

# Utjecaj angiogeneze, izražaja osteopontina i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u koštanoj srži na odgovor na prvu liniju terapije u pacijenata s multiplim mijelomom

---

**Babarović, Emina; Hadžisejdić, Ita; Štifter, Sanja; Lučin, Ksenija; Jonjić, Nives**

*Source / Izvornik:* **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2016, 52, 390 - 399**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

[https://doi.org/10.21860/52;3\\_390](https://doi.org/10.21860/52;3_390)

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:894003>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



# Utjecaj angiogeneze, izražaja osteopontina i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u koštanoj srži na odgovor na prvu liniju terapije u pacijenata s multiplim mijelomom

## Impact of bone marrow angiogenesis, expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor on myeloma patient response to the first line therapy

Emina Babarović\*, Ita Hadžisejdić, Sanja Štifter, Ksenija Lučin, Nives Jonjić

Zavod za patologiju i patološku anatomiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,  
Rijeka

**Sažetak. Cilj:** Istražiti utjecaj angiogenih parametara, izražaja osteopontina (OPN) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF; engl. *vascular endothelial growth factor*) u koštanoj srži na odgovor na prvu liniju terapije u pacijenata s multiplim mijelomom (MM). **Ispitanici i metode:** U istraživanje je uključeno 68 pacijenata s MM-om, liječenih na Odjelu hematologije Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Za kvantifikaciju angiogenih parametara uz klasičnu metodu utvrđivanja gustoće krvnih žila (MVD; engl. *microvessel density*) koristili smo i računalno potpomognutu analizu slike koja nam je omogućila izračunavanje broja krvnih žila po mm<sup>2</sup>, površine krvnih žila po mm<sup>2</sup>, srednjeg promjera krvnih žila i ukupne vaskularne površine (TVA; engl. *total vascular surface*) na biopsičkim uzorcima koštane srži obojanim s anti-CD34. Za određivanje izražaja OPN-a i VEGF-a u plazma stanicama korištena je dvostruka imunohistokemijska metoda CD138+OPN i CD138+VEGF. **Rezultati:** Utvrđeno je da su viši angiogeni parametri, MVD ( $P = 0,004$ ) i broj krvnih žila po mm<sup>2</sup> ( $P = 0,028$ ) značajni negativni prognostički pokazatelji odgovora na prvu liniju terapije u pacijenata s MM-om. **Zaključak:** Objektivna metoda procjene angiogeneze u uzorcima koštane srži mogla bi postati dio rutinske patohistološke obrade pacijenata koja bi pomogla u prepoznavanju podskupina pacijenata s eventualnim agresivnijim tijekom i lošijim odgovorom na terapiju.

**Ključne riječi:** angiogeneza; imunohistokemija; multipli mijelom; osteopontin; prognoza; vaskularni endotelni čimbenik rasta

**Abstract. Objective:** To investigate the effect of angiogenic parameters, expression of osteopontin (OPN) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in order to predict response to first-line therapy in patients with multiple myeloma (MM). **Patients and Methods:** The study included 68 patients with MM, treated at the Department of Hematology, Clinical Hospital Centre in Rijeka. For quantification of angiogenic parameters besides the classical method of determining microvessel density (MVD) we used a computer assisted image analysis which enabled us to calculate the number of blood vessels per mm<sup>2</sup>, the surface of blood vessels per mm<sup>2</sup>, an average diameter of blood vessels and total vascular surface (TVA) in the bone marrow biopsies stained with anti-CD34. To determine the expression of OPN and VEGF in plasma cells we used double staining immunohistochemistry method, CD138+OPN and CD138+VEGF. **Results:** We found that a higher angiogenic parameters, the MVD ( $P = 0.004$ ) and the number of blood vessels per mm<sup>2</sup> ( $P = 0.028$ ), were significantly negative prognostic indicator of response to the first-line therapy in patients with MM. **Conclusion:** An objective method of the assessment of angiogenesis in the bone marrow samples could become a part of the routine histopathological analysis which could help to identify a subgroup of patients with possible aggressive course and poor response to the therapy.

**Key words:** angiogenesis; immunohistochemistry; multiple myeloma; osteopontin; prognosis; vascular endothelial growth factor

### \*Dopisni autor:

Dr. sc. Emina Babarović, dr. med.  
Zavod za patologiju i patološku anatomiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci  
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka  
e-mail: esinozic@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Multipli mijelom (MM) drugi je najčešći oblik maligne hematološke bolesti i čini 15 % svih hematoloških novotvorina. U Sjevernoj Americi više od 10.000 pacijenata umire svake godine od MM-a ili komplikacija te bolesti<sup>1</sup>. MM je multifokalna maligna novotvorina plazma stanica sa stvaranjem monoklalnog imunoglobulina. Jedno od glavnih obilježja MM-a je lokalizacija tumorskih plazma stanica u mikrookolišu koštane srži koji čine proteini izvanstaničnog matriksa, stromalne stanice koštane srži, upalne stanice i krvne žile te tijesna veza između tumorskih stanica i mikrookoliša koji podržava rast tumora. Koštana srž je u većini slučajeva i mjesto širenja tumora, dok je ekstramedularna lokalizacija vrlo rijetka i u pravilu je rezervirana za uznapredovale stadije bolesti. Ograničen uspjeh konvencionalne antitumorske terapije citostaticima, kojima je glavni cilj isključivo mijelomska tumorska stanica, naglašava važnost razumijevanja uloge mikrookoliša koštane srži u razvoju i patogenezi ove maligne bolesti. Danas postoje brojni dokazi da interakcija mijelomskih stanica sa stanicama mikrookoliša, neposrednim kontaktom putem adhezijskih molekula ili lučenjem brojnih citokina, omogućava proliferaciju, migraciju i preživljavanje mijelomskih stanica, ali i rezistenciju na lijekove te progresiju koštane bolesti i aktivaciju procesa angiogeneze<sup>2-5</sup>.

