

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА КОСТНОГО МОЗГА ПРИ Rh-НЕГАТИВНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**Дарья Витальевна Гоголева<sup>1</sup>, Глеб Вячеславович Сычугов<sup>2</sup>

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

<sup>1</sup> pathology249@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5425-6472><sup>2</sup> docsgv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3251-6944>**Аннотация**

**Введение.** Оценка иммуногистохимической экспрессии матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9), их ингибиторов (TIMP-1, TIMP-2), фибробластического фактора роста 2 (FGF2), трансформирующего фактора роста b1 (TGFB1) и коллагена 3 типа в трепанобиопсиях костного мозга пациентов с Rh-негативными миелопролиферативными заболеваниями (МПЗ) имеет большое значение. Цель работы – оценка экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса (MMP-2, MMP-9, TIMP1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, Collagen III), участвующих в прогрессировании миелофиброза в трепанобиопсиях костного мозга в зависимости от мутационного статуса пациентов с ХМПЗ. **Материалы и методы.** Было проанализировано 108 трепанобиопсий костного мозга пациентов с МПЗ, которые были разделены на 3 группы: JAK2-позитивные (n=62), CALR-позитивные (n=25) и трижды негативные (n=21). Все гистопрепараты были окрашены иммуногистохимическим методом с использованием антител к MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, FGF2, TGFB1 и коллагену III и были оценены в программе ImageJ. Для выявления статистически значимых различий использовались критерии Краскелла-Уоллиса и Манна-Уитни. Также был подсчитан коэффициент корреляции Спирмена. Статистически достоверными считались различия  $p < 0,05$ . Результаты. Экспрессия металлопротеиназы MMP2 определялась в цитоплазме мегакариоцитов. Экспрессия MMP9 определялась в цитоплазме нейтрофилов, макрофагов, а также в экстрацеллюлярном матриксе (ЭМ) микроокружения кровяного костного мозга. Ингибитор металлопротеиназ TIMP1 экспрессировался только в ЭМ. Экспрессия TIMP2, Collagen III, FGF2 и TGFB1 определялась в цитоплазме мегакариоцитов и ЭМ. Выявлены различия между всеми тремя группами, наибольшие различия между группами JAK2 и CALR. Выявлена слабая и умеренная положительная корреляция между мутацией JAK2 и иммуногистохимической экспрессией компонентов ЭМ и слабая негативная корреляция между мутацией CALR и иммуногистохимической экспрессией компонентов ЭМ. **Обсуждение.** Наибольшее количество компонентов ЭМ выявлено в JAK2-позитивной группе, наименьшее – в CALR-позитивной группе. Так как экспрессия оценивалась во всех миелоидных клетках и компонентах костномозговых ниш, можно говорить, что данный вид оценки более полный, чем в ранее опубликованных исследованиях, где оценка производилась только в сыворотке крови, по культуре клеток и др. **Заключение.** Иммуногистохимическая экспрессия MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, collagen type III зависит от драйверных мутаций. Это может быть полезно для понимания патогенеза фиброза и оценки прогноза Rh-негативных МПЗ. **Ключевые слова:** Rh-негативные миелопролиферативные заболевания, трепанобиопсия костного мозга, экстрацеллюлярный матрикс, JAK2 мутация, CALR мутация.

**Для цитирования:** Гоголева Д.В., Сычугов Г.В. Иммуноморфологическая характеристика экстрацеллюлярного матрикса костного мозга при rh-негативных миелопролиферативных заболеваниях. Уральский медицинский журнал 2023;22(2):93-101. <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-2-93-101>.

© Гоголева Д.В., Сычугов Г.В., 2023

© Gogoleva D.V., Sychugov G.V., 2023

**IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF BONE MARROW EXTRACELLULAR MATRIX IN PH-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE DISEASES**Darya V. Gogoleva<sup>1</sup>, Gleb V. Sychugov<sup>2</sup>

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

<sup>1</sup> [pathology249@mail.ru](mailto:pathology249@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5425-6472><sup>2</sup> [docsgv@gmail.com](mailto:docsgv@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3251-6944>**Abstract**

