

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Сопоставление количества атипичных мегакариоцитов, экспрессирующих TGFβF1, со степенью фиброзных изменений стромы костного мозга и остеосклероза у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и различными стадиями первичного миелофиброза

Correlation of the Number of TGFβF1-Expressing Atypical Megakaryocytes with the Degree of Bone Marrow Stroma Fibrosis and Osteosclerosis in Patients with Essential Thrombocythemia and Different Stages of Primary Myelofibrosis

Д.И. Чеботарев, А.М. Ковригина, А.Л. Меликян

DI Chebotarev, AM Kovrigina, AL Melikyan

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность. Сходство морфологической картины в трепанобиоптатах костного мозга (КМ) на поздних стадиях клональной эволюции эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и при развитии посттромбоцитемического миелофиброза и первичного миелофиброза (ПМФ) обуславливает интерес к экспрессии факторов фиброгенеза атипичными мегакариоцитами (МКЦ).

Background. As morphological pattern of bone marrow (BM) biopsy samples at advanced stages of clonal evolution in essential thrombocythemia (ET) appears similar to that in the development of post-thrombocytopenic myelofibrosis and primary myelofibrosis (PMF), the expression of fibrogenesis factors by atypical megakaryocytes (MKC) acquires increased interest.

Цель. Изучение экспрессии атипичными МКЦ трансформирующего фактора роста TGFβF1. Сопоставление количества TGFβF1-позитивных МКЦ со степенью фиброза стромы КМ и изменениями трабекулярной кости у пациентов с ЭТ и различными стадиями ПМФ.

Aim. To study the expression of the transforming growth factor TGFβF1 by atypical MKC; to relate the number of TGFβF1-positive MKCs with the degree of BM stroma fibrosis and trabecular bone changes in patients with ET and different PMF stages.

Материалы и методы. На материале трепанобиоптатов КМ пациентов с ЭТ и ПМФ, полученных до начала циторедуктивной терапии, выполнено гистохимическое исследование с окраской по Гомори и трихром по Массону, а также иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b и TGFβF1. Степень миелофиброза и остеосклероза оценивалась полуколичественным методом в соответствии с рекомендациями Европейского консенсуса. При характеристике морфологии атипичных МКЦ проведена сравнительная оценка ядерно-цитоплазматического соотношения.

Materials & Methods. BM biopsy samples of ET and PMF patients, obtained before cytoreductive therapy, were subjected to histochemical study with Gomori stain and Masson trichrome as well as to CD42b and TGFβF1 antibody immunohistochemical assays. The degree of myelofibrosis and osteosclerosis was estimated by semi-quantitative method in accordance with the European Consensus guidelines. The morphological characteristics of atypical MKC included the comparative evaluation of nuclear-cytoplasmic ratio.

Результаты. Количество МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением было статистически значимо выше в трепанобиоптатах КМ пациентов с префиброзной/ранней стадией ПМФ (пре-ПМФ) и фиброзной стадией ПМФ (ф-ПМФ) по сравнению с трепанобиоптатами КМ пациентов с ЭТ. При анализе экспрессии TGFβF1 обнаружено различие в количестве положительных МКЦ между исследуемыми группами. При сопоставлении количества TGFβF1-позитивных МКЦ со степенью миелофиброза и остеосклероза безотносительно к нозологическим единицам выявлена статистически значимая умеренная корреляция этих признаков ($r = 0,431, p = 0,001$ и $r = 0,499, p = 0,001$ соответственно). При использовании

Results. The number of MKCs with high nuclear-cytoplasmic ratio was significantly higher in BM biopsy samples of patients with pre-fibrosis/early PMF (pre-PMF) stage and fibrosis stage of PMF (f-PMF) compared with BM biopsy samples of ET patients. The analysis of TGFβF1 expression showed different numbers of positive MKCs in the study groups. The matching of the number of TGFβF1-positive MKCs with the degree of myelofibrosis and osteosclerosis, with no regard to nosologic entities, revealed significant moderate correlation between these features ($r = 0.431, p = 0.001$ and $r = 0.499, p = 0.001$, respectively). In 55 % of pre-PMF patients' BM biopsy samples, histochemical study with Masson trichrome stain visualized minimal immature osteoid deposits on bone trabeculae. Similar changes were also identified in f-PMF patients' BM biopsy samples, whereas the ET patients' samples featured none of them.

гистохимической окраски трихром по Массону в 55 % трепанобиоптатов КМ пациентов из группы пре-ПМФ на костных балках визуализировались минимальные депозиты незрелого остеоида. Подобные изменения также наблюдались в трепанобиоптатах КМ пациентов с ф-ПМФ и отсутствовали в группе пациентов с ЭТ.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют в пользу влияния патологического клона МКЦ с экспрессией TGFβF1 на процессы миелофиброза и остеосклероза, выраженность которых в трепанобиоптатах КМ связана с количеством экспрессирующих TGFβF1 атипичных МКЦ.

Ключевые слова: первичный миелофиброз, пре-фиброзная и фиброзная стадии, эссенциальная тромбоцитемия, остеосклероз, TGFβF1, патоморфология, иммуногистохимия.

Получено: 12 августа 2021 г.

Принято в печать: 30 ноября 2021 г.

Для переписки: Дмитрий Ильич Чеботарев, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(916)091-27-09; e-mail: chebadmitry@gmail.com

Для цитирования: Чеботарев Д.И., Ковригина А.М., Меликян А.Л. Сопоставление количества атипичных мегакариоцитов, экспрессирующих TGFβF1, со степенью фиброзных изменений стромы костного мозга и остеосклероза у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и различными стадиями первичного миелофиброза. Клиническая онкогематология. 2022;15(1):76–84.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-1-76-84

Conclusion. The results of the study prove that the pathological clone of MKC with TGFβF1 expression affects myelofibrosis and osteosclerosis processes whose manifestation in BM biopsy samples is associated with the number of TGFβF1-expressing atypical MKCs.