Sastavni dio mikrookoliša koštane srži je osteopontin (OPN), glikozilirani fosfoprotein koji može biti u slobodnom obliku, kao citokin ili imobiliziran, kao protein izvanstaničnog matriksa većinom lokaliziran na površini koštanih gredica. OPN sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških i patoloških zbivanja poput hematopoeze, upalnog odgovora, resorpcije kostiju, angiogeneze, apoptoze, popravka i remodeliranja tkiva te onkogeneze, a mogu ga stvarati i izlučivati u izvanstanični matriks brojne stanice poput osteoklasta, osteoblasta, epitelnih stanica bubrega, dojke, kože, zatim neurona, glatkih mišićnih stanica krvnih žila i endotelnih stanica<sup>6-8</sup>. Rezultati brojnih *in vitro* i *in vivo* studija na solidnim tumorima pokazuju da OPN različitim mehanizmima dovodi do promjene izražaja brojnih gena, što ima za posljedicu ubranu diobu i migraciju stanica, smanjenu

apoptozu, povećano stvaranje krvnih žila u tumorskom tkivu te promjenu u imunološkom sustavu domaćina, čime pridonosi progresiji tumora<sup>6,7,9</sup>. Uloga OPN-a u etiologiji i progresiji MM-a nije još razjašnjena. Rezultati *in vitro* studija ukazuju da bi upravo OPN mogao biti važan adhezijski čimbenik za lokalizaciju i zadržavanje mijelomskih stanica u mikrookolišu koštane srži<sup>10</sup>. Istraživanja na staničnim kulturama pokazala su da tumorske stanice mijeloma mogu lučiti OPN te da je sinteza OPN glasničkog RNA-a (mRNA; engl. *messenger*) pove-

Angiogeni parametri, MVD i broj krvnih žila po mm<sup>2</sup> pokazali su se kao značajni prognostički pokazatelji pacijentova odgovora na prvu liniju terapije.

ćana u pacijenata s MM-om<sup>11-13</sup>. Stanično signaliranje u koje je uključen OPN izrazito je složeno zbog istovremenog postojanja njegovog autokrinog i parakrinog djelovanja. U animalnim modelima pokazano je da mijelomske stanice mogu poticati i druge netumorske stanice na povećano lučenje OPN-a<sup>13</sup>, čime potiču svoj rast, adheziju i preživljavanje u mikrookolišu koštane srži<sup>11-13</sup>. Do danas je samo nekoliko istraživanja provedeno s ciljem proučavanja prognostičke uloge OPN-a u MM-u, većinom određivanjem plazmatske koncentracije OPN-a i to s različitim rezultatima<sup>10-14</sup>. Jedan od najvažnijih proangiogenih čimbenika je vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF; engl. *vascular endothelial growth factor*) koji u mikrookolišu koštane srži luče mijelomske stanice, ali i stromalne stanice koštane srži. Colla i sur. su na *in vitro* modelu angiogeneze u MM-u dokazali važnu proangiogenu ulogu OPN-a<sup>13</sup>. Vezivanje OPN-a za  $\alpha\beta$  integrine potiče neoangiogenezu zbog pojačane migracije, produženog preživljavanja endotelnih stanica te oblikovanja vaskularnog lumena<sup>8</sup>. Uočeno je da je proangiogeni učinak OPN-a zapravo potaknut djelovanjem VEGF-a tako da VEGF potiče sintezu OPN-a, a pojačava i izražaj  $\alpha\beta$  integrina na endotelnim stanicama. Shijubo i sur. su na modelu humanog adenokarcinoma pluća dokazali da istovremeni izražaj VEGF-a i OPN-a u tumorskom tkivu ima veći utjecaj na prognozu pacijenata nego svaki od njih zasebno<sup>15</sup>, dok su Tanaka i sur. na *in vitro* modelu angiogeneze u MM-u dokazali da istovremeno djelovanje VEGF-a i OPN-a ima veći

utjecaj na pojačano stvaranje vaskularnih lumena nego svaki od njih zasebno<sup>16</sup>. Ovi rezultati upućuju na uzajamnu sinergističku ulogu OPN-a u poticanju neoangiogeneze putem VEGF-a. Proces angiogeneze u mikrookolišu koštane srži ima vrlo važnu ulogu u patogenezi i progresiji bolesti<sup>17-20</sup>. Neke studije pokazale su da povećanje stupnja angiogeneze ima prognostički značaj u pacijenata s novodijagnosticiranim MM-om<sup>17</sup>, te da povišena angiogeneza persistira nakon provedenog liječenja, čak i u pacijenata koji su postigli kompletan terapijski odgovor<sup>20</sup>. Glavni nedostatak većine studija koje su proučavale angiogenezu u koštanoj srži pacijenata s MM-om su metode koje su razvijene prvenstveno za određivanja angiogeneze u solidnim tumorima. Samo su dvije studije dosad koristile računalno potpomognutu analizu slike za preciznije određivanje angiogeneze u koštanoj srži<sup>21,22</sup>. Stoga je glavni cilj našeg istraživanja bio detaljna analiza tumorske angiogeneze, ispitivanje izražaja OPN-a i VEGF-a u koštanoj srži i ispitivanje njihova utjecaja na terapijski odgovor u pacijenata s MM-om.

## ISPITANICI I METODE

### Ispitanici

U ovu retrospektivnu studiju bilo je uključeno 68 pacijenata s aktivnim MM-om kojima je postavljena dijagnoza na Klinici za internu medicinu, Odjel hematologije Kliničkog bolničkog centra Rijeka, u razdoblju od 2001. do 2009. godine. U istraživanju je korišten bioptički materijal koštane srži arhiviran na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te klinički podaci dobiveni iz medicinske dokumentacije pacijenata na Klinici za internu medicinu, Odjel hematologije Kliničkog bolničkog centra Rijeka. U istraživanje su uključeni svi pacijenti redom kod kojih su postojali svi potrebni klinički podaci te dovoljna količina očuvanog bioptičkog materijala, a isključeni su pacijenti s asimptomatskim MM-om koji ne zahtijevaju liječenje već kliničko praćenje uz kontrolne laboratorijske nalaze. Pacijenti su razvrstani prema Durie-Salmon kliničkom stadiju bolesti<sup>23</sup> i Internacionalnom sustavu stadija bolesti za MM (ISS; engl. *International Staging System for Multiple Myeloma*)<sup>24</sup>. Unutar skupine pacijenata s aktivnim MM-om terapiju je prilikom

