

На правах рукописи

Буравцова Иоланта Валентиновна

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ
И ИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ТЕЧЕНИЯ
МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

14.01.21. – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва

2012 г.

Работа выполнена в Государственном учреждении « Московский областной научно-исследовательский клинический институт » им. М.Ф. Владимирского

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Голенков Анатолий Константинович

доктор биологических наук Карамышева Аида Фуадовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Ковалёва Л.Г.

доктор медицинских наук Шишина Р.Н.

Ведущее научное учреждение:

ФГУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России,
Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «27» марта 2012 года в часов

На заседании Диссертационного Совета Д 208.050.01.

При Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

По адресу: 117918, Москва, ул. Саморы Машела, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва» Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан «.....».....2012г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,

доктор медицинских наук, профессор

Чернов В.М.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Изучение опухолевого ангиогенеза при множественной миеломе (ММ) имеет важное значение для понимания особенностей патогенеза опухолевого роста, клинических проявлений болезни, вопросов диагностики и ответа на цитостатическую терапию. Эта проблема достаточно полно представлена в исследованиях, касающихся солидных опухолей (Folkman J., 1994; Ferrara N., 1995). Была сформулирована гипотеза, свидетельствующая о том, что жизнеспособность микрокластеров опухолевых клеток может обеспечиваться ростовыми факторами микроокружения. Однако дальнейший рост опухоли невозможен без формирования опухолевой сосудистой сети. В связи с этим при ММ, относящейся к злокачественным системным В-клеточным лимфопролиферативным процессам, некоторые клинические симптомы могут быть уточнены с помощью изучения ангиогенной активности опухолевых плазмочитов. Основанием для этого также служат клинические данные, указывающие на неоднородный характер опухолевого роста при множественной миеломе и различия в клиническом течении. Известно, что у 30% больных ММ возникает такой тяжелый клинический синдром, как опухолевая компрессия спинного мозга, за счет экстрадурального роста крупного миеломного узла (Голенков А.К., Шабалин В.Н., 1995). Появление видимых опухолей при ММ является закономерным признаком болезни, который может служить критерием эффективной терапии при его уменьшении после лечения (Бессемельцев С.С., Абдулкадыров К.М., 2007). Очаги остеолита, связанные с узловым типом роста в костном мозге, также являются признаком болезни и служат одним из критериев её стадирования. В то же время встречаются формы ММ с диффузным типом опухолевого

роста. Это отчётливое различие клинических вариантов болезни может быть объяснено с позиций изучения активности ангиогенеза. Об интересе к этой проблеме при ММ свидетельствуют исследования, посвящённые изучению экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов. Результаты этих исследований говорят о различной активности генов ангиогенеза при ММ и моноклональной гаммопатии неясного генеза (MGUS), коррелирующей с различными величинами плотности сосудов костного мозга по данным иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов костного мозга (Карамышева А.Ф., 2000; Vacca A. et al 2006). Актуальность данной проблемы подтверждается ещё и тем, что исследования ангиогенеза в солидных опухолях послужили основанием для создания лекарственных препаратов, блокирующих ангиогенез в опухолевых клетках, которые на сегодняшний день используются в клинической практике в сочетании с противоопухолевыми препаратами. Современные таргетные антиангиогенные препараты могут быть эффективны и у больных ММ с активным ангиогенезом.

Цель исследования

Установить значение активности ангиогенеза, оцениваемой по экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D* и их рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3* в моноклеарной фракции аспиратов костного мозга с преобладанием опухолевых плазматических клеток при различных вариантах течения ММ.

Задачи исследования

1. Проанализировать экспрессию генов факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*) у больных ММ с различными клиническими вариантами течения заболевания.

2. Сопоставить экспрессию генов факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*) с цитологическими и клиническими характеристиками больных ММ.

Научная новизна.

Установлено, что в мононуклеарной фракции аспириатов костного мозга с преобладанием опухолевых плазматических клеток больных ММ гены факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*) экспрессируются с различной интенсивностью, что позволило выделить две группы больных с высокой и низкой активностью экспрессии.

Установлено, что в группе с высокой экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*) количество кластеров плазматических клеток и сосудов в аспириатах костного мозга, степень остеолита в костях скелета больных ММ были достоверно выше, чем в группе с низкой экспрессией или ее отсутствием.

Отсутствие мРНК рецептора *VEGFR2*, единственного общего рецептора для всех исследуемых генов и основного рецептора для *VEGF-A* у 91% больных, позволило высказать предположение о независимости двух сигнальных систем: *VEGF-A/VEGFR1* и *VEGF-C,VEGF-D/VEGFR3* у большинства больных.

Полученные результаты послужили основанием для разработки нового цитологического метода оценки прогноза различных вариантов течения ММ на основании подсчета количества кластеров миеломных клеток и сосудов в аспириатах костного мозга.

