

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Спектр про- и антифибротических факторов в сыворотке у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями

Pro- and Antifibrotic Factors in the Serum of Patients with Chronic Myeloproliferative Disorders

А.А. Силютин, Н.М. Матюхина, Е.Г. Лисина,
В.И. Хван, С.Н. Лелеко, Н.Т. Сиordia, О.В. Сироткина,
П.А. Бутылин

AA Silyutina, NM Matyukhina, EG Lisina, VI Khvan,
SN Leleko, NT Siordiya, OV Sirotkina, PA Butylin

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность. Изучение спектра про- и антифибротических факторов в сыворотке у пациентов с Ph-негативными хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ) позволит лучше понять механизмы развития миелофиброза, а также выявить новые маркеры, имеющие дифференциально-диагностическое значение.

Background. The study of pro- and antifibrotic factors in the serum of patients with Ph-negative chronic myeloproliferative disorders (CMPDs) will allow to understand better the mechanisms of myelofibrosis development, as well as to identify new diagnostic markers.

Цель. Оценить уровень классических (TGF- β , bFGF, MMP-2, -9, -13 и VEGF) и новых провоспалительных (галектин-3) факторов в сыворотке, участвующих в развитии миелофиброза при различных нозологических Ph-негативных формах ХМПЗ, с учетом выявленных генетических нарушений.

Aim. To assess the correlation between the levels of classic (TGF- β , bFGF, MMP-2, -9, -13 and VEGF) and new proinflammatory serum factors (galectin-3), involved into development of myelofibrosis in different Ph-negative forms of CMPDs and genetic abnormalities.

Материалы и методы. В исследование включено 55 пациентов с ХМПЗ (13 — с истинной полицитемией, 17 — с эссенциальной тромбоцитемией, 25 — с первичным миелофиброзом) и 8 здоровых доноров. Для определения мутаций *JAK2V617F*, *CALR* (делеции и инсерции), *MPLW515L*, *MPLW515K* использовали геномную ДНК, выделенную из цельной крови. С целью определить уровень про- и антифибротических факторов в сыворотке был проведен иммуноферментный анализ галектина-3, TGF- β , bFGF, VEGF, MMP-2, MMP-9 и MMP-13 с иммобилизованными антителами.

Materials & Methods. The research included 55 CMPD patients (13 with polycythemia vera, 17 with essential thrombocythemia, 25 with primary myelofibrosis) and 8 healthy controls. Whole blood genomic DNA extraction was used to evaluate mutations *JAK2V617F*, *CALR* (deletions and insertions), *MPLW515L*, and *MPLW515K*. Antibody-immobilized ELISA was used to evaluate the levels of galectin-3, TGF- β , bFGF, VEGF, MMP-2, MMP-9 and MMP-13.

Результаты. Показаны изменения уровней MMP-9, VEGF, TGF- β и галектина-3 в сыворотке у пациентов с различными ХМПЗ. Отмечена тенденция к снижению уровня MMP-9 в сыворотке пациентов с мутациями в гене *CALR*.

Results. The analysis showed the differences in serum MMP-9, VEGF, TGF- β and galectin-3 levels in patients with different CMPDs. A tendency towards the decrease of serum MMP-9 levels in patients with *CALR* mutations was shown.

Заключение. Обнаруженные различия в группах пациентов с различными нозологическими формами ХМПЗ могут послужить основой для усовершенствования диагностических протоколов в спорных в дифференциально-диагностическом отношении клинических ситуациях при ХМПЗ.

Conclusion. The shown differences between patients with different CMPDs may serve as a basis for improving diagnostic protocols in challenging differential diagnosis of CMPDs.

Ключевые слова: Ph-негативные хронические миелопролиферативные заболевания, про- и антифибротические факторы, *JAK2V617F*, *CALR*, *MPLW515L*, *MPLW515K*, MMP-2, -9, -13, галектин-3.

Keywords: Ph-negative chronic myeloproliferative disorders, pro- and antifibrotic factors, *JAK2V617F*, *CALR*, *MPLW515L*, *MPLW515K*, MMP-2, -9, -13, galectin-3.

Получено: 26 апреля 2017 г.

Принято в печать: 5 июля 2017 г.

