

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



Hodnocení angiogeneze u chronické lymfocytární leukémie

Dizertační práce

MUDr. Lukáš Smolej

**II.interní klinika, oddělení klinické hematologie
Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové**

Hradec Králové 2008

Dizertační práce byla podpořena grantem č. NR/8373-3 a výzkumným záměrem
MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Poděkování

V první řadě děkuji své rodině, zejména manželce Marii, za neocenitelnou podporu. Děkuji MUDr. Petře Kašparové, Ph.D. a RNDr. Ctiradu Andrášovi, Ph.D. za vynikající úsilí a spolupráci při zavádění metod hodnocení angiogeneze. Dále děkuji svému školiteli prof. MUDr. Jaroslavu Malému, CSc. za cennou podporu, pomoc, rady a připomínky během celého doktorského studia. V neposlední řadě děkuji všem kolegům a kolegyním z Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové za spolupráci. Bez těchto lidí by tato dizertační práce nemohla vzniknout.

Obsah

1. Úvod a cíle dizertační práce.....	3
2. Chronická lymfocytární leukémie (CLL) – teoretický úvod.....	4
2.1 CLL obecně.....	4
2.2 Prognostické faktory u CLL.....	4
2.3 Léčba CLL.....	7
2.4 CLL – shrnutí.....	9
3. Angiogeneze – teoretický úvod.....	10
3.1 Angiogeneze a antiangiogenní léčba u nádorů.....	11
3.2 Význam angiogeneze u maligních nádorů.....	20
4. CLL a angiogeneze – úvod.....	24
4.1 Cirkulující angiogenní faktory u CLL.....	24
4.2 Vaskularita kostní dřeně u CLL.....	25
5. Výsledky.....	27
5.1 Cirkulující angiogenní faktory u CLL.....	27
5.1.1 Plazmatické koncentrace VEGF a bFGF u lymfoproliferací.....	28
5.1.2 Cirkulující solubilní endoglin u lymfoidních malignit.....	30
5.1.3 Souvislost mutačního stavu IgVH s bFGF a VEGF u CLL.....	33
5.1.4 Pokles cirkulujícího bFGF a VEGF po léčbě CLL.....	35
5.1.5 Moderní prognostické faktory a angiogeneze u CLL.....	41
5.1.6 Prognostický význam solubilního endoglinu u CLL.....	43
5.1.7 Endostatin u CLL a jeho vztah k prognostickým faktorům.....	51
5.2 Vaskularita dřeně u CLL.....	62
5.2.1 Význam angiogeneze ve dřeni u CLL.....	63
5.2.2 Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s CLL.....	65
5.2.3 Výběr endotelového markeru a hodnocení vaskularity dřeně u CLL..	74
6. Závěry a diskuze.....	84
7. Přílohy.....	87
7.1 Literatura.....	87
7.2 Seznam použitých zkratk.....	91

1. Úvod a cíle práce

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním dospělých na západní polokouli. Tato nozologická jednotka je nesmírně zajímavá z řady důvodů, ať již jde o nejasnou etiopatogenezi, výjimečnou různorodost klinického průběhu či léčebné úspěchy, kterých bylo v posledních 10-15 letech dosaženo. Zhruba třetina nemocných nikdy nevyžaduje léčbu, nicméně vzhledem k incidenci onemocnění, která navíc díky častějšímu vyšetřování krevního obrazu nadále stoupá, znamenají zbylé 2/3 nemocných obrovské náklady, které je třeba vyložit na diagnostiku a léčbu (včetně prevence a léčby infekčních komplikací, tak typických pro toto onemocnění), a tím představují nejen ryze medicínský, ale také finanční a sociální problém.

Aktuální problematikou řešenou v posledních letech je snaha o prognostické zařazení jednotlivého pacienta. Je známo, že celkové přežití u CLL se může pohybovat v řádech měsíců až po celá desetiletí, a ani systémy klinické klasifikace dle Bineta a Raie, ač nemocné základním způsobem rozdělí dle klinického rizika, nejsou zejména schopné stanovit prognózu u pacientů diagnostikovaných v časných stádiích (kterých je dnes až 75 %), u kterých však dojde k rychlé progresi a jejichž celkové přežití bude výrazně zkráceno. Jedním z možných prognostických faktorů, které by mohly přispět ke zpřesnění prognózy nemocných s CLL, je angiogeneze, neboli novotvorba cév z již existující vaskulatury. Cílem dizertační práce bylo stanovit ukazatele angiogeneze u CLL a vyhodnotit jejich prognostický význam i v kontextu s dalšími klasickými i novými prognostickými ukazateli u CLL.

Cíle dizertační práce:

1. Stanovit koncentrace cirkulujících angiogenních faktorů v plazmě nemocných s CLL.
2. Zhodnotit souvislost angiogenních faktorů s prognostickými faktory u CLL.
3. Vyšetřit vývoj koncentrací angiogenních faktorů po intenzivní léčbě
4. Stanovit mikrovaskulární denzitu kostní dřeně u nemocných s CLL.
5. Zhodnotit souvislost mikrovaskulární denzity a prognostických faktorů u CLL.
6. Stanovit souvislost mikrovaskulární denzity a cirkulujících angiogenních faktorů.

Dizertační práce je koncipována jako soubor publikací, které jsem publikoval či byly přijaty k publikaci v českém i zahraničním tisku na téma angiogeneze u chronické lymfocytární leukémie. Teoretický úvod k CLL a angiogenezi u tohoto onemocnění je uveden v textu. Teorie týkající se angiogeneze obecně je shrnuta ve dvou přehledných pracích a poté výsledky ve formě deseti plnotextových prací (studie hodnotící endostatin u CLL dosud nebyla publikována). Literatura je uvedena v každém článku; přehled literatury na konci dizertační práce obsahuje pouze literární odkazy neobsažené v níže uvedených člancích.

2. Chronická lymfocytární leukémie – teoretický úvod

2.1 CLL obecně

Chronická lymfocytární leukémie je nejčastější leukémií dospělého věku na západní polokouli, celkově tvoří 25-30 % všech leukémií. Jde o onemocnění charakterizované hromaděním morfologicky zralých B-lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických orgánech. Etiologie choroby je neznámá. V patogenezi hraje zásadní roli porucha programované buněčné smrti – apoptózy - která vede k narušení rovnováhy mezi novotvorbou a zánikem B-lymfocytů. Tradiční představa o pasivním hromaděním lymfocytů neschopných apoptózy však byla vyvrácena díky experimentům, které prokázaly významný podíl aktivní proliferace maligního klonu na celkové nádorové populaci. CLL má průměrnou incidenci kolem 3/100 000, avšak výrazně stoupající s věkem. Ze všech leukémií jeví nejčastější familiární výskyt (riziko vzniku CLL v 1.příbuzenské linii je cca 7x vyšší než u běžné populace). CLL postihuje častěji muže než ženy v poměru 1,8:1. Medián věku při stanovení diagnózy je zhruba 65 let, v poslední době však klesá díky náhodnému záchytu CLL u asymptomatických jedinců při častějším rutinním vyšetřování krevního obrazu. Zhruba 30 % nemocných je mladších než 50 let, což je velmi důležité z hlediska možnosti použití intenzivní léčby. Diagnóza je založena na Chesonových kritériích z roku 1996 (tab. 1).

morfologicky zralé lymfocyty v periferní krvi $>5000/\text{mm}^3$, $< 55\%$ atypických buněk imunofenotyp (CD 5/19/20/23+, sIg slabě +, FMC7-)
--

Tab.1. Diagnostická kritéria CLL dle National Cancer Institute Sponsored Working Group.

2.2 Prognostické faktory

Systémy stagingu zavedené v 70. letech 20. století Raiem a Binetem uvedené v tab.2 a 3 jsou nadále základem pro hodnocení rizika onemocnění. Binetova klasifikace je převážně používána v Evropě, Raiova (v tříbodovém modifikovaném systému) v USA. I když tyto systémy rozdělí nemocné podle celkového přežití, není možné podle nich identifikovat ty nemocné, jejichž onemocnění bylo zjištěné v časném stádiu, ale mají vysoké riziko progresu a celkově špatnou prognózu. Dále existují velké rozdíly v celkovém přežití v rámci jednoho stádia. Je nutno uvést, že oba stagingové systémy v klasické podobě využívají pouze fyzikálního vyšetření pro detekci lymfadenopatie a hepato/splenomegalie; nyní se však stále více používá ultrazvukové vyšetření periferních uzlin a břicha, ev. CT vyšetření hrudníku a břicha podobně jako u ostatních lymfoproliferací. Mezi již klasické nepříznivé prognostické faktory patří krátký zdvojevací čas lymfocytů do 12 měsíců, difúzní infiltrace kostní dřene a zvýšení sérových parametrů beta2-mikroglobulinu, tymidin kinázy nebo solubilního CD23 (sCD23).

Stádium	Definice
0	Lymfocytóza
I	Lymfadenopatie
II	Hepatomegalie a/nebo splenomegalie
III	Anémie Hb<110 g/l
IV	Trombocytopenie <100 000/mm ³

Tab.2. Staging CLL podle Raie. Dle modifikovaného střístupňového stagingu (1987) je stádium nízkého rizika 0, středního I/II a vysokého III/IV.

Stádium	Definice
A	Méně než 3 postižené lymfatické oblasti
B	3 a více postižených lymfatických oblastí
C	Anémie Hb<100 g/l a/nebo trombocytopenie <100 000/mm ³

Tab.3. Staging CLL podle Bineta. Za 1 oblast jsou počítány krční, axilární, mediastinální, retroperitoneální, tříselné, játra a slezina. Oboustranné postižení je počítáno jako 1 oblast.

V roce 1999 byly publikovány dvě studie, které prokázaly diametrální rozdíly v celkovém přežití nemocných s CLL na základě molekulárně-biologického vyšetření tzv. mutačního stavu genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH). Nemocní s mutovanými geny pro IgVH mají zpravidla stabilní onemocnění a výrazně delší celkové přežití, na druhé straně nemocní s méně než dvouprocentní mutací IgVH genů mají tendenci k progresi a kratší celkové přežití. Je však nutné si uvědomit, že jde o retrospektivní sledování heterogenní skupiny pacientů a definitivní potvrzení významu IgVH přinesou až prospektivní studie hodnotící eventuální vliv IgVH na účinnost konkrétní léčby, například kombinovaných fludarabinových režimů. Vzhledem k technické a finanční náročnosti stanovení mutačního stavu IgVH (reverzně-transkriptázová PCR s nutností izolace a sekvenace PCR produktů) byla snaha najít zástupné faktory, které by těsně korelovaly s tímto vyšetřením, ale byly levnější a technicky dostupnější. Nadějnou se v tomto směru jeví například stanovení exprese zeta-asociovaného proteinu o 70 kilodaltonech (ZAP-70), ale v poslední době se ukazuje, že půjde spíše o nezávislý prognostický faktor; vzhledem k tomu, že dostupnost vyšetření mutačního stavu IgVH se od roku 1999 výrazně zlepšila (např. v České republice je nabízí 5 center), bude vhodné myšlenku zástupných faktorů za mutační stav IgVH opustit a snažit se spíše o zpřesnění prognózy v rámci každé podskupiny. Vysoká exprese znaku CD38 je zřejmě spojena s aktivací leukemických buněk, zvýšenou signalizací přes B-buněčný receptor a rychlejší progresí onemocnění. V posledních 2-3 letech byly na základě studií profilu genové exprese identifikovány další molekuly, které by mohly mít prognostický význam. Jde například o lipoproteinovou lipázu (LPL), ADAM29, či

CLLU1. Je však nutné ověření v prospektivních studiích. Zcela zásadním prognostickým faktorem u CLL jsou genetické aberace. Klasické cytogenetické vyšetření je u CLL málo výtěžné (cca 30 %) pro velice nízkou mitotickou aktivitu leukemických lymfocytů *in vitro* a možné falešně pozitivní výsledky způsobené záchytem aberací v příměsi nenádorových T-lymfocytů. Proto je v současnosti standardem vyšetření interfázní FISH, kterou je možno zachytit genetické abnormality až v 80 procentech. Na rozdíl od lymfomů, kde jsou nalézány typické translokace, hrají u CLL nejdůležitější roli delece. Nejčastější je delece dlouhého ramene 13. chromozómu (del 13q), která je prognosticky příznivá. Pacienti s trisomií 12. chromozómu (+12) mají zřejmě intermediární prognózu. Delece části dlouhého ramene 11. chromozómu (del 11q) postihující gen ATM je spojena s rychlejší progresí a výraznou lymfadenopatií, delece krátkého ramene 17. chromozómu (del 17p) postihující gen p53 je jednoznačně nejméně příznivá, spojena často s rezistencí na konvenční léčbu alkylačními látkami či fludarabinem. Vztah genetických abnormalit k celkovému přežití podle nejcitovanější retrospektivní analýzy Döhnera a spol. je uveden v tab.4. Přehled nepříznivých prognostických parametrů podává tab.5.

abnormalita	výskyt (%)	medián přežití (měs.)
del 13q14	36	133
negat. nález	18	111
+12	14	114
del 11q22	17	79
del 17p13	7	32

Tab. 4. Celkové přežití nemocných s CLL v závislosti na genetických aberacích.

zdvojnásobení lymfocytů pod 12 měsíců
pokročilé klinické stádium (Binet C, Rai III/IV)
difúzní infiltrace kostní dřeně
vysoký beta2-mikroglobulin, tymidin kináza, sCD23
nemutované geny pro IgVH
delece 11q, 17p
vysoká exprese ZAP-70
vysoká exprese CD38

Tab.5. Nepříznivé prognostické faktory u CLL.

