

## Osoczowe stężenie cytokin limfo-i angiogennych u chorych na chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

Plasma concentration of cytokins involved in lymph- and angiogenesis in diffuse large B-cell lymphoma

Wosztal Anna<sup>1</sup>, Wołowicz Dariusz<sup>2</sup>, Ziółkowska Ewelina<sup>3</sup>, Robak Ewa<sup>4</sup>, Korycka-Wołowicz Anna<sup>3</sup>

### STRESZCZENIE

W rozwoju chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) istotną rolę przypisuje się procesom angio- i limfangiogenezy. Do najważniejszych czynników regulujących te procesy zalicza się cytokiny należące do rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), ich receptory (VEGF-R) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Celem przedstawionych badań była ocena osoczowego stężenia VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3 i bFGF w grupie 55 chorych na DLBCL przed rozpoczęciem leczenia wg schematu R-CHOP oraz po jego zakończeniu. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osób. U chorych przed leczeniem stężenie VEGF-R3 było istotnie wyższe niż u osób zdrowych. Stężenie VEGF-R3 oraz VEGF-C było istotnie wyższe u chorych z grupy większego ryzyka (IPI 3–5), w porównaniu z chorymi z grupy mniejszego ryzyka (IPI 0–2). U chorych stężenie VEGF-R3 wykazywało ponadto dodatnią korelację ze stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny, VEGF-D natomiast wykazywało dodatni związek z aktywnością LDH i stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny, a ujemny z liczbą płytek krwi oraz ze stężeniem albumin. Stężenia oznaczanych cytokin po zakończeniu leczenia nie różniły się istotnie od wartości stwierdzonych przed leczeniem. Pomimo że uzyskane wyniki nie wskazują na znaczenie predykcyjne badanych cytokin w odniesieniu do wyniku leczenia DLBCL, sugerują jednak związek czynników uczestniczących w limfangiogenezie z aktywnością choroby.

**Słowa kluczowe:** limfangiogeneza, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3, bFGF, chłoniak rozlany z dużych komórek B

### ABSTRACT

Angiogenesis and lymphangiogenesis play an important role in the development of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Above phenomena are controlled by a number of cytokines among them the most important are vascular endothelial growth factor family members (VEGF), their receptors (VEGF-R) and basic fibroblast growth factor (bFGF). The aim of this study was to evaluate the plasma level of VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3 and bFGF in 55 patients with DLBCL before treatment as well as after chemotherapy with R-CHOP protocol. Control group consisted of 30 healthy subjects. The concentration of VEGF-R3 was significantly higher in patients before treatment than in control group. Concentrations of VEGF-R3 and VEGF-C were significantly higher in patients with higher risk (IPI 3–5) than in subjects with lower risk (IPI 0–2). Additionally, VEGF-R3 was positively correlated with  $\beta_2$ -microglobulin, whereas VEGF-D was correlated positively with LDH and  $\beta_2$ -microglobulin, and negatively with platelets count and serum albumins concentration. We found no statistical differences between cytokine values after treatment as compared to initial ones. However, our results do not indicate a predictive value of the cytokines studied regarding the issue of DLBCL therapy, they may suggest a role of some lymphangiogenesis-involved factors in the disease activity.

**Key words:** Lymphangiogenesis, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3, bFGF, Diffuse large B-cell lymphoma

© by Polskie Towarzystwo Hematologów  
i Transfuzjologów  
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 20.08.2012  
Zaakceptowano: 12.09.2012

<sup>1</sup> Dział Hematologii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach

Kierownik: dr med. Marcin Pasiarski

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Chorób Nowotworowych Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Kierownik: prof.dr hab.med. Kazimierz Kuliczkowski

<sup>3</sup> Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof.dr hab.med. Tadeusz Robak

<sup>4</sup> Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu

Medycznego w Łodzi

Kierownik: prof.dr hab.med. Anna Sysa-Jędrzejowska

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:

Anna Korycka-Wołowicz

Klinika Hematologii UM w Łodzi

ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź

e-mail: anna.korycka-wołowicz@umed.lodz.pl

Praca częściowo finansowana z prac statutowych Klinik Hematologii UM w Łodzi Nr 503/1-093-01/503-01

Acta  
Haematologica  
Polonica;  
43 (3): 277–284

## Wstęp

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma*; DLBCL) jest nowotworem wywodzącym się z germinalnych lub postgerminalnych limfocytów B, które po kontakcie z antygenem uległy transformacji nowotworowej. W Europie jest on jednym z najczęściej rozpoznawanych chłoniaków niehodgkinowskich (non-Hodgkin lymphoma, NHL) i stanowi ok. 30–58% wszystkich NHL u dorosłych [1].