Научно-практическая ценность

Применение молекулярно-генетического анализа экспрессии генов семейства *VEGF* и их рецепторов вместе с оценкой цитологической характеристики аспиратов костного мозга у больных ММ позволят более полно проводить диагностику заболевания. Определение экспрессии генов семейства *VEGF* и их рецепторов совместно с подсчетом количества кластеров опухолевых плазмоцитов и сосудов в аспиратах костного мозга больных ММ расширяет диагностические возможности стандартного цитологического метода, придавая ему прогностическое значение. Введение новой оценочной категории с подсчетом количества кластеров опухолевых плазмоцитов и сосудов в описательную часть миелограммы, является основанием для перспективной оценки течения болезни, остаточной опухоли, появления гематологического рецидива. (Разрешение на выдачу патента на изобретение № 20101338337/15(047969)).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга с преобладанием опухолевых плазматических клеток больных ММ экспрессированы гены факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*).
2. Выделены две группы больных с ММ по наличию или отсутствию экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов (*VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D*) и их рецепторов (*VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*), которые имеют различные цитологические и клинические характеристики.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, 8 в отечественной, 2 в зарубежной литературе, в том числе в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК – 1.

Апробация работы

Работа апробирована на заседании совместной научной конференции сотрудников отделений клинической гематологии и иммунотерапии, отделения детоксикации, кафедры онкологии и торакальной хирургии, отделения терапевтической эндокринологии, клинико-диагностической лаборатории, лаборатории клинической иммунологии ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза ГУ РОНЦ им.Н.Н. Блохина.

Основные положения диссертации доложены на XIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» Москва 16-20 апреля 2007 г., заседании общества гематологов Московской области «Современные методы диагностики и лечения множественной миеломы» 15-17 февраля 2008 г., заседании общества гематологов Московской области «Современные методы диагностики и лечения лимфопролиферативных заболеваний» 16-18 мая 2008г., II научно-практической конференции «Современная гематология. Проблемы и решения» Москва 20-21 ноября 2008 г., научно-практической конференции общества гематологов Московской области «Современные аспекты диагностики и лечения больных множественной миеломой» 21- 23 мая 2010 г., V научно-практической конференции «Современная гематология. Проблемы и решения» Москва 2-3 ноября 2011 г..

Объем и структура работы

Работа изложена на 88 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 16 рисунков. Диссертация состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, 2 главы по результатам собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Указатель литературы содержит 129 библиографических источников (7 отечественных и 122 зарубежных авторов).

Работа проводилась в период с апреля 2004 г. по апрель 2010 г. на базе отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГУ МОНКИ им. М.Ф. Владимирского (руководитель – проф., д.м.н. А.К. Голенков), молекулярно - генетическое исследование проводили совместно с Н.Н. Калитиным, аспирантом лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза ГУ РОНЦ им.Н.Н. Блохина (руководитель - проф., д.б.н. А.А. Ставровская), цитологическое исследование аспиратов костного мозга выполнено старшим научным сотрудником клинико-диагностической лаборатории ГУ Московского областного научно-исследовательского института им. М.Ф. Владимирского, к.м.н. Н.В. Инюткиной (руководитель д.м.н., профессор С.А. Шатохина). Статистическая обработка результатов общей выживаемости выполнена в лаборатории биostatистики и информационных систем ФБГУ ГНЦ МЗ и СР РФ Б.В. Зингерманом.

Содержание работы

Характеристика больных и методы исследования

В исследование включено 33 больных с III ст. ММ в возрасте от 37 до 75 лет, из них мужчин было 14, женщин – 19. Диагноз устанавливали на основании жалоб больных, связанных с основным заболеванием - боли в костях различной интенсивности, боли в поясничном отделе позвоночника,

обусловленные корешковым синдромом. Видимые опухоли отмечены у 3 больных. Диагноз подтверждали цитологическим исследованием аспиратов костного мозга, где выявлялась плазмноклеточная инфильтрация у всех больных. Всем больным проведена рентгенография костей скелета в двух проекциях. Генерализованный остеолитический синдром диагностирован у 24 из 33 больных. У 8 больных с упорными корешковыми болями выявлен внутриспинальный опухолевый рост без симптомов компрессии спинного мозга по данным ЯМРТ позвоночника. Иммунохимическое исследование белков сыворотки крови и мочи выполнено у 31 из 33 больных. Выявленная моноклональная секреция парапротеина распределилась следующим образом: G κ - 15 пациентов, G λ - 4 пациента, G κ VJ κ - 4 пациента, G λ VJ λ - 2 пациента, A κ - 2 пациента, A λ - 2 пациента, M κ - 1 пациент, VJ λ — 1 пациент. К моменту начала настоящего исследования 23 пациента были первичными, 9 – резистентны к проводимой ранее цитостатической терапии, у 1 пациента зафиксирован рецидив. Индукционный период лечения включал от 6 до 8 курсов цитостатической терапии по протоколу M-2 (циклофосфан, мелфалан, винкристин, преднизолон, нитрозомочевина). Поддерживающую терапию проводили по протоколу M-2 1 раз в 3 мес. Лечение резистентных и рецидивных больных в дальнейшем проводили велкейдсодержащими программами, в одном наблюдении использовали ревлимид.