Keywords: primary myelofibrosis, pre-fibrosis and fibrosis stages, essential thrombocythemia, osteosclerosis, TGFβF1, pathomorphology, immunohistochemistry.

Received: August 12, 2021

Accepted: November 30, 2021

For correspondence: Dmitrii Ilich Chebotarev, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(916)091-27-09; e-mail: chebadmitry@gmail.com

For citation: Chebotarev DI, Kovrigina AM, Melikyan AL. Correlation of the Number of TGFβF1-Expressing Atypical Megakaryocytes with the Degree of Bone Marrow Stroma Fibrosis and Osteosclerosis in Patients with Essential Thrombocythemia and Different Stages of Primary Myelofibrosis. Clinical oncohematology. 2022;15(1):76–84. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-1-76-84

ВВЕДЕНИЕ

Патоморфологическая дифференциальная диагностика новой нозологии — префиброзной/ранней стадии первичного миелофиброза (пре-ПМФ) — и эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) вызывает значительные трудности [1]. На ранних стадиях миелолиферативного заболевания (МПЗ) это обусловлено клиническими проявлениями в виде изолированного тромбоцитоза, сходством морфологической картины пре-ПМФ и ЭТ. На поздних стадиях, при развитии миелофиброза и выраженных остеосклеротических изменений, единственным критерием, позволяющим достоверно высказаться о нозологической принадлежности, является анамнез и установленный патоморфологический диагноз в дебюте заболевания. Сходство морфологической картины на ранних и поздних этапах клональной эволюции МПЗ вызывает интерес к изучению экспрессии факторов фиброгенеза при ЭТ и на разных стадиях ПМФ. Особый интерес представляет возможность иммуногистохимической (ИГХ) визуализации патологического клона мегакариоцитов (МКЦ) при соотношении со степенью фиброза стромы и трабекулярной костью в трепанобиоптатах костного мозга (КМ). Среди цитокинов, обеспечивающих взаимодействие клональных МКЦ и стромы, следует выделить тромбопоэтин, трансформирующий фактор роста TGFβF1, тромбоцитарный фактор

роста (PDGF) и фактор роста фибробластов (FGF). Корреляция в развитии миелофиброза для FGF и PDGF не установлена, поскольку случаи ЭТ и ПМФ в равной степени демонстрируют повышение концентрации данных цитокинов [2].

В 1991–1992 гг. в первых работах М. Martyre и Т. Buhr было высказано предположение о влиянии пролиферирующих атипичных МКЦ на формирование фиброза стромы и сформулирована гипотеза о роли TGFβ в этом процессе [3, 4]. В настоящее время установлено, что TGFβF1 потенцирует синтез коллагена 1, 3 и 4-го типов, а также отложение фибронектина, протеогликанов и тенасцина, составляющих основу фиброзных изменений стромы при ПМФ. Кроме того, отмечается подавляющее влияние TGF на процессы резорбции костного матрикса [5–7]. В исследовании О. Vock и соавт. [6], проведенном в 2005 г. с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, было продемонстрировано повышение экспрессии мРНК TGFβ1 в части изученных случаев ПМФ с наибольшими показателями при фиброзной стадии ПМФ (ф-ПМФ). При рассмотрении авторами возможности визуализации транскрипта исследуемой мРНК ИГХ-методом положительная реакция с клоном антител к TGFβ1, в настоящее время снятым с производства, была получена в единичных МКЦ. В исследовании S. Jacquelin и соавт. [8], продолжающем изучение вклада пролиферирующих МКЦ в формирование миелофиброза, продемонстрирована способность МКЦ к продукции экстрацеллюлярного матрикса с обратным

дозозависимым эффектом воздействия TGFb *in vitro*. Таким образом, исследование возможности ИГХ-визуализации наличия и уровня экспрессии TGFβ1 мегакариоцитами с учетом особенностей их морфологии, степени фиброза стромы КМ и изменений трабекулярной кости у пациентов с разными стадиями ПМФ при сопоставлении с ЭТ представляет особый интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При ретроспективном анализе трепанобиоптатов КМ больных с Rh-негативными МПЗ, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ в 2014–2019 гг., были сформированы три группы пациентов с установленным клиническим и патоморфологическим диагнозом согласно критериям классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2017 г.: пре-ПМФ (20 трепанобиоптатов), ф-ПМФ (10 трепанобиоптатов) и ЭТ (20 трепанобиоптатов), а также контрольная группа доноров КМ (10 трепанобиоптатов). В исследование включен материал трепанобиоптатов КМ, полученных до проведения циторедуктивной терапии.

С целью визуализации волокон ретикулярной стромы КМ и волокон грубоволокнистой соединительной ткани использовались гистохимические реакции с импрегнацией солями серебра по Гомори и трихром по Массону. Степень миелофиброза и остеосклероза оценивалась полуколичественным методом по 4-балльной шкале (MF 0–3 и Grade 0–3 соответственно) в соответствии с рекомендациями Европейского консенсуса [9]. ИГХ-исследование проведено с использованием иммуноштейнера Leica Bond-Max. Характеристика изученных антител представлена в табл. 1.

ИГХ-исследование с антителами к CD42b служило дополнительным методом визуализации МКЦ с оценкой их иммуногистоархитектоники. При анализе морфологии МКЦ оценивалось ядерно-цитоплазматическое соотношение, учитывалось количество гигантских и безъядерных форм МКЦ.

При анализе литературных данных мы не обнаружили публикаций с использованием антител к TGFβF1 (клон TB21) при ИГХ-исследовании трепанобиоптатов КМ. Экспериментальным путем был определен внутренний положительный контроль: цитоплазматическая реакция в эритрокариоцитах, которая также наблюдалась в трепанобиоптатах КМ контрольной группы доноров. С учетом этого оценивалось относительное количество МКЦ с цитоплазматической реакцией, сопоставимой по интенсивности с реакцией в эритрокариоцитах.