Для переписки: Павел Андреевич Бутылин, канд. биол. наук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: butylinp@gmail.com

Для цитирования: Силютина А.А., Матюхина Н.М., Лисина Е.Г. и др. Спектр про- и антифибротических факторов в сыворотке у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Клиническая онкогематология. 2017;10(4):479–84.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-479-484

Received: April 26, 2017

Accepted: July 5, 2017

For correspondence: Pavel Andreevich Butylin, PhD, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: butylinp@gmail.com

For citation: Silyutina AA, Matyukhina NM, Lisina EG, et al. Pro- and Antifibrotic Factors in the Serum of Patients with Chronic Myeloproliferative Disorders. Clinical oncohematology. 2017;10(4):479–84 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-479-484

ВВЕДЕНИЕ

К Ph-негативным хроническим миелопролиферативным заболеваниям (ХМПЗ) относятся истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Ведущим в патогенезе данной группы заболеваний является активация сигнального пути JAK-STAT в результате приобретенных генетических нарушений. Это приводит к цитокин-независимому проведению сигнала от клеточных рецепторов и усилению пролиферации клеток миелопоэза. Наиболее частыми генетическими нарушениями при Ph-негативных ХМПЗ являются мутации в гене *JAK2*. Это точечная мутация в экзоне 14, приводящая к замене валина на фенилаланин в положении 617 полипептидной цепи (*JAK2V617F*), и многочисленные точечные мутации в экзоне 12 [1]. На втором месте по частоте открытые в 2013 г. мутации в гене кальретикулина (*CALR*) — делеции и инсерции [2, 3]. Третье место занимают мутации тромбопоэтинового рецептора *MPLW515L* и *MPLW515K* [4]. Все эти нарушения, так или иначе, приводят к лиганд-независимому проведению сигнала рецепторов эритропоэтина, тромбопоэтина и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [5].

В этой группе заболеваний ПМФ характеризуется как самый неблагоприятный по течению и прогнозу. При этом в исходе ИП и ЭТ также может развиваться вторичный миелофиброз, что существенно уменьшает продолжительность жизни и ухудшает состояние пациентов [6, 7]. Причины формирования миелофиброза активно исследуются, но все еще не до конца понятны.

Миелофиброз — цитокин-опосредованный процесс, возникающий в результате клонального злокачественного перерождения в мультипотентной гемопоэтической стволовой клетке [8, 9], и характеризуется усилением продукции белков внеклеточного матрикса [10]. Это состояние сопровождается коллагеновым фиброзом костного мозга, остеосклерозом и избыточным ангиогенезом [11, 12]. Стромальные клетки костного мозга реагируют повышением фиброгенной активности в ответ на воздействие ростовых факторов, таких как трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста фибробластов (bFGF) и эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) [13–15]. Кроме того, при любом фиброзе неизбежны нарушения в системе матриксных металлопротеиназ (ММП) и тканевых ингибиторов металлопротеиназ [16].

На данный момент не существует специфических маркеров развития этого состояния. Диагностика осуществляется путем установления признаков миелофиброза в трепанобиоптате костного мозга. Стерильная пункция и трепанобиопсия считаются инвазивными методами, которые требуют наличия специального оборудования и высококвалифицированного персонала, а также подготовки пациента. Кроме того, коллагеновый фиброз костного мозга затрудняет взятие аспирата для подсчета миелограммы, что создает сложности при необходимости быстрого установления диагноза. Это обуславливает поиск новых маркеров, характерных для данного заболевания, проанализировать которые можно в образце периферической крови.

Кроме морфологических критериев в последнее время получили распространение молекулярно-биологические. До сих пор остается открытым вопрос, существуют ли различия в спектре про- и антифибротических факторов у пациентов с различными молекулярными поломками.

Цель данной работы — оценить уровень классических (TGF- β , bFGF, ММП, VEGF) и новых перспективных (галектин-3) факторов, участвующих в развитии миелофиброза, при различных нозологических формах ХМПЗ с учетом выявленных генетических нарушений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика пациентов

Образцами для исследования служили цельная кровь (генетические исследования) и сыворотка (иммуноферментный анализ) от 55 пациентов с ХМПЗ (13 — ИП, 17 — ЭТ, 25 — ПМФ) и 8 здоровых доноров. Для генетических исследований кровь брали в пробирки с K_3 ЭДТА (КИМА, Италия), а для иммуноферментного анализа — в пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем (КИМА, Италия). Венозную кровь набирали из локтевой вены натощак. Все обследуемые пациенты имели диагноз, подтвержденный в соответствии с критериями ВОЗ.