Выделение РНК из клеток костного мозга

После аспирации, клетки костного мозга наслаивали на Ficoll и центрифугировали, после чего на границе раздела фаз отбирали моноклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую преимущественно плазматические клетки. К осадку клеток добавляли Trizol. Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению света при длине волны 260 нм. Электрофорез выделенной РНК проводили в

1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Качество выделенной РНК оценивали визуально по наличию полос рибосомальной РНК.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Экспрессию мРНК генов, кодирующих факторы роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и рецепторы *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2* и *VEGFR3* определяли методом ОТ-ПЦР на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 1. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию β 2-микроглобулина. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали визуально в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры “Samsung CCTV LENZ”.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров

Анализируемый ген	Название праймера	Последовательность
VEGF-A	VEGF-F	5'-AGTGGTGAAGTTCATGGATGTC-3'
	VEGF-R	5'-TGGTCTATCTTTCTTTGGTCTG-3'
VEGF-C	VEGFc-F	5'-CAGTTACGGTCTGTGTCCAGTGTAG-3'
	VEGFc-R	5'-GGACACACATGGAGGTTAAAGAAG-3'
VEGF-D	Vd-F	5'-TCCAGATCCCTGAAGAAGATCGCTG-3'
	Vd-R	5'-ATGCTTTGCACATGCTGTTTTGC-3'
VEGFR1	FLT1-F	5'-CAGCTCCAAATATCTAGCTGTACC-3'
	FLT1-R	5'-GAGGACAAGAGTATGGCCTCTAAG-3'
VEGFR1s *	sFLT1-F	5'-GCACCTTGGTTGTGGCTGCTGAC-3'
	sFLT1-R	5'-AATGTTTTACATTAATTTGTGTGG-3'
VEGFR2	KDR-F	5'-ATGGCCTCTTCTGTAAGACACTCAC-3'
	KDR-R	5'-AAGAAGGGTATCCAGTTGAAGTC-3'
VEGFR3	FG-1s-F	5'-CTTGTCCGGTACCGGCGTCATC-3'
	FG-3as-R	5'-GAGGATCTTGAGCTCCGACATCAG-3'
B2m	A3-F	5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3'
	B3-R	

Цитологическая оценка аспиратов костного мозга больных ММ

При установке диагноза всем больным ММ проводилась стандартная цитологическая оценка аспирата костного мозга, окрашенного по Нохту (увеличение $\times 1000$). В дальнейшем, учитывая задачи исследования, проводился расширенный анализ аспиратов костного мозга больных ММ с подсчетом количества плазматических клеток, подсчетом количества кластеров плазматических клеток (клеточная структура, содержащая от трёх плазматических клеток) и количества сосудов в 1 поле зрения. В каждом аспирате костного мозга произведен подсчет 50 полей зрения, что является репрезентативной выборкой. Для контроля клеточного состава мононуклеарной фракции, проведена цитологическая оценка мазков. Мононуклеарная фракция костного мозга содержала от 74,2% до 93,6% опухолевых плазматических клеток.

Оценка остеодеструктивного процесса в костях скелета больных ММ

Критерии оценки остеолита разработаны в отделении клинической гематологии и иммунотерапии ГУ МОНКИ им. М.Ф. Владимирского. Для оценки выбирались 4 зоны: череп, ребра, позвоночник, таз.

Таблица 2. Критерии оценки остеолита

Степень остеолита	Баллы
Очагов остеолита нет	0
1 или 2 очага в 1 зоне	1
Множественные (≥ 3) очагов в 1 зоне и/или мягкотканый компонент	2

Характеристику распространенности остеолитического процесса получали при суммировании баллов (0-1-2) каждой из исследованных

рентгенологических зон костной системы (в двух проекциях). Минимальная оценка составляла 1 балл, максимальная – 8 баллов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась определением достоверности методом непрямых разностей (Монцевичюте – Эрингене Е.В., 1964). Общую выживаемость больных оценивали с помощью теста Wilcoxon-Gehan. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты анализа экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* у больных ММ представлены в табл. 3.

Таблица 3. Экспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D* у больных ММ

Число наблюдений	Экспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов <i>VEGF-A</i> , <i>VEGF-C</i> , <i>VEGF-D</i>		
	<i>VEGF-A</i>	<i>VEGF-C</i>	<i>VEGF-D</i>
33	24/33	13/33	7/33
	72,7%	39%	21,2%

Как видно из табл. 3, экспрессия гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* выявлена в 72,7%, ген *VEGF-C* экспрессирован у 39% больных. мРНК фактора роста *VEGF-D* представлена у 21,2%. Полученные результаты показывают, что мРНК основного фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* представлена у подавляющего большинства больных.

При анализе результатов экспрессии генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-R1*, *VEGF-R1s*, *VEGF-R2*, *VEGF-R3* (табл. 4) выявлены следующие показатели.

Таблица 4. Экспрессия генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3* у больных ММ

Число наблюдений	Гены рецепторов факторов роста эндотелия сосудов <i>VEGFR1, VEGFR1s, VEGFR2, VEGFR3</i>			
	VEGFR1	VEGFR1s	VEGFR2	VEGFR3
33	25/33	27/33	3/33	25/33
	75,7%	81,8%	9%	75,7%

Экспрессия гена рецептора *VEGFR1* выявлена в 75,7% случаев, ген растворимой формы рецептора *VEGFR1s* выявлен в 81,8%, экспрессия *VEGFR2* выявлена у 9%, экспрессия гена рецептора *VEGFR3* выявлена в 75,7%.

Из представленной табл. 4 видно, что экспрессия генов рецепторов *VEGFR1, VEGFR1s* и *VEGFR3* выявлена у подавляющего большинства больных ММ. Следует отметить, что экспрессия гена рецептора *VEGFR2* встречалась редко и была установлена только у 9% больных.

Представляло интерес проанализировать коэкспрессию генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D* (табл. 5).

