

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 И 9 В ПЛАЗМЕ АСПИРАТОВ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

**Инна Федоровна ЛЕСНИЧЕНКО, Сергей Васильевич ГРИЦАЕВ,
Иван Иванович КОСТРОМА**

*ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России
191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16*

Цель исследования – определить концентрации ММП-2 и ММП-9 в плазме аспиринов костного мозга больных острым миелоидным лейкозом для оценки эффективности специфической терапии. Материал и методы: исследована концентрация ММП-2 и ММП-9 у 76 больных, 32 из которых находились в состоянии полной ремиссии, а 44 вне ее, с помощью иммуноферментного анализа. Результаты и обсуждение. Установлено, что концентрации ММП-2 и ММП-9 при постановке диагноза ниже, чем в полной ремиссии ($p = 0,0001$). Они увеличивались при полной ремиссии и снижались при рецидиве. Таким образом, концентрации ММП-2 и ММП-9 представляют собой перспективный маркер при оценке объема лейкозной массы в процессе лечения.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа-2, матриксная металлопротеиназа-9, острый миелоидный лейкоз.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство эндопептидаз, которые при совместном действии расщепляют все компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Наряду с этим ММП принимают участие в преобразовании регуляторных протеинов, включая цитокины, факторы роста и их рецепторы [1, 2, 4]. В физиологических условиях ММП участвуют во многих процессах организма: в заживлении ран, ангиогенезе, органном морфогенезе, апоптозе, костном ремоделировании, гемопоэзе, развитии плаценты и др. Кроме того, ММП вовлечены в патогенез широкого спектра заболеваний: воспалительных заболеваний суставов, атеросклероза, нейродегенеративных заболеваний, ишемического повреждения миокарда, эмфиземы легких и др. [1, 4, 8].

Установлено, что ММП участвуют на разных этапах развития опухоли (ангиогенезе, росте опухоли, метастазировании) и задействованы в механизмах, которые позволяют опухолевым клеткам избегать иммунного надзора и апоптоза [1, 3, 4]. В настоящее время экспрессия ММП активно исследуется при солидных опухолях. Показано, что ее повышение ассоциировано с низкой дифференцировкой опухолевых клеток, их высокой инвазивностью, метастатической активностью. Выявлена сопряженность гиперэкспрессии ММП

с ухудшением выживаемости больных. Данный факт позволяет рассматривать экспрессию ММП как прогностический маркер неблагоприятного течения ряда солидных опухолей [1, 3, 4].

Среди ММП наибольшее внимание онкогематологов привлекают желатиназы – ММП-2 и ММП-9, основными субстратами которых являются денатурированный коллаген (желатин) и нативный коллаген IV типа. Указанные субстраты представляют собой основные компоненты базальной мембраны, которая является основным препятствием на пути распространения диссемилирующих опухолевых клеток [4, 8]. Предпринимались попытки изучить прогностическую ценность экспрессии ММП-2 и ММП-9 у больных онкогематологическими заболеваниями: острым лимфобластным и острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), миелодиспластическим синдромом, хроническом лимфолейкозом, неходжкинскими лимфомами [1, 4, 5, 8]. Однако полученные результаты немногочисленны и противоречивы, что не позволяет сделать заключение о сопряженности экспрессии ММП с объемом лейкозной массы и ответом на проводимую терапию, длительностью полной ремиссии (ПР) и вероятностью прогрессии. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование концентрации ММП-2

Лесниченко И.Ф. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: RNIИHT@mail.ru

*Грицаев С.В. – д.м.н., главный научный сотрудник клинического отдела гематологии,
e-mail: gritsaevsv@mail.ru*

Кострома И.И. – младший научный сотрудник клинического отдела гематологии, e-mail: RNIИHT@mail.ru

и ММП-9 в плазме аспиринов костного мозга (ПАКМ) больных ОМЛ и определение клинического значения этого показателя как перспективного маркера оценки эффективности специфической терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено исследование уровня ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ 76 больных ОМЛ (37 мужчин и 39 женщин в возрасте от 17 до 73 лет, медиана 38 лет). Диагноз ОМЛ устанавливали по критериям классификации ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей. Заготовку биологических образцов и инициацию цитостатической терапии осуществляли после подписания больными информированного согласия. Образцы ПАКМ получали до начала цитостатической терапии, аликвоты замораживали при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранили до анализа. Содержание ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ больных ОМЛ определяли с помощью иммуоферментных тест-систем «Human MMP-9 (total) immunoassay» и «Human MMP-2 (total) immunoassay» (R&D System, США) и ИФА-анализатора «Biotek EL808» (США).

