

Hodnocení kostního obratu a významu deficitu vitamínu D u pacientů s myelofibrózou

Palová M.¹, Szotkowski T.¹, Hluší A.¹, Navrátilová J.¹, Divoká M.¹, Papajík T.¹, Petrová P.², Prošková J.²

¹Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

²Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc

Transfuze Hematol. dnes, 25, 2019, No. 2, p. 159-167

SOUHRN

Úvod: Primární myelofibróza je řazena mezi Ph (Philadelphia chromosome) negativní myeloproliferativní nemoci (Ph-MPN), spolu s pravou polycytemií a esenciální trombocytemií, které ve svém průběhu taktéž mohou přecházet do fibrózy kostní dřeně. V práci byly hodnoceny biochemické markery kostní remodelace a osteoprotegerin s cílem nalezení vhodného parametru pro neinvazivní monitorování pokročilosti fibrózy kostní dřeně, dále byl posuzován kostní metabolismus, zejména význam vitamínu D.

Pacienti a metody: U 34 pacientů s myelofibrózou, 13 nemocných v prefibrotické fázi primární myelofibrózy a 28 nemocných s pravou polycytemií či esenciální trombocytemií byly analyzovány markery kostní remodelace (bALP, PINP, ICTP), kostní metabolismus a osteoprotegerin.

Výsledky: Nebylo prokázáno zvýšení bALP, PINP byl zvýšen u 18 %, ICTP u 32 % nemocných s myelofibrózou. Hodnoty nekorelovaly s pokročilostí fibrózy, nevykazovaly významný rozdíl oproti prefibrotické fázi primární myelofibrózy ani ostatním Ph-MPN. Osteoprotegerin byl zvýšen u 53 % myelofibróz, hodnoty korelovaly s pokročilostí nemoci ($p = 0,0043$), ale nebyly signifikantně rozdílné ve srovnání s prefibrotickou fází primární myelofibrózy či ostatními Ph-MPN. Z hodnocených parametrů kostního metabolismu byly zaznamenány významné rozdíly v hladinách vitamínu D. Ve srovnání s ostatními Ph-MPN byl jeho deficit častěji zjištěn ve skupině myelofibróz ($p = 0,0003$), u kterých sérové koncentrace vitamínu D korelovaly s pokročilostí choroby ($p = 0,05$).

Závěr: Testované plazmatické parametry nejsou dostatečně citlivé pro neinvazivní monitorování fibrózy kostní dřeně v rutinní klinické praxi. Zvýšená exprese OPG zřejmě hraje roli v patogenezi myelofibrózy. U MF jsou nižší sérové koncentrace vitamínu D ve srovnání s ostatními Ph-MPN, tíže jeho deficitu koreluje s pokročilostí choroby. S ohledem na skutečnost, že se vitamin D spolupodílí na inhibici JAK/STAT signální dráhy, vyvstává aktuální potřeba ověřit jeho prognostický význam v éře JAK inhibitorů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ph-myeloproliferace – myelofibróza – kostní obrat – osteoprotegerin – vitamin D

SUMMARY

Palová M., Szotkowski T., Hluší A., Navrátilová J., Divoká M., Papajík T., Petrová P., Prošková J.

Assessing bone turnover and the role of vitamin D deficiency in patients with myelofibrosis

Introduction: Primary myelofibrosis belongs to a group of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (Ph-MPN) together with essential thrombocythemia and polycythemia vera, which may also progress to bone marrow fibrosis. The study assessed biochemical markers of bone remodeling and osteoprotegerin to find a suitable marker for non-invasive monitoring of bone marrow fibrosis, as well as bone metabolism, in particular the role of vitamin D.

Patients and methods: Bone remodeling markers (bALP, PINP, ICTP), bone metabolism and osteoprotegerin were analyzed in 34 patients with myelofibrosis, 13 patients with prefibrotic primary myelofibrosis and a group of 28 patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.

Results: There was no increase in bALP, PINP and ICTP were elevated in 18% and 32% of MF, respectively. The values neither correlated with fibrosis stage nor showed significant differences compared to the other Ph-MPN. Osteoprotegerin was increased in 53% of myelofibrosis, values correlated with myelofibrosis risk status ($p = 0.0043$) but did not show a significant difference compared to the other Ph-MPN. Among bone metabolism parameters,

significant differences were noted for vitamin D levels. Myelofibrosis had significantly lower vitamin D levels than the other Ph-MPN ($p = 0.0003$), the values correlated with MF risk status ($p = 0.05$).

Conclusion: The tested parameters are not sensitive enough for non-invasive monitoring of bone marrow fibrosis in routine clinical practice. Increased expression of osteoprotegerin is likely to play a role in the pathogenesis of myelofibrosis. Serum concentrations of vitamin D are significantly lower in myelofibrosis; the severity of its deficiency correlates with disease stage. Given the fact that vitamin D participates in inhibition of the JAK/STAT signaling pathway, there is an urgent need to verify its prognostic value in the present-day era of JAK inhibitors.