2.3 Léčba CLL

Terapie CLL zaznamenala takřka revoluční obrat. Ještě před cca 10 lety měl neotřesitelnou pozici v léčbě 1. linie chlorambucil (CLB), tedy alkylační cytostatikum podávané perorálně. Účinnost léčby CLB je poměrně nízká, dosahuje většinou jen parciální remise (PR) nebo stabilizace onemocnění, počet kompletních remisí zpravidla nedosahuje 10 procent a délka trvání léčebné odpovědi je kolem 1 roku. Použití polychemoterapeutických režimů (cyklofosfamid, vinkristin, prednison – COP, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison – CHOP) přineslo sice zvýšení léčebné odpovědi, ale neprodloužilo celkové přežití. Chlorambucil, ev. schémata COP/CHOP jsou tedy užívána u nemocných s CLL nad 75 let věku nebo obecně u těch, kteří nemohou absolvovat intenzivní léčbu. Fludarabin je hlavním zástupcem skupiny purinových analog, cytostatik, jejichž mechanismus účinku spočívá v blokování adenosin deaminázy a DNA polymerázy s následnou poruchou reparační DNA, deplecí ATP, nahromaděním fragmentů DNA a apoptózou maligních lymfocytů. Fludarabin byl do léčby CLL zaveden počátkem 90. let 20. století, a to zprvu v monoterapii rezistentní choroby. Vyšší účinnost ve srovnání s monoterapií nabízí kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem (FC), která dosahuje 70-90 % celkové odpovědi a 17-50 % kompletních remisí (CR) při výraznější myelosupresi, ale bez vyššího výskytu infekcí. Na základě tří randomizovaných studií, ve kterých byla prokázáno jednoznačné zlepšení léčebné odpovědi a doby do přežití u kombinace FC ve srovnání s monoterapií fludarabinem, je nyní v Evropě režim FC pokládán za léčbu 1. volby. Chimérická myší monoklonální protilátka anti-CD20 rituximab není v monoterapii ve standardní dávce účinná pro nižší četnost znaku CD20 na maligních lymfocytech a rychlé odstranění rituximabu z oběhu po navázání na solubilní CD20. Rituximab však zvyšuje efektivitu cytostatické terapie, proto byly do léčby CLL zavedeny režimy kombinované chemoimunoterapie. Protokol fludarabin+rituximab (FR) zaznamenal nejen vyšší procento celkové odpovědi a kompletních remisí, ale také celkové přežití v porovnání s historickou skupinou léčenou fludarabinem v monoterapii. Tyto slibné výsledky je však nutno potvrdit prospektivní randomizovanou studií. V současnosti nejúčinnějším léčebným schématem u CLL je kombinace fludarabin, cyklofosfamid, rituximab (FCR), která dosahuje v léčbě 1. linie 95 % celkové odpovědi a 70 % kompletních remisí, z nichž polovina nemocných dosahuje molekulární remise, tedy nezachycení klonu CLL citlivou metodou, např. vícebarevnou průtokovou cytometrií. Vysokou aktivitu má režim FCR i u relapsu nebo refrakterní choroby. Nejde však o randomizovaná data. V současné době proto ve světě probíhají velké randomizované multicentrické studie, které mají za cíl zhodnotit efekt kombinovaných fludarabinových režimů v léčbě 1. linie. Humanizovaná potkaní protilátka anti-CD52 alemtuzumab představuje kvalitativní posun v léčbě CLL. Jde o nejúčinnější lék CLL v monoterapii - v léčbě refrakterní a

rezistentní choroby u těžce předlčených pacientů dosahuje 30-40 % celkové odpovědi a 2 % CR (8), v jediné studii v léčbě 1.linie pak 87 % celkové odpovědi, z toho 19 % CR. Po léčbě alemtuzumabem dochází v důsledku dlouhodobé a výrazné deplece zdravých B- a T-lymfocytů ke zvýšení rizika oportunních infekcí, zejména mykotických, Pneumocystis jiroveci (dříve P. carinii) nebo reaktivace cytomegalovirové infekce (CMV). Z tohoto důvodu je nutné, aby nemocní léčení alemtuzumabem užívali antimikrobiální profylaxi po dobu léčby a minimálně 2 měsíce po jejím skončení, dále musí být monitorována reaktivace CMV pomocí PCR. Podkožní aplikace alemtuzumabu je považována za srovnatelnou s nitrožilní stran účinnosti, ale výhodnější vzhledem k výraznému snížení vedlejších účinků spojených s infúzí (třesavky, zimnice, horečky, hypotenze), a to pouze za cenu kožního infiltrátu v místě aplikace. V současné době je alemtuzumab schválen pro léčbu relabující a refrakterní CLL u nemocných v minulosti léčených alkylačními látkami, u nichž došlo k selhání chemoterapie obsahující fludarabin. Dosud neexistují randomizované studie hodnotící transplantační přístup u CLL. Vysokodávkovaná chemoterapii s následnou autologní transplantací periferních kmenových buněk (nemocný je zároveň dárce i příjemce) má minimální peritransplantační mortalitu a je možné ji provést u nemocných až do 65, ev. 70 let. I po této léčbě se však objevují relapsy, nejde tedy o kurativní metodu. Alogenní transplantace (od příbuzného či nepříbuzného dárce) je proveditelná u nemocných do 55, výjimečně 60 let a je zatížena vysokou peritransplantační mortalitou (až 30 %), může však nemocného s CLL vyléčit. Nadějnou metodou je použití tzv. nemyeloablativního přístupu spočívajícím v použití nižších dávek cytostatik, které zcela nezničí původní krvetvorbu, ale způsobí „pouze“ těžkou imunosupresi, která umožní přihojení dárcovského štěpu. Tato léčebná modalita využívá efektu reakce štěpu proti leukémii (graft versus leukemia effect, GvL) schopného v mnoha případech zcela eliminovat zbytkový leukemický klon. (16). Výhodou tohoto přístupu je výrazně nižší peritransplantační mortalita a možnost použití u nemocných až do 70 let věku, mezi rizika patří jednak nebezpečí snížení kvality života při těžké reakci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD), která GvL efekt obvykle doprovází, a také zvýšené riziko oportunních infekcí. S ohledem na zmíněné skutečnosti je doporučeno transplantační postupy u CLL provádět v rámci klinických studií. V rámci klinických studií se v současnosti zkouší řada preparátů, např. thalidomid a lenalidomid - imunomodulační a antiangiogenní léky, lumiliximab - monoklonální protilátka anti-CD23, ofatumumab – humánní protilátka anti-CD20, oblimersen - antisense oligonukleotid proti bcl-2, bortezomib - inhibitor proteasomu a další.

2.4 CLL - shrnutí

Diagnostika i léčba CLL zaznamenala v uplynulých 10 letech nebývalý pokrok, který umožňuje lépe zhodnotit prognózu nemocných již v době diagnózy a tedy individualizovat léčbu podle rizika s cílem maximalizace efektu a minimalizace nežádoucích účinků. Vyšetření mutačního stavu IgVH a genetických aberací metodou FISH je nyní vhodné (pokud to ekonomické aspekty dovolí) provádět u maximálního možného počtu pacientů v rámci komplexního zhodnocení rizika, nicméně až do potvrzení prognostického významu v rámci randomizovaných prospektivních studií by neměl být léčebný přístup (snad s výjimkou poškození signální dráhy p53) ovlivněn těmito novými faktory. Došlo k odklonu od paliativní léčby směrem k vysoce účinné chemoterapii a chemoimunoterapii s pronikavým zvýšením léčebné odpovědi a doby do progresu. Výsledky probíhajících randomizovaných multicentrických studií přinesou kýženou odpověď na postavení jednotlivých kombinačních režimů s purinovými analogy a monoklonálními protilátkami a zlepšení léčebných výsledků u nemocných s CLL.

3. Angiogeneze - teoretický úvod

3.1 Pour L., Hájek R., Büchler T., Maisnar V., Smolej L.: Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50(12):930-8.

3.2 Smolej L., Benešová P.: Význam angiogeneze u maligních nádorů. *Acta Medica (Hradec Králové) Suppl* 2005; 48(2):69-72.

Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů

Pour L.¹, Hájek R.¹, Buchler T.¹, Maisnar V.², Smolej L.²

¹Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

²II. interní klinika, oddělení klinické hematologie Lékařské fakulty UK a FN, Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Souhrn

Fyziologická angiogeneze hraje roli během hojení ran, rovněž během reprodukčního cyklu ženy a během embryonálního vývoje. Angiogeneze je ale nezbytná i pro růst nádoru a jeho metastazování, a proto tedy představuje pochopitelný cíl nádorové terapie. Angiogeneze je složitý proces, který je přísně regulován pro- a antiangiogenními růstovými faktory. Patologická angiogeneze je charakterizována buď zvýšenou (nádory), nebo nedostatečnou (např. ischemická choroba srdeční) neovaskularizací. Avaskulární tumory jsou inhibovány ve svém růstu kvůli svému nedostatečnému zásobení krví. Proto, aby nádory začaly růst, je nutný tzv. „angiogenní switch“, během kterého se zvýší aktivita proangiogenních faktorů a rovnováha se posune na jejich stranu oproti inhibitorům angiogeneze. Nádorové buňky často samy produkují růstové faktory (např. VEGF) a vytvářejí podmínky pro tento angiogenní switch. V antiangiogenní terapii se využívají dva přístupy: 1. snížení aktivity proangiogenních faktorů, 2. terapie využívající endogenních inhibitorů angiogeneze. V tomto souhrnném článku jsou popsány perspektivní antiangiogenní léky, aktuálně zkoušeny v klinických studiích.

Klíčová slova: Angiogeneze - Antiangiogenní terapie - Rakovina

Summary: Pour L., Hájek R., Buchler T., Maisnar V., Smolej L.: Angiogenesis and Antiangiogenic Cancer Therapy

Physiologic angiogenesis takes place during tissue growth and repair, during the female reproductive cycle, and during fetal development. Angiogenesis is also required for tumor growth and metastasis and, therefore, represents an exciting target for cancer treatment. Angiogenesis is a complex process that is tightly regulated by pro- and antiangiogenic growth factors. Pathologic angiogenesis is characterized by either excessive (eg. cancer) or inadequate (eg. coronary artery disease) neovascularization. Avascular tumors are severely restricted in their growth potential because of the lack of a blood supply. For tumors to develop in size and metastatic potential they must make an "angiogenic switch" through perturbing the local balance of proangiogenic and antiangiogenic factors. Frequently, tumors overexpress proangiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor, allowing them to make this angiogenic switch. Two strategies used in the development of antiangiogenic agents involve the inhibition of proangiogenic factors (eg. anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibodies) as well as therapy with endogenous inhibitors of angiogenesis. Emerging antiangiogenic agents currently in clinical studies are discussed in this review.

Key words: Angiogenesis - Antiangiogenic therapy - Cancer

Vnitř. Lék., 50, 2004, No. 12, p. 930 - 938

Úvod

Angiogeneze je novotvorba cév fyziologicky se vyskytující při embryogenezi, hojení ran a ve vaječnicích a děložní sliznici při menstruačním cyklu. Souvislost nádorového bujení a angiogeneze byla objevena Folkmanem v roce 1971 (26). Po tomto objevu se soustředilo úsilí mnoha výzkumníků na detailnější rozpoznání regulace angiogeneze. Cílem nebyla jen možnost ovlivnění nádorového růstu, ale i ostatních na angiogenezi závislých onemocnění. Od druhé poloviny devadesátých let dvacátého století lze pozorovat nástup klinických studií využívajících antiangiogenní léky. Ačkoli dopo-

sud žádný lék z této skupiny nepřekročil hranice klinických studií, některé výsledky se zdají být velice povzbudivé. V současné době je zkoušeno více než 40 látek s antiangiogenním efektem, z nichž některé již podstupují fázi III klinických studií (12, 68, 93). Nelze si nepovšimnout skutečnosti, že u řady dobře známých léčiv je nyní nově dokladován i antiangiogenní efekt. Znovu je ověřován jejich mechanismus účinku (61).

Antiangiogenní léčiva mají několik rozdílů oproti klasické cytostatické léčbě. Obecně účinkují pomaleji a jsou lépe tolerována. Při jejich použití může být porušeno hojení ran a fertilita. Na rozdíl od cytotoxické terapie nemusí být terapie orgánově specifická. Orgánová specifita antiangiogenní te-

rapie nebyla doposud popsána. Je možné synergistické použití s ostatními protinádorovými léčebnými postupy. Protože antiangiogenní terapie nemusí nutně zasahovat nádorové buňky, není pro hodnocení léčebné odpovědi nejpodstatnější redukce objemu nádoru, ale čas k progresi, případně délka přežití (42).

Níže jsou nejprve ve stručnosti zmíněny některé základní skutečnosti o angiogenezi, jejím vztahu k nádorovému růstu, buněčné signalizaci a metastazování. Následně je uvedeno základní rozdělení antiangiogenních léčiv do skupin s vybranými příklady.

Závislost angiogeneze a nádorového růstu

Původní Folkmanova hypotéza, že nádorový růst je závislý na angiogenezi a každé zvýšení nádorového růstu je úzce spojeno s růstem nových

kapilár, je dnes obecně přijímaným faktem. Zjednodušeně, zvýšení růstu nádoru nezbytně vyžaduje zvýšení růstu cév (83). Dostupná data ukazují, že zablokování angiogeneze je účinné nejen pro léčbu solidních nádorů, ale i pro kontrolu růstu hematologických nádorových onemocnění (9, 24, 50, 55, 80).

Buněčná signalizace

Bylo prokázáno, že nádorové buňky stimulují proliferaci endotelových buněk, ale zároveň endotelové buňky působí parakrinně na vlastní nádorové buňky. Stimulace je tedy oboustranná - reciproční. Angiogeneze je velmi složitý proces, ve kterém je zapojeno obrovské množství genů a produktů těchto genů z nádorových i normálních tkání. Podle výsledné převahy jednotlivých zapojených faktorů je angiogeneze tlumena nebo aktivována (12,

Tab. 1. Endogenní stimulatory a inhibitory angiogeneze podle Brema

	Stimulatory	Inhibitory
Růstové faktory	Angiogenin Angiotropin Epidermal growth factor Fibroblast growth factor (acidic and basic) (bFGF) Granulocyte colony - stimulating factor Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) Platelet-derived growth factor-BB Tumor necrosis factor-alpha (TNF) Vascular endothelial growth factor (VEGF)	
Proteinázy (MMP) a inhibitory proteináz	Cathepsin Gelatinase A, B Stromelysin Urokinase-type plasminogen activator (uPA)	Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2) Plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1)
Onkogeny	c-myc ras c-src v-raf c-jun	p53 Rb
Enzymy signálních drah	Thymidine phosphorylase Farnesyl transferase Geranylgeranyl transferase	
Cytokiny	Interleukin-1 Interleukin-6 Interleukin-8	
Endogenní modulatory	Alpha v beta integrin Angiopoietin-1 Angiostatin II (AT1 receptor) Endothelin (ETB receptor) Erythropoietin Hypoxia Nitric oxide synthase Platelet-activating factor Prostaglandin E Thrombopoietin	Angiostatin (fragment plasminogenu) Anigopoietin-2 Angiotensin Angiotensin II (AT2 receptor) Cartilage derived inhibitor (CDI) Caveolin-1, caveolin-2 Endostatin Heparinasy Interferon-alpha/beta/gama Isoflavones Kringle5 (fragment plasminogenu) 2-metoxyestradiol Platelet factor-4 Prolactin (16 Kd fragment) Retinoidy Tetrahydrokortisol Thrombospondin Troponin-1 Vasculostatin Vasostatin
Stopové prvky	Měď	Zinek

25). S trochou nadsázky lze konstatovat, že se seznam těchto faktorů rozrůstá každým dnem.