**Introduction** Evaluation of immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP2, MMP9), their inhibitors (TIMP1, TIMP2), fibroblast growth factor (FGF2), transforming growth factor beta (TGFB1) and collagen type III in the bone marrow of patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) is of great importance. **The aim of the study** was the evaluation of expression of extracellular matrix components (MMP-2, MMP-9, TIMP1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, Collagen III) involved in myelofibrosis progression in bone marrow trepan biopsies depending on mutational status of patients with CMPD. **Materials and methods** We analyzed 108 bone marrow biopsies of patients with MPN, which were divided into 3 groups: JAK2-positive (n=62), CALR-positive (n=25) and triple-negative (n=21). Whole-slide sections were immunostained using antibodies against MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, collagen type III and scored by ImageJ plugin software. We used Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test for comparisons of differences in medians. Spearman's rank order correlation was calculated. Statistical significance was set at  $p < 0,05$ . **Results and Discussion** MMP2 expression was observed in megakaryocytes. MMP9 expression was observed in neutrophils, macrophages and the bone marrow extracellular matrix (EM). TIMP1 expression was observed in the EM. TIMP-2, FGF2, TGFB1 and collagen type III expression was observed in megakaryocytes and the EM. Kruskal-Wallis test determined the differences between all 3 groups (MMP-2  $p < 0,001$ , MMP-9  $p = 0,023$ , TIMP-1  $p < 0,001$ , TIMP-2  $p < 0,001$ , FGF2  $p < 0,001$ , TGFB1  $p < 0,001$ , collagen type III  $p < 0,001$ ). Mann-Whitney U-test determined the most differences between JAK2- and CALR-groups (MMP-2  $p = 0,001$ , MMP-9  $p = 0,001$ , TIMP-1  $p = 0,001$ , FGF2  $p = 0,001$ , TGFB1  $p = 0,001$ , collagen type III  $p = 0,001$ ), except TIMP-2. There was the weak and moderate positive correlation between JAK2-mutation and the immunohistochemistry expression of EM components, also the weak negative correlation between CALR-mutation and the immunohistochemistry expression of EM components. **Conclusion** The bone marrow immunohistochemistry expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, collagen type III depends on driver mutations. It may be useful for understanding of fibrosis pathogenesis and prognosis estimate of Ph-negative MPN.

**Key words:** Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms, bone marrow biopsy, extracellular matrix, JAK2 mutation, CALR mutation.

**For citation:**

Gogoleva DV, Sychugov GV. Immunohistochemistry of bone marrow extracellular matrix in ph-negative myeloproliferative diseases. Ural medical journal 2023;22(2):93-101. (In Russ.). <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-2-93-101>

**ВВЕДЕНИЕ**

Ph-негативные хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – медленно прогрессирующие заболевания крови, ведущую роль в патогенезе которых играют генетические нарушения: мутация в гене JAK2, в гене кальретикулина CALR и мутации тромбозитинового рецептора MPL [1]. Одним из исходов ХМПЗ является миелофиброз, проявления которого уменьшают продолжительность жизни и ухудшают состояние пациентов [2, 3]. Причины формирования миелофиброза до конца неясны. Миелофиброз – цитокин-опосредованный процесс, запускающийся при клональном перерождении гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) [4, 5] и сопровождающийся продукцией белков

внеклеточного матрикса [6]. Нарушения в системе матриксных металлопротеиназ (ММП) и тканевых ингибиторов металлопротеиназ [7], а также выработка ростовых факторов – трансформирующего фактора роста В (TGFB) и фактора роста фибробластов (FGF2), повышает фиброгенную активность в стромальных клетках костного мозга [8, 9, 10].

Семейство ММП можно разделить на мембранные и секретируемые коллагеназы, желатиназы, стромелизины и матрилизины [11]. Наиболее изучены желатиназы MMP-2 и MMP-9, которые экспрессируются почти всеми клетками ниш микроокружения [12]. Желатиназы MMP-2 и -9 могут расщеплять различные типы коллагена и фибулин-2 [13]. В костном мозге MMP-2, -9 способны

разрушать факторы роста, влияя на мобилизацию ГСК в периферическую кровь [14, 15].

Тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP1-4) могут ингибировать все активированные ММП [16, 17] и экспрессируются в кроветворных и некроветворных клетках костного мозга. Помимо своих ингибирующих протеиназу функций, TIMP-1 и -2 стимулируют эритроидный росток [18, 19], а также могут значительно влиять на выживаемость и пролиферацию миелоидных клеток-предшественников [20, 21] и CD34+ ГСК [22] через мембранный рецептор CD63. Аналогичный CD63-опосредованный эффект наблюдается в клетках острого миелоидного лейкоза, за счёт вовлечения лейкозных клеток в клеточный цикл [23].

Фактор роста фибробластов (FGF2) и трансформирующий фактор роста B1 (TGFB1) участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки ГСК [24]. TGFB1 играет ключевую роль в продукции коллагена I типа [25]

Коллаген III типа секретируется в полых и растяжимых тканях, таких как кровеносные сосуды, кишечник и матка [26], также обнаруживается в костях, где он секретируется остеобластами [27]. Коллаген III обнаруживается по всему костному мозгу [28] в виде небольшого количества фибрилл, вокруг артериол [29] или в периостальных областях, но отсутствует в эндостальных областях и центральной части костно-мозговых лакун. Функционально коллаген III типа участвует в развитии трабекулярной кости, влияет на остеогенез [27] и образование тромбоцитов [29].

