

PŮVODNÍ ČLÁNEK / ORIGINAL ARTICLE

IMUNITNÍ DEREGLACE U MYELOYDYSPLASTICKÝCH SYNDROMŮ – ROLE CYTOKINŮ A SOLUBILNÍCH ADHEZNÍCH MOLEKUL. PILOTNÍ STUDIE

IMMUNE DEREGLATION IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES – THE ROLE OF CYTOKINES AND SOLUBLE ADHESION MOLECULES. A PILOT STUDY

Tomáš Kupsa ^{1,2}, Jan M. Horáček ^{1,2}✉, Petra Bělohávková ², Martin Štajer ^{1,2}, Ladislav Jebavý ^{1,2}, Martin Jakl ¹, Pavel Skořepa ¹, Pavel Žák ²

¹ Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

² IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Přijato 7. června 2022.

Akceptováno 13. července 2022.

Zveřejněno 2. června 2023.

Souhrn

V posledních letech byl díky zavedení nových léčebných postupů dosažen signifikantní pokrok v léčbě mnoha hematologických onemocnění. Se zavedením nových léčebných postupů přichází nové otázky ohledně dalšího zvyšování účinnosti léčby a jejího zacílení na nádorovou buňku. Jedním ze sledovaných faktorů jsou parametry nádorového mikroprostředí, které představují cytokiny, chemokiny, solubilní adhezní molekuly, specifické populace T-lymfocytů a další populace antigen prezentujících buněk.

V tomto článku přinášíme výsledky naší pilotní studie hladin cytokinů, chemokinů a solubilních adhezních molekul u nemocných s myelodysplastickým syndromem vyššího rizika léčených hypomethylační látkou azacytidin. Analyzujeme faktory související s hladinami sledovaných cytokinů, celkovým přežitím a selháním léčby. Propojením klinických a laboratorních dat se tak snažíme přispět k hlubšímu pochopení problematiky myelodysplastických syndromů a obecně vlivu nádorového mikroprostředí na průběh hematologických onemocnění.

Klíčová slova: Cytokiny; Adhezní molekuly; Myelodysplastický syndrom; Azacytidin; Celkové přežití

Summary

A significant effort has been made to innovative treatment approaches in majority of haematologic diseases including myelodysplastic syndromes. Adopting novel therapies brings new questions about

✉ Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Česká republika
jan.horacek@unob.cz

enhancing their efficacy. Increasing evidence show a significant role of tumour microenvironment, which compounds of cytokines, chemokines, soluble adhesion molecules, specific T-lymphocyte populations and further populations of antigen presenting cells.

In this article, we publish results of our pivotal trial analysing serum levels of cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in patients with high-risk myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agent Azacytidine. We analyse factors associated with levels of measured analytes, overall survival and treatment failure. Incorporating both clinical and experimental data into analyses helps to achieve a deeper insight into biology of myelodysplastic syndromes and the crosstalk of tumour microenvironment and outcome of therapies in general.

Key words: cytokines; adhesion molecules; myelodysplastic syndrome; azacytidine; overall survival

Úvod

Jako myelodysplastické syndromy (MDS) označujeme skupinu klonálních poruch krvetvorby, postihující hematopoetickou kmenovou buňku. Charakteristickými nálezy jsou hypercelulární kostní dřev s významnými změnami architektiky krvetvorných elementů (dysplazie), cytopenie v obvodové krvi v důsledky inefektivní krvetvorby a schopnost progresu do akutní myeloidní leukemie (AML). V poslední době přibývá důkazů, že rychlost progresu MDS směrem k AML je ovlivněna nejen vlastní genetickou odchylkou na úrovni hematopoetické kmenové buňky, ale rovněž faktory nádorového prostředí, které představují cytokiny, adhezni interakce a imunitní mechanismy zprostředkované různými buněčnými populacemi, například T-lymfocyty, mesenchymálními kmenovými buňkami, dendritickými buňkami, myeloidními supresory a dalšími populacemi buněk.

V této práci se věnujeme především roli cytokinů a chemokinů. Cytokiny a chemokiny jsou proteiny o nízké molekulové hmotnosti, uvolňované buňkami imunitního systému za účelem ovlivnění zánětlivé reakce. Současně jsou schopny ovlivnit vnitřní prostředí kostní dřevě a hematopoezu. Za fyziologických podmínek jsou tyto faktory nezbytné pro přežití, proliferaci a vyžrávání kmenových buněk kostní dřevě. Stejně mechanismy se uplatňují i patologických okolností s tím rozdílem, že zdrojem cytokinů mohou být i vlastní buňky maligního klonu.