Angiogeneze a invazivita a metastazování

Tyto události jsou velice úzce spojeny. Důležitou úlohu zde mají proteínázy, zvláště MMP (matrixmetaloproteinázy). Zvýšení jejich aktivity je nutné pro migraci endotelových buněk a pro migraci a šíření nádorových buněk. Většina antiangiogenních léků má rovněž účinek antimetastatický a antiinvazivní (9, 41).

Aktivní molekuly uplatňující se v procesu angiogeneze

Známé faktory jsou uvedeny v tabulce 1. Počet známých angioaktivních látek se neustále rozrůstá. Brehm dělí tyto faktory do sedmi skupin: růstové faktory, proteínázy a jejich inhibitory, onkogeny, cytokiny, enzymy signálních drah, endogenní modulatory a stopové prvky (10). Velký význam pro zahájení angiogeneze a pro šíření nádoru mají proteolytické enzymy (83, 41).

Nejvýznamnějšími aktivátory angiogeneze jsou vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), basický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a hepatocytární růstový faktor (HGF) (83). Největší význam pro proces angiogeneze však má VEGF. Ten reguluje vaskulární proliferaci i permeabilitu, funguje jako endotelově specifický mitogen a rovněž jako anti-apoptický faktor v endotelových buňkách novotvořených cév. Je známo celkem šest členů VEGF rodiny - VEGF A-E, a placentární růstový faktor. VEGF se uplatňuje ve všech procesech angiogeneze. Jeho exprese je potencována mnoha faktory, mezi nejsilnější patří hypoxie, při zvýšené produkci VEGF je zvýšena permeabilita cév, což vede k úniku plazmatických proteinů a vytvoření tzv. extravaskulárního fibrinového gelu, který funguje jako substrát pro růst endotelových i nádorových buněk (43, 83). Biologická účinnost VEGF je zprostředkována pomocí tyrosinkinázových receptorů. Známé jsou čtyři typy: VEGFR1 (Ftl1), VEGFR2 (Flk1/KDR), NP1 a VEGFR3. Prozkoumán je význam VEGFR1 a VEGFR2, které mají hlavní úlohu v angiogenezi, další dva jsou teprve nedávno objevené a jejich význam je zatím nejasný (9). Exprese VEGF je asociována s nádorovým růstem, angiogenezí a metastazováním. Hladiny VEGF se jeví jako prognostický faktor u celé řady lidských nádorů. Exprese VEGF je asociována se zhoršenou prognózou u akutní myeloidní leukémie (5), karcinomu prsu (20), karcinomu tlustého střeva (36), hepatocelulárního karcinomu (18), bronchiálních tumorů (54, 76) a ovariálního karcinomu (56). Např. ve studii u pacientů s primárním plicním nádorem (různého histologického typu) činil medián přežití u pacientů s nízkou hladinou

VEGF v séru 151 měsíců oproti 8 měsícům u pacientů s vysokou hladinou VEGF (54). Tyto skutečnosti vedou k oprávněným pokusům o inhibici VEGF jako protinádorové terapie.

Angiogeneze je fyziologicky tlumena několika endogenními inhibitory, mezi kterými lze zdůraznit především angiostatin, thrombospondin, endostatin, tkáňové inhibitory proteáz (TIMP) (25, 41, 43, 83) Další jsou uvedené v tabulce 1.

Existují i endogenní látky, jež mohou působit jako stimulatory i inhibitory v závislosti na jejich koncentraci, mikroprostředí a přítomnosti jiných faktorů. Mezi tyto patří TNF-alfa (tumor nekrotizující faktor alfa), TGF-beta (transformující růstový faktor beta), IL-4 (interleukin 4) (83).

Velké množství současných experimentů se zabývá mědi jako prvkem nutným pro novotvorbu cév. Měď je důležitým kofaktorem růstových faktorů angiogeneze. Proto její deplece brzdí angiogenezi, čehož se snaží využít výzkumníci i pro klinické aplikace (15, 57).

Mnoho současných prací se zabývá rolí supresorového genu p53 v angiogenezi. Mutace genu p53 koreluje se sníženou expresí trombospondinu, zvýšenou angiogenezí a maligní progresí. Při přítomnosti tzv. wt-p53 (wild type) je vedle indukce apoptózy současně inhibována i novotvorba cév (42).

Antiangiogenní terapie

Léky inhibující angiogenezi mohou účinkovat dvěma způsoby: 1. blokovat účinek stimulatorů angiogeneze; 2. zvyšovat aktivitu angiogenních inhibitorů. Podle účinku lze antiangiogenní léky dělit na šest skupin:

1. inhibitory proteínáz;
2. inhibitory migrace a proliferace endotelu;
3. inhibitory angiogenních růstových faktorů;
4. léky inhibující endotelově specifický integrin;
5. chelátory mědi;
6. léky s nejasným účinkem.

V následujících odstavcích je uveden přehled jednotlivých skupin antiangiogenních léků, zvláště těch, které jsou již ve fázi klinického zkoušení.

Inhibitory proteínáz

V tabulce 2 jsou uvedeny jednotlivé inhibitory proteínáz. Dále jsou popsány nejsledovanější léky z této skupiny.

Marimastat byl první inhibitor metaloproteináz testovaný na lidech. Pokusy prokázaly výbornou dostupnost při perorálním podání. Ve fázi I. klinické studie se u pacientů vyskytly pouze fibromyalgie, které po vysazení léku ustoupily. Prozatímni výsledky jsou povzbudivé při léčbě karcinomu rekta, vaječníků, prostaty a pankreatu (65). Velká studie fáze II však nepotvrdila zvýšení mediánu přežití a užití marimastatu dokonce snížilo kvalitu života u malobuněčného plicního karcinomu (71).

Tab. 2. Inhibitory proteináz

Lék	Mechanismus účinku	Stav výzkumu	Zdroj
Marimastat	Syntetický inhibitor metaloproteináz	Fáze III Karcinom plic, pankreatu, Maligní gliom	British Biotech
COL-3	Syntetický inhibitor metaloproteináz, derivát tetracyklinu	Fáze I/II Nádory mozku, Kaposiho sarkom	Collagenex
BMS-275291	Syntetický inhibitor metaloproteináz	Fáze I/II Kaposiho sarkom, Pokročilý karcinom plic fáze II/III	Bristol-Meyers Squibb
AG3340 Primomastat	Syntetický inhibitor metaloproteináz	Fáze III Karcinom plic, Karcinom prostaty	Agouron/Warner/ Lambert
CGS 27023A	Syntetický inhibitor metaloproteináz	Fáze I/II	Novartis
AE-941 Neovastat	Přírodní inhibitor metaloproteináz	Fáze III Karcinom plic, mnohočetný myelom	Aeterna
Bay 12-9566	Syntetický inhibitor metaloproteináz	Fáze III Karcinom plic, Karcinom pankreatu, Karcinom ovariální	Bayer
Dalteparin	Nízkomolekulární heparin	Fáze III Karcinom prostaty Karcinom plic	Komerčně dostupný
Penicilamin	Inhibitor urokinázy, mědi	Fáze II Glioblastom	Komerčně dostupný

Tab. 3. Inhibitory proliferace a migrace endotelových buněk

Lék	Mechanismus účinku	Stav výzkumu	Zdroj
TNP-470	Inhibuje růst endotelových buněk	Fáze II	TAP
Squalamine	Inhibuje Na-H výměník	Fáze I/II	Magainin
Combrestatin	Indukce apoptózy v proliferujících endotelových buňkách	Fáze I	Oxigene
Angiostatin	Inhibice endotelových buněk	Fáze I	
Endostatin	Inhibice endotelových buněk	Fáze I	EntreMed
Penicilamine	Inhibice mědi	běžně dostupný	
Farnesyl transferasa inhibitor	Blokuje migraci a proliferaci endotelových buněk	Fáze I	NCI
2-Metoxyestradiol	Inhibice endotelových buněk	Fáze I/II	EntreMed
LY317615	Inhibitor proteinkinázy C beta	Fáze I/II lymfomy, karcinom prostaty	NCI
R115777	Inhibice endotelových buněk	Fáze I	Janssen
Genistein	Sojový isoflavon	Fáze I/II	NCI
SCH 66336	Inhibice endotelových buněk	Fáze I	Schering

Neovastat je přírodní produkt ze žraločí chrupavky používaný perorálně ve formě suspenze. V klinických studiích byl velmi dobře tolerován. Vyskytly se jen mírné gastrointestinální obtíže. I když je jeho toxický profil příznivý a úplné zhodnocení jeho protinádorové účinnosti není přesně známé, zdá se, že jeho zásadní přínos nebude prokázán (22, 29,32).

Prinomastat AG3340 je syntetický produkt podávaný perorálně, selektivně inhibující metaloproteinázy MMP 9 a MMP 2 a MMP13. Je velmi dobře tolerován, nejčastější nežádoucí účinky jsou bolesti muskuloskeletálního systému a únava. Probíhají studie fáze III u pacientů s karcinomem prostaty a bronchiálním karcinomem. Jsou publikovány výsledky z fáze II klinické studie u pa-

cientů s myelodysplastickým syndromem, kde z celkem 28 pacientů na transfúzích závislých byl u pěti pacientů prokázán dobrý hematologický efekt (47).

Dalteparin je nízkomolekulární heparin s prokázaným antiangiogenním efektem, v současné době je užíván často v kombinaci s ostatními cytostatiky pro léčbu pokročilých nádorových onemocnění (84).

Ostatní zmíněné léky jsou zatím na počátku klinického zkoušení (14, 31, 45, 53). Nutno zmínit, že metaloproteinázy, konkrétně MMP-2, mají přímý vliv na vznik jednoho z inhibitorů angiogeneze - thrombospondinu. Tato skutečnost může snižovat účinek inhibitorů proteináz v klinickém použití (42).

Inhibitory proliferace a migrace endotelových buněk

V tabulce 3 jsou uvedeni vybraní zástupci této skupiny. Dále jsou popsány nejsledovanější léky z této skupiny.

TNP-470 je derivát fumagilinu, přirozeně se vyskytujícího se inhibitoru angiogeneze. Ze současných poznatků z klinického testování je známá reverzibilní toxicita CNS. U pokročilého renálního karcinomu nebyla prokázána klinická účinnost (52, 73). Hodnocení účinnosti prozatím není možné.

Squalamin je produkt získaný ze žraločích jater ve fázi I klinického zkoušení. Podobně jako u Neovastatu (žraločí chrupavka) se zdá toxický profil vynikající, ale účinnost nízká (12).

Endostatin je přirozeně se vyskytující inhibitor angiogeneze, který by dle fáze I klinických studií mohl být příslibem pro léčbu (13, 77).

Angiostatin je rovněž endogenní inhibitor angiogeneze. Váže se na povrch endotelových buněk, ve kterých indukuje apoptózu a inhibuje jejich formování a migraci. Jeho působení je synergistické s endostatinem (33, 51). Preklinicky se testuje jejich společné využití v podobě antiangiogenní genové terapie (69). Princip metody spočívá v přenosu genu (genů) pro tvorbu inhibitoru angiogeneze do buněk organismu. Z vlastního těla (např. svalové tkáni) se vytvoří „továrna“ na výrobu angiostatinu

(42). Vlastní použití angiostatinu pro klinické studie je limitováno jeho náročnou laboratorní výrobou.

Inhibitory růstových angiogenních faktorů

O všech potencionálních léčivech této skupiny uvedených v tabulce 4 kromě interferonu a snad anti-VEGF platí, že jsou na počátku klinického zkoušení a informace jsou předběžné.

Interferon alfa je antiproliferativní lék, u kterého byla rovněž potvrzena inhibice produkce bFGF a VEGF. Jde o lék s poměrně širokým spektrem účinků a rovněž dobře známých nežádoucích účinků (2, 32). Není ujasněno, jak velkou roli hraje jeho antiangiogenní účinek, ani zda jej lze nově využít kromě již známých indikací v léčbě nádorových onemocnění. Platí pro něj výše uvedený komentář, že jeho antiangiogenní efekt byl „dodatečně dohledán“.

RhuMab-VEGF (bevacizumab) je první klinicky zkoušenou antiangiogenní monoklonální protilátkou. V experimentálních modelech *in vitro* a *in vivo* výrazně snižoval hladinu VEGF selektivně inhibicí receptoru VEGFR 2 (KDR/Flk-1), inhiboval růst nádoru na myším modelu (12). Za zmínku stojí i výše uvedená skutečnost, že zvýšená předléčebná hodnota VEGF může mít u některých nádorů značnou prediktivní hodnotu pro léčbu.

Použití bevacizumabu je poměrně netoxické. Z nežádoucích účinků se objevují nejčastěji příznaky chřipky, teplota, bolest hlavy, třes, hypertenzní reakce. Bevacizumab byl hodnocen ve fázi II klinické studie u 104 neléčených nemocných s metastazujícím kolorektálním karcinomem. Nemocní byli randomizováni do tří ramen, a to se standardní léčbou (5-fluorouracil + leukovorin), ramenem se stejnou léčbou a bevacizumabem v dávce 5 mg/kg intravenózně každé dva týdny nebo do ramene s bevacizumabem v dávce 10 mg/kg. Léčebná odpověď byla pozorovaná u 17 % případů při použití standardní léčby, u 40 % při použití nízké dávky a u 24 % případů při použití vysoké dávky bevacizumabu. Korespondující doba do progresu byla 5,2 měsíce pro standardní léčbu, 9,0 měsíců pro nízkou a 7,2 měsíce pro vysokou dávku bevacizumabu.