Определение мутационного статуса

ДНК для исследований выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Великобритания). Наличие мутаций *JAK2V617F*, *MPLW515K* и

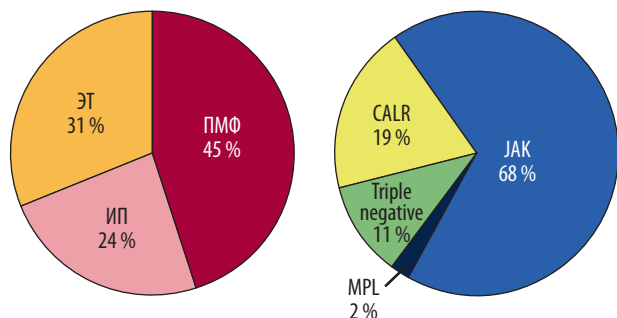


Рис. 1. Распределение пациентов с ХМПЗ в соответствии с нозологическими формами и мутационным статусом

CALR — пациенты, у которых обнаружены мутации в гене кальретикулина; JAK2 — пациенты, у которых обнаружена мутация JAK2V617F; MPL — пациенты, у которых обнаружена мутация в гене тромбопоэтинового рецептора; TN (тройной негативный статус) — пациенты с установленным диагнозом ХМПЗ, которым был проведен анализ на мутации JAK2V617F, MPLW515K, MPLW515L и мутации в гене CALR и ни одна из них не обнаружена; ИП — истинная полицитемия; ПМФ — первичный миелофиброз; ХМПЗ — хронические миелопролиферативные заболевания; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Fig. 1. CMPPD patients according to nosologic forms and mutation status

CALR — calreticulin gene mutations; JAK2 — JAK2V617F mutations; MPL — mutations in thrombopoietin receptor gene; TN (triple negative) — none of the following mutations is found: JAK2V617F, MPLW515K, MPLW515L and/or CALR mutations; ИП — polycythemia vera; ПМФ — primary myelofibrosis; ХМПЗ — chronic myeloproliferative disorders; ЭТ — essential thrombocythemia.

MPLW515L определяли методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (наборы «Гено-технология», Москва), мутации в экзоне 9 гена CALR — методом секвенирования по Сэнджеру.

Определение про- и антифибротических факторов в сыворотке

Уровень галектина-3, TGF- β , bFGF, VEGF, MMP-2, MMP-9 и MMP-13 в сыворотке определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа (DuoSet ELISA kit R&D Systems, США, для TGF- β , bFGF, VEGF, MMP-2, MMP-9; Galektin-3Quantikine ELISA Kit для галектина-3; Human Pro-MMP-13 Quantikine ELISA Kit для MMP-13).

Статистический анализ

Для статистического анализа использовался пакет программ SPSS for Windows 16.0, для построения графиков и создания базы данных — Microsoft Excel 2010. Сравнение всех исследуемых групп выполнялось с использованием непараметрического критерия Краскала—Уоллиса. Парное сравнение проводилось с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Данные представлены в виде медианы. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование включено 54 пациента с ХМПЗ (24 мужчины, 30 женщин; средний возраст $59,37 \pm 12,38$ года) и 8 здоровых доноров (4 мужчины, 4 женщины; средний возраст $31,43 \pm 13,24$ года) (рис. 1).

Уровень матричных металлопротеиназ в сыворотке при ХМПЗ

Статистически значимых различий уровня MMP-13 в сыворотке у пациентов с ХМПЗ и здоровых доноров не обнаружено, хотя медиана этого параметра у больных ХМПЗ была ниже, чем у здоровых доноров ($p = 0,807$). Статистически значимых различий в уровне MMP-2 также не обнаружено ($p = 0,403$). При попарном сравнении в сыворотке у пациентов с ПМФ наблюдалось значимое снижение содержания MMP-9 по сравнению со здоровыми донорами ($p = 0,0005$) и группами с ИП ($p = 0,001$) и ЭТ ($p = 0,009$). У всех больных ХМПЗ отмечалось снижение содержания MMP-9 по сравнению со здоровыми донорами ($p = 0,019$) (рис. 2).

У пациентов, имеющих мутации в гене CALR, наблюдалась тенденция к снижению содержания MMP-9 по сравнению с JAK2-положительными больными ($p = 0,053$) и с тройным негативным (triple negative — TN) статусом ($p = 0,055$). Статистически значимых различий в уровне MMP-2 ($p = 0,990$) и MMP-13 ($p = 0,374$) не обнаружено (рис. 3).

Уровень ростовых факторов в сыворотке при ХМПЗ

Уровень bFGF был значительно выше у всех пациентов с ХМПЗ по сравнению со здоровыми донорами, однако эти различия нельзя считать статистически значимыми из-за большой вариабельности результатов в пределах групп ($p = 0,336$). У пациентов с ИП и ЭТ наблюдалось значимое повышение VEGF в сыворотке по сравнению со здоровыми донорами ($p = 0,013$ и $p = 0,004$ соответственно). В сыворотке пациентов с ПМФ был обнаружен еще более высокий уровень VEGF, однако из-за большой вариабельности результатов у этих пациентов статистически значимых различий по сравнению с другими группами не выявлено ($p = 0,111$).

