

В.Г. Бебешко
И.Н. Кабаченко
И.В. Абраменко
И.С. Дягиль
О.Я. Плещак
И.В. Белинская

Институт клинической радиологии Научного центра радиационной медицины АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: миелофиброз с миелоидной метаплазией, тромбоцитарный фактор роста ВВ, ионизирующее излучение

СОДЕРЖАНИЕ ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА ВВ ПРИ МИЕЛОФИБРОЗЕ С МИЕЛОИДНОЙ МЕТАПЛАЗИЕЙ У ЛИЦ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Резюме. Иммуноферментным методом изучена концентрация тромбоцитарного фактора роста, его димерной изоформы ВВ (PDGF-BB), в сыворотке крови и костном мозге (КМ) при миелофиброзе с миелоидной метаплазией (МММ) у пациентов, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС (основная группа — I) и не подвергавшихся действию ионизирующего излучения (группа сравнения — II), а также у лиц без онкогематологических заболеваний и фиброза КМ какого-либо генеза, составивших III — контрольную группу. Проанализирована взаимосвязь состояния мегакариоцитарного ростка и концентрации PDGF-BB в сыворотке крови и КМ с целью оценки вклада PDGF-BB и ионизирующего излучения (ИИ) в патогенез и течение МММ. Выявлено статистически достоверное повышение концентрации PDGF-BB в образцах КМ больных МММ I и II групп по сравнению с таковой в III контрольной группе. Найдена корреляционная зависимость между содержанием PDGF-BB и числом мегакариоцитов у больных МММ вне стадии бластного криза. Более высокие концентрации PDGF-BB в КМ у пациентов с МММ I группы, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, по сравнению с таковой у пациентов II группы, ассоциированы с увеличением количества молодых форм клеток в мегакариоцитогамме, выраженной пролиферацией гемопоэтических клеток-предшественников в КМ.

ВВЕДЕНИЕ

Миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ) возникает в результате злокачественной трансформации стволовой гемопоэтической клетки. Однако многие ключевые симптомы при данном заболевании связаны с пролиферацией неопухолевого популяции стромальных клеток костного мозга (КМ), в первую очередь, фибробластов. Предположения об участии в развитии фиброза мегакариоцитов первоначально основывалось на данных гистоморфологического исследования КМ. Накопление волокнистых структур наиболее интенсивно происходит в участках скопления мегакариоцитов. В дальнейшем было установлено, что фибросклеротические процессы в КМ обусловлены выделением из мегакариоцитов комплекса ростовых факторов, включая тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB) [1, 2, 3].

Известно, что PDGF — один из наиболее функционально активных и распространенных пептидных митогенов для клеток соединительной ткани. Лигандиндуцированная димеризация рецепторов PDGF-бета активирует внутриклеточные сигнальные пути, стимулирующие переход неделящихся клеток из фазы G₀ в фазу G₁ [4, 5], потенцируя клеточное де-

ление, проявляя антиапоптотическое действие. Следует учесть, что связывание димерных изоформ PDGF происходит избирательно: рецептор PDGF-бета взаимодействует с высокой степенью афинности только с PDGF-BB, тогда как PDGF-альфа связывает все изоформы PDGF [4, 7].

В настоящее время установлено, что в КМ ростовой фактор PDGF-BB синтезируется не только мегакариоцитами [6, 19], но и незрелыми гемопоэтическими клетками [8, 9], фибробластами [10], а также другими, подвергшимися стимуляции, клетками крови и сосудистой стенки, такими как макрофаги [11], эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов [12, 13]. Рецепторы PDGF-бета имеются как в фибробластах [14], так и в мегакариоцитах [15, 16], макрофагах [17], гладкомышечных [14] и эндотелиальных клетках сосудов КМ [18, 19], в нормальных клетках миелоидной и лимфоидной (Т-лимфоциты) линий, а также в клетках этих линий при лейкозном процессе или вирусном инфицировании [20, 21, 22]. Таким образом, нельзя исключить возможность аутокринной стимуляции роста клеток, коэкспрессирующих ростовой фактор PDGF-BB и PDGF-бета рецепторы [20, 23]. Обращает на себя внимание, что пролиферирующие клетки КМ при МММ характеризуются коэк-

прессией PDGF-BB и бета-рецепторов. Данные этих наблюдений согласуются с результатами исследований S.Y. Yoon и соавторов [9] и J.M. Chou и соавторов [24], изучавших с помощью иммуногистохимического метода распределение PDGF-BB и его рецепторов в клетках КМ у пациентов с МММ и негематологических больных. Авторами было установлено, что незрелые гемопоэтические предшественники в контроле и при МММ экспрессируют исключительно PDGF-BB димер, а также имеют PDGF-бета рецепторы.

