

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ  
И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО  
АГЕНТСТВА

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И  
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РАЗРЕШЕНИЕ НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ  
ФС № 2009/313 ОТ 4 СЕНТЯБРЯ 2009 Г.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И НЕКОТОРЫХ  
ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

(МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ)

Санкт-Петербург

2010

### **АННОТАЦИЯ**

В медицинской технологии приведены факторы риска, имеющие прогностическое значение: возраст больных, стадия заболевания, нарушение функции почек, тяжесть анемии и тромбоцитопении, выраженность опухолевой инфильтрации костного мозга, апоптотическая активность клеток костного мозга, распространенность остеолита. Выявлена взаимосвязь между факторами риска и влиянием их на частоту ответа на проводимую терапию и общую выживаемость больных множественной миеломой. Медиана общей выживаемости больных в возрасте  $\geq 70$  лет с низким показателем гемоглобина, креатининемией и высоким уровнем плазматических клеток в костном мозге составила 24 мес., а в возрасте  $< 70$  лет – 46 мес.

Доказана прогностическая значимость апоптотической активности клеток костного мозга больных для оценки эффективности специфической терапии и представлена методика ее определения.

Технология предназначена для врачей-гематологов и онкологов. Уровень внедрения: гематологические отделения многопрофильных больниц, специализированных онкологических больниц, онкологических диспансеров.

### **Авторы**

Доктор медицинских наук, профессор С. С. Бессмельцев

Засл. деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор К. М. Абдулкадыров

Доктор медицинских наук, профессор Л. Н. Бубнова

Научный сотрудник Ж. В. Чубукина

### **Рецензенты**

Профессор кафедры трансфузиологии и гематологии СПбМАПО,

заслуж. врач РФ, чл.-корр. ПАНИ, доктор медицинских наук И. Г. Дуткевич

Начальник НИО клинической иммунологии, главный научный сотрудник

ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России, д.м.н., профессор Н. М. Калинина

Заявитель: Федеральное государственное учреждение “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии” Федерального медико-биологического агентства

### **Список сокращений и условных обозначений**

ММ - множественная миелома

ПК – плазматические клетки

ХПН – хроническая почечная недостаточность

Me – медиана

ХТ – химиотерапия

FITC – флуоресцеинизотиоционат

ПИ – пропидий йодид

ФС – фосфатидилсерин

## СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	7
3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	7
4. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	7
5. ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	8
6. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ.....	13
7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	13
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	23

## ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование программ химиотерапии (ХТ), применение высокодозных режимов ХТ с проведением, в последующем, аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, в том числе двойной, а также внедрение новых лекарственных препаратов (талидомида, леналидомида, бортезомида) позволило существенно повысить количество полных и длительных ремиссий, увеличить общую, бессобытийную и безрецидивную выживаемость больных множественной миеломой (ММ). Тем не менее, ММ все еще остается некурабельным заболеванием, а указанные показатели широко варьируют в различных клиниках. Это обстоятельство диктует необходимость выявления факторов риска как при первичной диагностике заболевания, так и в продвинутых стадиях с целью определения адекватной лечебной тактики. К настоящему времени установлено важное прогностическое значение ряда клинико-лабораторных признаков ММ, оказывающих существенное влияние на течение заболевания. Степень изменений признаков у разных больных не одинакова, однако они в значительной мере определяют характер опухолевого процесса и длительность жизни больных [1].

Одним из факторов неблагоприятного прогноза является возраст больных ММ. Подавляющее большинство больных ММ – это лица пожилого возраста. Описаны лишь единичные пациенты с ММ моложе 30 лет, а сообщений о заболевании детей нет. При старении, как известно, наблюдается постепенное количественное и качественное истощение пула стволовых клеток. Это может быть следствием цитостатической терапии и остаточная регенеративная способность уцелевших нормальных клеток костного мозга и лимфоидной ткани оказывается недостаточной. К другим проявлениям процесса старения, которые отражаются на течении ММ, относятся снижение иммунного ответа и повышение восприимчивости к инфекциям. По результатам исследования P. Rodon et al. [2], медиана (Me) выживаемости больных в возрасте  $\geq 75$  лет не превышает 22 мес. Между тем, Me выживаемости больных моложе 40 лет, как показали исследования J. Blade et al. [3], в целом составила 54 мес., а у больных с сохранной функцией почек и низким уровнем  $\beta_2$ -м – 96 мес. Наряду с возрастом, к факторам неблагоприятного прогноза относят общесоматический статус ( $\geq$

2), высокий уровень креатинина и кальция в сыворотке крови ( $\geq 120$  мкмол/л и  $\geq 12$  мг/дл соответственно),  $\beta_2$ -м ( $> 4$  мг/л), С-реактивного протеина ( $> 6$  мг/л), пониженное содержание тромбоцитов ( $< 100 \times 10^9$ /л), частые инфекции, которые возникают преимущественно у пожилых пациентов, и недостаточный ответ на химиотерапию. Французская группа по изучению миеломы [4] приводит результаты обследования 91 больного ММ. По их мнению, факторами, оказывающими существенное влияние на прогноз, являются пониженный уровень гемоглобина, выраженная плазмноклеточная инфильтрация костного мозга и высокий уровень парапротеина в крови больных. Однако влияние различных факторов прогноза на выживаемость в преобладающем большинстве случаев связано с возрастом больных ММ. Так, 5-летняя выживаемость пациентов  $\geq 70$  лет с уровнем кальция в сыворотке крови  $< 12$  или  $\geq 12$  мг/дл составила 66,2 и 11,1% соответственно, а больных в возрасте  $< 70$  лет - 64,1 и 33,3% [5].

Любой вид терапии зачастую ведет к развитию резистентности, которая связана развитием множественной лекарственной устойчивости, и активизацией новых опухолевых клонов, скорость пролиферации которых опережает цитостатический эффект используемых препаратов. Лекарственная устойчивость представляет серьезное препятствие на пути успешного лечения большинства злокачественных новообразований. Полагают, что торможение апоптоза может быть тем механизмом, в следствии которого опухолевые клетки приобретают лекарственную устойчивость [6]. Лечение больных ММ в той или иной степени связано с попыткой восстановления способности клеток к апоптозу. Изучение апоптоза на клеточных культурах с помощью набора «классических» биохимических, микроскопических и более современных методов (проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции) позволяет получить наиболее четкие представления относительно механизмов гибели опухолевых клеток. В то же время вопросы прогнозирования характера течения ММ по апоптотической активности клеток остаются до конца не разрешенными. Нет ответа на вопрос, могут ли быть использованы характеристики апоптотической активности опухолевых клеток на этапе первичной диагностики заболевания для выработки адекватной лечебной тактики.

