СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА НИВАТА НА ЦИРКУЛИРАЩИ НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С ИНДОЛЕНТНИ И АГРЕСИВНИ НЕХОДЖКИНОВИ ЛИМФОМИ

Шениз Юзеир[1,2], Лиана Герчева[3]

[1]Втора катедра по вътрешни болести, Факултет по медицина, Медицински университет – Варна
[2]Клиника по хематология, УМБАЛ „Св. Марина", Медицински университет – Варна
[3]Аджибадем Сити Клиник, Варна

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE LEVELS OF CIRCULATING PLATELET-NEUTROPHIL COMPLEXES IN NEWLY DIAGNOSED NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PATIENTS

Sheniz Yuzeir[1,2], Liana Gercheva[3]

[1]Second Department of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Medical University of Varna
[2]Clinic of Hematology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna
[3]Acibadem City Clinic, Varna

РЕЗЮМЕ

Въведение: *При малигнените заболявания броят на активираните неутрофили и тромбоцити се увеличава многократно. Образуването на комплекси между тромбоцитите и неутрофилите, наречено PNC (platelet-neutropfil complexes), е основен механизъм, свързващ хемостазата и възпалителните процеси на вродената имунна система.*

Цел: *Цел на проучването е да се изследват нивата на циркулиращи неутофилно-тромбоцитни комплекси (ЦНТК) при новодиагностицирани пациенти с агресивни и индолентни неходжкинови лимфоми (НХЛ) преди и след стимулация с тромбоцитни агонисти (ADP и PMA).*

Материал и методи: *Нивата на ЦНТК са изследвани чрез флоуцитометричен анализ на венозна кръв при 88 пациенти с хистологично верифицирани НХЛ преди химиотерапевтично лечение и при 20 здрави контроли.*

Резултати: *Установява се съществена разлика между средните стойности на PNC при здравите контроли и тези в пациентската група ($p<0.001$). Установи се значима разлика в нивата на PNC при агресивните в сравнение с индолентните НХЛ.*

ABSTRACT

Introduction: *It has been established that the number of activated neutrophils and platelets increases in the presence of inflammatory and neoplastic diseases. The formation of complexes between these cells is the main mechanism that connects haemostasis with inflammatory processes.*

Aim: *We aimed to investigate the level of circulating platelet-neutrophil complexes (PNC) before and after with platelet agonist stimulation (ADP and PMA).*

Materials and Methods: *A total 88 patients with pathologically verified non-Hodgkin's lymphoma (NHL) before chemotherapy and 20 healthy controls had their PNC levels analyzed. Levels of PNC were measured by flow cytometry analysis of peripheral blood.*

Results: *The platelet-neutrophil complex levels were significantly higher in patients with NHL compared to healthy controls ($p<0.01$). The levels were significantly higher in the group of patients with aggressive NHL compared with the group of patients with indolent NHL.*

Ключови думи: *неутрофилно-тромбоцитни комплекси, Нехочкинови лимфоми*

Keywords: *platelet-neutrophil complexes, non-Hodgkin's lymphoma*

ВЪВЕДЕНИЕ

Неутрофилите са важна част от имунната система. Те отделят различни видове молекули, наречени цитокини и хемокини. Доказано е, че тези белтъци имат важна роля за развитието на туморните клетки и редица процеси, позволяващи разрастване на туморната тъкан (туморна ангиогенеза, процеси на метастазиране и др.) (1). Тромбоцитите са клетки, свързани с процесите на хемостаза и играят ключова роля в образуването на фибриновия съсирек (4).

Установено е, че при възпалителни процеси и неопластични заболявания броят на активираните неутрофили и тромбоцити се увеличава многократно.

Образуването на комплекси между неутрофили и тромбоцити, наречено PNC (platelet-neutrophil complexes) е много важен механизъм, свързващ хемостазата и възпалителните процеси (2). Процесът на формиране на комплекси води до взаимно активиране на тромбоцити и на неутрофили, освобождаване на цитокини, експозиция на определени адхезионни молекули и рецептори на клетъчната повърхност (4).

