Концентрация IL8 матрикс-металлопротеиназ в сыворотке крови в динамике терапии Г-КСФ*

Е.В. Райкина, С.А. Румянцев

IL8 matrix-metalloproteinasa concentration in blood serum in therapy with G-CSF

E.V. Raikina, S.A. Rumyantsev

В последние несколько лет стало очевидным, что мобилизация ГСК – процесс до конца не изученный и достаточно противоречивый. Он обеспечивается комплексом взаимодействий между ростовыми факторами, хемокинами, протеазами и молекулами адгезии. Хотя каждый из этих участников может независимо друг от друга запускать каскад мобилизации ГСК, их пути, так или иначе, перекрещиваются и становятся взаимосвязанными. Появились факты, свидетельствующие о том, что мобилизация является результатом действия «периферических» хемокинов, таких как интерлейкин 8 (IL-8 или CXCL8), и ремоделирования матрикса и базальной мембраны энзимами матрикса, такими как желатиназа-В (MMP-9) [1-4]. Проведенные исследования убеждают, что нейтрофилы, IL-8 и MMP-9 играют ключевую роль в Г-КСФ-индуцированной мобилизации стволовых клеток. Стимуляция препаратами Г-КСФ может приводить к снижению экспрессии CD114 на нейтрофилах с последующей их активацией и повышенной продукцией IL-8, который вызывает дегрануляцию нейтрофилов и высвобождение из них различных энзимов, в том числе матрикс металлопротеиназ (MMP-9, MMP-2), эластазы, катепсина G [5-7]. Более того, нейтрофилы не продуцируют TIMP-1 и могут химически активировать латентную про-желатиназу-В. Все вместе это приводит к деградации и/или инактивации молекул адгезии, таких как VCAM-1/VLA-4, хемокинов (SDF-1/CXCR-4), растворимой фракции KIT-лиганда и др., тем самым, нарушая контакт между ГСК и костно-мозговым микроокружением. Стволовые клетки, таким образом, получают возможность беспрепятственной миграции из костного мозга через эндотелиальный барьер в периферическую кровь [8, 9].

Таким образом, поиск посредников, определяющих эффективность Г-КСФ-индуцированной мобилизации ГСК в периферическую кровь представляется актуальным для получения наиболее эффективного трансплантационного материала.

Материал и методы исследования

Материалом исследования служила периферическая кровь (ПК) 45 детей с онкогематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в ФГУ «ФНКЦ ДГОИ» Росздрава с 2000 по 2006 годы. Из них 26 пациентов получали препараты Г-КСФ с целью восстановления количества гранулоцитов при медикаментозной цитопении, остальные 19 – с целью мобилизации $CD34^+$ клеток в периферическую кровь для сбора и последующей аутологичной трансплантации. Кроме того, исследовали периферическую кровь и сыворотку 15 здоровых доноров ГСК, которые получали препараты Г-КСФ с целью мобилизации $CD34^+$ клеток в периферическую кровь для дальнейшего отбора и последующей аллогенной трансплантации.

Протоколы клинического применения препаратов Г-КСФ

В настоящем исследовании использовались препараты Г-КСФ – граноцит (леногастрим), нейпоген (филгастрим) и лейкостим (филгастрим) – в рамках трех протоколов клинического применения Г-КСФ:

1. Мобилизация $CD34^+$ клеток в периферическую кровь с целью их сбора для аллогенной трансплантации.
2. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь с целью их сбора для аутологичной трансплантации.
3. Лечение медикаментозной цитопении после курсов высокодозной цитотоксической полихимиотерапии у детей с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями.

Получение $CD34^+$ клеток периферической крови

Периферические $CD34^+$ клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе «Baxter CS-3000 Plus». Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Процедуры цитафереза после периода мобилизации проводили ежедневно до тех пор, пока суммарное количество $CD34^+$ клеток не достигало уровня, обеспечивающего наиболее быстрое приживление трансплантата.