dijagnoze primilo 57 pacijenata, 8 pacijenata nije primilo terapiju zbog komorbiditeta, a 3 pacijenta su inicijalno odbila liječenje te su praćeni. Naši pacijenti koji su primili terapiju u prvoj liniji liječenja su heterogeno: kombinacijom vinkristina, adriamicina i deksametazona (VAD protokol), kombinacijom melfalana i prednizona (MP protokol) te deksametazonom s ili bez talidomida. Nakon provedene prve linije terapije, iz odgovarajuće dokumentacije pacijenata utvrđen je odgovor na terapiju, definiran prema kriterijima Internacionalne radne grupe za mijelom<sup>25</sup>. Skupine odgovora na terapiju su: kompletan terapijski odgovor, vrlo dobar parcijalni odgovor, parcijalni odgovor, stabilna bolest i progresija bolesti. No, s obzirom na mali broj pacijenata u nekim skupinama, pacijenti su podijeljeni na one koji nisu odgovorili na terapiju (bez odgovora i progresija bolesti) i one koji su postigli bilo koji odgovor na terapiju. Kliničkopatološka obilježja svih pacijenata uključenih u istraživanje prikazuje tablica 1.

**Tablica 1.** Kliničkopatološka obilježja pacijenata s multiplim mijelomom (MM)

Obilježje	MM (N = 68)
Dob pacijenata (god.) medijan (raspon)	68 (43 – 87)
Spol (M/Ž)	36/32
% plazma stanica, medijan (raspon)	66 (5 – 100)
Durie-Salmon klinički stadij	Broj pacijenata
I	1
II	25
III	42
Durie-Salmon subklasifikacija	Broj pacijenata
A	45
B	23
ISS	Broj pacijenata
I	16
II	17
III	35
Odgovor na terapiju	Broj pacijenata
Odgovorili	19
Nisu odgovorili	38

ISS, Internacionalni sustav stadija bolesti za mijelom

**Tablica 2.** Primarna protutijela protiv humanih epitopa korištena u imunohistokemijskom bojanju

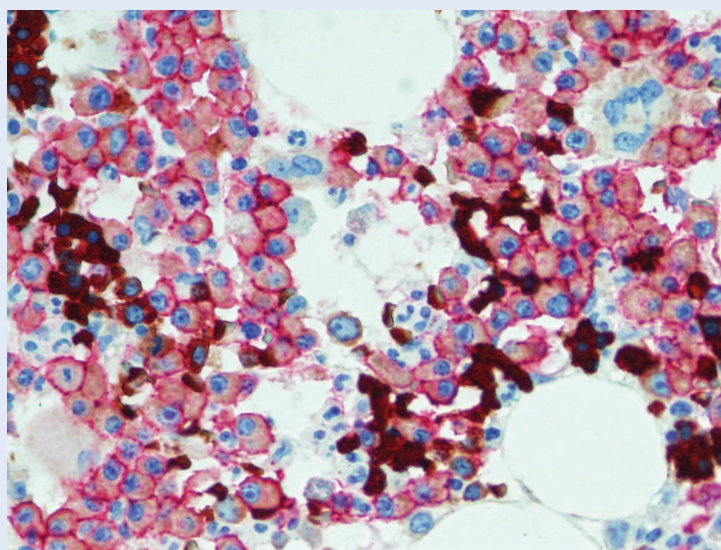
Protutijelo	Podrijetlo	Klon, proizvođač	Razrjeđenje i inkubacija
Protiv CD34	mišje monoklono IgG <sub>1</sub>	QBEnd-10, DAKO, Glostrup, Danska	1 : 100, 30 minuta sobna temperatura
Protiv OPN-a	mišje monoklono IgG <sub>2B</sub>	OP3N, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1 : 100, 60 minuta sobna temperatura
Protiv VEGF-a	mišje monoklono IgG <sub>2A</sub>	SC-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1 : 500, 30 minuta sobna temperatura

### Bioptički materijal iz arhive

Bioptički uzorci koštane srži fiksirani su u Schaffero-rovom fiksativu 24 sata i dekalcinirani u osteodec-4 do 5 sati, nakon toga su uklopljeni u parafin i rezani. Standardnom, rutinskom patohistološkom metodom bojani su na hemalaun-eozin (HE), Giemsu, PAS (periodni Schiffov reagens), Gomory i Berlinsko modriilo. Deparafinirani uzorci također su rutinski obojeni imunohistokemijski s anti-CD138 (klon MI15, m7228, DAKO, Glostrup, Danska), Ig (imunoglobulin laki lanac) Kappa (No.40191, DAKO, Glostrup, Danska) i Ig Lambda (No.40193, DAKO, Glostrup, Danska) protutijelima. Patohistološka obrada uključivala je procjenu plazmastičnih infiltrata (difuzni, nodularni, intersticijski i miješani), postotak plazma stanica (CD 138+) u koštanoj srži te restrikciju lakih lanaca.

### Imunohistokemijsko bojanje

Parafinski rezovi debljine 3 do 5  $\mu\text{m}$  sušeni su preko noći na 55 °C, te potom deparafinizirani i dehidrirani standardnim postupkom. Rezovi su tretirani vizualizacijskim sistemom temeljenim na *EnVision* metodi. Vizualizacijski sistem (*DAKO EnVision FLEX, High pH KIT K801021*, Glostrup, Danska) korišten je u automatskom imunobojaču (*DAKO Autostainer plus*). Diaminobenzidine (DAB) korišten je kao kromogen. Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula od interesa primijenjen je toplinom inducirani pretretman. Rezovi su uronjeni u Tris-EDTA pufer, pH 9 (10 mM Tris baze, 1 mM EDTA otopine) i zatim u vodenu kupelj tijekom 15 minuta na temperaturi od 97 °C. Primarna protutijela koja su korištena u istraživanju prikazana su u tablici 2. Za određivanje izražaja OPN-a i VEGF-a u tumorskim stanicama korištena je dvostruka imunohistokemijska metoda, CD138+OPN i CD138+VEGF, primjenom *DAKO EnVision™ Doublestain System (K5361)*. U automatskom imunobojaču dva antigena u istom