KEY WORDS

Ph-myeloproliferative neoplasms – myelofibrosis – bone turnover – osteoprotegerin – vitamin D

ÚVOD

Primární myelofibróza (PMF) je chronickým klonálním onemocněním krvetvorby. Spolu s pravou polycytemií (PV) a esenciální trombocytemií (ET), které ve svém průběhu taktéž mohou přecházet do fibrózy kostní dřeně, patří do skupiny Ph (Philadelphia chromosome) negativních myeloproliferativních nemocí [1]. Incidence PMF je 1,5 případu na 100 000 obyvatel za rok [2]. Incidence PV je vyšší u mužů než u žen, a to 2,8 versus 1,3 případu na 100 000 obyvatel za rok. Kumulativní riziko přechodu do post-polycytemické myelofibrózy je 26% po 20 letech trvání nemoci [3, 4]. Incidence ET je 2,5 případu na 100 000 obyvatel za rok, kumulativní riziko transformace do post-trombocytemické myelofibrózy je 9% po 15 letech trvání choroby [5, 6]. V patogenezi PMF je zásadní dysregulace, respektive konstitutivní aktivace JAK/STAT signální dráhy, jež vede k autofosforylaci STAT proteinů (Signal transducer and activator of transcription) [7]. Konstitutivní aktivace JAK/STAT dráhy může být způsobená buď přímo somatickou mutací genu JAK2 v pozici V617F, nebo nepřímo mutacemi v genu MPL či CALR [8, 10]. Důsledkem aktivace signálních drah je u PMF klonální proliferace atypických megakaryocytů s intenzivnější produkcí cytokinů a růstových faktorů, vedoucí ke zvýšené tvorbě neklonálních fibroblastů s následnou zvýšenou tvorbou retikulárních a kolagenních vláken. To zapříčiňuje cytopenii, extramedulární hematopoézu, hepatosplenomegalii a vznik konstitučních symptomů (zvýšení tělesné teploty, noční poty, hmotnostní úbytek) [7]. Zatímco objevy posledních let přinesly průlom v pochopení role „driver“ mutací při aktivaci JAK/STAT signální dráhy vedoucí k proliferaci nádorového klonu, mechanismus samotné fibrogenese a osteosklerózy dřeně zůstává stále nejasný. Zmnožení retikulárních a následně kolagenních vláken typu 1 a 3, snížené zastoupení až absence osteoklastů a neoangiogeneze jsou dominujícími znaky pokročilé myelofibrózy [11, 12]. Již dřívější práce poukázaly na význam narušení cytokinové osy

OPG (osteoprotegerin) – RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) – RANK (receptor activator of NF- κ B). RANKL, trans-membránový protein produkovaný stromálními buňkami a osteoblasty, po vazbě na receptor RANK indukuje diferenciaci a formaci osteoklastů. OPG, solubilní glykoprotein uvolňovaný osteoblasty a stromálními buňkami, funguje jako „decoy“ receptor pro RANKL (decoy receptory – tzv. „návnadové/matoucí“ receptory, které soutěží o vazbu na ligand; po navázání ligandu neaktivují příslušnou signální dráhu, ale zabírají jeho interakci s regulérním receptorem). Tím OPG blokuje interakci mezi RANK-RANKL a inhibuje osteoklastogenezi [13, 14]. Dalším potenciálním zdrojem OPG jsou endoteliální buňky, pro jejichž proliferaci je OPG důležitý [15]. Vysoká produkce OPG proto může mít duální funkci v patogenezi progresu myelofibrózy, vedle poškození funkce osteoklastů se může podílet také na endoteliálním růstu a neoangiogenezi. Někteří autoři považují právě nadprodukcí OPG endoteliálními buňkami za jeden z důležitých momentů v procesu fibrotizace dřeně [16, 17].

Rychlost tvorby a resorpce kosti lze posoudit podle produktů vznikajících v metabolismu organických složek kostní matrix. Mezi markery novotvorby kosti řadíme kostní izoenzym alkalické fosfatázy (bALP) nebo prokolagen typu 1 (PINP). PINP je syntetizován fibroblasty a uvolňován do plazmy během syntézy kolagenu a je přímým markerem procesu osteoformace. Biochemickým markerem odbourávání kostí je koncová část kolagenu typu I (ICTP), degradační produkt kolagenu vznikající vlivem osteoklastů [18, 19].

Vitamin D, multifunkční pro-hormon, jehož hlavní funkcí je kontrola kalcium-fosfátového metabolismu, se také specificky podílí na regulaci aktivity osteoklastů a osteoblastů v procesu kostní remodelace. Vitamin D zahrnuje několik kalciferolů, pro potřeby lidského organismu jsou rozhodující cholekalciferol (D3) a ergokalciferol (D2), které jsou biologicky neaktivními prekurzory. V játrech se hydroxylací mění na

25-hydroxyvitamin D (25OHD), hlavní neaktivní formu hormonu v krvi. Další hydroxylaci v ledvinách vzniká aktivní forma 1,25-hydroxyvitamin D (kalcitriol) [20]. Vzhledem k delšímu poločasu a vyšší sérové koncentraci je k monitorování koncentrací vitamínu D v těle používán 25OHD. V posledních letech se věnuje značná pozornost dalším úlohám vitamínu D v organismu. Jeho deficit je spojen s rizikem rozvoje kardiovaskulárních, metabolických a autoimunních chorob [20]. Jeho antitumorózní efekt se vysvětluje inhibicí buněčné proliferace, indukci diferenciací a apoptózy [21, 22]. Byla prokázána negativní korelace mezi sérovou koncentrací vitamínu D a incidencí některých solidních tumorů [23]. Výsledky metaanalýzy zahrnující 2 284 pacientů s hematologickou malignitou potvrdily asociaci mezi horším celkovým přežitím (OS) a nízkou sérovou koncentrací 25OHD [24]. Ačkoliv epidemiologické studie poukazují na možný prognostický význam vitamínu D a na korelaci mezi jeho deficitem a vyšším rizikem rozvoje malignity či horší prognózou nemocných, není stále jasné, zda jeho suplementace může u pacientů s nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním zlepšit léčebné výsledky.