Tab. 4. Inhibitory růstových angiogenních faktorů

Lék	Mechanismus účinku	Stav výzkumu	Zdroj
RhuMab-VEGF (bevacizumab)	Monoklonální protilátka blokuje účinek VEGF	Fáze II	Avastin, Genentech
ZD6474	Blokuje signální dráhy receptorů VEGF	Fáze II Mnohočetný myelom Karcinom plic	Zeneca
SU6668	Blokuje signální dráhy receptorů dráhy receptorů VEGF, bFGF, PDGF	Fáze I	Sugen
Ribozyme	Snižuje množství mRNA pro tvorbu VEGF receptorů	Fáze I	Ribozyme Pharmaceutical Inc.
PTK787/ZK22584	Blokuje receptor pro VEGF	Fáze I	Novartis
Suramin	Blokuje navázání růstových faktorů na jejich receptory	Fáze II	Komerčně dostupné

Medián přežití byl 13,6 měsíce pro standardní chemoterapii a 16,1 měsíce pro vysokou dávku bevacizumabu, přičemž pro nízkou dávku ještě nebylo mediánu přežití dosaženo (37). Rovněž jiní výzkumníci prezentovali slibné výsledky klinických studií fáze II u karcinomu prsu a plic (17, 30, 72). Intenzivní klinické hodnocení pokračuje a na konci roku 2003 nelze více upřesnit perspektivu této monoklonální protilátky.

Firma Sugen vyvíjí řadu látek, jejichž mechanismem účinku je interakce s receptory pro angiogenní faktory. SU11248 patří mezi ně a má velice slibné účinky u akutní myeloidní leukémie, kde ve studii fáze I došlo k více než 50 % redukci blastů v periferní krvi u 13 ze 16 pacientů (1).

PTK787/ZK 222584 je inhibitor receptorů VEGFR1 a VEGFR2 a rovněž slabě inhibuje receptory pro PDGF (46). Nejnověji jsou publikovány výsledky fáze I klinické studie u akutní myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu. U akutní myeloidní leukémie nebyla prokázána objektivní odpověď na léčbu (64).

Léky inhibující endotelové specifický integrin

Integriny jsou důležité adhezivní molekuly podílející se na regulaci angiogeneze. U nádorů prsu byla potvrzena negativní prognostická hodnota při jejich zvýšené expresi. Protilátky proti integrinu mají preklinicky prokázaný protinádorový efekt.

Vitaxin I a II jsou protilátky blokující integrin alfa-v-beta3 na povrchu endotelových buněk. V současnosti je klinicky zkoušen u leiomyosarkomu. Při dosavadním použití byla tato léčba bezpečná a poměrně účinná (58, 59).

EMD121974 patří mezi tzv. „malé molekuly“ blokující integrin na povrchu endotelových buněk. Klinické studie jsou ve fázi I/II (75).

Chelátory mědi

Nejnovější studie potvrzují hypotézu, že měď se významně podílí na přesmyku normálního klidového endotelu do proliferačního stádia aktivovaného růstovými faktory. Měď je významným kofaktorem růstových faktorů a při jejím nedostatku jsou faktory neúčinné, endotelové buňky zůstávají v G0 fázi nebo podléhají apoptóze. Bylo prokázáno, že dieta s nízkým obsahem mědi a terapie penicilaminem snižuje novotvorbu cév (12, 15). Do této skupiny lze zařadit penicilamin, kaptopril a tetrathiomolybdat (57).

Penicilamin má široký antiangiogenní efekt, blokuje migraci a proliferaci endotelových buněk pomocí vychytávání mědi. Jeho sulfhydrylové skupiny se podílejí na vzniku angiotenzinu. Má inhibiční účinek na některé proteínázy. Zevním nedostatkem mědi je jeho protinádorový účinek umocněn. Je komerčně dostupný a probíhají fáze II klinických studií (12, 83).

Captopril je komerčně dostupný lék, inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu. Pro tento účinek je rutinně používán v léčbě vysokého tlaku. Je rovněž chelátorem mědi a zinku a inhibitorem MMP (35). Proto bylo zahájeno klinické testování

jeho protinádorové účinnosti (84). Výsledky zatím nejsou k dispozici.

Léky s nescifickým mechanismem účinku

Do této skupiny jsou zde zařazeny léky, které nepatří do ani jedné z výše uvedených skupin. Jejich účinek není přesně definován, obecně se však uznává, že část jejich efektu je i antiangiogenní. Typická je tato skutečnost pro skupinu imunomodulačních léků (immunomodulatory drugs; IMiDs) s prokázaným antiangiogenním účinkem.

Thalidomid, Actimid a Revimid jsou reprezentanty této skupiny léků. Thalidomid byl prvním klinicky zkušným lékem této skupiny, jeho mechanismus účinku není doposud zcela znám, ale antiangiogenní efekt je všeobecně uznáván. Další mají výrazně vyšší imunomodulační aktivitu než thalidomid. Zprávy z prvních studií ukázaly, že IMiDs mohou zvyšovat proliferaci T lymfocytů, aktivitu NK buněk, zvyšovat u různých typů buněk produkci IL-2, IL-12, protizánětlivých cytokinů včetně IL-10, a naopak snižovat či blokovat produkci prozánětlivých cytokinů typu TNF alfa, IL-1 beta, a jiných. Výsledným efektem IMiDs tedy může být přímý i nepřímý inhibiční efekt na růst nádorových buněk (16, 49, 63).

U thalidomidu jsou známé i dlouhodobé výsledky léčby. Zdá se, že je dobře účinný u relabujících či refrakterních myelomů, zvláště pak v kombinaci s dexametazonem (23). Zde je uveden příklad asi největší studie u relabujících nemocných s mnohočetným myelomem. Studie fáze II započatá Arkan-saským centrem v roce 1998 hodnotila celkem 169 pacientů s relabujícím/refrakterním onemocněním, kteří byli léčeni Thalidomidem bez kombinace s jinými léky. U 50 % pacientů poklesla hladina monoklonálního proteinu alespoň o 25 %, toto zahrnuje 33 % pacientů s poklesem o více než 50 % a 11% procent pacientů dosáhnuvších celkové remise, tedy úplné vymizení monoklonálního proteinu. Po 4 letech sledování zůstává v celkové remisi 9 % pacientů a 25 % stále žije. Touto studií byla potvrzena i lepší účinnost thalidomidu u prognosticky příznivější skupiny pacientů s nízkou počáteční hodnotou beta-2-mikroglobulinu a u pacientů bez cytogenetických abnormalit. Bez těchto negativních faktorů přežívá 51 % pacientů, ale s přítomností alespoň jednoho z nich pouze 14 % pacientů (8). Lék je používán perorálně v dávce zpravidla nepřekračující 400 mg denně. Má řadu nežádoucích účinků včetně proslule známé nešťastné teratogenity. Nejčastěji se objevují sedace, únava, závažná periferní neuropatie, kožní problémy a hluboká žilní trombóza (23). Logickým krokem tedy byl vývoj dalších léků ze skupiny nazývané IMiDs. Jde o perorální analogy thalidomidu s výrazně lepším bezpečnostním a toxickým profilem, bez teratogenity a současně o několik řádů *in vitro* účinnější (např. pro Actimid je udávána 5 000krát vyšší inhibiční aktivita TNF alfa oproti thalidomidu). Z výzkumné líně firmy Celgene sem patří nejdéle zkoumaný Revimid (CC-5013) ve fázi II s přechodem do fáze III. Nejnověji pak Actimid (CC-4047).

Tab. 5. Léky s nespecifickým mechanismem účinku

Lék	Mechanismus účinku	Stav výzkumu	Zdroj
Thalidomid	Antiangiogenní imunomodulační	Fáze III	Celgene
Actimid	Imunomodulační Antiangiogenní	Fáze II	Celgene
Revimid	Imunomodulační Antiangiogenní	Fáze II	Celgene
ABT-627	Antagonista endotelinového receptoru	Fáze I	Abbot
Halofuginon hydrobromid (Tempostatín)	Komplexní antiangiogenní efekt	Fáze III	NCI
CM101/ZD0101	Interakce se specifickým receptorem	Fáze I	CarboMed/Zeneca
IM862	Blokuje produkci VEGF a bFGF	Fáze II	Cytran
Celocoxib	Cox-2 inhibice	Fáze III	Pharmacia
CAI	Inhibice kalciového influxu	Fáze III Ovariální karcinom Plicní tumory	NCI

Limitující toxicitou u tohoto léku byla neutropenie a trombóza, doposud nebyla definovaná maximální tolerovatelná dávka (63).

Další látky uvedené v tabulce 5 jsou v počátcích svého klinického zkoušení a hodnocení jejich přínosu prozatím není možné (11, 19, 34, 74, 78).

Závěr

Antiangiogenní působky účinkují pomaleji než klasické cytotoxické léky, jsou ale obecně lépe tolerovány. Velkou výhodou je, že doposud nebyl popsán vznik rezistence na antiangiogenní látky. Na

rozdíl od cytotoxické terapie nemusí být vybrána terapie orgánově specifická. Orgánová specifita antiangiogenní terapie nebyla popsána. Je možné synergistické použití s ostatními protinádorovými léčebnými postupy. Protože antiangiogenní terapie nemusí nutně zasahovat nádorové buňky, není pro léčebnou odpověď nejpodstatnější redukce objemu nádoru, ale čas k progresi případně přežití. Jedná se o způsob léčby poměrně nový a zdá se být velice perspektivní, zvláště pro jeho výše uvedené přednosti. Zhodnocení efektu pro léčbu nádorů je otázkou následujících let a již nyní je jasné, že pouze některé z výše uvedených léků dojdou širšího klinického použití.

Literatura

- Abrams, T., Ofarrell, A. M., Ngai, T. G. et al.: Characterization of SU11248 as a Potent Inhibitor of Flt3 in Preclinical Models. Am. Soc. Hem. 2002 44th annual meeting, Abstract 2199
- Adam, Z., Pour, L., Svobodník, A. et al.: Kvalita života a tolerance udržovací léčby u pacientů s mnohočetným myelomem. Vnitř. Lék., 48, 2002, 216 - 229
- Adam, Z., Krejčí, M., Bačovský, J. et al.: Léčba mnohočetného myelomu vysokodávkovanou chemoterapií a transplantací autologních periferních kmenových hematopoetických buněk a následující udržovací léčbou interferonem alfa a dexamethasonem. Vnitř. Lék., 44, 1998, 400 - 408
- Adams, J.: Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. Semin. Oncol., 28, 2001, 613 - 619
- Aguayo, A., Kantarjian, H. M., Estey, E. H. et al.: Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. Cancer, 95, 2002, 1923 - 1930
- Awada, A., Eskens, F. A., Piccart, M. et al.: Phase I and pharmacological study of the oral farnesyltransferase inhibitor SCH 66336 given once daily to patients with advanced solid tumours. Eur. J. Cancer, 38, 2002, 2272 - 2278
- Barille, S., Akhoundi, C., Collette, M. et al.: Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. Blood, 90, 1997, 1649 - 1655
- Barlogie, B., Tricot G., Anaissie E. et al.: Long-Term Follow-Up (Median of 4 Yr) of 169 Patients Receiving Thalidomide (THAL) for Advanced and Refractory Multiple Myeloma (MM): Superior Survival in the Absence of Cytogenetic Abnormalities (CA) and Low b-2 Microglobulin (B2M). Am. Soc. Hem. 2002 44th annual meeting, Abstract 789
- Bellamy, W. T.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. Semin. Oncol., 28, 2001, 551 - 559
- Bergsland, E., Hurwitz, H., Fehrenbacher, L. et al.: A randomized phase II trial comparing rhuMAb VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial cell growth factor) plus 5-fluorouracil/leucovorin (FU/LV) to FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 28, 2000, Abstract 939
- Berlin, J., Tutsch, K. D., Arzoomanian, R. Z. et al.: Phase I and pharmacokinetic study of a micronized formulation of carboxyamidotriazole, a calcium signal transduction inhibitor: toxicity, bioavailability and the effect of food. Clin. Cancer Res., 8, 2002, 86 - 94
- Brehm, S.: Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. Cancer Control, 6, 1999, 436 - 458