В данной работе мы исследовали состояние клеток мегакариоцитарного ростка кроветворения и определяли концентрацию PDGF-BB в сыворотке крови и КМ у пациентов с МММ, подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения (ИИ) в результате аварии на ЧАЭС. Принимали во внимание, что ИИ является одним из непосредственных индукторов ростстимулирующих эффектов в фибробластах [1, 25], а также тот факт, что влияние ИИ на систему кроветворения в диапазоне доз, характерных для аварии на ЧАЭС, в период послерадиационной регенерации КМ, проявляется активацией темпа деления стволовых кроветворных клеток, сокращением транзитного времени созревания клеточных элементов, выходом в циркуляцию незрелых клеток-предшественников и функционально неполноценных клеток разной степени зрелости [26]. Учитывали также, что при МММ выявлено увеличение количества циркулирующих стволовых клеток в периферической крови [27].

До настоящего времени, судя по данным доступной литературы, определение и сравнение концентрации PDGF-BB в сыворотке крови и КМ у пациентов с МММ, подвергавшихся и не подвергавшихся действию ИИ, не проводили.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследована концентрация PDGF-BB в сыворотке крови и КМ у 23 пациентов с МММ, составивших I и II группы и у 7 лиц (III группа) без признаков онкогематологических заболеваний. I основная группа была представлена 13 пациентами с МММ, принимавшими участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС в 1986–1987 годах и проживающими на контролируемых территориях. По данным маршрутных листов и проведенным расчетам [28, 29], дозовые нагрузки у пациентов I группы колебались в пределах 0,01–0,25 Зв. Во II группу вошли 10 больных с МММ без наличия в анамнезе воздействия ИИ.

Для определения концентрации PDGF-BB использовали набор реагентов «Quantikine, Human PDGF-BB Immunoassay» («R & D Systems Inc.», USA). Подготовка образцов сыворотки крови и КМ, определение концентрации фактора PDGF-BB проводили методом ELISA, применяющимся для количественного определения концентрации человеческого PDGF-BB в супернатанте клеточной культуры, сыворотке и плазме крови [30, 31]. Все исследования повторяли трижды. Результаты ис-

следования анализировали с учетом клинико-гематологических, цитологических данных, анализа мегакариоцитогаммы аспирата КМ и гистоморфометрических исследований трепанобиоптатов КМ [32, 33, 34].

Полученные данные были обработаны с помощью общепринятых методов вариационной статистики [35], с использованием пакета программ «Microsoft Excel 2000», достоверность различий оценивали T-тестом, применяли методику корреляционного анализа для малых выборок [36].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация ростового фактора PDGF-BB в исследуемых образцах сыворотки крови и КМ лиц контрольной III группы (без гематологических заболеваний и признаков фиброза КМ) варьировала в значительной степени: от 63,09 до 398,00 пг/мл в образцах КМ и от 97,72 до 331,13 пг/мл в сыворотке крови. В группе больных с МММ верхний предел колебаний был значительно выше: 141,2–3623,4 пг/мл в сыворотке КМ и 61,7–1144,3 пг/мл в сыворотке крови. Концентрация PDGF-BB в образцах КМ при МММ была достоверно выше таковой в контрольной группе ($p < 0,05$) (таблица).

Таблица
Концентрация PDGF-BB в образцах крови и КМ больных миелофиброзом с миелоидной метаплазией

Группа обследованных	Концентрация PDGF-BB (пг/мл)	
	КМ (M ± m)	периферической крови (M ± m)
Все больные, n = 23	699,29 ± 189,55*	377,74 ± 79,18
I, n = 13	797,35 ± 196,48*	443,90 ± 81,88
II, n = 10	535,42 ± 89,09**	292,69 ± 148,96
III (контроль), n = 7	215,47 ± 35,63	267,78 ± 74,93

Примечание: по сравнению с контрольной группой * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Концентрация PDGF-BB в сыворотке крови лиц контрольной группы была равной или не превышала соответствующий показатель в КМ более чем на 20%. У больных МММ, напротив, концентрация фактора в образцах КМ была в среднем на 50% выше по сравнению с таковой в крови (см. таблицу).