Таблица 1. Характеристика антител, использованных при иммуногистохимическом исследовании

Антитело	Клон	Разведение, программа демаскировки	Производитель
CD42b	AB1	1:100, ER1	NeoMarkers (США)
TGFb	TB21	1:400, ER1	Abcam (Великобритания)

При указании относительного количества клеток для параметров, обладающих нормальным распределением, использовалось среднее значение \pm 95%-й доверительный интервал. Для параметров с распределением, отличным от нормального, указана медиана \pm 95%-й доверительный интервал. При проведении корреляционного анализа применялся метод Кендалла τ (tau).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-лабораторная и клинико-инструментальная характеристики исследуемых групп пациентов

В группу с пре-ПМФ включено 20 пациентов с медианой возраста 47,5 года (диапазон 32–81 год) и соотношением мужчин/женщин 1:2,3. У 15 (75 %) из 20 пациентов заболевание манифестировало в виде изолированного тромбоцитоза; у 5 (25 %) — отмечалось увеличение количества лейкоцитов без изменений лейкоцитарной формулы и связи с сопутствующими заболеваниями. Медиана размеров селезенки по данным УЗИ составляла 61,7 см² (диапазон 26,8–140,4 см²). У 10 (50 %) из 20 пациентов выявлена мутация в гене *CALR* (экзон 9), у 10 (50 %) — драйверной мутацией была *JAK2V617F*, медиана аллельной нагрузки которой составляла 15,8 % (диапазон 9–44 %).

В группу с ф-ПМФ включено 10 пациентов с медианой возраста 58,5 года (диапазон 40–69 лет) и соотношением мужчин/женщин 1:2,3. У 3 (30 %) из 10 пациентов заболевание манифестировало в виде изолированного тромбоцитоза; у 3 (30 %) — в дебюте заболевания было диагностировано кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода, что послужило основанием для обследования; у 4 (40 %) — заболевание манифестировало с конституциональных симптомов, обусловленных анемией. Размеры селезенки по данным УЗИ составляли 208,1 см². У 5 (50 %) из 10 пациентов драйверной была мутация в гене *CALR* (экзон 9), у 5 (50 %) — мутация *JAK2V617F*, медиана аллельной нагрузки которой составляла 33 % (диапазон 33–45 %).

В группу с ЭТ включено 20 пациентов с медианой возраста 35,5 года (диапазон 19–65 лет) и соотношением мужчин/женщин 1:9. Изменения клинического анализа крови демонстрировали изолированный тромбоцитоз в 17 (85 %) из 20 исследований. Медиана размеров селезенки по данным УЗИ составляла 38,1 см² (диапазон 24,0–88,6 см²). У 10 (50 %) из 20 пациентов драйверной была мутация в гене *CALR* (экзон 9), у остальных 10 (50 %) — обнаружена мутация *JAK2V617F*, медиана аллельной нагрузки которой составляла 10,4 % (диапазон 3–27 %).

Характеристика иммуногистоархитектоники и характера экспрессии TGFβF1 мегакариоцитами в трепанобиоптатах КМ исследуемых групп пациентов

При морфологическом исследовании в трепанобиоптатах КМ пациентов всех групп атипичные МКЦ составляли более 95 % клеток мегакариоцитарного

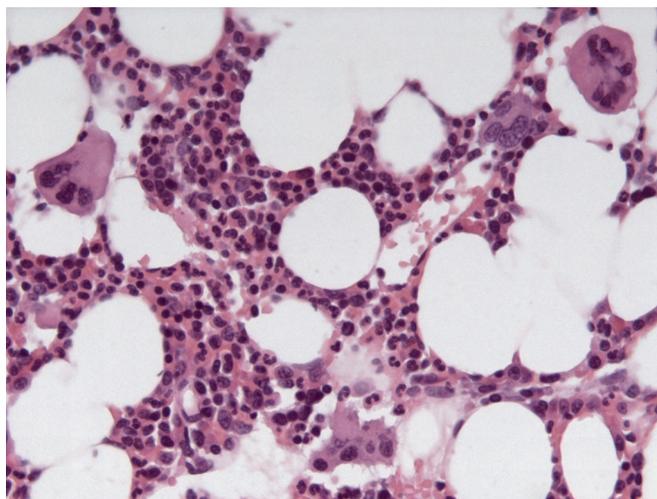


Рис. 1. Трепанобиоптат костного мозга пациента 35 лет с эссенциальной тромбоцитемией. Нормоклеточный костный мозг с наличием атипичных мегакариоцитов крупного и гигантского размеров с широкой зоной зрелой цитоплазмы, гиперсегментированными ядрами, мелкие сегменты которых соединены отчетливыми межъядерными перетяжками. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 1. Bone marrow biopsy sample of a 35-year-old patient with essential thrombocythemia. Normocellular bone marrow with atypical large and giant megakaryocytes with broad zone of mature cytoplasm and hypersegmented nuclei whose small segments are connected by distinct internuclear constrictions. H&E stain, $\times 400$

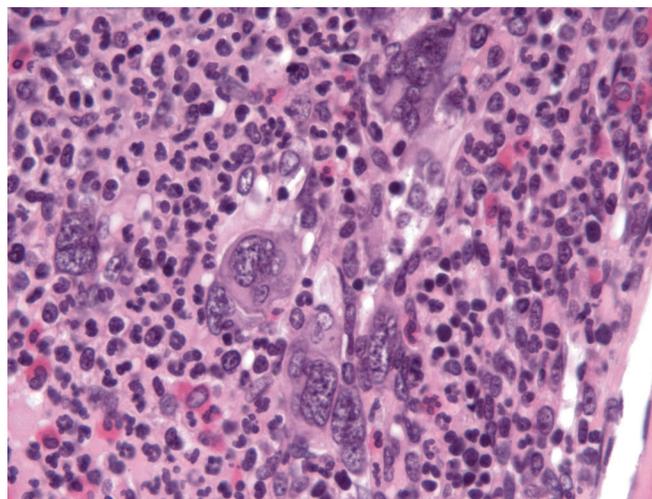


Рис. 2. Трепанобиоптат костного мозга пациента 31 года с префиброзной/ранней стадией первичного миелофиброза. Гиперклеточный костный мозг с наличием атипичных мегакариоцитов обычного и крупного размеров с узким ободком цитоплазмы, гиперсегментированными ядрами, крупные сегменты которых наслаиваются друг на друга, что обуславливает картину ложной гиполобулярности. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 2. Bone marrow biopsy sample of a 31-year-old patient with pre-fibrosis/early stage of primary myelofibrosis. Hypercellular bone marrow with atypical normal-sized and large megakaryocytes having narrow cytoplasm rim and hypersegmented nuclei whose large segments layer on top of each other, creating a picture of false hypolobularity. H&E stain, $\times 400$