13. Capillo, M., Mancuso, P., Gobbi, A. et al.: Continuous Infusion of Endostatin Inhibits Differentiation, Mobilization, and Clonogenic Potential of Endothelial Cell Progenitors. *Clin. Cancer Res.*, 9, 2003, 377 - 382
14. Cianfrocca, M., Cooley, T. P., Lee, J. Y. et al.: Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS malignancy consortium study. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002, 153 - 159
15. Cox, C., Teknos, T. N., Barrios, M. et al.: The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 11, 2001, 696 - 701
16. D'Amato, R. J., Lentzsch, S., Anderson, K. C. et al.: Mechanism of action of thalidomide and 3-aminthalidomide in multiple myeloma. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, 597 - 601
17. DeVore, R. F., Fehrenbacher, L., Herbst, R. S. et al.: A randomized phase II trial comparing Rhumab VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial cell growth factor) plus carboplatin/paclitaxel (CP) to CP alone in patients with stage IIIB/IVNSCLC. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 19, 2000, Abstract 1896
18. Dhar, D. K., Ono, T., Yamanoi, A. et al.: Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 95, 2002, 2188 - 2195
19. Dy, G. K., Adjei, A. A.: Farnesyltransferase inhibitors in breast cancer therapy. *Cancer Invest.*, Suppl. 2., 20, 2002, 30 - 37
20. Eppenberger, U., Kueng, W., Schlaepi, J. M. et al.: Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high and low risk subsets of node negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 20, 1998, 3129 - 3136
21. Ergun, S., Kilic, N., Wurmbach, J. H. et al.: Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis*, 4, 2001, 93 - 206
22. Falardeau, P., Champagne, P., Poyet, P. et al.: Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, 620 - 625
23. Foldyna, D., Kamelander, J., Krejčí, M. et al.: Žádoucí a nežádoucí účinky léčby thalidomidem u pacientů s mnohočetným myelomem. *Vnitř. Lék.*, 49, 2003, 859 - 868
24. Folkman, J.: Angiogenesis-dependent diseases. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, 536 - 542
25. Folkman, J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 20, 2002, 15 - 18
26. Folkman, J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 18, 1971, 1182 - 1186
27. Giles, F. J.: The emerging role of angiogenesis inhibitors in hematologic malignancies. *Oncology*, 5, 2002, 23 - 29
28. Giles, F. J.: New drugs in acute myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.*, 4, 2002, 369 - 374
29. Gingras, D., Batist, G., Beliveau, R.: AE-941 (Neovastat): a novel multifunctional antiangiogenic compound. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 3, 2001, 341 - 347
30. Gordon, M. S., Margolin, K., Talpaz, M. et al.: Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19, 2001, 843 - 850
31. Heath, E. I., O'Reilly, S., Humphrey, R. et al.: Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY12-9566 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48, 2001, 269 - 274
32. Hajek, R., Adam, Z., Krivanova, A. et al.: Current role of immunotherapy in multiple myeloma. *Acta Med. Austriaca*, 25, 1998, 79 - 85
33. Hajitou, A., Grignet, C., Devy, L. et al.: The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J.*, 16, 2002, 1802 - 1804
34. Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Patel, J. et al.: Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer. *Cancer Res.*, 62, 2002, 5405 - 5407
35. Chisi, J. E., Briscoe, C. V., Ezan, E. et al.: Captopril inhibits in vitro and in vivo the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation. *Br. J. Haematol.*, 109, 2000, 563 - 570
36. Ishigami, S. I., Ariti, S., Furutani, M., et al.: Predictive Value of VEGF in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 78, 1998, 1379 - 1384
37. Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L. et al.: Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21, 2003, 60 - 65
38. Karp, J. E., Lancet, J. E., Kaufmann, S. H. et al.: Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase I-clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, 97, 2001, 3361 - 3369
39. Katano, K., Kondo, A., Safaei, R. et al.: Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res.*, 62, 2002, 6559 - 6565
40. Klener, P.: Perspektivní možnosti v protinádorové chemoterapii. *ČLČ*, 140, 2001, 605 - 610
41. Klener, P.: *Klinická onkologie*. Galén, Praha 2002; vybrané kapitoly
42. Lattime, E. C., Gerson, S. L.: Gene therapy of cancer, second edition. Academic Press, San Diego 2002, 405 - 432
43. Lee Rosen, S.: Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Cancer Control*, 9, 2002, 36 - 44
44. Linder-Stragliotto, C., Strander, H., Munck-Wikland, E.: Low levels of endostatin in the urine from patients with malignant disease. *Tumour Biol.*, 23, 2002, 222 - 227
45. Levitt, N. C., Eskens, F. A., O'Byrne, K. J. et al.: Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer. *Clin. Cancer Res.*, 7, 2001, 1912 - 1922
46. Lin, B., Podar, K., Gupta, D. et al.: The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res.*, 62, 2002, 5019 - 5026
47. List, A. F., Kurtin, S. E., Callander, N. et al.: Randomized, Double-Blind Phase II Study of the Matrix Metalloprotease (MMP) Inhibitor, AG3340 (Prinomastat™) in Patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS). *Am. Soc. Hem.* 2002, 44th annual meeting; Abstract 3119
48. Lokeshwar, B. L., Selzer, M. G., Zhu, B. Q. et al.: Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *Int. J. Cancer*, 98, 2002, 297 - 309
49. Marriotti, J. B., Clarke, I. A., Dredge, K. et al.: Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1, 2002, 75 - 84
50. Moehler, T. M., Neben, K., Goldschmidt, H.: Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann. Hematol.* 80, 2001, 695 - 705
51. Moser, T. L., Stack, M. S., Wahl, M. L.: The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? *Thromb. Haemost.*, 83, 2002, 394 - 401
52. Mysliwski, A., Koszalka, P., Bigda, J.: Complete remission of Bomirski Ab amelanotic melanoma in hamsters treated with the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Neoplasma*, 49, 2002, 319 - 322
53. Naglich, J. G., Jure-Kunkel, M., Gupta, E. et al.: Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res.*, 61, 2001, 8480 - 8485
54. Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M. et al.: Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2, 1996, 1411 - 1416

55. Orpana, A., Salven, P.: Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 43, 2002, 219 - 224
56. Paley, P. J., Staskus, K. A., Gebhard, K. et al.: VEGF expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer*, 80, 1997, 98 - 106
57. Pan, Q., Kleer, C. G., van Golen, K. L. et al.: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.*, 62, 2002, 4854 - 4859
58. Patel, S. R., Jenkins, J., Papadopoulos, N. et al.: Pilot study of vitaxin - an angiogenesis inhibitor - in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer*, 92, 2001, 1347 - 1348
59. Posey, J. A., Khazaeli, M. B., DelGrosso, A. et al.: A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 16, 2001, 125 - 132
60. Rajkumar, S. V., Kyle, R. A.: Angiogenesis in multiple myeloma. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, 560 - 564
61. Ribatti, D., Vacca, A., Iurlaro M. et al.: Human recombinant interferon alpha-2a inhibits angiogenesis of chick area vasculosa in shell-less culture. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 16, 1996, 165 - 169
62. Richardson, P., Jagannath, S., Schlossman, R. et al.: A Multi-Center, Randomized, Phase II Study To Evaluate the Efficacy and Safety of Two CDC-5013 Dose Regimens When Used Alone or in Combination with Dexamethasone (Dex) for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (MM). *Am. Soc. Hem. 2002 44th annual meeting*, Abstract 386
63. Richardson, P. G., Schlossman, R. L., Weller, E. et al.: Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 100, 2002, 3063 - 3067
64. Roboz, G. J., List, A. F., Giles, F.: Phase I Trial of PTK787/ZK 222584, an Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases, in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Am. Soc. Hem. 2002 44th annual meeting*, Abstract 1308
65. Rosemurgy, A., Harris, J., Langleben, J. et al.: Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose finding study. *Am. J. Clin. Oncol.*, 22, 1999, 247 - 252
66. Ryska, A., Hovorkova, E., Ludvikova, M.: Angiogeneze u nádorů, část II. *Čes.-slov. Patol.*, 36, 2000, 71 - 80
67. Ryska, A.: Angiogeneze u nádorů, část I. *Čes.-slov. Patol.*, 36, 2000, 26 - 31
68. Scappaticci, F. A.: Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002, 3906 - 3927
69. Scappaticci, F. A., Contreras, A., Smith, R. et al.: Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis*, 4, 2001, 263 - 268
70. Sen, C. K., Khanna, S., Venojarvi, M. et al.: Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282, 2002, 1821 - 1827
71. Sepherd, F. A., Giaccone, G., Seymour, L. et al.: Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat after response to first-line chemotherapy in patients with small-cell lung cancer: a trial of the national cancer institute of Canada-clinical trials group and the European organization for research and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002, 4434 - 4439
72. Sledge, G., Miller, K., Novotny, W. et al.: A phase II trial of single-agent Rhumab VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial cell growth factor) in patients with relapsed metastatic breast cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2000*, Abstract 5C
73. Stadler, W. M., Kuzel, T., Shapiro, C. et al.: Multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in metastatic renal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 17, 1999, 2541 - 2545
74. Stratton, M. S., Alberts, D. S.: Current application of selective COX-2 inhibitors in cancer prevention and treatment. *Oncology*, 16, 2002, 37 - 51
75. Taga, T., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I. et al.: The alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer*, 90, 2002, s.690-697
76. Tamura, M., Ohta, Y., Nakamura, H. et al.: Diagnostic value of plasma vascular endothelial growth factor as a tumor marker in patients with non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 17, 2002, 275 - 279
77. Thomas, J. P., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D. et al.: Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 21, 2003, 223 - 231
78. Trifan, O. C., Durham, W. F., Salazar, V. S. et al.: Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances anti-tumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res.*, 62, 2002, 5778 - 5784
79. Tulpule, A., Scadden, D. T., Espina, B. M. et al.: Results of a randomized study of IM862 nasal solution in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Oncol.*, 18, 2000, 716 - 723
80. Vacca, A., Ribatti, D., Roccaro, A. M. et al.: Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, 543 - 550
81. Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M. et al.: Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*, 93, 1999, 544 - 552
82. te Velde, E. A., Vogten, J. M., Gebbink, M. F. et al.: Enhanced antitumor efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br. J. Surg.*, 10, 2002, 1302 - 1309
83. Voest, E., D'Amore, P.: Tumor angiogenesis and microcirculation. *Marcel Dekker AG, New York*, 2001, 623 s.
84. www.cancer.gov/clinicaltrials/developments

Došlo do redakce: 11. 12. 2003

Přijato po recenzi: 16. 2. 2004

Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

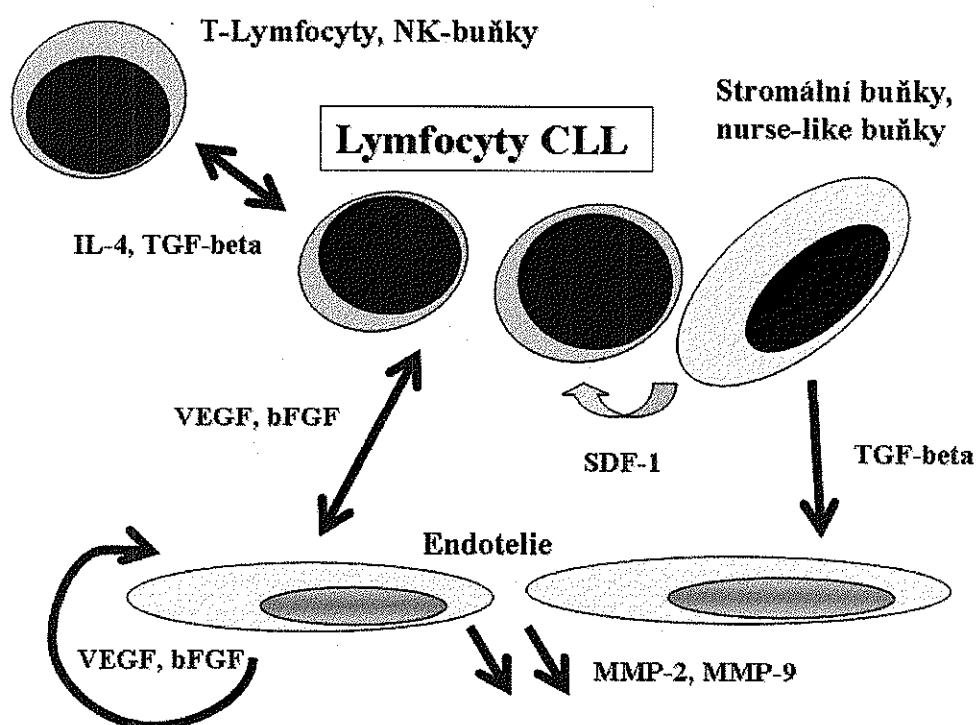
MUDr. Luděk Pour

Jihlavská 20

639 00 Brno

4. CLL a angiogeneze

Lze říci, že problematika angiogeneze u CLL je dosud málo prozkoumaná. V databázi Medline lze nalézt při kombinaci klíčových slov „angiogenesis“ a „chronic lymphocytic leukemia“ pouze 33 odkazů (údaj ze srpna 2007). Angiogenní procesy u CLL jsou výsledkem intenzivních a mnohostranných interakcí leukemických buněk CLL v mikroprostředí kostní dřeně s endotelovými buňkami, stromálními buňkami, „nurse like“ buňkami, složkami imunitního systému (T-lymfocyty, NK-buňky) a dalšími, při kterých se uplatňují nejen přímé mezibuněčné kontakty, ale také parakrinní či autokrinní stimulace a inhibice (Obr.1). Důležitá studie Kaye et al. prokázala schopnost leukemických lymfocytů CLL produkovat širokou paletu pro- i antiangiogenních látek. Bairey et al. zjistili expresi všech tří receptorů pro VEGF v membránové formě na povrchu CLL buněk, což dokazuje možnost jejich autokrinní stimulace. Stejně jako u ostatních hematologických malignit, jsou možné dvě základní metody hodnocení angiogeneze: měření angiogenních cytokinů v periferní krvi a hodnocení neovaskularizace v kostní dřeni.



Obr. 1. Komplexní interakce v mikroprostředí kostní dřeně u chronické lymfocytární leukémie.

4.1 Cirkulující angiogenní faktory

První zmínka o angiogenních ukazatelích u chronické lymfocytární leukémie pochází z r. 1995, kdy Duensing et al. prokázali zvýšení bazického růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF) v séru u pilotního souboru 18 pacientů s CLL. Dosud bylo publikováno několik prací zkoumajících cirkulující bFGF i VEGF, některé však vykazovaly metodické nedostatky v podobě naprosté

absence či nedostatečného rozsahu kontrolní skupiny, eventuálně zařazení i nemocných, kteří před hodnocením angiogeneze již podstoupili cytoredukční léčbu. Z hlediska prognostického významu ukazatelů angiogeneze byly ve třech studiích nalezeny vyšší koncentrace bFGF u pokročilých vs. časných klinických stádií. Molica et al. navíc zjistili souvislost mezi vyšší koncentrací VEGF a časnější progresí nemocných z časných stádií. Bairey et al. publikovali korelaci mezi sérovým bFGF a antiapoptotickým proteinem bcl-2. Z hlediska cirkulujících inhibitorů angiogeneze jsou k dispozici pouze dvě studie týkající se sérového endostatinu, kde nebyly zjištěny významné rozdíly v koncentracích endostatinu mezi skupinou CLL pacientů a zdravými kontrolami. Kromě endostatinu byla publikována pouze jediná práce o trombospondinu-1, a to v již zmíněné práci Kay et al., kteří prokázali produkci mRNA pro trombospondin buňkami CLL a jeho sekreci do kultivačního média; cirkulující trombospondin měřen nebyl. Prognostický význam endostatinu byl hodnocen ve dvou studiích a nalezena souvislost mezi vyššími hodnotami a klinickým stádiem a také kratším obdobím dogrese. V jediné předchozí studii hodnotící vliv léčby na angiogenní faktory u CLL zjistili Gora-Tybor et al. významný pokles bFGF a TGF-beta u osmnácti nemocných léčených monoterapií kladribinem. Dosud neexistuje práce hodnotící angiogenní faktory v závislosti na kombinované léčbě obsahující fludarabin, stejně tak nebyla dosud publikována studie hodnotící vývoj koncentrací VEGF po léčbě CLL. Stejně tak neexistuje práce hodnotící solubilní endoglin (sCD105) u CLL.

