

Т.П. Николаенко-Камышова

Коммунальное учреждение
«Днепропетровская городская
многопрофильная клиническая
больница № 4 ОГА»,
Днепропетровск, Украина

Ключевые слова:

миелопролиферативные
новообразования, миелофиброз,
металлопротеиназы.

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ФОРМИРОВАНИЯ МИЕЛОФИБРОЗА ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Разные формы миелопролиферативных новообразований (МПН) имеют похожие морфологические и клинико-гематологические признаки. Они сопровождаются гиперпродукцией клеточных элементов, развитием миелофиброза и недостаточностью кроветворения. Дегградация внеклеточного матрикса происходит под действием цитокинов и матриксных металлопротеиназ (ММП). С целью уточнения особенностей формирования миелофиброза при хронических МПН определяли активность ММП (ММП-2 и -9). **Объект и методы:** изучали клинико-лабораторные показатели у 115 больных с МПН: 31 — с истинной полицитемией, 75 — с первичным миелофиброзом (ПМФ), 9 — с эссенциальной тромбоцитопенией (ЭТ). В группу сравнения включены 92 пациента с атеросклеротическими изменениями сосудов нижних конечностей. Определение активности ММП-2 и -9 в плазме крови проводили методом желатин-зимографии. Протеолитическую активность оценивали по размеру неокрашенных полос на синем фоне. Идентификацию зон, соответствующих ММП-2 и -9, проводили, используя окрашенные маркеры (Bio-Rad Laboratories) и при помощи позитивного контроля этих ферментов (Sigma). **Результаты:** у больных с МПН количество тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов значительно превышало показатели в группе сравнения (больные атеросклеротическим поражением сосудов). У них при гепатоспленомегалии и лейкоцитозе определялся наивысший уровень лактатдегидрогеназы. У пациентов с ЭТ, при небольших размерах печени, селезенки и умеренном повышении уровня лейкоцитов и тромбоцитов, показатели лактатдегидрогеназы превышали результаты в группе сравнения, но были ниже, чем в группе пациентов с ПМФ. Данные изучения гистологических препаратов согласовываются с полученными результатами: при истинной полицитемии незначительная стромальная гиперплазия была в периваскулярных зонах костного мозга. При ПМФ в препаратах определялся ретикулиновый фиброз, при прогрессировании ПМФ — миелофиброз. **Выводы:** изменения структуры внеклеточного матрикса при формировании миелофиброза у больных с МПН предположительно обусловлены действием активированных лейкоцитов и тромбоцитов, включая клетки лейкоемического клона, в том числе за счет продукции ММП-2 и -9; при ПМФ активность ММП-9 была значительно выше, чем в группе сравнения. Прогрессирование миелопролиферативного синдрома усугубляет дефектность экстрацеллюлярного матрикса. ММП-9 играет значительную роль в возникновении деструктивных изменений стромального микроокружения с развитием фиброзных процессов в костном мозгу, печени и селезенке.

К миелопролиферативным новообразованиям (МПН) относятся клональные патологические процессы, возникающие в результате трансформации гемопоэтической стволовой клетки и характеризующиеся пролиферацией клеток одной или более линий миелопоэза (гранулоцитов, мегакариоцитов, эритроидных и тучных клеток).

Различные формы хронических МПН, в число которых входит хронический миелолейкоз, истин-

ная полицитемия (ИП), первичный миелофиброз (ПМФ), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), имеют сходные и перекрывающиеся морфологические и клинико-гематологические признаки [7].

Незаметное и постепенное вначале развитие болезни в дальнейшем проходит разные стадии, обусловленные клональной эволюцией. Они сопровождаются гиперпродукцией клеточных элементов той или иной линии миелопоэза, развитием миело-

фиброза и связанной с этим недостаточностью кровотока, трансформацией в острую фазу бластного криза в терминальной стадии заболевания [7].

Миелофиброз — гетерогенный генерализованный процесс с фибротическими и/или склеротическими перестройками в различных областях костного мозга, сопровождающийся изменением всей архитектоники кроветворения [1–3, 12, 13]. В развитии миелофиброза при МПН выделяют следующие фазы: клеточно-пролиферативную (префибротическая, ранняя), коллагеново-миелофибротическую (фибротическо-склеротическая) с развитием раннего ретикулинового фиброза, а затем — ретикулинового склероза с умеренным коллагеновым фиброзом и, наконец, фазу выраженного коллагенового фиброза; остеомиело-склероз с формированием лейкоэритробластической картины костномозгового кроветворения. Стадийность миелофиброза во многом определяется состоянием внеклеточного матрикса (ВКМ) — содержанием и соотношением ретикулиновых и коллагеновых волокон, выявляемых при изучении гистологических препаратов трепанобиоптата костного мозга [4, 12, 13]. Формирование обширных зон фиброза обусловлено избыточной продукцией цитокинов макрофагами и мегакариоцитами [11].

