

УДК 616.155.392.8-036.11:616.71-018,46:577.15

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ММП-2 И ММП-9 В ПЛАЗМЕ АСПИРАТОВ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

***И.Ф. Лесниченко*, С.В. Грицаев, А.Н. Сергеев,
И.И. Кострома, С.А. Тиранова***

ФГБУ “РосНИИ Гематологии и Трансфузиологии” ФМБА России,
191024 Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16; тел.: (812) 274-56-50;
факс: (812) 717-25-50; эл. почта: Lubo@hotmail.com; RNIINT@mail.ru

С целью определения прогностической значимости величины соотношения ММП-2/ММП-9 был проведен сравнительный анализ активности ММП-2 и ММП-9 в плазме аспиринов костного мозга (КМ) 53 больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) методом зимограмм. Аспираты были получены от 33 больных в стадии полной ремиссии (ПР) и 20 больных вне ПР. У большинства обследованных больных (75%) величина соотношения ММП-2/ММП-9 близка или равна единице, а её максимальное значение равно 1,77. В то же время, у 13 больных (10 больных вне ПР и 3 больных в стадии ПР), величина ММП-2/ММП-9 была повышенной ($p < 0,001$), а её минимальное значение составило 1,80. Все больные вне ПР с повышенной величиной ММП-2/ММП-9 оказались резистентными к химиотерапии. Медиана их общей выживаемости была значительно меньше, чем у остальных больных (7,0 мес. vs 33,5 мес, $p < 0,001$). У одного больного в стадии ПР возрастание ММП-2/ММП-9 наблюдалось за 2 месяца до рецидива, у 2-х других повышенная величина ММП-2/ММП-9 имела место на фоне остаточной болезни. На основании полученных данных повышенную величину ММП-2/ММП-9 ($\geq 1,80$) в плазме КМ следует рассматривать как показатель неблагоприятного течения ОМЛ.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, острый миелоидный лейкоз, плазма костного мозга.

ВВЕДЕНИЕ. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство эндопептидаз, которые при совместном действии способны расщеплять все компоненты внеклеточного матрикса и многие нематриксные молекулы. Эти ферменты участвуют в нормальных физиологических процессах организма и в патогенезе широкого спектра заболеваний [1-5].

* - адресат для переписки

Среди ММП большой интерес для онкологов и онкогематологов представляют желатиназы ММП-2 и ММП-9 в связи с их ролью в неогенезе, включая такие процессы, как рост, инвазия и метастазирование опухоли, а также неоангиогенез. К числу субстратов ММП-2 и ММП-9 относятся денатурированный коллаген (желатин) и нативный коллаген IV типа – основные компоненты базальной мембраны, которая является главным препятствием на пути диссеминирующих опухолевых клеток, и клеток эндотелия, необходимых для неоангиогенеза.

Роль в патогенезе и клиническое значение экспрессии и активности желатиназ ММП-2 и ММП-9 активно исследуются при солидных опухолях. Было установлено, что уровень экспрессии и активность ММП-2 и ММП-9 могут быть использованы как прогностические факторы [1, 2, 4, 5].

У больных гемобластозами экспрессия ММП-2 и ММП-9 была исследована при острых лимфобластном и миелоидном лейкозах, миелодиспластическом синдроме (МДС), хроническом лимфолейкозе, неходжкинских лимфомах [3, 4]. Однако, немногочисленность и противоречивость полученных результатов, не позволяют сформировать единое мнение о клиническом значении уровня экспрессии ММП-2 и ММП-9 у онкогематологических больных. Кроме того, у больных гемобластозами, в отличие от больных солидными опухолями, не проводились исследования активности желатиназ ММП-2 и ММП-9 методом зимограмм [6].

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – заболевание, характеризующееся вариабельностью клинического течения и ответа на стандартные курсы индукционной и постремиссионной терапии. Для прогноза течения ОМЛ используются клинические, гематологические, биохимические и молекулярно-генетические показатели. Тем не менее, в ряде случаев, предсказать характер развития ОМЛ бывает затруднительно. Поэтому особую актуальность представляет поиск новых маркеров риска у больных ОМЛ.

Целью данной работы является определение прогностической значимости отношения активности ММП-2 и ММП-9 (ММП-2/ММП-9) в плазме аспиратов костного мозга (КМ) больных ОМЛ.

