



Медицински университет  
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна  
Факултет по медицина  
Катедра „Вътрешни болести II“

---

**Д-Р СТЕЛА КОСТОВА ДИМИТРОВА**

**ПЪРВИЧНА, ПОСТЕРИТРЕМИЧНА,  
ПОСТТРОМБОЦИТЕМИЧНА МИЕЛОФИБРОЗА –  
УЧАСТИЕТО НА ИНФЛАМАТОРНИ ЦИТОКИНИ  
(INTERLEUKIN 6, INTERLEUKIN 8)  
И РЕГУЛАТОРИТЕ НА ЖЕЛЕЗНИЯ  
МЕТАБОЛИЗЪМ (ХЕПСИДИН) В ПАТОГЕНЕЗАТА  
НА АНЕМИЧНИЯ СИНДРОМ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на  
научна и образователна степен „Доктор“

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Илина Мичева, д.м.

**Официални рецензенти:**

Проф. д-р Валерия Калева, д.м.

Проф. д-р Маргарита Генова, д.м.

Варна, 2021

Дисертационният труд е представен в обем 142 страници и съдържа 2 таблици и 34 фигури. Литературната справка включва 237 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на Катедра „Вътрешни болести II“ при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и е насочен за публична защита пред научно жури в следния състав:

Доц. д-р Илина Мичева, д.м.

Проф. д-р Жанет Грудева – Попова, д.м.

Проф. д-р Маргарита Генова, д.м.

Проф. д-р Юлиан Райнов, д.м.

Проф. д-р Валерия Калева, д.м.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... 2021 г. от ..... часа в зала ..... на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински университет „Проф. д-р П.Стоянов“ – Варна и в електронен вид на сайта на МУ – Варна.

# Съдържание

Използвани съкращения .....	5
Въведение .....	8
I. Литературен обзор .....	10
1. Въведение.....	10
2. Значение на хепсидина при заболявания, протичащи с анемичен синдром .....	12
3. Проинфламаторна регулация на анемичния синдром .....	15
4. Заключение .....	19
II. Цел, задачи, хипотеза.....	21
1. Цел .....	21
2. Задачи .....	21
3. Хипотеза.....	21
III. Контингент и методи.....	22
1. Материална база за реализиране на дисертационния труд .....	22
2. Обект на проучването .....	22
3. Подбор на пациенти .....	22
4. Получаване и съхраняване на проби. Изследвани показатели. Методи на анализ.....	23
5. Статистически дизайн и анализ .....	25
IV. Собствени резултати .....	26
1. Клинична характеристика на пациентите .....	26
2. Сравняване серумните нива на хепсидин при пациенти с миелофиброза и здрави контроли .....	28
3. Анализирани връзката на хепсидина с клинично- лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите.....	30

4. Сравняване серумните нива на IL-6 и IL-8 при пациенти с миелофиброза и здрави контроли .....	38
5. Анализирани връзката на IL-6, IL-8 и клиничко-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите.....	42
6. Анализирани връзката между серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 в изследваната група пациенти .....	47
7. Анализирани потенциала на серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 за прогностични маркери по отношение на възникване и задълбочаване на анемичния синдром и общата преживяемост .....	49
8. Разработване на рисков профил, включващ хепсидин, IL-6 и IL-8 и връзката му клиничко-лабораторни характеристики на пациентите.....	50
V. Дискусия .....	54
1. Роля на хепсидина в патогенезата и протичането на анемичния синдром.....	54
2. Роля на IL-6 и IL-8 в патогенезата и протичането на анемичния синдром.....	60
Заклучение .....	64
Изводи .....	65
VI. Приноси на дисертационния труд .....	66
Приноси с оригинален характер .....	66
Приноси с потвърдителен характер.....	66
VII. Научни публикации по темата.....	67
VIII. Благодарности .....	68

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

### Използвани съкращения на кирилица

ЕТ	есенциална тромбоцитемия
МДС	миелодиспластичен синдром
МПН	миелопролиферативни неоплазии
МФ	миелофиброза
НХЛ	неходжкинов лимфом
ПМФ	първична миелофиброза
СЗО	Световна здравна организация
СУЕ	скорост на утаяване на еритроцитите
ТЖСК	тотален желязо-свързващ капацитет
тРНК	транспортна рибонуклеинова киселина
ХЕ	хронична еритремия

### Използвани съкращения на латиница

ALK2	activin receptor-like kinase-2
ASXL1	additional sex combs-like 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP/SMAD	bone morphogenic protein/ SMAD
BMP14	bone morphogenic protein 14
C/EBP $\alpha$	stress-inducible transcription factors CCAAT-enhancer-binding
CALR	calreticulin
CHOP	stress-inducible transcription factors CCAAT-enhancer-binding -homologous protein
CREBH	cAMP-Response-Element-Binding-protein-H
CRP	C-reactive protein
CXCL-10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10
CXCR1	Chemokine receptor 1
CXCR2	Chemokine receptor 2
CXCR8	chemokine receptor 8
DIPSS	dynamic international prognostic scoring system

DIPSS-Plus	dynamic international prognostic scoring system-Plus
DMT1	divalent metal transporter 1
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERFE	erythropoietic regulator erythroferrone
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FGF	fibroblast growth factor
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GDF15	growth differentiation factor 15
GIPSS	the genetically inspired prognostic scoringsystem
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	graft versus host disease
HAMP	hepcidin antimicrobial peptide gene
HIF	hypoxia-inducible factor
HIF2 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 2 alpha
HIV	human immunodeficiency virus
IBD	inflammatory bowel disease
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
IKZF	IKAROS family zinc finger 1
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IL-2R	Interleukin 2 receptor
IL-3	interleukin 3
IL-33	interleukin 33
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-8RA	Interleukin 8 receptor A
IL-8RB	Interleukin 8 receptor B
INF $\gamma$	interferon gamma
IPSS	international prognostic scoring system
IRE	iron regulatory element
IRIDA	iron-refractory iron-deficiency anemia
IRP-1	iron regulatory protein 1

IRP-2	iron regulatory protein 2
JAK2	Janus kinase 2
JAK2V617F	Janus kinase 2 V617F
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCV	mean corpuscular volume
MIPSS70	mutation-enhanced international prognostic scoring system for transplant-age patients
MIPSS70+	mutation-enhanced international prognostic scoring system 70+
MPL	human c-mpl gene
NTBI	non-transferrin-bound-iron
PDGF	platelet-derived growth factor
PHZ	phenylhydrazine
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
SF3B1	splicing factor 3B subunit 1)
SRSF2	serine/arginine-rich splicing factor 2)
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TET2	TET oncogene family member 2
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TP53	tumor protein p53
TWSG1	twisted gastrulation protein homolog 1
U2AF1	(U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

## ВЪВЕДЕНИЕ

Миелофиброзата е (МФ) е клонална хематологична неоплазия, която се характеризира с хетерогенна клинична изява, обусловена от фибротично заместване на кръвотворенето, прояви на костно-мозъчна недостатъчност, екстрамедуларна хемопоеза с ексцесивна спленомегалия и цитопении в късните фази с предимно изразен тежък анемичен синдром.

По литературни данни 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 (Naumagon L et al. 2017).

Много фактори участват в развитието на анемичния синдром при МФ, като един от подозираните е нарушената регулация на желязната обмяна. Тя заема ключово място в патогенезата на редица заболявания, сред които солидни тумори, хронични възпалителни процеси, както и процесите на стареене. Фактори, свързани с абнормния метаболизъм на желязото, имат роля и в развитието на някои хематологични неоплазии. Доказано е, че при пациенти с МФ се наблюдава нарушение на желязната хомеостаза, задълбочаване на анемията и свързания с болестта инфламаторен фон, независимо от стадия на заболяването и рисковата група (Pardanani A et al. 2013). Основен регулатор на желязната метаболизъм е пептидният, хормон хепсидин, който чрез оста хепсидин-феропортин контролира нивата на екстрацелуларното желязо в организма (Veena Sangkhae et al. 2017). Доказват се значимо по-високи нива на хепсидин при пациенти с МФ в сравнение със здрави контроли, което корелира с тежестта на анемичния синдром, нуждата от хемотрансфузии и нивата на серумен феритин при новодиагностицирани болни. Установява се също, че тези отклонения са предиктори за скъсена преживяемост, независимо от рисковия профил (Pardanani A et al. 2013). Допълнителна роля за нарушената желязна хомеостаза при тези пациенти играят повишените нива на инфламаторни цитокини в циркулацията, желязното свръхнатрупване, последица от честите хемотрансфузии и абнормната абсорбция на желязо в тънките черва (Tefferi A et al. 2009). Установени са сигнификантно увеличени



серумни нива на интерлевкин-8 (IL-8) и интерлевкин-6 (IL-6), като свръхекспресия на IL-8 се наблюдава в различни хемопоеични линии и се явява независим прогностичен фактор за преживяемост. Обединяването на фактори като неефективна еритропоеза, инфламаторни стимули и желязно свръхнатрупване при пациентите с МФ предопределя водещата роля на нарушената хепсидинова секреция в развитието на анемичния синдром и нейното прогностично значение за еволюцията на заболяването (Pardanani A et al. 2013).

# I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## 1. Въведение

### 1.1. Миелофиброза – общи характеристики

Миелофиброзата (МФ) е клонална миелопролиферативна неоплазия (МПН), характеризираща се с костно-мозъчна фиброза и неефективна екстрамедуларна хемопоеза, които водят до прогресивна костно-мозъчна недостатъчност, тежка анемия, конституционални симптоми, спленомегалия и тромбоза. Миелофиброзата може да е резултат от естествената еволюция на хроничната еритремия (ХЕ) и есенциалната тромбоцитемия (ЕТ) или да възникне *de novo* като първична миелофиброза (ПМФ). Средната възраст при диагнозата е 67 години, без сигнификантна разлика в разпределението по пол. Средната преживяемост на пациентите може да варира от месеци до години, в зависимост от хода на заболяването и определени прогностични показатели. Болните живеят приблизително от 3,5 до 5,5 години средно, като най-честата причина за смърт е трансформацията в остра левкемия (20%). Редица пациенти умират и от много свързани със заболяването събития като прогресия без трансформация, инфекциозни усложнения и тромботични или хеморагични инциденти (Cervantes F et al. 2009). Значение за прогнозата при пациентите с МФ имат някои клинични и биологични характеристики като напреднала възраст, левкоцитоза и анемия, налични при поставяне на диагнозата, трансфузионната зависимост, както и високите нива на инфламаторни цитокини (Zhou A et al. 2014).

### 1.2. Патогенеза на анемичния синдром при миелофиброза

Като клонална МПН, МФ се характеризира с патологична миелопролиферация и аберантна цитокинова продукция, което води до прогресивна фиброза на костния мозък, прояви на възпаление и

компрометиране на функцията на костно-мозъчната ниша. Пациентите с МФ развиват спленомегалия (в резултат на екстрамедуларна хемопоеза), хиперкатаболни симптоми (в резултат на хиперекспресия на инфламаторни цитокини) и анемия (в резултат на костно-мозъчна недостатъчност и спленална секвестрация) (Naumagon L et al. 2017). Развитието на анемия при пациентите с МФ се базира на комплекс от механизми, който включва понижени костно-мозъчни резерви, цитокин-медирана инхибция на хемопоезата, хронична хемολиза, кървене, хемодилуция, спленална секвестрация, нутритивни нарушения, както и действието на миелосупресивни медикаменти (Maуа Kanasakia et al. 2015; Leitch HA et al. 2010) (Фигура 1).

Анемията е една от първостепенните прояви на заболяването. Близо 40% от пациентите с МФ са със стойности на хемоглобина < 100 g/L при поставяне на диагнозата и приблизително една четвърт са вече трансфузионно зависими към този момент (Tefferi A et al. 2012). Буквално всички пациенти с миелофиброза в крайна сметка развиват анемия, като наличието на такава се асоциира със занижено качество на живот и лоша прогноза (Servantes F et al. 2012). Проучване на 722 пациенти с ПМФ показва анемия в различна степен на тежест при 628 (87%) от болните – 235 (33%) с тежка форма на анемия (хемоглобин < 80 g/L), 98 (14%) със средно тежка форма на анемия (хемоглобин 80–100 g/L) и 295 (41%) с лека форма на анемия (Tefferi A. 2017). Хемоглобин < 100 g/L е компонент на скоринговите системи за определяне на прогнозата при пациенти с МФ – DIPSS и DIPSS-Plus с включване на хемотрансфузионната зависимост като допълнителен лош прогностичен фактор в DIPSS-Plus. Прогностичната стойност на трансфузионно-зависимата анемия при болните с МФ е определена като основен предиктор за преживяемост в DIPSS-Plus и само нейното наличие вече стратифицира пациентите като интермедиерен 2 или висок риск (Passamonti F et al. 2010).

## **2. Значение на хепсидина при заболявания, протичащи с анемичен синдром**

### **2.1. Автоимунни, хронични възпалителни и онкологични заболявания**

Хепсидинът е централен медиатор на анемията, свързана с възпаление. Повлиян от възпалителни процеси и други стимули, блокира отделянето на желязо от макрофагите и намалява интестиналната му абсорбция (Wrighting DM et al. 2004).

Анемията, свързана с хронично възпаление, се наблюдава при редица заболявания и състояния като хроничните възпалителни чревни заболявания (улцерозен колит и болест на Крон), ревматоидния артрит, хроничната бъбречна увреда и затлъстяването (Fraenkel PG 2017). Такава се наблюдава и при болни с неоплазми, както и при увредени, коморбидни възрастни пациенти. Инфламаторната индукция на хепсидиновата експресия е един от факторите, допринасящи към развитието на анемия на възпалението, водейки до хипоферемия и повишена секвестрация на желязо в тъканите.

Много туморни клетки продуцират хепсидин за автокринна регулация на нивата на желязо, необходимо за собствената пролиферация и клетъчен растеж (Torti SV et al. 2018). Подобни механизми са описани при карцином на гърдата, простатата и щитовидната жлеза (Pinnix ZK et al. 2010; Tesfay L et al. 2015; Zhou Q et al. 2018). В напреднали стадии на заболяването е описана ролята на имунния отговор на организма към първични туморни и метастазиралите туморни клетки, като потенциален тригер за индукция на хепатоцитите, водещ отново до системна хепсидинова свръхпродукция.