Цель работы – оценка экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса (MMP-2, MMP-9, TIMP1, TIMP-2, FGF2, TGFB1, Collagen III), участвующих в прогрессировании миелофиброза, в трепанобиопсиях костного мозга в зависимости от мутационного статуса пациентов с ХМПЗ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 113 трепанобиопсий костного мозга пациентов с установленными диагнозами истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза и миелопролиферативного заболевания неклассифицируемого, обследованных в ГБУЗ ЧОПАБ за период с 2014 по 2022 г. Обязательный критерий включения – молекулярно-генетическое исследование на JAK2V617F, CALR(1,2), MPL, а также отсутствие предшествующей циторедуктивной терапии. В исследовании участвовали 60 пациентов женского пола (53,1%) и 53 пациента мужского пола (46,9%); возраст от 22 до 82 лет (медиана – 58 лет, Q1 –45,5; Q3 –66,5). Мы разделили пациентов на 4 группы по результатам молекулярно-генетического исследования: первая группа – пациенты без мутаций, или «трижды негативные» (21 человек); вторая группа – пациенты с мутацией JAK2V617F (62 человек); третья группа – пациенты с мутациями CALR 1,2 (25 человек); четвертая группа

– пациенты с мутацией MPL (5 человек). Последняя группа (с мутацией MPL) была исключена из исследования в связи с малым количеством пациентов.

На остальных 108 трепанобиопсиях было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием системы визуализации UltraVIEW Universal (США) с хромогеном DAB. С парафиновых блоков трепанобиопсий костного мозга, изготавливались срезы толщиной 4 мкм. Иммуногистохимическая реакция ставилась в устройстве Ventana Benchmark (США) с применением моноклональных и поликлональных антител: MMP2 (клон Y175, производитель Epitomics), MMP9 (клон EP1254, производитель Epitomics), TIMP1 (производитель Abbotec), TIMP2 (производитель Abbotec), FGF2 (клон AS24, производитель GeneTex), TGFB1 (клон 7F6, производитель GeneTex), Collagen III (клон FH-7A, производитель GeneTex). Все гистопрепараты были отсканированы в гистосканере PANNORAMIC® 250 Flash III DX. Экспрессия антигенов оценивалась по гистосканам в программе ImageJ с плагином ICH Profiler. Площадь оценки устанавливалась в программе – 1000 мкм<sup>2</sup>. Оценка производилась в 5 разных участках трепанобиопсии, исключая субкортикальные ткани, толстые костные балки и искусственно смятые костномозговые пространства. Для статистического анализа использовалось среднее значение. Плотность окрашенных клеток и экстрацеллюлярного матрикса оценивалась в абсолютных цифрах площади (мкм<sup>2</sup>), также оценивалась объемная доля окрашенных клеток и экстрацеллюлярного матрикса в % (удельный объем окрашенных элементов по данным программы ImageJ × 100%) при исследовании на площади поверхности микропрепарата равной 1000 мкм<sup>2</sup>.

Статистическая обработка данных проводилась в программе SPSS Statistics. Для оценки распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова с поправкой значимости Лиллиефорса. Во всех случаях распределение признаков отличалось от нормального. Для количественных показателей использовались методы описательной статистики – медиана (Me) и квартили (Q1 и Q3).

Непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Бонферрони ( $p < 0,017$ ) использовались для оценки значимости различий между группами (группирующая переменная – мутации JAK2, CALR или их отсутствие, TN). Статистически достоверными считались различия  $p < 0,05$ . Значения  $p$  (менее 0,0001) обозначались  $p < 0,001$ .

Также производилась оценка корреляционных связей компонентов экстрацеллюлярного матрикса и мутационного статуса пациента (коэффициент ранговой корреляции Спирмена  $r_s$ ). Для выявления корреляционной взаимосвязи между мутационным статусом и экстрацеллюлярным матриксом пациенты были перегруппированы на 2 группы – группа JAK2,  $n=62$  и пациенты с другим мутационным статусом (группы TN+CALR,  $n=46$ ); группа CALR,  $n=25$  и TN+JAK2,  $n=83$ ; группа TN,  $n=21$  и

группы JAK2+CALR, n=87. Использовались количественные непараметрические данные (плотность окрашенных клеток и экстрацеллюлярного матрикса), во всех случаях распределение признаков отличалось от нормального.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами было выявлено, что в гистопрепаратах костного мозга экспрессия металлопротеиназы MMP2 определяется только в цитоплазме мегакариоцитов.

Экспрессия MMP9 определяется в цитоплазме нейтрофилов, макрофагов, а также в экстрацеллюлярном матриксе микроокружения кроветворного костного мозга. Ингибитор металлопротеиназ TIMP1 экспрессируется только в экстрацеллюлярном матриксе. Экспрессия ингибитора TIMP2, коллагена 3 типа, фибробластического фактора роста 2 (FGF2) и трансформирующего фактора роста В1 (TGFB1) определяется в цитоплазме мегакариоцитов и в экстрацеллюлярном матриксе (рис. 1, 2, 3).