Выявлены некоторые особенности, позволяющие судить о факторах, обуславливающих концентрацию PDGF-BB в КМ. Учитывая, что основным источником PDGF-BB являются мегакариоциты, логичным было предположить наличие зависимости концентрации фактора от содержания мегакариоцитов в КМ, которое мы оценивали по значению мегакариоцитарного коэффициента (МКЦК). Для вычисления МКЦК использовали результаты ранее проведенной диагностической гистоморфометрии препаратов трепанобиоптатов КМ из заднего гребешка подвздошной кости [34]. Прямая корреляционная связь между МКЦК и содержанием PDGF-BB в образцах КМ четко прослеживалась в начальной ($r = 0,8309$; $p < 0,01$) и развернутой ($r = 0,8009$, $p < 0,01$) стадиях МММ; в терминальной стадии, в фазе бластного криза, прямая корреляция сопоставляемых показателей отсутствовала ($r = -0,402$). Концентрация ростового фактора в фазе бластного криза значительно возрастала (рисунок),

что, вероятно, обусловлено способностью секретировать его миелоидных клеток-предшественников и других клеток КМ, коэкспрессирующих PDGF-BB и PDGF-бета-рецепторы. Зависимость между количеством МГКЦ на единицу площади гемопоэтической ткани в трепанобиоптатах КМ и содержанием фактора в периферической крови не выявлено ни в контроле, ни при МММ. В тоже время концентрация PDGF-BB в сыворотке крови коррелировала как в контрольной группе, так и при МММ с тромбоцитозом ($r = 0,7994$, $p < 0,01$), что подтверждает преимущественно тромбоцитарное происхождение данного фактора в сыворотке крови.

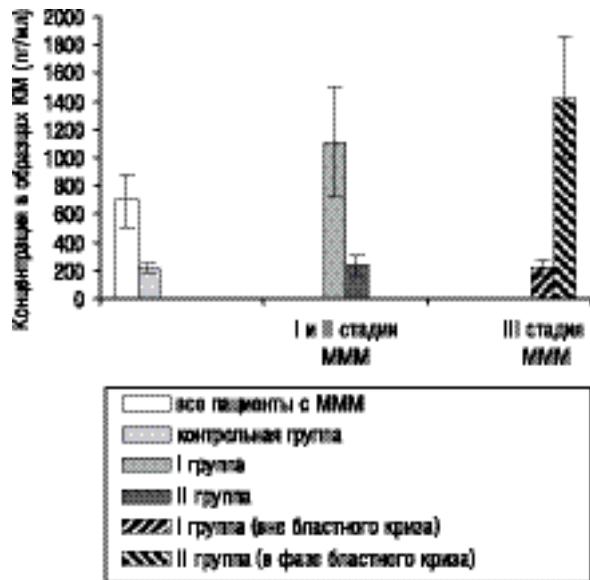


Рисунок. Концентрация PDGF-BB в образцах КМ при различных стадиях заболевания

Полученные предварительные данные позволяют предположить наличие ряда факторов, которые определяют концентрацию PDGF-BB в исследуемом образце: тромбоциты периферической крови, мегакариоциты КМ (обуславливающие повышенное содержание PDGF-BB в КМ у больных МММ), а также миелоидные клетки-предшественники, роль которых возрастает при бластной трансформации МММ.

По результатам наших исследований, концентрация PDGF-BB в КМ у пациентов I группы в начальной и развернутой стадиях МММ ($1113,51 \pm 390,01$ пг/мл) по сравнению с таковой у пациентов II группы ($238,47 \pm 69,64$ пг/мл), не подвергавшихся действию ИИ, была достоверно выше ($p < 0,05$) (см. рисунок), что позволяет предполагать наличие дополнительных факторов, инициированных ИИ, в реализации механизмов развития данного заболевания. К числу таких факторов можно отнести особенности регенерации КМ у лиц, подвергавшихся действию ИИ в результате аварии на ЧАЭС [26], возможность секреции PDGF-BB гемопоэтическими клетками-предшественниками [9].

При изучении мегакариоцитограмм у больных I группы выявлено преобладание по сравнению со

II группой малых и гипоглобулярных форм мегакариоцитов, включая про- и мегакариобласты [33]. Содержание мегакариобластов и промегакариоцитов в парциальной мегакариоцитограмме достоверно коррелировало с уровнем PDGF-BB ($r = 0,62$; $p < 0,01$). Примечательно, что, по данным ряда авторов [6, 37], согласно проведенному ими цитоморфометрическому анализу, преимущественно клетки подобного типа являются секреторирующей PDGF-BB популяцией. В некоторой степени этим может определяться установленная нами повышенная концентрация PDGF-BB в КМ у лиц с МММ, подвергавшихся действию ИИ.