V naší práci jsme hodnotili kostní status u MF pomocí biochemických markerů kostní remodelace (bALP, PINP, ICTP), kostního metabolismu (ionty Ca²⁺, fosfáty, hormony ovlivňující kostní metabolismus – parathormon a 25-hydroxyvitamin D) a OPG, pro jeho schopnost inhibice osteoklastů. Cílem naší práce bylo posouzení možnosti identifikace vhodného markeru využitelného k neinvazivnímu monitorování stupně fibrózy kostní dřene v průběhu nemoci, sledování léčebné odpovědi nebo časnému zastižení přechodu ET a PV do fibrotického stadia, dále zhodnocení kostního metabolismu, zejména významu vitamínu D u pacientů s MF.

PACIENTI A METODY

Z celkového počtu 73 pacientů s MF bylo do analýzy zařazeno 34 vhodných nemocných diagnostikovaných v našem centru v období let 2000–2017. Vyloučení byli všichni v terminálním stavu choroby, po alogenní transplantaci kostní dřene, s duplicitní malignitou a dalšími stavy, jež by mohly ovlivnit výsledky testovaných parametrů – hyperparathyreózou, renální insuficiencí, hepatopatií, užívající bisfosfonáty, hormonální substituční léčbu nebo glukokortikoidy v dávce vyšší než 10 mg/den déle než 3 měsíce a diabetes mellitus léčeným inzulínem. Všichni hodnocení jedinci měli normální funkci štítné žlázy a glykemii. Jednalo se o 22 nemocných s diagnózou PMF, tři s post-PV myelofibrózou a devět s post-ET myelofibrózou. Šlo

o 13 mužů, 21 žen, medián věku 61 let (rozmezí 36–79 let). V době analýzy užívalo 68 % pacientů specifickou léčbu MPN, a to 38 % hydroxyureu, 9 % anagrelid, 15 % ruxolitinib a 6 % busulfan. Srovnávací soubor zahrnoval 13 pacientů v prefibrotické/časné fázi PMF (prePMF; 3 muži, 10 žen, medián věku 53 let; rozmezí 25–72 roků) a 28 nemocných s Ph-MPN bez histologicky potvrzené fibrózy kostní dřene (23 s PV, 5 s ET, 16 mužů, 12 žen, medián věku 61 let; rozmezí 28–85 roků). V době analýzy bylo léčeno 69 % nemocných s prePMF (8 % interferonem alfa, 46 % hydroxyureou, 15 % anagrelidem) a 75 % pacientů ze skupiny PV a ET (7 % interferonem alfa, 57 % hydroxyureou, 11 % anagrelidem). Všichni vyšetřovaní měli histologicky verifikovanou diagnózu MPN minimálně jednou biopsií kostní dřene a splnili kritéria WHO klasifikace 2008 nebo 2016. Nové vyšetření kostní dřene nebylo pro účely analýzy vyžadováno. Všichni nemocní podepsali informovaný souhlas s odběrem a zpracováním biologického materiálu, vyšetřením genetického materiálu (DNA), hodnocením získaných výsledků. Preanalytické zpracování vzorků a všechna měření byla v obou skupinách prováděna identickým způsobem. Všechny vzorky krve byly sbírány ráno, nalačno, v rámci pravidelných kontrolních vyšetření, standardním postupem z antekubitální žíly.

Detekce somatických mutací

U všech pacientů byla testována přítomnost mutací JAK2 V617F, v genu MPL a CALR. Všechny analýzy byly provedeny s využitím DNA izolované z leukocytů periferní krve. U všech pacientů byla vyšetřována mutace v kodonu 617 genu JAK2 alelově specifickou polymerázovou řetězovou reakcí (AS-PCR) [25]. U všech subjektů jsme realizovali screening exonu 9 genu CALR pomocí fragmentační analýzy. V pozitivních případech byl přesný typ mutace identifikován Sangerovou metodou sekvenování [10]. Mutace genu MPL (S505N a W515) byly vyšetřeny s využitím AS-PCR a fragmentační analýzy, detekované mutace byly ověřeny Sangerovou metodou sekvenování [9].

Biochemická analýza

Všechny biochemické analýzy byly prováděny na Oddělení klinické biochemie. Pro hodnocení kostního obratu pomocí biochemických parametrů jsme vycházeli z doporučení International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in clinical studies [19]. V naší studii jsme vyšetřovali hladiny čtyř parametrů: bALP, PINP, ICTP a OPG.

PINP (N-terminální propeptid prokolagenu typu 1) a 25OHD (25-hydroxyvitamin D) byly stanoveny soupra-

vami Elecsys PINP a Elecsys Vitamin D total (Roche) na analyzátoru Cobas 6000 modul e601 metodou elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA), ICTP (karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I) soupravou UniQ ICTP RIA (Orion) radioimunoanalýzou, bALP imunoradiometrickou analýzou s užitím kitu OsteaseIRMA (BeckmanCoulter). ICTP a bALP byly měřeny automatickým více detektorovým systémem Wizard 2 model 2470 (Perkin Elmer). OPG (osteoprotegerin) byl vyšetřen automatickým analyzátozem mikrodestiček EVOLIS (Bio-Rad) pomocí soupravy Human Osteoprotegerin ELISA (Bio-Vendor), do doby vyšetření byly vzorky skladovány při teplotě -80 °C.

Ostatní parametry kostního metabolismu byly stanoveny soupravami firmy Roche na analyzátozech Cobas (Hitachi). Nevyšetřovali jsme RANK a RANKL z důvodu nepřítomnosti osteolytických lézí u hodnocených pacientů a také s ohledem na závěry všech zatím publikovaných analýz neprokazujících konko-

mitantní snížení RANKL a poměru RANKL/OPG u Ph-
-MPN [16,26]. U pacientů s MF jsme hodnotili vztah mezi hematologickým fenotypem, pokročilostí choroby a markery kostního metabolismu. Srovnávací soubor tvořili nemocní s pre PMF, PV a ET bez známek fibrózy kostní dřeně.