Из табл. 5 видно, что в 24,2% случаев экспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов не отмечена, ген 1-го из факторов *VEGF* был экспрессирован у 9% больных, гены 2-х факторов *VEGF* – у 39,3%. В 3-х наблюдениях из 33 была обнаружена экспрессия генов 3-х факторов роста эндотелия сосудов.

Таблица 5. Коэкспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D* у больных ММ

Число наблюдений	Коэкспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов <i>VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D</i>			
	отсутствие экспрессии	экспрессия гена 1 фактора	экспрессия генов 2-х факторов	экспрессия генов 3-х факторов
33				

	8/33	8/33	14/33	3/33
	24,2%	24,2%	42,4%	9%

Исходя из представленных результатов можно сделать заключение о достаточно высокой частоте экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов при множественной миеломе: у 51,4% больных обнаружена коэкспрессия 2-х или 3-х генов исследованных факторов роста.

При изучении коэкспрессии генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов было установлено, что гены рецепторов факторов роста *VEGFR* были экспрессированы или коэкспрессированы у всех больных (табл. 6). Так ген 1-го из рецепторов был экспрессирован у 15,1% больных, гены 2-х рецепторов у 27,3%, 3-х рецепторов у 51,5% и 4-х рецепторов у 6% больных.

Таблица 6. Коэкспрессия генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3* у больных ММ

Число наблюдений	Коэкспрессия генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов <i>VEGFR1</i> , <i>VEGFR1s</i> , <i>VEGFR2</i> , <i>VEGFR3</i>				
	Отсутствие экспрессии	1 рецептор	2 рецептора	3 рецептора	4 рецептора
33	0/33	5/33	9/33	17/33	2/33
	0%	15,1%	27,3%	51,5%	6%

Высокая частота экспрессии генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов *VEGFR* свидетельствует о том, что опухолевые плазматические клетки, преимущественно содержащиеся в мононуклеарной фракции аспириатов костного мозга больных ММ, способны отвечать на сигналы факторов роста VEGF, секретируемых либо клетками стромы микроокружения, либо самими плазматическими клетками, тем самым поддерживая активность опухолевого роста.

Исходя из анализа экспрессии и коэкспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и их рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3* создавались предпосылки для разделения больных на группы по наличию или отсутствию экспрессии. В результате проведенного анализа мы выделили две группы больных. Группа из 24 больных с наличием и/или высокой экспрессией генов («васкулярный» тип) и группа из 9 больных с низкой и/или отсутствующей экспрессией («аваскулярный» тип). Распределение 33 больных на «васкулярный» и «аваскулярный» типы течения ММ представлены на рис. 1.



Рисунок 1. Распределение 33 больных ММ на «васкулярный» и «аваскулярный» типы течения

№ образца	<i>VEGF-A</i>	<i>VEGF-C</i>	<i>VEGF-D</i>	<i>VEGFR1</i>	<i>VEGFR1s</i>	<i>VEGFR3</i>	<i>VEGFR2</i>
ММ7	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue
ММ19	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Blue
ММ38	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Blue
ММ40	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
ММ41	Blue	Red	Blue	Red	Red	Red	Blue
ММ57	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
ММ58	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
ММ62	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue
ММ64	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue

«аваскулярный» типы течения

Приведенная ниже табл. 7 характеризует наличие или отсутствие экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов в

«аваскулярной» группе из 9 (27,3%) больных; наличие экспрессии обозначено красным цветом, отсутствие экспрессии - синим цветом.

Таблица 7. Оценка экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов в «аваскулярной» группе больных ММ

Из табл. 7 видно, что у 9 больных ММ установлено отсутствие экспрессии гена фактора роста *VEGF-A*, который является одним из основных факторов ангиогенеза. Экспрессия гена *VEGF-C* выявлена только у 1 больного этой группы. У этих же больных экспрессия гена фактора *VEGF-D* не выявлялась. В то же время следует отметить, что экспрессия гена рецептора *VEGFR1* выявлена у 5 из 9 больных. Высокая частота экспрессии гена растворимой молекулы *VEGFR1s* встречалась у 6 больных из 9. мРНК гена рецептора *VEGFR3* обнаружена у 5 больных из 9. При этом следует отметить полное отсутствие в данной группе больных экспрессии гена рецептора *VEGFR2*, основного рецептора для *VEGF-A*.

В табл. 8 дана оценка экспрессии генов в «васкулярной» группе из 24 (72,7%) больных с высокой экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов; наличие экспрессии обозначено красным цветом, отсутствие экспрессии - синим цветом.