Морфологической основой процесса, получившего название «субклеточный ремоделинг» (subcellular remodeling), является специфическое изменение пространственной конфигурации и состава клеточных органелл [2] и ВКМ [12, 14] — сложной пространственной структуры, состоящей из коллагена, гликопротеинов (ламинин, фибронектин) и протеогликанов [1, 3, 4]. Регуляция процессов взаимодействия «клетка-клетка», «клетка-экстрацеллюлярный матрикс» осуществляется посредством лиганд-рецепторных связей [3, 8]. Ключевыми ферментами реорганизации ВКМ и межклеточных взаимодействий являются матриксные металлопротеиназы (ММП) [15]. Помимо деградации ВКМ, ММП осуществляют протеолитическую модификацию рецепторов, экспрессированных на клеточной мембране [16].

Синтез желатиназ ассоциирован с экспрессией интегринов. Они передают сигналы внутрь клетки и стимулируют экспрессию генов, ответственных за миграцию, дифференцировку и пролиферацию клеток [1]. Классический пример интегрин — фибронектиновый рецептор [6]. ММП являются продуктами различных генов. Они секретируются в межклеточное пространство как проферменты, их экспрессия регулируется в процессе тканевой перестройки [16, 17].

Желатиназы А (ММП-2) и В (ММП-9) присутствуют также в клетках сосудистой эндотелия стенок артерий [15]. Их высокий уровень ассоциирован с деструкцией сосудистой стенки [4, 5]. Обширный исследовательский материал свидетельствует о повышении экспрессии ММП в клетках опухолей [5]. Данные об экспрессии ММП при лейкоэмических процессах, в частности при МПН, в доступной ли-

тературе отсутствуют. Возможно, клон лейкоэмических клеток формирует специфическое, характерное лишь для него, микроокружение с последующими патологическими перестройками ВКМ. Факторами такого микроокружения могут быть ММП, обеспечивающие перестройки ВКМ.

Целью работы было уточнение особенностей формирования миелофиброза при МПН с учетом роли ММП.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали клинико-лабораторные показатели у 115 больных с МПН: у 31 — с ИП, 75 — с ПМФ, 9 — с ЭТ. Диагноз МПН у всех пациентов устанавливали в соответствии с критериями FAB (French-American-British)-классификации. Группу сравнения составили 92 пациента с атеросклеротическими изменениями сосудов нижних конечностей. Контрольная группа включала 30 практически здоровых доноров.

Оценивали демографические и клинико-лабораторные показатели (анализ миелограммы, изучение трепанобиоптата костного мозга, данных общего анализа крови, уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови, активности желатиназ в плазме крови).

Определение активности желатиназ (ММП-2 и -9) в плазме крови проводили методом зимографии с некоторыми модификациями [9]. Для исследования использовали цитратную плазму крови пациентов. Активность ММП определяли методом желатин-зимографии с предварительным вертикальным электрофорезом образцов в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфатнатрия и 1% желатина (Sigma, США). По окончании электрофореза гель промывали в растворе Тритона X-100 и инкубировали при +37 °С в течение 16 ч в буферном растворе, после чего гели окрашивали при комнатной температуре Кумасси бриллиантовым синим G250, растворенном в смеси «метанол : уксусная кислота : вода» в соотношении 2,5 : 1,0 : 6,5. На зимограммах действие желатиназ проявлялось как обесцвеченные зоны на синем фоне. Соответствие зон лизиса ММП-2 и -9 оценивали с помощью маркеров Bio-Rad Laboratories (США) и позитивного контроля ферментов (Sigma, США). Зимограммы переводили в цифровой формат. Обработку результатов проводили с помощью программы Videodensitometer Sorbfil 2.0. Активность желатиназ определяли в условных единицах (усл. ед.) относительно активности этих ферментов в стандартном образце, в котором этот показатель был принят за 1 усл. ед. В качестве стандарта использовали пул плазмы крови здоровых людей-доноров. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Statwin и Excel, с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна — Уитни (U-критерий). Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формы МПН с учетом клинических данных и клинико-лабораторных особенностей приведены в табл. 1. Негативными прогностическими факторами течения МПН считалась выраженная гепатоспленомегалия, обусловленная прогрессированием миелопролиферативного синдрома, и возраст больных, превышающий 60 лет.