Многочисленность известных в настоящее время факторов прогноза при ММ не только демонстрируют вариабельность клинических проявлений болезни и активности патологического процесса, но и отсутствие точных клинических и лабораторных критериев, способных на современном уровне предопределить характер течения ММ и

выживаемость больных. Различные авторы придают неодинаковое значение отдельным клиническим и лабораторным признакам при оценке прогноза ММ. Однако не вызывает сомнения тот факт, что данные прогностические факторы могут быть использованы для оценки эффективности проводимой терапии этой тяжелой категории больных.

Медицинская технология «Прогностическое значение клинических признаков и некоторых лабораторных показателей при множественной миеломе» является новой, так как в ней впервые представлен ряд прогностических критериев, позволяющие выявить больных с высоким и низким риском прогрессии опухолевого процесса. Выявлена прогностическая значимость степени активности апоптоза плазматических клеток костного мозга на первом этапе диагностики для оценки эффективности назначенной терапии. Для определения апоптоза плазматических клеток предложен метод проточной цитометрии, позволяющий выявить ранние признаки данного процесса в клетке. Использование предложенных факторов прогноза будет основанием для назначения соответствующей адекватной терапии.

#### **ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

1. Множественная миелома, впервые выявленная.
2. Химиорезистентные формы множественной миеломы или рецидив заболевания в любой стадии патологического процесса.

#### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Противопоказаний нет.

#### **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

- Стандартное обеспечение клинико-диагностической лаборатории.
- Центрифуга лабораторная медицинская настольная с ротором ЦЛМН-Р10-01-«Элекон», ФЭР № гос. рег.2008/02873 (ООО «Элекон», Россия).
- Микроскоп биологический (лабораторный), ФС № гос.рег. 2005/314 (Leica Microsystems Weiziar GmbH, ФРГ).

- Дозаторы серии CAPP с принадлежностями, ФС № гос.рег. 2005/91 (Cappelen Laboratory Technics Aps, Дания).
- Реагенты диагностические *in vitro* для анализаторов коагулометрических и полуавтоматических, ФС № гос. рег. 2005/1968 (Instrumentation Laboratory Co., Instrumentation Laboratory S.p.A., Biokit S.A., СШФ, Италия, Испания)
- Реагенты и расходные материалы для биохимических анализаторов серии SYNCHRON®, ФС № гос.рег. 2005/926 («Beckman Coulter Inc.», США, ФРГ, Ирландия).
- Реагенты и расходные материалы для цитометрических исследований (набор реагентов для определения апоптоза «AnnexinV Kit»), ФС № гос.рег. 2005/1043 (Beckman Coulter Inc., Immunotech S.A.S., США, ФРГ, Франция).
- Лазерный проточный цитофлуориметр Cytomics FC 500 с принадлежностями, МЗ РФ № гос. рег. 2003/1665 («Beckman Coulter Inc.», США).

## **ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Суть данной медицинской технологии заключается в выявлении факторов риска у больных множественной миеломой, позволяющих прогнозировать течение опухолевого процесса, полноту ответа на терапию и выживаемость больных.

В представленной медицинской технологии приведены факторы риска, имеющие прогностическое значение: возраст больных, стадия заболевания, функция почек, тяжесть анемии и тромбоцитопении, выраженность опухолевой инфильтрации костного мозга, апоптотическая активность клеток костного мозга, распространенность остеолита.

Для выявления деструктивных изменений в костях скелета проводили рентгенологическое исследование костей скелета: рентгенографию черепа (снимок спереди и сбоку), всего позвоночника (спереди и сбоку), грудной клетки с верхней частью плечевой кости, костей таза с верхней частью бедренной кости. Костные повреждения оценивали согласно шкале, предложенной B.G.M. Durie, S.E. Salmon [7]: 0 – без изменений, 1 – остеопороз, 2 – умеренные литические повреждения, 3 – выраженные костные деструкции. Для установления стадии ММ использовали критерии системы стадирования, предложенные B.G.M. Durie, S.E. Salmon (1975 г.) и ISS-критерии Международной системы стадирования (Greipp P.R. et al., 2003) (табл. 1).



Таблица 1

## Стадии множественной миеломы

Стадии	<i>Критерии по B.G.M. Durie, S.E. Salmon (1975)</i>	Масса миеломных клеток в организме, $\times 10^{12}$ кл/м <sup>2</sup>	<i>ISS-критерии по Greipp P.R. et al. (2003)</i>
I	Гемоглобин >100 г/л и Уровень кальция в сыворотке $\leq 2,88$ ммоль/л (нормальный) и Рентгенологически нормальная структура кости или только 1 солитарный очаг деструкции и Низкая степень продукции моноклонального протеина: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ig G при G-миеломе &lt; 50 г/л</li> <li>• Ig A при A-миеломе &lt; 30 г/л</li> <li>• Протеинурия Бенс-Джонса &lt; 4 г/24 час</li> </ul>	< 0,6 (низкая)	$\beta_2$ -м < 3,5 мг/л и альбумин $\geq 3,5$ г/дл
II	Показатели, не укладывающиеся ни в I, ни в III стадию	0,6 – 1,2 (средняя)	Показатели, не укладывающиеся ни в I, ни в III стадию
III	Гемоглобин < 85 г/л или Уровень кальция в сыворотке > 2,88 ммоль/л или Множественные очаги деструкции в костях скелета (3) или Высокая степень продукции моноклонального протеина: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ig G при G-миеломе &gt; 70 г/л</li> <li>• Ig A при A-миеломе &gt; 50 г/л</li> <li>• Протеинурия Бенс-Джонса &gt; 12 г/24 час</li> </ul>	> 1,2 (высокая)	$\beta_2$ -м $\geq 5,5$ мг/л
Под- стадии	<i>Критерии по B.G.M. Durie, S.E. Salmon</i>		
A	Нормальная функция почек (уровень креатинина в сыворотке $\leq 2$ г/дл или 177 мкмоль/л)		

Б	Функция почек нарушена (уровень креатинина в сыворотке > 2 г/дл или 177 мкмоль/л)
---	---

Для характеристики функции почек у всех больных определяли содержание креатинина, оценивали скорость клубочковой фильтрации по 24-часовому клиренсу эндогенного креатинина методом Реберга. Концентрационную способность почек изучали в пробе Зимницкого [8, 9].

При оценке тяжести анемии и тромбоцитопении использовали классификацию, принятую Всемирной Организацией Здравоохранения (табл. 2).