Z metodického hlediska je nutno poznamenat, že naprostá většina studií hodnotila angiogenní aktivátory v krevním séru periferní krve, pouze ve dvou pracech byla použita krevní plazma. Otázka, zda měřit ukazatele angiogeneze v séru či plazmě je dosud nedořešená, nicméně řada prací dokazuje, že zejména v případě VEGF je kvantifikace v séru zatížena chybou způsobenou uvolněním tohoto faktoru z trombocytů při tvorbě krevní sraženiny, z čehož vyplývají vyšší hodnoty v séru ve srovnání s plazmou a pozitivní korelace s počtem trombocytů. Z tohoto důvodu je podle našeho názoru přesnější a lépe vystihující biologickou aktivitu stanovení angiogenních faktorů v plazmě.

4.2 Vaskularita v kostní dřeni

Význam vaskularity kostní dřene u CLL není dosud zcela vyjasněn, což je dáno nedostatkem kvalitních a rozsáhlých studií v této oblasti. První publikace na toto téma z roku 2000 pochází z M.D.Anderson Cancer Center v Houstonu; v této publikaci nebyla zjištěna vyšší angiogeneze ve dřeni vůči kontrolám. Problémem této studie však je kromě malého rozsahu vyšetřeného souboru a kontrol také zcela odlišná metodika hodnocení mikrovaskulární denzity (MVD). Naopak pilotní studie Kini et al zvýšenou MVD prokázala. Dosud největší studie Sezera et al.,

publikovaná pouze formou abstraktu, zjistila kromě zvýšení MVD oproti kontrolám také významně vyšší MVD u difúzní vs. nedifúzní infiltrace dřeně; navíc nemocní s vyšší MVD měli významně kratší dobu do progresu. Podobných výsledků dosáhli Molica et al. u skupiny pacientů s časou CLL. Wolowiec et al zjistili také významně vyšší MVD u CLL a také pozitivní korelaci mezi proliferací a vaskularitou; neprokázali však vliv MVD na klinický průběh. Ve studii De Raeveho et al. byla zjištěna vyšší MVD a endoteliální proliferace pouze u podskupiny s difúzní infiltrací dřeně. Dosud byly publikovány pouze dvě pilotní studie italských autorů hodnotící vliv léčby na mikrovaskulární denzitu kostní dřeně. V první z nich bylo léčbou na bázi fludarabinu dosaženo významného snížení MVD, ve druhé bylo stejného účinku dosaženo pomocí alemtuzumabu, nikoliv však chlorambucilu. Tato pilotní data naznačují, že podobně jako řada dalších klasických chemoterapeutik, fludarabin, resp. alemtuzumab, by mohly mít také antiangiogenní účinky. Příčin nejednoznačnosti dosavadních výsledků týkajících se vaskularity dřeně u CLL je několik. Za prvé, některé studie měly velmi omezený rozsah vyšetřených vzorků (např. Kini et al. vyšetřil 12 pacientů s CLL, z toho tři již po léčbě). Za druhé, výsledky jednotlivých studií jsou těžko porovnatelné v důsledku použití odlišných protilátek k průkazu endotelu a metodik hodnocení MVD (např. metodika „hot spot“ vs. použití náhodných polí v publikaci Aguayo et al). Nutné jsou tedy rozsáhlejší prospektivní studie s použitím pokud možno porovnatelných a reprodukovatelných metodik k objasnění praktického významu vaskularity dřeně v patogenezi CLL. Přehled dosud publikovaných studií týkajících se vaskularity kostní dřeně u CLL podává tab. 6.

Autor, rok	CLL	Kontroly	Marker	Metodika	Zvýšení MVD
Aguayo, 2000	23	16	vWF	MVD	ne (zcela odlišná metodika)
Kini, 2000	12	11	CD34	MVD	ano
Sezer, 2001	90	?	CD34	MVD	ano, krátký PFS vyšší MVD u difúzní vs. nedifúzní infiltrace
Molica, 2002	45	12	VEGF	MVD, MSA	ano, časnější progresu u vyšší MSA
Wolowiec, 2004	46	10	CD34	MVD	ano, korelace s proliferací
De Raeve, 2004	26	23	CD34	MVD	ano, pouze u difúzní infiltrace
Molica, 2005	12	-	vWF	MVD	snížení po fludarabinu
Molica, 2007	20	-	vWF	MVD	snížení po alemtuzumabu

Tab. 6. Přehled studií hodnotících angiogenezi v kostní dřeni u CLL.

5. Výsledky

5.1. Cirkulující angiogenní faktory u CLL

5.1.1 Smolej L., Maisnar V., Andrys C., Pour L., Malý J.: Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005;48 (1):57-8.

5.1.2 Smolej L., Andrys C., Belada D., Maisnar V., Žák P., Široký O., Malý J.: Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u nemocných s lymfoidními malignitami. *Trans. Hemat. dnes* 2006;12(1):37–39.

5.1.3 Smolej L., Andrys C., Pekova S., Schwarz J., Zak P., Belada D Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91(10):1432-1433. **IF=5,032**

5.1.4 Smolej L, Andrys C, Krejsek J, Belada D, Žák P, Široký O, Malý J. Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a cévní endotelový růstový faktor (VEGF) jsou zvýšeny v plazmě periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukémií a klesají po intenzivní léčbě obsahující fludarabin. *Vnitř Lék* 2007;53(11):1171-6.

5.1.5 Smolej L, Andrys C, Vroblova V. Modern prognostic factors and angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia: More data needed. *Leuk Res.* 2007;31(12):1763-4. **IF=2,483**

5.1.6 Smolej L., Andrys C., Belada D., Hrudková M., Krejsek J., Malý J. Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *Trans Hemat dnes*, přijato k publikaci.

5.1.7 Smolej L, Andrys C, Pekova S, Kucerova L. Plasma Endostatin Levels in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: Relationship to Prognostic Factors. Nepublikovaná studie.

PLASMA CONCENTRATIONS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

Lukáš Smolej¹, Ctirad Andrýs², Vladimír Maisnar¹, Luděk Pour³, Jaroslav Malý¹

Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic: 2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Haematology¹, Institute of Clinical Immunology and Allergology²; Masaryk University, Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic: Internal Haematology Department³

Summary: Angiogenesis plays a major role in the development and progression of haematological malignancies. In our study we measured plasma concentrations of key angiogenic activators vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) using commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 37 patients with lymphoid malignancies and 20 healthy donors. We found a statistically significant increase in bFGF concentrations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL, n=18) compared to the control group (median 118.8 vs. 9.3 pg/ml, p<0.001). However, we didn't find any significant difference in VEGF concentrations between B-CLL patients and the control group. There was also no significant increase in bFGF or VEGF in patients with multiple myeloma (n=7) and non-Hodgkin's lymphoma (n=12). Our pilot study shows that measurement of angiogenic activators in plasma is a feasible and reproducible method of angiogenesis assessment. Larger studies are needed for correlation between serum and plasma concentrations and detailed statistical evaluation including the impact on patients' survival.

Key words: Angiogenesis; VEGF; bFGF; Leukemia; Lymphoma; Myeloma

Angiogenesis is involved in pathogenesis and progression of haematological malignancies (3,4,5,6). Increased angiogenesis has been found in acute and chronic leukemias, lymphomas, multiple myeloma, myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. Recent studies have also correlated increased angiogenesis to inferior clinical outcome and shorter overall survival (4). Determination of angiogenic cytokines in peripheral blood is a common method of angiogenesis assessment (7,8). However, angiogenic fac-

tors have been usually measured in serum rather than plasma. Because serum levels of angiogenic factors can be increased by release from platelets during clot formation (2,9), we evaluated feasibility of measuring EDTA plasma concentrations of angiogenic activators - basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) using commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Human bFGF and VEGF Quantikine ELISA kit, R & D Systems, MN, USA) in 37

Tab. 1: Plasma bFGF and VEGF - descriptive statistics and results of Mann-Whitney U test. B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia; NHL, Non-Hodgkin's lymphoma; MM, multiple myeloma; CI, confidence interval; NA, not applicable. All concentrations are in pg/ml.

VEGF (ELISA)	n	Median	Mean	SD	SE	95% CI of Mean	p-value vs. controls
B-CLL	18	78.8	95.5	88.5	20.9	51.5-139.5	0.69
NHL	12	41.9	86.9	172.0	49.7	-22.3-196.2	0.3
MM	7	59.7	87.8	48.0	18.1	43.4-132.1	0.54
Controls	20	57.5	85.2	76.1	17.0	49.6-120.8	NA
bFGF (ELISA)	n	Median	Mean	SD	SE	95% CI of Mean	p-value vs. controls
B-CLL	18	118.8	92.7	66.5	15.7	59.7-125.8	<0.001
NHL	12	10.3	16.9	21.4	6.2	3.3-30.5	0.87
MM	7	9.6	13.0	8.6	3.3	5.0-21.0	0.63
Controls	20	9.3	10.7	3.3	0.7	9.3-12.3	NA

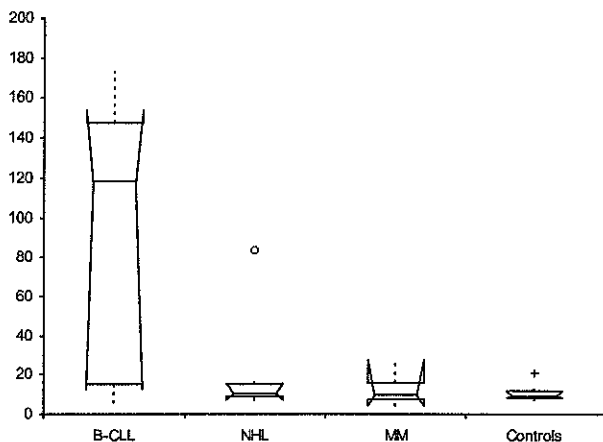


Fig. 1: Box plot comparing bFGF levels in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma and controls. Concentrations are in pg/ml.

patients with chronic lymphoid malignancies. The cohort consisted of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL, n=18), multiple myeloma (MM, n=7) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL, n=12). Twenty healthy donors were used as the control group. All samples were collected from untreated patients at the time of diagnosis. Median plasma levels of bFGF in B-CLL, NHL and MM patients were 118.8, 10.3 and 9.6 pg/ml. Median levels of VEGF in B-CLL, NHL and MM were 78.8, 41.9 and 59.7 pg/ml. Median plasma levels of bFGF and VEGF in control group were 9.3 and 57.5 pg/ml (Table 1). Plasma levels of bFGF in chronic lymphocytic leukemia were significantly higher in comparison to control group ($p < 0.001$, Fig. 1). The differences in plasma concentrations of bFGF in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma as well as VEGF levels in all three diseases compared to control group did not reach statistical significance. Our pilot study shows that ELISA measurement of EDTA plasma levels of angiogenic factors is a feasible and reproducible method of angiogenesis assessment. Results concerning significantly increased bFGF in B-CLL are similar to work of Aguayo and coworkers (1). It is necessary to confirm these observations by a larger study which will enable us to compare serum and plasma

concentration of angiogenic factors and to correlate the data with patients' clinical outcome. Nevertheless, the preliminary results are promising and warrant further investigations.

Acknowledgments

We would like to thank Oldřich Široký, M.D., David Belada, M.D., Pavel Žák, M.D., Ph.D., Jaroslava Voglová, M.D., Alice Sýkorová, M.D., and Milan Bláha, M.D., Ph.D. for their excellent cooperation. This work was supported in part by grants NR/8076 - 3 and NR/8373 - 3 from Ministry of Health of Czech Republic.

References

1. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96(6):2240-5.
2. George ML, Eccles SA, Tutton MG et al. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3147-52.
3. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 2002;16(5): 911-9.
4. Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt H et al. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;45(3):227-44.
5. Pour L, Hájek R, Büchler T et al. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in tumors. *Vnitř Lék* 2004;12:930-8.
6. Ribatti D, Vacca A, Dammacco F et al. Angiogenesis and anti-angiogenesis in hematological malignancies. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12(1):11-22.
7. Smolej L. Angiogenesis as a diagnostic and therapeutic target in hematological malignancies. *Pracovní dny SZP 2004, Sedmihorky, Book of abstracts*, 56-9.
8. Smolej L. Markers of Angiogenesis in Hematological Malignancies. 1st Morphological Postgraduate Workshop, Hradec Králové, 15.2.2005, Book of abstracts, 35.
9. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;94(4):395-404.

Submitted December 2004.

Accepted March 2005.

*MUDr. Lukáš Smolej,
Charles University in Prague,
Faculty of Medicine in Hradec Králové,
2nd Department of Internal Medicine,
Department of Clinical Haematology,
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové,
Czech Republic.
e-mail: smolej@seznam.cz*

Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u nemocných s lymfoidními malignitami

Smolej L.¹, Andrýs C.², Belada D.¹, V. Maisnar¹, Žák P.¹, Široký O.¹, Malý J.¹

¹Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, 2. interní klinika

²Oddělení klinické hematologie a Ústav klinické imunologie a alergologie

Souhrn

Zvýšená angiogeneze byla v poslední době prokázána u akutních a chronických leukemií, lymfomů i myeloproliferací. Endoglin (CD105), člen receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta (TGF-beta), ovlivňuje buněčnou odpověď na TGF-beta a je absolutně nezbytný pro angiogenní pochody. Solubilní endoglin (sCD105) je zvýšený v krvi u nemocných s některými solidními nádory. V naší pilotní studii jsme měřili sCD105 ELISA metodou v plazmě periferní krve u 75 nemocných s lymfoidními malignitami a 13 zdravých dobrovolníků. Zjistili jsme signifikantně zvýšenou koncentraci sCD105 u nemocných s chronickou B-lymfocytární leukemií (n = 42) v porovnání s kontrolní skupinou (p = 0,0296). Překvapivým zjištěním bylo signifikantní snížení sCD105 u nemocných s mnohočetným myelomem (n = 13, p = 0,0023). Koncentrace solubilního endoglinu se nelišily od kontrol u difuzního velkobuněčného (n = 12) ani folikulárního (n = 8) lymfomu. Naše data ukazují, že sCD105 jakožto nový ukazatel angiogeneze u lymfoidních malignit může společně s dalšími angiogenními cytokiny (jako jsou např. VEGF - vascular endothelial growth factor nebo bFGF - basic fibroblast growth factor) napomoci komplexnějšímu zhodnocení angiogeneze s cílem přispět k prognostické stratifikaci u těchto onemocnění.

