

response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CMLCP) treated with imatinib (IM). Blood 2008; 112(11): 186.

17. Kovitz C., Kantarjian H., Garcia-Manero G. et al. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia developing after imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. Blood 2006; 108(8): 2811–3.

18. Schafhausen P., Dierlamm J., Bokemeyer C. et al. Development of AML with t(8;21)(q22;q22) and RUNX1-RUNX1T1 fusion following Philadelphia-

negative clonal evolution during treatment of CML with Imatinib. Cancer Genet. Cytogenet. 2009; 189(1): 63–7.

19. Dvorak P., Hruby M., Subrt I. Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. Leuk. Res. 2009; 33(6): 860–1.

20. Sanchez-Guijo F.M., Hernandez J.M., Lumberras E. et al. Effects of imatinib mesylate on normal bone marrow cells from chronic myeloid leukemia patients in complete cytogenetic response. Leuk. Res. 2009; 33(1): 170–3.

## Ангиогенез в костном мозге больных множественной миеломой на различных этапах высокодозной химиотерапии

О.С. Покровская, Л.П. Менделеева, И.Б. Капланская, Е.О. Грибанова, Е.Ю. Варламова, Т.Н. Обухова, Э.Г. Гемджян, В.Г. Савченко

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Цель настоящего исследования — изучить динамику количества микрососудов в костномозговой ткани больных множественной миеломой (ММ) на фоне проведения высокодозной химиотерапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК).

**Материалы и методы.** 36 первичным больным ММ в возрасте 31–67 лет (медиана 51 год) проводилась терапия по стандартному или модифицированному протоколу Тотальной терапии-1. Среди этих пациентов было 15 женщин и 21 мужчина, у 18 больных была диагностирована миелома G, у 6 — миелома A, у 1 — миелома D, у 9 — миелома VJ и у 2 — несекретирующая миелома. У 22 пациентов определена II стадия ММ, у 14 — III стадия. Всем пациентам выполнялась трепанобиопсия в дебюте заболевания, после индукционной терапии, после мобилизации, перед первой трансплантацией и после завершения высокодозной терапии (всего в ходе лечения 5 исследований). В группу сравнения вошло 10 доноров костного мозга (КМ), которым трепанобиопсию выполняли во время эксфузии КМ. По гистологическим препаратам, используя иммуногистохимическую окраску с применением анти-CD34-антитела (производства Novocastra Laboratories Ltd.), подсчитывали количество микрососудов в 10 полях зрения (общей площадью 1,59 мм<sup>2</sup>) с пересчетом на 1 мм<sup>2</sup> площади кроветворной ткани.

**Результаты.** На фоне проведения программной терапии наблюдалось статистически значимое уменьшение количества микрососудов в КМ. Так, в дебюте ММ оно составляло  $96,0 \pm 5,3$  микрососудов/мм<sup>2</sup>, после завершения индукционной терапии —  $78,6 \pm 3,9$ /мм<sup>2</sup>, перед первой аутоТГСК —  $68,6 \pm 3,4$ /мм<sup>2</sup>, после завершения трансплантации —  $60,8 \pm 1,8$ /мм<sup>2</sup>. Отмечено статистически значимое увеличение количества микрососудов после мобилизации. В контрольной группе плотность микрососудов составляла  $46,8 \pm 2,0$ /мм<sup>2</sup>. Таким образом, несмотря на достижение полной или очень хорошей частичной ремиссии после высокодозной химиотерапии у больных ММ, количество микрососудов оставалось значительно выше, чем у доноров ( $p < 0,001$ ). При анализе вероятности выживаемости без прогрессии после аутоТГСК в зависимости от количества микрососудов на разных этапах терапии показано, что количество микрососудов перед первой трансплантацией служит определяющим фактором.

**Заключение.** У больных ММ отмечена высокая пролиферация микрососудов в КМ. В процессе лечения происходит уменьшение количества микрососудов, однако и после завершения терапии оно выше, чем у здоровых доноров.

Количество сосудов перед аутоТГСК значимо предопределяет посттрансплантационную выживаемость без признаков прогрессии, опережая по значимости противоопухолевый ответ на индукционную терапию.

### Ключевые слова

множественная миелома, плотность микрососудов костного мозга, трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, выживаемость без прогрессии.

### Bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma in different phases of high-dose therapy

O.S. Pokrovskaya, L.P. Mendeleeva, I.B. Kaplanskaya, E.O. Gribanova, E.Yu. Varlamova, T.N. Obukhova, E.G. Gemdjan, V.G. Savchenko

#### SUMMARY

**Aim.** The aim of our study was to investigate bone marrow microvessel density (MVD) in patients undergoing high-dose therapy and autologous stem cell transplantation (ASCT).

**Patients and methods.** 36 patients 31–67 years old (median, 51) with newly diagnosed MM underwent Total Therapy-1 or modified Total Therapy-1 treatment. There were 21 male and 15 female, MM G was diagnosed in 18 cases, MM A — in 6 cases, MM D — in 1 case, MM VJ — in 9 cases and nonsecretory MM — in 2 cases. In 22 pts stage II was in 22 cases and stage III in 14 cases. Trepanobiopsies were performed at the time of diagnosis, after the induction, after stem cell mobilization before the 1st ASCT and after the end of therapy (5 times during the treatment). Control group (10 donors of BM, 7 male and 3 female, aged 17–59, median 29) were also included in the study. BM biopsy was performed during BM harvesting. Blood vessels were highlighted by immunostaining endothelial cells with a monoclonal CD34 antibody (Novocastra Lab Ltd.). The MVD was calculated in 10 HPF that conformed 1.59 mm<sup>2</sup>.

**Results.** There is a significant decrease of BM MVD after each phase of therapy. MVD was  $96.0 \pm 5.3$  at the time of diagnosis,  $78.6 \pm 3.9$  after the induction therapy,  $68.6 \pm 3.4$  before the 1st ASCT and  $60.8 \pm 1.8$  at the end of treatment. There was a statistically significant increase of MVD after stem cell mobilization. In the control group MVD was  $46.8 \pm 2.0$ . Thus, the BM MVD is significantly higher in patients with MM after HDT and ASCT in spite of achievement of CR or VGPR than in control group ( $p < 0.001$ ).