През 1975 г. за първи път подобни взаимодействия между неутрофили и тромбоцити са наблюдавани при пациенти с рак на простатна жлеза (12).

Преди около 50 години феноменът тромбоцитите, прилепнали към неутрофили, е описан и формулиран като „тромбоцитен сателизъм" (11). Днес е известно, че образуването на комплекси между тромбоцитите и неутрофилите се отнася до плеяда от патологични състояния, но точният механизъм на тяхното формиране все още е обект на дискусии.

Образуването на неутрофилно-тромбоцитни комплекси се осъществява между адхезионна молекула P-selectin (CD62P), разположена върху тромбоцитната мембрана и лиганда PSGL-1, намиращ се върху неутрофилите (10).

Взаимодействието между циркулиращите тромбоцити и неутрофили е процес, характеризиращ се с интензивен обмен на вътреклетъчни сигнали.

Подчертана е важната роля на взаимодействията между интегринови рецепторни молекули, като Gp1b-IX-V/GpIIB/IIIa върху тромбоцитите и alpha-M-beta-2 върху неутрофилите, които инициират вътреклетъчна сигнализация (5,15).

Съществуват много интересни факти, показващи, че тези циркулиращи PNC образуват т. нар. „метастатична ниша" и засилват процесите на метастазиране (13). PNC комплекси се наблюдават при редица патологични състояния, като бронхиална астма, хроничен улцерозен колит (ХУК), сепсис, ревматоиден артрит, остър коронарен синдром и др. (3,6,7,16).

До този момент при нито една от нозологичните единици, включени в тази група лимфопролиферативни заболявания, не е проучена ролята на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси (PNC) за хода на протичане на заболяванията, включително като рисков показател и потенциален прогностичен фактор за изхода от лечение.

ЦЕЛ

Цел на изследването е да се анализират нивата на циркулиращите PNC при новодиагностицирани пациенти с агресивни и индолентни неходжкинови лимфоми (НХЛ) преди и след стимулация с тромбоцитни агонисти ADP (аденозин-дифосфат) и PMA (форбол-миристат-ацетат) и мониториране на нивата на PNC след проведено противотуморно лечение.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В проучването са включени общо 88 новодиагностицирани пациенти с хистологич-

но верифицирана диагноза НХЛ, съобразно патолого-анатомичните критерии за поставяне на диагнозата, и 20 здрави контроли.

Венозна кръв за определяне нивата на циркулиращите PNC е взета при здрави контроли и всички пациенти изходно, а при тези, лекувани с химиотерапия или имунохимиотерапия, и след 6-ия месец от лечението (втора, контролна кръвна проба).

Количеството на всяка кръвна проба беше 8 mL, разпределена в два вакутейнера, съдържащи два различни антикоагуланта: (1) ACD (Becton Dickinson, USA, BD Vacutainer® 8.5 mL с адитив ACD Solution A: тринатриев цитрат 22.0 g/L; лимонена киселина 8.0 g/L; D-глюкоза 24.5 g/L; 1.5 mL) и (2) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). In vitro анализ на PNC се осъществи чрез стимулация на тромбоцитите с ADP и на неутрофилите с PMA.

Неутрофилните гранулоцити се гейтират по CD15 APC/SSC. Циркулиращите PNC се отчитат по двойно-позитивния сигнал на тромбоцитния маркер CD41a и неутрофилния маркер CD15. Анализът на образуването на тромбоцитно-левкоцитни комплекси е извършен според метод на Mauler и съавтори с модификации (14).