### **2.2. Хематологични заболявания**

Редица проучвания през последните години доказват ролята на хепсидина в патогенезата на анемията при някои хематологични заболявания.

Проучване на пациенти с неходжкинови лимфоми (НХЛ) показва деветкратно увеличение нивата на серумния хепсидин в сравне-

ние със здравите контроли. Стойностите на хемоглобина са значимо по-ниски при пациентите с по-високи хепсидинови нива в сравнение с нисък хепсидин (Hara M et al. 2015).

При макроглобулинемията на Валдешрьом, подобно на останалите НХЛ, клинично изявената анемия би могла да се обясни с повишена секреция на хепсидин и дисрегулация на желязния метаболизъм. Проучване на 53 болни показва значимо повишени нива на хепсидин в сравнение със здрави контроли, което корелира позитивно с лимфо-плазмоцитонидната инфилтрация в костния мозък, високите серумни нива на бета-2 микроглобулин, CRP и серумен IL-6 и негативно корелира с хемоглобиновите стойности. Подобни резултати са описани и в популация на болни с болест на Ходжкин с потвърждаване на връзката между повишената секреция на IL-6 и хепсидин (Ciccarelli VT et al. 2011).

Комплексната генеза на анемичния синдром се обсъжда и при редица други хематологични неоплазми като множествен миелом. Проучване при 27 болни с новодиагностициран множествен миелом в сравнение със здрави контроли показва значимо по-високи стойности на хепсидин в групата на болните, както и значимо по-високи такива в субанализ при анемичните пациенти с миелом в сравнение с тези, които не са се презентирали с анемия при диагнозата. Силна обратнопропорционална връзка се установява спрямо хепсидиновите нива и стойностите на хемоглобин и хематокрит, което доказва ролята на хепсидина във възникването на анемия (Ibricevic-Balic L et al. 2016).

Повишени стойности на хепсидин се наблюдават при пациенти с МДС в хода на лечение с хелираща терапия. Счита се, че политрансфузираните болни с МДС обикновено проявяват признаци на желязно натрупване, което може да се усили от интензивна, но неефективна еритропоеза, както и от оксидативен стрес – два фактора, които потискат продукцията на хепсидин. Повишената, но неефективна еритропоеза особено при пациенти с рефрактерна анемия с ринг сидеробласти, която допълнително се стимулира от приложено лечение с еритропоетин, намалява нивата на хепсидин чрез регулация от GDF15. Ефектът на хелиращата терапия върху хепсидиновата регу-

лация обхваща в себе си два противопоставящи се механизма на въздействие – редуциране на желязния товар, което води до потискане секрецията на хепсидин, както и намаляване на неефективната еритропоеза и оксидативния стрес, което стимулира съответно хепсидиновата продукция.

### **2.3. Миелопролиферативни заболявания и миелофиброза**

Желязната хомеостаза е нарушена и при пациентите с МФ, особено при наличие на изразен анемичен синдром.

Pardanani и сътр. през 2013 г. изследват 203 пациенти с ПМФ и установяват значимо по-високи нива на плазмен хепсидин в сравнение със здравите контроли. Тези резултати корелират пряко с хемоглобинови нива 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  $4 \times 10^9/L$ . Мултивариационен анализ на четири прогностични показатели (нива на хепсидин, феритин, хемоглобин и трансфузионни нужди) разкрива, че повишените нива на хепсидин, свързаните с това високи стойности на феритина и наличието на хемотрансфузионни нужди представляват предиктивни фактори за преживяемост при тези болни. При 29% от изследваните пациенти високите стойности на хепсидина и феритина, независимо от прогностичната скорингова система и от повишените нива на циркулиращи инфламаторни цитокини, се свързват с по-ниска преживяемост и би следвало да се считат за бъдещ прогностичен фактор при ПМФ (Pardanani A et al. 2013).

Проучване с Jak инхибитор – Momelotinib, установява, че в хода на лечение на пациенти с МФ, които са трансфузионно зависими, се наблюдава повлияване тежестта на анемията. Momelotinib има ефект върху фоновия възпалителен процес при тези болни и контролира достъпа до желязо чрез регулация на нивата на хепсидина. Подобно на други състояние, характеризиращи се с анемия при хронично възпаление, при болни с МФ се отчитат завишени стойности на хепсидин. В *in vivo* проучване на Momelotinib при 41 болни, които се тран-

сфузират редовно, се наблюдава понижаване на средните стойности на хепсидин 6 часа след прием на препарата. Серумното ниво на желязо, трансферин, хемоглобин, ретикулоцити и хематокрит се установяват значимо по-високи на втората седмица от лечение. Следвайки тази тенденция, серумните нива на желязо остават по-ниски, докато хемоглобинът, хематокритът и тромбоцитният брой се повишават в хода на лечение до 24-та седмица (Stephen T Oh et al. 2018).

### **3. Проинфламаторна регулация на анемичния синдром**

#### **3.1. Общи понятия**

Цитокините са протеини, които се синтезират от клетките и са медиатори на междуклетъчните взаимоотношения. Те играят ключова роля за нормалната функция на всички клетъчни системи в човешкия организъм. Участват в медирането на имунния отговор и функцията на имунната система; в костното изграждане; оказват влияние върху работата на мозъка, белите дробове и черния дроб; представляват ключови хемопоетични растежни фактори, като физиологичната хомеостаза се поддържа от продукцията и баланса между цитокините и техните антагонисти (Kurzrock R 2001).

IL-6 е многофункционален, плеотропен, проинфламаторен цитокин, който се отделя от имунокомпетентни клетки в резултат на инфекция и/или предизвикателство пред имунната система (D. S. C. Raj 2009). Основна функция на IL-6 е регулация на възпалителния процес, имунния отговор, костния метаболизъм, остро-фазовата реакция към възпалителен агент и хемопоезата (DSC Raj 2009; ET Ali et al. 2019).

Счита се, че IL-6 се синтезира след възпалителен стимул и се свързва в комплекс с IL-6-рецептор- $\alpha$ . Това води до активация на JAK/STAT пътя, което в клетъчното ядро предизвиква транскрипционна активност на много таргетни гени, въввлечени в метаболизма и протеиновия синтез, в това число и тази на хепсидина (Wrighting DM et al. 2006). Доказано е, че IL-6 индуцира тип II имуен отговор и води до повишен синтез на фибриноген, хаптоглобин,  $\alpha$ 1 антитрипсин, както хепсидин, които се определят като острофазови протеини тип II. Ето защо хепсидинът, като тип II острофазов белтък, представлява връз-

ката между възпалителните стимули, вторичната анемия и желязната хомеостаза (Minchella PA et al. 2015).

IL-8 е представител на фамилията на СХС хемокините, познат още като CXCL8. Той се секретира в отговор на активирани моноцити и макрофаги и води до директна миграция на неутрофили, базофили и Т-лимфоцити (Baggiolini et al. 1989; Rossi and Zlotnik 2000).

Установено, че IL-8 играе важна роля в развитието на автоимунни, възпалителни и инфекциозни болести (Harada et al. 1994; Koch et al. 1992; Smyth et al. 1991). Поради потенциалната му проинфламаторна активност, секрецията му е строго регламентирана и експресията му е много ниска до едва доловима в нормални, здрави тъкани. Потенциални активатори на експресията му (в някои случаи до над 100 пъти) са IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, Interferon- $\gamma$ , липополизахариди, свободни радикали и други стрес агенти (Baggiolini et al. 1994; DeForge et al. 1993).

### **3.2. Онкологични заболявания**

Дисрегулацията на инфламаторните цитокини вероятно участва в развитието и еволюцията на малигнените процеси. Обсъжда се ролята на цитокините в туморо-образуването и свързаните с неопластичните заболявания симптоми, най-чест от които е адинамията (Kurzrock R 2001).

Приложението на таргетна терапия спрямо IL-6, в съчетание с инхибитори на JAK/STAT сигналния път, показва редица положителни резултати в повлияването на солидните тумори. Регистрирани са два IL-6 инхибитора – Siltuximab и Tocilizumab. Клиничните проучвания с двата медикамента показват обнадеждаващи резултати по отношение редуциране на свързаните с инфламаторен стимул анорексия и кахексия в миши модели и при пациенти с карцином на белия дроб. Анти-IL-6 таргетирането потиска процесите на ангиогенеза и туморна пролиферация, които са резултат от повишената цитокинова продукция при карцином на яйчника и бъбрека (Roxburgh CS et al. 2016). По отношение ролята на JAK 2 инхибиторите, рандомизирано фаза-2 двойно-сляпо проучване при метастатичен карцином на панкреас с Ruxolitinib/Сареситабин срещу палцебо/Сареситабин показва по-голяма преживяемост в Ruxolitinib групата, особено при пациенти с начал-



но по-високи нива на С-реактивен протеин (Hurwitz H.I. et al. 2015).

Доказано е, че експресията на IL-8 има ключово значение на онкогенезата поради неговата митогенна, ангиогенна и мотогенна активност. Обсъждат се редица механизми на действие като директен ефект върху пролиферацията на туморните клетки, ангиогенеза, миграция, както и индиректен ефект чрез активиране на имунокомпетентни клетки на гостоприемника, като неутрофили и макрофаги, които продуцират множество фактори, промотиращи туморната ангиогенеза и растеж (Xei K et al. 2001).

Връзката между CXCL8-CXCR1/2 (IL-8 и неговите рецептори) е проучвана при солидни тумори като карцином на гърдата, простатен карцином, белодробен карцином и меланом. Проучвания в тази област доказват, че сигналните пътища, които се активират от IL-8, могат да доведат до промени в туморната микросреда чрез миграция и активиране на миелоидни дендритни клетки и неутрофили чрез експресия на индуциращия пролиферация лиганд (APRIL). IL-8 също може да доведе до свръхекспресия на VEGF в ендотелните клетки, което повлиява туморния растеж и прогресия чрез стимулиране на неоангиогенеза (Q. Liu et al. 2016).

### **3.3. Хематологични заболявания**

Проучване при пациенти с макроглобулинемия на Валденщрьом, анализиращо нива на IL-6 и разтворими рецептори за IL-6, показва, че при всички анализирани пациенти серумните нива на IL-6 при диагнозата са много по-високи от тези при здрави доброволци. Проучването установява също, че високите стойности на IL-6 са свързани в анализиранията популация с туморния товар, тежестта на протичане на заболяването и отговора от лечение, отчитайки значимо намаляване след терапия в сравнение с дебюта на заболяването (Hatzimichael EC et al. 2001).

Високи нива са намерени и при пациенти с НХЛ и болест на Ходжкин, като в сравнение със здрави контроли увеличаването им е сигнификантно. С последното се свързат по-лошият статус (PS) и наличието на В-симптоми при тези пациенти (Hurwitz HI et al. 2015).

Повишена експресия на IL-8 е описана при лимфоми. Проучване

за потенциални механизми за развитие и растеж на дифузен В-ед-роклетъчен НХЛ показват че IL-8 промотира APRIL-позитивна неутрофилна инфилтрация, което е определящо за туморния контрол (В. Manfroi et al. 2017).

### **3.4. Миелопролиферативни заболявания и миелофиброза**

Добре познатата концепция на „онкологично възпаление“/ „тумор-асоциирана имунна дисрегулация“ включва в себе си механизми, пътища и участници в комплексното кръстосано взаимодействие между малигнените клетки и заобикалящата ги инфламаторна микросреда (Bottazzi B et al. 2018). Докато при солидните тумори този процес е застъпен, то при хематологичните заболявания все още се изяснява (Hasselbalch HC 2013). Именно сред хематологичните неоплазии Филаделфия-негативните МПН репрезентират парагигма на онкоинфламаторни нарушения (Barosi G 2014; Hasselbalch HC 2012).

Базирайки се на този доказал се при онкологичните заболявания модел, при МПН можем да наблюдаваме съществуването на два пътя (вътрешен и външен) на взаимодействие между туморните клетки и средата. Вътрешният път се обуславя от онкогени, които водят до генериране на инфламаторна микросреда за растеж на тумора (в този случай това са „driver“ мутациите – Jak2, MPL и CALR), докато външният път се основава на процеси на хронично възпаление, което от своя страна повишава риска от възникване на злокачествен процес (в този случай – костно-мозъчната инфламаторна ниша). Ключови регулатори в интеракцията между тези два пътя се оказват транскрипционни фактори, цитокини и хемокини, сред които STAT3, IL-1, IL-6, IL-8 и някои други (Bottazzi B et al. 2018). Основна роля в цитокиновата продукция при МПН играе и аберантната мегакариопоеза в костния мозък, която е ключова черта за патобиологията на тези заболявания и диференциалната диагноза.

Ролята на IL-6 в туморогенезата както при онкологичните, така и при хематологичните неоплазии е добре известна. Редица проучвания при пациенти с ПМФ показват повишаване нивата и на множество

други инфламаторни цитокини (Zahr AA et al. 2016). Tefferi и сътрудници изследват плазмените нива на 30 инфламаторни цитокина при 127 пациенти с ПМФ. Сред 20 цитокини, чиито нива са били повишени спрямо здрави контроли, IL-8 и IL-2R показват силна корелация с фенотипа и прогнозата при заболяването. Повишените плазмени равнища на тези два цитокина се свързват с наличието на конституционални симптоми, високи трансфузионни нужди, левкоцитоза и по-кратка обща и свободна от левкемия преживяемост. Интерес представлява IL-8, който е плеотропен проинфламаторен цитокин. Той се секретира от много клетки, има доказани ангиогенна и митогенна активности и действие като растежен фактор. Неговата свръхпродукция се свързва с по-лоша прогноза при редица солидни тумори. Ролята му в патогенезата на ПМФ и нейната левкемична трансформация би могла да е резултат на митогенното му действие и активността му на растежен фактор. Всички тези процеси не са напълно изяснени и представляват обект на интерес и бъдещи проучвания (Tefferi A et al. 2011; Zarogoulidis P et al. 2014).