The analysis of probability of CR or VGPR conservation after ASCT according to MVD at different phases of therapy showed that MVD before the 1st ASCT is an important prognostic factor. The comparison of 2 factors (remission rate and MVD before the 1st ASCT) showed the greater amount of MVD for PFS after ASCT.

**Conclusion.** BM angiogenesis is increased in patients with MM. BM MVD is decreased under the treatment but even after the end of HDT and ASCT MVD is higher than in control group. MVD before the 1st ASCT is an important prognostic factors for PFS after ASCT and it is greater than remission rate before the 1st ASCT for PFS after ASCT.

#### Keywords:

multiple myeloma, bone marrow microvessel density, autologous stem cell transplantation, progression free survival.

Hematology Research Center RAMS, Moscow

Контакты: sillywilly@yandex.ru

Принято в печать: 16 ноября 2010 г.

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие в клинической и экспериментальной онкологии большое внимание уделялось вопросам ангиогенеза при различных опухолях. Удалось убедительно показать, что рост опухолей в значительной степени зависит от неопластического ангиогенеза, который представляет собой образование новых капилляров от посткапиллярных венул. Были изучены некоторые механизмы контроля неопластического ангиогенеза, исследованы возможности его активации и ингибирования.

Основным фактором, стимулирующим ангиогенез при физиологических и патологических состояниях, служит недостаток кислорода (гипоксия или ишемия). Через индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) происходит активация многих ангиогенных механизмов, прежде всего основного регулятора ангиогенеза — эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, их преществление и моноциты, экспрессирующих рецепторы. Кроме того, VEGF способствует увеличению проницаемости сосудов, пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство, обеспечивая тем самым миграцию эндотелиальных клеток. VEGF также стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между эндотелиальными клетками и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток [1].

В стабильном состоянии эндотелиальные клетки не пролиферируют и лишь изредка (1 раз в 7–10 лет) делятся. Стабильное состояние сосудов поддерживается балансом между активаторами ангиогенеза (в основном, факторами роста и цитокинами) и его ингибиторами (тромбоспондином, ингибиторами матриксных металлопротеиназ и активаторов плазминогена, эндостатином и др.). Сдвиг этого баланса в сторону активаторов приводит к интенсификации ангиогенеза. Под действием ангиогенных факторов роста и цитокинов происходит активация пролиферации эндотелиоцитов, которая завершается ремоделированием сосуда [2]. Вновь сформированный сосуд приобретает стабильное состояние. Примером может служить процесс заживления раны, развитие коллатералей при инфаркте миокарда, васкуляризация при диабетической ретинопатии [3].

Опухолевый неопластический ангиогенез обладает рядом особенностей, обусловленных сложнейшим дисбалансом между стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза. В опухолевых тканях выявляется повышенный уровень стимуляторов ангиогенеза (VEGF, основного фактора роста фибробластов [bFGF], тимидинфосфорилазы, ангиогенина и др.), тогда как уровень эндогенных ингибиторов (тромбоспондина I, ангиостатина, эндостатина и др.) снижен. Избыток стимуляторов ангиогенеза синтезируется как самой опухолью, так и ее микроокружением (клетками и матриксом). Эндотелиальные клетки опухоли быстро пролиферируют, поддерживая возросший ангиогенез, что способствует опухолевой прогрессии — росту опухоли, ее инвазии и метастазированию [4]. От нормальных сосудов новообразованные опухолевые сосуды отличаются повышенной проницаемостью в связи с наличием пор, везикул, межклеточных щелей, прерывистой базальной мембраны и недостаточного количества дополнительных стабилизирующих клеток — перicyтов. Эндотелий опухолевых сосудов может замещаться опухолевыми клетками, а иногда и вовсе отсутствовать. Быстрый рост опухолевых и эндотелиальных клеток вместе со структурными и функциональными отличиями эндотелиальных клеток

делают опухолевые сосуды извилистыми и расширенными, с неравномерным диаметром и наличием шунтов. Так, ток крови в опухолевых сосудах постоянно меняет свое направление, это ведет к гипоксии, что, в свою очередь, провоцирует дальнейший неопластический ангиогенез.

Многочисленными исследованиями было показано, что неопластический ангиогенез — ключевой патофизиологический механизм, обуславливающий прогрессию, инвазию и метастазирование солидных опухолей [5]. Введение ингибиторов ангиогенеза (природных или синтетических) в экспериментах *in vivo* приводило к остановке роста опухоли и даже ее регрессии.

Некоторые характеристики ангиогенеза рассматриваются в качестве неблагоприятных прогностических факторов при различных солидных опухолях. Так, у больных раком молочной железы, колоректальным раком, раком мочевого пузыря, а также меланомой увеличение количества сосудов в гистологическом препарате опухоли коррелирует с появлением метастазов, низкой общей и безрецидивной выживаемостью [6–10].

Немаловажное значение ангиогенеза в клиническом течении онкогематологических заболеваний подтверждено работами преимущественно зарубежных исследователей. У детей, страдающих острым лимфобластным лейкозом, а также у взрослых пациентов с острыми миелоидными лейкозами плотность микрососудов в костном мозге (КМ) была статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой (пациенты с онкогематологическими заболеваниями без поражения КМ) [11, 12].

P. Salven и соавт. сообщили о связи высокого уровня сывороточного VEGF с тяжелым соматическим статусом больных, высокой активностью лактатдегидрогеназы сыворотки крови, крупноклеточным морфологическим вариантом опухоли и низкими показателями выживаемости у пациентов с лимфомами [13]. F. Bertolini и соавт. обнаружили статистически значимое снижение бессобытийной выживаемости у пациентов с лимфомами, в плазме которых выявлялся высокий уровень факторов роста VEGF и bFGF [14].

A. Vassa и соавт. выявили увеличение плотности микрососудов в КМ у больных множественной миеломой (ММ), причем как на фоне развернутой картины заболевания, так и после высокодозной химиотерапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) [15, 16].