Резултатите са обработени с SPSS v. 20.0, като са използвани дисперсионен, вариационен, сравнителен и корелационен анализ. За ниво на значимост приемаме $p<0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

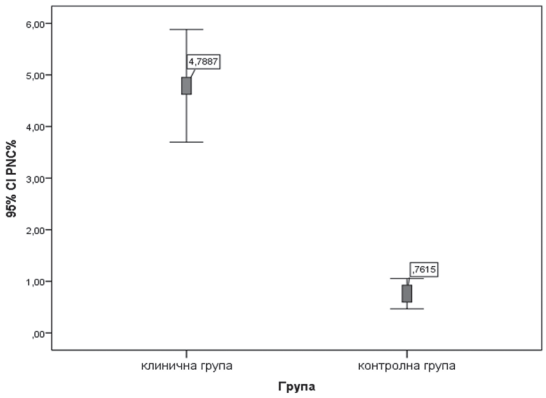
Пациентската полулация е със средна възраст 60.6 г. (28–88 г.). Не се наблюдава сигнификантна разлика във възрастовите групи между изследваните пациенти и здравите контроли.

Разпределението по пол е: мъже – 52.3% и жени – 47.7%. Установи се съществена разлика между пола на пациентите и типа на НХЛ {OR=1.87(0.810-4.317); $p<0.05$}.

В групата с агресивни НХЛ доминира броят на мъжете (58.7%), а в групата с индолентни НХЛ – този на жените (56.8%).

Разпределението според вида на лимфома е, както следва: агресивни НХЛ са 52.3% и индолентни – 47.7%. В изследването са включени и 20 здрави доброволци, служещи за контролна група.

На Фиг. 1 са представени средните стойности на PNC% в клиничната група и в групата на здравите контроли. Установява се съществена разлика между средните стойности на PNC при пациентите с НХЛ и здравите контроли ($p<0.001$).



Фиг. 1. Сравнителен анализ на средни стойности на PNC% при пациенти с НХЛ и здрави контроли

Табл. 1. Характеристика на пациентите с НХЛ според демографските показатели и нивата на PNC% преди и след стимулация с агонисти

Показател		Агресивни НХЛ	Индолентни НХЛ
Пол	Мъже	27/58.7%	19/45.2%
	Жени	19/41.3%	23/54.8%
Възраст (год.)	средна ст-ст±SD (граници)	60.2±13.1 (28–88)	61.2±10.5 (39–80)
PNC % EDTA	средна ст-ст±SD (граници)	5.5±6.3 (0.91–39.47)	4.0±3.5 (0.88–17.92)
PNC % ACD	средна ст-ст±SD (граници)	12.6±15.5 (0.97–68.53)	10.5±13.8 (0.86–63.64)
PNC % PMA	средна ст-ст±SD (граници)	57.2±19.9 (8.29–92.28)	51.9±22.1 (4.80–92.62)
PNC % ADP	средна ст-ст±SD (граници)	53.1±20.1 (5.81–86.25)	50.5±21.7 (7.60–87.47)

Основните демографски характеристики и сравнителния анализ на нивата на PNC при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ in vivo (EDTA и ACD) и in vitro (PMA и ADP) след стимулация са посочени в Табл. 1.

Установихме сигнификантна разлика между нивата на PNC преди и след стимулация с агонисти (ADP и PMA) при двете изследвани групи лимфоми.

Средните стойности на PNC% EDTA и PNC% ACD при агресивните лимфоми са значително по-високи в сравнение с индолентните НХЛ (съответно 12.64 за агресивните към 10.49 за индолентните НХЛ).

При статистически анализ на PNC% преди стимулация се установи съществена разлика между PNC% EDTA и PNC% ACD (p=0.012), която се наблюдава и в двете пациентски групи с НХЛ.

При болните с агресивни НХЛ изходните нива на PNC (PNC EDTA и PNC ACD) се увеличиха приблизително 11.8 пъти след стимулация на венозна кръв с PMA в сравнение със стойностите на PNC след стимулация с тромбоцитен агонист ADP.

В групата болни с индолентни НХЛ установихме същата тенденция. Изходните нива на PNC (PNC EDTA и PNC ACD) се увеличават приблизително 10.9 пъти след стимулация на венозна кръв с PMA в сравнение с тези, измерени след стимулация с ADP.