#### **4. Заключение**

Съществува неоспорима връзка между патогенезата на анемичния синдром при ПМФ, нивата на регулаторите на желязния метаболизъм и редица маркери на възпалението. Въпреки че тези процеси не са изучени детайлно, познанията за ролята им при други малигнени заболявания ни дават основание да търсим зависимост между развитието на анемичния синдром при ПМФ, механизмите на регулация на хепсидина и някои ключови инфламаторни цитокини. Клиничните проявления на ПМФ, които са свързани със свръхекспресията на интерлевкините, са много и най-разнообразни. Взаимовръзката между тази свръхекспресия, повишения синтез на хепсидин с последващата дисрегулация на желязния метаболизъм и анемичния синдром, който е един от основните клинично-лабораторни синдроми при ПМФ, все още не е добре проучена. Неясно остава и значението на тези показатели за тежестта на анемията, рисковия профил на пациентите, прогресията на болестта и цялостното терапевтично поведение при това проблемно заболяване с твърде кратка преживяемост.

Изследвания на цитокиновата дисрегулация биха спомогнали за изграждане на нови насоки на таргетирана и индивидуализирана терапия с помощта на нови молекули, повлияващи патогенетичните механизми при ПМФ. Очаква се бъдещата комбинирана таргетна терапия коренно да повлияе прогнозата, преживяемостта и качеството на живот без субективни симптоми при тези пациенти.

## **II. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, ХИПОТЕЗА**

### **1. Цел**

Цел на настоящата работа е да се изследва участието на хепсидин, IL-6 и IL-8 в патогенезата на анемичния синдром при МФ.

### **2. Задачи**

Във връзка с тази цел бяха формулирани следните основни задачи:

1. Да се сравнят серумните нива на хепсидин при пациенти с МФ и здрави контроли
2. Да се анализира връзката на хепсидина с клинично-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите
3. Да се сравнят серумните нива на IL-6 и IL-8 при пациенти с МФ и здрави контроли
4. Да се анализира връзката на IL-6, IL-8 и клинично-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите
5. Да се анализира връзката между серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 в изследваната група пациенти
6. Да се анализира потенциалът на хепсидин, IL-6 и IL-8 за прогностични маркери по отношение на възникване и задълбочаване на анемичния синдром и общата преживяемост.
7. Да се разработи рисков профил, включващ хепсидин, IL-6 и IL-8 и да се анализира връзката му клинично-лабораторни характеристики на пациентите

### **3. Хипотеза**

Хепсидин, IL-6 и IL-8 участват в развитието и еволюцията на анемичния синдром при пациенти с МФ.

### **III. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ**

#### **1. Материална база за реализиране на дисертационния труд**

- Клиника по клинична хематология – УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
- Лаборатория по клинична микробиология и вирусология – УМБАЛ „Света Марина“ – Варна

#### **2. Обект на проучването**

В проучването са включени 68 пациенти с първична, пост-еритремична и посттромбоцитемична миелофиброза на възраст над 18 години и 12 здрави индивиди, служещи за контроли. Не се наблюдава сигнификантна разлика във възрастта между здравите контроли и пациентите.

Пациентите бяха анализирани ретроспективно и проспективно, като първият пациент е включен през месец март 2020 година. Проучването бе проведено в Клиниката по клинична хематология към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна след одобрение от Комисията по етика на научните изследвания на Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация. Участниците в него бяха включени след предварително подписване на информирано съгласие.

#### **3. Подбор на пациенти**

Включени са пациенти, диагностицирани с първична, постеритремична и посттромбоцитемична миелофиброза според критериите за диагноза на Световната здравна организация от 2016 година (Arber DA et al. 2016).

За поставяне на диагнозата се използват следните рутинни методи:

- Периферна кръвна картина и диференциална кръвна картина

- Показател за активност на заболяването – лактатдеhidрогеназа (ЛДХ)
- Молекулярно изследване (RT-PCR) за носителство за Jak2 V617F мутация
- Костно-мозъчна биопсия с определяне на степен на фиброза в костния мозък чрез сребърна импрегнация по Гомори. Фиброзата е определена по 4-степенна скала на Европейската стадираща система – MF-0, MF-1, MF-2, MF-3 (Kvasnicka HM et al.)
- Определяне на размер на слезката в милиметри чрез ехографски метод
- Определяне на принадлежност към рискова група по DIPSS скорингова система (Gangat N et al.)

#### **4. Получаване и съхраняване на проби. Изследвани показатели. Методи на анализ**

При всички пациенти бе извършен:

- клиничен преглед, включващ анамнеза и статус
- рутинни лабораторни изследвания – показатели на периферна кръвна картина; изследване на LDH; показатели на желязен метаболизъм (серумно желязо, феритин, тотален желязо-свързващ капацитет – ТЖСК)

Венозна кръв за определяне серумни нива на хепсидин-25, IL-6 и IL-8 бе взета едновременно и еднократно от 68 пациенти и 12 здрави контроли. Количеството на всяка кръвна проба бе 8 ml, разпределена в два вакутейнера, които в рамките на 15 минути се центрофугираха при 2500g за 20 min, след което материалът бе разделен на аликвоти, които са съхранявани при температура -80°C до деня на анализа.

*ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) методика за изследване серумни нива на хепсидин-25, IL-6 и IL-8*

Пробите бяха анализирани за човешки хепсидин-25 (CUSABIO, Ухан, Китай); човешки IL-6 (Demeditec, Кил, Германия) и човешки IL-8 (Demeditec, Кил, Германия) чрез ELISA съгласно инструкциите на производителя.

В деня на експеримента пациентските проби бяха темперирани на

стайна температура, вортексирани и впоследствие разредени. Разреждане на пробите в съотношение 1:101 в буфер (10µl серум в 1.0ml буфер и размесени добре на вортекс). Наличните контроли в кита са предварително разредени и готови за употреба.

Тестова процедура:

1 стъпка:

Пипетиране и накапване на 100 µl контроли и разредени пациентски проби в индивидуални микроямки на микроплаката съгласно протокола за пипетиране.

Инкубиране 30 минути при стайна температура (+18°C до +25°C).

Промиване автоматично: 3 пъти с 300 µl промиващ буфер. Буферът остава във всяка ямка за 30 до 60 секунди на цикъл, след което ямката се изпразва. След промиване изхвърляне на остатъчната течност от ямките чрез потупване върху попивателна хартия.

2 стъпка: Инкубация на конюгата.

Пипетиране на 100µl of ензимен конюгат във всяка ямка на микроплаката.

Инкубиране 30 минути при стайна температура (+18°C до +25°C).

Промиване автоматично: 3 пъти с 300µl промиващ буфер. Буферът остава във всяка ямка за 30 до 60 секунди на цикъл, след което ямката се изпразва. След промиване изхвърляне на остатъчната течност от ямките чрез потупване върху попивателна хартия.

3 стъпка: Субстратно инкубиране.

Пипетиране на 100µl хромоген/субстратен разтвор във всяка ямка. Инкубиране 15 минути при стайна температура (+18°C до 25°C) на защитено от пряка слънчева светлина място.

4 стъпка: Спиране на реакцията.

Пипетиране на 100 µl стоп разтвор във всяка ямка в същия ред и скорост както и хромоген/субстратния разтвор.

Измерване: Фотометричното измерване на интензитета на цвета се направи при дължина на вълната 450nm и референтна дължина между 620 nm и 650 nm до 30 минути от добавянето на стоп разтвора.



## 5. Статистически дизайн и анализ

### Статистически методи:

- Дисперсионен анализ (ANOVA)
- Вариационен анализ
- Корелационен анализ
- Регресионен анализ
- ROC curve анализ
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези)
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените

резултати

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0.05$  при доверителен интервал 95%.

Данните са обработени със SPSS v. 20.0 за Windows.

## IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

### 1. Клинична характеристика на пациентите

Средната възраст на изследваните пациенти е 67.7 години (39–88 години), като 66.2% (n = 45) са над 65-годишна възраст. Не се наблюдава сигнификантна разлика във възрастта между здравите контроли и пациентите. По пол пациентите са разпределени по следния начин: мъже – 63.2% (n = 43) и жени – 36.8% (n = 25). Спрямо класификацията на СЗО от 2016 година ПМФ – фибротична фаза са 39.7% (n = 27), ПМФ – префибротична фаза са 36.7% (n = 25), пост-ЕТ МФ са 10.3% (n = 7) и пост-ПВ МФ са 13.3% (n = 9). Спрямо DIPSS болните са разпределени в следните рискови групи: нисък риск – 7.4% (n = 5), интермедиерен-1 риск – 32.4% (n = 22), интермедиерен-2 риск – 51.5% (n = 35) и висок риск – 8.8% (n = 6). Спрямо броя трансфузии, които получават месечно, пациентите са разделени както следва: трансфузионно независими: 58.8% (n = 40); получаващи средно 1 хемотрансфузия/месечно (ХТ/м): 7.3% (n = 5); 2 ХТ/м: 10.2% (n = 7); 3 ХТ/м: 5.8% (n = 4); 4 ХТ/м: 10.2% (n = 7); 5 ХТ/м: 5.8% (n = 4); > 6 ХТ/м: 1.9% (n = 1). Поради хетерогенността на анализиранията група пациентите бяха разпределени в три групи според трансфузионните нужди: без нужда от хемотрансфузии – 61.8% (n = 42), пациенти, които получават < 3 единици еритроцитен концентрат (ЕК) месечно – 19.1% (n = 13) и > 3 единици ЕК месечно – 19.1% (n = 13). Спрямо лечението, което получават към момента на извършване на анализа, пациентите бяха разделени на: получаващи таргетна терапия (Ruxolitinib) – 23,5% (n = 16); получаващи циторедуктивна терапия (Hydroxyurea/ Interferon- $\alpha$ ) – 38,2% (n = 26) и пациенти на съпътстваща терапия (*best supportive care* – BSC) – 38,2% (n = 26). За яснота на анализа (поради хетерогенността на популацията) пациентите бяха разделени в три групи според времето от дебюта на заболяването: до 1 година от поставяне на диагнозата – 45,5% (n = 31); от 1 до 5 години от поставяне на диагнозата – 33,8% (n = 23), и над 5 години от поставяне на диагнозата – 20,7% (n = 14). Всички демографски и клинично-лабораторни характеристики на пациентите са представени в Таблица 1.

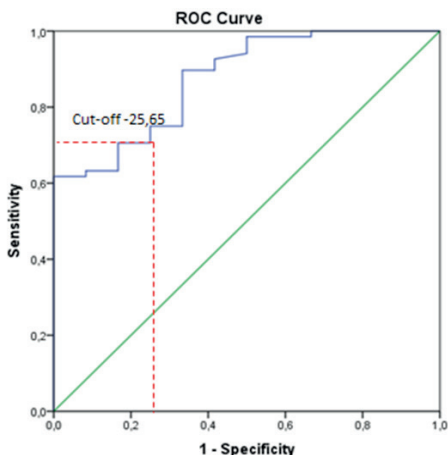
**Таблица 1.** Демографски и клиничко-лабораторни характеристики на пациентите

Показател		N (брой) / %
Възраст	Mean $\pm$ SD (range)	67.7 г. $\pm$ 9.7 г. (39–88 г.)
	> 65 г.	45/66.20 %
Пол	Мъже	43/63.2 %
	Жени	25/36.8 %
Рисков профил спрямо DIPSS	Нисък	5/7.4 %
	Интермедиерен-1	22/32.4%
	Интермедиерен-2	35/51.5%
	Висок	6/8.8%
Подвид спрямо СЗО 2016	Фибротична фаза	27/39.7%
	Префибротична фаза	25/36.7%
	Пост – тромбоцитемична	7/10.3%
	Пост – полицитемична	9/13.3%
Носителство на Jak2 V617F мутация	Позитивни	48/76.2%
	Негативни	15/23.8%
Степен на фиброза – сребърна импрегнация по Гомори	0	10/15,4%
	1	12/ 18,5%
	2	29/ 44,6%
	3	14/21,5%
Слезка (ехографски размер в мм)	Mean $\pm$ SD (range)	184.8 $\pm$ 40.5 (115–310)
Хемоглобин (g/L)	Mean $\pm$ SD (range)	99.1 $\pm$ 24.9 (50–161)
Левкоцити ( $\times 10^9/L$ )	Mean $\pm$ SD (range)	18.1 $\pm$ 19.1 (0.67–109.2)
Тромбоцити ( $\times 10^9/L$ )	Mean $\pm$ SD (range)	347.8 $\pm$ 397.9 (10–1836)
MCV (fL)	Mean $\pm$ SD (range)	90.1 $\pm$ 14.9 (54.70–144.5)

ЛДХ (U/L)	Mean $\pm$ SD (range)	1053.2 $\pm$ 780.9 (277–5296)
Серумно желязо (mmol/l)	Mean $\pm$ SD (range)	16.1 $\pm$ 12.6 (1.60–49.60)
Феритин ( $\mu$ g/l)	Mean $\pm$ SD (range)	877.2 $\pm$ 1913.9 (8.50–9494.7)
ТЖСК (mmol/l)	Mean $\pm$ SD (range)	48.1 $\pm$ 12.3 (14.1–74.4)
Хепсидин (ng/ml)	Mean $\pm$ SD (range)	87.3 $\pm$ 110.7 (0.9–536.2)
IL6 (pg/ml)	Mean $\pm$ SD (range)	22.9 $\pm$ 44.1 (-2.1–200)
IL8 (pg/ml)	Mean $\pm$ SD (range)	164.8 $\pm$ 413.2 (16.3–2000)
Трансфузия (единица/месец)	Mean $\pm$ SD (range)	1.3 $\pm$ 1.8 (0–6)
	Без трансфузия	42/61.8%
	< 3 трансфузии	13/19.1%
	> 3 трансфузии	13/19.1%
Лечение	Таргетна терапия (Ruxolitinib)	16/ 23,5%
	Циторедуктивна терапия (Hydroxyurea/ Interferon- $\alpha$ )	26/38,2%
	BSC (съпътстваща терапия)	26/38,2%
Еволюция на заболяването (разпределение спрямо дебюта)	< 1 година	31/45.5%
	1–5 години	23/33.8%
	> 5 години	14/20.7%

## 2. Сравняване серумните нива на хепсидин при пациенти с миелофиброза и здрави контроли

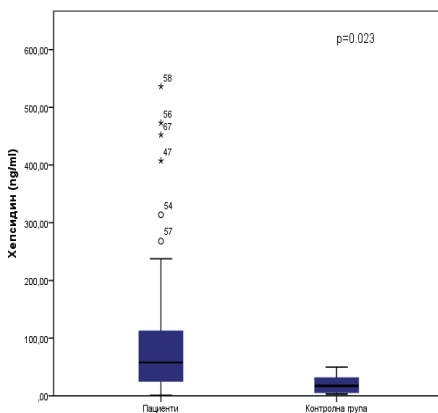
Поради липсата на референтни стойности за хепсидин чрез ROC curve анализ беше определена праговата стойност, която разграничава нивата на хепсидин при анализиранияте пациенти от здравите контроли (Фигура 1).