Таблица 2

Классификация анемии и тромбоцитопении по степени тяжести

Показатели	0 ст.	1 ст.	2 ст.	3 ст.	4 ст.
Гемоглобин (г/л)	≥ 110	95-110	80-95	65-80	< 65
Тромбоциты (×10 <sup>9</sup> /л)	> 100	75 – 99	50 - 74	25 - 49	< 25

Апоптотическую активность клеток костного мозга исследовали с помощью проточной цитометрии, обеспечивающей получение синхронных данных о клеточной дифференцировке и клеточной гибели, одновременно с экспрессией любых, вызывающих интерес иммунологических маркеров. Основные морфологические характеристики апоптоза клетки включают в себя потерю асимметричности клеточной мембраны, за счет перестройки ее фосфолипидных компонентов, сморщивание клетки, конденсацию хроматина и фрагментацию ядра [12, 13, 14]. Появление фосфатидилсерина (ФС) на наружной поверхности плазматической мембраны клетки может быть обнаружено при участии рекомбинантного, конъюгированного с флуорохромом, протеина (35-36 kD) - аннексина V, который при определенной концентрации солей и ионов Ca<sup>2+</sup> способен связываться с отрицательно заряженными молекулами фосфолипида, что позволяет визуализировать клетки находящиеся в раннем апоптозе [10, 11]. Для окрашивания клеточной ДНК используется пропидий йодид, который проникает внутрь клетки через поврежденную мембрану, нарушение которой происходит во время поздней стадии апоптоза или некроза клетки.

### ***Принцип проточной цитометрии***

В основе метода проточной цитометрии лежит проведение фотометрических и флуоресцентных измерений клеток в потоке жидкости лазерным лучом цитометра. Фотометрические каналы используются для оценки размеров клетки, ее гранулярности. При одновременной регистрации бокового и прямого светорассеяния можно выделить все клеточные популяции лейкоцитов. Таким образом, параметры светорассеяния позволяют провести анализ в регионе клеточной популяции с определенными характеристиками [15, 16]. При анализе мононуклеарных клеток костного мозга больных ММ на гистограмме бокового светорассеяния опухолевые плазматические клетки могут быть идентифицированы по особым характеристикам светорассеяния, отличающиеся от основной популяции мононуклеаров, представленных в костном мозге. Детекция сигнала специфического флуоресцентного красителя осуществляется детектором FL-1 (FITC, 520 нм) и FL-3 (ПИ, 600 нм) (рис. 1).

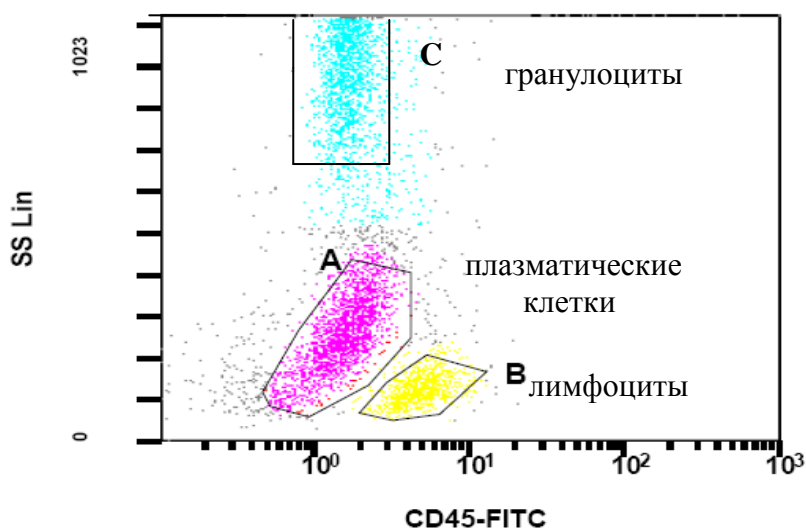


Рис. 1. Разделение популяции лейкоцитов костного мозга больного с впервые выявленной множественной миеломой (А – плазматические клетки, В – сохраненные лимфоциты, С – гранулоциты)

### ***Методика***

Набор предназначен для определения относительного содержания клеток, находящихся в апоптозе, с использованием метода проточной цитометрии, позволяющего выделить четыре популяции клеток: жизнеспособные (неокрашенные – отрицательные по аннексину V и по пропидию йодиду), находящиеся в раннем апоптозе (положительные по аннексину V), в позднем апоптозе / некрозе (положительные и по аннексину V, и по пропидию йодиду) и в некрозе (положительные по пропидию йодиду) (рис. 2).

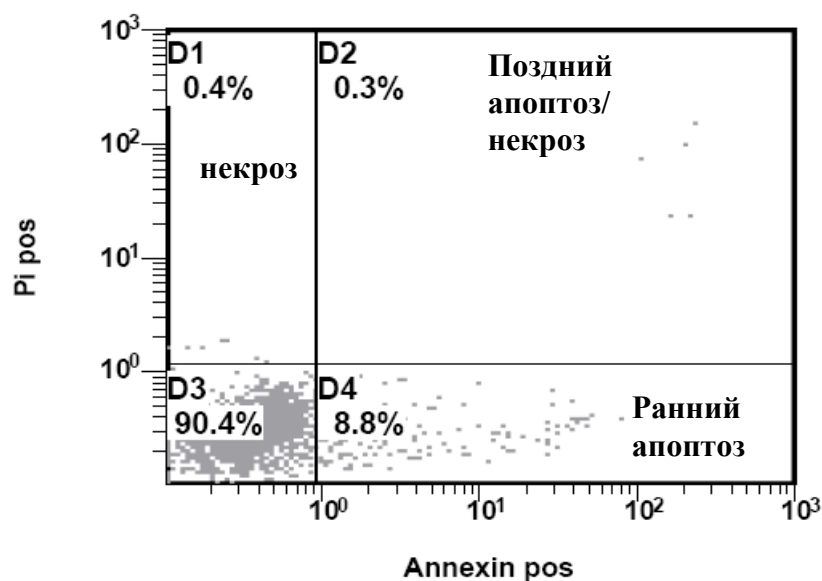


Рис. 2. Двухмерная точечная гистограмма, загейтирована по региону плазматических клеток: аннексин V / пропидий йодид (D1 – клетки в некрозе, D2 – клетки в позднем апоптозе / некрозе, D3 – жизнеспособные клетки, D4 – клетки находящиеся в раннем апоптозе)

**Реагенты:**

1. Аннексин V, конъюгированный с флуоресцеином FITC (Annexin V 1,0 мл).
2. Раствор пропидия йодода (Annex-PI, 2 мл), концентрация 50 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере.
3. 4-хсвязывающий буфер (Annex-B, 25 мл), буфер следует разводить деионизированной водой непосредственно перед использованием.
4. Фосфатно-солевой буфер (PBS).