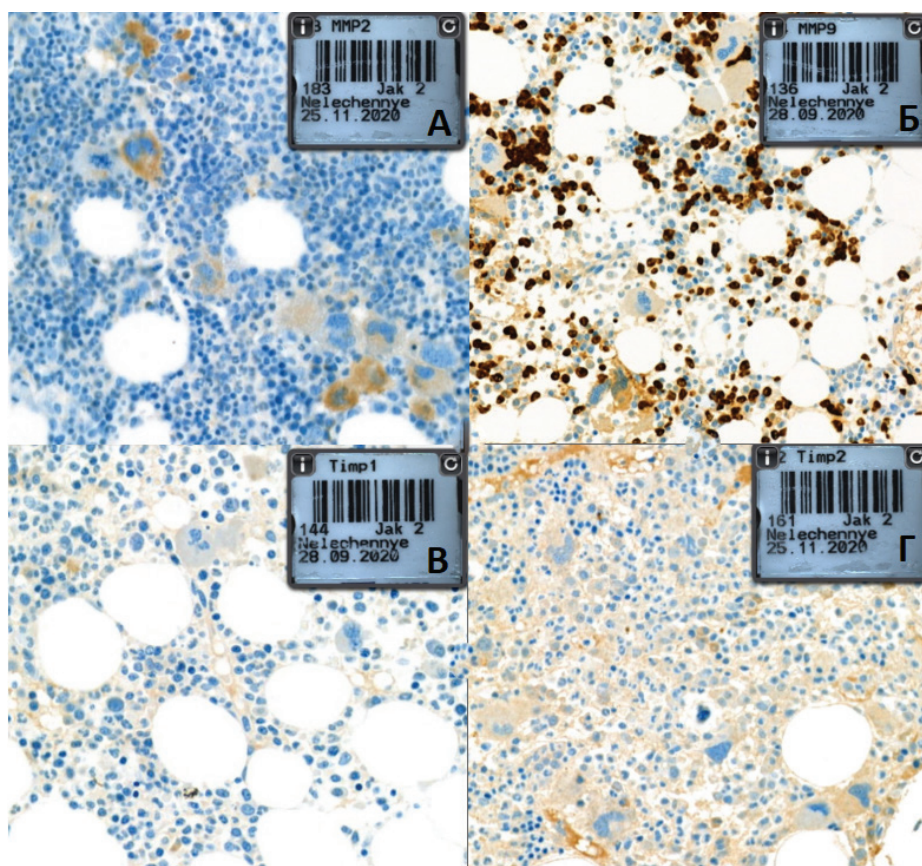


Рис. 1 Экспрессия компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трепанобиопсиях костного мозга, группа JAK2, иммуногистохимическая окраска,  $\times 400$ : а) MMP2 – экспрессия в цитоплазме мегакариоцитов; б) MMP9 – экспрессия в цитоплазме нейтрофилов, макрофагов и в экстрацеллюлярном матриксе; в) TIMP1 – экспрессируется в экстрацеллюлярном матриксе; г) TIMP2 – экспрессия в цитоплазме мегакариоцитов и в экстрацеллюлярном матриксе.



Рис. 2 Экспрессия компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трепанобиопсиях костного мозга, группа JAK2, иммуногистохимическая окраска,  $\times 400$ : а) FGF2 – экспрессируется в цитоплазме мегакариоцитов и экстрацеллюлярном матриксе; б) TGFB1 – экспрессия в цитоплазме мегакариоцитов и в экстрацеллюлярном матриксе.

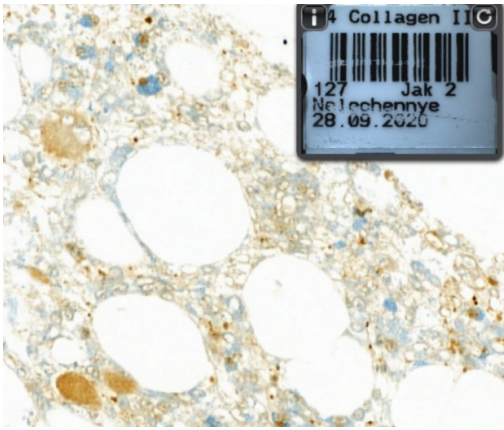


Рис. 3 Экспрессия компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трепанобиопсиях костного мозга, группа JAK2, иммуногистохимическая окраска,  $\times 400$ : Collagen III – экспрессия в цитоплазме мегакариоцитов и в экстрацеллюлярном матриксе.