**Фигура 1.** Прагова стойност на хепсидин спрямо здрави контроли

За прагова стойност на хепсидин се прие 25.65 ng/ml (AUC = 0.876 (0.781–0.970)  $p < 0.001$ ), над която резултатите се отнасят за пациентите с МФ с чувствителност 75% и специфичност 75 %.

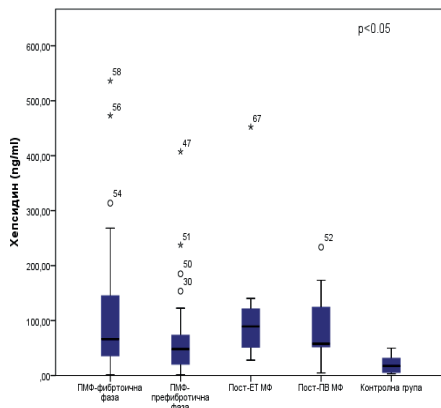
При пациентите с МФ средните нива на хепсидин са сигнификантно по-високи от тези при здрави контроли ( $99.05 \pm 115.99$  ng/ml;  $20.58 \pm 16.90$ ;  $t = 2.33$ ;  $p = 0.023$ ) (Фигура 2).



**Фигура 2.** Сравнителен анализ на средните серумни нива на хепсидин при пациенти с МФ и здрави контроли

Анализът според определената прагова стойност на хепсидин при пациенти и здрави контроли също установява сигнификантни различия между нивата на хепсидин в отделните групи ( $c^2 = 15.12$ ;  $p = 0.004$ ;  $r = 0.333$ ;  $p = 0.003$ ).

Сигнификантна разлика се открива между здрави контроли и пациенти с ПМФ-фибротична фаза ( $p = 0.011$ ) и между здрави контроли и ПМФ-префибротична фаза ( $p = 0.05$ ) (Фигура 3).



**Фигура 3.** Сравнителен анализ на пациенти с МФ, разпределени в групи спрямо класификация на СЗО от 2016 година и здрави контроли

### 3. Анализирание връзката на хепсидина с клинично-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите

#### 3.1. Връзка между хепсидин и демографски характеристики

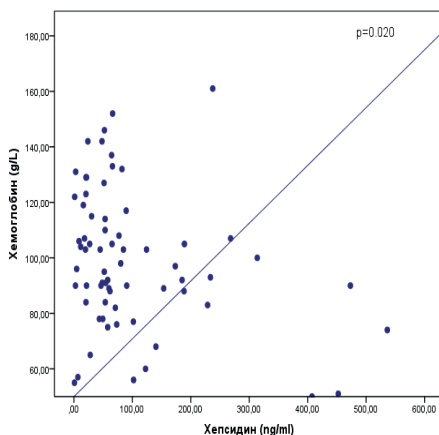
Не се намери връзка между средните стойности на хепсидин и възрастовото разпределение на пациентите. При пациенти > 65 години се регистрират по-високи стойности на хепсидин в сравнение с пациен-

ти < 65 години, без разликата да е сигнификантна ( $102.1 \pm 115.3$  ng/ml;  $92.6 \pm 119.7$  ng/ml;  $p = 0.75$ ).

Не се установи връзка между средните нива на хепсидин и разпределението по пол.

### 3.2. Връзка между хепсидин и хемоглобин

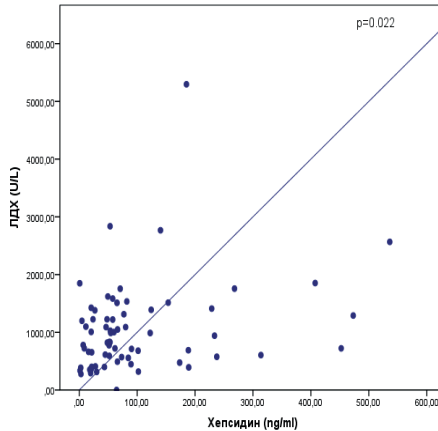
Установи се сигнификантна обратно-пропорционална връзка между средните стойности на хепсидин и хемоглобин ( $r = -0.282$ ;  $p = 0.020$ ) (Фигура 4).



Фигура 4. Корелация между хепсидин (ng/ml) и хемоглобин (g/L)

### 3.3. Връзка между хепсидин и ЛДХ

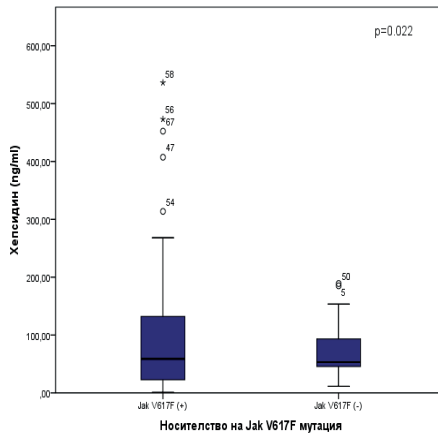
Доказа се сигнификантна правопрпорционална зависимост между нивата на хепсидин и ЛДХ ( $r = 0.279$ ;  $p = 0.022$ ) (Фигура 5).



**Фигура 5.** Корелация между хепсидин (ng/ml) и ЛДХ (U/L)

### 3.4. Връзка между хепсидин и носителство на Jak2 V617F мутация

Положителните за Jak2 V617F мутация пациенти имат значимо по-високи нива на хепсидин спрямо отрицателните пациенти ( $110.4 \pm 132.9$  ng/ml;  $79.1 \pm 55.5$  ng/ml;  $p = 0.022$ ) (Фигура 6).

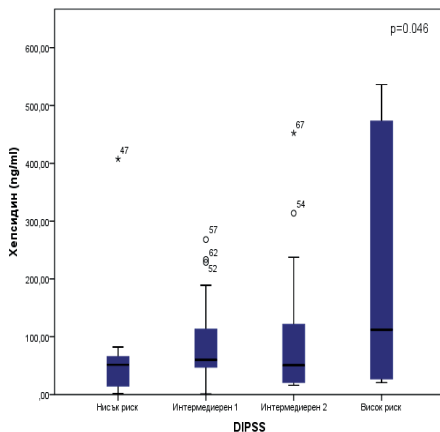


**Фигура 6.** Сравнителен анализ на средни стойности на хепсидин спрямо носителство на Jak2 V617F мутация



### 3.5. Връзка между хепсидин и рисков профил спрямо DIPSS

Пациентите с висок риск според DIPSS имат сигнификантно по-високи нива на хепсидин (между 2 и 6 пъти) спрямо пациентите с нисък, интермедиерен 1 и интермедиерен 2 риск ( $p = 0.046$ ) (Фигура 7a и 7b)



**Фигура 7a.** Сравнителен анализ на средни стойности на хепсидин спрямо рисков профил според DIPSS

#### ANOVA

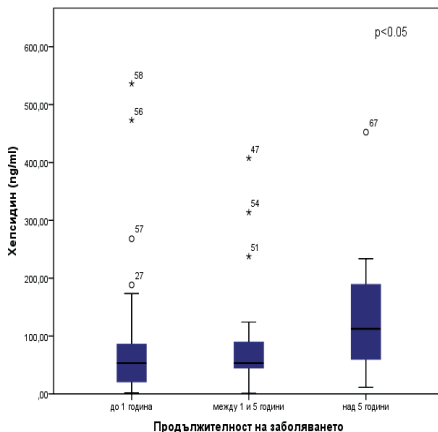
##### Хепсидин

	Сума от квадрати	Степен на свобода (df)	Квадрат	F – тест	Степен на сигнификантност (Sig.)
Между групи	104987,051	3	34995,684	2,812	0,046
Сред групи	796528,759	64	12445,762		
Общо	901515,810	67			

**Фигура 7b.** Дисперсионен анализ за зависимост между хепсидин и рисков профил спрямо DIPSS

### 3.5. Връзка между хепсидин и продължителност на заболяването

Пациентите с продължителност на заболяването над 5 години имат сигнификантно по-високи стойности на хепсидин спрямо пациентите с продължителност до 1 година и между 1 и 5 години ( $137.9 \pm 117.9$  ng/ml;  $90.4 \pm 125.4$  ng/ml;  $86.9 \pm 100.4$  ng/ml;  $p < 0.05$ ) (Фигура 8).



**Фигура 8.** Сравнителен анализ на средни стойности на хепсидин спрямо продължителност от дебюта на заболяването

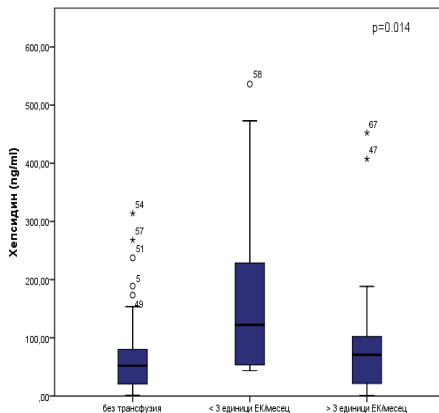
### 3.6. Връзка между хепсидин и симптоми

Въпреки че не се доказва сигнификантна разлика в нивата на хепсидина според наличието на симптоми, се установи тенденция пациентите, които са безсимптомни, да имат по-ниски нива на хепсидин ( $89.5 \pm 105.4$  ng/ml;  $107.1 \pm 125.1$  ng/ml;  $p = 0.53$ )

### 3.7. Връзка между хепсидин и трансфузионните нужди

Установи се правопрпорционална значима зависимост между нивата на хепсидин и броя хемотрансфузии месечно ( $r = 0.283$ ;  $p = 0.019$ ).

Пациентите без трансфузионни нужди имат значимо по-ниски нива на хепсидин в сравнение с тези, които се трансфузират с < 3 и > 3 единици ЕК/месечно ( $70.3 \pm 71.6$  ng/ml;  $173.2 \pm 162.2$  ng/ml;  $117.6 \pm 148.4$  ng/ml;  $p = 0.014$ ) (Фигура 9а и 9б)



**Фигура 9а.** Сравнителен анализ на средни стойности на хепсидин спрямо трансфузионните нужди на пациентите

## ANOVA

### Хепсидин

	Сума от квадрати	Степен на свобода (df)	Квадрат	F – тест	Степен на сигнификантност (Sig.)
Между групи	110692,600	2	55346,300	4,549	0,014
Сред групи	790823,210	65	12166,511		
Общо	901515,810	67			

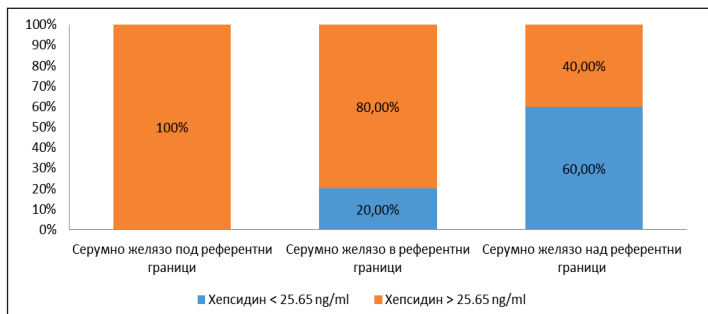
**Фигура 9б.** Дисперсионен анализ за зависимост между хепсидин и трансфузионни нужди на пациентите

## 3.8. Връзка между хепсидин и серумно желязо

Не се установи връзка между нивата на хепсидин и нивата на желязо.

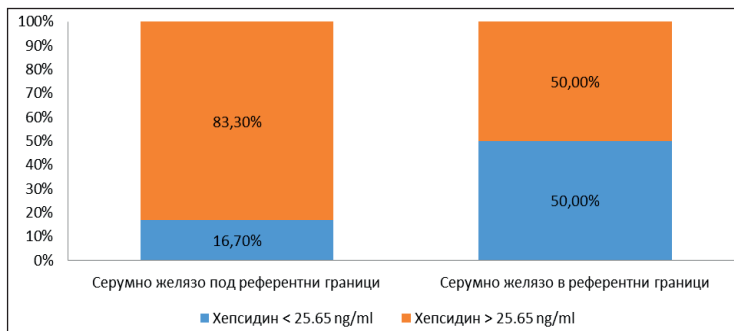
Такава не беше намерена и спрямо праговите стойности на хепсидина.

При оценка на зависимостта между двата показателя според подвида на миелофиброза спрямо класификацията на СЗО от 2016 г. се установи, че при пациентите с ПМФ-фибротична фаза има умерена сигнификантна обратнопропорционална зависимост между серумните нива на желязо и хепсидин ( $r = -0.435$ ;  $p = 0.034$ ) (Фигура 10).



**Фигура 10.** Процентно разпределение над и под праговата стойност на хепсидин при пациенти с ПМФ-фибротична фаза според нивата на серумно желязо (референтни граници от 9–30  $\mu\text{mol/l}$ )

Умерена значима обратнопропорционална зависимост между серумните нива на желязо и хепсидин беше установена и при пациентите с пост-ПВ МФ ( $r = -0.333$ ;  $p = 0.042$ ) (Фигура 11).