Среди обследованных были 32 человека, у которых на момент исследования в костно-мозговом пунктате количество бластных клеток составляло менее 5 %, данная группа обозначена как «ПР». В число остальных 44 пациентов с активной стадией ОМЛ, в костно-мозговом пунктате которых количество бластных клеток превышало 5 %, входили лица с вновь выявленным ОМЛ, рецидивом, а также резистентными формами заболевания. Данная группа обозначена как «вне ПР».

В индукционный период больным назначался стандартный курс химиотерапии «7 + 3». Консолидирующие курсы включали citarabin в дозе более 1 г/м^2 /введение. При отсутствии ответа на индукционные курсы применялся курс терапии «НАМ». Вариант противорецидивной терапии определялся сроками развития рецидива: при ремиссии длительностью более 12 мес. назначался курс «7 + 3», при продолжительности ремиссии менее 12 мес. – курс «НАМ». Резистентность верифицировали при отсутствии ПР на два последовательных курса «7 + 3».

У трех больных проведено исследование содержания ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ в ходе лечения. Интервалы между сроками заготовки образцов ПАКМ составляли от 3 до 6 мес.

Общую выживаемость определяли как период жизни от даты постановки диагноза ОМЛ до смерти, независимо от ее причины. При ее расчете учитывались результаты наблюдений за больными в течение не менее 3 мес.

Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Поскольку распределение полученных результатов отличалось от нормального, для вычисления статистической значимости различий между исследованными выборками применяли непараметрический критерий Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного анализа выявлено различие в концентрации ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ больных ОМЛ в ПР и вне ПР. Так, содержание ММП-9 в ПР составило $391,00 \pm 51,19$ нг/мл. При этом разброс показателей был в широком диапазоне – от 4,40 до 1556,12 нг/мл. В то же время концентрация ММП-9 у больных вне ПР была значимо ниже – $51,88 \pm 21,56$ нг/мл ($p = 0,0001$), а разброс показателей находился в более узком диапазоне, от 97,43 до 170,7 нг/мл.

У трех больных, у которых с момента диагностики ОМЛ был инициирован лабораторный мониторинг, выявлен факт повышения концентрации ММП-9 в ПАКМ в 1,5–5,0 раза по сравнению с исходными показателями. Напротив, при рецидиве заболевания концентрация ММП-9 снижалась (см. рисунок).

Ранее установлено, что в ПАКМ больных ОМЛ при постановке диагноза уровень ММП-9 значительно ниже, чем у здоровых лиц. При достижении ПР концентрация ММП-9 достигает нормальных величин и вновь снижается при рецидиве заболевания [7]. Полученные в настоящей работе результаты совместно с данными литературы позволяют рассматривать уровень ММП-9 в ПАКМ как суррогатный маркер при оценке качества ответа на химиотерапию больных ОМЛ.

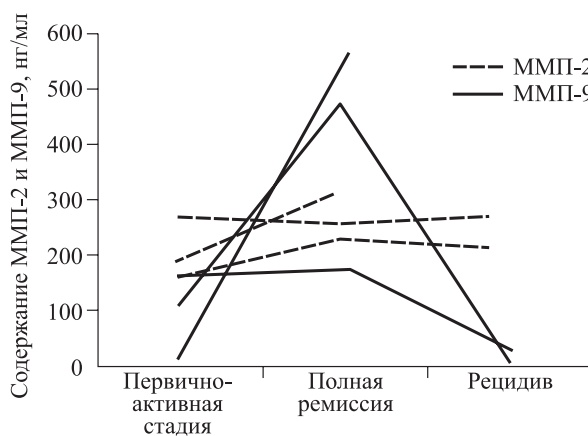


Рис. Содержание ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ больных ОМЛ в первично-активной стадии, при ПР и рецидиве

При изучении образцов ПАКМ также было установлено различие в концентрации ММП-2 в разные периоды лечения больных ОМЛ. Так, уровень ММП-2 в ПАКМ больных ОМЛ в ПР составлял $263 \pm 8,37$ нг/мл (от 76,44 до 380,74 нг/мл). У больных вне ПР концентрация ММП-2 была ниже и равнялась $220,80 \pm 8,10$ нг/мл (от 92,43 до 328,95 нг/мл). Выявленное различие было статистически значимым ($p = 0,0001$).

Изменение уровня ММП-2 в ПАКМ в процессе лечения оценено у тех же трех больных, у которых исследована и концентрация ММП-9. Оказалось, что у двух пациентов при достижении ПР концентрация ММП-2 повышалась (максимально в 2 раза) по сравнению со значениями при постановке диагноза, а у одного – практически не изменялась (см. рисунок).