При изследване на PNC% след стимулация с тромбоцитни агонисти (ADP и PMA) се наблюдава подобна тенденция (за PNC% PMA – 57.22 за агресивни и 51.94 за индолентни лимфоми, за PNC% ADP – 53.06 за агресивни и 50.54 за индолентни лимфоми).

От гледна точка на пола и типа на лимфома се наблюдават значими разлики в стойностите на PNC%.

При анализ на PNC% EDTA се установяват два пъти по-високи стойности при жените с агресивни лимфоми (съответно 3.5 за жени с индолентни НХЛ към 6.7 за жени с агресивни НХЛ; p=0.02).

При PNC% ACD съществена разлика се доказа и при двата пола. При мъжете стойностите на PNC% ACD са два пъти по-високи при агресивните лимфоми в сравнение със стойностите при индолентни лимфоми. При жените нивата на PNC% са 2.5 пъти по-високи при пациенти с агресивни лимфоми (p=0.005) (Фиг. 2).



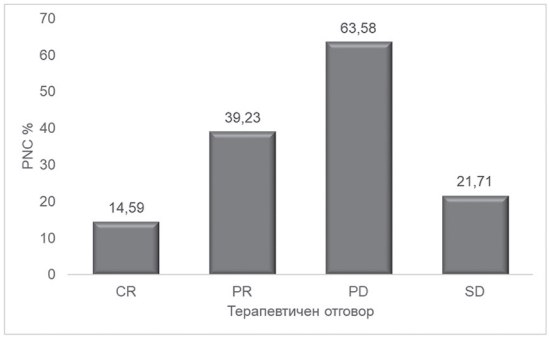
Фиг. 2. Средни стойности на PNC% според пола и типа на НХЛ

При анализ на нивата на PNC% PMA и PNC% ADP се отчита съществена разлика между пола и вида на лимфома. Жените с агресивни НХЛ имат по-високи стойности на PNC% PMA в сравнение с тези с индолентни НХЛ (61.04 към 52.41; p=0.016). Подобни резултати се регистрираха и при анализ на нивата на PNC% ADP (агресивни 54.55 към индолентни 47.78; p=0.004).

По отношение на възрастовия показател се доказа умерена обратно пропорционална зависимост между PNC% PMA и възрастта при пациенти с агресивни лимфоми (r=-0.355;p=0.016). Регистрира се слаба, клоняща към умерена, обратнопропорционална зависимост между възрастта и PNC% EDTA (r=-0.297; p<0.05) и PNC% PMA (r=-0.291; p<0.05) при индолентни лимфоми.

Установи се силна зависимост между нивото на PNC% и постигнат терапевтичен отговор (r=-0.476;p<0.001).

Най-високи стойности на PNC% се наблюдаваха при пациентите с прогресия на заболяването (Фиг. 3).



Фиг. 3. Средни стойности на PNC% според постигнатия терапевтичен отговор

Регистрира се значима разлика между стойностите на PNC% ADP и терапевтичния отговор (p=0.009), като се отчитат най-високи стойности при пациенти с доказана прогресия и рецидив на заболяването (съответно 58.6 при прогресия и 72.7 при рецидив).

При анализ на измененията на PNC% PMA според терапевтичния отговор и вида на лимфома се установи статистически значима разлика (p=0.004) (съответно при пациенти с прогресия 53.3 за индолентни към 59.4 за агресивни НХЛ и при пациенти с рецидив 69.1 за индолентни към 76.3 за агресивни лимфоми).

ДИСКУСИЯ

Настоящите резултати показват значително високи нива на PNC% при пациенти с неходжкинови лимфоми в сравнение с контролната група, като подобни резултати са докладвани и от други изследователски групи (8,9).

В проспективното ни проучване установихме сигнификантна разлика между нивата на циркулиращи PNC и вида на лимфома (агресивни и индолентни) преди и след стимулация с тромбоцитни агонисти (ADP и PMA), като подобни резултати са цитирани и от други изследователи (17).