МЕТОДИКА. Для достижения поставленной цели была исследована активность ММП-2 и ММП-9 в образцах плазмы, полученной из аспиратов КМ 53 больных ОМЛ, из которых 33 женщины и 20 мужчин. Возраст больных был от 17 до 73 лет, медиана – 38 лет. Аспираты КМ были заготовлены до начала цитостатической терапии.

Диагноз ОМЛ устанавливали по результатам комплексного изучения препаратов периферической крови и КМ, включая морфологические, цитохимические, иммунологические и молекулярно-генетические методы. Вариант ОМЛ верифицировали по критериям классификации ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей [7].

Цитостатическая терапия инициировалась после подписания больными информированного согласия.

В индукционный период назначался курс “7+3” с внутривенным введением цитарабина (Ара-Ц) по 100 мг/м² 2 раза в день и даунорубицина по 45-60 мг/м²/введение или идарубицина по 12 мг/м²/введение. Консолидирующие курсы включали Ара-Ц в дозе >1 г/м²/введение в режиме монотерапии или комбинации с антрациклиновыми антибиотиками. При отсутствии ответа в индукционном периоде назначался курс терапии “НАМ” с введением Ара-Ц в дозе ≥2 г/м²/введение.

Эффективность лечения оценивали по критериям IWG [8]. Резистентность верифицировали при отсутствии ПР после 2-х последовательных курсов ХТ “7+3”.

Среди обследованных были 33 больных, у которых на момент исследования в костномозговом пунктате количество бластных клеток было $\leq 5\%$. Это были больные с полной ремиссией (ПР), и полной ремиссией с неполным восстановлением тромбоцитов. Данная группа обозначена как “ПР”.

Кроме того, в число обследованных вошли 20 больных с активной стадией ОМЛ, в костномозговом пунктате которых количество бластных клеток превышало 5%. Среди них были больные с вновь выявленным ОМЛ, рецидивом, а также резистентными формами заболевания. Данная группа обозначена как “вне ПР”.

Общую выживаемость (ОВ) определяли как период жизни от даты постановки диагноза ОМЛ до смерти, независимо от её причины. При расчёте ОВ учитывали результаты наблюдений за больными в сроки не менее 3 месяцев.

Активность желатиназы плазмы аспиринов КМ больных ОМЛ исследовали с помощью зимографии по методу С. Neussen, E.B. Dowdle [9] с некоторыми модификациями.

Ферменты идентифицировали, используя маркеры молекулярной массы (“Sigma”, США), а также кондиционную среду линии KG-1. Зоны активности ферментов оценивали с помощью денситометрии. Денситограммы сканировали на сканере. Размер площади зон активности ММП-2 и ММП-9 определяли с помощью графического редактора Adobe Photoshop и выражали в условных единицах.

Для каждой пробы плазмы из аспиринов КМ больных ОМЛ рассчитывали величину отношения активности ММП-2 к величине активности ММП-9 - ММП2/ММП9, как отношение площади зоны активности ММП-2 к площади зоны активности ММП-9 на зимограммах.

Для статистической обработки данных была использована программа “Статистика”. 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. Для определения корреляции между показателями использовали критерий Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. По результатам анализа зимограмм было установлено, что в плазме аспиринов КМ больных ОМЛ желатиназная активность проявляется преимущественно в 2-х фракциях. Первая из них имела молекулярную массу порядка 72 кДа, что соответствует про-энзиму ММП-2 (в дальнейшем ММП-2). Вторая имела молекулярную массу порядка 92 кДа, что соответствует проэнзиму ММП-9 (в дальнейшем ММП-9) (рис. 1). Полученные результаты соответствуют данным литературы о том, что при солидных опухолях и гемобластозах ММП-2 и ММП-9 продуцируются в форме проэнзимов [10, 11]. Наряду с перечисленными, желатиназная активность выявлялась и во фракциях с другой молекулярной массой. Однако, как правило, они присутствовали в следовых количествах и в данном исследовании не учитывались.