**Хранение:**

Набор следует хранить при температуре 2 - 8° С.

### **Методика исследования:**

Материалом исследования является клетки костного мозга, полученного путем стерильной пункции, стабилизированного антикоагулянтом (гепарин, 25 Ед/мл).

1. Мононуклеарные клетки выделить из костного мозга методом градиентного центрифугирования с использованием "Лимфопреп" ( $\rho=1,077\text{г/см}^3$ ) в течение 20 мин при 1500 об./мин.
2. Выделенные клетки 2 раза отмыть фосфатно-солевым буфером в течение 10 мин при 1500 об./мин.
3. Ресуспендировать клетки в связывающем буфере, концентрация клеток 1млн/мл.
4. В пробирки объемом 5 мл поместить по 100 мкл клеточной суспензии.
5. В первой пробирке клетки оставить неокрашенными (негативный контроль); во вторую пробирку добавить 5 мкл реагента Annexin V – FITC; в третью – 10 мкл раствора пропидия йодида; в четвертую – 5 мкл реагента Annexin V – FITC и 10 мкл раствора пропидия йодида, перемешать.
6. Инкубировать 15 мин при комнатной температуре (20 - 22°C) в темноте.
7. После инкубации в пробирки добавить по 400 мкл связывающего буфера и проводить анализ на проточном цитофлуориметре.

При установке калибровочных параметров и величин компенсации осуществлять цитометрию неокрашенных клеток, окрашенных только аннексином V, окрашенных аннексином V и пропидием йодидом и клеток, окрашенных только пропидием йодидом.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При использовании предлагаемой медицинской технологии осложнений не наблюдается.

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

С целью оценки эффективности использования медицинской технологии, был проведен анализ особенностей течения ММ. Обследовано 142 больных с впервые диагностированной ММ, среди которых выделено 2 группы: 1-ю группу составили 57 больных в возрасте 38 - 59 лет, 2-ю – 85 человек 60 – 85 лет. Проанализированы основные клинические и лабораторные показатели периферической крови,

костномозгового кроветворения, функции почек, результаты рентгеновского исследования костей скелета. Кроме того, проведен ретроспективный анализ причин летальных исходов 120 больных ММ в возрасте 36 - 80 лет в период 1979 – 2000 гг.

При распределении больных по стадиям опухолевого процесса было установлено, что у больных 2-й группы чаще, чем в 1-й группе обнаруживалась III стадия ММ 53 и 26% и в 2 раза чаще – хроническая почечная недостаточность (ХПН) 30 и 15% ( $p < 0,001$ ). В каждой из групп больных была оценена частота развития инфекционных осложнений. Во 2-й группе инфекционные осложнения диагностированы у 30,5% пациентов, а в 1-й группе – у 15,7% ( $p < 0,05$ ). Проведенный анализ показателей периферической крови показал, что в обеих группах больных ММ имела тенденция к анемии, несколько больше выраженная у больных старше 60 лет. Так, у пациентов 2-й группы среднее содержание гемоглобина равнялось 94 г/л, а уровень гемоглобина менее 80 г/л выявлен у 32% больных. В 1-й группе больных средний показатель гемоглобина составил 102 г/л и лишь у 15% больных уровень гемоглобина был менее 80 г/л.

У больных 2-й группы обнаружено более низкое количество тромбоцитов, чем у пациентов 1-й группы ( $190$  и  $215 \times 10^9/\text{л}$  соответственно). Обращало на себя внимание, что у 24% пациентов 2 – ой группы уровень тромбоцитов был ниже  $150 \times 10^9/\text{л}$ , а у 6% -  $< 90 \times 10^9/\text{л}$ , в то же время у больных 1-й группы аналогичные показатели выявлены у 14 и 2% соответственно ( $p < 0,001$ ). Костномозговое кроветворение у больных 1-й группы характеризовалось нормальным содержанием миелокариоцитов (в среднем  $81 \times 10^9/\text{л}$ ). В то время как во 2-й группе больных наблюдалась тенденция к снижению клеточности костного мозга ( $62 \times 10^9/\text{л}$ ) (рис. 3). У 48% больных в возрасте  $> 60$  лет и только у 30% -  $< 60$  лет количество миелокариоцитов было менее  $50 \times 10^9/\text{л}$ . У всех больных наблюдалась гипоплазия гранулоцитарного ростка, относительное содержание клеток миелоидного ряда снижено. Одновременно обнаружено снижение количества клеток эритроидного ряда, однако, у больных пожилого возраста их содержание оказалось в 1,4 раза выше, чем в группе больных в возрасте до 60 лет. Различий в содержании плазматических клеток в миелограмме в целом не выявлено. Так, в 1-й группе содержание их в среднем составило 38% (у 44% больных колебалось от 30,6 до 88,8%), а во 2-й группе – 33% (у 44% - от 30,4 до 90,4%). Содержание молодых популяций опухолевых клеток (плазмобластов + проплазмоцитов) у лиц в возраст до 60 лет оказалось выше, чем у больных старше 60 лет (3,8 и 2,2% соответственно) (рис. 3).