Statistika

Rozdíl v hladině spojitých prediktorů mezi MF pacienty a kontrolami byl hodnocen pomocí Kruskalova-Wallisova testu. Kruskalův-Wallisův test je neparametrická analogie jednovýběrové ANOVY. Test zkoumá, zda obě datové sady pocházejí se stejné distribuce (tedy z distribuce se stejným mediánem). Pro dva vzorky je Kruskalův-Wallisův test ekvivalentní Mannovu-Whitneyho U testu. Všechny čtyři prediktory (OPG, PINP, bALP a ICTP) jsme zkombinovali pomocí mnohorozměrné logistické regrese. Vzájemný vztah mezi spojitými prediktory jsme analyzovali pomocí nepara-

Tab. 1. Klinický a laboratorní fenotyp pacientů s MF, prePMF, PV a ET v době analýzy

	MF n = 34	prePMF n = 13	PV+ET n = 28
Muži/ženy	13/21	3/10	16/12
Median věku (roky) (rozmezí)	61 (36-79)	53 (25-72)	61 (28-85)
Splenomegalie (% pacientů), (median velikosti pod LOŽ)	68 (6,5cm)	38 (0 cm)	18 (0 cm)
Median hemoglobinu (g/l) (rozmezí)	106,5 (76-143)	119 (99-162)	137,5 (97-166)
Median leukocytů x 10 ⁹ /l (rozmezí)	8,28 (3,14-33,7)	7,67 (3,3-15,2)	8,95 (2,56-24,08)
Median trombocytů x 10 ⁹ /l (rozmezí)	307 (71-768)	576 (142-882)	484 (124-901)
Cirkulující blasty ≥ 1 % (% pacientů)	47	0	0
JAK2V617F (% pacientů)	52,9	46	92,8
MPL (% pacientů)	32,3	0	0
CALR (% pacientů)	14,7	46	2
Konstituční symptomy ¹ (% pacientů)	17,6	0	0
Median LDH (μcat/l) (rozmezí)	8,1 (3,4-26,4)	4,47 (2,7-3,17)	3,8 (2,74-5,07)
Léčba	% pacientů	% pacientů	% pacientů
Interferon alfa	0	8	7
Hydroxyurea	38	46	57
Anagrelid	9	15	11
Ruxolitinib	15	0	0
Busulfan	5,8	0	0

¹ - konstituční symptomy: zvýšení tělesné teploty, ztráta hmotnosti a noční poty

LOŽ - levý oblouk žeberní, LDH - laktátdehydrogenáza, MF - myelofibróza, prePMF - prefibrbotická fáze primární myelofibrózy, ET - esenciální trombocytémie, PV - pravá polycytemie

Tab. 2. DIPSS skóre u pacientů s MF a prePMF v době analýzy

DIPSS skóre	MF n = 34 počet pacientů	prePMF n = 13 počet pacientů
Low risk	9	10
Intermediate-1 risk	12	3
Intermediate-2 risk	11	0
High risk	2	0

DIPSS skóre (Dynamic International Prognostic Scoring System) hodnotí rizikové faktory: věk > 65let (1 bod), konstituční symptomy (1 bod), hemoglobin < 100g/l (2 body), leukocyty > 25 x 10⁹/l (1 bod), cirkulující blasty ≥ 1 % (1 bod). Riziková stratifikace: low risk (0 bodů), intermediate-1 risk (1–2 body), intermediate-2 risk (3–4 body), high risk (≥ 5 bodů). Konstituční symptomy: zvýšení tělesné teploty, ztráta hmotnosti a noční poty

metrické (Spearmanovy) korelace. Vztah mezi kategoričnými proměnnými byl analyzován pomocí chí kvadrát testu v kontingenčních tabulkách. Pokud byly četnosti v buňkách malé, použili jsme exaktní Fisherův faktoriálový test. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Veškerá práce s daty, vizualizace a analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB and Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.

VÝSLEDKY

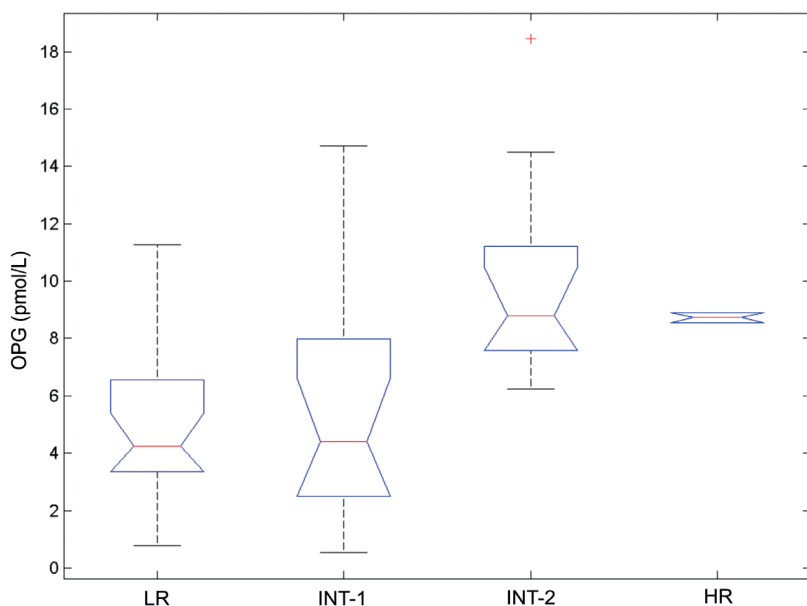
Distribuce „driver“ mutací u MF byla následující: JAK2 V617F 18 případů (53 %), CALR (exon 9) 11 případů (32 %),