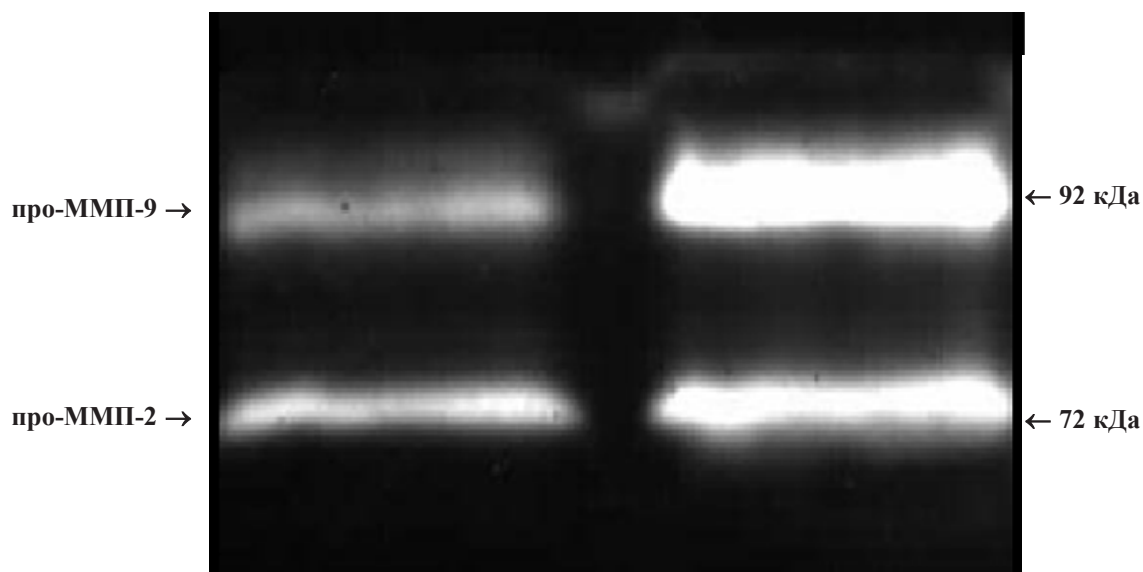


Рисунок 1.

Зимограмма ММП-2 и ММП-9 плазмы костного мозга больных ОМЛ.

Исследованные образцы плазмы КМ различались по активности ММП-2 и ММП-9, что выражалось в размере зон активности ферментов на зимограммах. Величина ММП-2/ММП-9 варьировала в пределах от 0,42 до 5,50. На основании этого показателя обследованные больные были разделены на две группы.

Первую группу составили 40 больных ОМЛ (75%), в число которых вошло подавляющее большинство больных в ПР (91%), а также половина больных вне ПР (50%). Активность ММП-2 и ММП-9 в плазме КМ больных первой группы, как правило, была примерно сходной, а величина ММП-2/ММП-9 близка или равна единице, составляя в среднем $0,91 \pm 0,06$ (рис. 2 – I). Максимальная величина ММП-2/ММП-9 была равна 1,77. У 27 из 40 представленных больных была оценена ОВ, медиана которой составила 33,5 месяцев.

Во вторую группу вошли 13 больных ОМЛ (25%) у которых величина ММП-2/ММП-9 была повышенной. Её значения более чем в 3 раза превышали этот показатель у больных первой группы, составляя в среднем $3,41 \pm 0,34$; $p < 0,001$ (рис. 2 – II). Минимальное значение величины ММП-2/ММП-9 в данном случае было равно 1,80. В эту группу вошли 3 больных в ПР (9%), и 10 больных вне ПР (50%). У одного из 3-х больных в ПР через 2 месяца после увеличения ММП-2/ММП-9 возник рецидив ОМЛ, у двух других повышенное значение ММП-2/ММП-9 имело место на фоне резидуальной болезни, определенной методом ПЦР.

По-видимому, высокочувствительный зимограммный анализ позволяет обнаружить резидуальные клетки по активности продуцируемых ими ММП-2 и ММП-9 задолго до интенсивной пролиферации опухолевого клона, приводящей к прогрессии заболевания.

На основании полученных данных, повышенную величину ММП-2/ММП-9 ($\geq 1,8$) следует рассматривать как критерий прогноза рецидива ОМЛ и “маркер” резидуальной болезни. Однако, для окончательного заключения об ассоциации величины ММП-2/ММП-9 с риском прогрессии ОМЛ необходимо накопление новых данных.