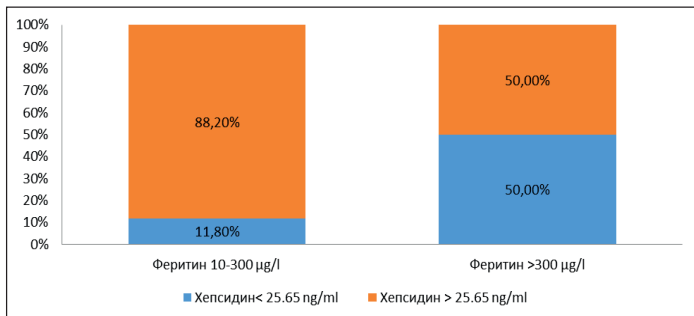


**Фигура 11.** Процентно разпределение над и под праговата стойност на хепсидин при пациенти с пост-ПВ МФ спрямо нивата на серумно желязо (референтни граници от 9–30  $\mu\text{mol/l}$ )

### 3.9. Връзка между хепсидин и феритин

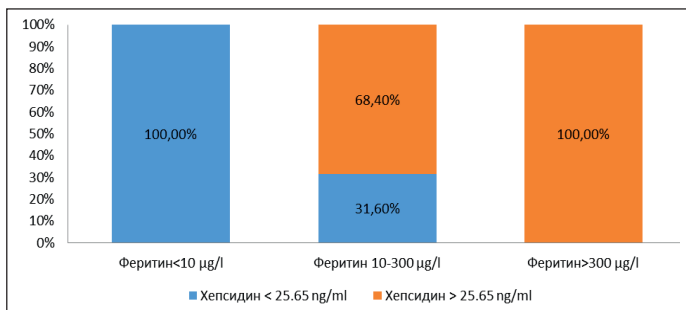
Не се установи сигнификантна връзка между хепсидина и феритина. Такава не се откри и спрямо праговата стойност на хепсидина.

При болните с фибротична фаза на МФ 88.20% са с референтни стойности на феритин и надпрагови стойности на хепсидин ( $> 25.65$  ng/ml). Една втора от пациентите със стойности на феритин над горната граница са с надпрагови нива на хепсидин (Фигура 12).



**Фигура 12.** Процентно разпределение над и под праговата стойност на хепсидин при пациенти с ПМФ-фибротична фаза спрямо серумните нива на феритин (референтни стойности от 10–300 µg/l)

При пациентите с ПМФ-префибротична фаза се установи, че високите стойности на феритин са свързани с нива на хепсидина над праговата стойност (Фигура 13).



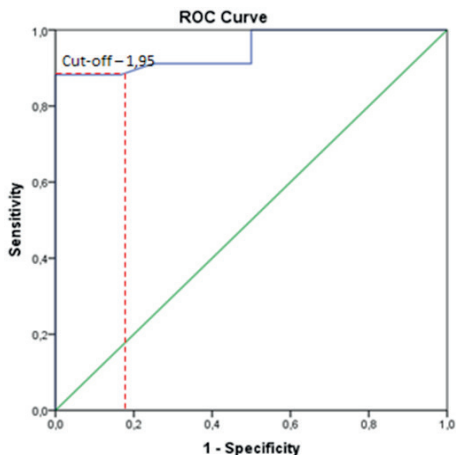
**Фигура 13.** Процентно разпределение над и под праговата стойност на хепсидин при пациенти с ПМФ-префибротична фаза спрямо серумните нива на феритин (референтни стойности от 10–300 µg/l)

Не се установи връзка между нивата на хепсидина и проведеното лечение.

Не беше установена връзка и между хепсидина и тромбоцитен брой, левкоцитен брой, MCV, размер на слезката, степен на фиброза и ТЖСК.

#### 4. Сравняване серумните нива на IL-6 и IL-8 при пациенти с миелофиброза и здрави контроли

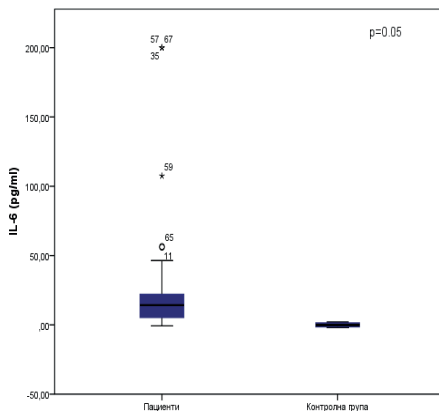
Поради липсата на референтни стойности на IL-6 за здрави индивиди чрез ROC curve се определи праговата стойност, която разграничава нивата на IL-6 при анализираниите пациенти от здравите контроли (Фигура 14).



Фигура 14. Прагова стойност на IL-6 спрямо здрави контроли

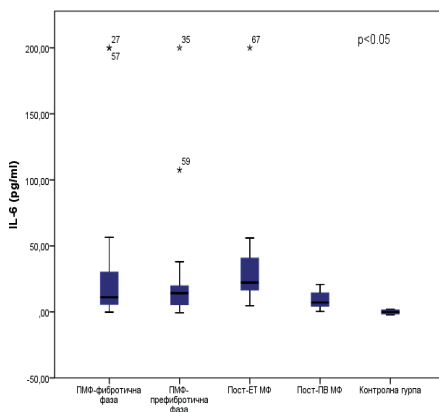
За прагова стойност на IL-6 се прие 1.95 pg/ml ( $AUC = 0.950$  ( $0.904-0.996$ )  $p < 0.001$ ), над която резултатите се отнасят за пациенти с МФ с чувствителност 88.2 % и специфичност 91.7 %.

Средните стойности на IL-6 при анализираниите пациенти са сигнификантно по-високи от тези при здравите доброволци ( $26.96 \pm 46.73$  pg/ml;  $-0.03 \pm 1.68$  pg/ml;  $t = 1.99$ ;  $p = 0.05$ ) (Фигура 15).



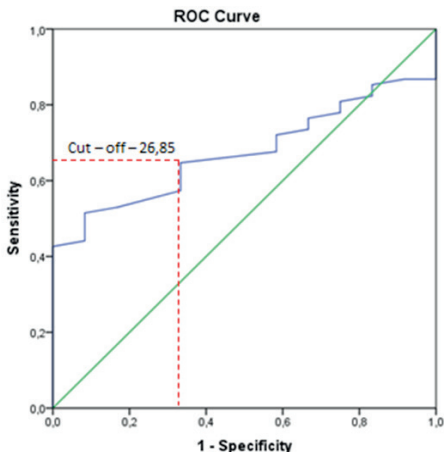
**Фигура 15.** Сравнителен анализ на средните серумни нива на IL-6 при пациенти с МФ и здрави контроли

Средните стойности на IL-6 при пациенти с МФ, разпределени в групи спрямо класификацията на СЗО от 2016 г., са значимо по-високи от тези при здрави контроли, като сигнификантна разлика се открива между здрави контроли и пациенти с ПМФ-фибротична фаза ( $p = 0.036$ ) и между здрави контроли и пациенти с пост-ПВ МФ ( $p = 0.028$ ) (Фигура 16).



**Фигура 16.** Сравнителен анализ на пациенти с МФ, разпределени в групи спрямо класификацията на СЗО от 2016 година и здрави контроли

Поради липсата на референтни стойности на IL-8 за здрави индивиди чрез ROC curve анализ се определи праговата стойност, която разграничава нивата на IL-8 при анализираните пациенти от здравите контроли (Фигура 17).

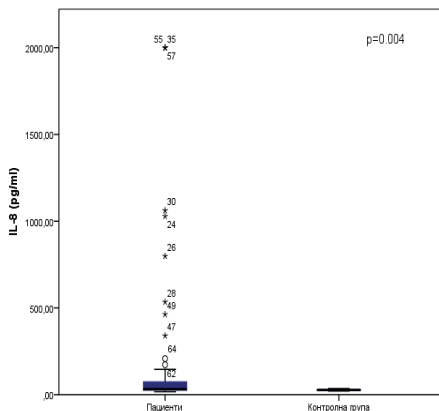


**Фигура 17.** Праговата стойност на IL-8 спрямо здрави контроли

За прагова стойност на IL-8 се прие 26.85 pg/ml ( $AUC = 0.674$  ( $0.555-0.793$ )  $p = 0.056$ ), резултатите се отнасят за пациенти с МФ с чувствителност 64.7 % и специфичност 66.7 %.

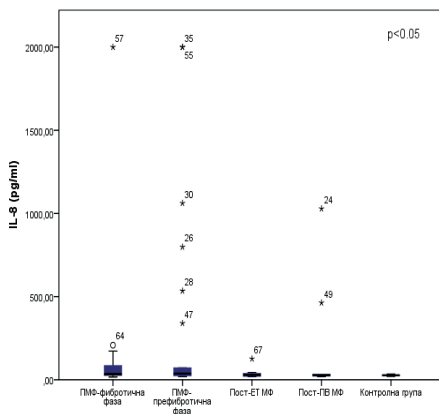
Средните стойности на IL-8 при анализираните пациенти са значително по-високи от тези при здравите контроли ( $189.18 \pm 444.13$  pg/ml;  $12.65 \pm 4.05$  pg/ml;  $t = 3.02$ ,  $p = 0.004$ ) (Фигура 18).





**Фигура 18.** Сравнителен анализ на средните серумни нива на IL-8 при пациенти с МФ и здрави контроли

Установи се, че средните стойности на IL-8 при пациенти с МФ, разпределени спрямо класификацията на СЗО от 2016 година, са значимо по-високи от тези при здрави контроли, като сигнификантна разлика се открива между здрави контроли и пациенти с ПМФ-фибротична фаза ( $p = 0.004$ ) и между здрави контроли и пациенти с ПМФ-префибротична фаза ( $p < 0.014$ ) (Фигура 19).



**Фигура 19.** Сравнителен анализ на пациенти с МФ, разпределени в групи спрямо класификация на СЗО – 2016 година и здрави контроли

## 5. Анализирани връзката на IL-6, IL-8 и клинично-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите

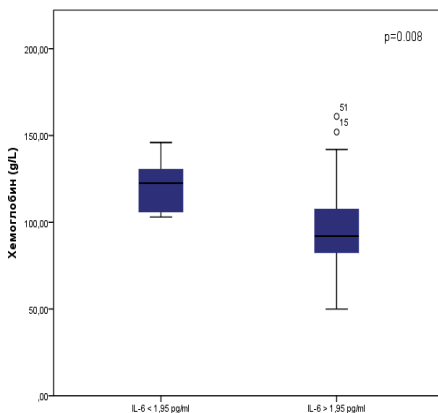
### 5.1. Връзка между IL-6 и демографски характеристики

Не се намери сигнификантна връзка между средните стойности на IL-6 и възрастовото разпределение на пациентите ( $p = 0.86$ ). Такава не беше установена и между пола и средните стойности на IL-6 ( $p = 0.58$ ).

### 5.2. Връзка между IL-6 и хемоглобин

Не се установи зависимост между средните нива на IL-6 и хемоглобин.

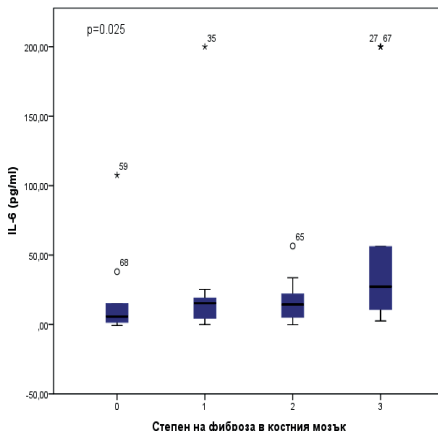
Беше намерена сигнификантна разлика между нивата на хемоглобина при пациентите с под- и надпрагова стойност на IL-6 ( $t = 2.74$ ;  $p = 0.008$ ) (Фигура 20).



Фигура 20. Сравнителен анализ между средните нива на IL-6 (pg/ml) и хемоглобина (g/L)

### 5.3. Връзка между IL-6 и степен на фиброза в костния мозък

Нивата на IL-6 са сигнификантно по-високи при пациенти със степен на фиброза 3 в сравнение с останалите степени ( $60.4 \pm 77.3$  pg/ml;  $p = 0.025$ ) (Фигура 21a и 21b).



**Фигура 21a.** Сравнителен анализ между средните нива на IL-6 и степен на фиброза в костния мозък

ANOVA

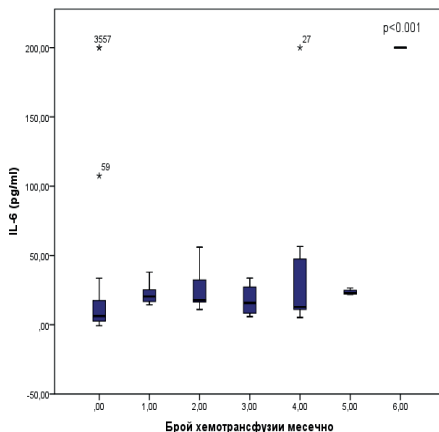
IL-6

	Сума от квадрати	Степен на свобода (df)	Квадрат	F – тест	Степен на сигнификантност (Sig.)
Между групи	20487,892	3	6829,297	3,331	0,025
Сред групи	125048,682	61	2049,978		
Общо	145536,574	64			

**Фигура 21b.** Дисперсионен анализ за зависимост между IL-6 и степен на фиброза в костния мозък

## 5.4. Връзка между IL-6 и трансфузионните нужди

Доказа се силна сигнификантна зависимост между стойностите на IL-6 и броя на хемотрансфузиите месечно ( $r = 0.488$ ;  $p < 0.001$ ) (Фигура 22).

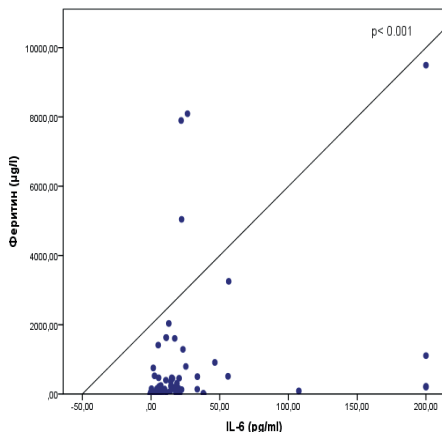


**Фигура 22.** Сравнителен анализ между средните нива на IL-6 и броя хемотрансфузии месечно

Не се установи разлика в нивата на хепсидина спрямо разпределението на пациентите в групи без хемотрансфузии  $< 3$  единици ЕК/месечно и  $> 3$  единици ЕК/месечно.