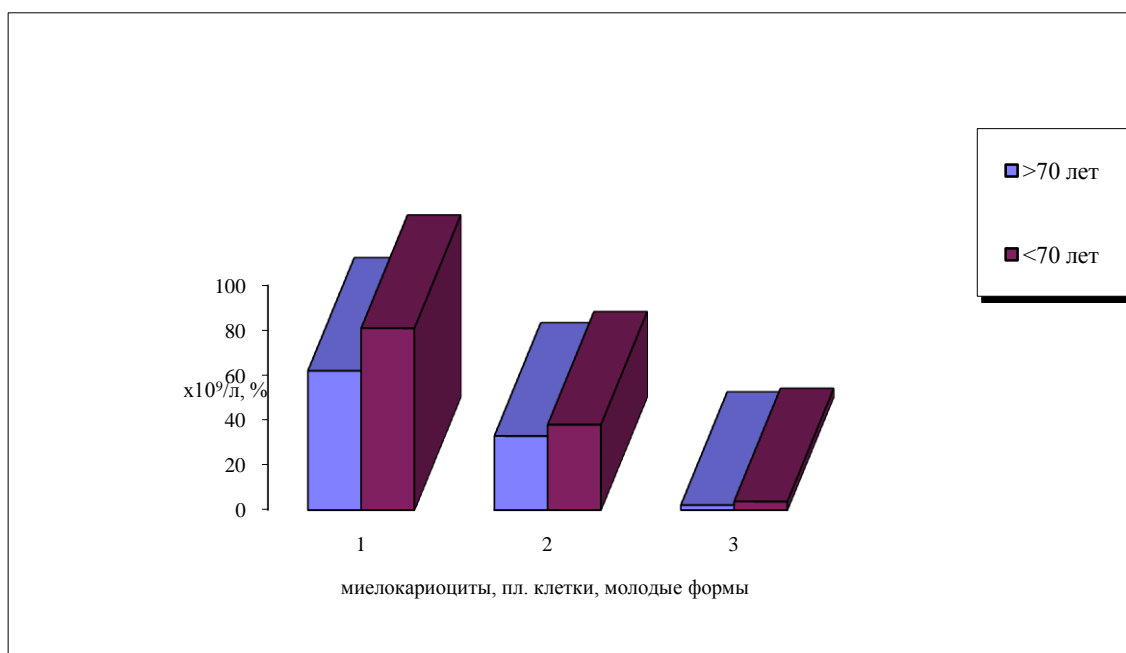


Рис. 3 Показатели костномозгового кроветворения у больных множественной миеломой

Анализ прогностической значимости исследуемых показателей гемограммы, костного мозга и функции почек позволил установить достоверное влияние на выживаемость больных ММ. Медиана общей выживаемости больных в возрасте 70 лет и старше, в случае выявления у них пониженного уровня гемоглобина ( $< 80$  г/л), ХПН (уровень креатинина  $> 120$  мкмл/л), плазмноклеточной инфильтрации костного мозга ( $> 30\%$  плазматических клеток), составила 24 мес., а в возрасте  $< 70$  лет – 46 мес.

Сравнение поражений костей скелета также показало достоверные различие в обеих группах пациентов с ММ. Обнаружено, что остеопороз в сочетании с очагами лизиса в костях регистрировался у 63,5% больных старше 60 лет и лишь у 31,5% пациентов моложе 60 лет ( $p < 0,001$ ) (рис. 4). Поражение позвоночника с компрессионными переломами тел грудных и пояснично-крестцовых позвонков наблюдались у 15 (26,3%) больных 1-ой группы и у 49 (57,6%) больных 2-ой группы ( $p < 0,001$ ). Наряду с этим у больных 2-ой группы чаще выявлялось поражение трубчатых костей, патологические переломы, очаги лизиса в костях таза.

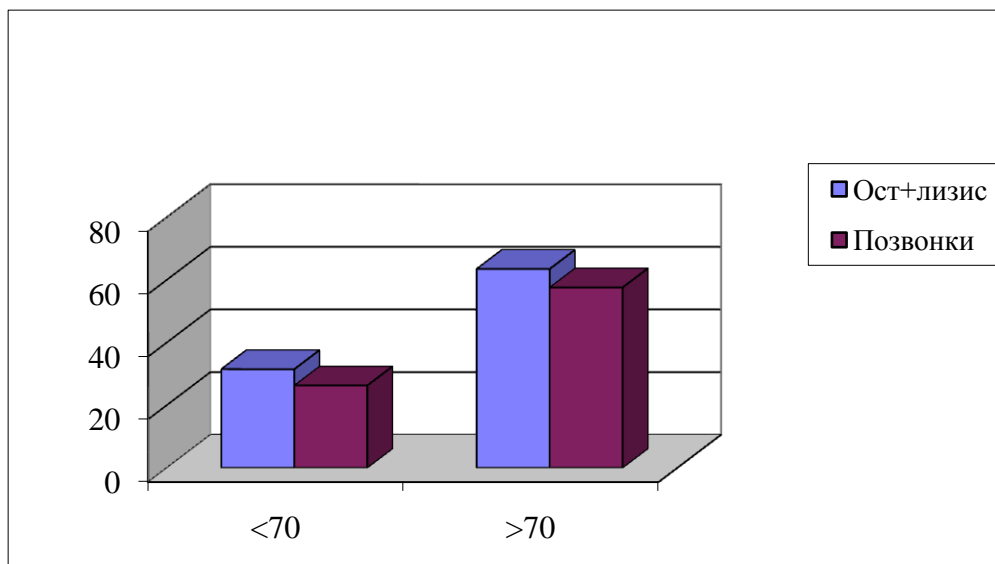


Рис.4 Поражение костей скелета у больных множественной миеломой

Обращало на себя внимание, что Me общей выживаемости больных старше 70 лет в целом по группе составила 30 мес., а моложе 70 лет - 50 мес. Однако, больные старше 70 лет с деструктивным процессом в костях таза или в трубчатых костях, или спонтанными переломами костей имели Me общей выживаемости равную 12 мес, а больные в возрасте до 70 лет - 24 мес. (рис. 5).

Среди причин летальности 120 больных ММ, лидирующую позицию занимает ХПН (рис. 6), которая составила 37,5%. Интоксикация, в том числе гематологическая токсичность, привела к гибели 28,3% больных ММ, острая пневмония - 21,6%; у 10% больных причиной смерти был геморрагический синдром. Анализ причин смерти больных, с учетом возраста, показал, что наиболее высокий процент смерти от ХПН обнаружен среди больных в возрасте старше 70 лет (43%), и существенно ниже в возрасте до 70 лет (26,6%) ( $p < 0,05$ ). У больных 36-45 лет основной причиной смерти была интоксикация, гематологическая токсичность (40%) и геморрагический синдром (8%). Инфекционные осложнения, в первую очередь, поражение легких у пациентов старше 70 лет (рис. 6), наблюдались значительно чаще и часто приводили их к гибели ( $p < 0,05$ ).