Таблица 8. Оценка экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов в «васкулярной» группе больных ММ

№ образца	<i>VEGF-A</i>	<i>VEGF-C</i>	<i>VEGF-D</i>	<i>VEGFR1</i>	<i>VEGFR1s</i>	<i>VEGFR3</i>	<i>VEGFR2</i>
ММ1	Красный	Синий	Синий	Красный	Красный	Красный	Синий
ММ2	Красный	Синий	Синий	Синий	Синий	Красный	Синий
ММ3	Красный	Синий	Синий	Красный	Красный	Красный	Синий
ММ4	Красный	Синий	Красный	Красный	Красный	Красный	Синий
ММ5	Красный	Красный	Синий	Красный	Синий	Красный	Красный
ММ6	Красный	Синий	Синий	Красный	Красный	Красный	Синий
ММ8	Красный	Красный	Красный	Красный	Красный	Синий	Синий
ММ10	Красный	Красный	Синий	Красный	Красный	Синий	Синий

№	<i>VEGF- A</i>	<i>VEGF- C</i>	<i>VEGF- D</i>	<i>VEGFR1</i>	<i>VEGFR1s</i>	<i>VEGFR3</i>	<i>VEGFR2</i>
образца №							
MM11	<i>VEGF- A</i>	<i>VEGF- C</i>	<i>VEGF- D</i>	<i>VEGFR1</i>	<i>VEGFR1s</i>	<i>VEGFR3</i>	<i>VEGFR2</i>
образца №							
MM12							
MM13							
MM15							
MM17							
MM18							
MM23							
MM25							
MM29							
MM34							
MM35							
MM36							
MM37							
MM39							
MM44							
MM52							

(Продолжение таблицы 8.)

Как следует из табл. 8, у всех 24 больных этой группы была выявлена экспрессия гена фактора *VEGF-A* – одного из основных факторов ангиогенеза. Экспрессия генов факторов *VEGF-C* и *VEGF-D* встречалась в этой группе с меньшей частотой (12 и 7 больных соответственно), причем выявлялись случаи коэкспрессии 2-х и 3-х факторов. Также следует отметить, что при этом варианте ММ встречалась высокая частота экспрессии и коэкспрессии генов рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR1s* и *VEGFR3*. Экспрессия гена рецептора *VEGFR2* была установлена лишь у 3-х из 24 больных.

На основании проведенного изучения нами составлена логическая модель ангиогенеза при ММ. Опухолевая плазматическая клетка в подавляющем большинстве характеризуется активной функцией генов факторов роста эндотелия сосудов, включая ген, кодирующий один из

основных ангиогенных факторов – *VEGF-A*. В результате активной функции гена, синтезированный фактор выделяется в окружающую среду, где взаимодействует со своим рецептором VEGFR2, который представлен на эндотелии сосудов микроокружения, что стимулирует образование новых сосудов вокруг плазматической клетки. Следует отметить, что подобный рецептор практически не синтезируется на опухолевой плазматической клетке, что подтверждается нашими исследованиями, которые выявили активность этого гена лишь у 9% больных. Это обстоятельство имеет важный биологический смысл, который заключается в том, что взаимодействие VEGF-A со своими рецепторами не будет блокироваться опухолевой клеткой.

Кроме указанного главного механизма стимуляции ангиогенеза опухолевыми миеломными клетками, осуществляемого при взаимодействии VEGF-A с VEGFR2, существуют дополнительные механизмы, которые могут усиливать или подавлять ангиогенное воздействие опухолевой клетки на эндотелий сосудов. К дополнительным факторам, усиливающим ангиогенез, следует отнести фактор VEGF-D, который экспрессируется при ММ по нашим данным в 21,2% случаев. Как показали опубликованные исследования фактор VEGF-D обладает возможностью стимулировать лимфангиогенез и рост эндотелия сосудов при взаимодействии с VEGFR2. Аналогичные литературные данные известны и в отношении фактора роста VEGF-C. К факторам, блокирующим стимуляцию ангиогенеза опухолевой клеткой, следует отнести экспрессию растворимой формы рецептора VEGFR1s на плазматической клетке, который будет связывать некоторое количество фактора VEGF-A, конкурируя с расположенным на мембране клетки рецептором VEGFR1 за связывание с VEGF-A. Кроме того VEGFR1, локализованный на клетках стромы, также будет связывать фактор VEGF-A, снижая его взаимодействие с VEGFR2. Следует отметить, что расположенные на мембранах плазматических и стромальных клеток рецепторы VEGFR1 и

VEGFR3 могут связываться с экспрессируемыми этими клетками факторами роста семейства VEGF, обеспечивая тем самым аутокринный опухолевый рост.

Достаточно высокая активность экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов свидетельствует о возможности поддержания опухолевого роста как по аутокринному, так и по паракринному механизму. Группа больных с низкой экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов характеризуется наличием опухолевых плазмоцитов, которые не обладают ангиогенным воздействием на эндотелий сосудов микроокружения. Однако при наличии в этих опухолевых клетках экспрессии генов рецепторов поддержание их роста может обеспечиваться по паракринному механизму, за счет влияния на опухолевую клетку ангиогенных факторов VEGF стромального микроокружения. В связи с этим, данный тип ММ не будет характеризоваться интенсивным опухолевым ростом.

Полученные результаты позволяют нам выделить «васкулярный» (с наличием экспрессии генов) и «аваскулярный» (с отсутствием экспрессии генов) типы ММ, как самостоятельные патогенетически обусловленные варианты течения заболевания. Указание на подобные варианты течения болезни имеются и в работе (Vacca A., Ribatti D. 2006). При сравнительном анализе представленных результатов, прежде всего следует обратить внимание на различие экспрессии генов ангиогенеза у этих групп больных.