Сведения о содержании ММП-2 в ПАКМ у больных ОМЛ в литературе противоречивы. По мнению одних авторов, уровень ММП-2 практически не изменяется при проведении противолейкозной терапии [7]. Однако в других исследованиях было продемонстрировано, что концентрация ММП-2 до начала химиотерапии была значимо ниже показателей контрольной группы и группы больных с ПР [6]. Собственные данные свидетельствуют о разных сценариях изменения уровня ММП-2 при наблюдении за больными ОМЛ, что, вероятно, обусловлено разным объемом клеток патологического клона. Данный факт требует дальнейшего накопления клинического материала.

ММП-2 может продуцироваться в межклеточную среду как бластными, так и стромальными клетками [1, 4, 8]. Возможно, что уменьшение содержания ММП-2, имеющее место при диагностике и рецидиве ОМЛ, отчасти обусловлено замещением клеток стромы миелобластами. Вместе с тем не исключено, что низкая концентрация ММП-2 связана с ее повышенной утилизацией вследствие усиления ангиогенеза, который наблюдается у больных ОМЛ [4, 6, 8].

При анализе возможных корреляционных связей не выявлено ассоциации уровня ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ, определяемого при диагностике ОМЛ, с возрастом больных, количеством бластных клеток в костном мозге и морфологическим вариантом ОМЛ. Не обнаружено также корреляции концентрации ММП-2 и ММП-9 с общей выживаемостью больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты позволяют сделать вывод о том, что изменения концентрации ММП-2 и ММП-9 в ПАКМ на разных этапах лечения больных ОМЛ ассоциированы с качеством ответа на химиотерапию. Концентрации ММП-2 и ММП-9 представляют собой перспективные маркеры при оценке объема лейкозной массы. Мониторинг уровня ММП-2 и ММП-9 может быть полезен при оценке ответа в процессе терапии ОМЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайдамака Н.В., Паровичникова Е.Н., Завалишина Л.Э. и др. Значимость матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в норме, онкологии и онкогематологии // *Терапевт. арх.* 2009. 81. (7). 91–96.
2. Ганусевич И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение // *Онкология.* 2010. 12. (1). 10–22.
3. Ганусевич И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей // *Онкология.* 2010. 12. (1). 108–117.
4. Лесниченко И.Ф., Грицаев С.В., Капустин С.И. Матриксные металлопротеиназы: характеристика, роль в лейкозогенезе и прогностическое значение // *Вопр. онкологии.* 2011. 57. (3). 286–294.
5. Лесниченко И.Ф., Грицаев С.В., Сергеев А.Н., Кострома И.И. Активность матриксных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 в плазме аспиринов костного мозга больных острым миелоидным лейкозом // *Биомед. химия.* 2013. 59. (5). 578–584.
6. Aref S., Osman E., Omer N. et al. Prognostic relevance of circulating matrix metalloproteinase-2 in acute myeloid leukaemia patients // *Hematol. Oncol.* 2007. 25. 121–126.
7. Lin L., Lin D., Cyang C. et al. Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue Inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia // *Br. J. Haematol.* 2002. 117. 835–841.
8. Yu X.F., Han Z.C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies // *Histol. Histopatol.* 2006. 21. 519–531.

MATRIXS METALLOPROTEINASES-2 AND 9 IN PLASMA OF BONE MARROW ASPIRATES OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

**Inna Federovna LESNICHENKO, Sergey Vasiljevich GRITSAEV,
Ivan Ivanovich KOSTROMA**

*Institute of Hematology and Transfusiology
191024, St. Petersburg, 2-nd Sovetskaja str., 16*

Aim. To determine MMP-2 and MMP-2 levels in aspirate's plasma of bone marrow of patients with acute myeloid leukemia and to evaluate their prognostic significance. Methods. The level of MMP-2 and MMP-9 were studied in 76 patients (32 in complete remission ad 44 in non complete remission). ELISA kits (R&D systems) were used. Results and discussion. The level of MMP-2 and MMP-9 at the period of AML diagnosis was lower than in complete remission ($p = 0.0001$). The level increased in complete remission and decreased in relapse. Conclusion. The level of MMP-2 and MMP-9 are perspective markers to determine the volume of residual disease during the treatment of patients with acute myeloid leukemia.

Key words: matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, acute myeloid leukemia.

*Lesnichenko I.F. – candidate of biological sciences, researcher of biochemical laboratory,
e-mail: RNIHT@mail.ru*

*Gritsaev S.V. – doctor of medical sciences, chief researcher of clinical department for hematology,
e-mail: gritsaevsv@mail.ru*

Kostroma I.I. – junior researcher of clinical department for hematology, e-mail: RNIHT@mail.ru