Нами были изучены мегакариоцитограммы пациентов I, II и III групп в мазках КМ, окрашенных по Паппенгейму. Данный метод позволяет оценить степень дифференцировки и зрелости как ядра, так и цитоплазмы. У пациентов с МММ в мегакариоцитограммах была выделена популяция клеток с асинхронизмом созревания ядра и цитоплазмы. Количество подобных клеток у пациентов с МММ достоверно превышало таковое у здоровых лиц ($21,0 \pm 3,0$ и $1,0 \pm 0,4\%$ соответственно $p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. В КМ больных МММ I и II групп достоверно повышена концентрация PDGF-BB по сравнению с таковой у лиц III группы, а также отмечена тенденция к повышению PDGF-BB в сыворотке крови.

2. Выявлена корреляционная зависимость между содержанием PDGF-BB в образцах КМ и числом мегакариоцитов у больных с МММ I и II групп вне стадии бластного криза; при развитии последнего, преимущественным источником секреции PDGF-BB, вероятно, становятся гемопоэтические клетки-предшественники.

3. Более высокое содержание PDGF-BB у пациентов I группы, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, в начальной и развернутой стадиях МММ по сравнению с таковым у пациентов II группы, ассоциировано с особенностями костномозгового кроветворения у пациентов I группы: увеличением количества гемопоэтических клеток-предшественников, а также незрелых клеток мегакариоцитарного ряда, в наибольшей степени секреторирующих PDGF-BB.

4. Результаты проведенных исследований свидетельствуют об участии PDGF-BB в развитии миелофиброза и миелолипролиферативного процесса при МММ. Они также отражают опосредованно влияние ионизирующего излучения на течение данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колосков АВ. Мегакариоциты и фиброз костного мозга. Гематол трансфузиол 1997; 42 (1): 29–31.
2. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, et al. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibrosis. Blood 1981; 57: 781–7.