Так в «васкулярной» группе больных ММ мРНК генов факторов *VEGF-A*, *VEGF-C* и *VEGF-D* встречалась с частотой 100%, 50% и 29,1% соответственно. В то же время у больных «аваскулярной» группы экспрессия аналогичных генов практически отсутствовала и составляла 0%, 11,1% и 0% соответственно. В «васкулярной» группе больных частота встречаемости генов рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3* составила 83,3%,

95,8%, 12,5% и 29,1% соответственно. Следует также отметить меньшую частоту встречаемости экспрессии генов рецепторов факторов роста эндотелия сосудов у больных в «аваскулярной» группе по всем изучаемым рецепторам – *VEGFR1*, *VEGFR1s*, *VEGFR2*, *VEGFR3*, что составило 55,5%, 66,6%, 0%, 22,2% соответственно. Исходя из логической модели ангиогенеза, которая может быть сформулирована при анализе полученных данных, можно понять значение исследуемых генов в патогенезе опухолевого роста при ММ. В группе больных с «васкулярным» типом болезни опухолевые клетки имеют активно функционирующие гены факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторного аппарата. При этом возникают предпосылки для активации пролиферативной активности эндотелия сосудов микроокружения. Кроме того, активный рецепторный аппарат этих клеток воспринимает сигналы VEGF клеток стромы и самих опухолевых клеток, вызывая активацию их роста по аутокринному и паракринному механизмам. В группе больных с «аваскулярным» типом болезни опухолевые клетки не будут активировать эндотелий стромы микроокружения, а рецепторный аппарат клеток будет взаимодействовать только с факторами роста VEGF, секретлируемыми клетками стромы. В этом случае активность этих сигнальных систем будет ниже и в силу своей невысокой активности будет слабее активироваться опухолевый рост по аутокринному и паракринному механизмам.

Клиническая и цитологическая характеристика больных ММ с различной экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов.

В выделенных нами двух группах больных ММ, различающихся по наличию или отсутствию экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов, был проведен сравнительный анализ клинических и цитологических характеристик.

При дальнейшей расширенной цитологической оценке аспиратов костного мозга в двух группах больных получены следующие результаты. В табл. 9 представлен сравнительный анализ результатов подсчета кластеров миеломных клеток в аспиратах костного мозга у двух групп больных ММ.

Таблица 9. Количество кластеров плазматических клеток в аспиратах костного мозга в двух группах больных ММ с различной экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов

Группы больных	Количество больных	Среднее количество кластеров в 1 поле зрения	
		«васкулярный» тип	24
«аваскулярный» тип	9	0,48±0,08	

Как видно из табл. 9 две группы отличаются между собой по наличию кластеров в аспиратах костного мозга. Так в группе из 24 больных с «васкулярным» типом количество кластеров миеломных клеток в аспиратах костного мозга было достоверно больше, чем в группе из 9 больных с «аваскулярным» типом.

Дальнейший сравнительный анализ количества сосудов в аспиратах костного мозга в двух группах больных ММ представлен в табл. 10.

Таблица 10. Количество сосудов в аспиратах костного мозга в двух группах больных ММ с различной экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов

Название группы	Количество больных	Среднее количество сосудов в 1 поле зрения	
		«васкулярный» тип	24
«аваскулярный» тип	9	0,0075±0,001	

При оценке количества свободнолежащих сосудов и сосудов, находящихся в кластерах плазматических клеток, в аспиратах костного мозга больных ММ в двух группах получены достоверные различия по этой цитологической характеристике. Так количество микрососудов в аспиратах костного мозга было достоверно больше в группе больных с «васкулярным» типом ММ.

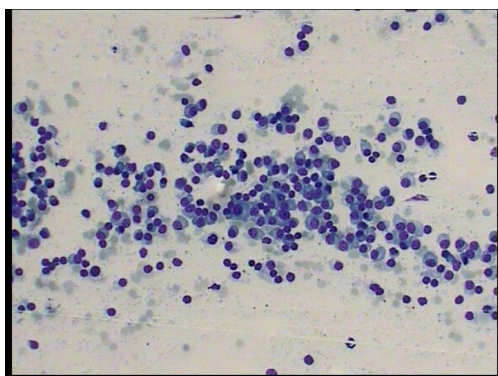


Рисунок 2. Костный мозг пациента ММ 64

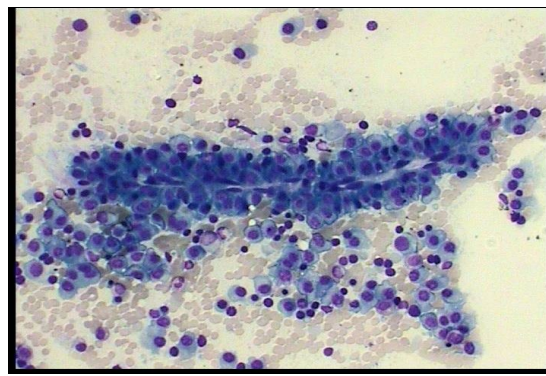


Рисунок 3. Костный мозг пациента ММ 11

На рис. 2 представлена цитограмма

костного мозга пациента ММ 64 Р.А.А. «аваскулярный тип», где выявляются поля плазмоцитов без формирования сосудов, в то время как на рис. 3 мы видим цитограмму пациента ММ 11 К.В.И. «васкулярный тип», где определяются множественные скопления кластеров плазматических клеток с сформированным сосудом внутри кластеров.