Klíčová slova: endoglin, CD105, angiogeneze, myelom, lymfom, B-CLL

Summary

Smolej L., Andrýs C., Belada D., Maisnar V., Žák P., Široký O., Malý J.: Plasmatic concentration of soluble endoglin in patients with lymphoid malignancies

Increased angiogenesis has been recently reported in acute and chronic leukemias, lymphomas, and myeloproliferative disorders. Endoglin (CD105), a member of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor family, modulates cellular responses to TGF-beta and is absolutely essential for angiogenesis. Its soluble form (sCD105) is increased in patients with various solid tumors. In our pilot study, we measured peripheral blood plasma concentrations of sCD105 using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay in 75 patients with lymphoid malignancies and 13 healthy donors. We found a statistically significant increase in sCD105 concentrations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (n = 42) compared to the control group (p = 0.0296). Surprisingly, patients with multiple myeloma (n = 13) had significantly lower concentrations of sCD105 in comparison to controls (p = 0.0023). We didn't find significant differences between sCD105 concentrations in patients with follicular lymphoma (n = 8) or diffuse large B-cell lymphoma (n = 12) and the control group. We conclude that plasma sCD105 is a new angiogenesis marker in lymphoid malignancies and together with other cytokines (such as VEGF - vascular endothelial growth factor and bFGF - basic fibroblast growth factor) might be useful as a part of complex angiogenesis assessment aimed to improve prognostic stratification of these disorders.

Key words: endoglin, CD105, angiogenesis, myeloma, lymphoma, B-CLL

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 1, p. 37-39.

Úvod

Angiogeneze, tedy novotvorba cév z již existující vaskulatury, je zásadním procesem při rozvoji maligních nádorů (1). Zvýšená neovaskularizace byla v posledních letech zjištěna u řady hematologických malignit, např. akutních a chronických leukemií, lymfomů, mnohočetného myelomu či myeloproliferací (2-4). Některé studie u maligních onemocnění krvevotvorby prokázaly korelaci mezi zvýšenou angiogenezí a nepříznivým klinickým průběhem (5-6). Endoglin (CD105) je homodimerický transmembránový glykoprotein, který má zcela nezastupitelnou úlohu v angiogenezi. Tento fakt byl prokázán u myši s delecí genu pro endoglin, které umírají během časného intrauterinního vývoje na mnohočetné srdeční a cévní defekty (7-9). CD105 tvoří součást receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta (TGF-beta), vykazuje

sekvenční homologii s betaglykanem, tedy TGF-beta receptorem III, a váže TGF-beta1 a 3 s vysokou afinitou (10). CD105 ovlivňuje buněčnou odpověď na TGF-beta, čímž se účastní na vývoji a remodelaci cév, zejména jako induktor proliferace endotelií (11). Jeho exprese je specifická pro proliferující endotel během angiogenních procesů (12). Endoglin může být uvolněn v solubilní formě (sCD105) do krevního oběhu. Zvýšené koncentrace sCD105 byly nedávno zjištěny u nemocných se solidními tumory a u myeloidních malignit (13-16). Podle našich informací dosud nebyla publikována žádná studie týkající se solubilního endoglinu u lymfoidních malignit.

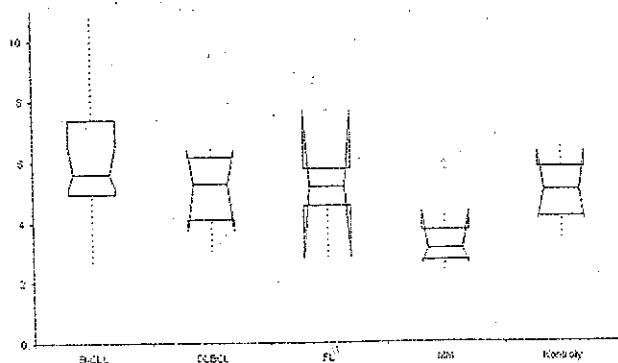
Nemocní a metody

V naší pilotní práci jsme měřili plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u 75 nemocných s lymfoidními malignitami. Spektrum diagnóz bylo následující:

chronická B-lymfocytární leukemie (B-CLL, n = 42), mnohočetný myelom (MM, n = 13), folikulární lymfom (FL, n = 8) a difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL, n = 12). Kontrolní skupinu tvořilo 13 zdravých dobrovolníků. Pacientské vzorky byly získány od neléčených nemocných. Ethyl-endiainmintetraoctová kyselina (EDTA) byla použita jako antikoagulans. Všechny vzorky plazmy byly po centrifugaci zamrazeny při teplotě -80 °C až do měření. Solubilní endoglin byl stanoven pomocí komerčně dostupného ELISA kitu (Human Endoglin Quantikine ELISA kit, R & D Systems, MN, USA). Měření bylo provedeno podle standardní metodiky doporučené výrobcem. Citlivost metody je 0,007 ng/ml. Studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace, schválena etickou komisí a nemocní podepsali informovaný souhlas. Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Analyse-it (Analyse-it Software Ltd., Velká Británie). Všechna data byla testována na normalitu Shapiro-Wilkovým testem. Pokud bylo rozdělení dat normální (ve skupině B-CLL, DLBCL, FL, kontrol), byl k testování rozdílů koncentrací vůči kontrolní skupině užit parametrický t-test. V případě MM neměla data normální rozdělení, proto byl použit neparametrický Mann-Whitneyův U test. P-hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za statisticky signifikantní.

Výsledky

Deskriptivní statistika i výsledky testování rozdílů v koncentracích mezi jednotlivými onemocněními a kontrolní skupinou jsou uvedeny v tabulce 1. Solubilní endoglin byl detekovatelný ve všech vzorcích. Koncentrace u nemocných s B-CLL byly signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (průměr ± standardní odchylka 6,2 ± 1,9 ng/ml, 95% IS [interval spolehlivosti] 5,6–6,8 ng/ml vs. 5,0 ± 1,1 ng/ml, 95% IS 4,3–5,6 ng/ml, p = 0,0296). Překvapivě byly výrazně nižší koncentrace sCD105 u mnohočetného myelomu v porovnání s kontrolami (3,5 ± 1,2 ng/ml, 95% IS 2,8–4,2 ng/ml vs. 5,0 ± 1,1 ng/ml, 95% IS 4,3–5,6 ng/ml, p = 0,0023).



Obr. 1. Kráčkový graf koncentrací sCD105. Hodnoty jsou v ng/ml.

Tab. 1. sCD105 – deskriptivní statistika a porovnání s kontrolami.

Skupina	n	Medián	Průměr	SD	95% IS průměru	p-hodnota*
B-CLL	42	5,6	6,2	1,9	5,6–6,8	0,0296
DLBCL	12	5,3	5,2	1,8	4,1–6,4	0,649
FL	8	5,2	5,1	1,5	3,8–6,3	0,834
MM	13	3,1	3,5	1,2	2,8–4,2	0,0023
Kontroly	13	5,0	5,0	1,1	4,3–5,6	-

*vztahovaná ke kontrolní skupině. Zkratky: B-CLL = chronická B-lymfocytární leukemie; FL = folikulární lymfom; DLBCL = difuzní velkobuněčný lymfom (diffuse large B-cell lymphoma); MM = mnohočetný myelom; SD = standardní odchylka (standard deviation); IS, interval spolehlivosti. Všechny koncentrace jsou uvedeny v ng/ml.

Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly u difuzního velkobuněčného lymfomu ani folikulárního lymfomu. Grafické znázornění distribuce hodnot sCD105 u jednotlivých skupin je na obrázku 1.

Diskuse

V posledních letech přibývá důkazů o významu angiogeneze u hematologických malignit. Dosud však nebyl identifikován univerzální marker angiogeneze a je velmi pravděpodobné, že vzhledem k výrazné komplexnosti angiogenních procesů a účasti mnoha cytokinových signálních drah ani nalezen nebude. Domníváme se, že spíše než hledání univerzálního ukazatele angiogeneze je výhodnější komplexní zhodnocení angiogeneze stanovením většího počtu jak angiogenních aktivátorů, tak inhibitorů. V naší pilotní práci jsme se proto zaměřili na dosud neanalyzovaný solubilní endoglin, který se angiogenních procesů účastní prostřednictvím signální cesty TGF-beta. Prokázali jsme signifikantní zvýšení sCD105 u B-CLL. Naproti tomu u MM jsou z neznámé příčiny koncentrace sCD105 výrazně nižší než u kontrol. U lymfomů nebyly prokázány signifikantní rozdíly vůči kontrolám. Data je však nutno interpretovat s opatrností vzhledem k omezenému rozsahu souboru. Na základě výsledků této studie plánujeme rozšíření počtu nemocných a sériové stanovení sCD105 před a po léčbě s cílem potvrzení dosavadních výsledků a stanovení korelace s klinickým průběhem. Stanovení solubilního endoglinu jakožto nového angiogenního ukazatele u lymfoidních malignit by mohlo přispět ke komplexnímu zhodnocení angiogeneze u těchto onemocnění.

Literatura

1. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 1995; 333: 1757–1763.
2. Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt H, Barlogie B. Angiogenesis in hematologic malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 2003; 45: 227–44.
3. Pour L, Hájek R, Büchler T, Maisnar V, Smolej L. Angiogeneze a antiangiogenní léčba u nádorů. Vnitř Lék 2004; 12: 930–8.
4. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 2000; 96: 2240–5.

5. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3111–3116.
6. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, Vitelli G, Tucci L, Roccaro AM, Dammacco F. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 3344–51.
7. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; 17: 984–92.
8. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 2003; 22: 6557–63.
9. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGF-beta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 2000; 217: 42–53.
10. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19027–30.
11. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, Dijke Pt P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 2004; 1–11.
12. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 1999; 81: 568–72.
13. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000; 89: 122–6.
14. Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N, Kumar S. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 88: 1424–31.
15. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 524–32.
16. Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C, Maio M. Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 2003; 194: 171–5.
17. Smolej L., Benešová P. Význam angiogeneze u maligních nádorů. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005, přijato k publikaci.

MUDr. Lukáš Smolej

2. interní klinika, Oddělení klinické hematologie

UK v Praze, LF a FN v Hradci Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: smolej@seznam.cz

Poděkování

Tato práce byla podpořena granty NR/8076 – 3 a NR/8373 – 3 IGA

MZ ČR a výzkumným záměrem MZO 00179906.

Došlo do redakce: 14. 11. 2005

Přijato: 5. 1. 2006

Chronic Lymphocytic Leukemia

Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgV_H mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia

The mutation status of genes encoding the variable region of immunoglobulin heavy chains (IgV_H) is a strong predictor of disease progression and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). We investigated whether there is an association between the concentration of both vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and IgV_H mutation status in 49 untreated B-CLL patients.

Haematologica 2006; 91:1432-1433
(<http://www.haematologica.org/journal/2006/10/1432.html>)

The overall survival of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is extremely heterogenous, so novel prognostic factors are being sought in order to identify high-risk patients at the time of diagnosis and to optimize their treatment. The mutation status of genes encoding the variable region of the immunoglobulin heavy chain (IgV_H) is currently considered one of key prognosticators of disease progression and survival.¹ Several studies have also shown that in B-CLL there is increased vascularity in bone marrow^{2,3} and angiogenic cytokines in peripheral blood.⁴⁻⁶ In this study, we investigated whether there is an association between concentrations of two key angiogenic activators, vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and IgV_H mutation status in patients with B-CLL.

Forty-nine patients with never-treated B-CLL, diagnosed according to NCI-WG criteria, and a control group of fifty age-matched healthy blood donors were enrolled. IgV_H mutation status was determined as described in detail elsewhere.¹⁰ IgV_H sequences were aligned to the nearest germline using the Ig BLAST program; IgV_H genes with less than 98% sequence homology to the corresponding germline were considered mutated. We quantified bFGF and VEGF in EDTA plasma samples (stored at -70°C until the time of analysis) using sandwich ELISA kits (Human bFGF and VEGF Quantikine® Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions. Software Analyse-It (Analyse-It Software Ltd., UK) was used for the statistical analyses. The non-parametric Mann-Whitney U test was used to compare differences between subgroups. The study was conducted according to Helsinki Declaration, approved by local ethics committee and study participants signed a written informed consent form. Twenty-six patients had mutated IgV_H genes and 23 unmutated ones. The male:female ratio was 12:14 in IgV_H-mutated subgroup and 16:7 in the unmutated subgroup. The median of the IgV_H-mutated and unmutated patients was 58.2 and 62.3 years, respectively (95% CI [confidence interval], 57.5-67.1 and 57.8-62.6 years, respectively). According to modified Rai staging, 20, 5 and 1 IgV_H-mutated patients and 8, 12, and 3 IgV_H-unmutated patients had low, intermediate and high risk B-CLL, respectively. The concentrations of both VEGF and bFGF in peripheral blood plasma were significantly higher in B-CLL patients than in the control patients ($p < 0.0001$ for both cytokines). The concentra-

Table 1. Descriptive statistics of bFGF and VEGF levels in B-CLL patients and controls; results of Mann-Whitney tests.

Group	N.	Median	Mean	SD	95% CI of Mean	Mann-Whitney test	p value
bFGF Mutated	26	175.2	212.7	165.2	146.0-279.4	bFGF mutated vs. controls	<0.0001
bFGF Unmutated	23	46.3	91.7	98.0	49.3-134.0	bFGF unmutated vs. controls	<0.0001
bFGF Controls	50	8.9	11.0	10.3	8.1-13.9	bFGF mutated vs. unmutated	0.0149
VEGF Mutated	26	104.9	141.7	90.9	105.0-178.4	VEGF mutated vs. controls	0.0002
VEGF Unmutated	23	80.3	134.4	156.8	66.6-202.2	VEGF unmutated vs. controls	0.0788
VEGF Controls	50	49.0	68.4	63.6	50.4-86.5	VEGF mutated vs. unmutated	0.146

SD: standard deviation; CI: confidence interval. Concentrations are in pg/mL.