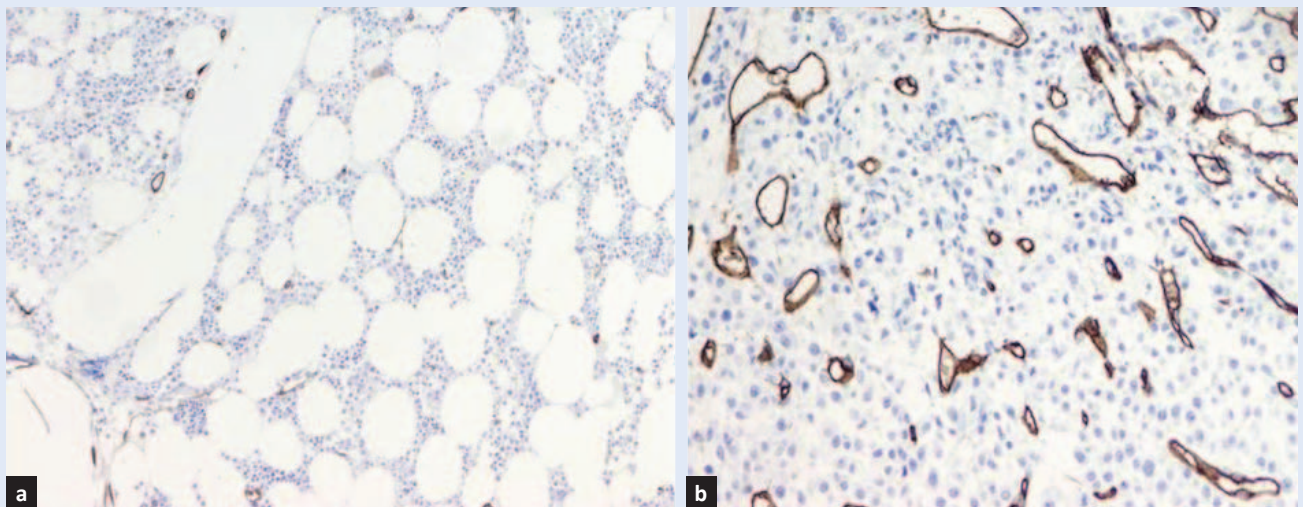


**Slika 1.** Detalj dvojnog imunohistokemijskog bojanja s CD138 i VEGF-om na bioptičkom uzorku koštane srži pacijenata s MM-om. Protutijelom anti-CD138 prikazane su membrane tumorskih stanica crveno, a u citoplazmama tumorskih stanica izražaj VEGF-a vidi se u obliku fino zrnatog smeđeg citoplazmatskog bojanja. Također se vidi izražaj VEGF-a u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze s najsnažnijim obojenjem u citoplazmama eritrona (povećanje  $\times 400$ ).

uzorku označavaju se kontrastnim bojama; u ovom slučaju protutijelom CD138 označe se membrane plazma stanica, a pozitivitet se vizualizira crveno s Chromgen Red, dok se izražaj VEGF-a (slika 1) ili OPN-a prikazuje kao citoplazmatski pozitivitet vizualiziran smeđim kromogenom DAB. Kao negativna kontrola za sva imunohistokemijska bojenja korišteni su rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanescena puferska otopina (DAKO).

### Procjena imunohistokemijskog bojanja

Računalno potpomognuta analiza slike korištena je za određivanje angiogenih parametara na uzorcima tumorskog tkiva obojenih anti-CD34 protutijelom (slika 2). U bioptičkim uzorcima koštane srži najbolji rezultati za prikaz krvnih žila i endo-



**Slika 2.** Bioptički uzorci koštane srži imunohistokemijski obojeni s anti-CD34 protutijelom za prikaz krvnih žila i endotelnih stanica. Uzorak koštane srži s malim brojem krvnih žila koje su smještene periferno i malog su lumena (a, povećanje  $\times 200$ ). Uzorak koštane biopsije s vrlo velikim brojem krvnih žila različito širokog lumena (b, povećanje  $\times 400$ ).

telnih stanica dobiveni su imunohistokemijski s anti-CD34 protutijelom, s obzirom na to da su druga protutijela koja se koriste u te svrhe, anti-CD31 i faktor VIII, izražena i u velikom broju stanica hematopoeze, uključujući megakariocite i mijeloičnu lozu, što u ovim uzorcima bitno otežava procjenu angiogenih parametara. Prilikom procjene bojanja u obzir su uzeti formirani lumeni krvnih žila, nakupine pozitivno obojenih endotelnih stanica i pojedinačne endotelne stanice. Određivan je ukupni broj malih krvnih žila po  $\text{mm}^2$ , površina malih krvnih žila po  $\text{mm}^2$ , srednji promjer malih krvnih žila i ukupna površina koju zauzimaju male krvne žile (kao postotak ukupne površine koštane biopsije). Mjerenja su izvršena pomoću SpotBrowser2 integriranog sustava (Alphelys, Plaisir, Francuska) koristeći metode segmentacije boje na digitalnim slikama koštane biopsije. Histološki preparat skeniran je na povećanju  $\times 20$  da bi se identificirali dijelovi od interesa, a zatim je skeniran na povećanju  $\times 200$  na kojem su kreirane slike za kvantifikaciju. Tijekom računalne obrade slike program detektira objekte od interesa na temelju svojstava piksela boje (valna duljina, intenzitet i zasićenost), grupiranja i morfometrije (oblika i veličine). Program za analizu koristi isti, prethodno stvoreni algoritam za segmentaciju boje, za sve uzorke. Algoritam je dizajniran tako da prepoznaje i automatski uklanja prazni prostor, određuje i broji pozitivne površine te mjeri srednji promjer krvnih žila. Ova mjerenja