ростка. При морфологической оценке МКЦ по параметру ядерно-цитоплазматического соотношения было выделено два варианта, сочетающихся во всех трепанобиоптатах:

1. МКЦ с обычным и низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, преимущественно крупного размера с гиперсегментацией нормохромных ядер, небольшим размером ядерных сегментов, соединенных межъядерными перетяжками (рис. 1);
2. МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, преимущественно обычного размера с гиперсегментацией и гиперхромией ядер, крупными гиперхромными сегментами ядер, наслаивающимися друг на друга, без отчетливых межъядерных перетяжек (рис. 2).

В трепанобиоптатах КМ пациентов с **пре-ПМФ** преобладали атипичные МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, которые составляли $69,0 \pm 3,4$ %. МКЦ с обычным и низким ядерно-цитоплазматическим соотношением и безъядерные формы встречались во всех трепанобиоптатах и составляли $23,3 \pm 2,3$ и $5,6 \pm 1,2$ % всех клеток мегакариоцитарного ростка соответственно. Гигантские формы МКЦ обнаружены в 9 (45 %) из 20 трепанобиоптатов, которые составляли $3,3 \pm 1,3$ %. В 15 (75 %) из 20 трепанобиоптатов атипичные МКЦ были расположены в паратрабекулярных областях; в 8 (40 %) — отмечалось формирование рыхлых кластеров МКЦ; в 1 (5 %) — наличие плотных кластеров МКЦ. В 5 (25 %) из 20 трепанобиоптатов визуализировались единичные атипичные МКЦ, расположенные в

просвете синусоидных капилляров. При проведении ИГХ-исследования с антителами к TGF β 1 в 9 (45 %) из 20 трепанобиоптатов часть МКЦ ($9,4 \pm 2,31$ %) демонстрировала цитоплазматическую экспрессию. Зависимости наличия и интенсивности экспрессии от расположения, размеров и признаков кластеризации МКЦ не отмечалось.

В трепанобиоптатах КМ пациентов с **ф-ПМФ** преобладали МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, которые составляли $75,5 \pm 2,5$ % всех клеток мегакариоцитарного ростка. Во всех трепанобиоптатах КМ присутствовали МКЦ с нормальным ядерно-цитоплазматическим соотношением и безъядерные формы. Они составляли $19,0 \pm 2,4$ и $3,4 \pm 0,9$ % соответственно. В 5 (50 %) из 10 трепанобиоптатов обнаруживались МКЦ гигантского размера, которые составляли $2,6 \pm 0,9$ %. Во всех трепанобиоптатах КМ отмечалось наличие рыхлых и плотных кластеров МКЦ, атипичные МКЦ обнаруживались в паратрабекулярных областях и в просвете синусоидных капилляров. При проведении ИГХ-исследования с антителами к TGF β 1 во всех трепанобиоптатах определялись МКЦ с интенсивной цитоплазматической реакцией ($23,5 \pm 5,96$ %) (по сравнению с эритроидным ростком). Отмечалась гетерогенность экспрессии TGF β 1 лишь частью МКЦ в составе одного кластера. Интенсивность цитоплазматической реакции была снижена по сравнению с эритроидным ростком в 6 (60 %) из 10 трепанобиоптатов, в 4 (40 %) — интенсивность реакции в МКЦ была сопоставима с эритроидным ростком.

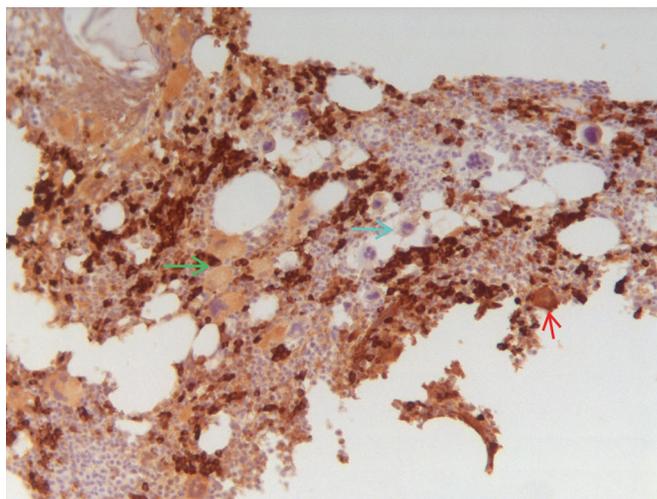


Рис. 3. Трепанобиоптат костного мозга пациента 34 лет с префиброзной/ранней стадией первичного миелофиброза. Реакция с применением антител к TGFβ1. Красной стрелкой указан мегакариоцит с интенсивной цитоплазматической реакцией; зеленой — мегакариоцит со слабой цитоплазматической реакцией; голубой — мегакариоцит с отрицательной реакцией. Иммуноферментный метод, ×200

Fig. 3. Bone marrow biopsy of a 34-year-old patient with pre-fibrosis/early stage of primary myelofibrosis. TGFβ1 antibody assay. Red arrow shows the megakaryocyte with intensive cytoplasmic reaction; green arrow indicates the megakaryocyte with weak cytoplasmic reaction; blue arrow shows the megakaryocyte with negative reaction. Immunoassay, ×200