## 5.5. Връзка между IL-6 и феритина

Феритинът корелира правопрпорционално с IL-6 ( $r = 0.454$ ;  $p < 0.001$ ) (Фигура 23).



**Фигура 23.** Корелация между IL-6 (pg/ml) и феритин (µg/l)

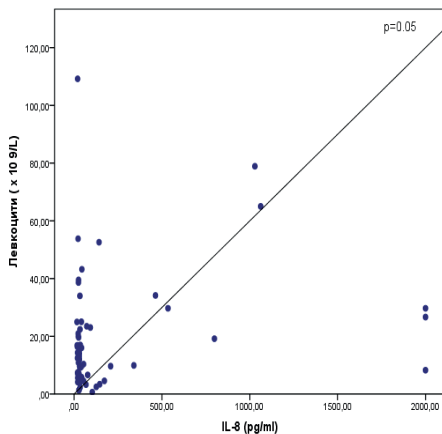
Не беше намерена връзка между нивата на IL-6, ЛДХ, левкоцитен брой, MCV, размери на слезката, носителство на Jak2 V617F мутация, DIPSS, симптоматична болест, продължителност на заболяването и проведеното лечение. Не се установи зависимост и между IL-6, серумно желязо и ТЖСК.

## **5.6. Връзка между IL-8 и демографски характеристики на пациентите**

Установиха се значимо по-високи средни стойности на IL-8 при мъже в сравнение с жени ( $232.4 \pm 469.8$  pg/ml;  $114.8 \pm 393.9$  pg/ml;  $p < 0.05$ ) и при пациенти  $> 65$  години в сравнение с тези  $< 65$  години ( $224.6 \pm 522.6$  pg/ml;  $115.0 \pm 188.5$  pg/ml;  $p < 0.05$ ).

## **5.7. Връзка между IL-8 и левкоцити**

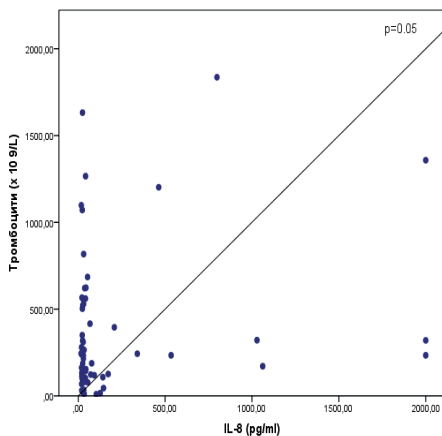
Стойностите на IL-8 корелират правопрпорционално със стойностите на левкоцитите ( $r = 0.238$ ;  $p = 0.05$ ) (Фигура 24).



**Фигура 24.** Корелация между левкоцити ( $\times 10^9/L$ ) и IL-8 (pg/ml)

## 5.8. Връзка между IL-8 и тромбоцити

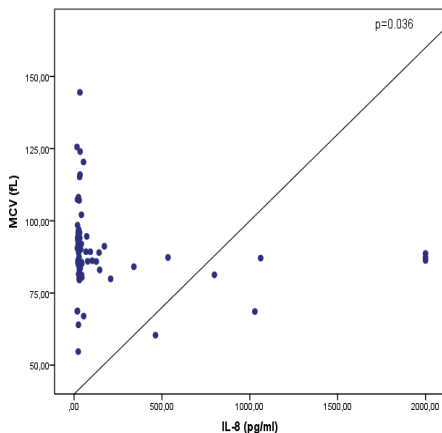
Повишените нива на IL-8 корелират правопрпорционално и с високи стойности на тромбоцитите ( $r = 0.234$ ;  $p = 0.05$ ) (Фигура 25).



**Фигура 25.** Корелация между тромбоцити ( $\times 10^9/L$ ) и IL-8 (pg/ml)

## 5.9. Връзка между IL-8 и MCV

Беше установена обратнопропорционална зависимост между нивата на IL-8 и MCV ( $r = -0.254$ ;  $p = 0.036$ ) (Фигура 26).



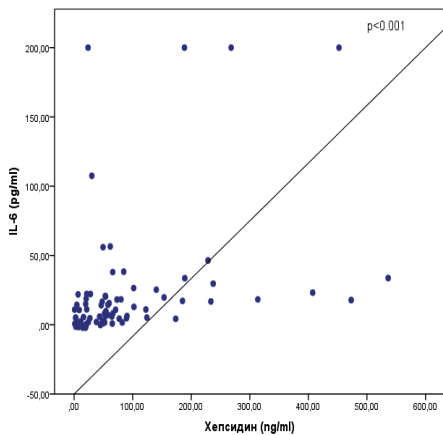
**Фигура 26.** Корелция между IL-8 (pg/ml) и MCV (fL)

Не се установи значима връзка между нивата на IL-8 и хемоглобина. Не беше намерена връзка и между нивата на IL-8 и размер на слезката, носителството на Jak2 V617F мутация, DIPSS, степен на фиброза, наличие на симптоми, продължителност на заболяването и проведено лечение.

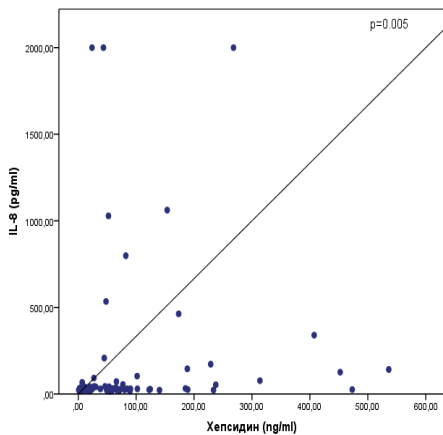
Не беше намерена връзка между IL-8 и феритин, желязо и ТЖСК.

## 6. Анализирание на връзката между серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 в изследваната група пациенти

Корелационен анализ между нивата на хепсидин, IL-6 и IL-8 установи силна правопрпорционална зависимост между хепсидин и IL-6 ( $r = 0.533$ ;  $p < 0.001$ ) и умерена правопрпорционална зависимост между хепсидин и IL-8 ( $r = 0.314$ ;  $p = 0.005$ ) (Фигура 27 и 28). Откри се и сигнификантна позитивна зависимост между между IL-6 и IL-8 ( $r = 0.257$ ;  $p = 0.021$ ) (Фигура 29).

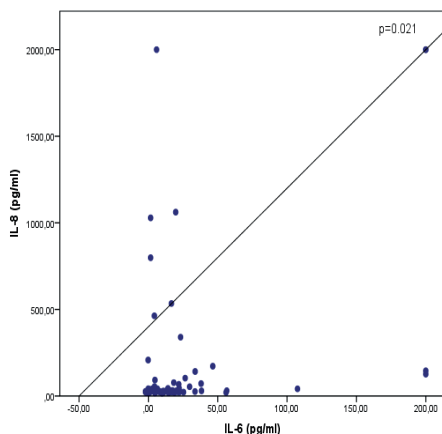


**Фигура 27.** Корелция между хепсидин (ng/ml) и IL-6 (pg/ml)



**Фигура 28.** Връзка между хепсидин (ng/ml) и IL-8 (pg/ml)





Фигура 29. Връзка между IL-6 (pg/ml) и IL-8 (pg/ml)

## 7. Анализирани потенциала на серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 за прогностични маркери по отношение на възникване и задълбочаване на анемичния синдром и общата преживяемост

Установи се, че нивата на хепсидин над определената прагова стойност (25.65 ng/ml) са свързани с три пъти по-висок риск от развитието на анемия (RR = 3.00 (1.115–8.070);  $p = 0.001$ ).

Установи се, че нивата на IL-6 над праговата стойност (1.95 pg/ml) са свързани с десет пъти по-висок риск от развитието на анемия (RR = 10.58 (1.62–69.28);  $p < 0.001$ ).

Установи се, че нивата на IL-8 над праговата стойност (26.85 pg/ml) са свързани с близо два пъти по-висок риск от развитието на анемия (RR = 1.89 (0.835–4,309);  $p < 0.05$ ).

Общата преживяемост на пациентите се свързва с нива на хепсидина над определената праговата стойност ( $> 25.65$  ng/ml), като те водят до по-висок риск от смърт при тези болни (OR = 1.08 (1.002–1.176)). Над 76.9% от починалите са с нива на хепсидин над праговата стойност.

Общата преживяемост на пациентите се свързва с нива на IL-6 над

праговата стойност ( $> 1.95$  pg/ml), като те водят до по-висок риск от смърт при тези болни (OR = 1.07 (1.001–1.146)). При 88.4% от починалите пациенти се откриват нива на IL-6 над праговата стойност.

Връзка между стойностите на IL-8 и преживяемостта на пациентите не се откри.

## **8. Разработване на рисков профил, включващ хепсидин, IL-6 и IL-8 и връзката му с клинично-лабораторни характеристики на пациентите**

Беше определен рисков профил на пациентите, който включва хепсидин, IL-6 и IL-8 в стойности над определената прагова за трите параметъра в анализирания група. При 47,1% от изследваните пациенти нивата на хепсидин, IL-6 и IL-8 са установени едновременно над праговата стойност.

### **8.1. Връзка между рисков профил и демографски характеристики на пациентите**

Установи се, че няма връзка между рисковия профил и възраст на пациентите над 65 години.

Определеният рисков профил корелира с мъжки пол (OR = 1.58 (0.814–3.068)  $p = 0.013$ ).

### **8.2. Връзка между рисков профил и разпределение спрямо СЗО 2016 година**

Спрямо класификацията на СЗО 2016 година в рисковия профил попадат 14 пациенти с МФ-фибротична фаза (51.9% от всички пациенти в тази група); 12 пациенти с МФ-префибротична фаза (48.0% от всички пациенти в тази група); 7 пациенти с пост-ЕТ МФ ( 57.1% от всички пациенти в тази група) и 9 пациенти с пост-ПВ МФ (22.2% от всички пациенти в тази група). Не се открива сигнификантна зависимост между рисковия профил и разпределението спрямо СЗО-2016 година.

### **8.3. Връзка между рисков профил и разпределение спрямо DIPSS**

Спрямо разпределението по DIPSS в рисковия профил попадат 6 пациенти с висок риск (50.0% от всички пациенти в тази група); 18 пациенти с интермедиерен 2 риск (51.4% от всички пациенти в тази група) и 11 пациенти с интермедиерен 1 риск ( 50.0% от всички пациенти в тази група). От групата на пациентите с нисък риск никой не попада в определения рисков профил. Не се открива сигнификантна зависимост между рисковия профил и разпределението спрямо разпределението по DIPSS.

### **8.4. Връзка между рисков профил и носителство на Jak2 V617F мутация**

При пациентите, които са позитивни за Jak2 V617F мутация, се наблюдава тенденция за едновременно завишени стойности на хепсидин, IL-6 и IL-8. Връзката между мутацията и определения рисков профил не е статистически значима (OR = 1.35 (0.422–4.319)  $p = 0.416$ ).

### **8.5. Връзка между рисков профил и фиброза в костния мозък**

Наличието на фиброза в костния мозък е рисков фактор за включване на пациента в рисковия профил, като с най-голямо значение е фиброза степен 3 (OR = 2.25 (0.527–9.613)  $p = 0.022$ ). Наличието на фиброза 3-та степен води до 2.25 пъти по-висок риск от попадане на пациента в рисковия модел.

### **8.6. Връзка между рисков профил и лабораторни характеристики на пациентите**

Пациентите, които попадат в рисковия профил, имат по-висок риск от развитие на анемия (OR = 1.24 (0.438–3.536)  $p = 0.046$ ). Средната стойност на хемоглобина при тези болни е  $95.7 \pm 25.66$  g/L. Същата зависимост се наблюдава и спрямо тромбоцитен брой. Пациентите в

рисковия модел са с по-висок риск от развитие на тромбоцитопения (OR = 2.80 (1.041–7.530) p = 0.024). Средната стойност на тромбоцитите при тези болни е  $70.13 \pm 43.57 \times 10^9/L$ . Подобна зависимост не се открива с левкоцитен брой, ЛДХ, МСВ.

При пациентите в рисковия модел установяването на завишени стойности на феритин (определени като серумен феритин > 500 µg/l) е с по-висок риск (OR = 2.22 (0.716–6.899) p = 0.017). Средната стойност на феритина при болните в рисковия профил е  $1280.93 \pm 2412.12$  µg/l. Не се установи връзка със серумно желязо и ТЖСК.

### **8.7. Връзка между рисков профил и наличие на симптоми**

Попадането на пациентите в рисковия профил води до 2.27 по-висок риск от развитие на симптоми (OR = 2.27 (0.858–6.030) p = 0.078).

### **8.8. Връзка между рисков профил и лечение**

Спрямо разпределението в групи според проведеното лечение в рисковия профил попадат 26 пациенти, които са на съпътстваща терапия (50.0% от всички пациенти в тази група); 26 пациенти на лечение с циторедуктивна терапия (38.5% от всички пациенти в тази група) и 16 пациенти на лечение с Ruxolitinib (56.2% от всички пациенти в тази група). Не се открива сигнификантна зависимост между рисковия профил и разпределението спрямо проведено лечение.

### **8.9. Връзка между рисков профил и трансфузионна зависимост**

Установи се, че пациентите, попадащи в рисковия модел имат средно 2 трансфузии/месечно в сравнение с останалите пациенти, при които броят трансфузии е под 1 трансфузия/месечно (0.88 трансфузии/месечно) (OR = 2.01 (0.743–5.410) p = 0.016). Спрямо разпределението на пациентите в зависимост от трансфузионните нужди в рисковия профил попадат 42 пациенти, които са трансфузионни независими (40.5% от всички пациенти в тази група); 13 пациенти, кои-

то получават < 3 трансфузии/месечно (53.8% от всички пациенти в тази група) и 13 пациенти, които получават > 3 трансфузии/месечно (61.5% от всички пациенти в тази група).