W ostatnich latach w patogenezie DLBCL, podobnie jak w innych nowotworach hematologicznych i guzach litych, istotne znaczenie przypisuje się patologicznemu rozrostowi naczyń krwionośnych i limfatycznych, zwanemu odpowiednio angiogenezą i limfangiogenezą [2–4]. Procesy te polegają na powstawaniu nowych naczyń krwionośnych i chłonnych z sieci naczyń już istniejących, a ich wydolność w chorobach nowotworowych warunkuje odżywienie guza i jego rozsiew [5]. Obydwa procesy, w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, regulowane są przez szereg cytokin. Do najważniejszych czynników proangiogennych zalicza się VEGF-A i VEGF-B, należące do rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*; VEGF) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*; bFGF) [2]. Do najważniejszych stymulatorów limfangiogenezы należą natomiast VEGF-C i VEGF-D, będące ligandami receptora o aktywności kinazy tyrozynowej VEGF-R3 (Flt-4) [6]. Oś VEGF-C/VEGF-D/VEGF-R3 stanowi główną drogę przekazywania sygnałów związanych ze wzrostem komórek chłonnych śródbłonka, migracją komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych, pobudzeniem limfangiogenezы wewnątrz guza i w otaczających go tkankach oraz ze zwiększeniem przepuszczalności ścian naczyń [6].

Liczne opublikowane dotychczas badania dotyczące biologii nowotworów hematologicznych i guzów litych wskazują na związek pomiędzy gęstością unaczynienia krwionośnego i chłonnego guza, a obrazem klinicznym choroby i jej przebiegiem [6–8]. Badania takie dotyczyły także NHL, w tym DLBCL. Niektórzy autorzy stwierdzili, że gęstość unaczynienia jest wyższa w chłoniakach agresywnych niż w przewlekłych [2, 9, 10]. Wykazano także, że komórki chłoniakowe produkują zarówno cytokiny proangiogenne, jak i prolimfoangiogenne (VEGF-A, VEGF-C i VEGF-D) oraz ich receptory (VEGF-R1, VEGF-R2 i VEGF-R3), a gęstość unaczynienia guza oraz ekspresja komórkowa tych cytokin może mieć znaczenie rokownicze [5, 11–16].

Pośrednimi wskaźnikami angio- i limfangiogenezы są osoczowe stężenia cytokin zaangażowanych w te zjawiska. Należy jednak pamiętać, że źródłem ich rozpuszczalnych form są nie tylko komórki utkania nowotworowego, ale także liczne prawidłowe komórki

i tkanki, dlatego też związek pomiędzy stężeniem tych czynników we krwi a gęstością unaczynienia guza nie zawsze jest możliwy do wykazania. Zaobserwowano jednak, że podwyższone surowicze stężenie VEGF i bFGF w NHL ma niekorzystne znaczenie rokownicze [17–20]. W szczególności u chorych na DLBCL wykazano, że stężenie VEGF jest podwyższone w stosunku do osób zdrowych i w analizie wieloczynnikowej jest ono powiązane z krótkim czasem całkowitego przeżycia [3]. W tej grupie chłoniaków nie oceniano dotychczas stężenia cytokin prolimfangiogennych ani ich związku z przebiegiem leczenia cytotatycznego.

Dlatego też celem niniejszych badań była ocena zmian osoczowego stężenia cytokin zaangażowanych w limfangiogenezę (VEGF-C, VEGF-D i VEGF-R3), jak również bFGF jako stymulatora angiogenezы, w grupie chorych na DLBCL przed leczeniem immunochemioterapią według schematu R-CHOP oraz po jej zakończeniu, w porównaniu z osobami zdrowymi, oraz ocena związku tych stężeń z wynikiem leczenia cytotatycznego i z podstawowymi parametrami klinicznymi i hematologicznymi.

## Materiał i metody

### Charakterystyka chorych

Badaniami objęto 55 uprzednio nieleczonych chorych na DLBCL (38 mężczyzn i 17 kobiet) w wieku 23–88 lat (średnia 65,4). Chorzy ci w latach 2007–2010 znajdowali się pod opieką Działu Hematologii i Świątokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach lub Poradni Hematologicznej Świątokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach. Rozpoznanie oparto na badaniu histopatologicznym powiększonego węzła chłonnego lub guza nowotworowego z uwzględnieniem badań immunohistochemicznych. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników (21 kobiet i 9 mężczyzn) w wieku 39–88 lat (średnia 61,1). U wszystkich chorych przed leczeniem wykonano podstawowe badania diagnostyczne, niezbędne do ustalenia stanu zaawansowania według skali Ann Arbor, jak również stanu ogólnego w skali ECOG i Międzynarodowego Wskaźnika Progностycznego (IPI). U chorych oraz w grupie kontrolnej oznaczono morfologię krwi, aktywność LDH, stężenie  $\beta_2$ -mikroglobuliny, stężenie albumin i stężenie CRP. Ogólną charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli I.

U 53 chorych zastosowano 6 lub 8 cykli immunochemioterapii wg schematu R-CHOP (rituksymab 375 mg/m<sup>2</sup>; cyklofosfamid 750 mg/m<sup>2</sup>; doksorubicyna 50 mg/m<sup>2</sup>; winkrystyna 2 mg 1. dnia; prednizon 100 mg przez 5 dni), podawanego co 21 dni. U trzech chorych, ze względu na istnienie przeciwwskazań do antracyklin, podano leczenie według schematu R-COP. U 39 chorych zrealizowano cały program leczenia (u 34 chorych 8 cykli, u 5 chorych 6 cykli).