MPL (W515) 5 případů (14 %). Z CALR mutovaných nese 69 % mutaci typu 1, 7 % mutaci typu 2 a 23 % další méně frekventní typy. Palpačně hmatná splenomegalie byla v době analýzy přítomná u 68 % nemocných s mediánem velikosti 6,5 cm pod levý oblouk žeberní (rozmezí 2–24). Hlavní charakteristiky studiové populace a referenční skupiny jsou shrnuty v tabulce 1. K posouzení pokročilosti choroby bylo v době analýzy u všech pacientů stanoveno aktuální DIPSS skóre (Dynamic International Prognostic Scoring system, tab. 2) [27]. Hodnoty sledovaných markerů kostního metabolismu a další laboratorní výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Výsledky TSH, parathormonu, ionizovaného calcia (Ca), fosforu (P), kreatininu a kostní izoformy alkalické fosfatázy nepřekračovaly u hodnocených subjektů referenční meze. Parametr PINP byl elevován u 18 % MF a 15 % prePMF, ICTP u 32 % případů MF a 23 % prePMF. Hodnoty nekorelují s pokročilostí fibrózy ani dalšími laboratorními parametry, nevykazují statisticky významné rozdíly ve srovnání se skupinou PV a ET. OPG byl zvýšen nad laboratorní danou referenční mez u 53 % případů MF, 38 % prePMF a 65,5 % PV a ET, rozdíly mezi skupinami ale nebyly statisticky významné (p > 0,05). U MF korelují hodnoty OPG s rizikovým statusem hodnoceným podle DIPSS skóre, s významně vyšším OPG u nemocných s DIPSS skóre ≥ 3 (4,3 pmol/l vs. 8,8 pmol/l; p = 0,0043, graf 1). Nepotvrdili jsme význam-

Tab. 3. Laboratorní parametry pacientů s MF, prePMF, PV a ET

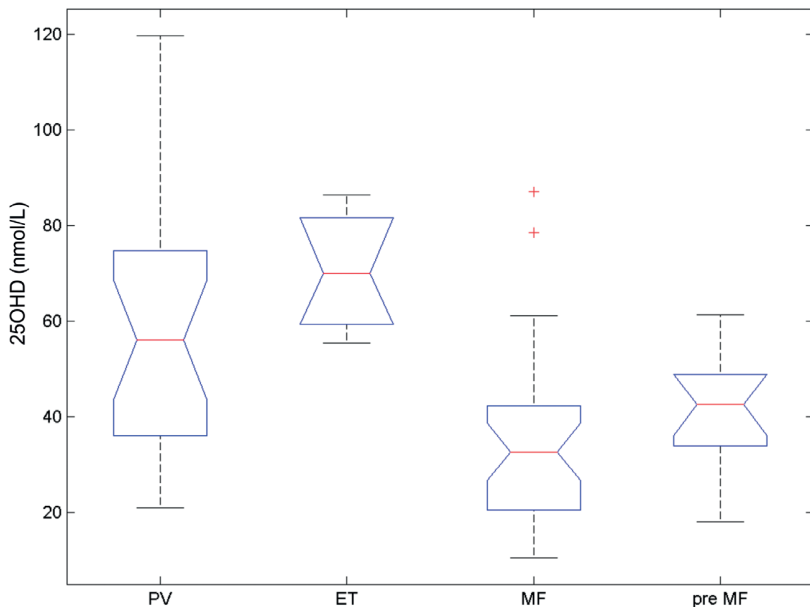
	prePMF n = 13	MF n = 34	PV + ET n = 28	Hodnoty p
Parathormon (pmol/l) median (rozmezí)	3,4 (2–6)	4,1 (2,2–6)	3,55 (1,6–5,5)	> 0,05
Ca ²⁺ (mmol/l) median (rozmezí)	2,37 (2,16–2,5)	2,3 (2,01–2,53)	2,3 (2,15–2,54)	> 0,05
Fosfáty (mmol/l) median (rozmezí)	1,08 (0,81–1,34)	1,1 (0,8–1,45)	1,16 (0,7–1,42)	> 0,05
CB (g/l) median (rozmezí)	70,2 (63,4–83,3)	67,5 (65–77,5)	70 (64–77,5)	> 0,05
bALP (μg/l) median (rozmezí)	7,9 (5–15,8)	10,7 (5–22)	9,55 (5,2–22,1)	> 0,05
PINP (μg/l) median (rozmezí)	41,8 (30,4–98,5)	36,6 (19,6–239)	33,5 (12,3–73,2)	> 0,05
ICTP (μg/l) median (rozmezí)	3,82 (1,82–5,37)	5,16 (1,82–17,3)	4,65 (2,87–12,1)	> 0,05
OPG (pmol/l) median (rozmezí)	4,15 (1,92–10,3)	5,9 (0,53–18,45)	5,2 (0,92–8,99)	> 0,05
25OHD (nmol/l) median (rozmezí)	42,6 (18–61,2)	28 (10,4–87,1)	59,6 (21–119,7)	0,0003

MF - myelofibróza, prePMF - prefibrótická fáze primární myelofibrózy, ET - esenciální trombocytémie, PV - pravá polycytémie, 25OHD - 25-hydroxyvitamin D, Ca²⁺ - calcium, CB - celková bílkovina, PINP - N-terminální propeptid prokolagenu typu I, ICTP - karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I, bALP - kostní izoenzym alkalické fosfatázy, OPG - osteoprotegerin



Graf 1. Hodnoty osteoprotegerinu (OPG) u pacientů s myelofibrózou. U myelofibrózy koreluje hodnota OPG s pokročilostí choroby podle DIPSS skóre, s významně vyšším OPG u nemocných s intermediate-2 a vysokým rizikem ($p = 0,0043$). DIPSS – Dynamic International Prognostic Scoring System

nou korelaci mezi studovanými parametry kostního statusu a hodnotami laktátdehydrogenázy, solubilního receptoru pro interleukin-2, pohlavím, mutačním stavem ani splenomegalii.