3. Reilly JT. Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis. *Acta Haematol* 2002; **108** (3): 113–9.
4. Heldin C.-H, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1990; **1**: 555–66.
5. Ostman A, Andersson M. Identification of a cell retention signal in the B-chain of platelet derived growth factor and in the long splice version of the A-chain. *Cell Regul J* 1991; **2**: 503–12.
6. Wickenhauser C, Hillienhof A, Jungheim K, *et al.* Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF-beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes. *Leukemia* 1995; **9** (2): 310–5.
7. Claesson-Welsh I, *et al.* cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4917–21.
8. Miyazono K, Takaku F. Platelet-derived growth factors. *Blood Rev* 1989; **3** (4): 269–76.
9. Yoon SY, Tefferi A, Li CY. Cellular distribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in normal bone marrow. *Acta Haematol*. 2000; **104** (4): 151–7.
10. Paulsson Y, Hammacher A, Heldin C-H, Westermark B. Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987; **328**: 715–7.
11. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, *et al.* A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 1985; **43**: 277–86.
12. Nilsson J, Sjolund M, Palmberg L, *et al.* Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 4418–22.
13. Dicorleto PE, Bowen-Pope DF. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1919–23.
14. Heldin C-H, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; **79**: 1283–316.
15. Daynes RA, Dowell T, Araneo BA. Platelet-derived growth factor is a potent biologic response modifier of T cells. *J Exp Med* 1991; **174**: 1323–33.
16. De Parseval N, Fichelson S, Mayeux P, *et al.* Expression of functional platelet-derived growth factor receptors on hematopoietic cell lines. *Cytokine* 1993; **5**: 8–15.
17. Inaba T, Shimano H, Gotoda T, *et al.* Expression of platelet-derived growth factor receptor on human monocyte-derived macrophages and effects of platelet-derived growth factor BB dimer on the cellular function. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24353–60.
18. Bar RS, Boes M, Booth BA, *et al.* The effects of platelet-derived growth factor in cultured microvessel endothelial cell. *Endocrinology* 1989; **124**: 1841–8.
19. Smits A, Hermanson M, Nister M, *et al.* Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors* 1989; **2**: 1–8.
20. Yoon SY, Tefferi A, Li CY. Cellular distribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in normal bone marrow. *Acta Haematol* 2000; **104** (4): 151–7.
21. Pantazis P, Goustin AS, Nixon J. Platelet-derived growth factor and its receptor in blood cell differentiation and neoplasia. *Eur J Haematol* 1990; **45** (3): 127–38.
22. Шитикова АС. Тромбоцитарный гемостаз. СПб: Издательство СПб ГМУ, 2000. 227с.
23. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; **15** (4): 255–73.
24. Chou JM, Li CY, Tefferi A. Bone marrow immunohistochemical studies of angiogenic cytokines and their receptors in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia Res* 2003; **27** (6): 499–504.
25. Зуброва СГ, Быкова ТВ, Зарицкий АЮ и др. Влияние ионизирующей радиации на функциональную активность макрофагов. *Вопр онкологии*. 1996; **45** (6): 645–9.
26. Білько НМ. Кровотворні клітини-попередники при радіаційному опроміненні. [Автореф дис ... д-ра мед наук]. Київ: ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Український науково-дослідний інститут онкології і радіології МОЗ України. Київ. 1998. 31 с.
27. Chervenick PA. Increase in Circulating Stem Cells in Patients with Myelofibrosis. *Blood* 1973; **41** (1): 67–71.
28. Likhtarev IA, Kovgan LN, Jacob P, Anspaugh LR. Chernobyl accident: retrospective and prospective estimates of external dose of the population of Ukraine. *Health Phys* 2002; **82**: 290–303.
29. Чумак ВВ, Баханова ЕВ, Мусяченко НВ и др. Дозиметрия ликвидаторов через 14 лет после Чернобыльской аварии: проблемы и достижения. *Межд Журн Радиацион Медицины* 2000; **1**: 26–45.
30. Raines EW. Platelet-derived growth factor. Sporn MB, Roberts AB. Eds. *Peptide Growth Factors and their Receptors I*. 1991: 173–242.
31. Eming SA, Martin L, Yarmush, *et al.* Regulation of the Spatial Organization of Mesenchymal Connective Tissue: Effects of Cell-Associated versus Released Isoforms of Platelet-Derived Growth Factor *Am J Pathol* 1999; **154**: 281–9.
32. Byelinska IV, Kabachenko IN, Dyagil IS. Megakaryocytes morphology in idiopathic (primary) myelofibrosis. *Rep Pract Oncol Radiother* 2004; **9**: 223–8.
33. Kabachenko IN, Byelinska VI, Klymenko SV, *et al.* Megakaryocytopoiesis in clean-up workers of the Chernobyl accident with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Annals of Oncology*. Volume 15. Abstract Book of the 29th ESMO Congress, Vienna, Austria, 2004; **3** (Suppl.): 164.
34. Кабаченко ИН, Бебешко ВГ, Грабовой АН и др. Особенности структурной организации костного мозга при различных стадиях миелофиброза с миелоидной метаплазией. *Вісник морфології* 2005; **2**: 164–8.
35. Сергиенко ВИ, Бондарева ИБ. Математическая статистика в клинических исследованиях. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 256 с.
36. Каминский ЛС. Обработка клинических и лабораторных данных. Медгиз: Ленинградское отделение, 1959. 196 с.
37. Kimura A, Katoh O, Hyodo H, *et al.* Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1995 Jul; **18** (3–4):237–42.

CONTENTS OF THE PLATELET GROWTH FACTOR BB IN MYELOFIBROSIS WITH MYELOID METAPLASIA AT THE PERSONS SUFFERED FROM IONIZING IRRADIATION

V.G. Bebesko, I.N. Kabachenko, I.V. Abramenko, I.S. Djagil, O.J. Pleskach, I.V. Belinskaja

Summary. Level of platelet-derived growth factor (PDGF-BB) in blood serum and bone marrow of patients, suffered from myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM) as result of Chernobyl accident (I group) and not exposed to irradiation people (II group) were determined by immunoassay. Control group (III group) consists of patients without haematological diseases and fibrosis process in bone marrow. The interaction between status megakaryocytic lineage and a level of PDGF-BB secretion in groups is analyzed. The aim of this is to evaluate the contribution of ionizing radiation (IR) and level of PDGF-BB in the pathomorphogenesis

of MMM. Increase of PDGF-BB concentration in BM's serum of patients with MMM comparing with those in the control group was revealed. Correlation between PDGF-BB contents and number of megakaryocytic in patients with MMM without blast proliferation was found. More higher PDGF-BB concentrations in BM's serum in patients with MMM, suffered from Chernobyl accident, in comparing with those in patients of II group, are associated with increase of quantity of young

forms of megakaryocytes, expressed by proliferation of hemopoietic cells-precursors in BM.

Key Words: myelofibrosis with myeloid metaplasia, platelet-derived growth factor, ionizing irradiation.

Адрес для переписки:

Кабаченко И.Н.

02154, Киев, ул. Энтузиастов, 9, кв. 82

ika@i.kiev.ua