**Tabela I.** Ogólna charakterystyka badanych chorych

Table I. Patients characteristics

Liczba chorych (n) ogółem	55	
Wiek (lata) $\bar{x} \pm SD$ (min.–max)	65,4 $\pm$ 14,7 (23-88)	
Płeć, n (%)	M (n)	38 (69)
	K (n)	17 (31)
Stadium Ann Arbor	I (n)	5
	II (n)	16
	III (n)	20
	IV (n)	14
Stadium ECOG	0 (n)	2
	1 (n)	5
	2 (n)	20
	3 (n)	26
IPI	4 (n)	2
	0 (n)	1
	1 (n)	8
	2 (n)	11
IPI	3 (n)	17
	4 (n)	17
	5 (n)	1

Przyczyną podania mniejszej liczby cykli u pozostałych 16 chorych była progresja choroby lub zgon podczas chemioterapii albo decyzja pacjenta o zaprzestaniu leczenia. W wyniku leczenia 24 chorych uzyskała całkowitą remisję (CR), u 29 nie uzyskano CR (NCR), a dwóch pozostałych chorych utracono z obserwacji przed oceną skuteczności leczenia.

#### Pobieranie materiału do badań

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa uzyskiwana od chorych na DLBCL podczas rutynowych badań diagnostycznych przed leczeniem oraz po jego zakończeniu, tj. po 6 lub 8 cyklach chemioterapii, jak również od osób zdrowych. Uzyskane osocze przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr RNN/110/07/KE), a wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

#### Oznaczanie stężenia badanych cytokin w osoczu chorych na DLBCL oraz w grupie kontrolnej

Stężenia badanych cytokin zostały oznaczone w Zakładzie Immunoendokrynologii Katedry Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów, z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej (ELISA). VEGF-C, VEGF-D i bFGF oznaczano, stosując zestawy Quantikine firmy R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA), natomiast VEGF-R3/FLT-4 oznaczano przy użyciu

zestawu firmy e.Bioscience (USA). Zestawy do oznaczenia osoczkowego stężenia badanych cytokin miały komercyjne płytki 96-dołkowe, opłaszczane odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi. Przed przystąpieniem do oznaczeń zarówno zestawy, jak i zamrożone próbki osocza ogrzewano do temperatury pokojowej i postępowano ściśle według zaleceń producentów.

Gęstość optyczną odczytywano przy użyciu czytnika płytek ELISA Meterteche960, stosując długość fali  $\lambda = 450 \text{ nm}$  i filtr korekcyjny  $\lambda = 540\text{--}570 \text{ nm}$ . Stężenia badanych cytokin odczytywano w oparciu o odpowiednie krzywe wzorcowe.

Czułość testów dla VEGF-C wynosiła 13,3 pg/ml, dla VEGF-D 11,4 pg/ml, dla bFGF  $< 3 \text{ pg/ml}$ , a dla VEGF-R3 0,03 ng/ml.

#### Analiza statystyczna

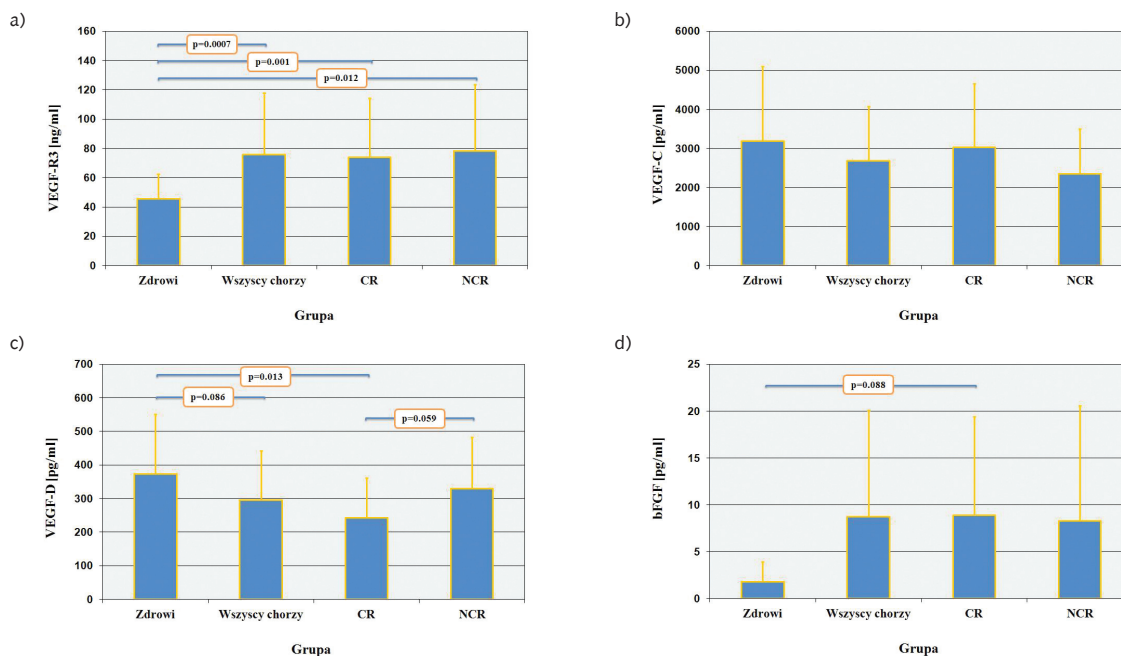
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testów nieparametrycznych: test Manna-Whitneya dla zmiennych niezależnych, test par Wilcozona dla zmiennych zależnych, test korelacji rang Spearmana dla zmiennych ilościowych oraz test  $\chi^2$ . We wszystkich analizach za statystycznie istotne przyjęto  $p < 0,05$ .