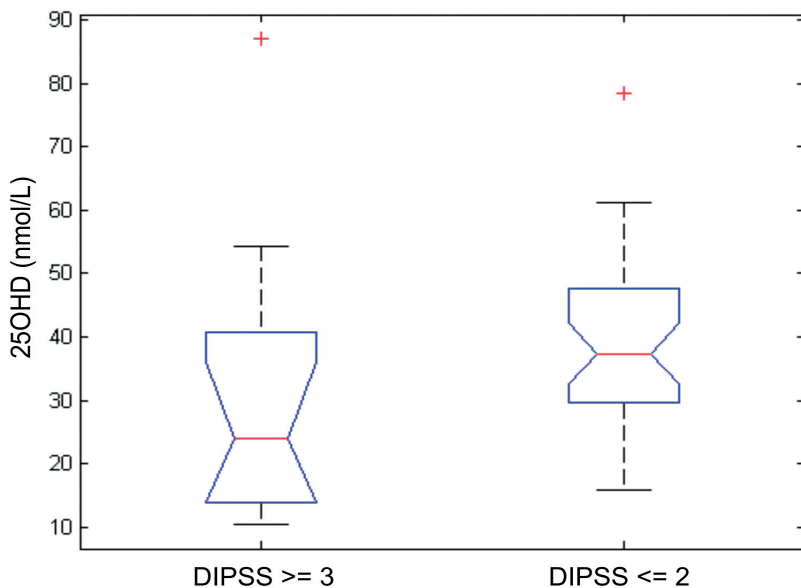


Graf 2. Tíže deficitu vitamínu D v závislosti na typu Ph-MPN. Pacienti s myelofibrózou mají signifikantně nižší hladiny 25OHD ve srovnání s prePMF a skupinou PV/ET ($p = 0,0003$). PV – pravá polycytemie, ET – esenciální trombocytémie, Ph-MPN – Philadelphia chromosome negativní myeloproliferativní nemoci, 25OHD – 25-hydroxyvitamín D

Medián plazmatických koncentrací 25OHD byl následující: u MF 28 nmol/l (rozmezí 10,4–87,1), u pre-PMF 42,6 nmol/l (rozmezí 18–61,2), u PV a ET 59,6 nmol/l (rozmezí 21–119,7). Deficit 25OHD byl častěji zaznamenán ve skupině MF (v 96 %). Pacienti s MF mají také signifikantně nižší hladiny 25OHD ve srovnání s prePMF a skupinou PV a ET (28 nmol/l vs. 42,6 nmol/l vs. 59,6 nmol/l; $p = 0,0003$, graf 2). U MF koreluje sérové koncentrace 25OHD s pokročilostí choroby, s významně nižší hladinou 25OHD u nemocných s DIPSS skóre ≥ 3 (24 nmol/l vs. 38,4 nmol/l; $p = 0,05$, graf 3). Pro relativně nízký počet zaznamenaných událostí nemůžeme statisticky relevantně zhodnotit vliv deficitu 25OHD na OS ve skupině MF.

DISKUSE

Markery kostní remodelace – v současném písemnictví byl kostní status u MF studován pouze na poměrně malých počtech pacientů a ve většině případů srovnáván se zdravou populací [16–18, 26, 28]. Závěry dříve publikovaných studií navíc nejsou jednotné. V naší práci jsme vyšetřovali parametry kostního obratu ve větším souboru MF a hodnotili jejich přínos pro běžnou klinickou praxi. Výsledky jsme srovnávali s ostatními Ph-MPN s cílem identifikovat laboratorní marker reflektující přítomnost fibrózy kostní dřeně. Diamond et al. popisují zvýšení jak bALP (marker kostní formace), tak ICTP (marker kostní resorpce) na 4 kazuistických případech MF [29]. Další práce shodně prokazuje vyšší hodnoty ICTP u nemocných s MF [30]. Farmer et al. ve svém souboru 18 pacientů s MF popsali signifikantní elevaci P1NP, ale nepotvrdili zvýšení hodnot bALP, ani markerů kostní resorpce [18]. V naší kohortě MF jsme také neprokázali zvýšení bALP. P1NP a ICTP byly zvýšeny nad referenční mez jen u části nemocných, hodnoty nekorelovaly s pokročilostí choroby ani dalšími laboratorními či klinickými parametry, byly srovnatelné jako u prePMF nebo PV/ET. Testované plazmatické markery zřejmě nejsou dostatečně cit-



Graf 3. Tíže deficitu vitamínu D v závislosti MF hodnocené podle DIPSS skóre. Sérové koncentrace 25OHD korelovaly s pokročilostí choroby hodnocené podle DIPSS skóre, s významně nižší hladinou 25OHD u MF s DIPSS skóre ≥ 3 ($p = 0,05$). DIPSS – Dynamic International Prognostic Scoring System, 25OHD – 25-hydroxyvitamin D, MF – myelofibróza

livé pro rutinní neinvazivní monitorování stupně fibrózy kostní dřeně. Wang et al. a Kreipe et al. popisují vyšší expresi OPG (měřením sérové hladiny OPG a OPG mRNA v kulturách stromálních buněk kostní dřeně) u pokročilé MF oproti ostatním MPN a kontrolní skupině zdravých probandů [17, 26]. Shodně s dříve publikovanými studiemi jsme potvrdili zvýšení OPG u většiny pacientů s MF, současně ale také u prePMF a PV/ET skupiny, rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné. U MF hodnoty OPG korelovaly s rizikovým statusem hodnoceným podle DIPSS skóre, s významně vyšším OPG u pacientů s vysokým a středním-2 rizikem ($p = 0,0043$). Naše výsledky podporují hypotézu, že zvýšená produkce osteoprotegerinu bude důležitým faktorem pro rozvoj fibrózy kostní dřeně u Ph-MPN, ale také se nejeví jako vhodný klinický prediktor, pomocí něhož bychom neinvazivně odlišili MF od prefibrótického stadia nebo ostatních Ph-MPN.