В трепанобиоптатах КМ пациентов с ЭТ преобладали атипичные МКЦ с низким и обычным ядерно-цитоплазматическим соотношением, широкой зоной зрелой цитоплазмы, которые составляли $68,5 \pm 2,9$ %; безъядерные формы МКЦ — $5,8 \pm 1,0$ %. Атипичные МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением обнаруживались во всех трепанобиоптатах КМ этой группы и составляли $20,8 \pm 2,7$ %. В 13 (65 %) из 20 трепанобиоптатов присутствовали гигантские МКЦ

с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, которые составляли $7,8 \pm 1,8$ %. МКЦ были расположены преимущественно межтрабекулярно и вблизи синусоидных капилляров во всех трепанобиоптатах. В 4 (20 %) из 20 трепанобиоптатов единичные МКЦ обнаруживались в паратрабекулярных областях, в 8 (40 %) — увеличенное количество МКЦ обуславливало их тесное расположение с формированием отдельных групп. При проведении ИГХ-исследования с антителами к TGFβ1 в 7 (35 %) из 20 трепанобиоптатов реакция в МКЦ носит цитоплазматический характер (рис. 3). В каждом из этих трепанобиоптатов реакция была положительной лишь в части МКЦ ($1,65 \pm 1,38$ %), интенсивность реакции в них была снижена по сравнению с эритроидным ростком.

При сопоставлении доли МКЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением в трепанобиоптатах КМ исследуемых групп их количество было статистически значимо выше в группах пре-ПМФ и ПМФ по сравнению с ЭТ ($p < 0,001$) (табл. 2). При сопоставлении доли МКЦ с экспрессией TGFβ1 в трепанобиоптатах исследуемых групп получено статистически значимое различие между группами пре-ПМФ и ЭТ ($p = 0,046$) и между группами пре-ПМФ и ф-ПМФ ($p = 0,01$) (табл. 3).

Характеристика стромы КМ и трабекулярной кости в трепанобиоптатах КМ исследуемых групп пациентов

Для полуколичественной оценки степени фиброза стромы (MF) по 4-балльной шкале используется пороговое значение 30 % площади костномозговых полостей. В случае распространения изменений стромы, соответствующих большей степени миелофиброза на площади, превышающей пороговое значение, эта степень рассматривается как ведущая. Для учета случаев, в которых более высокая степень миелофиброза определяется, но занимает менее 30 % площади костномозговых полостей, используется обозначение MF-0/1, в котором на 1-м месте учитывается преоб-

Таблица 2. Сравнительная характеристика количества МКЦ с морфологическими вариантами атипии в трепанобиоптатах костного мозга исследуемых групп

Морфологическая особенность	ЭТ	пре-ПМФ	ф-ПМФ	<i>p</i>
Нормальное и низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение	$68,5 \pm 2,9$ %	$24,3 \pm 2,7$ %	$19,0 \pm 2,4$ %	$< 0,001$
Высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение	$20,8 \pm 2,7$ %	$69,0 \pm 3,4$ %	$75,5 \pm 2,6$ %	$< 0,001$
Безъядерные формы	$5,8 \pm 1,0$ %	$5,6 \pm 1,2$ %	$3,4 \pm 0,9$ %	0,862
Гигантские МКЦ (<i>n/N</i> трепанобиоптатов)	13/20 (65 %)	9/20 (45 %)	5/10 (50 %)	0,334
Рыхлые кластеры МКЦ (<i>n/N</i> трепанобиоптатов)	$7,8 \pm 1,8$ %	$3,3 \pm 1,3$ %	$2,6 \pm 0,9$ %	—
	8/20 (40 %)	9/20 (45 %)	10/10 (100 %)	—

МКЦ — мегакариоциты; ПМФ — первичный миелофиброз; пре-ПМФ — префиброзная/ранняя стадия ПМФ; ф-ПМФ — фиброзная стадия ПМФ; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Таблица 3. Сравнительная характеристика доли МКЦ с цитоплазматической экспрессией TGFβ1 в трепанобиоптатах костного мозга исследуемых групп

Нозологическая единица	Количество трепанобиоптатов КМ с наличием экспрессии TGFβ1 в МКЦ	Доля МКЦ с экспрессией TGFβ1	<i>p</i>
ЭТ	7/20 (35 %)	$1,65 \pm 1,38$ %	0,046
пре-ПМФ	9/20 (45 %)	$9,4 \pm 2,31$ %	0,010
ф-ПМФ	10/10 (100 %)	$23,5 \pm 5,96$ %	—

TGFβ1 — трансформирующий фактор роста; КМ — костный мозг; МКЦ — мегакариоциты; ПМФ — первичный миелофиброз; пре-ПМФ — префиброзная/ранняя стадия ПМФ; ф-ПМФ — фиброзная стадия ПМФ; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

Таблица 4. Сравнительная характеристика степени фиброза стромы в трепанобиоптатах костного мозга исследуемых групп

Нозологическая единица	MF-0	MF-0/1	MF-1/2	MF-2/3	MF-3
ЭТ	11/20 (55 %)	9/20 (45 %)	0	0	0
пре-ПМФ	2/20 (10 %)	15/20 (75 %)	3/20 (15 %)	0	0
ф-ПМФ	0	0	2/10 (20 %)	4/10 (40 %)	4/10 (40 %)

MF — степень миелофиброза; ПМФ — первичный миелофиброз; пре-ПМФ — префиброзная/ранняя стадия ПМФ; ф-ПМФ — фиброзная стадия ПМФ; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