При попарном сравнении при ЭТ было показано более высокое содержание TGF- β в сыворотке по сравнению с пациентами с ПМФ ($p = 0,007$) (рис. 4).

При сравнении JAK2/CALR-положительных и TN-групп пациентов статистически значимых изменений в уровне VEGF ($p = 0,538$), bFGF ($p = 0,612$) и TGF- β ($p = 0,942$) не отмечено.

Уровень галектина-3 в сыворотке при ХМПЗ

Отмечено статистически значимое снижение уровня галектина-3 в сыворотке пациентов с ЭТ по сравнению со здоровыми донорами ($p = 0,018$), пациентами с ИП ($p = 0,029$) и ПМФ ($p = 0,006$) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение уровня MMP в сыворотке согласуется с представлением об этих ферментах как об антифибротических агентах. В ранее опубликованных работах изменения уровня сывороточных металлопротеиназ не отмечались [17] либо изменения были незначимыми [18], что, возможно, связано с небольшим объемом выборки. Снижение уровня сывороточной MMP-9 у всех пациентов с ХМПЗ по сравнению со здоровыми донорами и у пациентов с ПМФ и ЭТ по сравнению с ИП и здоровыми донорами может свидетельствовать

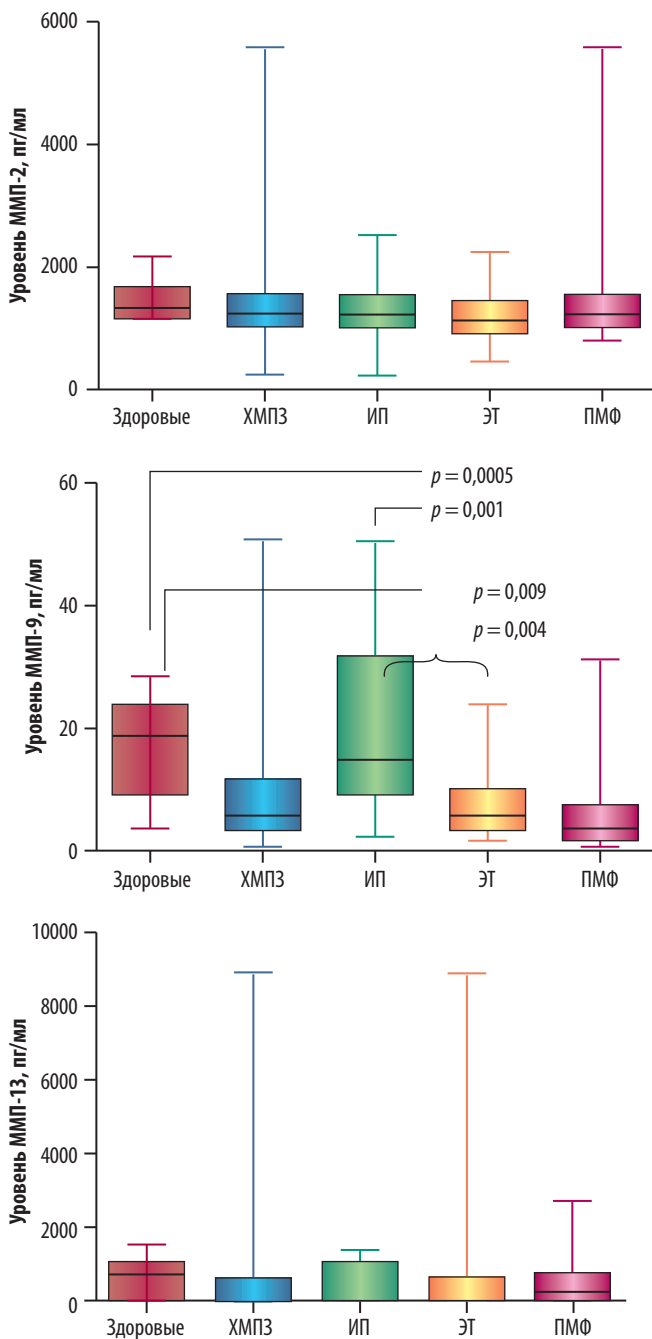


Рис. 2. Уровень металлопротеиназ в сыворотке пациентов с различными нозологическими формами ХМПЗ
 ИП — истинная полицитемия; ММП — металлопротеиназы; ПМФ — первичный миелофиброз; ХМПЗ — хронические миело-пролиферативные заболевания; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Fig. 2. Serum levels of metalloproteinases in patients with different CMPDs

ИП — polycythemia vera; ММП — metalloproteinases; ПМФ — primary myelofibrosis; ХМПЗ — chronic myeloproliferative disorders; ЭТ — essential thrombocythemia.