Минимально допустимым количеством $CD34^+$ клеток для трансплантации считали их число более 2×10^6/кг массы тела реципиента. Оптимальным считали количество $CD34^+$ клеток более 5×10^6/кг массы тела реципиента. Для достижения такого уровня требовалось различное число процедур цитафереза (от 1 до 4). Ежедневное введение препаратов Г-КСФ продолжали и в дни проведения сеансов цитафереза.

Определение колониеобразующей активности ГСК

Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции крови определяли двумя методами:

1. Культивирование в течение 14 суток в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста «MethoCult 4338, StemCellTehnologies, Canada) с подсчетом количества КОЕ-ГЕММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

• Эффективность клонирования определяли как общее число КОЕ на 1×10^5 эксплантированных клеток.

* Материал представлен на международный симпозиум «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантации», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

• Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл ПК полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

2. Культивирование в полутвердой среде в системе «агаровая капля – жидкая среда» в течение 7 сут. с расчетом следующих показателей:

• Колониеобразующая (КОС) и кластерообразующая (КлОС) способность – число колоний (малые – 20–40 клеток, средние – 41–100 клеток и большие – более 100 клеток) и кластеров (малые – 5–9 клеток, большие – 10–19 клеток) на 1×10^5 эксплантированных клеток.

• Эффективность клонирования – общее число колоний и кластеров на 1×10^5 эксплантированных клеток.

• Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл крови или костного мозга полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови и на число миелокариоцитов в 1 мл костного мозга.

Определение количества субпопуляций лейкоцитов и стволовых клеток, несущих рецептор к IL8 и Г-КСФ

Количество субпопуляций лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток, несущих рецепторы к Г-КСФ (CD114) и IL8 (CDw128), определяли по экспрессии мембранных маркеров (CD – clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, CD14, CD15, CD34, CD38, CD45, CD114, CDw128 «Becton Dickinson» (США) при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCalibur «Becton Dickinson» (США).

Определение концентрации цитокинов и ферментов в сыворотке крови

Для количественного определения концентрации G-CSF, IL-8, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа. В качестве ферментных меток использовалась пероксидаза. В настоящем исследовании использовались следующие наборы реагентов: «Human MMP-9 (total)», «Human/mouse MMP-2(total)», «Human TIMP-2» («Quantikine®» R&D Systems Inc., USA), «Human TIMP-1» (Biosource International Inc., USA), «Human IL-8 ELISA Kit II» (BD OptEIA™ BD Biosciences Pharmingen, USA).

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с помощью однофакторного дисперсионного анализа и оценкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена-Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением с помощью критерия Крускалла-Уоллеса и критерия Манна-Уитни. Для оценки равенства долей использовали *Z*-тест. Корреляционный анализ проводили с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена для рядов с непараметрическим распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Результаты и обсуждение

Исследования последних лет, в основном на моделях с животными, показали, что Г-КСФ не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические клетки-предшественники [10], а мобилизация ГСК является результатом действия «периферических» хемокинов, таких, как интерлейкин 8 (IL-8 или CXCL8), и ремоделирования матрикса и базальной мембраны энзимами матрикса, такими, как желатиназа-В (MMP-9) [11]. В настоящем исследовании показано, что до назначения Г-КСФ наименьший уровень IL-8 наблюдался в группе здоровых доноров (6,07±0,39 пг/мл), а наибольший – у доноров аутологичных стволовых клеток (485±158 пг/мл) (табл. 1).

В результате применения Г-КСФ концентрация IL-8 в сыворотке периферической крови статистически значимо нарастает во всех трех исследованных группах (см. табл. 1).

Учитывая полученные результаты, мы изучили связь между концентрацией IL-8 перед началом курса Г-КСФ и кратностью его роста к моменту отмены, и оказалось, что статистически значимой связи этих признаков не наблюдается (табл. 2).