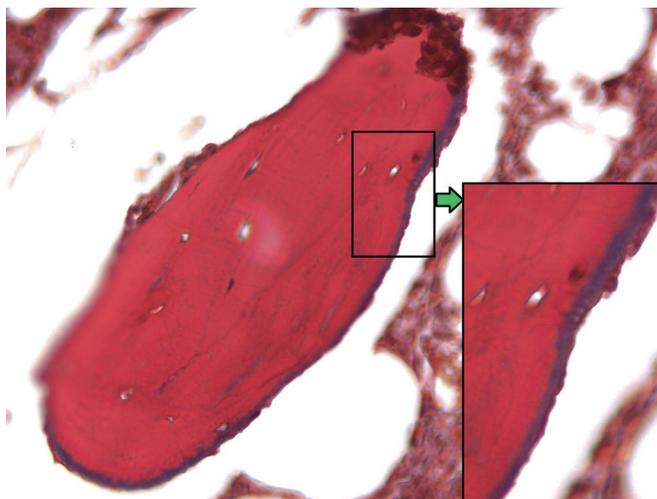


Рис. 4. Трепанобиоптат костного мозга пациента 61 года с префиброзной/ранней стадией первичного миелофиброза. На отдельных костных балках отмечается напластование незрелого остеоида (стрелка), не покрытого надкостницей, представленного окрашенной в синий цвет грубоволокнистой соединительной тканью в виде щеточной каемки. Окраска трихром по Массону, $\times 200$

Fig. 4. Bone marrow biopsy of a 61-year-old patient with pre-fibrosis/early stage of primary myelofibrosis. Some bone trabeculae feature immature osteoid layers (arrow), not covered with periosteum, visualized as blue-stained coarse fibrous connective tissue in the form of a brush border. Masson trichrome stain, $\times 200$

ладающая степень миелофиброза, на 2-м — более высокая степень, не превышающая порогового значения. Результаты анализа степени миелофиброза в трепанобиоптатах КМ исследуемых групп приведены в табл. 4.

При оценке степени остеосклероза гистохимический метод исследования с использованием окраски трихром по Массону позволил визуализировать незрелый остеоид в составе трабекулярной кости. Во всех трепанобиоптатах КМ из группы ЭТ на единичных костных балках отмечались очажки незрелого остеоида, покрытые активированной надкостницей, с ровной внешней границей. Сходные изменения наблюдались в 11 из 20 трепанобиоптатов КМ из группы пре-ПМФ.

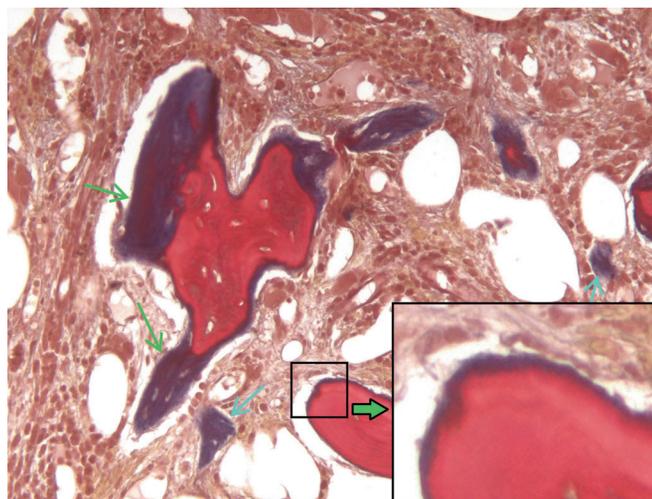


Рис. 5. Трепанобиоптат костного мозга пациента 67 лет с фиброзной стадией первичного миелофиброза. На костных балках отмечается напластование незрелого остеоида синего цвета, волокнистого вида (голубые стрелки) и созревающего остеоида с точками минерализации (вкрапления красного цвета в волокнистых массах синего цвета, зеленые стрелки). Присутствуют костные балки с наличием на поверхности незрелого остеоида по типу щеточной каемки, не покрытого надкостницей. Окраска трихром по Массону, $\times 100$

Fig. 5. Bone marrow biopsy of a 67-year-old patient with fibrosis stage of primary myelofibrosis. Bone trabeculae feature blue-colored immature osteoid fibrous layers (blue arrows) and maturing osteoid with points of mineralization (red spots in blue-colored fibrous mass, green arrows). Bone trabeculae with immature osteoid on the surface in the form of a brush border, not covered with periosteum. Masson trichrome stain, $\times 100$

В 9 (45 %) из 20 трепанобиоптатов из группы пре-ПМФ более чем на 30 % костных балок визуализировались фокусы напластования незрелого остеоида, не покрытые надкостницей, напоминающие щеточную каемку, отнесенные к степени остеосклероза Grade 1 (рис. 4). Подобные изменения трабекулярной кости также наблюдались в трепанобиоптатах КМ из группы ф-ПМФ в условиях остеосклеротических изменений различной степени выраженности (рис. 5). Объединенные данные по оценке остеосклероза трабекулярной кости представлены в табл. 5.

Таблица 5. Сравнительная характеристика степени остеосклероза в трепанобиоптатах костного мозга исследуемых групп

Нозологическая единица	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
ЭТ	20/20 (100 %)	0	0	0
пре-ПМФ	9/20 (45 %)	11/20 (55 %)	0	0
ф-ПМФ	0	0	3/10 (30 %)	7/10 (70 %)

Grade — степень остеосклероза; ПМФ — первичный миелофиброз; пре-ПМФ — префиброзная/ранняя стадия ПМФ; ф-ПМФ — фиброзная стадия ПМФ; ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия.

При анализе корреляции количества МКЦ с экспрессией TGFβF1 и полуколичественных оценок степени миелофиброза (MF) и остеосклероза (Grade) без учета нозологической принадлежности обнаружена статистически значимая умеренная корреляция для степени миелофиброза ($r = 0,431$; $p < 0,001$) и степени остеосклероза ($r = 0,499$; $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Понятие атипичной морфологии МКЦ при МПЗ неоднозначно. Оно включает в себя изменение их размеров, ядерно-цитоплазматического соотношения, нарушение сегментации ядер. Так, первый вариант морфологии МКЦ с гиперсегментацией ядер и формированием причудливых форм, описанных в литературе как рога оленя, наблюдался на ранних стадиях клональной эволюции МПЗ и преобладал в субстрате ЭТ, составляя, по нашим данным, $68,5 \pm 2,9$ %. На поздних этапах клональной эволюции, примером которой служит ф-ПМФ, морфология клональных МКЦ претерпевает изменения и приобретает выраженные признаки клеточной атипичности (второй вариант морфологии МКЦ): увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения, гиперхромия ядер с утратой контуров отдельных сегментов, наслоением их друг на друга и формированием гиперхромных дисморфных ядер, описанных в литературе как облаковидные ядра. Вторым вариантом морфологии МКЦ при ПМФ преобладает, составляя при пре-ПМФ $69,0 \pm 3,4$ %, а при ф-ПМФ — $75,5 \pm 2,6$ %. В настоящем исследовании продемонстрировано, что МКЦ с обоими вариантами морфологии встречаются при каждой из изученных нозологических единиц, различается лишь их относительное количество. Это наблюдение позволяет предположить, что ЭТ и ПМФ являются этапами развития одного патологического процесса, морфологические особенности которого обусловлены разным периодом их клональной эволюции.