koriste se za izračunavanje prosječne gustoće malih krvnih žila (broj malih krvnih žila na  $\text{mm}^2$ ) i ukupne vaskularne površine (postotak površine krvnih žila u ukupnoj površini koštane biopsije, TVA (od engl. *total vascular area*). Uz računalno potpomognutu analizu slike angiogeni parametri su određivani i tzv. klasičnom metodom određivanja angiogeneze. Svjetlosnim mikroskopom pregledani su bioptički uzorci koštane srži na malom povećanju ( $\times 10$ ) s ciljem utvrđivanja mjesta s najvećom gustoćom malih krvnih žila (tzv. vruće točke; engl. *hot spots*). Na svakom preparatu odabrane su tri vruće točke u kojima su pomoću svjetlosnog mikroskopa na povećanju  $\times 400$  izbrojene pozitivno obojene krvne žile i nakupine ili pojedinačne endotelne stanice. Aritmetičkom sredinom dobivena je srednja vrijednost, odnosno gustoća malih krvnih žila (MVD; engl. *microvessel density*), koja je prikazana kao broj krvnih žila po velikom vidnom polju (povećanje  $\times 400$ ). Prilikom procjene bojanja na VEGF i OPN u obzir su uzete samo tumorske stanice iako su pozitivitet u koštanoj srži na VEGF pokazivale endotelne stanice, glatke mišićne stanice krvnih žila, pojedine stanice granulopoeze i eritropoeze, dok je u uzorcima koštane srži OPN bio prisutan u gotovo svim stanicama hematopoeze, stromalnim stanicama koštane srži, osteoblastima i osteoklastima. Jednostavniju identifikaciju tumorskih plazma stanica omogućilo nam je dvojno imunohistokemijsko bojanje, a izražaj VEGF-a i OPN-a

je bio prisutan u obliku fino-zrnatog citoplazmatskog obojenja (slika 1). Pregledavanjem cijelog uzorka koštane biopsije svjetlosnim mikroskopom određen je postotak obojenosti tumorskih stanica na VEGF i OPN. Uzorci su razvrstani u pet kategorija imunohistokemijskog bojanja s obzirom na postotak pozitivnih stanica: 0 – 10 %; 11 – 25 %; 26 – 50 %; 51 – 75 % i 76 – 100 %. Prijelomna vrijednost za oba parametra bila je 10 %, tako da su uzorci s 10 % i manje pozitivnih tumorskih stanica označeni kao imunohistokemijski negativni.

### Statistička obrada podataka

Podatci su uneseni u proračunsku tablicu i obrađeni pomoću računalnog programa MedCalc 12.2.1.0 (*MedCalc Software*, Ostend, Belgija) uz razinu statističke značajnosti od  $P < 0,05$ . Podatci su prikazani mjerom središnjice i raspršenja s obzirom na njihovu raspodjelu. Kod opisa podataka koristimo se klasičnim metodama deskriptivne statistike. Za testiranje razlika pokazatelja mjera središnjice između skupina pacijenata, ovisno o zadovoljavanju pretpostavke normalnosti, koristio se t-test za nezavisne uzorke ili Mann-Whitneyjev U-test. Dok se za testiranje razlika nominalnih varijabli koristio Fisherov egzaktni ili hi-kvadrat test. ROC analiza, odnosno analiza operativne karakteristične krivulje (engl. *receiver operating characteristic – ROC curve analysis*) korištena je prilikom određivanja prijelomnih vrijednosti potencijalnih prediktora odgovora na terapiju, pri čemu se kao kriterij optimalnosti koristio Youdenov indeks. Kod analize predikcije događaja izračunava se omjer izgleda metodom logističke regresije.

## REZULTATI

Od ukupno 68 pacijenata uključenih u istraživanje spolna i dobna raspodjela bila je sljedeća: 32 pacijenta bila su ženskog spola (47 %), a 36 muškog (53 %) s omjerom M : Ž = 1,13 : 1. Raspon dobi pacijenata bio je od 43 do 87 godina s medijanom od 68 godina. Postotak plazma stanica u koštanoj srži naših pacijenata iznosio je od 5 % do 100 % s medijanom 66 %.

Svi analizirani parametri angiogeneze, kao i postotak pozitivnih tumorskih stanica bojenjem na VEGF i OPN u cijeloj skupini pacijenata metodom deskriptivne statistike, prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Deskriptivni prikaz analiziranih parametara angiogeneze i izražaja VEGF-a i OPN-a u tumorskim stanicama koštane srži pacijenata s MM-om

Parametar (N = 68)	Medijan (raspon)
Gustoća malih krvnih žila	24 (9 – 65)
Ukupna vaskularna površina	2,14 (0,19 – 17,3)
Broj krvnih žila po mm <sup>2</sup>	176 (27-685)
Površina krvnih žila po mm <sup>2</sup>	0,0285 (0,0025 – 0,602)
Srednji promjer krvnih žila	10,9 (7,9 – 17,6)
Vaskularni endotelni čimbenik rasta (%)	15 (0 – 100)
Osteopontin (%)	76 (0 – 100)

Pregledom uzoraka uočen je različit broj, oblik i raspored krvnih žila u uzorcima (slika 2), no prema očekivanjima uzorci s difuznim infiltratima i velikim nodularnim infiltratima plazma stanica u pravilu su imali veću gustoću krvnih žila od uzoraka s manjim intersticijskim infiltratima tumorskih stanica.

Plazma stanice koštane srži pacijenata s MM-om pokazivale su heterogeno bojanje na VEGF u rasponu od kompletno negativnog preko umjereno pozitivnih do snažnog citoplazmatskog bojanja. Suprotno od očekivanog, prilikom pregledavanja uzoraka velik broj tumora s difuznim plazmastičnim infiltratom bio je imunohistokemijski kompletno negativan na VEGF. U najvećem broju slučajeva (32/68) tumorske stanice nisu pokazivale imunoreaktivnost s protutijelom protiv VEGF-a, odnosno bilo je pozitivno manje od 10 % stanica, dok su pozitivni tumori bili podjednako raspoređeni među pojedinim kategorijama imunohistokemijskog bojanja s obzirom na postotak pozitivnih stanica. Medijan postotka pozitivnih tumorskih stanica na VEGF u cijeloj skupini pacijenata iznosio je 15 % (raspon 0 – 100 %). Različito od VEGF-a, najzastupljenija kategorija imunohistokemijskog bojenja na OPN bila je ona s najvišim postotkom pozitivnih tumorskih stanica, odnosno više od 76 % (29/68 uzoraka). Medijan postotka pozitivnih tumorskih stanica na OPN iznosio je 76 % s rasponom od 0 do 100 %.