Abnormální hladiny cytokinů, chemokinů a růstových faktorů u nemocných s MDS byly popsány různými pracovními skupinami. (1-3). Z hlediska MDS byly studovány prozánětlivé cytokiny: tumor nekrotizující faktor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , transformující růstový faktor (TGF)- β , interleukiny (IL)-6, IL-8, IL-17 a růstové faktory granulocytů (G-CSF) i makrofágů (GM-CSF). Hladiny těchto cytokinů bývají u nemocných s MDS zpravidla zvýšené (2, 4-6).

MDS však musíme chápat jako skupinu onemocnění s různým biologickým potenciálem. U MDS nižšího rizika je v kostní dřevě vysoký obrát buněk a vystupňovaná apoptóza narušující konečné vyžrávání prekurzorů. Přibývá důkazů, že na patogenezi těchto stavů se cytokiny mohou podílet jak přímo účinkem na vyžrávající prekurzory, tak i nepřímo ovlivněním efektorových buněk imunitního systému. Uplatňuje se zejména regulace T-lymfocytárních populací. MDS nižšího rizika je spojena s vyšší aktivitou cytotoxických, CD8 pozitivních T-lymfocytů, které inhibují růst maligních i nemaligních buněk v kostní dřevě. To může vysvětlovat příznivý účinek imunosupresivní terapie na cytopenie v periferní krvi dokumentovaný v některých situacích (7). MDS vyššího rizika jsou spojeny s nižšími počty CD8 pozitivních T-lymfocytů, což umožňuje přežívání maligních buněk a progresi do AML. Současně je přítomno vyšší riziko infekcí (8, 9).

Z hlediska cytokinů u MDS jsou diskutovány jejich rozdílné hladiny u nemocných nižšího a vyššího rizika. Někteří autoři popisují rozdílné hladiny IL-6, GM-CSF a solubilního receptoru pro IL-2 v závislosti na pokročilosti MDS směrem k akutní leukemii (10, 11). Zůstává nevyjasněná role IL-10. Kornblau et al. (12) popisují nižší hladiny pleiotropních cytokinů IL-4 a IL-10 u nemocných s MDS ve srovnání se zdravými jedinci. Lopes et al. (13) sledovali vztah hladin IL-10 a počtů CD8 pozitivních T-lymfocytů. Z jejich závěrů vyplývá, že hladiny IL-10 jsou zvýšené u nemocných s MDS vyššího rizika a negativně korelují s počty CD8 pozitivních T-lymfocytů.

Je tedy zřejmé, že imunitní deregulace u MDS, a současně také pravděpodobně u většiny maligních onemocnění, je značně komplexní. Lze tedy předpokládat, že k hlubšímu pochopení problematiky povede současná analýza více faktorů než několika izolovaných veličin. Tento předpoklad nás vedl k vypracování pilotní studie na souboru nemocných s MDS vyššího rizika, kteří byli indikováni k léčbě hypomethylační látkou azacytidin. Cílem studie bylo najít cytokiny, chemokiny a solubilní adhezni molekuly, které souvisí s léčebnou odpovědí na azacytidin (respektive selháním léčby) u nemocných s MDS vyššího rizika.

Metodika

K analýze v rámci této pilotní studie byl použit soubor 32 jedinců (21 mužů a 11 žen) ve věku 60,4 – 80,7 let, průměr 71,2 let, medián 72 let. Tito nemocní byli diagnostikováni a léčeni pro MDS vyššího rizika na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové v průběhu let 2015–2020. Vyšší riziko MDS bylo spočítáno dle mezinárodně používaných prognostických systémů IPSS a IPSS-R (14, 15). K indikaci léčby hypomethylační látkou azacytidin bylo požadováno, aby alespoň jeden z těchto skórovacích systémů svědčil pro MDS vyššího rizika, tedy IPSS vyšší střední nebo vysoké riziko a IPSS-R vysoké nebo velmi vysoké riziko. Vzájemné vztahy skóre dle IPSS a IPSS-R jsou shrnuty v Tabulce 1. Byli vybráni nemocní, u kterých nebylo současně přítomno jiné nádorové onemocnění, případně byli nejméně 5 let v kompletní remisi po léčbě jiného nádorového onemocnění. Dalším vylučujícím faktorem byla přítomnost aktivního chronického zánětlivého onemocnění. Provedení studie bylo schváleno místní Etickou komisí. Všichni nemocní obdrželi a podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie.