Одним из факторов, определяющим прогрессию миелофиброза и остеосклероза при ЭТ и пре-ПМФ, может служить количество МКЦ, секретирующих TGFβ. Предполагается, что в трепанобиоптатах КМ пациентов из групп пре-ПМФ и ф-ПМФ патологический клон МКЦ обладает повышенной экспрессией TGFβF1, что не только обуславливает развитие остеомиелофиброза, но и приводит к снижению пролиферации эритрокариоцитов с сужением эритроидного ростка [10–12]. Авторами упомянутой выше публикации [6] с попыткой ИГХ-визуализации экспрессии TGFβF1 мегакариоцитами использовался клон антител, недоступный в настоящее время, в связи с чем оценить воспроизводимость результатов не представлялось возможным. В данном исследовании впервые на материале трепанобиоптатов КМ выполнено ИГХ-исследование с клоном антител ТВ21 к TGFβ для оценки характера его экспрессии клетками КМ. В трепанобиоптатах КМ всех исследуемых групп обнаруживалась интенсивная цитоплазматическая реакция с антителами к TGFβF1 в эритрокариоцитах, что отражало реализацию его нормальной функции

в регуляции процессов дифференцировки и пролиферации эритрокариоцитов [13] и было принято за внутренний положительный контроль. Интерес представляет тот факт, что при ИГХ-исследовании TGFβF1-позитивные МКЦ обнаружены в трепанобиоптатах КМ пациентов всех исследуемых групп, а также то, что экспрессия TGFβF1 в каждом трепанобиоптате КМ наблюдается только в части МКЦ с различной интенсивностью. Наличие статистически значимой умеренной положительной корреляции количества МКЦ с экспрессией TGFβF1, степени миелофиброза и остеосклероза свидетельствует об участии клональных МКЦ в фиброгенезе и остеосклерозе, опосредованном секрецией TGFβF1, и едином патогенезе формирования фиброза стромы при ЭТ и ПМФ, что согласуется с литературными данными [14, 15]. Биологическую обоснованность наблюдаемой корреляции подтверждают исследования активирующего влияния TGFβF1 на клетки фибробластического ряда и его способности активировать функцию остеобластов и остеонеогенез [16–19].

Для ПМФ и посттромбоцитомического миелофиброза характерно развитие остеосклероза. В отличие от перестройки трабекулярной кости реактивного характера, например, при метастатическом поражении КМ, остеосклероз при МПЗ характеризуется формированием на материнской балке депо остеоида, не покрытых надкостницей и без признаков ее активации. Структура и процесс созревания остеоида в норме и патологии не различаются. Остеоид представляет собой белковую основу костной ткани и состоит из неупорядоченных волокон коллагенового матрикса; отложение кристаллов гидроксиапатита при его полимеризации приводит к формированию упорядоченных пучковых структур, служащих основой зрелой костной ткани [20]. В процессе декальцинации костной ткани при гистологической проводке материала из нее вымываются кристаллы гидроксиапатита без нарушения полимерной структуры пучков коллагена. Такое различие в химической структуре коллагена обуславливает явление гетерохромии при окраске трихромом по Массону: грубоволокнистый коллагеновый матрикс (охарактеризованный как незрелый остеоид) окрашивается в синий цвет, зрелая костная ткань — в красный цвет.

При анализе результатов ИГХ-исследования наблюдалась промежуточная стадия между двумя крайними вариантами — наличие точек окостенения (красного цвета) среди масс коллагенового матрикса (синего цвета), что было охарактеризовано как созревающий остеоид (см. рис. 5) [21]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что этот метод также позволяет визуализировать ранние этапы остеосклеротических изменений костной балки (что наблюдалось как в группе пре-ПМФ, так и в группе ПМФ), которые проявляются формированием на поверхности материнской балки узкого ободка незрелого остеоида, окрашивающегося в синий цвет и не покрытого надкостницей, с неровным внешним контуром, напоминающим щеточную каемку. Следует отметить, что этот метод также определяет остеоид, формирующийся в процессе нормальной перестройки

трабекулярной кости, ключевым отличием которого является ровный внешний контур, обусловленный покрывающей его надкостницей. В целях минимизации субъективности оценки предлагается пороговое значение в 30 % периметра костных балок, при превышении протяженности которого депозитами незрелого остеоида, не покрытыми надкостницей, рекомендуется устанавливать степень остеосклероза Grade 1.