#### Wyniki

Nie wykazano istotnych różnic co do wieku i rozkładu płci pomiędzy grupą chorych i grupą kontrolną. Średnie osoczkowe stężenie VEGF-R3 było istotnie wyższe u wszystkich chorych przed leczeniem niż u osób zdrowych ( $p=0,0007$ ) (Ryc. 1A). Podobną różnicę stwierdzono także pomiędzy grupą kontrolną a chorymi, którzy uzyskali CR, oraz grupą kontrolną a pacjentami, którzy tej remisji nie uzyskali ( $p=0,001$  i  $p=0,01$ ; odpowiednio). Średnie stężenie VEGF-D było wyższe (lecz bez istotności statystycznej) u osób zdrowych niż u wszystkich chorych przed leczeniem ( $p=0,086$ ) oraz istotnie wyższe niż u chorych, którzy uzyskali CR ( $p=0,01$ ). Było ono również niższe (na granicy istotności statystycznej) u pacjentów, którzy uzyskali CR w stosunku do pozostałych chorych ( $p=0,059$ ) (Ryc. 1C). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w stężeniach VEGF-C i bFGF pomiędzy analizowanymi grupami chorych przed leczeniem i u osób zdrowych (Ryc. 1B i D).

Stężenia badanych cytokin u chorych na DLBCL przed leczeniem i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli II.

Nie wykazano związku pomiędzy stężeniami badanych cytokin, a wiekiem, płcią ani stadium zaawansowania klinicznego. Stężenia VEGF-R3 oraz VEGF-C były natomiast istotnie wyższe u chorych z IPI 3–5, w porównaniu z chorymi z IPI 0–2 (Tab. III).



**Ryc. 1.** Stężenie VEGF-R3 (a), VEGF-C (b), VEGF-D (c) oraz bFGF (d) u chorych na DLBCL przed leczeniem i w grupie kontrolnej. CR – całkowita remisja (*complete remission*); NCR – odpowiedź inna niż całkowita remisja (*response other than complete remission*)

**Fig.1.** Concentration of VEGF-R3 (a), VEGF-C (b), VEGF-D (c) and bFGF (d) in DLBCL patients before treatment and in control group

**Tabela II.** Stężenia badanych cytokin u chorych na DLBCL przed leczeniem oraz w grupie kontrolnej

**Table II.** Cytokines concentrations in DLBCL patients before treatment and in healthy volunteers

	VEGF-R3* (ng/ml)		VEGF-C* (pg/ml)		VEGF-D* (pg/ml)		bFGF* (pg/ml)	
	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)
Chorzy	52	75,8±42,1 (16-194)	49	2680,3±1397,8 (845-7060)	50	295,7±146,5 (0-859,5)	50	8,7±11,4 (0-48,7)
Zdrowi	30	45,7±16,7 (14-86)	28	3186,9±1904 (1129-7887)	30	372,9±178,6 (104,7-813,4)	29	1,8±2,1 (0-7,6)
Analiza statystyczna (p)		0,0007	NZ		0,086		NZ	

N – liczba chorych, NZ – wartość nieznamienna, X – wartość średnia, w nawiasach (min-max), SD – odchylenie standardowe

\*VEGF-R3 i VEGF-C – wykrywalny u wszystkich zdrowych i u wszystkich chorych;

\*VEGF-D – niewykrywalny (stężenie =0) u 1 chorego;

\*bFGF – niewykrywalny (stężenie =0) u 3 zdrowych i u 17 chorych

**Tabela III.** Zależność pomiędzy Międzynarodowym Indeksie Progностycznym (IPI), a stężeniem badanych cytokin u chorych na DLBCL