### **8.10. Връзка между рисков профил и продължителност на заболяването**

Установи се, че пациентите в рисковия модел са с продължителност на заболяването над 1 година (OR = 2.38 (0.894–6.371) p = 0.021). Спрямо разпределението на пациентите в зависимост от продължителността на заболяването в рисковия профил попадат 31 пациенти с продължителност на заболяването < 1 година (35.5% от всички пациенти в тази група); 23 пациенти с продължителност на заболяването между 1–5 години (56.5% от всички пациенти в тази група) и 14 пациенти с продължителност на заболяването > 5 години (57.1% от всички пациенти в тази група).

Не се установи зависимост между рисковия модел, трансформация на заболяването и общата преживяемост.

Определеният рисков профил се установява при пациенти със следните характеристики на заболяването:

1. Мъжки пол (71.2% от пациентите)
2. Носителство на Jak2 V617F мутация (73.3% от пациентите)
3. Фиброза степен 3 в костния мозък ( 64.3% от пациентите)
4. Наличие на анемия (81.8% от пациентите) и тромбоцитопения (58.3% от пациентите)
5. Стойности на феритин > 500 µg/l (58.8% от пациентите)
6. Наличие на симптоми (58.1% от пациентите)
7. Трансфузионни нужди > 2 единици ЕК/месечно (88.4% от пациентите)
8. Продължителност на заболяването > 1 година (65.6% от пациентите)

## V. ДИСКУСИЯ

### 1. Роля на хепсидина в патогенезата и протичането на анемичния синдром

Анемията при МФ е неизменен фактор за прогноза при определяне на риска. Стойности на хемоглобина  $< 100$  g/L и наличието на хемотрансфузионни нужди носят независима прогностична стойност според DIPSS-Plus скоринговата система (Pardanani A. Et al. 2013). Нарушената желязна хомеостаза би могла да повлияе патогенезата на анемичния синдром при МФ. Участие в дисрегулацията на желязната хомеостаза има хепсидинът, чийто анализ при болни с МФ може да доведе до изясняване на редица механизми при възникване и задълбочаване на анемичния синдром.

В нашия анализ се установи, че стойностите на хепсидин при пациентите са значимо по-високи в сравнение с контролната група както в цялата пациентска популация, така и в подгрупите болни, разпределени спрямо класификацията на СЗО от 2016 година. Подобен резултат е представен през 2013 година от Pardanani и сътрудници, които анализират стойности на хепсидин при новодиагностицирани пациенти с МФ и установяват статистически значима разлика в нивата на хепсидина при пациентите и здрави контроли (Pardanani A et al. 2013). Проучване от 2018 година на Zhou и сътрудници, което анализира стойности на хепсидин в група от 99 пациенти с МФ също установява значимо по-високи стойности на хепсидина в пациентската група спрямо здравите доброволци (Amy Zhou et al. 2018).

Поради липсата на референтни стойности за хепсидина, чрез ROC curve анализ беше определена прагова стойност за анализираната пациентска група от 25.65 ng/ml. Установи се, че високите стойности на хепсидин при изследваните пациенти са свързани с по-ниски стойности на хемоглобин, като връзката е статистически значима. Подобни резултати са описани и в анализа на Pardanani и сътрудници, където повишените стойности на хепсидин се асоциират със стойности на хемоглобин под 100 g/L (Pardanani A et al. 2013). От своя страна

анализът на Zhou показва тенденция за връзка между по-високите стойности на хепсидин и по-ниските стойности на хемоглобин, като тя не е статистически значима, което авторите обясняват с недостатъчен брой анализирани болни (Amy Zhou et al. 2018). За разлика от тях, ние установихме, че нива на хепсидин над определената прагова стойност за анализирания група са свързани с три пъти по-висок риск от анемия, което обяснява и обратнопропорционалната сигнификантната връзка между хепсидина и хемоглобина в цялата популация. Анализ на Birgegarg и сътрудници, който има за цел да проучи ролята на функционалния железен дефицит при МФ, също показва, че стойностите на хепсидина са значимо по-високи при пациентите с анемия. Освен в групата на 53 анемични от 80 анализирани пациенти, негативна корелация между хемоглобина и хепсидина със статистическа значимост се потвърждава при всички болни (Birgegarg G et al. 2019).

Не беше установена връзка между нивата на хепсидин и останалите параметри на ПМК – тромбоцити, левкоцити и MCV. Подобни резултати са описани и в проучването на Pardanani, където няма корелация между хепсидиновите нива и левкоцити  $> 25 \times 10^9/L$  и тромбоцити  $< 100 \times 10^9/L$  (Pardanani A et al. 2013).

По отношение на връзката между стойностите на хепсидина и основни клиничко-лабораторни характеристики на пациентите ние установихме значима правопрпорционална връзка между хепсидин и ЛДХ, носителство на Jak2 V617F мутация, висок риск според DIPSS и по-продължителна еволюция на заболяването ( $> 5$  години от поставяне на диагнозата). Описаната зависимост е от голямо значение за изграждането на клинични модели за определяне на ролята му в развитието, проявите на активност на заболяването и вероятността за възникване или задълбочаване на анемичния синдром. Сходни резултати са представени и в литературата, където по-високите стойности на хепсидин са неизменно свързани с по-висок риск според DIPSS. Високият риск по DIPSS и желязното натрупване при тези болни се считат за допълнителни значими механизми на стимулиране секретията на хепсидин, паралелно с инфламаторни сигнали и повишен еритропоетичен стимул (Pardanani A et al. 2013).

Нашият анализ показва, че носителството на Jak2 V617F мутация корелира правопрпорционално с високите хепсидинови нива. Вероятна-

та връзка на Jak2 и желязния метаболизъм е описана от De Dominico и сътрудници, които демонстрират, че образуването на комплекса хепсидин/феропортин в резултат от активация на Jak2 е необходима за последващата интернализация и деградация на феропортина. Неслучайно механизми на повишена стимулация на Jak2 гена се обсъждат в генезата на анемия при хронично възпаление, като той допринася за свръхекспресията на хепсидин и произлизащия от това функционален желязен дефицит (De Domenico I et al. 2012). Тези познати механизми на патогенезата на анемията, свързана с хронично възпаление (участието на провокираната от Jak2 повишена транскрипция на хепсидиновия ген, стимулацията на хепсидинова 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 (Pardanani A et al. 2013), (Strati P et al. 2014). Това обуславя и ролята на таргетната терапия (Jak инхибитори) в повлияването на хепсидиновата секреция и възникващите от нея патофизиологични процеси на желязна дисрегулация и неефективна еритропоеза при болни с МФ. Няколко предклинични и клинични проучвания с Momelotinib показват понижаване стойностите на хепсидин след прием на медикамента, както и свързано с това стабилно във времето повишаване стойностите на серумно желязо, трансферин, хемоглобин, хематокрит и ретикулоцити. Фаза 2 проучване на пациенти с МФ, лекувани с Momelotinib, доказва ролята му в повлияване на анемичния синдром при болни, които от хронично хемотрансфузирани стават трансфузионно независими (Stephen T Oh et al. 2018).

Правата зависимост на хепсидин с някои основни показатели на активност и по-продължителна еволюция на заболяването като ЛДХ, наличие на конституционални симптоми и по-дълъг период на болест също са очакван резултат и биха могли косвено да се интерпретират в контекста на развитието и задълбочаването на анемията, влошеното качество на живот и кумулирането на свързаните с болестта ефекти в хода на нейното протичане.

В анализираната от нас група пациенти се наблюдава тенденция за обратна зависимост между нивата на желязо и хепсидиновите нива, като такава се открива предимно в подгрупите на ПМФ-фибротична фаза и пост-ПВ МФ, където пациентите с установено ниско серумно



желязо имат стойности на хепсидин над определената прагова граница от 25.65 ng/ml (при всички болни с ПМФ-фибротична фаза и при над 80% от болните в пост-ПВ МФ). За разлика от това пациентите, при които има високи серумни нива на желязо, показват стойности на хепсидин над праговата – 40% при ПМФ – фибротична фаза и 50% при пост-ПВ МФ. Обратнопорпорционалната връзка между серумните нива на желязо и хепсидин е косвен белег за желязна дисрегулация.

Обичайно адекватната регулация на желязната хомеостаза показва, че повишените плазмени и чернодробни нива на желязо водят до индуциране синтеза на хепсидин (връзката е правопрпорционална), подобно на ефекта на възпалителните стимули, докато еритропоетичната активност потиска продукцията му (Hentze MW et al. 2010). Стимулираната еритропоеза в резултат повишава запасите на желязо чрез абсорбция и отделяне от депата за собствени нужди. Този патологичен механизъм е от съществено значение за заболявания с неефективна еритропоеза, където процентът на еритроидните прекурсори е значително увеличен, но те не узряват, а са подложени на апоптоза. Счита се, че продукцията на GDP15 от еритроидните прекурсори води до потискане експресията на хепсидин, като това е основен механизъм за желязно натрупване при бета-таласемия (Tanno T et al. 2007) и вероятно може да се приложи и при други заболявания с неефективна еритропоеза. Подобен механизъм би могъл да обясни нарушената, парадоксална регулация на хепсидиновата секреция, наблюдавана и при изследваните пациенти с МФ.

По отношение на взаимовръзката между хепсидин и феритин се наблюдава малко по-различна зависимост. Отново при болните с фибротична фаза на МФ повишените нива на феритин са обвързани и с надпрагови нива на хепсидин, въпреки че и при феритин в по-ниски граници болните демонстрират стойности на хепсидина над 25.65 ng/ml. Феритинът се приема за основен показател за капацитета на железните депа и косвен такъв за липсата или излишъка на желязо. Именно липсата на правопрпорционална зависимост между феритин/хепсидин при тези болни е счетена за индикатор за нарушена регулация. Предвид някои сходни патогенетични механизми при двата вида миелоидни неоплазии, като например наличието на неефективна еритропоеза, сходните резултати по отношение на експресията на

хепсидин и предхождащите и последващи това процеси са вероятно очакван момент.

При пациентите с ПМФ-префибротична фаза се наблюдава по-скоро обратна тенденция, показваща сравнително запазената регулация на хепсидина спрямо феритиновите нива. При тези пациенти връзката между феритин и хепсидин е права и пациентите с подпрагови стойности на хепсидин имат и по-ниски серумни нива на феритин, както и обратното. При пациентите с префибротична МФ, където заболяването е в начален етап на развитие и не са намесени допълнителни механизми на регулация, както и ятрогенни стимули (като хемотрансфузии и/или терапевтична намеса), хепсидиновата секреция е релативно интактна на желязната хомеостаза, което се демонстрира с връзката между феритин и хепсидин. Подобен анализ е направен и при голяма популация от болни с различни подвидове МДС, където пациентите с рефрактерна анемия, рефрактерна анемия с рингсидеробласти, както и тези с 5q-синдром демонстрират запазена регулация на хепсидина в сравнение с пациентите с рефрактерна анемия с ексцес на бласти, където тя е нарушена (Santini V et al. 2011). Анализът на Birgegarg при МФ и ЕТ също открива сигнификантна правопрпорционална корелация между серумния феритин и хепсидина при всички болни (Birgegard G et al. 2019).

По-високите стойности на хепсидин корелират слабо с по-голям брой хемотрансфузии при анализраните болни. Статистически значима разлика в стойностите на хепсидин при трансфузионно-зависими пациенти с МФ и пациентите с анемия, които не се нуждаят от кръвопреливане, е открита от Birgegarg, като при трансфузираните болни хепсидинът е по-висок. Това може да се коментира както във връзка с косвената стойност на този клиничен показател за тежестта на анемия, която определя и честотата и броя хемотрансфузии, така и във връзка с последващото продължителните трансфузии желязно натрупване, което е ключов фактор за промяната в параметрите на желязния метаболизъм серумно желязо и феритин. В своя анализ Birgegarg дискутира, че по-високите нива на хепсидин при трансфузионно-зависима анемия и при феритин над 500 µg/l могат да се коментират във връзка с по-напреднал ход на заболяването, но не бива да се пренебрегва фактът, че вторичната хемохроматоза при тези болни и влиянието на

хепсидина и възпалението върху дистрибуцията на желязо могат да замъглят картината и да доведат до подвеждаща и неправилна интерпретация (Birgegard G et al. 2019).

Анализирането на хепсидина като независим прогностичен показател за преживяемост при пациентите с МФ показва подобна зависимост. Отново Pardadani доказва, че завишените стойности на хепсидин в изследваните от него болни са предиктор за по-ниска преживяемост, независимо от рисковия профил по DIPSS с HR = 1.8 и  $p = 0.02$ . В комбинация със завишените стойности и на феритина тези два показателя доказано имат ефект по отношение на общата преживяемост при болните с МФ с HR = 2.4 и  $p = 0.002$ , независимо от DIPSS и повишените нива на инфламаторни цитокини. Нашият анализ показва, че стойности на хепсидина над праговата се свързват с по-висок риск от прогресия. Установи се, че 76,9% от починалите са с надпрагови стойности на хепсидина (със и без прогресия) и нивата на хепсидин над праговата стойност са свързани в по-висок риск от смърт. Хепсидинът е комплексен биомаркер, регулацията му е трудна и многофакторна и включва редица фактори като желязно натрупване, неефективна еритропоеза, възпалителни стимули, всички от които пряко обвързани с генезата и протичането на МФ. Освен това причината за смърт при тези болни не винаги може да се отдиференцира правилно, предвид факта, че едва около 20% умират от прогресия в ОМЛ. Това прави еднозначното тълкуване на прогностичната стойност на хепсидина за трансформацията на болестта и за общата преживяемост по-скоро трудно приложимо.

По отношение на проведеното лечение връзка между стойностите на хепсидина и лечението при нашите болни не се откри нито в цялата популация, нито между отделните подгрупи спрямо терапията. За сравнение анализът на Zhou от 2018 година демонстрира липса на разлика в нивата на хепсидин в групата болни, лекувани с Ruxolitinib, и останалите болни (Amy Zhou et al. 2018). Същият резултат показва и проучването на Birgegarg, при което 9 от пациентите са лекувани с Ruxolitinib, 17 – с Interferon- $\alpha$ , и 25 – с хидроксиурея. Не се установява сигнификантна разлика в стойностите на хепсидина между описаните групи (Birgegard G et al. 2019).