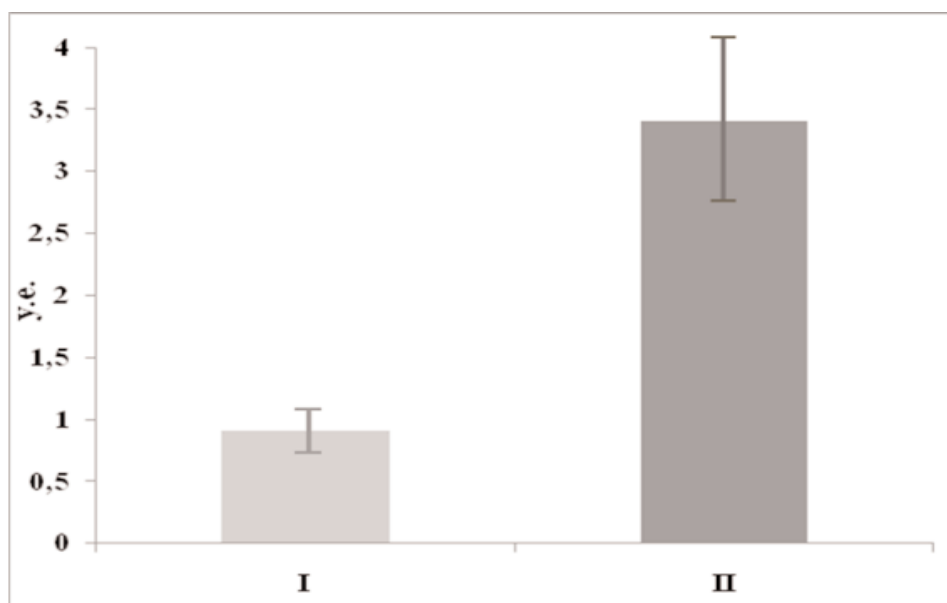


Рисунок 2.

Величина ММП-2/ММП-9 у больных ОМЛ I и II группы ($p < 0,001$).

У всех 10 больных вне ПР с повышенной величиной ММП-2/ММП-9, была верифицирована резистентная форма ОМЛ. Медиана ОВ этих больных была значительно меньше по сравнению с остальными больными ОМЛ ($p < 0,001$) и составила всего 7 месяцев. Среди больных вне ПР величина ММП-2/ММП-9 была существенно выше в случае резистентности к ХТ, чем при её отсутствии ($p < 0,001$) (рис. 3). Возможно, что повышенная величина ММП-2/ММП-9 ($\geq 1,80$) является “маркером” клона клеток, резистентного к ХТ. Однако, данное предположение нуждается в дополнительном подтверждении.

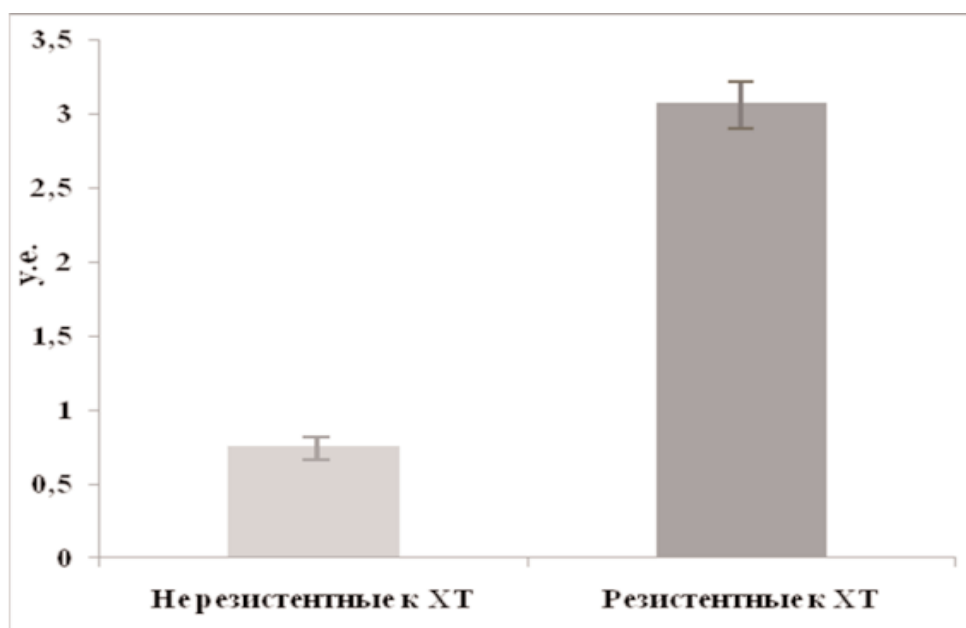


Рисунок 3.

Величина ММП-2/ММП-9 у больных ОМЛ с избытком бластов в костном мозге в зависимости от ответа на терапию ($p < 0,001$).

АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ПЛАЗМЕ КМ ПРИ ОМЛ

Ранее сообщалось о высокой активности ММП-2 в кондиционных средах мононуклеаров КМ больных ОМЛ резистентных к ХТ. Эти особенности клеток сочетались с их высокой инвазивностью [12]. Кроме того, была установлена связь между количеством ММП-2 в сыворотке крови больных ОМЛ и спленомегалией [13].