### Procjena utjecaja izražaja angiogenih parametara, VEGF-a i OPN-a na odgovor na terapiju u pacijenata s MM-om

U statističkoj obradi prvo smo analizirali diskriminatornu snagu varijabli u odnosu na odgovor na

prvu liniju terapije uz pomoć ROC analize, a rezultati su prikazani u tablici 4. Na osnovi dobivenih rezultata, površine ispod ROC krivulje (AUC, od engl. *area under the ROC curve*) i *P* vrijednosti zaključujemo da bi utjecaj na uspjeh terapije mogle imati sljedeće varijable: broj krvnih žila po mm<sup>2</sup>, MVD, TVA i postotak VEGF pozitivnih tumorskih stanica. Naime, kao kriterij smo koristili vrijednost površine ispod ROC krivulje (AUC) viši od 0,6, a u ovom dijelu analize, gdje smo samo željeli procijeniti diskriminatornu snagu pojedine varijable za sljedeću analizu, dopustili smo da *P* vrijednosti budu nešto viša, do *P* = 0,1. Nadalje za

odabrane varijable određujemo prijelomne (engl. *cut-off*) vrijednosti, pri čemu kao kriterij optimalnosti koristimo Youdenov indeks (tablica 5). Temelem dobivenih prijelomnih vrijednosti rezultati su za svaki pojedini prediktor pretvoreni u dihotome, odnosno one s visokim ili niskim vrijednostima VEGF-a i gore navedenih angiogenih parametara te se metodom logističke regresije izračunao omjer izgleda odgovora na prvu liniju terapije. U univarijantnoj analizi angiogeni parametri, broj MVD i broj krvnih žila po mm<sup>2</sup> pokazali su se kao značajni prognostički pokazatelji pacijentova odgovora na prvu liniju terapije (tablica 6), no nisu zadržali značaj-

**Tablica 4.** Analiza diskriminatorne snage varijable u odnosu na odgovor na prvu liniju terapije

	Odgovor na terapiju		
	AUC	95 % interval pouzdanosti	<i>P</i> vrijednost
Broj krvnih žila po mm <sup>2</sup>	0,662	0,525 – 0,782	0,04
Gustoća malih krvnih žila	0,651	0,512 – 0,774	0,07
Površina krvnih žila po mm <sup>2</sup>	0,560	0,422 – 0,692	0,51
Srednji promjer krvnih žila	0,553	0,415 – 0,685	0,54
Ukupna vaskularna površina	0,643	0,505 – 0,766	0,08
Vaskularni endotelni čimbenik rasta (%)	0,610	0,470 – 0,737	0,16
Osteopontin (%)	0,564	0,425 – 0,696	0,44

AUC, površina ispod ROC krivulje (engl. *Area under the ROC curve*)

**Tablica 5.** Određivanje prijelomnih vrijednosti potencijalnih prediktora odgovora na terapiju uz Youdenov indeks kao kriterij optimalnosti

	Youdenov indeks	95 % interval pouzdanosti	Prijelomna vrijednost	Osjetljivost	95 % interval pouzdanosti	Specifičnost	95 % interval pouzdanosti
VEGF (%)	0,2788	0,12 – 0,49	> 10	68,42	43,4 – 87,4	59,46	42,1 – 75,2
MVD	0,3656	0,14 – 0,55	≤ 16	47,37	24,4 – 71,1	89,19	74,6 – 97,0
TVA	0,2632	0,16 – 0,39	≤ 2,06	57,89	33,5 – 79,7	68,42	51,3 – 82,5
Broj krvnih žila po mm <sup>2</sup>	0,3158	0,12 – 0,47	≤ 185	73,68	48,8 – 90,9	57,89	40,8 – 73,7

VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni čimbenik rasta); MVD (engl. *microvessel density*), koja je prikazana kao broj krvnih žila po velikom vidnom polju (povećanje × 400). TVA (engl. *total vascular area*), ukupna vaskularna površina

**Tablica 6.** Univarijantna analiza prognostičkih pokazatelja odgovora na prvu liniju terapije u pacijenata s MM-om

Parametar	Odgovor na terapiju		Omjer izgleda	95 % CI	<i>P</i> vrijednost
	da	ne			
Gustoća malih krvnih žila					
> 16	10	34	0,13	0,03 – 0,53	0,004
≤ 16	9	4			
Broj krvnih žila po mm <sup>2</sup>					
> 185	5	22	0,26	0,08 – 0,87	0,028
≤ 185	14	16			

CI = interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*; CI)



nost u multivarijantnoj analizi. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da pacijent s aktivnim MM-om koji u koštanoj srži ima više angiogene parametre (MVD i broj krvnih žila po mm<sup>2</sup>) ima veći izgled neuspjeha prve linije terapije. Točnije, pacijent koji ima u koštanoj srži više od 16 krvnih žila po velikom vidnom polju ima 7,69 puta veću vjerojatnost da ne odgovori na prvu liniju terapije nego pacijent koji ima niži broj krvnih žila u koštanoj srži. Jednako tako, pacijent s više od 185 krvnih žila po mm<sup>2</sup> u uzorku koštane srži ima 3,85 puta veću vjerojatnost neuspjeha prve linije terapije u odnosu na pacijenta s manje krvnih žila.