S.V. Rajkumar и соавт. представили доказательства того, что ангиогенез в КМ прогрессивно возрастает по мере озлокачествления парапротеинемического гемобластоза, начиная от моноклональной гаммапатии неясного генеза, «тлеющей» миеломы, ММ с клиническими проявлениями и заканчивая рецидивирующим и прогрессирующим течением ММ. Авторами обнаружено, что лишь у небольшой части пациентов с моноклональной гаммапатией неясного генеза число микрососудов в КМ незначительно превышает таковое у здоровых лиц. Ангиогенез существенно возрастает у пациентов с «тлеющей» миеломой по сравнению с пациентами с моноклональной гаммапатией неясного генеза и у пациентов с развернутой картиной ММ по сравнению с «тлеющей» миеломой. У больных с рецидивами ММ неопластический ангиогенез выражен наиболее значительно [17].

O. Sezer и соавт. показали статистически значимые различия выживаемости больных ММ в зависимости от наличия низкой или высокой плотности микрососудов в КМ в дебюте заболевания. Данные, полученные авторами, так же как и результаты исследования N. Munshi и соавт., продемонстрировали более высокую выживаемость

больных ММ после высокодозной терапии и двойной аутоТГСК, у которых в дебюте заболевания была низкая плотность микрососудов в КМ [18, 19]. O. Sezer и соавт. не только подчеркивали важное значение ангиогенеза при этом виде гемобластоза, но и утверждали, что плотность микрососудов служит новым прогностическим фактором выживаемости больных ММ вне зависимости от характера терапии.

Некоторые исследователи анализировали зависимость числа микрососудов в КМ у больных ММ от стадии заболевания, содержания парапротеина и уровня  $\beta_2$ -микроглобулина. Удалось выявить статистически значимое увеличение плотности микрососудов у пациентов со II–III стадией заболевания по сравнению с I стадией, а также у пациентов с высоким содержанием  $\beta_2$ -микроглобулина [20, 21].

Несмотря на столь высокий интерес исследователей к значению ангиогенеза в клиническом течении ММ, в литературе не представлены сведения, характеризующие состояние ангиогенеза на всех этапах программной химиотерапии ММ — от индукции до высокодозной консолидации.

Цель нашей работы — изучить изменение количества микрососудов в костномозговой ткани у больных ММ на фоне проведения индукционной терапии и высокодозной химиотерапии с последующей аутоТГСК, а также оценить роль ангиогенеза в достижении противоопухолевого ответа на проведенное высокодозное лечение.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 36 больных ММ в возрасте 31–67 лет (медиана 51 год), находившихся в отделении химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ГИЦ РАМН с 2001 по 2006 г. Среди них было 15 женщин и 21 мужчина. У 18 (50 %) пациентов была диагностирована миелома G, у 6 (16,7 %) — миелома A, у 9 (25 %) — миелома Бенс-Джонса, у 1 (2,8 %) — миелома D и у 2 (5,5 %) — несекретирующая миелома. Преобладали пациенты со II стадией заболевания (22 больных, 61,1 %), с III стадией ММ было 14 (38,9 %) больных. У 21 (58,3 %) пациента в дебюте заболевания был повышен уровень  $\beta_2$ -микроглобулина максимум до 13,4 мг/л, у 13 (33,3 %) больных уровень альбумина был менее 35 г/л. Цитогенетическое исследование выполнено 14 пациентам, у 8 из них выявлена делеция хромосомы 13.

Для лечения ММ в нашей клинике используются химиотерапевтические программы, основанные на принципе ранней интенсификации и высокодозной консолидации. В период с 2001 по 2005 г. за основу терапевтической тактики была избрана программа Тотальной терапии-1, предложенная В. Barlogie в 1999 г. [22], которая состояла из нескольких курсов полихимиотерапии, мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и аутоТГСК. Индукционная терапия включала 3–4 курса VAD (винкристин + доксорубин + дексаметазон). Мобилизация ГСК проводилась с использованием высоких доз циклофосфамида (6 г/м<sup>2</sup>) и гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) по 5 мкг/кг/сут. Затем выполнялся дополнительный курс химиотерапии EDAP (этопозид + дексаметазон + citarabin + цисплатин). аутоТГСК (однократную или двойную) проводили после введения высоких доз мелфалана (200 мг/м<sup>2</sup>). Далее назначали поддерживающую терапию (интерферон- $\alpha$ ), которую продолжали до развития рецидива заболевания. Представленная программа была выполнена 29 больным.

В 2006 г. нами был модифицирован протокол лечения ММ [23]. В тех случаях, когда после 1–2 курсов VAD наблюдался недостаточный противоопухолевый ответ (частичная ремиссия [ЧР] или минимальный ответ [МО]), в схему лечения включали 4–6 бортезомибсодержащих курсов (бортезомиб + дексаметазон  $\pm$  доксорубин). После завершения индукционной терапии пациентам выполняли мобилизацию ГСК и аутоТГСК. По модифицированному протоколу было пролечено 7 больных.

Диагностика ММ и оценка противоопухолевого ответа проводились в соответствии с критериями, разработанными IWGM (Международная рабочая группа по изучению миеломы) [24, 25].

После индукционной терапии у 5 (13,9 %) пациентов была достигнута полная ремиссия (ПР), у 11 (30,6 %) — очень хорошая ЧР, у 17 (47,2 %) — ЧР и у 3 (8,3 %) — МО. Перед трансплантацией было зафиксировано улучшение показателей противоопухолевого ответа: ПР была подтверждена у 12 (33,3 %) пациентов, очень хорошая ЧР — у 8 (22,2 %), ЧР — у 15 (41,7 %) и МО — у 1 (2,8 %). Выполнение аутоТГСК способствовало дальнейшему повышению противоопухолевого ответа: уже в 28 (77,5 %) случаях была констатирована ПР и очень хорошая ЧР. ЧР сохранялась у 7 (19,4 %) пациентов, а у 1 (2,8 %) — МО. Продолжительность наблюдения за пациентами после аутоТГСК составила 6,5–92,5 мес. (медиана 43 мес.).

Качественная и количественная характеристика состояния ангиогенеза у больных ММ изучалась на гистологических препаратах КМ. С этой целью больным выполняли трепанобиопсию задней ости подвздошной кости 5 раз за все время лечения: в момент диагностики заболевания, после выполнения схемы индукции, после мобилизации ГСК, перед первой аутоТГСК и через 3 мес. после завершения программы трансплантации.

Контрольную группу составили доноры КМ, которым во время экфузии выполнялась трепанобиопсия задней ости подвздошной кости. В эту группу вошло 7 мужчин и 3 женщины в возрасте 19–56 лет (медиана 29 лет).