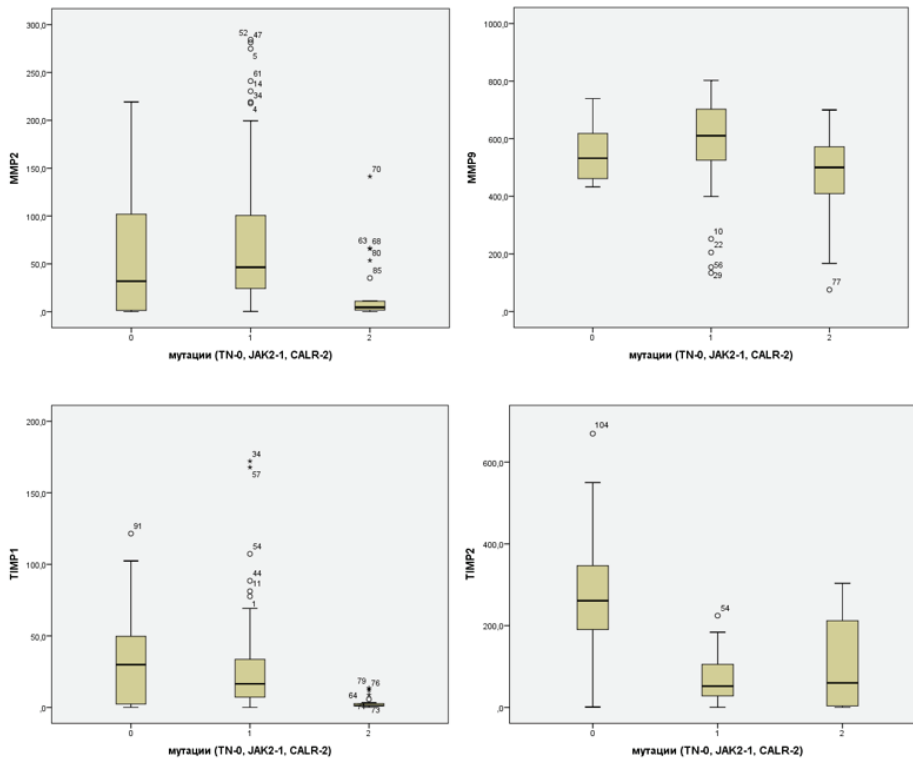


Рис. 4. Соотношение количества компонентов экстрацеллюлярного матрикса (окрашенная площадь в  $\mu\text{м}^2$  – MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2) в зависимости от мутационного статуса: 0 – TN (трижды негативные), 1 – JAK2, 2 – CALR.

В таблице 1 приведена сравнительная характеристика экспрессии металлопротеиназ, их ингибиторов и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса в количественном выражении (медиана, квартили) в зависимости от мутационного статуса пациента (нет мутаций – TN, JAK2, CALR) (рис. 4).

Нами было выявлено, что состав компонентов экстрацеллюлярного матрикса кроветворного костного мозга у пациентов с ХМПЗ, различается в зависимости от драйверной мутации.

При анализе MMP2 наименее выражена экспрессия в CALR-положительной группе, максимально выражена экспрессия в JAK2-положительной группе (критерий Краскелла-Уоллеса  $< 0,001$ , критерий Манна-Уитни для JAK2 и CALR = 0,001).

При анализе MMP9 наименее выражена экспрессия в CALR-положительной группе, максимально

выражена экспрессия в JAK2-положительной группе (критерий Краскелла-Уоллеса = 0,0023, критерий Манна-Уитни для JAK2 и CALR = 0,001).

При анализе TIMP1 наименее выражена экспрессия в CALR-положительной группе, максимально выражена экспрессия в группе без мутаций (критерий Краскелла-Уоллеса  $< 0,001$ , критерий Манна-Уитни для JAK2 и CALR = 0,001, для TN и CALR = 0,001).

При анализе TIMP2 наименее выражена экспрессия в JAK2-положительной группе, максимально выражена экспрессия в группе без мутаций (критерий Краскелла-Уоллеса  $< 0,001$ , критерий Манна-Уитни для TN и JAK2 = 0,001, для TN и CALR = 0,001).

При анализе FGF2 наименее выражена экспрессия в CALR-положительной группе, максимально выражена экспрессия в JAK2-положительной группе

(критерий Краскелла-Уоллеса < 0,001, критерий Манна-Уитни для JAK2 и CALR = 0,001, для TN и CALR = 0,023, для TN и JAK2 = 0,003).

При анализе TGFB1 наименее выражена экспрессия в CALR-позитивной группе, максимально выражена экспрессия в JAK2-позитивной группе (критерий Краскелла-Уоллеса < 0,001, критерий Манна-Уитни для JAK2 и CALR = 0,001, для TN и CALR = 0,024).