**Table III.** Correlation between IPI and cytokines concentrations in DLBCL patients

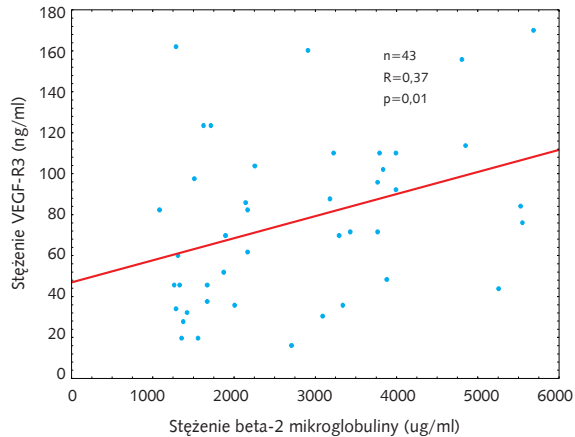
	VEGF-R3 (ng/ml)		VEGF-C (pg/ml)		VEGF-D (pg/ml)		bFGF (pg/ml)		
	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)	n	x±SD (min-max)	
IPI	0-2	20	63,5±40,6 (20,0-156,0)	18	2309,0±1729,5 (845,0-7060,0)	19	249,3±128,2 (0-859,5)	19	7,3±11,3 (0-40,7)
	3-5	32	83,5±41,8 (16,0-194,0)	31	2895,6±1140,5 (970,0-5280,0)	31	324,1±151,7 (44,7-561,6)	31	9,6±11,5 (0-48,7)
Analiza statystyczna (p)		0,048		0,02		NZ		NZ	

N – liczba chorych, NZ – wartość nieznamienna, x – wartość średnia, w nawiasach (min-max), SD – odchylenie standardowe

U chorych na DLBCL stężenie VEGF-R3 wykazywało dodatnią korelację ze stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny (R=0,37, p=0,01) (Ryc. 2). Stężenie VEGF-D wykazywało natomiast dodatni związek z aktywnością LDH (R=0,35; p=0,01) (Ryc. 3A) i stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny (R=0,35; p=0,02) (Ryc. 3B),

a ujemny z liczbą płytek krwi (R=-0,39; p=0,006) (Ryc. 3C) oraz ze stężeniem albumin (R=-0,44; p=0,001) (Ryc. 3D).

Stężenia badanych cytokin w chwili rozpoznania nie różniły się istotnie od wartości oznaczonych po zakończeniu leczenia zarówno w gru-



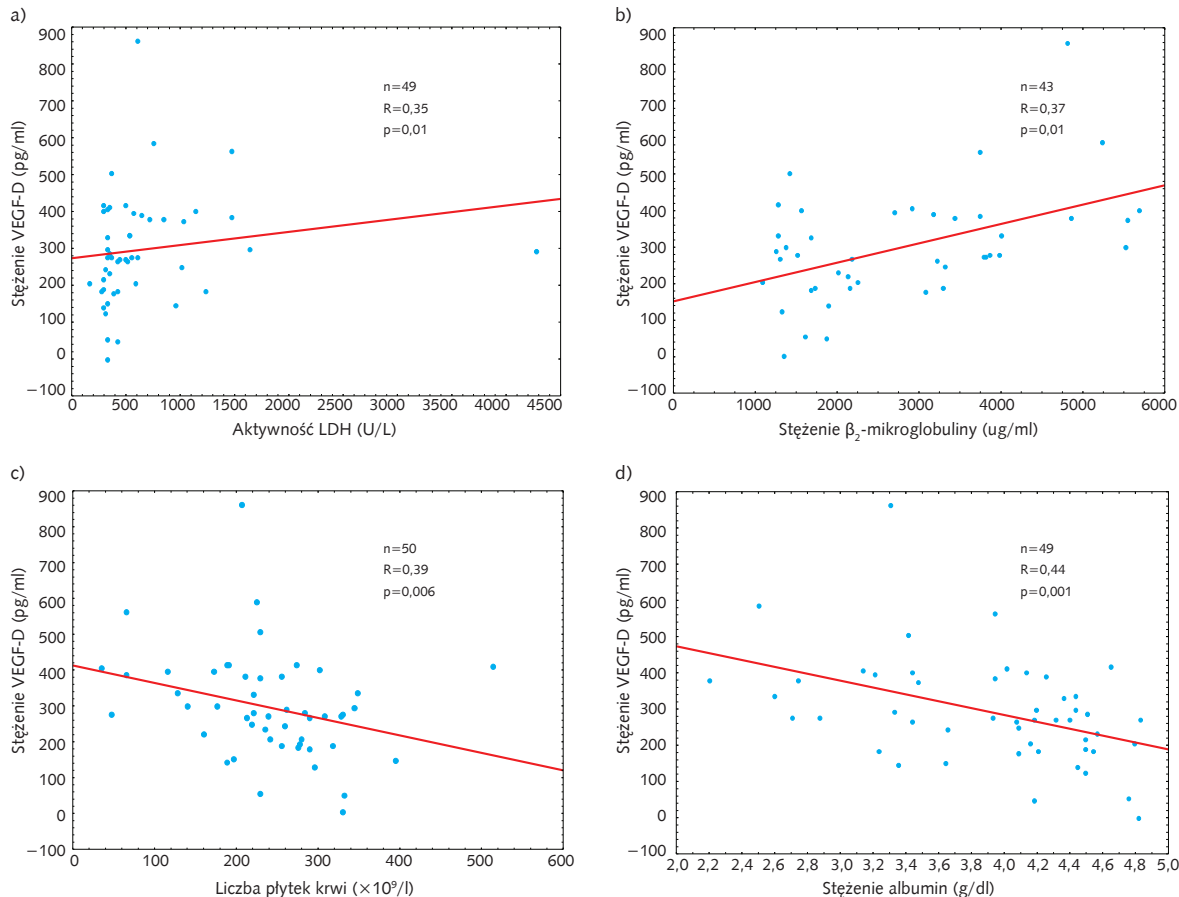
**Ryc. 2.** Zależność pomiędzy stężeniem VEGF-R3, a stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny u chorych na DLBCL przed leczeniem  
**Fig. 2.** Correlation between VEGF-R3 and  $\beta_2$ -microglobulin concentrations in DLBCL patients before treatment