Особый интерес представляют результаты исследования новой нозологической единицы — пре-ПМФ, выделенной в классификации ВОЗ 2017 г. [1]. По ряду исследованных параметров (степень фиброза стромы и остеосклероза, количество TGFβF1-позитивных МКЦ) пре-ПМФ статистически значимо отличается как от ЭТ, так и от ф-ПМФ и занимает промежуточное положение между ними. Обнаруженные различия, с одной стороны, могут служить дифференциально-диагностическими критериями пре-ПМФ, а с другой — позволяют предположить, что в ряде случаев пре-ПМФ является этапом клональной эволюции ЭТ в ПМФ. Необходимо подчеркнуть, что по клиническому течению заболевания пре-ПМФ по сравнению с ЭТ обладает более высоким риском прогрессии миелофиброза и остеосклероза [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя представленные результаты, можно сделать вывод о возможности использования ИГХ-исследования с антителами к TGFβF1 для визуализации и полуколичественной оценки его экспрессии атипичными МКЦ. Применение гистохимической окраски трихром по Массону позволяет определять наличие минимальных депозитов остеоида, соответствующих ранним стадиям формирования остеосклеротических изменений, и оптимизировать проведение дифференциальной диагностики пре-ПМФ и ЭТ. Обнаружение взаимосвязи между количеством МКЦ с экспрессией TGFβF1 и степенью фиброзных изменений стромы КМ и остеосклероза трабекулярной кости свидетельствует в пользу активирующего влияния клональных МКЦ на процессы миелофиброза и остеосклероза при ЭТ и ПМФ. С учетом выявленных различий исследуемых групп по ряду изучаемых признаков особый интерес представляет дальнейший анализ факторов фиброгенеза в сопоставлении с динамикой изменения выраженности признаков клеточной атипичности МКЦ на разных этапах клональной эволюции Рн-негативных МПЗ. Следует подчеркнуть необходимость использования в диагностике Рн-негативных МПЗ трепанобиоптатов КМ, полученных до начала терапии.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. А.М. Ковригина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР «Изучение молекулярных, цитогенетических, иммуноморфологических основ патогенеза клональных заболеваний системы крови» 2021–2023 гг. РК № АААА-А21-121011290078-8.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Д.И. Чеботарев, А.М. Ковригина.
Сбор и обработка данных: Д.И. Чеботарев, А.М. Ковригина.

Предоставление материалов исследования: Д.И. Чеботарев, А.М. Ковригина.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: Д.И. Чеботарев.

Окончательное одобрение рукописи: А.М. Ковригина, А.Л. Меликян.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017. pp. 174–7.
2. Kreipe H, Busche G, Bock O, Hussein K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. *Fibrogen Tiss Repair*. 2012;5(Suppl 1):S21. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S21.
3. Buhr T, Choritz H, Georgii A. The impact of megakaryocyte proliferation on the evolution of myelofibrosis. *Histological follow-up study in 186 patients with chronic myeloid leukaemia*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(6):473–8. doi: 10.1007/BF01600251.
4. Martyre MC. Platelet PDGF and TGF-β Levels in Myeloproliferative Disorders. *Leuk Lymphoma*. 1991;6(1):1–6. doi: 10.3109/10428199109064872.
5. Wang JC. Importance of plasma matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) in development of fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(9):1261–8. doi: 10.1080/10428190500126463.
6. Bock O, Loch G, Schade U, et al. Aberrant expression of transforming growth factor beta-1 (TGF beta-1) per se does not discriminate fibrotic from non-fibrotic chronic myeloproliferative disorders. *J Pathol*. 2005;205(5):548–57. doi: 10.1002/path.1744.
7. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, et al. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-β. *Stem Cell Investig*. 2016;3:5. doi: 10.3978/j.issn.2306-9759.2016.02.03.
8. Jacquelin S, Kramer F, Mullally A, Lane SW. Murine Models of Myelofibrosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2381. doi: 10.3390/cancers12092381.
9. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128–32.
10. Krystal G, Lam V, Dragowska W, et al. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J Exp Med*. 1994;180(3):851–60. doi: 10.1084/jem.180.3.851.
11. 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.
12. Sennikov SV, Eremina LV, Samarin DM, et al. Cytokine gene expression in erythroid cells. *Eur Cytokine Netw*. 1996;7(4):771–4.
13. Di Giandomenico S, Kermani P, Molle N, et al. Megakaryocyte TGFβ1 partitions erythropoiesis into immature progenitor/stem cells and maturing precursors. *Blood*. 2020;136(9):1044–54. doi: 10.1182/blood.2019003276.
14. Tang Y, Hu M, Xu Y, et al. Megakaryocytes promote bone formation through coupling osteogenesis with angiogenesis by secreting TGF-β1. *Theranostics*. 2020;10(5):2229–42. doi: 10.7150/tno.40559.
15. Malara A, Abbonante V, Zingariello M, et al. Megakaryocyte contribution to bone marrow fibrosis: many arrows in the quiver. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(1):e2018068. doi: 10.4084/MJHID.2018.068.
16. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;250:261–76. doi: 10.1097/00003086-199001000-00036.

17. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4(1):16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9.

18. Jann J, Gascon S, Roux S, Fauchoux N. Influence of the TGF- β Superfamily on Osteoclasts/Osteoblasts Balance in Physiological and Pathological Bone Conditions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7597. doi: 10.3390/ijms21207597.

19. Zhang Z, Zhang X, Zhao D, et al. TGF β 1 promotes the osteoinduction of human osteoblasts via the PI3K/AKT/mTOR/S6K1 signalling pathway. *Mol Med Rep.* 2019;19(5):3505–18. doi: 10.3892/mmr.2019.10051.

20. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12):a031229. doi: 10.1101/cshperspect.a031229.

21. Чеботарев Д.И., Ковригина А.М., Меликян А.Л., Кузьмина Л.А. Сравнительная характеристика изменений клеточного состава, стромы костного

мозга и трабекулярной кости при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных первичным миелофиброзом. *Гематология и трансфузиология.* 2021;66(1):68–78. doi: 10.35754/0234-5730-2021-66-1-68-78.

[Chebotarev DI, Kovrigina AM, Melikyan AL, Kuzmina LA. Comparative characteristics of bone marrow cell composition, stroma, and trabecular bone in allogenic hematopoietic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. *Russian journal of hematology and transfusiology.* 2021;66(1):68–78. doi: 10.35754/0234-5730-2021-66-1-68-78. (In Russ)]

22. Szuber N, Mudireddy M, Nicolosi M, et al. 3023 Mayo Clinic Patients With Myeloproliferative Neoplasms: Risk-Stratified Comparison of Survival and Outcomes Data Among Disease Subgroups. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(4):599–610. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.022.