#### RASPRAVA

Glavno obilježje MM-a je golema raznolikost u kliničkoj prezentaciji, genetičkim abnormalnostima i ishodu bolesti<sup>26</sup>. Istraživanja su posljednjih godina u području MM-a bila usmjerena na razumijevanje genetičke heterogenosti i uloge mikrokoliša koštane srži u razvoju i patogenezi bolesti, što je pridonijelo razvoju brojnih novih učinkovitijih lijekova i otvorilo mogućnost bolje i individualizirane terapije pacijenata. No bez obzira na poboljšanja učinjena u terapijskom pristupu, MM i dalje ostaje neizlječiva bolest. Medijan preživljenja se s novim terapijskim protokolima i autolognom transplantacijom matičnih krvotvornih stanica povećao s tri na šest godina, no tijekom bolesti je vrlo različit pa preživljenje pacijenata varira od nekoliko tjedana do više od deset godina. Na jednom kraju spektra nalaze se pacijenti s agresivnom bolešću koja brzo postaje rezistentna na dostupnu terapiju, dok su s druge strane pacijenti s indolentnijim tijekom bolesti, koji zahtijevaju intermitentnu terapiju, kontrolu bolesti i dugotrajno praćenje. No, zbog velikog broja novih terapijskih mogućnosti s različitim mehanizmima djelovanja javlja se potreba za poboljšanim i standardiziranim metodama praćenja pacijenata. Iznenadujuće, u rutinskim laboratorijskim metodama tijekom pregleda koštane srži u obzir se uzima samo broj plazma stanica, a malo pažnje posvećuje se morfološkim promjenama u mikrokolišu koštane srži, pa tako i angiogenim parametrima<sup>27,28</sup>. U literaturi postoje različiti rezultati o značenju angiogenih čimbenika<sup>29-32</sup> i parametara tumorske angiogeneze u smislu odgovara na terapiju i prognoze pacijenata<sup>18-22</sup>, što je jednim di-

jelom posljedica različitih metodologija, a također i činjenice da do sada nije bilo dovoljno kliničkih istraživanja koja su sustavno analizirala angiogene parametre i izražaj angiogenih čimbenika u različitim stadijima ove bolesti te nisu donijeli definitivni zaključci koji bi bili primjenjivi u praksi. Imunohistokemijski izražaj VEGF-a u plazma stanicama pacijenata s MM-om u našem uzorku je nešto malo niži, s višom zastupljenošću negativnih uzoraka, u odnosu na prijašnje studije<sup>32-36</sup>. Opažena heterogenost bojanja je u skladu s prijašnjim istraživanjima

Objektivna metoda procjene angiogeneze korištenjem računalno potpomognute analize slike mogla bi postati dio rutinske patohistološke obrade pacijenata s MM-om, koja bi pomogla u prepoznavanju pacijenata s eventualnim agresivnijim tijekom bolesti i lošijim odgovorom na terapiju.

ma<sup>33-36</sup>. Suprotno očekivanjima, prilikom pregledavanja uzoraka uočili smo značajan broj tumora imunoreaktivno kompletno negativnih na VEGF, te i s difuznim tipom infiltrata koji su bili povezani s vrlo visokim postotkom tumorskih plazma stanica. Prema našim spoznajama ovo je prvo sustavno istraživanje imunohistokemijskog izražaja OPN-a u koštanoj srži pacijenata s MM-om. Do sada je provedeno samo nekoliko studija koje su određivale plazmatske koncentracije OPN-a u pacijenata s MM-om<sup>10-12,14</sup>. Imunohistokemijski izražaj OPN-a u plazma stanicama bio je heterogen, no za razliku od VEGF-a izražaj OPN-a u plazma stanicama je bio u najvećem broju uzoraka pozitivan, a pored toga najzastupljenija kategorija imunohistokemijskog bojanja na OPN je bila ona s najvišim postotkom pozitivnih plazma stanica (više od 76 %) koja je opažena u 29 uzoraka.

Za kvantifikaciju angiogenih parametara uz klasičnu metodu tzv. „vrućih točaka”, koja je u literaturi najčešće primjenjivana<sup>17-20,29,30,33-36</sup>, ali koja je dizajnirana za procjenu angiogeneze u solidnim tumorima, koristili smo i računalno potpomognutu analizu slike, objektivnu metodu koja nam je omogućila izračunavanje broja malih krvnih žila po mm<sup>2</sup>, površine malih krvnih žila po mm<sup>2</sup>, srednjeg promjera malih krvnih žila i ukupne površine koju zauzimaju male krvne žile, odnosno ukupne

vaskularne površine. Smatramo da je glavni nedostatak većine studija koje su proučavale angiogenezu u koštanoj srži pacijenata s MM-om metodologija, odnosno korištenje metoda koje su razvijene prvenstveno za određivanja angiogeneze u solidnim tumorima, što nije problem u uzorcima koštane srži ako se radi o difuznom tipu plazmastičnih infiltrata s vrlo visokim postotkom plazma stanica. Problem primjene takve metodologije pojavljuje se u uzorcima koštane srži s intersticijskim, miješanim pa čak i manjim nodularnim tipovima infiltrata gdje smatramo da definitivno postoji potreba preciznije i točnije procjene angiogenih parametara. Naime, u ovako heterogenoj bolesti vjerujemo da u budućnosti treba dizajnirati studije koje će promatrati jednu homogenu skupinu pacijenata u istom stadiju bolesti s približno jednakim plazmastičnim infiltratima i pokušati objektivno i precizno utvrditi razlike u angiogenim parametrima i eventualne razlike u izražaju angiogenih čimbenika koje bi imale važnost u biologiji i progresiji ove bolesti. Naime pregledom uzoraka obojenih s anti-CD34 protutijelom uočen je ne samo različit broj krvnih žila nego i različita širina lumena te njihov raspored, što bi moglo biti važno u biologiji tumora, te je to bila nit vodilja detaljnog pregleda angiogeneze u ovom istraživanju. Samo su dvije studije do sada koristile računalno potpomognutu analizu slike za preciznije određivanje angiogeneze u koštanoj srži i pri tome su određivale samo broj malih krvnih žila po  $\text{mm}^2$  i TVA<sup>21,22</sup>.