об уменьшении эффективности деградации коллагена у данной категории больных. Обращает на себя внимание, что снижение ММП более выражено у пациентов с мутациями *CALR*, несмотря на то что для этих пациентов характерно благоприятное течение заболевания [19]. При этом известно, что 95 % пациентов с ИП поло-

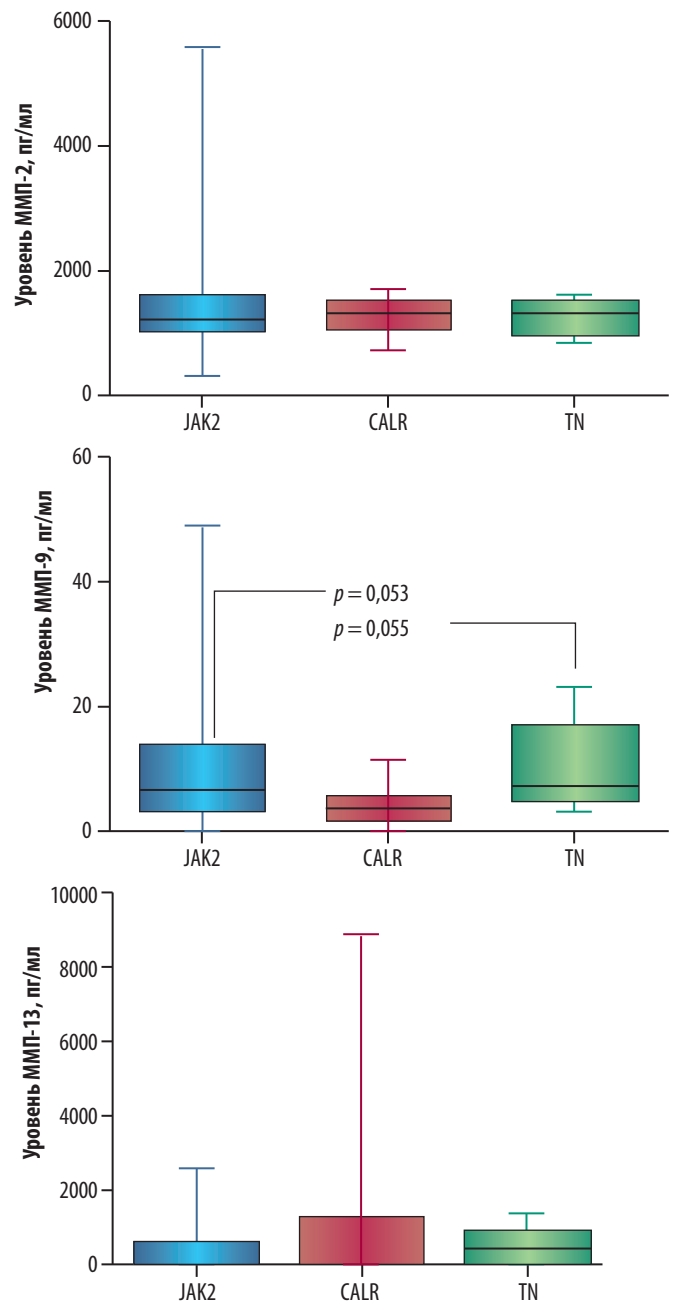


Рис. 3. Уровень металлопротеиназ в сыворотке пациентов с различными нозологическими формами ХМПЗ

JAK2 — пациенты, у которых обнаружена мутация *JAK2V617F*; CALR — пациенты, у которых обнаружены мутации в гене кальретикулина; TN (тройной негативный статус) — пациенты с установленным диагнозом ХМПЗ, которым был проведен анализ на мутации *JAK2V617F*, *MPLW515K*, *MPLW515L* и мутации в гене *CALR* и ни одна из них не обнаружена; ММП — металлопротеиназы; ХМПЗ — хронические миело-пролиферативные заболевания.

