

### MOŽNOST PREDIKCE LÉČEBNÉ ODPOVĚDI NA AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI POMOCÍ STANOVENÍ VYBRANÝCH AKTIVÁTORŮ A INHIBITORŮ ANGIOGENEZE

### DETECTION OF ANGIOGENESIS ACTIVATORS AND INHIBITORS AS A PREDICTOR OF RESPONSE TO THERAPY WITH AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION

POUR L.<sup>1,3</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>2,3</sup>, SLANÝ M.<sup>3</sup>, KŘEN L.<sup>5</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> ÚSTAV PATOLOGIE, FN A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Význam inhibitorů angiogeneze na rozdíl od aktivátorů není u mnohočetného myelomu doposud zcela jasně definován. Naši hypotézou, kterou jsme ověřovali v této práci, bylo zvýšení hladiny inhibitorů u pacientů s dobrou léčebnou odpovědí, tedy zvýšená inhibice angiogeneze u těchto pacientů. ELISA metodou byly měřeny hladiny aktivátorů a inhibitorů angiogeneze v periferní plazmě u celkem 88 pacientů a plazmě kostní dřeně u celkem 95 pacientů. Pacienti byli rozděleni na skupiny podle dosažené léčebné odpovědi na tři skupiny: 1. alespoň velmi dobrá parciální remise (VGPR), 2. parciální remise (PR), 3. nedostatečná léčebná odpověď. Bylo porovnáno, zda se liší hladiny jednotlivých faktorů měřených v době stanovení diagnózy mezi pacienty s rozdílnou léčebnou odpovědí. Výsledky u skupiny 41 pacientů s  $\geq$ VGPR, byly zaznamenány signifikantně nižší hodnoty HGF než u skupiny 33 pacientů s dosaženou PR a u 14 pacientů s nedostatečnou léčebnou odpovědí. Stejně tak v plazmě kostní dřeně byla hodnota HGF nižší u pacientů s dosaženou VGPR oproti ostatním. U parametru trombospodinu byl v kostní dřeni prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami. U 14 pacientů s nedostatečnou odpovědí byla v porovnání s 36 pacienty s dosaženou, PR statisticky signifikantně nižší hodnota trombospodinu;  $p=0,036$ . Rovněž tak pacienti s dosaženou  $\geq$ VGPR vykazovali statisticky signifikantně vyšší hodnotu trombospodinu oproti pacientům s nedostatečnou léčebnou odpovědí ( $p=0,001$ ) a skupině pacientů s PR ( $p=0,049$ ). Hodnoty VEGF, bFGF, angiostatinu a endostatinu se v jednotlivých skupinách nelišily v PP ani PKD. Závěr: Vysoká hladina trombospodinu u pacientů dobře reagujících na transplantační léčbu, je novým, dosud nepublikovaným prognostickým markerem. Společně s prokázanou nižší hladinou aktivátoru HGF u pacientů s dobrou léčebnou odpovědí je potvrzením snížení angiogeneze u pacientů reagujících na léčbu.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, angiogeneze, ELISA, inhibitory angiogeneze, HGF.

#### Summary

Angiogenesis is involved in the development and progression of multiple myeloma (MM.) Role of angiogenesis activators in myeloma seems to be confirmed but role of angiogenesis inhibitors in MM remains very unclear. The aim of this study was to evaluate the role of VEGF, HGF, bFGF, thrombospondin, endostatin, and angiostatin peripheral plasma (PP) and bone marrow plasma (BM) levels in a group of patients with MM who underwent autologous stem cell transplant (ASCT) and their influence on treatment response.

Patients were divided into three groups according to treatment response: group A) 43 patients who achieved at least very good partial response (VGPR); group B) 35 patients who achieved partial response (PR); group C) 14 patients who did not achieve even PR. HGF concentration at the time of diagnosis in both PP and BM is significantly lower at group A (PP-median=472 pg/L; 95%IS 417-823pg/L. BM-median= 886 pg/L; 95%IS 928-2111pg/L) than at group B (PP-median=623 pg/L; 95%IS 493-990pg/L;  $p=0,025$  / BM-median= 1165 pg/L; 95%IS 1140-2656pg/L;  $p=0,001$  /) and group C (PP-median=1870 pg/L; 95%IS 522-4971pg/L;  $p=0,001$  / BM-median= 2605 pg/L; 95%IS 1328-5355pg/L;  $p=0,001$  /). Thrombospondin concentration at the time of diagnosis only in BM not in PP is significantly lower at group C (BM-median= 188 pg/L; 95%IS 38-678pg/L) than at group B (BM-median= 303 pg/L; 95%IS 249-705pg/L;  $p=0,036$ ) and group A (BM-median= 351pg/L; 95%IS 437-916pg/L;  $p=0,001$  /). VEGF, bFGF, endostatin and angiostatin concentrations at diagnosis time did not differ significantly in PP and BM in patients with VGPR, PR and no response. Our results confirmed that key angiogenesis activators in MM is HGF. If the treatment is successful low levels of HGF occurs only. There is important finding that thrombospondin in BM is higher in patients with successful treatment. It means, that angiogenesis is more inhibited in patients with VGPR than in other.