Всего было выполнено 140 трепанобиопсий. Однако в связи с недостаточным объемом кроветворной ткани в некоторых гистологических препаратах результаты иммуногистохимического исследования были оценены только в 113 (80,7 %) случаях. Таким образом, состояние ангиогенеза в дебюте заболевания было изучено у 16 больных, после выполнения индукции — у 26, после мобилизации ГСК — у 10, перед первой аутоТГСК — у 25 и после завершения высокодозной химиотерапии — у 26 больных.

Для гистологического исследования биоптаты КМ фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинировали в растворе Де Кастро, помещали в батарею спиртов восходящей концентрации и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по рутинной методике.

Иммуногистохимическое исследование проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом по общепринятой схеме на парафиновых срезах толщиной 3 мкм. Использовали моноклональные антитела CD34 (производства Novocastra Lab. Ltd.) — маркер эндотелия сосудов и клеток-предшественниц гемопоэза. В качестве детекционной системы применяли проявляющую систему En Lab Vision (Dako, Дания). Иммуногистохимические реакции проводили с помощью иммуногистостейнера Dako Avtostainer (Dako Cytomation, США). Подсчет микрососудов осуществляли в 10 полях зрения при увеличении 400 (объектив  $\times 40$ , окуляр  $\times 10/18$ ). Площадь одного поля зрения составила 0,159 мм<sup>2</sup>. Таким образом, в каждом

гистологическом препарате подсчитывали количество сосудов на площади кроветворной ткани 1,59 мм<sup>2</sup> с последующим перерасчетом на единицу площади, равную 1 мм<sup>2</sup>. Под термином «микрососуды» мы понимали эндотелиальные клетки, расположенные поодиночке или кластерами в виде гнезд или трубочек, четко отделенных одна от другой, без наличия или с наличием просвета, не превышающего 10 мкм в диаметре (т. е. не более чем в 1,5 раза превышающего диаметр ядра эндотелиальной клетки в поперечном сечении). Сосуды большего диаметра, а также сосуды, близко расположенные к трабекулам, не учитывались.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы Statistica (версия 6.0). Данные представлены в виде среднего числа ± стандартное отклонение, а также в виде максимального значения, минимального значения, медианы. Для оценки данных использованы методы описательной статистики, анализ таблиц сопряженности и анализ выживаемости.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Иммуногистохимическое исследование КМ здоровых доноров позволило установить, что количество микрососудов в гистологическом препарате составляло 36,5–55,3 на 1 мм<sup>2</sup> (в среднем 46,8 ± 2,0/мм<sup>2</sup>). Это среднее значение, равное 46,8/мм<sup>2</sup>, в данном исследовании было принято за основную норму (рис. 1).

При исследовании кроветворной ткани у больных ММ отмечено, что в дебюте заболевания количество микрососудов более чем в 2 раза превышало таковое у доноров и составляло 66,6–139,6/мм<sup>2</sup> (в среднем 96,0 ± 5,3/мм<sup>2</sup>). Ни в одном случае плотность микрососудов в КМ при развернутой фазе ММ не соответствовала нормальным значениям. После индукционного этапа терапии количество микрососудов несколько уменьшилось, но оставалось еще значительным и равнялось 52,2–135,5/мм<sup>2</sup> (в среднем 78,6 ± 3,9/мм<sup>2</sup>). Перед выполнением первой трансплантации показатели плотности микрососудов статистически значимо снизились по сравнению с предыдущими исследованиями и составили 49,1–111,3/мм<sup>2</sup> (в среднем 68,6 ± 3,4/мм<sup>2</sup>). Таким образом, перед первой аутоТГСК у 5 из 25 больных количество микрососудов было в норме, т. е. не превышало 48,6/мм<sup>2</sup>. Через 3 мес. после завершения высокодозной трансплантационной терапии количество микрососудов было уже 43,4–78,0/мм<sup>2</sup>. При этом средние значения плотности микрососудов в эти сроки (60,8 ± 1,8/мм<sup>2</sup>) снизились более чем на 1/3 по сравнению с исходными; у 8 пациентов число микрососудов в КМ нормализовалось, составив 43,4–55,3/мм<sup>2</sup>.

В табл. 1 представлена динамика показателей плотности микрососудов КМ у больных ММ на каждом этапе проводившегося лечения. Сопоставив анализируемые

параметры с показателями противоопухолевого ответа на терапию, можно отметить, что изменение количества микрососудов в КМ четко коррелировало со степенью выраженности противоопухолевого ответа. Иными словами, по мере увеличения процента ПР и очень хороших ЧР после выполнения каждого из этапов интенсивного лечения число микрососудов в КМ статистически значимо снижалось. Тем не менее даже после окончания лечения среднее количество микрососудов у больных ММ оставалось статистически значимо выше, чем в контрольной группе ( $p = 0,001$ ).

Особое внимание в нашем исследовании обращено на изменение количества микрососудов в КМ на фоне применения Г-КСФ, назначавшегося больным с целью мобилизации ГСК. Сопоставив показатели плотности микрососудов у пациентов, которым исследование КМ проводили до начала мобилизации ГСК и сразу после завершения инъекций Г-КСФ, было выявлено повышение числа микрососудов у всех 10 больных (рис. 2). Так, если перед мобилизацией ГСК плотность микрососудов составляла 52,2–84,3/мм<sup>2</sup> (в среднем 72,5 ± 3,1/мм<sup>2</sup>), то после 8–15-дневного применения Г-КСФ она возросла до 78,6–103,1/мм<sup>2</sup> (в среднем 90,0 ± 2,6/мм<sup>2</sup>). Выявленные различия оказались статистически значимыми ( $p = 0,005$ ). Наиболее вероятным объяснением данного феномена может быть опосредованное стимулирующее влияние Г-КСФ на ангиогенез. Доказательства этому представлены в исследованиях Yu. Ohki и соавт. Авторы показали, что при применении Г-КСФ происходит повышение уровня VEGF в плазме крови, что ведет к мобилизации эндотелиальных клеток-предшественниц. У животных, которым вводится Г-КСФ, блокирование рецепторов VEGF приводит к отсрочке тканевой ревазуляризации [26].

На рис. 3 представлены микрофотографии гистологических препаратов КМ пациента с ММ, демонстрирующие увеличение количества микрососудов на фоне мобилизации ГСК с использованием циклофосфида (6 г/м<sup>2</sup>) и Г-КСФ.