Fig. 3. Serum levels of metalloproteinases in patients with different CMPDs

JAK2 — *JAK2V617F* mutations; CALR — calreticulin gene mutations; TN (triple negative) — none of the following mutations is found: *JAK2V617F*, *MPLW515K*, *MPLW515L* and/or *CALR* mutations; ММП — metalloproteinases; ХМПЗ — chronic myeloproliferative disorders.

жительны по мутации *JAK2V617F*, остальные — имеют мутации в экзоне 12 *JAK2*. Среди больных ЭТ и ПМФ только 60 % *JAK*-позитивны. Поскольку именно эти пациенты составляют группу с мутациями в экзоне 9 кальретикулина, возможно, с этим и связано снижение ММП-9 в указанной категории больных.

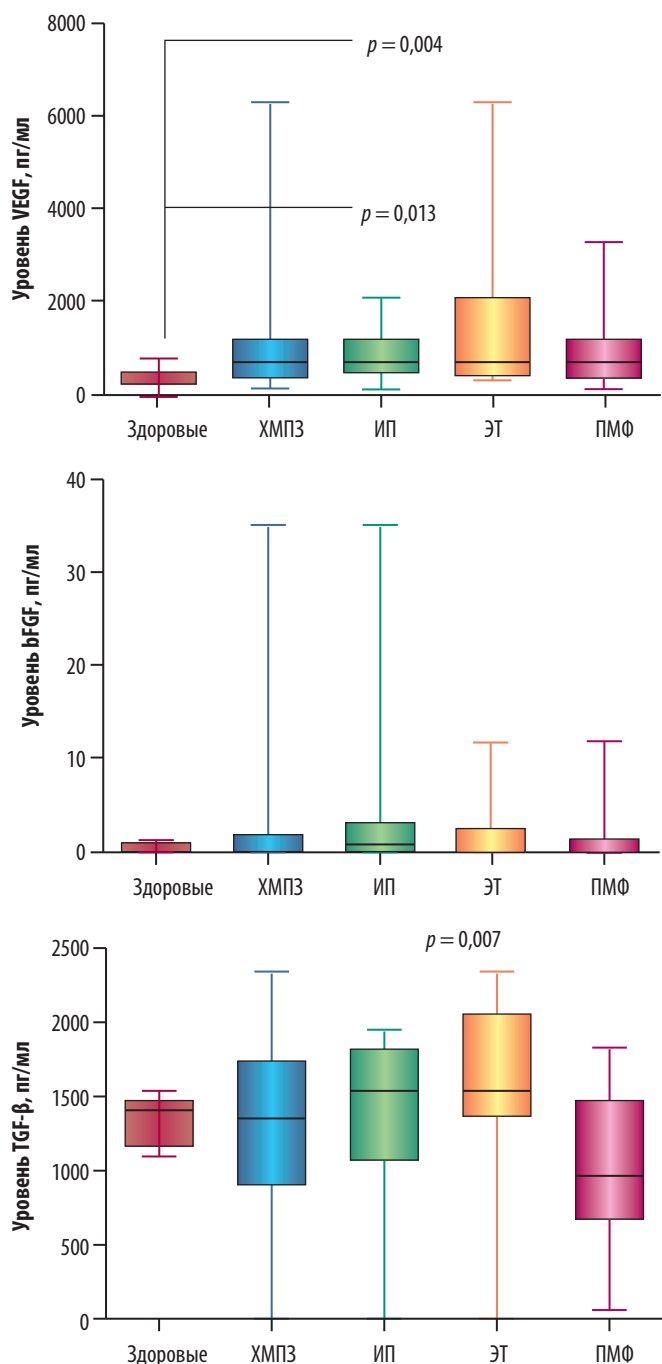


Рис. 4. Уровень ростовых факторов в сыворотке пациентов с различными нозологическими формами ХМПЗ
bFGF — фактор роста фибробластов; TGF-β — трансформирующий фактор роста β; VEGF — эндотелиальный фактор роста сосудов; ИП — истинная полицитемия; ПМФ — первичный миелофиброз; ХМПЗ — хронические миелопролиферативные заболевания; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Fig. 4. Serum levels of growth factors in patients with different CMPDs
bFGF — basic fibroblast growth factor; TGF-β — transforming growth factor beta; VEGF — vascular endothelial growth factor; ИП — polycythemia vera; ПМФ — primary myelofibrosis; ХМПЗ — chronic myeloproliferative disorders; ЭТ — essential thrombocythemia.