Limitací naší práce může být skutečnost, že biopsie kostní dřeně nebyly realizovány přesně v době odběrů vzorků krve k vyšetření kostního statusu a nelze vyloučit, že u některých pacientů od poslední biopsie mohlo dojít k progresi fibrózy. Pro celkově relativně nízký počet pacientů, nemůžeme statisticky relevantně zhodnotit vliv jednotlivých typů specifické léčby MF na hodnoty indikátorů kostního statusu.

Vitamin D – Pardananani uvádí častější výskyt deficitu vitamínu D u pacientů s PMF a PV, nepotvrdil ale korelaci mezi tíží deficitu a klinickými či laboratorními

charakteristikami pacientů s Ph-MPN (věk, mutační stav, transfuzní závislost, DIPSS-Plus skóre, hodnoty hemoglobinu, leukocytů, trombocytů, cirkulujících blastů), ani vliv na OS [31]. Naproti tomu recentní práce hodnotící význam vitamínu D u myeloproliferativních chorob naznačují, že 25OHD může mít odlišný prognostický význam u pacientů léčených různými typy léčby. Radujkovic et al. popisují u pacientů s myelodysplastickým syndromem a vyšším vitamínem D před zahájením terapie lepší celkové přežití po první linii hypometylační léčby 5-azacitidinem. Současně in vitro prokázal, že konkomitantní podávání vysokých dávek vitamínu D potencuje antiproliferační efekt 5-azacitidinu [32]. Dřívější studie s limitovaným počtem pacientů s MF sice nepotvrdily terapeutický efekt substituce vitamínem D, avšak aplikace adekvátních dávek vitamínu D byla u použitých preparátů

limitována rozvojem hyperkalcemie [33–35].

Další studie na zvířecích modelech přinášejí důkazy o schopnosti vitamínu D snižovat aktivaci STAT 3 a STAT 1 proteinů a tím i produkci proinflatorních cytokinů [36, 37]. V našem souboru koreluje přítomnost fibrózy a stadium podle DIPSS skóre s hladinou vitamínu D, s nižšími hodnotami 25OHD u pacientů s rozvinutou fibrózou ($p = 0,0003$) nebo DIPSS skóre ≥ 3 ($p = 0,05$). Pozorovali jsme signifikantně nižší sérové koncentrace 25OHD u MF oproti prePMF a skupině PV a ET ($p = 0,0003$). S ohledem na tato zjištění a skutečnost, že se vitamin D spolupodílí na inhibici JAK/STAT signální dráhy, vyvstává aktuální potřeba ověřit jeho prognostický význam a přínos suplementace v současné éře JAK-inhibitorů prospektivními studiemi.

ZÁVĚR

Hlubší poznání patogeneze fibrózy kostní dřeně umožní nejen zpřesnit klasifikaci Ph-MPN, ale také snížit potřebu invazivních vyšetření a zlepšit monitorování nemocných. Ani jeden z testovaných parametrů reflektujících kostní status (bALP, ICTP, P1NP) se ale v běžné klinické praxi nejeví jako přínosný pro sledování rozvoje fibrózy u Ph-MPN populace. Zvýšená exprese osteoprotegerinu, podílející se na inhibici osteoklastů, endoteliální proliferaci a neoangiogenezi, zřejmě hraje podstatnou roli v patogenezi fibrózy kostní dřeně, nicméně není vhodným markerem k neinvaziv-

nímu monitorování rozvoje a progresu fibrózy dřeně. Trepanobiopsie zůstává stále nezastupitelným vyšetřením v diagnostice a sledování vývoje MF. Vitamin D je multifunkční pro-hormon s širokým spektrem účinků, kterým se v posledních letech věnuje značná pozornost. Jeho deficit bývá spojován s vyšším rizikem vzniku maligních onemocnění a horší prognózou nemocných [20, 22]. V našem souboru pozorujeme u pacientů s MF signifikantně nižší sérové koncentrace vitamínu D ve srovnání s prePMF a ostatními Ph-MPN, tíže jeho deficitu u MF koreluje s pokročilostí nemoci. Hlubší poznání efektu kalcitriolu na nádorový klon může determinovat jeho potenciální využití v léčbě MF. Hypotézu o možném synergistickém působení vitamínu D s JAK-inhibitory bude nutné ověřit budoucími multicentrickými studiemi s dostatečně velkou kohortou pacientů.