Tabulka 1. Vzájemné vztahy IPSS a IPSS-R

	IPSS střední 1	IPSS střední 2	IPSS vysoké	Celkem
IPSS-R střední	-	5	1	6
IPSS-R vysoké	1	5	3	9
IPSS-R velmi vysoké	1	8	8	17
Celkem	2	18	12	32

IPSS: mezinárodní prognostický skórovací systém; IPSS-R: revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém

Nemocní byli léčeni hypomethylační látkou azacytidin v dávce 75 mg/m². Léčba byla aplikována v prvních 7 pracovních dnech cyklu, které se opakují v intervalech trvajících 4–6 týdnů. Počet aplikovaných dávek v cyklu i délka intervalu mezi cykly se odvíjí od závažnosti cytopenií, tolerance léčby a případných infekčních komplikací. Do analýzy byli zařazeni také 4 nemocní léčeni azacytidinem jako přemostňující terapií před provedením alogenní transplantace krvetvorby. Nejpozději po každém šestém cyklu léčby je nutné vyšetřit aspirát kostní dřeně. V léčbě azacytidinem lze pokračovat až do progresu onemocnění.

Vzorky krve nemocných byly odebrány před zahájením léčby azacytidinem a doručeny do laboratoře v časovém intervalu nepřesahujícím 2 hodiny. Po centrifugaci trvající 10 minut při 3000 otáčkách za minutu bylo sérum staženo, rozděleno do alikvotů po přibližně 200 uL, označeno a skladováno při -80° C.

Pro měření byly vybrány požadované vzorky v zamraženém stavu, rozmrazení proběhlo bezprostředně před měřením nebo zahájením inkubace s reagenty v souladu s požadavky výrobce proteinových biočipů. Po proběhlém měření byly zbytky alikvotů zlikvidovány v souladu s požadavky na zacházení s biologickým odpadem.

Byly měřeny sérové hladiny celkem 17 analytů: interleukinů IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interferon gamma (IFN- γ), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α) a solubilní adhezni molekuly E-selectin (E-SEL), P-selectin (P-SEL), L-selectin (L-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) a Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Hladiny biomarkerů byly měřeny pomocí proteinového biočipu na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Tato metoda umožňuje současné stanovení hladin více analytů

z jediného vzorku séra. Sledované analyty séra se naváží na vazebná místa proteinového biočipu, kde je jejich přítomnost prokázána monoklonální protilátkou značenou křenovou peroxidázou. Intenzita chemiluminiscenci emitovaného signálu je poté snímána citlivou kamerou a porovnává s uloženou kalibrační křivkou. Výsledek je vydáván v pg/mL pro cytokiny a ng/mL pro solubilní adhezní molekuly.

V definovaném souboru nemocných s MDS jsme analyzovali, zda některé ze sledovaných indikátorů nádorového mikroprostředí souvisí s věkem, rizikovou stratifikací dle IPSS a IPSS-R, časným selháním léčby azacytidinem během prvních 6 cyklů léčby, nebo naopak s celkovým přežitím přesahujícím 18 měsíců.

Statistická analýza byla provedena v programu STATISTICA verze 2.0. Rozdíly s $P < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

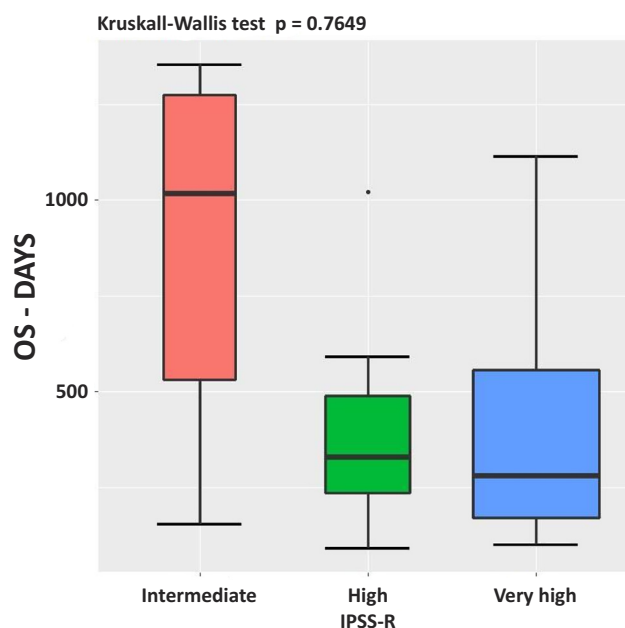
Výsledky

Analýza hladin sledovaných analytů a věku nemocných ukázala slabé inverzní korelace s hladinami E-SEL ($r = -0,297$; $P = 0,591$), L-SEL ($r = -0,345$; $P = 0,374$) a IL-4 ($r = -0,246$; $P = 0,871$). Hladiny E-SEL a L-SEL spolu statisticky významně korelovaly ($r = 0,673$; $P = 0,0002$). Korelace věku s IL-1 α , IL-8 a VEGF byly slabé, ostatní analyty s věkem nekorelovaly.