Повышение уровня VEGF в сыворотке больных ИП отражает склонность этой категории пациентов к усиленному ангиогенезу и также может указывать на повышенный выход ростовых факторов из диспластичных мегакариоцитов при ЭТ и ПМФ. Известно, что в костном мозге повышенная экспрессия VEGF

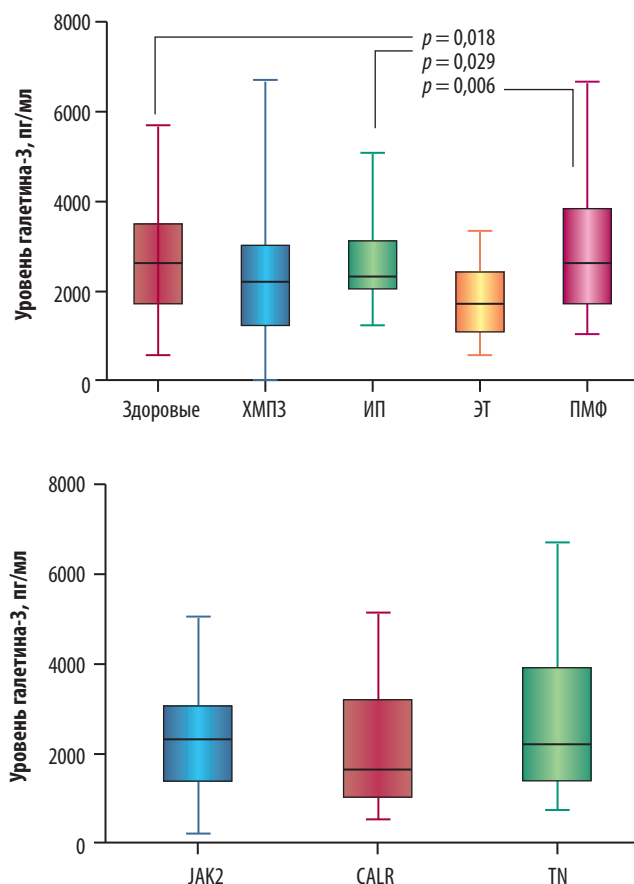


Рис. 5. Уровень галектина-3 в сыворотке пациентов с различными формами ХМПЗ и мутационным статусом
JAK2 — пациенты, у которых обнаружена мутация *JAK2V617F*; CALR — пациенты, у которых обнаружены мутации в гене кальретикулина; TN (тройной негативный статус) — пациенты с установленным диагнозом ХМПЗ, которым был проведен анализ на мутации *JAK2V617F*, *MPLW515K*, *MPLW515L* и мутации в гене CALR и ни одна из них не обнаружена; ИП — истинная полицитемия; ПМФ — первичный миелофиброз; ХМПЗ — хронические миелопролиферативные заболевания; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Fig. 5. Serum levels of galectin-3 level in patients with different CMPDs and mutation status
JAK2 — *JAK2V617F* mutations; CALR — calreticulin gene mutations; TN (triple negative) — none of the following mutations is found: *JAK2V617F*, *MPLW515K*, *MPLW515L* and/or CALR mutations; ИП — polycythemia vera; ПМФ — primary myelofibrosis; ХМПЗ — chronic myeloproliferative disorders; ЭТ — essential thrombocythemia.

наблюдается только на стадии гиперклеточности, но не на стадии фиброза [20]. Это объясняет низкий уровень VEGF в сыворотке больных ПМФ по сравнению с другими нозологическими формами ХМПЗ.

Повышение уровня TGF-β в сыворотке пациентов с ЭТ по сравнению с ПМФ, по-видимому, связано с увеличенным содержанием тромбоцитов, которые считаются главными продуцентами этого цитокина у данной категории больных [21, 22]. Это наблюдение подтверждает тезис о ведущей роли мегакариоцитов как продуцентов TGF-β, описанный ранее [23].

Пока не существует четких представлений о роли галектина-3 в фибротических изменениях. Однако существуют исследования, указывающие на то, что уровень галектина-3 повышается у мышей с фиброзом печени [24]. Кроме того, при гистологическом исследовании костного мозга мышей с нокаутом гена галектина-3 наблюдается снижение клеточности. При этом отсутствие