Použité zkratky

25HOD	– 25-hydroxyvitamin D
ALP	– kostní izoenzym alkalické fosfatázy
AS-PCR	– alelově specifická polymerázová řetězová reakce
Ca ²⁺	– kalcium
CALR	– kalretikulín
DIPSS	– <i>Dynamic International Prognostic Scoring System</i>
ET	– esenciální trombocytémie
ICTP	– karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
JAK2 V617F	– mutace genu pro Janusovu kinázu 2 v pozici 617
LDH	– laktátdehydrogenáza
MF	– myelofibróza
MPL	– <i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
OPG	– osteoprotegerin
OS	– celkové přežití
P1NP	– N-terminální propeptid prokolagenu typu I
Ph-MPN	– Philadelphia chromosome negativní myeloproliferativní nemoci
PMF/prePMF	– primární myelofibróza/ prefibrotická fáze primární myelofibrózy
PV	– pravá polycytemie
RANK/RANKL	– <i>receptor activator of NF-κB/receptor activator of NF-κB ligand</i>
STAT	– <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TSH	– tyreotropní hormon hypofýzy

LITERATURA

1. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2016;91(12):1262–1271.

- Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County study, 1976–1995. *Am J Hematol* 1999;61(1):10–15.
- Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ. 3rd. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935–1989. *Am J Hematol* 1994;47(2):89–93.
- Bonicelli G, Abdulkarim K, Mounier M, et al. Leukocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythemia vera: a population-based study of 327 patients. *Br J Haematol* 2013;160(2):251–254.
- Moulard O, Mehta J, Fryzek J, et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol* 2014;92(4):289–297.
- Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3179–3184.
- Reilly JT, McMullin MF, Beer PA, et al. Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis. *Br J Haematol* 2012;158(4):453–471.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779–1790.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–2390.
- Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: clinical and molecular advances. *Blood Rev* 2016;30(6):453–459.
- Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, et al. A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:2534–2541.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama* 2004;292(4):490–495.
- Chagraoui H, Sabri S, Capron C, Villeval JL, Vainchenker W, Wendling F. Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes. *Exp Hematol* 2003;31(11):1081–1088.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-κB and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276(23):20659–20672.
- Bock O, Loch G, Schade U, et al. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br J Haematol* 2005;130(1):76–82.
- Wang JC, Hemavathy K, Charles W, et al. Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol* 2004;32(10):905–910.

18. Farmer S, Vestergaard H, Hansen S, et al. Bone geometry, bone mineral density, and micro-architecture in patients with myelofibrosis: a cross-sectional study using DXA, HR-pQCT, and bone turnover markers. *Int J Hematol* 2015;102(1):67-75.
19. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, et al. International osteoporosis foundation and international federation of clinical chemistry and laboratory medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(8):1271-1274.
20. Lai YH, Fang TC. The pleiotropic effect of vitamin D. *ISRN Nephrol* 2013; DOI: 10.5402/2013/898125.
21. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J* 2010;16(1):1-9.
22. Kulling PM, Olson KC, Olson TL, Feith DJ, Loughran TP jr. Vitamin D in hematological disorders and malignancies. *Eur J Haematol* 2017;98(3):187-197.
23. Maalmi H, Ordóñez-Mena JM, Schottker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer* 2014;50(8):1510-1521.
24. Wang W, Li G, He X, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prognosis in hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(5):1999-2005.
25. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054-1061.
26. Kreipe H, Büsche G, Bock O, Hussein K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5(suppl 1):S21.
27. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment). *Blood* 2010;115(9):1703-1708.
28. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao Z, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanism and the role of TGF- β . *Stem Cell Investig* 2016;3:5.
29. Diamond T, Smith A, Schnier R, Manoharan A. Syndrome of myelofibrosis and osteosclerosis: a series of case reports and review of the literature. *Bone* 2002;30(3):498-501.
30. Jensen MK, Riisbro R, Holten-Andersen MN, et al. Collagen metabolism and enzymes of the urokinase plasminogen activator system in chronic myeloproliferative disorders: correlation between plasma-soluble urokinase plasminogen activator receptor and serum markers for collagen metabolism. *Eur J Haematol* 2003;71(4):276-282.
31. Pardanani A, Drake MT, Finke C, et al. Vitamin D insufficiency in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes: clinical correlates and prognostic studies. *Am J Hematol* 2011;86(12):1013-1016.
32. Radujkovic A, Schnitzler P, Ho AD, Dreger P, Luft T. Low serum vitamin D levels are associated with shorter survival after first-line azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome and secondary oligoblastic acute myeloid leukemia. *Clin Nutr* 2017;36(2):542-551.
33. Wieslander SB, Mortensen BT, Binderup L, Nissen NI. 1 alpha(OH)D₃ (ETALPHA) treatment and receptor studies in 16 patients with chronic and myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol* 1987;39(1):35-38.
34. Tsatalas C, Curtoglou G, Fotopoulos D, Halkia P, Vyzantiadis AT, Sinakos Z. 1 alpha(OH)D₃ treatment and procollagen III (PC III) studies in idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 1989;74(6):559-562.
35. Foa P, Maiolo AT, Cortellaro M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in the treatment of idiopathic thrombocytopenia and myelofibrosis. *Haematologica* 1990;75(3):294-295.
36. Wang Q, Li H, Xie H, et al. 25-Hydroxyvitamin D₃ attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;135:43-50.
37. Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1,25 Dihydroxyvitamin-D₃ modulates JAK-STAT pathway in IL-12/INFgamma axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2006;83(7):1299-1309.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

- MP – příprava rukopisu
 TS, AH, TP – podíleli se na revizi, úpravách, doplnění a finální verzi rukopisu
 JN, MD – vyšetření mutačních stavů nemocných
 PP, JP – realizace vyšetření biochemických parametrů

Čestné prohlášení

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantovým projektem IGA_LF_2018_004.

Doručeno do redakce dne 8. 7. 2018.

Přijato do tisku dne 2. 10. 2018.

MUDr. Miroslava Palová

Hemato-onkologická klinika
 Fakultní nemocnice Olomouc
 I. P. Pavlova 6
 779 00 Olomouc
 e-mail: Miroslava.palova@fnol.cz