chorych na PV i ET zarówno dwa podstawowe markery eryptozy tj. aktywność kalpain i eksternalizacja PS, jak i odzwierciedlające poziom stresu oksydacyjnego osoczowe stężenie produktów peroksydacji lipidów są znamienne podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej. U leczonych HU aktywność kalpain w stosunku do pacjentów nie przyjmujących HU zachowywała się odmiennie zależnie od jednostki chorobowej – w przypadku ET była istotnie wyższa w grupie leczonej, podczas gdy w PV istotnie niższa. Podobnej zależności nie obserwowano w przypadku drugiego markera eryptozy – eksternalizacji PS, który nie zmieniał się istotnie pod wpływem HU, tak w PV jak i ET. W grupie chorych na PV przyjmujących HU, w stosunku do nieleczonych cytoredukcyjnie, obserwowano istotnie wyższe wartości parametru FSC – cytometrycznego markera objętości krwinki czerwonej. Natomiast w zakresie parametru SSC, odzwierciedlającego stopień pofałdowania błony erytrocytarnej, ani wśród chorych na PV, ani wśród chorych na ET nie wykazano istotnych różnic zależnych od stosowania HU. Może to sugerować, że eryptozozależne zmiany w obrębie błony komórkowej krwinki czerwonej stwierdzane w PV i ET są nieodwracalne, a przynajmniej nie poddają się leczeniu HU.

W grupie chorych nie przyjmujących HU odnotowano, zależnie od nowotworu, dwa odmiennie profile odpowiedzi antyoksydacyjnej, najpewniej wynikające z różnego nasilenia stresu oksydacyjnego w PV i ET. U pacjentów z PV – prezentujących znamienne wyższy w stosunku do chorych na ET poziom stresu oksydacyjnego ocenianego za pomocą stężenie osoczowych TBARS – obserwowano, w porównaniu z grupą kontrolną, istotnie niższe: TAC, aktywność SOD i GPx, istotnie wyższą aktywność CAT oraz brak różnic w poziomie erytrocytarnego GSH. Chorzy na ET z kolei, w zestawieniu ze zdrowymi ochotnikami, wykazywali znamienne obniżone aktywności SOD i CAT, podwyższone stężenie erytrocytarnego GSH oraz brak różnic w TAC i aktywności GPx. Leczenie hydroksymocznikiem chorych na PV i ET zmieniało korzystnie profil stanu redoks. Był on zbliżony, mimo wciąż istniejących różnic, do obserwowanego w grupie kontrolnej, co sugeruje antyoksydacyjny efekt działania leku w obu nowotworach.

Pacjenci, którzy przebyli incydent zakrzepowo-zatorowy, wykazywali znamienne większy poziom TBARS, aniżeli chorzy bez takiego wywiadu – zależność taką odnotowano zarówno w grupie ET jak i PV. Obserwacja ta wskazuje, że poziom nasilenia stresu oksydacyjnego może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych. Podobnie u chorych na ET z obecną mutacją JAK2V617F stężenie TBARS było istotnie wyższe, aniżeli w grupie ET JAK2V617F-ujemnej, co sugeruje dominujący JAK2-zależny mechanizm stresu oksydacyjnego w tym nowotworze; nie będzie to jednak mechanizm wyłączny, o czym świadczy istotne nasilenie stresu oksydacyjnego względem zdrowych ochotników także w grupie ET JAK2V617F-ujemnej.

Przeprowadzone przeze mnie badania dostarczyły istotnych informacji nt. roli eryptozy i stresu oksydacyjnego w patogenezie oraz przebiegu naturalnym PV i ET, z uwzględnieniem ryzyka powikłań zakrzepowo-zatorowych. Ponadto zbadałem wpływ terapii HU i obecności mutacji JAK2V617F na nasilenie zjawiska eryptozy i poziom stresu oksydacyjnego w tych nowotworach mieloproliferacyjnych. Dalsze badania, na większej grupie chorych, mogą przyczynić się do dokładniejszego poznania biologii PV i ET z identyfikacją nowych czynników ryzyka zakrzepowo-zatorowego włącznie, jak również mogą służyć do opracowania nowych kierunków leczenia erytrocytozy w przebiegu MPN Ph-ujemnych, wykorzystujących jako punkt uchwytu farmakologiczną indukcję eryptozy.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badań własnych można sformułować następujące wnioski:

1. Zwiększony proces eryptozy u chorych na czerwienicę prawdziwą wyklucza akumulację erytrocytów pochodzących z nowotworowego klonu jako przyczynę zwiększonej masy czerwonych krwinek występującej w tej chorobie. Obserwacja ta pośrednio dowodzi, że przyczyną nadkrwistości w czerwienicy prawdziwej jest nadprodukcja erytrocytów spowodowana zahamowaniem apoptozy komórki macierzystej szpiku kostnego.