Благодаря внедрению в практику интенсивных высокодозных лечебных стратегий, а также новых биологически направленных лекарственных препаратов (ингибиторы протеосом, иммуномодуляторы) взгляды клиницистов на результаты терапии ММ значительно изменились. Появилась возможность обсуждать не только частоту ПР и ЧР у больных ММ, но и оценивать длительность ремиссий, а также зависимость продолжительности ответа на лечение от глубины этого ответа. В клинических исследованиях последнего десятилетия было убедительно показано, что достижение ПР связано с длительной выживаемостью без прогрессирования (ВБП). В то же время у пациентов, противоопухолевый ответ на лечение у которых был минимальным или не превышал параметров ЧР, прогрессия

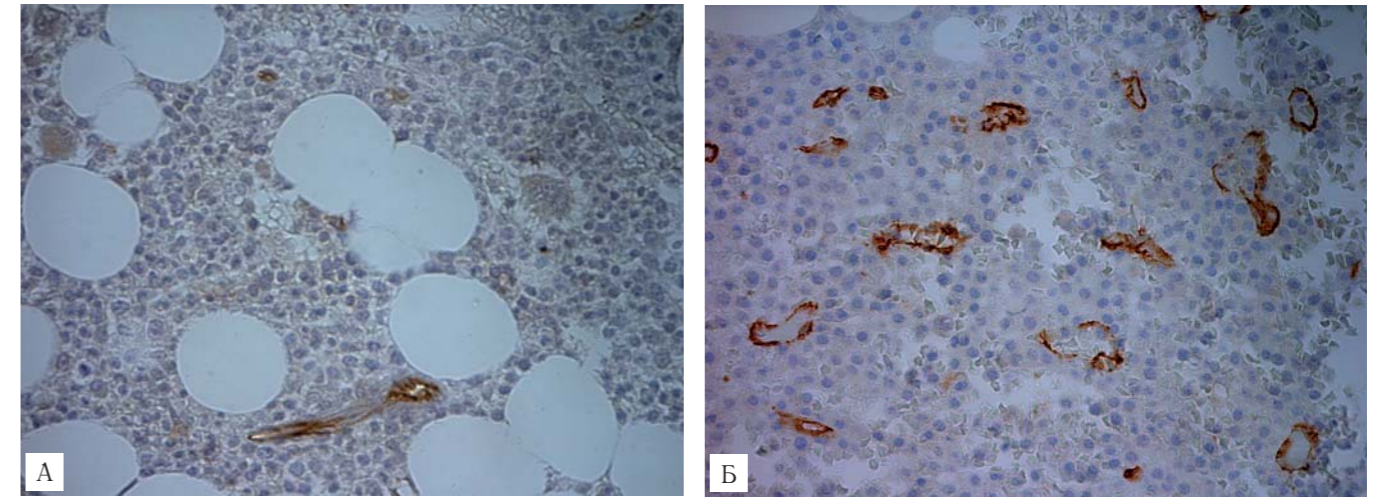


Рис. 1. Микрососуды при иммуногистохимическом исследовании костного мозга с использованием моноклонального антитела CD34, ×400: А — донор костного мозга; Б — пациент с множественной миеломой

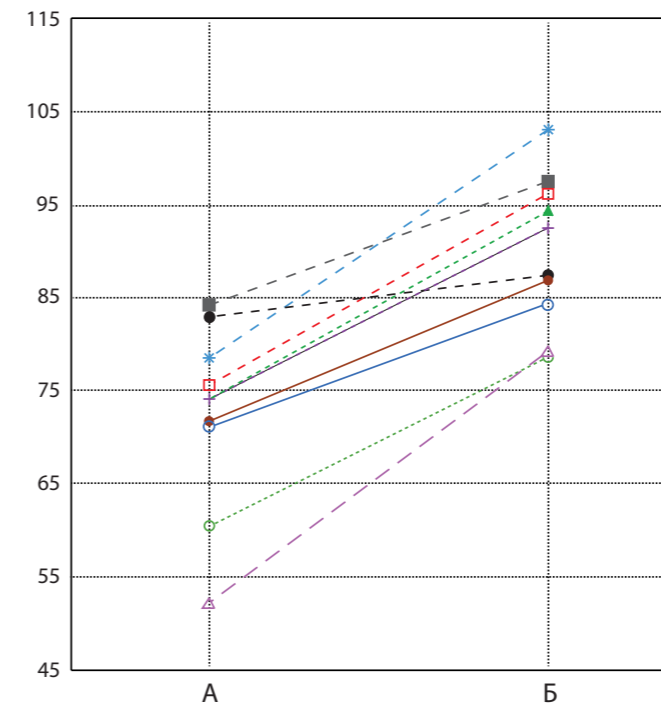


Рис. 2. Изменение плотности микрососудов костного мозга у 10 больных множественной миеломой до и после мобилизации гемопоэтических стволовых клеток крови с использованием циклофосфида и Г-КСФ: А — до начала мобилизации ГСК; Б — после завершения инъекций Г-КСФ

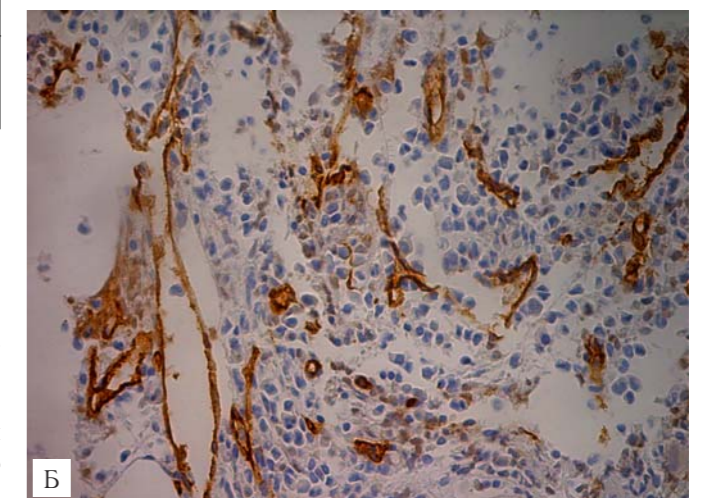
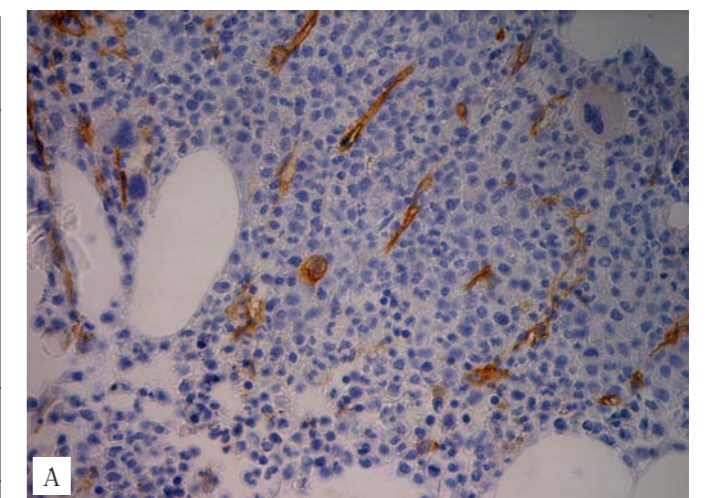