pie wszystkich badanych chorych ( $72,4 \pm 47,1$  ng/ml;  $2777,5 \pm 1615,0$  pg/ml;  $295,4 \pm 132,1$  pg/ml i  $12,7 \pm 15,8$  pg/ml; odpowiednio dla VEGF-R3, VEG-

F-C, VEGF-D i bFGF), jak i w podgrupach wyodrębnionych w zależności od odpowiedzi na leczenie (CR i NCR) (dla VEGF-R3 odpowiednio  $70,1 \pm 32,4$  i  $75,3 \pm 59,5$  ng/ml; dla VEGF-C odpowiednio  $3100,9 \pm 1549,7$  i  $2404,4 \pm 1668,9$  pg/ml, dla VEGF-D odpowiednio  $279,5 \pm 133,2$  i  $315,1 \pm 133,2$  pg/ml i dla bFGF odpowiednio  $13,1 \pm 14,5$  i  $12,2 \pm 17,7$  pg/ml).

## Omówienie

Angiogeneza i limfangiogeneza są zaliczane do ważnych procesów biorących udział w rozwoju i szerzeniu się nowotworów różnego pochodzenia, w tym także DLBCL, a nasilenie tych zjawisk wykazuje związek z obrazem klinicznym choroby i jej przebiegiem. Ze względu na trudności metodologiczne związane z bezpośrednim pomiarem gęstości naczyń krwionośnych lub chłonnych w guzie nowotworowym, podejmowane są próby oceny angio- i limfangiogenezy za pomocą wskaźników pośrednich, w szczególności surowiczego lub osoczonego stężenia cytokin zaangażowanych w regulację omawianych procesów.



**Ryc. 3.** Zależność pomiędzy stężeniem VEGF-D, a aktywnością LDH (a), stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny (b), liczbą płytek krwi (c) i stężeniem albumin (d) u chorych na DLBCL przed leczeniem:  
**Fig. 3.** Correlation between VEGF-D concentration and LDH activity (a),  $\beta_2$ -microglobulin concentration (b), platelets count (c) and albumin concentration (d) in DLBCL patients before treatment



Cytokiny VEGF-C i VEGF-D, dla których głównym receptorem jest VEGF-R3 (Flt-4), należą do najważniejszych aktywatorów limfangiogenezy, chociaż należy pamiętać, że w pewnym stopniu wywierają one także wpływ na tworzenie naczyń krwionośnych. Oś VEGF-C/D-VEGF-R3 uważana jest obecnie za najważniejszy szlak przekazywania pozakomórkowych sygnałów prolimfangiogennych. O jej roli w patogenezie DLBCL świadczą badania Pazgal i wsp. [5], którzy u prawie wszystkich spośród 38 chorych wykazali ekspresję VEGF-C, VEGF-D oraz VEGF-R3 w guzie nowotworowym. Wysoką tkankową ekspresję VEGF-C u 89% chorych na DLBCL stwierdzili Ganjoo i wsp. [21], podczas gdy Paydas i wsp. [22] ujawnili ją jedynie u ok. 1/3 chorych na NHL, z podobną częstością w chłoniakach agresywnych i przewlekłych. Nie opublikowano natomiast badań dotyczących stężeń powyższych cytokin we krwi chorych na DLBCL, choć Aref i wsp. [3] zaobserwowali u pacjentów z tym podtypem chłoniaka podwyższone surowicze stężenie VEGF w stosunku do osób zdrowych, związane z krótszym czasem całkowitego przeżycia. Dlatego też celem przedstawionych powyżej badań była ocena osoczowego stężenia VEGF-C, -D, ich receptora VEGF-R3, jak również cytokiny proangiogennej bFGF, w grupie chorych na DLBCL przed leczeniem oraz po zakończeniu immunochemioterapii schematem R-CHOP.