Таблица 1

Клиническая оценка состояния больных с МПН по шкале ВОЗ

Показатели	ПМФ (n = 75)	ИП (n = 31)	ЭТ (n = 9)
Гепатомегалия	34	2	2
Спленомегалия	42	5	4
Плетора	33	26	0
Состояние по ВОЗ > 2 баллов	10	3	1

Результаты клинико-лабораторного исследования пациентов с МПН во время первичной диагностики заболеваний представлены в табл. 2.

У больных с МПН количество клеточных элементов (тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов) было достоверно увеличенным по сравнению с показателями в группе сравнения (больные с атеросклеротическими изменениями сосудов) (см. табл. 2).

У больных с ПМФ с гепатоспленомегалией и лейкоцитозом ($> 17 \cdot 10^9/\text{л}$) определялся наиболее высокий уровень ЛДГ. У пациентов с ЭТ при незначительном увеличении размеров печени, селезенки и умеренном повышении уровня лейкоцитов и тромбоцитов показатели ЛДГ превышали данные в группе сравнения, но были ниже, чем в группе больных ПМФ. Показатели ЛДГ указывали на высокий уровень метаболических процессов в клетке, что соотносилось с активизацией нейтрофильного звена лейкоцитов и с высоким уровнем ММП-2 и -9 в плазме крови [17].

ММП-2, согласно данным доступной литературы, способствует адгезии клеток с последующей их агрегацией [18], причем активная ММП-2 способна активировать ММП-9. Желатиназа В (ММП-9) синтезируется нейтрофилами со стадией дифференцировки промиелоцит/миелоцит. Фермент накапливается в желатиназных гранулах миелоидных клеток с последующим гликозилированием, секретируется, являясь маркером зрелых функционально активных циркулирующих нейтрофилов [16, 18]. Продукция ММП-9 нейтрофилами способствует их миграции в ткани, а гиперсекреция — реализует развитие локального вос-

паления с возникновением проявлений эндотелиальной дисфункции и формированием фиброза [15, 17].

Результаты исследования гистологических препаратов трепанобиоптатов мозга согласуются с полученными данными. В препаратах больных с ИП незначительные признаки стромальной гиперплазии отмечены в периваскулярных зонах костного мозга (рис. 1).

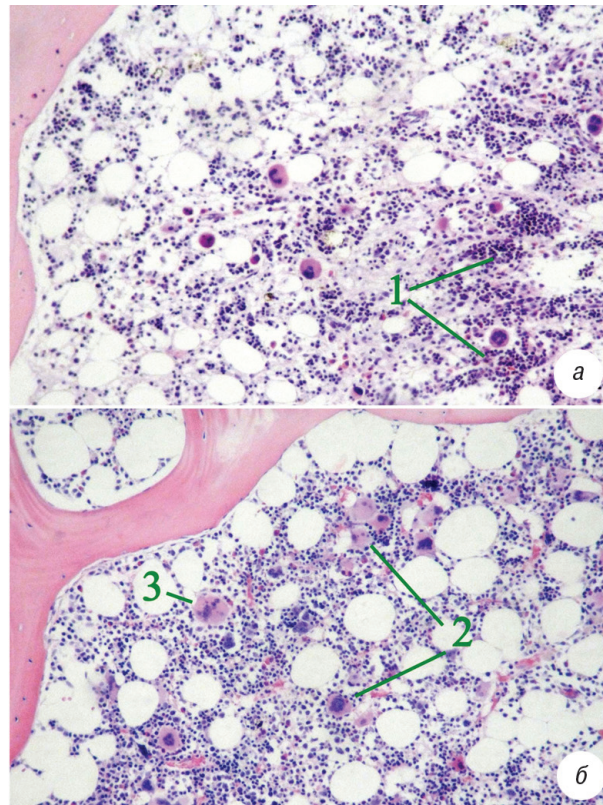


Рис. 1. Морфологические изменения костного мозга при ИП: а — очаговые скопления клеток эритроидного ряда с тенденцией к слиянию (1); б — диффузная и очаговая гиперплазия мегакариоцитов (2) с наличием атипичных форм (3). Гематоксилин-эозин, $\times 200$