Прави впечатление, че пациентите с агресивни лимфоми имат три пъти по-висока активност на PNC% преди и след стимулация в сравнение с индолентните лимфоми. При анализ на демографски показатели (пол и възраст) се отчита обратнопропорционална зависимост между възрастта и PNC% и три пъти по-високи нива на PNC% при жените за разлика от мъжете.

По отношение на постигнат терапевтичен отговор, най-високи нива на PNC% комплекси се установиха при прогресирали и рецидивирали пациенти с НХЛ.

Въз основа на получените резултати и горецитираните данни можем да констатираме, че PNC% се определя като неблагоприятен прогностичен фактор при НХЛ.

Нашият опит показва, че високата активност на PNC се свързва с по-напреднала фаза на заболяването при поставяне на диагнозата, по-чести рецидиви и по-висок процент на рефрактерност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хетерогенността на НХЛ е клинично отражение на различните биологични и хистопатологични характеристики на лимфомния процес. Високите нива на циркулиращи PNC могат да играят ролята на негативен предиктивен маркер в развитието на НХЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol. 2012;30:459-489.
2. Bauer HM. In-vitro platelet-neutrophil adherence. Am J Clin Pathol. 1975; 63:824–7. doi:10.1093/ajcp/63.6.824.
3. Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, et al. Enhanced Fcgamma receptor I, alpha M beta2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. J Rheumatol. 2004. 31:2347–55.
4. Cedervall J, Olsson AK. Platelet Regulation of Angiogenesis, Tumor Growth and Metastasis. Tumour Angiogenesis. Rijeka: InTech . 2012; p. 116-134.
5. Diacovo TG, et al. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. Blood. 1996;88(1):146–157.
6. Ferroni P, Basili S, Martini F, et al. Soluble P-selectin as a marker of platelet hyperactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Investig Med. 2000. 48(1):21-7
7. Huo, Y., Schober, A., Forlow S. B, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. Nat. Med.2003. 9(1):61-7.
8. Irving PM, Macey MG, Feakins RM, et al.2008.Platelet-leucocyte aggregates form in the mesenteric vasculature in patients with ulcerative colitis. Eur J Gastroenterol Hepatol.2008. 20(4):283-9.
9. Jensen M. K, Brown P. De N, Lund B. V, Nielsen O. J, Hasselbalch H. C. Increased circulating platelet–leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. European Journal Of Haematology.2001; 66(3):143-51
10. Kuijper PH, Gallardo Tores HI, Lammers JW,et al..Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions. Thromb Haemost.1998. 80:443–8.
11. Kjeldsberg CR, Swanson J. Platelet satellitism. Blood (1974) 43:831–6.

12. Theoret, J. F., Bienvenu, J. G., Kumar, et al. P-Selectin antagonism with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGLIg) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. J. Pharmacol. Exp. Ther.2001. 298, 658–664

13. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111:E3053–61. doi:10.1073/pnas.1411082111.

14. Mauler M. Seyfert J, Haenel D, Seeba H, Guenther J, Stallmann D, Schoeniche C, Hilgendorf I, Bode C, Ahrens I & Duerschmied D. Platelet-neutrophil complex formation-a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples. Journal of Leukocyte Biology.2016; 99(5), 781–789. doi. org/10.1189/jlb.3TA0315-082R.

15. Peters, M. J., Dixon, et al.1999. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. Br. J. Haematol. 106, 391–399.2

16. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL.Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. J Leukoc Biol. 2009; 85:195–204.10.1189/jlb.0708400.

17. Setianto BY, Hartopo AB, Gharini PP, et al. Circulating soluble CD40 ligand mediates the interaction between neutrophils and platelets in acute coronary syndrome. Heart Vessels.2010. 25:282–7.10.1007/ s00380-009-1199-1.

Адрес за кореспонденция:
Шениз Юзеир
Факултет по медицина
Медицински университет – Варна
ул. Марин Дринов 55
9002 Варна
e-mail: shenizyuzeir@abv.bg