либо снижение экспрессии галектина-3 подавляет продукцию ГМ-КСФ стромальными клетками костного мозга, повышает число клеток-предшественниц в сочетании со снижением их способности дифференцироваться в зрелые миелоидные клетки [25]. В предыдущих исследованиях показано, что галектин-3 интенсивнее экспрессируется в костном мозге пациентов с ИП [26]. Мы отметили значимое снижение уровня сывороточного галектина-3 у пациентов с ЭТ по сравнению с другими группами больных и здоровыми донорами. Возможно, данный маркер можно будет адаптировать для дифференциальной диагностики ХМПЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные подтверждают, что уровень про- и антифибротических факторов в сыворотке пациентов с ХМПЗ существенно меняется, а также различается у больных с разными нозологическими формами. Так, показано снижение ММП-9 у пациентов с ЭТ и ПМФ относительно других групп больных и здоровых доноров, а галектина-3 — у пациентов с ЭТ. У всех пациентов с ХМПЗ повышен уровень VEGF в сыворотке по сравнению со здоровыми донорами. При этом у пациентов с разным мутационным статусом исследованные вещества остаются примерно на одном уровне. Эти знания могут существенно помочь в разработке диагностических протоколов и дифференциальной диагностике различных Ph-негативных форм ХМПЗ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было выполнено в рамках государственного задания «Расшифровка механизмов развития фиброза костного мозга и подходов к его реверсии».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.А. Силютин, П.А. Бутылин, О.В. Сироткина.

Сбор и обработка данных: Е.Г. Лисина, Н.Т. Сиordia, П.А. Бутылин, А.А. Силютин.

Предоставление материалов исследования: А.А. Силютин, Н.М. Матюхина, В.И. Хван, С.Н. Лелеко.

Анализ и интерпретация данных: А.А. Силютин, П.А. Бутылин.

Подготовка рукописи: А.А. Силютин, П.А. Бутылин.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kiladjan J-J. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2012;2012:561–6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.561.

2. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391–405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542.
3. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379–90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347.
4. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech*. 2011;4(3):311–7. doi: 10.1242/dmm.006817.
5. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385–95. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81167-8.
6. 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):437–8. doi: 10.1038/sj.leu.2404914.
7. Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology*. 2007;2007(1):346–54. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.346.
8. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978;51(2):189–94.
9. 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):1981–3. doi: 10.1182/blood-2002-07-2341.
10. Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. *Blood Rev*. 1997;11(4):233–42. doi: 10.1016/S0268-960X(97)90022-9.
11. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, et al. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000;96:3374–80.
12. Tefferi A. The pathogenesis of chronic myeloproliferative diseases. *Int J Hematol*. 2001;73(2):170–6. doi: 10.1007/BF02981934.
13. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002;100(10):3495–503. doi: 10.1182/blood-2002-04-1133.
14. 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):441–8. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.292671.x.
15. 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):226–31. doi: 10.1136/jcp.2010.083386.
16. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Mod Mech*. 2014;7(2):193–203. doi: 10.1242/dmm.012062.
17. Jensen MK, Holten-Andersen MN, Riisbro R, et al. Elevated plasma levels of TIMP-1 correlate with plasma suPAR/uPA in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol*. 2003;71(5):377–84. doi: 10.1034/j.1600-0609.2003.00096.x.
18. Wang JC, Novetsky A, Chen C, Novetsky AD. Plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with agnogenic myeloid metaplasia or idiopathic primary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2002;119(3):709–12. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03874.x.
19. 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, Unclassifiable. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(5):635–44. doi: 10.1309/AJCPUAAC16LIWZMM.
20. Gianelli U, Vener C, Raviele PR, et al. VEGF Expression Correlates With Microvessel Density in Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myeloproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(6):966–73. doi: 10.1309/FPON3LC8MBJUFFA6.
21. Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, et al. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*. 1996;88:4534–46.
22. Campanelli R, Rosti V, Villani L, et al. Evaluation of the bioactive and total transforming growth factor beta1 levels in primary myelofibrosis. *Cytokine*. 2011;53(1):100–6. doi: 10.1016/j.cyto.2010.07.427.
23. Силютин А.А., Гин И.И., Матюхина Н.М. и др. Модели миелофиброза (обзор литературы и собственные данные). *Клиническая онкогематология*. 2017;10(1):75–84. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-75-84. [Silyutina AA, Gin II, Matyukhina NM, et al. Myelofibrosis Models: Literature Review and Own Data. *Clinical oncohematology*. 2017;10(1):75–84. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-75-84. (In Russ)]
24. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(13):5060–5. doi: 10.1073/pnas.0511167103.
25. Brand C, Oliveira F, Takiya C, et al. The involvement of the spleen during chronic phase of *Schistosoma mansoni* infection in galectin-3-/- mice. *Histol Histopathol*. 2012;27(8):1109–20. doi: 10.14670/HH-27.1109.
26. Koopmans SM, Bot FJ, Schouten HC, et al. The involvement of Galectins in the modulation of the JAK/STAT pathway in myeloproliferative neoplasia. *Am J Blood Res*. 2012;2(2):119–27.