В связи с высоким количеством кластеров опухолевых клеток в аспиратах костного мозга больных с коэкспрессией генов *VEGF* и их рецепторов, представляло интерес проанализировать интенсивность остеолиза у этих больных. Дальнейшая оценка остеолитического процесса в костях скелета в двух исследованных группах выявила достоверные различия, что представлено в табл. 11.

Таблица 11. Характеристика остеолитического процесса у двух групп больных ММ с различной экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов

Название группы	Количество больных	Среднее количество баллов	
«васкулярный» тип	24	1,76±0,12	p < 0,06
«аваскулярный» тип	9	0,8±0,31	

Как видно из табл. 11, интенсивность остеолиза у больных с «васкулярным» типом была значительно больше, чем у больных с «аваскулярным» типом течения ММ.

При сравнении выживаемости двух групп, проведенном по тесту Wilcoxon-Gehan, были выявлены статистически значимые различия (рис. 4.).

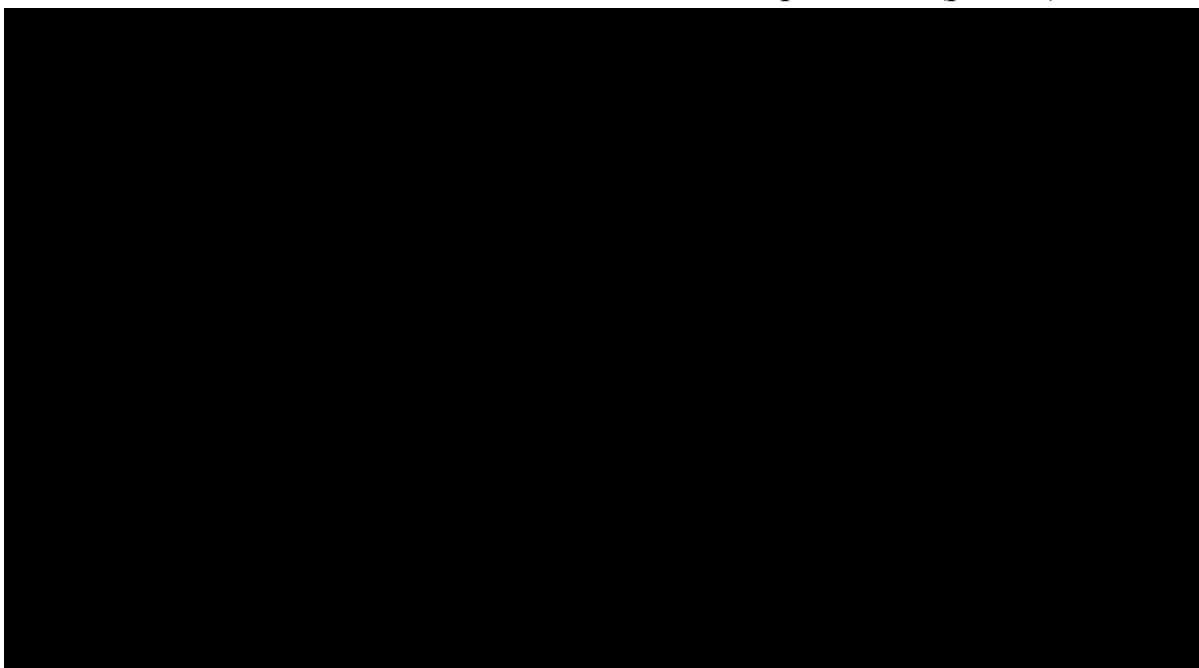


Рисунок 4. Выживаемость двух групп больных ММ с различной экспрессией генов

Как видно на рис. 4 в группе с «аваскулярным» типом выживаемость составила 67 месяцев, что достоверно выше, чем в группе с «васкулярным» типом течения, где выживаемость составила 29 месяцев.

Заключение

В результате проведенного диссертационного исследования полученные нами данные определили их высокую значимость для диагностики, расширения знаний патогенеза ММ и показали, что моноклеарная фракция костного мозга с преимущественным содержанием опухолевых плазматических клеток у больных ММ характеризуется различной степенью экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов. Экспрессия гена фактора роста *VEGF-A* установлена у 24 больных, *VEGF-C* у 13, *VEGF-D* у 7, *VEGFR1* у 25 больных, *VEGFR2* у 3, *VEGFR3* у 25. У 27 больных выявлена высокая экспрессия растворимой формы молекулы гена *VEGFR1s*. Интегральная оценка полученной экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов позволила разделить больных на две группы с высокой и низкой активностью генов. При проведении цитологического анализа аспиратов костного мозга двух групп больных, с высокой и низкой активностью генов, определены существенные различия в этих группах. В группе с наличием экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов количество кластеров и сосудов в аспиратах костного мозга больных ММ достоверно выше, чем в группе с низкой экспрессией или ее отсутствием. Данные проведенного исследования позволяют расширить возможности цитологической диагностики ММ за счет включения в оценку аспиратов костного мозга подсчета количества кластеров плазматических клеток, сосудов внутри кластеров и вне их. Повышенное количество кластеров, наличие сосудистых структур может быть фактором прогноза тяжелого течения болезни. Указанные две группы больных, сформированные по степени активности экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов были исследованы по распространенности остеолитического поражения. Было установлено, что остеодеструктивный процесс в костях скелета больных ММ в группе с наличием экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов был достоверно выше, чем в группе с

низкой экспрессией. Анализ общей выживаемости двух групп больных достоверно показал, что «аваскулярный» тип ММ (с низкой активностью экспрессии исследованных генов) имел большую медиану выживаемости, чем «васкулярный» тип (с наличием экспрессии).