При анализе Collagen III наименее выражена экспрессия в CALR-позитивной группе, максимально выражена экспрессия в JAK2-позитивной группе (критерий Краскелла-Уоллеса < 0,001, критерий Манна-У-

итни для TN и JAK2= 0,003, для JAK2 и CALR = 0,001).

Таким образом, в CALR-позитивной группе определяется наименьшее количество компонентов экстрацеллюлярного матрикса – мателлопротеиназ 2 и 9, ингибитора металлопротеиназ TIMP1, а также коллагена 3 типа, фибробластического фактора роста 2 (FGF2) и трансформирующего фактора роста В1 (TGFB1). В свою очередь в JAK2-позитивной группе определяется наибольшее количество компонентов экстрацеллюлярного матрикса – металлопротеиназ 2 и 9, коллагена 3 типа, фибробластического фактора роста 2 (FGF2) и трансформирующего фактора роста В1 (TGFB1).

Таблица 1.

Сравнительная количественная характеристика компонентов экстрацеллюлярного матрикса (в мкм<sup>2</sup>) в зависимости от мутационного статуса (нет мутаций – TN, JAK2, CALR).

Группы / компоненты экстрацеллюлярного матрикса	Me (Q1; Q3)			Критерий Краскелла-Уоллеса	Критерий Манна-Уитни:		
	Группа 1 нет мутаций TN, n=21	Группа 2 JAK2, n=62	Группа 3 CALR, n=25		P <sub>1,2</sub>	P <sub>2,3</sub>	P <sub>1,3</sub>
MMP2	31,9 (1,1; 105,3)	46,5 (24,1; 100,6)	4,6 (1,8; 11,2)	< 0,001	0,197	<b>0,001</b>	0,208
MMP9	532,3 (458,5; 659,3)	610,4 (520,9; 703,9)	500,2 (406,1; 586)	<0,002	0,147	<b>0,001</b>	0,072
TIMP1	29,9 (2,2;53,6)	16,5 (7;34)	1,3 (1;3)	< 0,001	0,987	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
TIMP2	261 (174,8; 388,4)	52,2 (27,7; 105,5)	60 (2,5; 222,8)	< 0,001	<b>0,001</b>	0,993	<b>0,001</b>
FGF2	3,3 (1,3;7,2)	10,3 (4;19,4)	0,9 (0;5,1)	< 0,001	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,023</b>
TGFB1	29,3 (13,3;73,1)	45,3 (15;77,6)	4,8 (1,6; 36)	< 0,001	0,6	<b>0,001</b>	<b>0,024</b>
Collagen3	1,2 (0,3;6,1)	13,3 (1,6;62,6)	0,4 (0;3)	< 0,001	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,098

При оценке корреляционной взаимосвязи между мутационным статусом и экстрацеллюлярным матриксом нами выявлена положительная корреляция средней и слабой силы (умеренная и слабая) между всеми исследованными компонентами экстрацеллюлярного матрикса и наличием мутации JAK2 (MMP2 rs = 0,366, p <0,001; MMP9 rs = 0,299, p =0,002; TIMP1 rs = 0,355, p <0,001; FGF2 rs = 0,494, p <0,001; TGFB1 rs = 0,277, p =0,004; Collagen3 rs = 0,439, p <0,001). Т.е. количество (окрашенная площадь) этих компонентов экстрацеллюлярного матрикса выше у пациентов с мутацией JAK2, чем в двух других группах, за исключением TIMP2, количество которого меньше при наличии данной мутации (TIMP2 rs = -0,305, p =0,001).

Негативная взаимосвязь выявлена для группы с мутацией CALR (группа CALR, n=25 и TN+JAK2, n=83) (MMP2 rs = -0,382, p <0,001; MMP9 rs = -0,310, p =0,001; TIMP1 rs = -0,532, p <0,001; FGF2 rs = -0,431, p <0,001; TGFB1 rs = -0,361, p <0,001; Collagen3 rs = -0,371, p <0,001). То есть количество (окрашенная

площадь) этих компонентов экстрацеллюлярного матрикса ниже у пациентов с мутацией CALR, чем в двух других группах. Также за исключением TIMP2, где статистически достоверной корреляционной связи не выявлено (TIMP2 rs = -0,119, p =0,219).

В свою очередь отсутствие мутаций (группа TN, n=21 и группы JAK2+CALR, n=87) не коррелирует с количеством компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Снова за исключением TIMP2, где выявлена негативная корреляция средней силы (умеренная) (rs = -0,488, p <0,001).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос влияния компонентов экстрацеллюлярного матрикса на развитие фиброза является актуальным и давно изучается в различных локализациях (заболевания почек, легких, онкологические заболевания) [30]. Одним из частых исходов заболеваний из группы ХМПЗ является остеомиелофиброз, поэтому исследования, рассматривающие эту проблему с точки зрения различных нозологий,

мутаций и степени выраженности фиброза, являются актуальным вопросом онкогематологии и патологической анатомии.