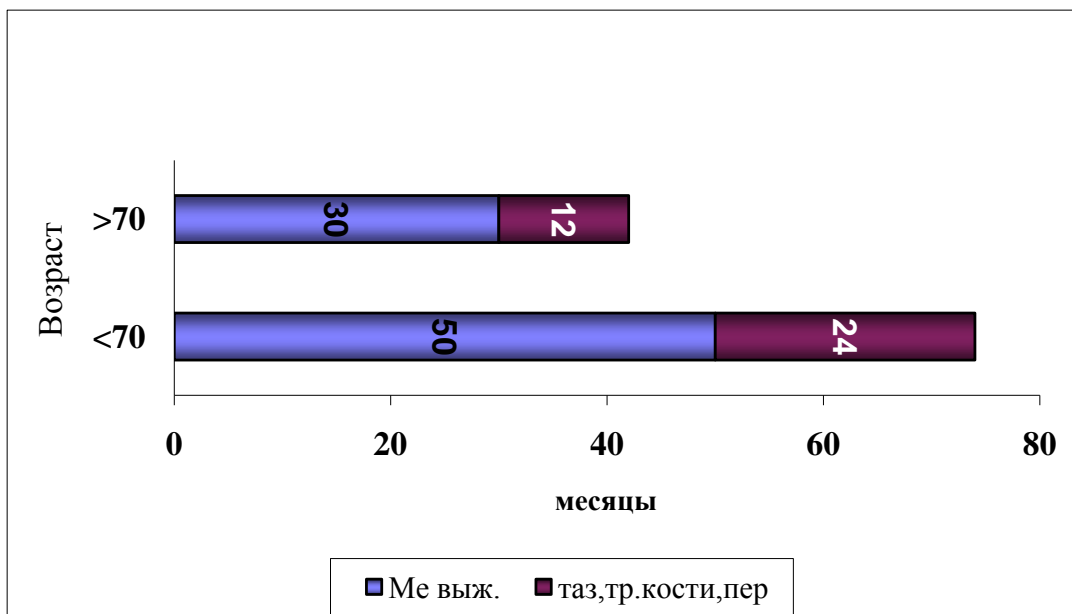


Рис. 5 Медиана выживаемости больных в целом (Me выж) и при наличии костных деструкций (таз, трубчатые кости, переломы)

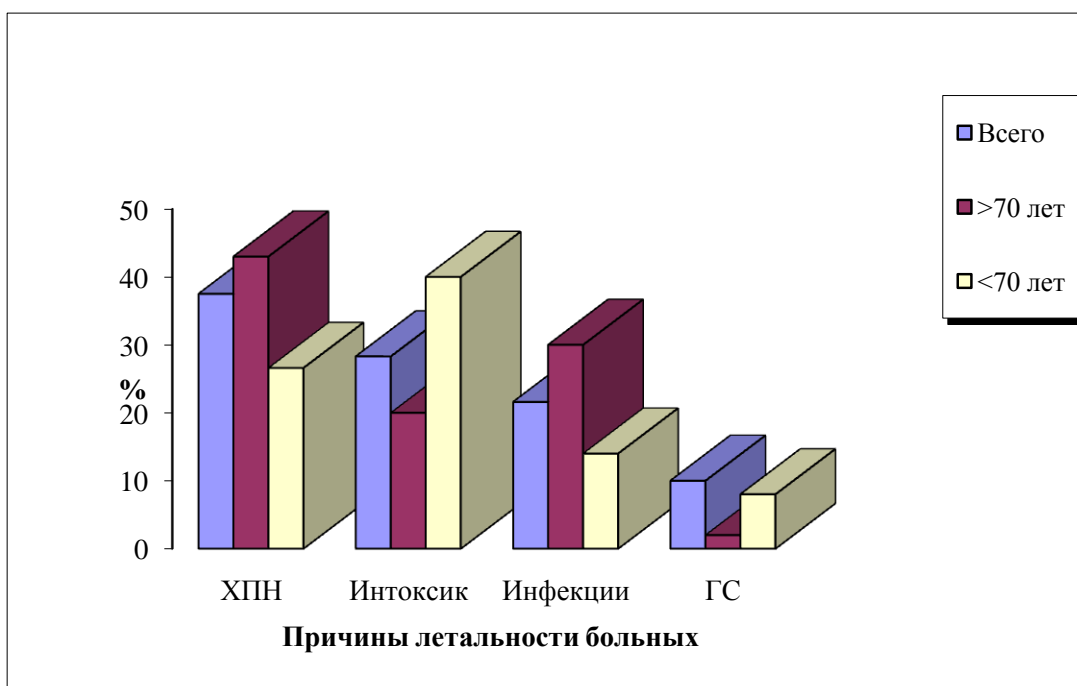


Рис. 6 Причины летальности больных множественной миеломой в возрасте до 70 лет и старше

Таким образом, множественная миелома у лиц пожилого возраста имеет определенные особенности течения. Проведение первичного стадирования заболевания показало, что большинство больных старше 60 лет имели III стадию, которая в большинстве наблюдений, в отличие от больных в возрасте до 60 лет, сопровождалась хронической почечной недостаточностью, что нередко предопределяло неблагоприятный прогноз заболевания. Хроническая почечная недостаточность – основная причина смерти больных пожилого возраста. Распространенность плазмоклеточной инфильтрации и степень зрелости плазматических клеток отчетливо коррелируют с выживаемостью. Для неблагоприятного течения ММ характерен высокий плазмоцитоз костного мозга ( $> 30\%$ ) и незрелость плазматических клеток. У больных ММ старшей возрастной группы ( $> 60$  лет) нормальный гемопоэз нарушен в большей степени, отмечается истощение пула стволовых клеток, а эритропоэз неэффективен. Наши исследования показали, что наиболее неблагоприятное влияние на течение ММ оказывает не один какой-либо фактор, а сочетание различных факторов: уровень гемоглобина  $< 80$  г/л, уровень креатинина  $> 120$  мкмл/л, плазмоклеточная инфильтрация костного мозга  $> 30\%$ . Ме выживаемости больных в возрасте  $\geq 70$  лет в 2 раза меньше, чем у больных в возрасте  $< 70$  лет.

Наиболее выраженные изменения в костях скелета чаще встречались у лиц старше 70 лет, что повлияло на показатель общей выживаемости. Наиболее важное значение имеет выраженный деструктивный процесс в костях таза или в трубчатых костях, с возникновением спонтанных переломов костей. У данной категории больных часто наблюдаются инфекционные осложнения, в частности острая пневмония, и характеризуются тяжелым течением, нередко заканчиваются летальным исходом.

К особенностям течения ММ у пациентов  $\geq 70$  лет относятся: более высокая частота встречаемости ММ в продвинутых стадиях (III ст.) с нарушением функции почек, нарушением нормального гемопоэза, что проявляется снижением клеточности костного мозга и неэффективным эритропоэзом, частое поражение костей скелета, в первую очередь костей таза. Факторами, влияющими на общую выживаемость этой категории больных ММ, являются: уровень гемоглобина  $< 80$  г/л, уровень креатинина  $> 120$  мкмл/л, плазмоклеточная инфильтрация костного мозга  $> 30\%$ , выраженный деструктивный процесс в костях таза или в трубчатых костях, с возникновением спонтанных переломов костей. А также часто наблюдается присоединение инфекционных осложнений, в частности острой пневмонии, которая характеризуется тяжелым течением с быстрым летальным исходом. Продолжительность жизни данной

группы пациентов значительно ниже. Таким образом, возраст больных является фактором прогноза.