Рис. 3. Микрососуды при иммуногистохимическом исследовании костного мозга у больного множественной миеломой до и после мобилизации гемопоэтических стволовых клеток крови с использованием циклофосфида и Г-КСФ (×400, окрашивание моноклональным антителом CD34): А — до мобилизации ГСК; Б — после мобилизации ГСК

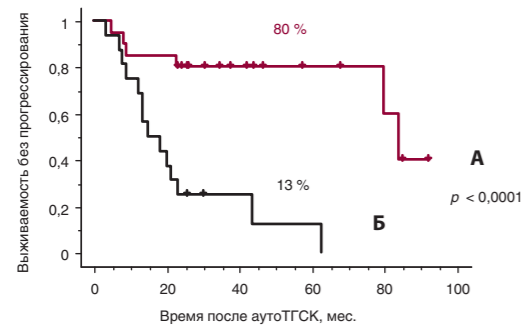
ММ наблюдалась в ближайшие сроки [27–29]. В. Barlogie и соавт., проанализировав отдаленные результаты лечения ММ по программе Тотальной терапии-2, показали, что достижение ПР сопровождается и более высокими показателями общей выживаемости [30]. Аналогичную закономерность отмечали J.S. Kim и соавт., изучавшие влияние фазы заболевания перед аутоТГСК на общую выживаемость больных после трансплантации. При медиане посттрансплантационного наблюдения 22,4 мес. (диапазон 0,4–96 мес.) общая выживаемость пациентов с документированной ПР перед трансплантацией значительно превышала таковую у пациентов, трансплантация которым выполнялась на фоне лишь ЧР ( $p = 0,0015$ ) [31].

В нашем исследовании также были сопоставлены отдаленные результаты высокодозной химиотерапии с последующей аутоТГСК в зависимости от фазы заболевания на момент выполнения трансплантации. Больные были разделены на две группы: в 1-ю группу включено 20 пациентов, у

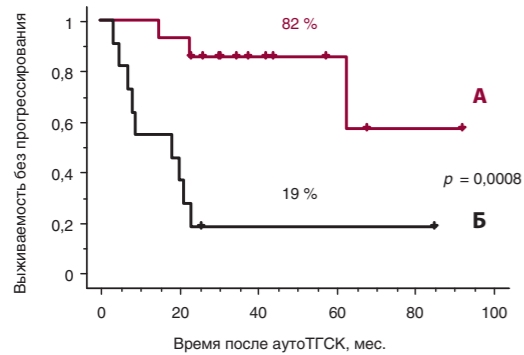
которых перед трансплантацией была подтверждена ПР или очень хорошая ЧР, во 2-ю группу — 16 пациентов, у которых в результате всех индукционных мероприятий удалось достичь лишь ЧР или МО. Как видно на рис. 4, вероятность ВБП в течение 5 лет после трансплантации составляла 80 % у больных 1-й группы, у которых определялся высокий противоопухолевый ответ на индукционную терапию, в

Таблица 1. Изменение количества микрососудов в гистологических препаратах костного мозга у больных множественной миеломой на каждом этапе интенсивной терапии

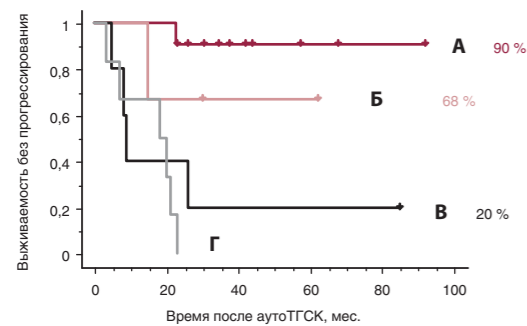
Этап	Время исследования	Характеристика противоопухолевого ответа	Количество микрососудов в 1 мм <sup>2</sup> КМ (M ± m)	p
1	До начала терапии		96,0 ± 5,3 (66,7–139,6)	
2	После индукции	ПР + очень хорошая ЧР = 44,5 % ЧР = 47,2 % МО = 8,3 %	78,6 ± 3,9 (52,2–135,5)	$p_{1,2} = 0,0001$
3	Перед первой аутоТГСК	ПР + очень хорошая ЧР = 55,5 % ЧР = 41,7 % МО = 2,8 %	68,6 ± 3,4 (49,1–111,3)	$p_{2,3} = 0,0001$
4	Через 3 мес. после завершения трансплантационной методики	ПР + очень хорошая ЧР = 77,8 % ЧР = 19,4 % МО = 2,8 %	60,8 ± 1,8 (43,4–78,0)	$p_{3,4} = 0,009$
5	Здоровые доноры КМ		46,8 ± 2,0 (36,5–55,3)	$p_{4,5} = 0,001$



**Рис. 4.** Выживаемость без прогрессирования больных множественной миеломой в зависимости от фазы заболевания перед первой трансплантацией ( $n = 36$ ): А — полная ремиссия + очень хорошая частичная ремиссия; Б — частичная ремиссия + минимальный ответ



**Рис. 5.** Выживаемость без прогрессирования больных множественной миеломой в зависимости от количества микрососудов в костном мозге перед первой трансплантацией ( $n = 25$ ): А — количество микрососудов менее 68,6/мм<sup>2</sup>; Б — количество микрососудов более 68,6/мм<sup>2</sup>



**Рис. 6.** Выживаемость без прогрессирования больных множественной миеломой в зависимости от сочетания двух признаков: количество микрососудов в костном мозге и ответ на терапию перед аутоТГСК ( $n = 25$ ): А — низкая плотность микрососудов + полная и очень хорошая частичная ремиссия; Б — низкая плотность микрососудов + частичная ремиссия и минимальный ответ; В — высокая плотность микрососудов + полная и очень хорошая частичная ремиссия; Г — высокая плотность микрососудов + частичная ремиссия и минимальный ответ

отличие от 13 % у больных 2-й группы, достигших перед трансплантацией лишь ЧР и МО.