Таблица 1. **Концентрация IL-8 в сыворотке периферической крови до и после применения Г-КСФ (M±m)**

Исследуемая группа	*N*	Концентрация IL-8 в сыворотке, пг/мл		*p*	Кратность роста IL-8
		после Г-КСФ	до Г-КСФ		
Медикаментозная цитопения	21	485±158	1113±250	4,9±1,36	0,001
Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток	9	108±15	569±159	6,2±2,4	0,040
Здоровые доноры	6	6,07±0,39	47,0±6,18	7,7±3,2	0,022

Таблица 2. **Зависимость кратности роста концентрации IL-8 в сыворотке крови от его инициальной концентрации в сыворотке крови**

Исследуемая группа	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	–0,28	0,2
Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток	–0,32	0,37
Здоровые доноры	–0,64	0,55

Одними из основных участников процесса реализации мобилизирующего эффекта Г-КСФ на клетки-мишени, вероятно, являются матрикс-металлопротеиназы (MMP-9, MMP-2) и их естественные ингибиторы (TIMP-I и TIMP-II). Нами показано, что в результате применения Г-КСФ в сыворотке периферической крови как у больных, подвергшихся химиотерапевтическому лечению, так и у доноров гемопоэтических стволовых клеток происходит изменение концентрации MMP-9. Так, в группе медикаментозной цитопении начальная концентрация MMP-9 была наименьшей – 24,2±7,7нг/мл. В ответ на действие Г-КСФ она выросла до 826,5±180,37нг/мл, изменившись, таким образом, в 55,75±17,6 раза ($p < 0,0001$). Самое высокое содержание MMP-9 и до начала курса Г-ГСФ, и в момент его отмены наблюдалось в группе здоровых доноров (182,0±42,1 и 1358,2±261,3 нг/мл соответственно). Кратность роста при этом составила 8,3±2,1 раза ($p < 0,0001$). Меньше всего изменилась концентрация MMP-9 в группе доноров ауто-ГСК – в 3,94±1,24 раза ($p = 0,043$) (табл. 3).

Учитывая выявленные статистически значимые изменения уровня MMP-9 в динамике Г-КСФ-мобилизации, мы изучили зависимость количества клеток периферической крови от роста MMP-9. Как показано в таблице 4, во всех исследованных группах отмечается выраженная зависимость роста количества гранулоцитов от увеличения концентрации MMP-9 в сыворотке крови. Зависимость роста количества моноцитов от нарастания концентрации MMP-9 в сыворотке крови наблюдается у доноров аутологичных $CD34^+$ клеток (коэффициент корреляции $r = 0,954$, $p = 0,045$) и у здоровых доноров (коэффициент корреляции $r = 0,724$, $p = 0,048$). В группе медикаментозной цитопении статистически значимой связи этих процессов не обнаружено. Проведенный корреляционный анализ по законам линейной регрессии показал, что рост лимфоцитов происходит вне зависимости от роста MMP-9.

Учитывая связь роста количества клеток крови со степенью нарастания концентрации в сыворотке крови IL8 и MMP-9, можно предположить, что динамика сывороточной концентрации указанных цитокинов в результате использования препаратов Г-КСФ связана друг с другом. При исследовании взаимосвязи степени роста концентрации MMP-9 с повышением концентрации IL-8 показано, что прямая корреляционная связь имеется в группе доноров ауто-ГСК (коэффициент корреляции 0,963, $p = 0,037$) и здоровых доноров (коэффициент корреляции 0,621, $p = 0,046$). В группе медикаментозной цитопении такая зависимость имеется, хоть и статистически не значима.

Учитывая тот факт, что фермент MMP-9 имеет естественный ингибитор, мы определили концентрацию естественного ингибитора желатиназы-B – TIMP-I в сыворотке периферической крови в динамике мобилизации Г-КСФ. Из полученных данных хорошо видно, что в результате действия Г-КСФ концентрация TIMP-I в сыворотке не изменяется ни в одной из исследованных групп. Соотношение MMP-9 и ее тканевого ингибитора изменяется во всех группах за счет статистически значимого увеличения содержания MMP-9. В группе медикаментозной цитопении, когда Г-КСФ назначался больным при количестве нейтрофилов менее 500 в 1 мкл, это соотношение изменилось в наибольшей степени (кратность роста MMP-9/TIMP-I составила 58,39±28,54 раза, $p=0,02$).