Hladiny sledovaných analytů nesouvisely s kategorií rizika hodnocené dle IPSS nebo IPSS-R. Skupiny nemocných rozdělené do jednotlivých kategorií dle IPSS i IPSS-R se navzájem nelišily věkem.

V této skupině nemocných nebyl IPSS spolehlivým prediktorem celkového přežití. Jedinci s vysokým rizikem dle IPSS měli nevýznamně kratší celkové přežití (432 ± 222 vs. 538 ± 364 dní, $P = 0,4579$) v porovnání s ostatními jedinci skupiny. V celkovém přežití dle IPSS-R bylo prokázáno významně delší přežití jedinců se středním rizikem (879 ± 406 vs. 411 ± 235 dní, $P = 0,0048$) v porovnání se zbytkem skupiny. Přežití jedinců s vysokým a velmi vysokým rizikem dle IPSS-R se statisticky významně nelišilo, viz Graf 1.

Graf 1. Celkové přežití dle kategorie IPSS-R



IPSS-R: revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém; OS-days: celkové přežití udávané ve dnech; Intermediate: střední riziko; High: vysoké riziko; Very high: velmi vysoké riziko

Pacienti indikovaní k alogenní transplantaci krvetvorných buněk ($n = 4$; 12,5 %) byli významně mladší ($64,05 \pm 3,35$ vs. $72,23 \pm 2,36$ let, $P = 0,008$). Tito nemocní měli vyšší hladiny E-SEL ($P = 0,0007$), IL-8 ($P = 0,0047$), IFN- γ ($P = 0,0238$) a P-SEL ($P = 0,0490$). V této skupině došlo u tří jedinců k selhání azacytidinu a progresi MDS do AML ještě před alogenní transplantací krvetvorby. Celkové přežití alogenně transplantovaných jedinců bylo v této skupině nevýznamně delší (645 ± 196 vs. 477 ± 319 dní, $P = 0,4217$).

Analýzovali jsme vztah věku a celkového přežití nemocných. Analýzou celé kohorty jsme odhalili středně silnou negativní korelaci věku a celkového přežití ($r = -0,403$; $P = 0,199$).

U jedinců s vysokým rizikem dle IPSS nebyla prokázána korelace věku a celkového přežití ($r = -0,1532$; $P = \text{NS}$). U jedinců s ostatním rizikem dle IPSS ($n = 20$; 62,5 %) koreloval věk s celkovým přežitím inverzně, středně silně ($r = -0,431$; $P = 0,428$). Rozdělením kohorty dle IPSS-R jsme zjistili, že v kategorii velmi vysokého rizika ($n = 17$; 53,1 %) celkové přežití silně a negativně korelovalo s věkem ($r = -0,569$; $P = 0,188$). U ostatních kategorií IPSS-R nebyla korelace celkového přežití a věku nemocných prokázána ($r = -0,0477$; $P = \text{NS}$).

Identifikovali jsme skupinu 8 nemocných (25 %) s časným selháním léčby azacytidinem. Tito nemocní se od ostatních nelišili věkem ($P = 0,0999$), ale měli vyšší hladiny IL-8 ($P = 0,0125$) a IFN- γ ($P = 0,0303$). Blízko statistické významnosti byly nižší hladiny TNF- α ($P = 0,0770$) a vyšší E-SEL ($P = 0,0862$), viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Cytokiny a časné selhání léčby azacytidinem

Analyt	Selhání azacytidinu	Azacytidin účinný	<i>P</i>
IL-8	$167,1 \pm 139,2$ pg/mL	$44,2 \pm 38,2$ pg/mL	0,0125
IFN- γ	$3,33 \pm 2,53$ pg/mL	$0,52 \pm 0,29$ pg/mL	0,0303
TNF- α	$1,88 \pm 0,99$ pg/mL	$2,79 \pm 0,85$ pg/mL	0,0770
E-SEL	$15,25 \pm 12,38$ ng/mL	$8,89 \pm 3,47$ ng/mL	0,0862

IL-8: Interleukin-8; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alfa; E-SEL: E-selektin

Nakonec jsme identifikovali 7 nemocných s celkovým přežitím přesahujícím 18 měsíců. V této skupině byli i tři nemocní, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk pro časnou progresi MDS do AML. Věkem se tato skupina nemocných nelišila od ostatních ($P = 0,3953$). V této skupině byly nižší hladiny IL-1 α ($P = 0,0432$) a četnější výskyt středního rizika dle IPSS-R ($P = 0,0122$).