Поскольку на предыдущих этапах данного исследования была выявлена четкая взаимосвязь между плотностью микрососудов в КМ и степенью выраженности противоопухолевого ответа, нами была предпринята попытка определить наличие зависимости между количеством микрососудов в КМ перед аутоТГСК и показателями посттрансплантационной ВБП.

Среднее значение плотности микрососудов перед первой аутоТГСК составляло  $68,6 \pm 3,4/\text{мм}^2$ . Больные

были разделены на две группы в зависимости от количества микрососудов в гистологическом препарате. В 1-ю группу включено 14 пациентов, у которых количество микрососудов перед трансплантацией было ниже среднего значения ( $49,1-65,4/\text{мм}^2$ ). Во 2-ю группу вошло 11 пациентов с содержанием микрососудов в КМ более  $68,6/\text{мм}^2$  ( $69,2-111,3/\text{мм}^2$ ). Затем была проанализирована вероятность ВБП в зависимости от количества сосудов в КМ перед первой аутоТГСК. Как показано на рис. 5, вероятность 5-летней ВБП составляла 82 % у больных 1-й группы с малым количеством микрососудов в КМ перед трансплантацией в отличие от 19 % у больных 2-й группы с высоким содержанием микрососудов в КМ ( $p = 0,0008$ ).

Итак, результаты проведенных сопоставлений позволили прийти к заключению, что посттрансплантационная ВБП статистически значимо зависела как от количества микрососудов в КМ, так и от степени противоопухолевого ответа, документированного на момент выполнения первой аутоТГСК.

Кроме того, было выполнено сравнительное исследование отдаленных результатов аутоТГСК у больных ММ в зависимости от различного сочетания перед трансплантацией двух изучаемых нами признаков: количество микрососудов в КМ и степень противоопухолевого ответа. Кривые ВБП, представленные на рис. 6, демонстрируют наилучшие 5-летние результаты (90 %) у больных с низкой плотностью микрососудов и ПР + очень хорошая ЧР перед выполнением аутоТГСК. Весьма оптимистичны эти показатели (68 %) и в группе больных с низкой плотностью сосудов и ЧР + МО. Значимо хуже показатели 5-летней ВБП (20 %) у пациентов с высокой плотностью микрососудов даже при наличии ПР или очень хорошей ЧР. При этом у всех пациентов из группы с высокой плотностью микрососудов и слабым противоопухолевым ответом прогрессия заболевания была выявлена в течение 2 лет после аутоТГСК (см. рис. 6).

Зарубежные исследователи, изучая ангиогенез при ММ, обратили внимание на зависимость ВБП от плотности микрососудов в КМ, выявленной в дебюте заболевания [20]. В анализ был включен 21 больной ММ, большинству из которых ( $n = 15$ ) выполняли стандартную химиотерапию и лишь 6 больным — высокодозную химиотерапию с последующей аутоТГСК. По результатам терапии все пациенты были разделены на две группы: в 1-ю вошли достигшие ПР или ЧР, во 2-ю группу — не ответившие на терапию. До начала лечения медиана плотности микрососудов в КМ не отличалась в двух группах. После завершения терапии число микрососудов в КМ снизилось в целом на 58 % у пациентов, ответивших на лечение, медиана ВБП в этой группе составила 23,3 мес. У больных 2-й группы, не ответивших на лечение, плотность микрососудов практически не изменилась и медиана их ВБП была всего 7,1 мес.

В нашем исследовании основной акцент был сделан на исследование плотности микрососудов в КМ перед аутоТГСК. На основании полученных результатов отмечено, что ВБП была значимо выше у тех пациентов, у которых количество микрососудов в КМ перед трансплантацией было менее  $68,6/\text{мм}^2$  вне зависимости от достигнутого на этот момент противоопухолевого ответа. Именно количество микрососудов в КМ стало признаком, определяющим вероятность сохранения ремиссии после аутоТГСК, опережая по значимости противоопухолевый ответ, достигнутый на этапе индукционной терапии.

В рамках данной работы было проведено сопоставление показателей плотности микрососудов в КМ в дебюте заболевания с некоторыми клинико-лабораторными параметрами — факторами неблагоприятного прогноза течения

ММ. В анализ были включены такие параметры, как уровень альбумина и  $\beta_2$ -микроглобулина в момент диагностики, процентное содержание плазматических клеток в КМ, стадия заболевания, наличие делеции хромосомы 13. Оказалось, что количество микрососудов статистически значимо коррелирует с уровнем альбумина в дебюте заболевания и стадией заболевания.

Так, у пациентов со II стадией ММ количество микрососудов в КМ исходно составляло  $66,6-113,2/\text{мм}^2$  (в среднем  $89,1 \pm 6,1/\text{мм}^2$ ) и было статистически значимо меньше, чем у пациентов с III стадией ММ ( $74,2-139,6/\text{мм}^2$ , в среднем  $102,9 \pm 8,3/\text{мм}^2$ ;  $p = 0,02$ ).

У пациентов с наличием такого неблагоприятного фактора, как низкий уровень альбумина ( $< 35$  г/л), количество микрососудов в КМ составило  $92,5-139,6/\text{мм}^2$  (в среднем  $111,7 \pm 9,2/\text{мм}^2$ ), в то время как у пациентов с нормальным уровнем альбумина в дебюте заболевания количество микрососудов было статистически меньше ( $p < 0,0001$ ) и равнялось  $66,6-112,6/\text{мм}^2$  (в среднем  $86,6 \pm 4,4/\text{мм}^2$ ).