В ранее опубликованных зарубежных исследованиях оценка продукции ММП производилась в сыворотке крови, а также *in vitro* с выделением CD34+ ГСК. Различия в таких исследованиях не выявлялись [31] или выявлялись минимально, например, отмечалось увеличение клональной активности ГСК под воздействием TIMP1 и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса для мутации JAK2, в сравнении с мутацией CALR [32].

Полученные нами результаты показали, что наличие той или иной драйверной мутации или её отсутствие, влияет на продукцию компонентов экстрацеллюлярного матрикса. При этом данные получены при количественной оценке экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трепанобиоптатах костного мозга, с учётом всех зрелых и незрелых клеток миелоидного ряда (эритроидный, гранулоцитарный и мегакариоцитарный ростки) и компонентов костномозговых ниш, включая сосуды, ретикулиновые и коллагеновые волокна, клетки сопутствующего воспалительного инфильтрата. Такая оценка выявляет более полную картину, что дает возможность посмотреть на проблему с новой точки зрения, и делает исследование актуальным.

Нами получены данные о максимально выраженной экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса в группе с мутацией JAK2 и минимально выраженной в группе с мутацией CALR. При этом данные о снижении количества компонентов экстрацеллюлярного матрикса в CALR-положительной группе соотносятся с данными исследования 2017 г. (Силютин А.А., Матюхина Н.М., Лисина Е.Г. и др.), выявившим снижение количества металлопротеиназ (MMP9) в сыворотке крови CALR-положительных пациентов с ХМПЗ. У пациентов с различными формами ХМПЗ с учетом мутационного статуса (исследовался уровень TGFB, FGF2, MMP-2, -9 в сыворотке крови) было выявлено снижение уровня сывороточной MMP-9 по сравнению со здоровыми донорами, что может свидетельствовать о нарушении деградации коллагена. Снижение MMP было

более выражено у пациентов с мутацией CALR [33], несмотря на благоприятный прогноз в этой группе пациентов [34].

Интересным наблюдением является то, что отсутствие мутаций статистически не коррелирует с количеством компонентов экстрацеллюлярного матрикса, а различия между группой TN и двумя другими группами прослеживаются только по части маркеров. Это можно объяснить большой генетической гетерогенностью трижды негативной группы, т.к. отсутствие драйверных мутаций не исключает наличие других генетических поломок (мутации ASXL1, EZH2, TET2, IDH1, IDH2, SRSF2 и SF381) [35]. Сложность набора достаточных по количеству групп пациентов со всем спектром «недрайверных» генетических поломок при ХМПЗ затрудняет полную и объективную оценку трижды негативной группы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные подтверждают, что количество (окрашенная площадь) компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трепанобиопсиях костного мозга различается в зависимости от мутационного статуса пациента. Наиболее выражены различия между JAK2-положительной, где площадь экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса (MMP2,9, Collagen III, FGF2, TGFB1) максимальна, и CALR-положительной группы, где площадь экспрессии (MMP2,9, TIMP1, Collagen III, FGF2, TGFB1) минимальна. Отсутствие мутаций не коррелирует с количеством компонентов экстрацеллюлярного матрикса, а различия между группой TN и двумя другими группами прослеживаются только по части маркеров (с группой JAK2 – TIMP2, FGF2 и Collagen III; с группой CALR – TIMP1, TIMP2, FGF2 и TGFB2).

Увеличение количества информации о связи между компонентами экстрацеллюлярного матрикса костного мозга и мутационным статусом пациента улучшит понимание патогенеза фиброза при Ph-негативных ХМПЗ и будет способствовать совершенствованию системы оценки прогноза у данной группы пациентов.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech* 2011;4(3):311–317. <https://doi.org/10.1242/dmm.006817>.
- Barosi G, Mesa RA, Thiele J et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008;22(2):437–438. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404914>.
- Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology* 2007;2007(1):346–354. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.346>.
- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51(2):189–194.
- Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, et al. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101(5):1981–1983. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2341>.
- Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. *Blood Rev* 1997;11(4):233–242. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(97\)90022-9](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(97)90022-9).
- Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Mod Mechan*