С целью углубления представлений о биологических свойствах клеток опухолевого клона исследовали уровень активности апоптоза плазматических клеток костного мозга у больных множественной миеломой и определяли возможность использования этого показателя как критерия эффективности лечения.

Обследовано 49 больных ММ в возрасте от 39 до 79 лет, с длительностью заболевания от 6 мес. до 60 мес. По иммунохимическому варианту заболевания: G-миелома наблюдалась у 30 (61,2%) больных, А-вариант – у 12 (24,5%), миелома Бенс-Джонса – у 5 (10,2%) и несекретирующая миелома выявлена у 2 (4,1%) больных. Пациенты были разделены на 2 группы. Первую группу составили 27 (55%) больных с впервые выявленной ММ, вторую - 22 (45%) с рецидивом заболевания. Содержание плазматических клеток (ПК) в костном мозге больных 1 - ой группы колебалось от 11,4 до 64,8% (36,2%), 2 - ой группы – от 8,4 до 86,4% (27,7%). Для оценки эффективности лечения больных ММ использовали критерии ИВМТ [17], согласно которым полная ремиссия устанавливается в тех случаях, когда в миелограмме обнаруживается не более 5% плазматических клеток нормальной морфологии и отсутствует моноклональный иммуноглобулин в сыворотке крови и моче. Частичная ремиссия верифицируется у больных с  $\geq 50\%$  уменьшением моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или 90% уменьшением белка Бенс-Джонса в моче.

Исследование апоптоза плазматических клеток проводили до начала специфической терапии больных ММ (спонтанный апоптоз) и непосредственно после завершения курса лечения (индуцированный апоптоз).

Относительное содержание ПК, находящихся в апоптозе, определяли с помощью визуализации раннего маркера апоптоза - фосфатидилсерина (ФС), по связыванию его с аннексином V- FITC, рекомбинантного, конъюгированного с флуорохромом, протеина (35-36 kD), который при определенной концентрации солей и ионов  $Ca^{2+}$  способен связываться с отрицательно заряженными молекулами фосфолипида. Исследование проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 BECKMAN COULTER (США).

Ни в одной из групп больных не установлено зависимости апоптотической активности ПК от возраста больных и иммунохимического варианта ММ.

Выявлено, что спонтанная апоптотическая активность ПК у больных с впервые выявленной ММ в среднем составила  $25,2 \pm 14,6\%$ , при этом индивидуальные показатели апоптотической активности у больных внутри группы значительно различались (от 7,8 до 47,3%).

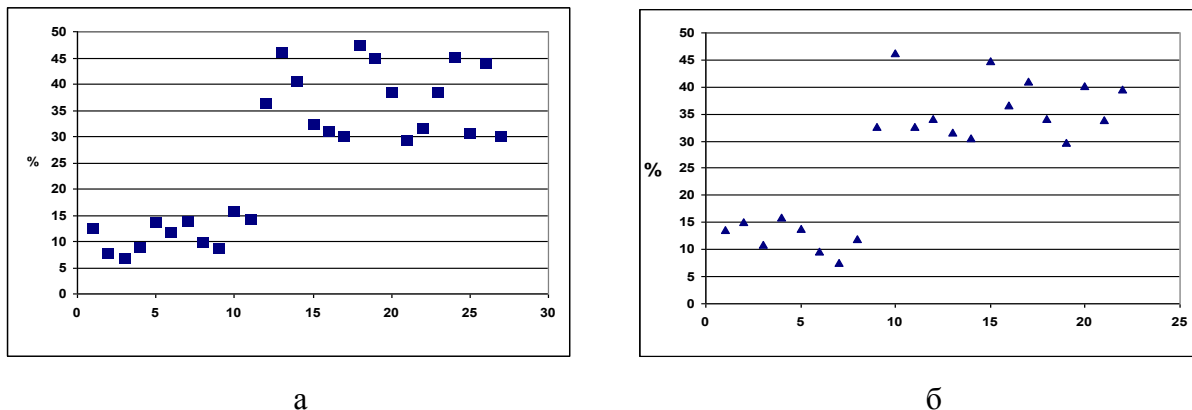


Рис. 7. а - Показатели спонтанной апоптотической активности плазматических клеток у больных с впервые выявленной ММ; б - с рецидивом

При детальном рассмотрении показателей спонтанного апоптоза у больных с впервые выявленной ММ (рис.7, а), мы отметили пациентов с низким и высоким уровнем апоптотической активности относительно среднего уровня в целом по группе. Так, у 41% (11) больных показатели апоптотической активности были значительно ниже среднего уровня и находились в интервале от 7,8 до 15,7%. Тогда как у 59% (16) больных спонтанный апоптоз ПК был значительно выше средней величины в группе, при диапазоне показателей от 29,3 до 47,3%.

У больных с рецидивом ММ (рис.7 б), также как и у больных с впервые выявленной ММ, показатели апоптотической активности значительно различались внутри группы (от 9,7 до 44,8%), при этом средний показатель апоптоза ПК составил  $22,1 \pm 2,3\%$ .

При анализе индивидуальных показателей апоптотической активности у больных с рецидивом мы также отметили, что у 36% (8) пациентов показатель апоптоза ПК был ниже среднего уровня по группе при диапазоне от 7,6 до 15,9%. Тогда как у 64% (14) пациентов эти показатели были значительно выше среднего уровня при варьировании от 32,7 до 44,8%.

Учитывая однотипность распределения величин активности спонтанного апоптоза у больных ММ с активной фазой, мы сочли возможным разделить пациентов на две группы: с высоким уровнем апоптоза и с низким, относительно среднего

показателя по группе. В дальнейшем мы рассматривали динамику апоптотической активности в соответствии с этим распределением больных.

При исследовании апоптотической активности ПК после проведенного курса специфического лечения, направленного на индукцию апоптоза опухолевых миеломных клеток, у больных с первоначально низким показателем апоптоза выявлено его нарастание более чем в 3 раза, что составило в среднем  $39,1 \pm 2,1\%$  (рис. 8). У этих больных отмечалась положительная клинико-гематологическая динамика, которая выражалась в снижении количества ПК в миелограмме до  $<5\%$ , содержания моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и в моче более чем на 50% и 75% соответственно, и других признаках наступления полной или частичной ремиссии.

Напротив, у пациентов с высоким показателем апоптоза ни в одном из случаев не было отмечено его дальнейшего возрастания после проведенного курса терапии, апоптоз оставался практически на прежнем уровне и составил в среднем  $36,8 \pm 2,8\%$  (рис. 8). У этих пациентов отсутствовал клинический эффект от специфической терапии, не было положительной клинико-гематологической динамики.