## **2. Роля на IL-6 и IL-8 в патогенезата и протичането на анемичния синдром**

По последни литературни данни МФ вече се дефинира като туморен модел на хронично възпаление. Доказано е, че съществува значима връзка между хроничното възпаление и патогенезата на МФ. Редица проучвания се опитват да дефинират клиничен цитокинов профил на пациентите с МФ. Други използват клетъчни култури и експериментални животински модели, за да установят подлежащите цитокинови механизми в развитието на МФ. Въпреки това от съществено значение е да се установи кои от анализираните цитокини са критични за възникване на заболяването и кои носят предиктивна и прогностична стойност.

От друга страна, задълбоченото изучаване на желязния метаболизъм през последните десет години показва, че редица инфламаторни цитокини водят до нарушение в дистрибуцията на желязо и могат да предизвикат функционален желязен дефицит при пациенти с МФ (Birgegard G et al. 2019). Тези нарушения са свързани неизменно с повишената секреция на хепсидин, която е повлияна от инфламаторни стимули. Нормалната и необходима за организма рециркулация на желязо от разрушените еритроцити в моноцито-макрофагналната система е потисната в резултат от възпаление и желязото остава „затворено“ в клетките, потокът на желязо през плазмата за нуждите на еритропоезата е намален и еритробластите остават с недостатъчни нива на желязо за нормалната си диференциация, пролиферация и матурация (Roy CN et al. 2005; Nemeth E et al. 2008). Редица проучвания при МФ през последните години регистрират повишена инфламаторна активност (Hasselbalch HC et al. 2015; Koschmieder S et al. 2016; Lussana F et al. 2017). Други демонстрират, че хепсидинът и трансфериновата сатурация корелират значимо с подлежащото възпаление и обща преживяемост при тези болни (Pardanani A et al. 2013; Lucijanic M et al. 2018).

Подобно на хепсидина, стойностите на IL-6 и IL-8 в изследваните от нас пациенти са значимо по-високи от тези при здрави контроли както в цялата анализирана група, така и в подгрупите според класификацията на СЗО от 2016 година. Такива резултати са описани в много други проучвания. Един от първите експерименти, които изуча-

ват IL-6 при пациенти с МПН, е през 1999 година, където е установена значима разлика в нивата на IL-6 при пациенти с МПН и здрави контроли (Bourantas KL et al. 1999). През 2005 година в друго проучване нивата на IL-6 при пациенти с миелоидна метаплазия с миелофиброза и хронична миелоидна левкемия, но не и при тези в ПВ и ЕТ, също са установени значително по-високи в сравнение с контролна група (KE Panteli et al. 2005). Резултатите на испанската група по МПН показват, че пациентите с ПВ, ЕТ и ПМФ имат сигнификантно по-високи стойности на IL-6 в сравнение със здрави контроли (Casemiro MDC et al. 2018). Интерпретирани заедно, всички тези проучвания показват, че IL-6 е ключов за патогенезата и прогресията на МФ.

Проучване от 2005 година показва, че при 32 пациенти с миелоидна метаплазия с миелофиброза нивата на IL-8 са значително по-високи в сравнение с контролна група (S. Emadi et al. 2005). Други две проучвания при пациенти с ПВ също демонстрират сигнификантно по-високи стойности на IL-8 в сравнение със здрави индивиди (Hermouet S et al. 2002; Vaidya R et al. 2021). Проучване на 127 пациенти с ПМФ също демонстрира значително по-високи стойности на IL-8 в пациентската група в сравнение със здрави доброволци (Tefferi A et al. 2011).

Чрез корелационен анализ се установи и силна правопрпорционална зависимост между хепсидин и IL-6, както и умерена такава между хепсидин и IL-8. За сравнение, в анализираната от Pardanani пациентска група, където са изследвани тридесет инфламаторни цитокина, не се открива корелация между нивата на хепсидин и изследваните цитокини, включително IL-6, IL-8 и IL-2R (Pardanani A et al. 2013). В проучването на Zhou обаче, където чрез мултиплекс са измерени плазмени нива на комплекс от инфламаторни цитокини, подобно на нашите резултати, хепсидинът корелира правопрпорционално с IL-6. Връзка с IL-8 или някой от останалите цитокини не е установена (Amy Zhou et al. 2018). Част от тези резултати са обвързани и с регулацията на хепсидина, в която голямо значение има IL-6, който чрез Jak/STAT сигналния път пряко индуцира транскрипцията на гРНК за секреция на хепсидин.

Поради липсата на референтни стойности за IL-6 и IL-8 беше определена прагова стойност за изследваната пациентска група чрез ROC curve анализ, като за IL-6 праговата стойност е 1.95 pg/ml, а за IL-8

съответно – 26.85 pg/ml.

Не се установи пряка зависимост между нивата на IL-6 и хемоглобина. Въпреки това спрямо определената прагова стойност се доказва, че пациентите с надпрагови нива за IL-6 имат значимо по-нисък хемоглобин в сравнение с тези, при които нивата на IL-6 са под праговата стойност. За сравнение, проучване на Скандинавската работна група по МПН (Birgegarg et al. 2019) намира сигнификантна негативна връзка между някои инфламаторни цитокини, сред които IL-6, IL-2 и TNF- $\alpha$  и стойностите на хемоглобина както при анемични, така и при пациентите, които не са с клинично значима анемия към момента на анализа. Друго голямо проучване на Panteli и сътрудници при пациенти с МПН (в това число хронична миелоидна левкемия) демонстрира селективно по-високи нива на IL-6, IL-2 и IL-2R при пациентите с ПМФ в сравнение с останалите нозологични единици. Фенотипни характеристики на анализиранията популацията показват обратнопропорционална зависимост между IL-6 и хемоглобин, подобно на нашите резултати (Panteli KE et al. 2005).

Зависимост между другите клинично-лабораторни характеристики не беше открита. Такава не беше намерена и по отношение на наличието на симптоми, рисковия профил, продължителността на заболяването и проведеното лечение. За разлика от нашите резултати анализът на скандинавската работна група показва значима връзка между качеството на живот и наличието на симптоми с повишени стойности на IL-6 (Birgegarg et al. 2019).

Във връзка с лечението, подобно на нашите резултати, Birgegarg и сътрудници не установяват значима разлика в нивата на изследваните цитокини при пациентите, лекувани с таргетна или циторедуктивна терапия (Birgegarg et al. 2019). Проучване на Fisher и сътрудници от 2018 година също демонстрира, че измерените плазмени нива на инфламаторни цитокини в хода на лечение с Ruxolitinib остават абнормни, което косвено доказва персистирането на аберантната цитокинова продукция въпреки приложената таргетна терапия (Daniel A.C. Fisher et al. 2018).

Въпреки че не беше открита пряка връзка между стойностите на IL-8 и хемоглобина, се установи, че високите нива на IL-8 над определената чрез ROC curve анализ прагова стойност от 25.65 pg/ml са свързани с близо два пъти по-висок риск от развитие на анемия.

Проучване на Pardanani и сътрудници оценява ролята на повишените нива на цитокини в модулиране на терапевтичния отговор към помалидомид при пациенти с МФ. Установява се, че високите стойности на циркулиращи инфламаторни цитокини като IL-8, IL-15, IL-2R са предиктори на по-лош отговор към лечението по отношение повлияване на анемичния синдром, като водят до липса на повишаване на хемоглобиновите нива. Описаните резултати неизменно са показателни за неблагоприятната роля на IL-8 в развитието и задълбочаването на анемичния синдром при МФ (Pardanani A et al. 2011).

IL-8 корелира обратнопропорционално с MCV и по-високите стойности на IL-8 са вероятно свързани с наличие на микроцитоза. Проучване на Strati и сътрудници доказва наличие на микроцитоза в 19% от новодиагностицираните пациенти с МФ, а сред нелекуваните пациенти процентът се увеличава до 24%. Релативно често срещаната микроцитоза при пациентите с МФ може да е свързана с дисрегулация на желязния метаболизъм, а проявата ѝ предимно при нелекувани пациенти да е сурогат на начална, активна болест. Авторите коментират, че връзката между липсата на лечение и микроцитозата показва, че лечението вероятно нормализира стойностите на MCV. Проучването на Strati коментира наличната микроцитоза при болни с МФ в контекста на функционален желязен дефицит. Не се обсъжда ролята на инфламаторни цитокини и техните ефекти върху показателите на периферната кръвна картина и морфологията на еритроцитите при МФ, като не може да се изключи връзката им с тази находка и повлияващите я фактори (Strati P et al. 2014).

Установява се връзка между надпраговите стойности на IL-6 и преживяемостта на пациентите, като 88.4% от починалите са с регистрирани стойности на IL-6 над 1.95 pg/ml. Такава връзка не се открива с IL-8. За разлика от нашите резултати, анализ на 90 пациенти с МФ установява, че повишени нива на IL-8, IL-2R, IL-12, IL-15, но не и IL-6, са независим неблагоприятен прогностичен фактор за преживяемост. Прогностичната им стойност остава значима въпреки рисковата стратификация според DIPSS (Tefferi A et al. 2011). Друго проучване доказва, че нивата на IL-6, IL-2 и IL-2R са повишени при прогресия на МФ в бластна криза, както и при трансформация на ЕТ и ПВ във вторична миелофиброза (Panteli KE et al. 2005).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На база на направения анализ се разработи клиничко-лабораторен рисков модел на пациенти с МФ, демонстриращ двупосочна връзка на комбинацията от надпрагови стойности на трите изследвани параметъра (хепсидин, IL-6 и IL-8) и свързани с пациента и заболяването характеристики при МФ. Установи се, че рисковите пациенти развиват анемия и тромбоцитопения; проявяват конституционални симптоми и са трансфузионно зависими; имат продължителност на заболяването > 1 година. На база на рисковия профил се демонстрира, че с по-голяма степен на значимост е мъжкият пол, носителство на Jak2 V617F мутация, степен на фиброза 3 в костния мозък и стойности на феритин > 500 µg/l. Доказа се неизменното място на хепсидин, IL-6 и IL-8 в еволюцията на заболяването чрез вероятната им косвена роля във възникването и задълбочаването на анемичния синдром. Въпреки нееднозначната функция, регулация и взаимовръзка на трите показателя в контекста на нозологична единица с хетерогенен клиничен фенотип, каквато е МФ, те определено повлияват развитието на заболяването и могат да служат като допълнителни рискови фактори по отношение на протичането и изхода му.



## ИЗВОДИ

1. Пациентите с МФ имат значимо по-високи нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 в сравнение със здравата популация за съответната възраст и пол.
2. Високите нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 са независим прогностичен фактор в развитието на анемия при МФ.
3. Високите нива на хепсидин корелират с по-ниски нива на хемоглобин при пациенти с МФ.
4. Високите нива на хепсидин са свързани с висок риск спрямо DIPSS, носителство на Jak V617F мутация, по-дълга продължителност на заболяването и хемотрансфузионна зависимост при пациенти с МФ.
5. Съществува значима и правопрпорционална зависимост между хепсидин, IL-6 и IL-8.
6. Надпраговите стойности на хепсидин и IL-6 са свързани с по-ниска обща преживяемост при пациенти с МФ.

## **VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР**

1. За първи път в България е проведено изследване на серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 при голяма група пациенти с изключително рядка хематологична неоплазия като МФ.
2. За първи път в България се изследва връзката на хепсидин, IL-6 и IL-8 с клинично-лабораторни и молекулярно-генетични фактори в развитието на анемия при пациенти с МФ.
3. За първи път се разработва рисков модел при МФ, включващ хепсидин, IL-6 и IL-8, и се анализира неговата значимост в контекста на клинични и лабораторни характеристики на пациентите.

### **ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР**

- a. Потвърди се, че стойностите на хепсидин, IL-6 и IL-8 са значимо по-високи при пациенти с МФ в сравнение със здрави контроли.
- b. Потвърди се значението на хепсидин, IL-6 и IL-8 във възникването, клиничната изява и задълбочаването на анемичния синдром при пациенти с МФ.
- c. Затвърди се правопорционалната връзка между нивата на хепсидин и инфламаторните цитокини.
- d. Потвърди се ролята на хепсидин и IL-6 като фактори за преживяемост при пациенти с МФ.

## VII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА

1. Gercheva L, Dimitrova S, Micheva I. Impact of the impaired iron homeostasis on the pathogenesis of anemia in Primary myelofibrosis. J of IMAB. 2016 Jan-Mar; 22(1):1083–1085
2. THE ROLE OF HEPCIDIN AND DYSREGULATED IRON HOMEOSTASIS IN THE PATHOGENESIS OF ANEMIA IN MYELOFIBROSIS – постер – EHA, Amsterdam, June 2019
3. Ст. Димитрова, И. Мичева; Първична миелофиброза – участие на регулатори на желязния метаболизъм – хепсидин и инфламаторни цитокини в патогенезата на анемичния синдром. – Медицински преглед, 56, 2020, № 4, 5–11
4. Стела Димитрова, Илина Мичева; РОЛЯ НА ХЕПСИДИНА В ПАТОГЕНЕЗАТА, ТЕЖЕСТТА НА КЛИНИЧНА ИЗЯВА И ПРОГНОЗАТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОФИБРОЗА – Известия на Съюза на учените – Варна. Серия медицина и екология. 1‘2020; 25: 18–23

## VIII. БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение изказвам благодарности на:

- Научния ми ръководител доц. д-р Илина Мичева – за безрезервната подкрепа, търпението, помощта и отдадеността при разработването, анализа и подготовката на дисертационния труд
- Д-р Живка Стойкова, старши лаборант Радка Стоянова и лаборант Диана Николова от Вирусологична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна – за осъществяване на научния експеримент
- Медицинска сестра Стоянка Петрова – за колекция на пробите на участниците в анализа
- Валентина Великова – за статистическата обработка на резултатите
- Всички пациенти и здрави доброволци, които дадоха съгласието си за участие в научно-изследователския проект, послужил като основа на настоящия дисертационен труд
- Семейството и приятелите ми – за подкрепата, вярата и любовта