Кроме того, при ПМФ на фоне диффузно-очаговой пролиферации клеток эритроидного и мегакариоцитарного ростков вокруг сосудов отмечено увеличение числа ретикулярных клеток, фибробластов и фиброцитов, а при прогрессии ПМФ — ретикулиновых и коллагеновых волокон. В терминальной стадии заболевания в препаратах определялся миелофиброз с субтотальным замещением межбалочных пространств элементами фиброретикулярной

Таблица 2

Данные лабораторных исследований и активность желатиназ (ММП-2 и -9) при МПН

Показатель	Атеросклеротические изменения (n = 92)	ПМФ (n = 75)	ИП (n = 31)	ЭТ (n = 9)	МПН (n = 115)
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$4,27 \pm 0,93$	$6,17 \pm 1,98^{**}$	$6,73 \pm 1,52^{***}$	$5,66 \pm 1,34^{**}$	$6,03 \pm 1,56^{**}$
Гемоглобин, Г/л	$134,84 \pm 27,94$	$150,47 \pm 38,3$	$176,1 \pm 33,06^{**}$	$138,54 \pm 34,42$	$147,65 \pm 37,61$
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	$251,8 \pm 103$	$651,3 \pm 41,9^{***}$	$448,7 \pm 76,3^{**}$	$875,20 \pm 143,1^{***}$	$589,7 \pm 80,6^{***}$
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$9,01 \pm 1,95$	$20,34 \pm 12,94^{**}$	$11,64 \pm 5,84$	$10,07 \pm 3,24$	$17,56 \pm 7,15^{**}$
ЛДГ, г/л	$265,63 \pm 43,75$	$623,45 \pm 24,10^{***}$	$286,84 \pm 43,83^{***}$	$463,83 \pm 53,43^{***}$	$433,52 \pm 42,15^{***}$
ММП-2, усл.ед.	$0,96 \pm 0,23$	$1,38 \pm 0,18^{**}$	$1,13 \pm 0,18$	$1,26 \pm 0,32^*$	$1,31 \pm 0,23^*$
ММП-9, усл.ед.	$1,21 \pm 0,11^*$	$4,35 \pm 0,13^{***}$	$2,64 \pm 0,65^{***}$	$2,75 \pm 0,34 \pm 0,65^{***}$	$3,34 \pm 0,38^{***}$

Данные статистически значимы: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

ткани с небольшими скоплениями клеток костно-мозгового кроветворения с повышенным содержанием незрелых форм миелоидного ряда и мегакариоцитов (рис. 2).

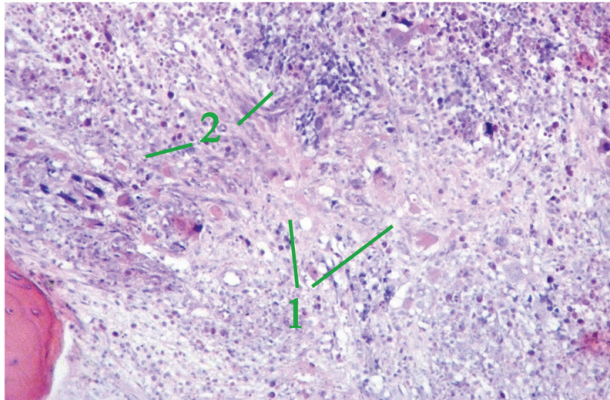


Рис. 2. Субтотальное замещение межбалочных пространств элементами фиброретикулярной ткани (1), очаговые скопления клеток кроветворения (2). Гематоксин-эозин, $\times 200$

ВЫВОДЫ

1. Изменения структуры ВКМ при формировании миелофиброза у больных с МПН предположительно обусловлено действием активированных лейкоцитов (нейтрофилов) и тромбоцитов, включая клетки лейкомиического клона, в том числе за счет продукции ММП-2 и -9.

2. Активность ММП-9 в плазме крови больных ПМФ значительно превышала соответствующие показатели в группе сравнения, существенно возрастала при прогрессировании пролиферативного синдрома, усиливая дефектность ВКМ.

3. ММП-9 играет более значимую роль в развитии деструктивных изменений стромального микроокружения с развитием фиброзных процессов в костном мозгу, печени и селезенке, чем ММП-2. Возможно, компоненты ВКМ также продуцируют ММП-9, оказывая влияние на развитие патологического процесса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бережная НМ. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения. Онкология 2010; **12** (2): 86–91.
2. Биологические маркеры постинфарктного ремоделирования сердца. Therapia 2010 (2): 34–40.
3. Бондаренко ЛБ, Володина ТТ. Взаимодействие полиаминов и коллагенов в различных процессах формирования и функционирования внеклеточного матрикса в норме и при патологии. Укр биохим журн 2007; (6): 19–25.
4. Гайдамака НВ, Паровичникова ЕН, Завалишина ЛЭ и др. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в костном мозге у больных острыми лейкозами. Гематол трансфузиол 2009; **54** (2): 3–10.
5. Ганусевич ИИ. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. Онкология 2010; **12** (2): 108–17.