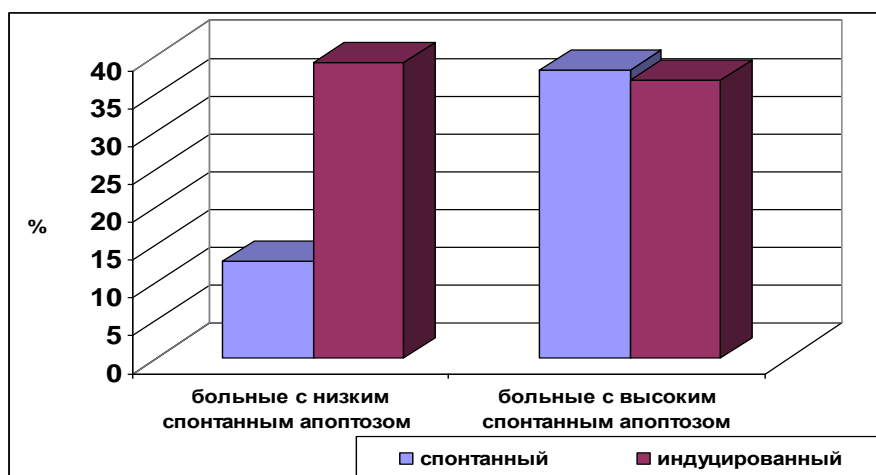


Рис. 8. Динамика апоптотической активности у больных ММ

Таким образом установлено, что пациенты с низким показателем апоптоза, у которых в ответ на специфически направленную терапию наблюдалось увеличение апоптотических событий, отвечали на специфическую терапию. У них удалось получить либо полную, либо частичную клинико-гематологическую ремиссию. В динамике терапии у больных, положительно ответивших на назначенное лечение, апоптотическая активность клеток костного мозга продолжала нарастать. И, напротив,

пациенты, у которых исходно повышенный показатель спонтанного апоптоза в процессе терапии не менялся, не отвечали на лечение, у них развивалась резистентность или отмечалась прогрессия заболевания.

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что специфическая терапия способствует развитию каскада апоптотических событий в опухолевых клетках и оценка апоптоза клеток костного мозга позволяет прогнозировать эффективность осуществляемой терапии. Больные, у которых отмечается увеличение апоптоза плазматических клеток, отвечают на терапию. Больные, у которых индукция апоптотического процесса недостаточна, остаются рефрактерными к специфической терапии.

Итак, комплекс объективных клинико-лабораторных тестов позволяет выявить факторы риска при ММ, оценить течение заболевания и эффективность специфической терапии. Возраст больных является фактором прогноза. У пожилых пациентов чаще встречается ММ III стадии с нарушением функции почек, нарушение нормального гемопоеза, поражение костей скелета. Низкий уровень гемоглобина, высокий уровень креатинина и плазмноклеточной инфильтрации костного мозга, выраженный деструктивный процесс в костях таза или в трубчатых костях, регистрируемые в период диагностики заболевания предвещают развитие химиорезистентности и снижение продолжительности жизни у пациентов старше 60 лет. Определение апоптоза плазматических клеток костного мозга имеет прогностическое значение и может быть использовано для оценки эффективности специфической терапии при ММ. Исходно пониженный показатель спонтанного апоптоза ПК костного мозга у больных ММ является признаком более благоприятного течения заболевания и эффективности проводимой терапии. Этот тест можно рекомендовать в качестве дополнительного критерия прогноза развития резистентности к проводимой терапии больных ММ. Повышенный показатель спонтанного апоптоза клеток костного мозга больных ММ является прогностически неблагоприятным, так как такие опухолевые клетки остаются рефрактерными к терапии направленной на индукцию апоптоза.

### Список использованной литературы

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома. Современный взгляд на проблему – г. Алматы, 2007. – 480 с.
2. Rodon P., Linassier C., Gauvain J.B. et al. Multiple myeloma in elderly patients: presenting features and outcome // *Eur. J haematol.* – 2001. – Vol. 66. – P. 11 – 17.
3. Blade J., Kyle R.A., Greipp P.R. et al. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years // *Br. J Haematol.* – 1996. – Vol. 93. – P. 345 – 351.
4. Facon T., Menard J.F., Michaux J.L. et al. Prognostic factors in low tumour mass asymptomatic multiple myeloma: a report on 91 patients. The Group d'Etudes et de recherche sur le Myeloma// *Am. J Hematol.* – 1995. – Vol. 48. – P. 71 – 75.
5. Kurabayashi H., Kubota K., Tsuchiya J. et al. Prognostic value of morphological classifications and clinical variables in elderly and young patients with multiple myeloma// *Ann. Hematol.* – 1999. – Vol. 78. – P. 19 – 23.
6. Владимирская Е. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия// *Клиническая лабораторная диагностика.* - 2002. - № 11. - С. 25-32.
7. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival// *Cancer.* – 1975. – Vol. 36. – P. 842-854.
8. Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.В. Диагностика болезней почек. – Д., 1979. – 242 с.
9. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. - Минск, 1989. - 360 с.
10. Martin S.J., Reutelingsperger C.M.P., McGahon A.J., et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initialing stimulus. Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl// *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182. – P. 1545-1557.
11. De Rosa L. Bone marrow autograft with immunomagnetic beads in poor prognosis B lymphoid malignancies// *Haematologica.* – 1993. – Vol. 1. – P. 203.
12. Diaz C., Schroit A.J. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry// *J. Membrane Biol.* – 1996. – Vol. 151. – P. 1-9.

13. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes// *L. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182. – P. 1597-1601.
14. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C.P.M. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V// *J. Immunol. Methods.* – 1995. – Vol. 180. – P. 39-52.
15. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицин Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. - М., Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. – 168 с.
16. Методы проточной цитометрии в медицинских и биологических исследованиях (сборник научных трудов) / Под ред. М.П. Потапнева. – Минск: ГУ РНМБ, 2003. – 136 с.
17. Blade J., Samson D., Rees D. et al. Criteria for valuating disease response and progression in patients wit multiple myeloma treated by high-dose therapy an haemopoietic stem sell transplantation // *B. J. Haematol.* - 1998. - Vol. 102. - P. 15-1023.
18. Greipp P.R., San Miguel J.F., Durie D.G. et al. A New International Stading System (ISS) for Multiple Myeloma (MM) from the International Myeloma Working Group // *Blod.* – 2003. – Vol. 102, № 11. – Abstr. 664.