Wykazano, że osoczowe stężenie VEGF-R3 było istotnie wyższe u chorych na DLBCL niż u osób zdrowych oraz podobne u pacjentów, u których uzyskano CR, i tych, którzy tej remisji nie osiągnęli. W świetle przedstawionych powyżej badań Pazgal i wsp. [5], wydaje się więc możliwe, że źródłem tej cytokiny we krwi obwodowej są komórki nowotworowe. Stężenie VEGF-D w grupie kontrolnej było nieco wyższe niż stwierdzone w grupie wszystkich chorych, natomiast istotnie wyższe niż u pacjentów, którzy uzyskali CR. U tych chorych z kolei stężenie omawianej cytokiny było niższe (na granicy istotności statystycznej) niż u chorych, u których nie osiągnięto CR. Obserwacja ta jest trudna do interpretacji. Należy jednak pamiętać, że białka rodziny VEGF są cytokinami o działaniu wielokierunkowym, wykraczającym poza regulację angio- i limfangiogenezy, stąd też na ich stężenie surowicze czy osoczowe wpływają prawdopodobnie również czynniki niezwiązane bezpośrednio z rozwojem chłoniaka. Należy także uwzględnić stosunkowo małą liczebność grupy badanej, jak i kontrolnej, co mogło utrudnić ujawnienie związków istniejących w całej populacji chorych na DLBCL.

Na szczególną uwagę zasługuje obserwacja, że stężenie VEGF-R3 wykazywało dodatnią korelację z surowiczym stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny, a także było istotnie wyższe u chorych z IPI co najmniej 3 w stosunku do pacjentów, u których IPI nie przekraczało 2. Podobną współzależność z IPI zaobserwowano

także dla surowiczego stężenia VEGF-C. Stwierdzono również dodatnią korelację VEGF-D z aktywnością LDH, stężeniem  $\beta_2$ -mikroglobuliny oraz, na granicy istotności statystycznej, ze stężeniem CRP ( $p=0,06$ ). Wykazano natomiast ujemną korelację tej cytokiny ze stężeniem albumin, jak również z liczbą płytek krwi. Można przypuszczać, że ujemna współzależność pomiędzy liczbą płytek a osoczowym stężeniem VEGF-D wynika pośrednio ze związku pomiędzy tą cytokiną a masą guza, którego rozwój upośledza hematopoezę. Jest to jednak hipoteza, której potwierdzenie wymaga dalszych obserwacji na większej grupie chorych. Istotny wydaje się fakt, że powyższe zależności wykazano tylko w grupie badanej, nie były one natomiast stwierdzone u osób zdrowych. Pomimo że stężenie VEGF-D w grupie chorych na DLBCL przed leczeniem było nieco niższe niż u osób zdrowych, wymienione korelacje mogą wskazywać na istnienie związku pomiędzy wydzielaniem tych cytokin do krwioobiegu a masą nowotworu, co być może ma miejsce w wyniku ich zwiększonej syntezy. Tym samym korelacje te mogą potwierdzać rolę VEGF-D, a być może także VEGF-C oraz ich receptora VEGF-R3 w rozwoju DLBCL.

W badanej przez nas grupie chorych na DLBCL oraz u osób zdrowych oceniano także ekspresję bFGF, będącego jednym z najsilniejszych stymulatorów angiogenezy. Jest to czynnik o właściwościach mitogennych, który podobnie jak VEGF oddziałuje na komórki docelowe poprzez receptory o charakterze kinaz tyrozynowych. Uczestniczy on także w angiogenezie nowotworowej, a jego ekspresję wykazano w komórkach guzów różnego pochodzenia w tym także w komórkach NHL [23–26].

Giles i wsp. [27] wykazali zwiększone surowicze stężenie bFGF u chorych na NHL, w stosunku do osób zdrowych. Salven i wsp. [17–19] nie zaobserwowali istotnych różnic w surowiczym stężeniu tej cytokiny u chorych na NHL w zależności od stopnia złośliwości, określanego według klasyfikacji *Working Formulation* (formuła robocza), ale stwierdzili, że podwyższona wartość bFGF w chwili rozpoznania ma niekorzystne znaczenie rokownicze co do czasu przeżycia. Nasze badania wykazały, że stężenie bFGF w grupie badanej było, co prawda, wyższe niż u osób zdrowych, jednak różnica ta nie osiągnęła progu istotności statystycznej prawdopodobnie w związku z dużymi różnicami między stężeniem bFGF u poszczególnych chorych i stosunkowo małą liczebnością grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnych różnic w tym zakresie pomiędzy chorymi, u których uzyskano CR, i chorymi, u których zastosowane leczenie było mniej skuteczne. Należy jednak zwrócić uwagę, że w przedstawionych przez nas badaniach nie oceniano długości przeżycia, a jedynie bezpośredni wynik immunochemioterapii pierwszej linii, tzn. fakt uzyskania CR.

Jak wspomniano wyżej, Salven i wsp. [19] stwierdzili niekorzystne znaczenie rokownicze VEGF oraz bFGF co do całkowitego czasu przeżycia w chłoniakach o różnym stopniu złośliwości. Nie wykazali oni jednak wartości predykcyjnej surowiczego stężenia tych cytokin w odniesieniu do wyniku zastosowanego leczenia. Bertolini i wsp. [28] zaobserwowali natomiast, że stężenia VEGF oraz bFGF u chorych na NHL, którzy w wyniku leczenia uzyskali CR, były znacząco niższe niż u chorych z progresją choroby. Do badań włączyli oni jednak chorych z różnymi typami histopatologicznymi NHL, którzy byli leczeni różnymi schematami chemioterapii. Co istotniejsze, badania opublikowane pod koniec lat 90. ubiegłego i na początku pierwszej dekady bieżącego stulecia, zostały wykonane przy użyciu zestawów, które prawdopodobnie nie różnicowały poszczególnych białek rodziny VEGF.