Следует отметить, что спленомегалия наблюдалась лишь у двух из 53 больных ОМЛ, обследованных в представленной работе, причём оба пациента принадлежали к числу тех, у которых активность ММП-2 значительно превышала активность ММП-9, а величина отношения ММП-2/ММП-9 была выше 1,80.

Не было выявлено корреляции величины ММП-2/ММП-9 с такими клинико-гематологическими показателями, как возраст больных и количество бластов в периферической крови и КМ.

В целом выводы, сделанные на основании анализа величины ММП-2/ММП-9, согласуются с литературными данными исследования экспрессии желатиназ в том, что высокие уровни экспрессии ММП-2 ассоциированы с плохим прогнозом и более короткой выживаемостью больных ОМЛ. В частности, Ries С. и соавторы наблюдали бластный криз у 2-х больных ХМЛ, а также прогрессию МДС у 3-х больных, мононуклеары которых продуцировали ММП-2 [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что величина ММП-2/ММП-9 может быть потенциальным показателем, ассоциированным с неблагоприятным течением ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганусевич И.И. (2010) Онкол., **12**, 10-22.
2. Ганусевич И.И. (2010) Онкол., **12**, 108-117.
3. Лесниченко И.Ф., Грицаев С.В., Капустин С.И. (2011) Вопр. онкол., **57**, 286-294.
4. Gaidamaka N.V., Parovichnicova E.N., Zavalishina L.E., Savchenko V.G., Frank G.A. (2009) Ther. Arch., **81**, 91-96.
5. Klein G., Vellenga E., Fraaije M.W., Kamps W.A., de Bont E.S. (2004) Oncol. Hematol., **50**, 87-100.
6. Iijima T., Minami Y., Nakamura N., Onizuka M., Morishita Y., Inadome Y., Noguchi M. (2004) Pathol. Intern., **54**, 295-301.
7. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. (2008) Blood, **114**, 937-951.
8. Cheson B.D., Bennett J.M., Kopecsky K.J. et al. (2003) J. Clin. Oncol., **21**, 4642-4649.
9. Heussen C., Dowdle E. (1980) Anal. Biochem., **102**, 196-202.
10. Ries C., Loher F., Zang C. et al. (1999) Clin. Cancer Res., **5**, 1115-1124.
11. Travaglino E., Benatti C., Malcovati L., Porta M.G.D., Galli A., Bonetti E., Rosti V., Cazzolla M., Invernizzi R. (2008) Eur. J. Haematol., **80**, 216-226.
12. Song J.H., Kim S.H., Cho D., Lee B-K., Kim H-J., Kim T. (2009) Int. J. Cancer, **125**, 1074-1081.
13. Aref S., Osman E., Mansy S., Omer N., Azmy E., Goda T., El-Sherbiny M. (2007) Hematol. Oncol., **25**(3), 121-126.

Поступила: 11. 07. 2012.

ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES MMP-2 AND MMP-9 IN BONE MARROW PLASMA OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

I.F. Lesnichenko, S.V. Gritsaev, A.N. Sergeev, I.I. Kostroma, S.A. Tiranova

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of FMBA, 2-nd Sovetskaya ul., 16,
St-Petersburg, 191024 Russia; tel.: (812)274-56-50; fax: (812) 717-25-50;
e-mail: Lubo@hotmail.com; RNIHT@mail.ru

Prognostic significance of the ratio of MMP-2 and MMP-9 activities (MMP-2/MMP-9) have been investigated in bone marrow plasma (BMP) of 53 patients with acute myeloid leukemia (AML) using the method of zymography. During BMP collection 33 patients were diagnosed with complete remission (CR) and 22 patients without CR. The ratio MMP-2/MMP-9 was approximately 1.00 (the upper limit was equal 1.77) in the 75% of patients. At the same time the ratio was more than 3 times higher in 13 patients (25%); their minimal value was 1.80 ($p < 0.001$). In the group with high ratio MMP-2/MMP-9 only 3 patients were with CR, and 10 patients with resistant variant of AML. The median of the overall survival (OS) of these 10 patients was significantly lower than OS of other investigated AML patients (7.0 vs 33.5 months $p < 0.001$). Thus the high MMP-2/MMP-9 ratio (≥ 1.8) may be associated with unfavorable course of AML.

Key words: matrix metalloproteinases, acute myeloid leukemia, bone marrow plasma.