Корреляция между количеством микрососудов в КМ и уровнем  $\beta_2$ -микроглобулина, наличием делеции хромосомы 13, а также процентным содержанием плазматических клеток в КМ в дебюте заболевания выявлено не было.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование состояния ангиогенеза при ММ на различных этапах лечения позволило определить некоторые дополнительные факторы, характеризующие биологию опухоли. Оказалось, что величина плотности микрососудов в КМ перед аутоТГСК служит более важным прогностическим показателем, чем уровень секреции парaproтеина и содержание плазматических клеток в КМ. Именно количество микрососудов в гистологическом препарате КМ определяет вероятность продолжительной ВБП после аутоТГСК.

Результаты нашей работы свидетельствуют о высокой значимости исследования плотности микрососудов в КМ непосредственно перед выполнением аутоТГСК. Так, в группе больных, у которых количество микрососудов в КМ перед трансплантацией было менее  $68,6/\text{мм}^2$ , медиана ВБП не достигнута в течение 90 мес. после аутоТГСК, в то время как у пациентов с более высокими показателями плотности сосудов медиана ВБП не превысила 20 мес. Анализ показателей ВБП в зависимости от сочетания двух параметров — количества микрососудов и фазы заболевания перед аутоТГСК — позволил определить группу пациентов, применение высокодозного мелфалана у которых представляется особо целесообразным в качестве консолидирующего этапа лечения. Именно в группе больных с низким содержанием микрососудов в КМ перед трансплантацией этот вид терапии сопровождается наивысшими показателями ВБП.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gupta M.K., Qin R.Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. World J. Gastroenterol. 2003; 3: 1144–55.
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med. 2000; 6(4): 389–95.
3. Dvorak H.F., Nagy J.A., Feng D. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr. Top Microbiol. Immunol. 1999; 237: 97–132.

4. Aznavoorian S., Murphy A.N., Stetler-Stevenson W.G., et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. Cancer 1993; 71: 1368–83.
5. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 1757–63.
6. Acenero M.J., Gonzales J.F., Gallego G.M. et al. Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. J. Clin. Oncol. 1998; 16: 1684–8.
7. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R. et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 1991; 324: 1–8.
8. Chaudhary R., Bromley M., Clarke N.W. et al. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder. Anticancer Res. 1999; 19: 3479–84.
9. Gallego G.M., Acenero M.J., Sanz Ortega J. et al. Vascular enumeration as a prognosticator for colorectal carcinoma. Eur. J. Cancer 2000; 36: 55–60.
10. Graham C.H., Rivers J., Kerbel R.S. et al. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin ( $< 0,76$  mm) malignant melanomas. Am. J. Pathol. 1994; 145: 510–4.
11. Perez-Atayde A., Sallan S., Tedrow U. et al. Spectrum of tumour angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. Am. J. Pathol. 1997; 150: 815–21.
12. Hussong J.W., George M.P., Shami P.J. et al. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. Blood 2000; 95: 309–13.
13. Salven P., Teerenhovi L., Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997; 90: 3167–72.
14. Bertolini F., Paolucci M., Peccatori F. et al. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. Br. J. Haematol. 1999; 106: 504–9.
15. Vacca A., Ribatti D., Roncali L. et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. Br. J. Haematol. 1994; 87: 503–8.
16. Rajkumar S.V., Fonseca R., Witzig T.E. et al. Bone marrow angiogenesis in complete responders after stem cell transplantation for multiple myeloma. Leukemia 1999; 13: 469–72.
17. Rajkumar S.V., Mesa R.A., Fonseca R. et al. Bone Marrow Angiogenesis in 400 Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Multiple Myeloma, and Primary Amyloidosis. Clin. Cancer Res. 2002; 8: 2210–6.
18. Sezer O., Niemoller K., Eucker J. et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. Ann. Hematol. 2000; 79: 574–7.
19. Munshi N., Wilson C.S., Penn J. et al. Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma: poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies. Blood 1998; 92(Suppl. 1): 98a (abstr.).
20. Sezer O., Niemoller K., Kaufmann O. et al. Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients achieving a remission after chemotherapy. Eur. J. Haematol. 2001; 66: 238–44.
21. Niemoller K., Jakob C., Heider U. et al. Bone marrow angiogenesis and its correlation with other disease characteristics in multiple myeloma in stage I versus stage II-III. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2003; 129: 234–8.
22. Barlogie B., Jagannath S., Desikan K.R. et al. Total Therapy With Tandem Transplants for Newly Diagnosed Multiple Myeloma. Blood 1999; 93: 55–65.
23. Менделеева Л.П., Покровская О.С. Протокол высокодозной химиотерапии и трансплантации аутологичных стволовых гемопоэтических клеток при множественной миеломе. В: Программное лечение лейкозов. Под ред. В.Г. Савченко. М., 2008: 358–99.
24. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br. J. Haematol. 2003; 121: 749–57.
25. Durie B.G.M., Harousseau J.-L., Miguel J.S. et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 2006; 20: 1467–73.
26. Ohki Yu., Heissig B., Sato Y. et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. FASEB J. 2005; 19(14): 2005–7.
27. Barlogie B., Jagannath S., Desikan K.R. et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed patients. Blood 1999; 93: 55–65.
28. Lenhoff S., Hjorth M., Turesson I. et al. Intensive therapy for multiple myeloma in patients younger than 60 years. Long-term results focusing on the effect of the degree of response on survival and relapse pattern after transplantation. Haematologica 2006; 91: 1228–33.
29. Sonneveld P., van der Holt B., Segeren C.M. et al. Intermediate-dose melphalan compared with melphalan treatment in multiple myeloma: long-term follow-up of the Dutch Cooperative Group Hovon 24 trial. Haematologica 2007; 92: 928–35.
30. Barlogie B., Pineda-Roman M., van Rhee F. et al. Thalidomide arm of Total Therapy 2 improves complete remission duration and survival in myeloma patients with metaphase cytogenetic abnormalities. Blood 2008; 112(8): 3115–21.
31. Kim J.S., Kim K., Cheong J.W. et al. Complete remission status before autologous stem cell transplantation is an important prognostic factor in patients with multiple myeloma undergoing upfront single autologous transplantation. Bio. Blood Marrow Transplant. 2009; 15: 463–70.