Zarówno u chorych, u których uzyskano CR, jak i u tych, u których leczenie było mniej skuteczne, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stężeniami badanych cytokin przed leczeniem i po jego zakończeniu. Brak spodziewanego związku pomiędzy ustąpieniem objawów choroby a osoczymym stężeniem badanych cytokin może być spowodowany ich znaczącym przechodzeniem do krwioobiegu podczas leczenia w wyniku uwalniania z rozpadłych komórek lub w następstwie odczynu zapalnego towarzyszącego lizie guza.

Pomimo że jedynie stężenie VEGF-R3 różniło się istotnie pomiędzy grupą badaną a kontrolną i że nie wykazano znaczenia predykcyjnego osoczego stężenia badanych cytokin u chorych na DLBCL, leczonych typowym schematem immunochemioterapii R-CHOP, to jednak uzyskane wyniki sugerują związek badanych cytokin z aktywnością i zaawansowaniem choroby. Mogą o tym świadczyć współzależności pomiędzy stężeniami VEGF-C, VEGF-D i VEGF-R3 a niektórymi wskaźnikami masy guza i czynnikami rokowniczymi. Przydatność oznaczania surowiczego stężenia cytokin zaangażowanych w limfangiogenezę u chorych na DLBCL do określania zaawansowania choroby i prognozowania jej przebiegu zasługuje więc na dalsze badania.

#### Piśmiennictwo

1. Tilly H, Dreyling M. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21: 172-4.
2. Tzankov A, Heiss S, Ebner S, et al. Angiogenesis in nodal B-cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 476-82.
3. Aref S, Mabed M, Zalata K, Sakrana M, El Askalany H. The interplay between c-myc oncogen expression and circulating vascular endothelial growth factor (sVEGF), its antagonist receptor, soluble Flt-1 in Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL): Relationship to patient outcome. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 499-506.
4. Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and receptors on diffuse large-B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol.* 2007; 170: 1362-9.
5. Pazgal I, Boycov O, Shpilberg O, Okon E, Bairey O. Expression of VEGF-C, VEGF-D and their receptor VEGFR-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48: 2213-20.
6. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001; 26: 25-35.
7. Hansen S, Grabau DA, Sørensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 139-46.
8. Wosztł A, Korycka-Wołowiec A. Angiogeneza i limfangiogeneza oraz ich znaczenie w nieziarniczych chłoniakach złośliwych. *Acta Haematol Pol.* 2010; 41: 21-33.
9. Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphoma and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leuk Lymphoma.* 2000; 40: 157-66.
10. Vacca A, Ribatti D, Ruco L. et al. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 965-70.
11. Jørgensen JM, Sørensen F.B, Bendix K, et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 584-95.
12. Ganjoo KN, Moore AM, Orazi A, Sen JA, Johnson CS, An CS. The importance of angiogenesis markers in the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study of 97 patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134: 381-7.
13. Jørgensen JM, Sørensen FB, Bendix K. et al. Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1647-60.
14. Paydas S, Ergin M, Seydaoglu G, Erdogan S, Yavuz S. Prognostic significance of angiogenic/lymphangiogenic, anti-apoptotic, inflammatory and viral factors in 88 cases with diffuse large B cell lymphoma and review of the literature. *Leuk Res* 2009; 33: 1627-35.
15. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ. et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest.* 2008; 88: 38-47.
16. Gratzinger D, Advani R, Zhao S, et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry

- predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol.* 2010; 148: 235–44.
17. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 3167–72.
  18. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3334–9.
  19. Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the sera concentrations of angiogenic growth factors VEGF and bFGF is independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: a single institution study of 200 patients. *Blood* 2000; 96: 3712–8.
  20. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, et al. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol.* 2002; 68: 91–100.
  21. Ganjoo KN, An CS, Robertson MJ, et al. Rituximab, bevacizumab and CHOP (RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetic analysis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 998–1005.
  22. Paydas S, Seydaoglu G, Ergin M, Erdogan S, Yavuz S. The prognostic significance of VEGF-C and VEGF-A in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 366–73.
  23. Fukushima N, Satoh T, Sano M, Tokunaga O. Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 709–20.
  24. Szarvas T, Jäger T, Laszlo V, et al. Circulating Angiostatin, bFGF, and Tie2/TEK Levels and Their Prognostic Impact in Bladder Cancer. *Urology.* 2012; 80: 737–48.
  25. Gora-Tybor J, Jamroziak K, Szmigielska-Kaplon A, et al. Evaluation of circulating endothelial cells as noninvasive marker of angiogenesis in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50: 62–7.
  26. Wołowiec D, Dybko J, Wróbel T, et al. Circulating sCD138 and some angiogenesis-involved cytokines help to anticipate the disease progression of early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006: 42394.
  27. Giles FJ, Vose JM, Do KA, et al. Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res.* 2004; 28: 595–604
  28. Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F, et al. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 1999; 106: 504–9.