2. Nasilona eryptoza może być mechanizmem kompensacyjnym dla zwiększonej erytropoezy w czerwienicy prawdziwej, natomiast w przypadku nadpłytkowości samoistnej może stanowić pośredni laboratoryjny dowód na subkliniczne objęcie procesem rozrostowym także linii erytroidalnej.

3. Nadpłytkowość samoistna i czerwienica prawdziwa charakteryzuje zwiększony poziom stresu oksydacyjnego z jednoczesną dysfunkcją erytrocytarnego i osoczowego systemu obrony antyoksydacyjnej.

4. Hydroksymocznik może przyczyniać się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego w nadpłytkowości samoistnej i czerwienicy prawdziwej, wpływa natomiast w odmienny sposób

na eryptozę w obu tych nowotworach mieloproliferacyjnych. Można to tłumaczyć wielokierunkowym, nie w pełni poznany mechanizmem działania leku lub istnieniem istotnych różnic w mechanizmach patogenetycznych obu jednostek chorobowych. Obserwacje te wymagają dalszych badań.

5. W nadpłytkowości samoistnej obecność mutacji JAK2V617F przyczynia się do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego, natomiast nie wpływa na przebieg eryptozy.

6. Oznaczanie poziomu stresu oksydacyjnego u chorych na nadpłytkowość samoistną i czerwienicę prawdziwą może pozwolić na wyodrębnienie grupy pacjentów o wysokim ryzyku powikłań zakrzepowo-zatorowych.

ABSTRACT

Objectives: Polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) are Philadelphia–negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) characterized by overproduction of mature and functional blood cells and impairment of apoptosis at the hematopoietic stem cell level. However, so far no study has evaluated apoptosis at the level of circulating blood neoplastic cells, including the suicidal death of erythrocytes – eryptosis. On the other hand, eryptosis may be induced by oxidative stress, which plays a significant role in MPN pathophysiology and clinical picture. Oxidative stress is associated with changes in the prooxidant and antioxidant balance in favor of prooxidants. My aim in this study was to investigate the eryptosis and oxidative stress parameters in ET and PV cytoreductive-naïve patients compared to healthy volunteers and compared to ET and PV patients treated with HU. Moreover, this study was designed to investigate the probable relationship between vascular events and parameters of eryptosis and oxidative stress, as well as between JAK2V617F mutation status among ET patients and parameters of eryptosis and oxidative stress.

Methods: 61 patients (24 PV and 37 ET) naïve to and treated with hydroxyurea (HU) and 13 healthy volunteers were enrolled. Erythrocytes were analysed for eryptotic changes such as calpains activity from CMAC-fluorescence, phosphatidylserine externalization (PS) by treatment with Annexin V, alterations in cell volume and shape from FSC and SSC parameters. Additionally, we determined the serum and erythrocytic levels of oxidative status parameters, such as Total Antioxidant Capacity (TAS) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in serum as well as activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (GSH) concentration in erythrocytes.

Results: A significantly increased levels of calpains, PS externalization and TBARS were observed in both ET and PV naïve patients, indicating enhanced eryptosis and oxidative stress. Among HU-treated patients, a significant increase in calpain activity in the ET group and a decrease in the PV group were observed compared to patients without cytoreductive therapy. Among HU-treated PV patients, a significant decrease in TBARS was noted compared to PV patients without cytoreductive therapy. Among PV patients, FSC was substantially higher in the HU-treated group than the naïve group, whereas no significant differences were found between HU-treated and HU-naïve groups of ET patients. Both ET and PV HU-untreated patients had larger disturbances in oxidative stress parameters than HU-treated ET and PV groups. Additionally, the group of ET and PV patients with a history of vascular events had

significantly higher TBARS levels than similar group without thrombohemorrhagic complications in the past. Similarly, among ET patients, TBARS levels were significantly higher in JAK2V617F-positive group than in JAK2V617F-negative ones.

Conclusions: The enhanced eryptosis observed in ET and PV patients may be a form of systemic compensation of the pathological bone marrow overproduction of erythrocytes. HU, the basic cytoreductive drug used in ET and PV, may affect eryptosis in PV and ET in different ways depending on disease. The JAK2V617F mutation was not observed to have any effect on eryptosis in ET. Oxidative stress parameters were significantly increased in both ET and PV patients with and without HU treatment, but in comparison to control higher in HU-untreated PV and ET ones. Furthermore, ET and PV patients with a history of vascular events had significantly higher oxidative stress level than groups without vascular complications in the past. Similarly, ET JAK2V617F-positive group had significantly higher oxidative stress level than ET JAK2V617F- negative group, which suggests that JAK2V617F mutation may influence on oxidative status and trigger reactive oxygen species generation.