Таким образом, проведенное диссертационное исследование позволило дать оценку процессам ангиогенеза при ММ и установить взаимосвязь с клиническими проявлениями и цитологическими характеристиками.

Выводы

1. Исследования показали, что моноклеарная фракция костного мозга с преимущественным содержанием опухолевых плазматических клеток у больных ММ характеризуются различной степенью экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов.
2. Экспрессия гена фактора роста *VEGF-A* установлена у 24 (72,7%) больных *VEGF-C* у 13 (39%), *VEGF-D* у 7 (21,2%), *VEGFR1* у 25 (75,7%) больных, *VEGFR2* у 3 (9%), *VEGFR3* у 25 (75,7%). У 27 больных (81,8%) выявлена высокая экспрессия растворимой формы молекулы гена *VEGFR1s*.
3. По экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов у пациентов с ММ выделены две группы больных: с высокой и низкой экспрессией генов *VEGF* и их рецепторов.
4. В группе с наличием экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов количество кластеров и сосудов в аспиратах костного мозга больных ММ достоверно выше, чем в группе с низкой экспрессией или ее отсутствием.

5. Клинический анализ показал, что остеодеструктивный процесс в костях скелета больных ММ в группе с наличием экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов был достоверно выше, чем в группе с низкой экспрессией.

6. В группе с низкой экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов медиана выживаемости была достоверно выше, чем в группе с наличием экспрессии и составляла 67 и 29 мес. соответственно.

Практические рекомендации

1. Оценку экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов при ММ следует проводить для более полной диагностики заболевания.

2. Введение новой оценочной категории в описательную часть миелограммы при ММ (подсчёт кластеров опухолевых плазмочитов) позволяет определить прогноз заболевания и может быть рекомендована к применению в широкой клинической практике.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Буравцова И.В., Голенков А.К., Седов К.В., Саблина Ю.А., Кузнецова И.Н. Характеристика экспрессии генов *VEGFs* и их рецепторов *VEGFRs* у пациентов с множественной миеломой с различным ответом на терапию. Материалы 111 Всероссийской научно-практической конференция «Общество, государство и медицина для пожилых» Москва 2006, с. 21.

2. Buravtsova I.V., Golenkov A.K. Characteristics of *VEGFs* genes' and their *VEGFRs* receptors' expression in patients with multiple myeloma with different response to therapy. EHA – Haematologica – the Hematology journal. Amsterdam, June 7 -10, 2006, 532. ABS № 1496.

3. Саблина Ю.А., Буравцова И.В., Какпакова Е.С., Карамышева А.И., Голенков А.К. Экспрессия факторов роста эндотелия сосудов *VEGF* и их рецепторов в аспиратах костного мозга больных множественной миеломой (ММ) до и после лечения. IV Съезд онкологов и радиологов СНГ, Баку 2006, с. 48-49.
4. Буравцова И.В., Голенков А.К., Карамышева А.Ф., Катаева Е.В., Дудина Г.А. Экспрессия генов ангиогенеза при множественной миеломе. Сборник материалов XIV Российского Национального Конгресса « Человек и Лекарство» 2007, Москва, с.606.
5. Буравцова И.В., Голенков А.К., Катаева Е.В., Дудина Г.А., Высоцкая Л.Л., Седов К.В. Характеристика экспрессии генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов у больных множественной миеломой. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва 2007, с.4.
6. Buravtsova I., Karamysheva A., Golenkov A. The characteristics of vascular endothelial growth factors (*VEGFs*) and receptors gene expression in bone marrow aspirates of patients with multiple myeloma (MM) before and after treatment. 19 th International Congress on Anti Cancer Treatment. France, 2008. Abstract book PB 25, p.288.
7. И.В.Буравцова, А.К. Голенков, А.Ф.Карамышева, Е.В.Катаева, Г.А.Дудина Экспрессия генов ангиогенеза при множественной миеломе. Тезисы докладов II научно-практической конференции «Современная гематология. Проблемы и решения» Москва 2008, с.13.
8. Буравцова И.В., Калитин Н.Н., Саблина Ю.А., Какпакова Е.С., Карамышева А.Ф., Ставровская А.А., Голенков А.К. Экспрессия мРНК генов факторов роста семейства *VEGF* и их рецепторов у больных множественной миеломой: сопоставление с цитологическими

характеристиками костного мозга. Российский биотерапевтический журнал №4, том 8, 2009, с.17-24. ВАК 1541.

9. Буравцова И.В., Инюткина Н.В., Дудина Г.А., Голенков А.К., Карамышева А.Ф., Какпакова Е.С., Ставровская А.А. Экспрессия генов факторов роста семейства VEGF и их рецепторов у больных множественной миеломой. III Всероссийская научно-практическая конференция «Цитофотометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва 2010, с. 6-8.

10. Буравцова И.В., Голенков А.К., Инюткина Н.В., Карамышева А.Ф. Эффективность иммуномодулирующей терапии с резистентной ММ и низкой экспрессией генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов. Тезисы докладов V научно-практической конференции «Современная гематология. Проблемы и решения», Москва, 2011, с. 11-12.