Glavni cilj studije bio je ispitati utjecaj izražaja VEGF-a i OPN-a te svih analiziranih angiogenih parametara na odgovor na terapiju u pacijenata s aktivnim MM-om. Željeli smo ispitati što homogeniju skupinu pacijenata, pa smo odabrali odgovor na prvu liniju terapije, koja, istina, nije bila kompletno homogena, no ipak je najveći broj pacijenata liječen VAD protokolom. Uz to smo odabirom prve linije terapije željeli izbjeći heterogenost skupine u smislu da su neki pacijenti duže u studiji, što znači da su primili više linija terapije i time imali veću šansu boljeg odgovora na terapiju od pacijenata koji su kraće u studiji. Naime, tijekom provođenja ovog istraživanja naši pacijenti su lijekove iz nove generacije tzv. „pametnih“ lijekova, tj. bortezomib, mogli dobiti tek u trećoj liniji terapije. Od svih ispitivanih varijabli angiogeni parametri, MVD

i broj krvnih žila po  $\text{mm}^2$  pokazali su se kao značajni prognostički pokazatelji pacijentova odgovora na prvu liniju terapije. Rezultati ove studije pokazali su da pacijent s višim MVD-om ima 7,69 puta veću vjerojatnost neuspjeha prve linije terapije nego pacijent s niskim MVD-om. Jednako tako pacijent s visokim brojem krvnih žila po  $\text{mm}^2$  u uzorku koštane srži ima 3,85 puta veću vjerojatnost da ne odgovori na prvu liniju terapije. Suprotno ovim rezultatima Rajkumar i sur. pokazali su da ne postoji statistički značajna povezanost stupnja angiogeneze s odgovorom na terapiju<sup>37</sup>, no naši rezultati su u skladu s drugim provedenim studijama<sup>19,22</sup>.

## ZAKLJUČAK

Objektivna metoda procjene angiogeneze korištenjem računalno potpomognute analize slike uz izračunavanje broja malih krvnih žila po  $\text{mm}^2$ , površine malih krvnih žila po  $\text{mm}^2$  i ukupne vaskularne površine mogla bi postati dio rutinske patohistološke obrade pacijenata koje bi pomogle u prepoznavanju pacijenata s eventualnim agresivnijim tijekom bolesti i lošijim odgovorom na terapiju, a smatramo da bi se ovakav način procjene angiogeneze mogao koristiti i u praćenju pacijenata, odnosno reevaluaciji nakon provedenih linija terapije.

**Izjava o sukobu interesa:** Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Balakumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:465-80.
3. Edwards CM, Lwin ST, Fowler JA, Oyajobi BO, Zhuang J, Bates AL et al. Myeloma cells exhibit an increase in proteasome activity and an enhanced response to proteasome inhibition in the bone marrow microenvironment *in vivo*. *Am J Hematol* 2009;84:268-72.
4. Fowler JA, Edwards CM, Croucher PI. Tumor-host cell interactions in the bone disease of myeloma. *Bone* 2011;48:121-8.
5. Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr* 2008;3:29-34.
6. Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 2004;121:228-41.
7. Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S et al. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:77-84.

8. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005;106:1232-9.
9. Cook AC, Tuck AB, McCarthy S, Turner JG, Irby RB, Bloom GC et al. Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six hallmarks of cancer in model of breast cancer progression. *Mol Carcinog* 2005;43:225-36.
10. Standal T, Hjorth-Hansen H, Rasmussen T, Dahl IM, Lenhoff S, Brenne AT et al. Osteopontin is an adhesive factor for myeloma cells and is found in increased levels in plasma from patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:174-82.
11. Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol* 2003;123:263-70.
12. Caers J, Günthert U, De Raeve H, Van Valckenborgh E, Menu E, Van Riet I et al. The involvement of osteopontin and its receptors in multiple myeloma cell survival, migration and invasion in the murine 5T33MM model. *Br J Haematol* 2006;132:469-77.
13. Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Rizzato R, Lunghi P, Bonomini S et al. Human myeloma cells express the bone regulating gene Runx2/Cbfa1 and produce osteopontin that is involved in angiogenesis in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2005;19:2166-76.
14. Robbani DF, Colon K, Ely S, Chesi M, Bergsagel PL. Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol* 2007;25:16-20.
15. Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1269-73.
16. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clin Cancer Res* 2007;13:816-23.
17. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A 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. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:193-9.
19. Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Wellik LA, Fonseca R et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:23523-9.
20. Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13:469-72.
21. Rajkumar SV, Fonseca R, Ansell SM. Computerized image analysis in the assessment of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Blood* 1998;92Suppl 1:100a.
22. Bhatti SS, Kumar L, Dinda AK, Dawar R. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: use of light microscopy as well as computerized image analyzer in the assessment of microvessel density and total vascular area in multiple myeloma and its correlation with various clinical, histological, and laboratory parameters. *Am J Hematol* 2006;81:649-56.
23. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36:842-54.
24. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.
25. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
26. Landgren O, Kyle RA, Rajkumar SV. From myeloma precursor disease to multiple myeloma: new diagnostic concepts and opportunities for early intervention. *Clin Cancer Res* 2011;17:1243-52.
27. Rajkumar SV, Fonseca R, Dispenzieri A. Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2001;68:269-75.
28. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
29. Cibeira MT, Rozman M, Segarra M, Lozano E, Rosiñol L, Cid MC et al. Bone marrow angiogenesis and angiogenic factors in multiple myeloma treated with novel agents. *Cytokine* 2008;41:244-53.
30. Choi JH, Ahn MJ, Jang SJ, Park CK, Park YW, Oh HS et al. Absence of clinical prognostic value of vascular endothelial growth factor and microvessel density in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2002;76:460-4.
31. Ria R, Vacca A, Russo F, Cirulli T, Massaia M, Tosi P et al. VEGF-dependent autocrine loop mediates proliferation and capillarogenesis in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Thromb Haemost* 2004;92:1438-45.
32. Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V, Di Raimondo F et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88:176-85.
33. Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R et al. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia* 2003;17:2025-31.
34. Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Kimlinger TK et al. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. *Blood* 2004 104:1159-65.
35. Ribas C, Colleoni GW, Silva MR, Carreago MJ, Bordin JO. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunoreactivity in the context of adverse standard prognostic factors in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2004;73:311-7.
36. Marković O, Marisavljević D, Cemerikić V, Vidović A, Perunić M, Todorović M et al. Expression of VEGF and microvessel density in patients with multiple myeloma: clinical and prognostic significance. *Med Oncol* 2008;25:451-7.
37. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000;6:3111-6.