Другим представителем семейства матрикс-металлопротеиназ, возможно, участвующим в Г-КСФ-опосредованной мобилизации ГСК, является MMP-2. Нами показано, что до назначения Г-КСФ концентрации MMP-2 в сыворотке крови здоровых доноров и в момент его отмены были самыми высокими: 174,5±111,5 нг/мл и 156±70 нг/мл соответственно, у доноров аутологичных $CD34^+$ клеток концентрация MMP-2 в сыворотке крови составила 9,53±4,74 нг/мл. В результате мобилизации концентрация MMP-2 не изменилась. Содержание тканевого ингибитора MMP-2 (TIMP-II) в результате мобилизации также не изменялось.

В многочисленных исследованиях показано, что применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора приводит к значительному повышению количества $CD34^+$ клеток в периферической крови. Наши данные не стали исключением, но, учитывая вероятное участие IL8 и MMP-9 в процессе мобилизации ГСК под действием Г-КСФ было важно изучить влияние этих факторов на эффективность мобилизации.

Таблица 3. **Концентрация MMP-9 в сыворотке периферической крови до и после применения Г-КСФ (M±m)**

Исследуемая группа	*N*	Концентрация MMP-9 в сыворотке (нг/мл)		*p*	Кратность роста MMP-9
		после Г-КСФ	до Г-КСФ		
Медикаментозная цитопения	10	24,2±7,7	826,5±180,3	55,75±17,6	<0,0001
Доноры аутологичных $CD34^+$ клеток	5	175,0±79,7	819,4±254,7	3,94±1,24	0,043
Здоровые доноры	6	182,0±42,1	1358,2±261,3	8,3±2,1	<0,0001

Таблица 4. **Зависимость роста количества гранулоцитов от роста концентрации MMP-9 в сыворотке крови**

Исследуемая группа	*N*	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	8	0,839	0,009
Доноры аутологичных $CD34^+$клеток	4	0,957	0,042
Здоровые доноры	4	0,726	0,045

Так как в ходе проведенных исследований выяснилось, что во всех исследованных группах происходит статистически значимое увеличение концентрации IL–8 и MMP–9 на фоне стимуляции Г–КСФ, то становится очевидным желание связать эффект мобилизации CD34⁺ клеток с изменением уровня выше названных факторов.

Оказалось, что во всех исследованных группах отмечается прямая корреляционная зависимость эффективности мобилизации CD34⁺ клеток от степени роста концентрации IL–8 в сыворотке крови (табл. 5).

От степени повышения концентрации MMP–9 в сыворотке крови зависит Г–КСФ индуцированная мобилизация CD34⁺клеток в группе мобилизации ауто–ГСК и у здоровых доноров, в то время как при использовании Г–КСФ для лечения медикаментозной цитопении эффективность мобилизации не зависит от степени изменения концентрации MMP–9 (табл. 6).

При изучении влияния повышения концентрации в сыворотке крови IL8 и MMP–9 под действием Г–КСФ на динамику количества клеток–предшественников гранулоцитарно–макрофагального ряда кроветворения (КОЕ–ГМ) показано, что степень прироста КОЕ–ГМ в периферической крови после применения Г–КСФ зависит от степени роста сывороточной концентрации IL8 и не зависит от MMP–9 (табл. 7, 8).