**Key words:** multiple myeloma, angiogenesis, ELISA, inhibitors of angiogenesis, HGF.

## příklady využití

### Úvod

Jedním z nových prognostických faktorů u pacientů s mnohočetným myelomem léčených autologní transplantací by mohlo být i hodnocení angiogeneze. Opakovaně bylo prokázáno, že vyšší vstupní hladiny aktivátorů angiogeneze, zejména HGF koreluje s horší prognózou onemocnění (3, 6). Hladiny inhibitorů a jejich vliv na stanovení prognózy nebyl zatím publikován na rozsáhlém souboru pacientů. Naše výsledky jsou navíc podpořeny metodickou prací (4). Cílem naší práce bylo určení, zda se hladiny vybraných aktivátorů a inhibitorů liší v době stanovení diagnózy u pacientů, kteří dosáhli dobré léčebné odpovědi oproti pacientům, kteří ji nedosáhli.

### Soubor pacientů, metodika a výsledky

Hodnoceny byly inhibitory thrombospondin, angiostatin, endostatin a aktivátory, dále hepatocytární růstový faktor (HGF), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF). Hodnocení probíhalo ze vstupního vzorku plazmy kostní dřeně a plazmy periferní krve. Pacienti byli rozděleni na skupiny podle dosažené léčebné odpovědi (Durie2006). V našem souboru pacientů bylo prokázáno, že pacienti s dosaženou alespoň VGPR (velmi dobrá parciální remise) mají v úvodu diagnózy nižší hodnoty HGF v periferní plazmě i v plazmě kostní dřeně a zároveň pacienti s dosaženou VGPR mají vyšší vstupní hodnoty trombospondinu v plazmě kostní dřeně oproti ostatním pacientům. Viz tabulky č.1,2,3. V ostatních parametrech nebylo dosaženo statisticky signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami pacientů rozdělených podle léčebné odpovědi.

### Závěr

Výsledky HGF jsou v souladu s citovanou literaturou (2, 5, 8). Vzhledem k provedené standardizaci metodiky měření jednotlivých faktorů má rovněž negativní výsledek týkající se korelace hladin VEGF a bFGF s léčebnou odpovědí velkou výpovědní hodnotu. Naše výsledky naznačují, že

nízká vstupní hladina HGF a vysoká hladina trombospondinu v kostní dřeně úzce souvisí s dobrou prognózou. Jedná se o první rozsáhlejší soubor pacientů, kde byly hodnoceny inhibitory angiogeneze. Zjištění, že u pacientů s MM a dobrou léčebnou odpovědí je angiogeneze inhibována více než u pacientů ostatních, může mít významný dopad nejen prognostický, ale i terapeutický.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	41	33	14
Průměr (SD)	620,8 (572,9)	741,8 (629,1)	2628,1(2534,2)
Medián	472,0	623,0	1810,0
95% IS	417,7 - 823,9	493,0 - 990,7	284,4 - 4971,9
Min. - max.	34 - 2600	70,4 - 2700	527 - 8000

Tabulka č. 1: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty HGF v periferní krvi jsou v pg/ml.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	45	36	14
Průměr (SD)	1519,8 (1800,4)	1898,5 (2029,1)	3080,0 (2960,7)
Medián	886,5	1165,0	1300,0
95% IS	928,0 - 2111,6	1140,8 - 2656,1	804,2 - 5355,8
Min. - max.	143 - 8000	159 - 8000	490 - 8000

Tabulka č. 2: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty HGF v plazmě kostní dřeně jsou v pg/ml.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	45	36	14
Průměr (SD)	676,7 (729,1)	492,3 (570,8)	358,6 (416,7)
Medián	351,5	303,0	188,0
95% IS	437,1 - 916,3	279,1 - 705,4	38,3 - 678,9
Min. - max.	7,1 - 2060	58,9 - 2060	52,3 - 1350

Tabulka č. 3: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty trombospondinu v plazmě kostní dřeně jsou v pg/ml.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Durie BG. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. Eur J Cancer. 2006 Jul;42(11):1539-43.
2. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. Br J Haematol (England), Dec 2002, 119(3) p665-71
3. Neben K, Moehler T, Kraemer A et al. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. Br J Haematol. 2001 Dec;115(3):605-8.
4. Pour L., Kovarova L., Büchler T., Penka M., Vorlicek J., Hajek R.: Evaluation of hepatocyte growth factor and endostatin in the bone marrow of patients with multiple myeloma and the effect of peripheral blood admixture. 10<sup>th</sup> International Myeloma Workshop, Sydney, Australia, 10-14 April 2005, Abstract in: Haematologica 90, 2005, Suppl. 1, 170, PO
5. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. Clin Cancer Res (United States), Aug 2000, 6(8) p3111-6
6. Sezer O, Jakob C, Eucker J, et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. Eur J Haematol (Denmark), Feb 2001, 66(2) p83-8
7. Ščudla V., et al.: Comparison of serum levels of selected biological parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. Vnitř Lek. 2006 Mar;52(3):232-40. Czech.
8. Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. Haematologica (Italy), Feb 2003, 88(2) p176-85