6. Гордієнко ЮА, Кулініч АО, Ніколаєнко-Камишова ТП. Активність желатиназ і деградація фібронектину при метаболічних порушеннях та проліферативних захворюваннях крові. Мед хімія 2009; (3): 74–6.

7. Гусева СА, Бессмельцев СС, Гончаров ЯП. Истинная полицитемия. С.-П. Логос, 2009. 405 с.

8. Пелешенко АБ, Шевцова АИ, Бразалук АЗ. Фрагменты фибронектина в патогенезе, диагностике и лечении заболеваний. Лаб диагностика 2004; (2): 3–9.

9. UA 83196 U. Спосіб визначення желатиназ плазми крові. Шевцова АІ, Гордієнко ЮА, Шаульська ОЕ. 27.08.13.

10. Baklanova JV, Ushakova GO. Toxic effects and biochemical control the consequences of anthracycline therapy. Arh Klin Eksp Med 2013; **22** (2): 242–8 (in Ukrainian).

11. Chagraoni H, Wending F, Wainchker W. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia: insight from mouse models. Best Pract Res Clin Hematol 2006; **19**: 399.

12. Dufour A, Sampson NS, Zucker S. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. J Cell Physiol 2008; **217**: 643–51.

13. Galt SW, Lindemann S, Allen L, et al. Outside in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. Circ Res 2002; **90**: 1093–9.

14. Kuitinen O. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in hematological malignancies. Oulu, 2003, 80 p.

15. Lancrin C, Sroczynska P, Staphenson S, Allen T. The megakaryoblast generates hematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. Nature 2009; **457**: 892–5.

16. Marquez-Curtis LA, Dobrowsky A, Montano J. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by hematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukemic long-term marrow cultures. Br J Haematol 2001; **115** (3): 595–604.

17. Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. Cardiovasc Res 2006; **69**: 736–45.

18. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. J Biol Chem 2001; **276**: 37258–65.

THE PECULIARITIES IN THE PROCESS OF MYELOFIBROSIS FORMATION AT MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

T.P. Nikolaenko-Kamyshova

Summary. Neoplastic processes, including leukemias, develop under the action of many factors, one of which is extracellular matrix remodeling. A considerable part in the processes of stroma microenvironment degradation belong to the matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9. Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a group of diseases in which myelofibrosis determines the clinical picture and the disease prognosis. **Objective:** the role of MMP-2 and -9 in the process of formation myelofibrosis at chronic MPN was studied. **Object and methods:** the clinico-laboratory status of 115 patients with MPN (31 with polycythemia vera, 75 — with primary myelofibrosis (PMF), 9 — with essential thrombocytopenia was investigated). 92 patients with atherosclerotic process were included in the experimental group of comparison. The determination of MMP-2 and -9 activity was done according

to the methods. **Results:** in patients with MPN in the process of development a myeloproliferative syndrome the high levels of hemoglobin, leucocytes, thrombocytes and LDH were stated. Due to histology specimen of bone marrow the largest signs of fibrosis were found in the group of patients with PMF. **Conclusions:** extracellular matrix (EM) changes at MPN developing MMP-2, -9 action, being leucocytes derived of different degree of maturity and play a more meaningful role in the development of destructive changes of stroma microenvironment with the development of fibrosis processes. A myeloproliferative syndrome progression aggravates EM remodeling. An increased MMP-2 activity on account of high thrombocytes activity and development of endothelial dysfunction promotes vascular complications development. MMP-9 activity at PMF was much higher than a comparison group

indicators as well as on account of pro-enzyme which tells about a considerable EM reconstruction under the influence of activated neutrophils including a tumor clone.

Key Words: myeloproliferative neoplasms, myelofibrosis, metalloproteinases.

Адрес для переписки:

Николаенко-Камышова Т.П.
КУ «Днепропетровская городская
многопрофильная клиническая
больница № 4 ОГА»
Городской гематологический центр
49102, Днепропетровск, ул. Ближняя, 31
E-mail: dr.nik4@rambler.ru

Получено: 13.08.2014