- 2014;7(2):193–203. <https://doi.org/10.1242/dmm.012062>.
8. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 2002;100(10):3495–3503. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1133>.
9. Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles C, Romquin N et al. Elevated levels of basic growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997;97(2):441–448. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.292671.x>.
10. Boiocchi L, Vener C, Savi F et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol* 2011;64(3):226–231. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.083386>.
11. Yu XF, Han ZC. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol* 2006;21:519–531. <https://doi.org/10.14670/HH-21.519>.
12. Saw S, Weiss A, Khokha R, Waterhouse PD. Metalloproteases: on the watch in the hematopoietic niche. *Trends Immunol* 2019;40:1053–1070. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.09.006>.
13. Hergeth SP, Aicher WK, Essl M, Schreiber TD et al. Characterization and functional analysis of osteoblast-derived fibulins in the human hematopoietic stem cell niche. *Exp Hematol* 2008;36:1022–1034. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.013>.
14. Lee-Thedieck C, Schertl P, Klein G. The extracellular matrix of hematopoietic stem cell niches. *Adv Drug Deliv Rev* 2022;181:114069. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114069>.
15. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. *Журнал акушерства и женских болезней* 2012;61(1):113–125. Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matrix metalloproteinases and inhibitors: classification, mechanism of action. *Journal of obstetrics and women's diseases* 2012;61(1):113–125. (In Russ).
16. Jackson HW, Defamie V, Waterhouse P, Khokha R. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17:38–53. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.115>.
17. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:55–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>.
18. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994;107(9):2373–2379. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80015-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80015-9).
19. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K et al. Growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells a possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298:29–32. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80015-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80015-9).
20. Kobuch J, Cui H, Grünwald B et al. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice. *Haematologica* 2015;100(8):1005–1013. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.121590>.
21. Rossi L, Forte D et al. The tissue inhibitor of metalloproteinases 1 increases the clonogenic efficiency of human hematopoietic progenitor cells through CD63/PI3K/Akt signaling. *Exp Hematol* 2015;43:974–985. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.07.003>.
22. Dassé E, Bridoux L, Baranek T et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEK1/MEK6/p38alpha pathway. *Leukemia* 2007;21:595–603. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404540>.
23. Forte D, Salvestrini V, Corradi G et al. The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promotes survival and migration of acute myeloid leukemia cells through CD63/PI3K/Akt/p21 signaling. *Oncotarget* 2017;8:2261–2274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13664>.
24. Coombe DR, Kett WC. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:410–424. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4293-7>.
25. Chang N, Xiu L, Li L. Sphingosine 1-phosphate receptors negatively regulate collagen type I/III expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *J Cell Biochem* 2014;115:359–367. <https://doi.org/10.1002/jcb.24670>.
26. Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene* 2019;717:151–171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>.
27. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ et al. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int* 2014;94:621–631. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9843-x>.
28. Semeniak D, Kulawig R, Stegner D et al. Proplatelet formation is selectively inhibited by collagen type I through Syk-independent GPVI signaling. *J Cell Sci* 2016;129:3473–3484. <https://doi.org/10.1242/jcs.187971>.
29. Malara A, Currao M, Gruppi C et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells* 2014;32:926–937. <https://doi.org/10.1002/stem.1626>.
30. Ceron CS, Baligand C, Joshi S, et al. An intracellular matrix metalloproteinase-2 isoform induces tubular regulated necrosis: implications for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;312(6):1166–1183. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00461.2016>.
31. Wang JC, Novetsky A, Chen C et al. Plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with agnogenic myeloid metaplasia or idiopathic primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 2002;119(3):709–712. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03874.x>.
32. Sollazzo D, Forte D, Polverelli N et al. Crucial factors of the inflammatory microenvironment (IL-1 $\beta$ / TNF- $\alpha$ / TIMP-1) promote the maintenance of the malignant hemopoietic clone of myelofibrosis: an in vitro study. *Oncotarget* 2016;7(28):974–988. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9949>.
33. Силютин А.А., Магюхина Н.М., Лисина Е.Г. Спектр про- и антифибротических факторов в сыворотке у пациентов



с хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Клиническая онкогематология 2017;10(4):479–484.

Silyutina A, Matyukhina NM, Lisina EG. Pro- and antifibrotic factors in the serum of patients with chronic myeloproliferative disorders. Clinical oncohematology 2017;10(4):479–84. (In Russ.).

34. Kim SY, Im K, Park SN et al. CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassified. Am J Clin Pathol 2015;143(5):635–644. <https://doi.org/10.1309/AJCPUAAC16LIWZMM>.

35. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon, France; 2017.

***Сведения об авторах:***

Д.В. Гоголева – аспирант;

Г.В. Сычугов – кандидат медицинских наук;

***Information about the authors:***

D.V. Gogoleva – Post-graduated student;

G.V. Sychugov – Ph.D. in medicine.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflicts of interests** The authors declare no conflicts of interests.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Funding source** This study was not supported by any external sources of funding.

***Этическая экспертиза не требуется.***

**Ethical review** is not required.

***Информированное согласие не требуется.***

**Informed consent** is not required.

Статья поступила в редакцию 17.02.2023; одобрена после рецензирования 27.03.2023; принята к публикации 01.04.2023.

The article was submitted 17.02.2023; approved after reviewing 27.03.2023; accepted for publication 01.04.2023.