Таким образом, Г–КСФ, вероятно, не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки, реализуя свой эффект мобилизации CD34⁺ клеток через клетки–мишени, имеющие рецепторы к Г–КСФ, которыми являются нейтрофильные гранулоциты и, возможно, моноциты [1, 7, 12, 13]. Эти клетки, в свою очередь, получив сигнал от Г–КСФ, инициируют выработку вторичных посредников, которыми могут быть другие цитокины (IL–8, IL–3, GM–CSF, SDF–1) или ферменты (коллагеназы), которые разрушают связь CD34⁺ клеток со стромальными элементами костного мозга и усиливают миграцию CD34⁺ клеток в периферическую кровь.

В настоящем исследовании мы показали, что сывороточные концентрации IL–8 и MMP–9 значительно повышаются в результате использования Г–КСФ, причем степень этого повышения обратно пропорциональна их первоначальной концентрации. Концентрация другой матрикс–металлопротеиназы – MMP–2, также предполагающейся на роль посредника в реализации мобилизующего действия Г–КСф, в результате его использования не меняется. Не меняется и концентрация в сыворотке естественных ингибиторов MMP–9 и MMP–2 – TIMP–I и TIMP–II. Таким образом, из наших данных следует, что эффективность мобилизации как гранулоцитов, так и ГСК зависит от степени повышения сывороточной концентрации IL–8 и MMP–9.

Таблица 5. **Зависимость эффективности мобилизации CD34⁺ клеток от роста концентрации IL–8 в сыворотке крови**

Исследуемая группа	*N*	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	16	0,56	0,048
Доноры аутологичных CD34⁺ клеток	10	0,72	0,045
Здоровые доноры	6	0,69	0,040

Таблица 6. **Зависимость эффективности мобилизации CD34⁺ клеток от роста концентрации MMP–9 в сыворотке крови**

Исследуемая группа	*N*	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	8	–0,432	0,284
Доноры аутологичных CD34⁺клеток	4	0,968	0,032
Здоровые доноры	4	0,544	0,024

Таблица 7. **Зависимость эффективности мобилизации КОЕ–ГМ от роста концентрации IL8 в сыворотке крови**

Исследуемая группа	*N*	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	16	0,59	0,032
Доноры аутологичных CD34⁺ клеток	10	0,81	0,050

Таблица 8. **Зависимость эффективности мобилизации КОЕ–ГМ от роста концентрации MMP–9 в сыворотке крови**

Исследуемая группа	*N*	Коэффициент корреляции *(r)*	*p*
Медикаментозная цитопения	8	–0,152	0,487
Доноры аутологичных CD34⁺клеток	4	0,201	0,386

ЛИТЕРАТУРА:

1. Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. J. Immunol. 2005; 175: 2647-54.
2. Pruijt J.F.M., Fibbe W.E., Laterveer L. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1999; 96(19): 10863-8.
3. Robinson S.N., Seina S.M., Gohr J.C. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9. Stem Cells and Dev. 2005; 14: 317-28.
4. Takeyama K., Ohto H. PBSC mobilization. Transf. Apheresis Sci. 2004; 31: 233-43.
5. Chakrabarti S., Patel K.D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. J. Leukocyte Biol. 2005; 78: 279-88.
6. Domanovic D., Wozniak G., Cernelc P. et al. Matrix metalloproteinase-9 and cell kinetics during the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis. Transf. Apheresis Sci. 2005; 33: 37-45.
7. Jilma B., Hergovich N., Homoncik M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD 114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. Br. J. Haematol. 2000; 111: 314-20.
8. Robinson S.N., Pisarev V.M., Chavez J.M. et al. Use of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or FLT-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. Stem Cells 2003; 21: 417-27.
9. Thomas J., Liu F., Link D.C. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. Current Opinion in Hematol. 2002; 9:183-9.
10. Liu F., Poursine-Laurent J., Link D.C. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. Blood 2000; 95: 3025-31.
11. Starckx S., Van den Steen P.E., Wuyts A. et al. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. Leuk. Lymph. 2002; 43(2): 233-41.
12. Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. J. Immunol. 2005; 175: 2647-54.
13. Roberts A.W., Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. Blood 1995; 86: 1600.