Diskuse

Současné modely prognostické stratifikace MDS pracují s parametry krevního obrazu a cytogenetikou. I přes pokrok v molekulární biologii, narůstající množství mutací s popsanou vazbou na MDS a zdokonalení prognostických modelů je stále patrný význam nádorového mikroprostředí pro celkový výsledek léčby.

Námi sledovaný soubor je poměrně malý, nicméně z hlediska distribuce věku nemocných i (bohužel) nízkého zastoupení alogenně transplantovaných jedinců reprezentativní. Alogenní transplantace krvetvorby jako jediná metoda s kurativním potenciálem je dostupná jen malému množství nemocných s MDS. Má však potenciál překonat nepříznivou biologii MDS a je zatím jedinou metodou, která přináší šanci na dlouhodobé přežití (16).

Z námi analyzovaných dat vyplývá, že u nemocných s vyššími sérovými hladinami IL-8 a IFN- γ je vyšší pravděpodobnost rezistence k azacytidinu a selhání léčby. Tuto rezistenci lze překonat alogenní transplantací krvetvorby.

Dále je zřejmé, že současné prognostické modely u MDS lze dále rozvíjet a zpřesňovat rozšířením o další sledované faktory. Zda bude námi zjištěný IL-1 α nebo jiný cytokin v budoucnu potvrzen jako nezávislý prognostický faktor bude předmětem dalších studií. Vzhledem k současným možnostem modulace přenosu cytokiny

zprostředkované signalizace mají tyto nálezy možný výstup v rutinní klinické praxi. Námi zjištěné výsledky považujeme za povzbudivé, a proto již připravujeme obsáhlejší studii na větším souboru nemocných včetně většího zastoupení alogenně transplantovaných jedinců.

Financování

Práce byla podpořena Ministerstvem obrany České republiky “Dlouhodobým záměrem rozvoje organizace 1011 – Klinické obory II” Fakulty vojenského zdravotnictví Hradec Králové Univerzity obrany.

Funding

This work was supported by the Ministry of Defence of the Czech Republic “Long Term Development Plan 1011 – Clinical Fields II” of the Faculty of Military Health Sciences Hradec Kralove, University of Defence, Czech Republic.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests.

Adherence to Ethical Standards

This article does not contain any studies involving animals performed by any of the authors.

References

1. Gañán-Gómez I, Wei Y, Starczynowski DT, et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2015;29:1458-1469.
2. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1997;11:2049-2054.
3. Verhoef GE, De Schouwer P, Ceuppens JL, et al. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1992;6:1268-1272.
4. Allampallam K, Shetty V, Hussaini S, et al. Measurement of mRNA expression for a variety of cytokines and its receptors in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Anticancer Research* 1999;19:5323-5328.
5. Hsu HC, Lee YM, Tsai WH, et al. Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology* 2002;63:64-69.
6. Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 2003;27:583-591.
7. Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J, et al. Cyclosporin a therapy in hypoplastic MDS patient and certain refractory anemias without hypoplastic bone marrow. *British Journal of Haematology*. 1998;100:304-309.
8. Wu L, Li X, Chang C, et al. Deviation of type I and type II T cells and its negative effect on hematopoiesis in myelodysplastic syndrome. *International Journal of Laboratory Haematology*. 2008;30:390-399.
9. Sand K, Theorell J, Bruserud O, et al. Reduced potency of cytotoxic T-lymphocytes from patients with high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2016;65:1135-1147.
10. Wetzler M, Kurzrock R, Estrov Z, et al. Cytokine expression in adherent layers from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 1995;19:23-34.
11. Zoumbos N, Simeonidis A, Kourakli A, et al. Increased levels of soluble interleukin-2 receptors and tumor necrosis factor in serum of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1991;77:413-414.
12. Kornblau SM, McCue D, Singh N, et al. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and independently prognostic in acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood* 2010;116:4251-4261.
13. Lopes MR, Traina F, Campos P de M, et al. IL10 inversely correlates with percentage of CD8⁺ cells in MDS patients. *Leukemia Research* 2013;37:541-546.
14. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89:2079-2088.

15. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndrome. *Blood* 2012;120:2454-2465.
16. Belohlavkova P, Vrbacky F, Smolej L, et al. Prognostic factors affecting the outcome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res. Rep.*, 2021;16:100274, doi: 10.1016/j.lrr.2021.100274.