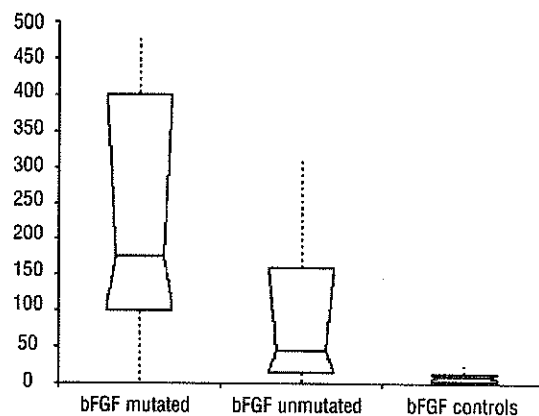


Figure 1. bFGF levels are significantly elevated in IgV_H mutated patients. Concentrations are in pg/mL.

tion of bFGF was significantly higher in both IgV_H subgroups than in controls ($p < 0.0001$) while VEGF was significantly increased only in IgV_H-mutated patients ($p = 0.0002$); the difference between concentrations in controls and IgV_H-unmutated patients not being significant ($p = 0.0788$, Table 1). Interestingly, the plasma levels of bFGF were significantly higher in the IgV_H-mutated group than in the IgV_H-unmutated subgroup ($p = 0.0149$, Figure 1). On the other hand, VEGF concentrations in the mutated and unmutated subgroups were not significantly different ($p = 0.146$). There was also no difference in VEGF or bFGF between patients with modified Rai low vs. intermediate vs. high risk disease. Likewise, no differ-

ence in either cytokine was seen between patients divided according to results of fluorescent *in situ* hybridization studies into a group with favorable cytogenetics (i.e. no abnormality or del 13q, n=30) and one with unfavorable cytogenetics (any other aberrations including del17p, 11q and +12, n=19) [data not shown].

As expected, plasma levels of bFGF and VEGF were significantly higher in the patients with B-CLL than in the controls; this is in agreement with previously published data.^{5,6} Surprisingly, however, the concentration of bFGF was significantly elevated in patients with a favorable prognosis with mutated IgV_H genes while VEGF was raised in both mutated and unmutated cases. Plasma/serum concentrations of bFGF in CLL are by far highest of all hematologic malignancies⁵ and increased bFGF in peripheral blood has been associated with an unfavorable disease course because of its correlation with advanced clinical stage,⁷ increased survival of B-CLL cells⁸ and enhanced resistance to fludarabine.⁹ We hypothesize that our conflicting results could be caused by preferred usage of bFGF signaling by CLL cells in patients with IgV_H mutations patients due to different gene expression profiles. We cannot exclude bias caused by the relatively small number of samples and patient selection; on the other hand, some of the abovementioned studies investigating the role of bFGF in B-CLL also investigated limited numbers of patients' samples (3 in Koenig's article,⁸ 36 in Menzel's study),⁹ so all these results should be interpreted with caution. In conclusion, our data suggest a possible association between elevated bFGF and mutated IgV_H genes in B-CLL. Further investigation of the exact role of bFGF and VEGF signaling in B-CLL in larger series of patients, in particular with respect to modern prognostic factors, is clearly warranted.

Lukás Smolej,* Ľirad Andrys,^o Sona Peková,**
Jirí Schwarz,^o David Belada,* Pavel Zák*

*2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic; ^oInstitute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic; ^oInstitute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; ^{**}Department of Clinical Hematology, Biochemistry and Immunology, Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic

Funding: supported by research project MZO 00179906 from the Ministry of Health, Czech Republic and by grant NR/8373-3 from the Internal Grant Agency, Ministry of Health, Czech Republic.

Key words: angiogenesis, bFGF, chronic lymphocytic leukemia, IgV_H mutation status.

Correspondence: Lukás Smolej, M.D., Department of Clinical Hematology, University Hospital and Medical School, Sokolská 581, Hradec Králové, Czech Republic 500 05. Phone: international +42.077.6704987. Fax: international +42.049.5832011. E-mail: smolej@seznam.cz

References

1. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005;90:391-9.
2. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:3344-51.
3. Wolowiec D, Wozniak Z, Potoczek S, Ganczarski G, Wrobel T, Kuliczkowski K, et al. Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:263-70.
4. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 2002;16:911-9.
5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-5.
6. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;107:605-10.
7. König A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosen A, Al-Katib A, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997;11:258-65.
8. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113:400-6.
9. Menzel T, Rahman Z, Calleja E, White K, Wilson EL, Wieder R, et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996; 87:1056-63.
10. Pekova S, Markova J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn* 2005;9:23-34.

Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a cévní endotelový růstový faktor (VEGF) jsou zvýšeny v plazmě periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukemií a klesají po intenzivní léčbě obsahující fludarabin

L. Smolej¹, C. Andrys², J. Krejsek², D. Belada¹, P. Žák¹, O. Široký¹, J. Malý¹

¹ Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

² Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Souhrn: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je charakteristická výraznou různorodostí prognózy s celkovým přežitím v řádu několika měsíců až desítek let. V současné době není možné přesně určit budoucí klinický průběh u jednotlivého pacienta. Angiogeneze se ukazuje v posledních letech jako potenciální prognostický faktor u řady hematologických malignit včetně CLL. Cílem naší studie bylo změřit klíčové angiogenní faktory bFGF a VEGF (basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor) metodou ELISA v plazmě periferní krve u 73 nemocných s neléčenou chronickou lymfocytární leukemií (43 mužů, 30 žen, medián věku 65 let, rozmezí 31–88 let) a 80 zdravých dobrovolníků. Zjistili jsme signifikantně zvýšenou koncentraci u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,0001$ pro oba cytokiny). Nebyly nalezeny významné rozdíly v angiogenních faktorech mezi podskupinami s nízkým vs středním vs vysokým rizikem dle Raiie či závislost angiogenních faktorů na pohlaví. U skupiny 12 pacientů došlo po intenzivní léčbě založené na fludarabinu k významnému poklesu u obou těchto faktorů (bFGF: $p = 0,0005$; VEGF: $p = 0,0068$), které již nebyly signifikantně odlišné od kontrolní skupiny (bFGF: $p = 0,524$; VEGF: $p = 0,728$). Naše data prokázala zvýšení zásadních angiogenních aktivátorů bFGF a VEGF u chronické lymfocytární leukemie. Intenzivní léčba kombinující fludarabin a cyklofosfamid + rituximab by mohla mít také antiangiogenní účinky. Další studie s delší dobou sledování jsou nutné k vyhodnocení vlivu angiogenních ukazatelů na dobu do progresu či celkové přežití.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukemie – angiogeneze – bFGF – VEGF – prognóza – léčba – fludarabin

Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment

Summary: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by extraordinary heterogeneity in terms of clinical course with overall survival ranging from several months to dozens of years. It is currently not possible to accurately predict the future clinical course in an individual patient. Angiogenesis has been recently reported as a potential prognostic factor in various hematological malignancies including CLL. The objective of the present study was to quantify plasma levels of key angiogenic activators vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in patients with CLL and determine their potential change after intensive fludarabine-based treatment. Peripheral blood EDTA plasma concentrations of bFGF and VEGF were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay in 73 patients with untreated CLL (43 males, 30 females, median age, 65 years, range 31–88) and 80 healthy donors serving as control group. We found statistically significant increase in concentrations in patients with chronic lymphocytic leukemia compared to the control group ($p < 0.0001$ for both cytokines). No differences in angiogenic factors were noted between subgroups with low vs. intermediate vs. high-risk stage according to modified Rai staging or males vs. females. In twelve patients who achieved at least partial response after intensive fludarabine-based treatment, levels of bFGF as well as VEGF decreased significantly (bFGF, $p = 0.0005$; VEGF, $p = 0.0068$); in addition, they were no more significantly different from controls (bFGF, $p = 0.524$; VEGF, $p = 0.728$). Our data showed that key angiogenic activators bFGF and VEGF were elevated in plasma of CLL patients. Furthermore, treatment with intensive fludarabine-containing regimens resulted in significant decrease of both cytokines. These data suggest that angiogenic cytokines may indeed play a significant role in CLL biology and that treatment with combination of fludarabine, cyclophosphamide ± rituximab may exhibit antiangiogenic properties. Further studies with longer follow-up are necessary for evaluation of a possible association between angiogenic markers and progression-free survival or overall survival.

Keywords: angiogenesis – chronic lymphocytic leukemia – bFGF – VEGF – prognosis – treatment – fludarabine

Úvod

Angiogeneze, tedy novotvorba cév z již existující vaskulatury, je zásadním procesem při rozvoji malignit [1–4]. Zatímco význam angiogeneze u solidních nádorů je znám již od počátku 70. let 20. století [1], teprve v 90. letech 20. století dochází k výzkumu neovaskularizace u maligních onemocnění krve. Zvýšená angiogeneze byla zjištěna u akutních a chronických leukemií, maligních lymfomů, mnohočetného myelomu, myeloproliferací i myelodysplazií [3–9]. Některé studie u maligních onemocnění krve prokázaly souvislost mezi zvýšenou angiogenezí a nepříznivým klinickým průběhem [7–9]. Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním dospělých v západní populaci. Toto lymfoproliferativní onemocnění je typické neobvykle vysokou různorodostí prognózy (s celkovým přežitím od několika měsíců až po desítky let), která neumožňuje dopředu odhadnout klinický prů-

běh u individuálního pacienta [10]. S cílem zpřesnění prognózy CLL jsou hledány nové prognostické parametry, jako v posledních letech např. genetické aberace detekované fluorescenční in situ hybridizací (FISH) či mutační stav genů kódujících variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH) [11]. V posledních letech bylo publikováno, že lymfocyty CLL mají schopnost tvořit angiogenní aktivátory i inhibitory [12] a že ukazatele angiogeneze by mohly mít u CLL prognostický význam [13–16]. Pouze jediná studie zkoumala vývoj koncentrací angiogenních cytokinů při léčbě CLL [17]. Za nejdůležitější aktivátory angiogeneze jsou pokládány cévní endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF) a bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor – bFGF) [3–4, 18–20]. Cílem naší práce bylo 1. stanovení těchto angiogenních faktorů v periferní krvi u nemocných s CLL, 2. zhodnocení jejich vztahu ke klinic-

kému stadiu a 3. porovnat jejich hodnoty v závislosti na intenzivní léčbě na bázi fludarabinu.

Nemocní a metody

Do studie bylo zařazeno 73 nemocných s neléčenou chronickou lymfocytární leukemií diagnostikovanou podle klasických kritérií National Cancer Institute – Sponsored Working Group [21]. Jednalo se o 43 mužů a 30 žen, medián věku 65 let, rozmezí 31–88 let. Nízké (Rai 0)/střední (Rai I – II)/vysoké (Rai III – IV) riziko dle modifikovaného Raiova stagingu [22] bylo přítomno u 37/31/5 nemocných. Kontrolní skupinu tvořilo 80 zdravých dobrovolníků. Jako antikoagulant byla použita kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Všechny vzorky plazmy byly po centrifugaci zamrazeny při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do měření. bFGF i VEGF byly stanoveny pomocí komerčně dostupného ELISA kitu (Human VEGF/bFGF Quantikine ELISA kit, R & D Systems, MN, USA). Měření bylo provedeno podle

Tab. 1. Angiogenní aktivátory bFGF a VEGF jsou signifikantně zvýšeny u CLL a významně klesají po léčbě založené na fludarabinu.

Angiogenní faktory	n	medián	průměr	s	95% IS průměru	p
bFGF CLL	73	140,5	182,6	162,2	144,8–220,5	< 0,0001
bFGF kontroly	80	8,6	11,1	11,3	8,6–13,6	
bFGF muži	43	137	177,3	161,6	127,6–227,1	0,89
bFGF ženy	30	149,1	190,2	165,5	128,4–252,0	
bFGF Rai nízké	37	145,7	182,3	158,4	129,5–235,1	0,782
bFGF Rai střední	31	116,1	178,9	176	114,4–243,5	
bFGF Rai vysoké	5	276,6	207,7	120,9	57,5–257,9	0,664
bFGF před léčbou	12	166,1	223,5	194,6	99,9–347,2	0,0005
bFGF po léčbě	12	10,6	13,6	13,3	5,1–22,0	
VEGF CLL	73	100,2	145,9	145,5	111,9–179,8	< 0,0001
VEGF kontroly	80	45,6	64,2	59,5	51,0–77,5	
VEGF muži	43	86,4	118,9	108,1	16,5–152,1	0,064
VEGF ženy	30	104,9	184,6	181,8	33,2–252,5	
VEGF Rai nízké	37	100,2	144,3	161,8	26,6–198,2	0,365
VEGF Rai střední	31	104,8	157,8	136,4	24,5–207,8	
VEGF Rai vysoké	5	83,4	84,2	17,3	7,7–105,7	0,293
VEGF před léčbou	12	95,5	156,2	164,2	51,9–260,6	0,0068
VEGF po léčbě	12	40,2	54,5	60,1	16,4–92,7	

Hodnoty bFGF i VEGF jsou uvedeny v pg/ml. CLL – chronická lymfocytární leukemie, s – standardní odchylka, IC – interval spolehlivosti.

standardní metodiky doporučené výrobcem. Studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace, schválena etickou komisí a nemocní podepsali informovaný souhlas. Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Velká Británie). Všechna data byla testována na normalitu Shapirovým-Wilkovým testem. Pokud bylo rozdělení dat normální, byl k testování rozdílu koncentrací vůči kontrolní skupině užit parametrický t-test. Pokud neměla data normální rozdělení, byl použit neparametrický Mannův-Whitneyův U test. K testování změny angiogenních faktorů po léčbě byl proveden Wilcoxonův test. Korelace byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Všechny výsledky p hodnot jsou pro dvoustranné testy. P hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za statisticky signifikantní.

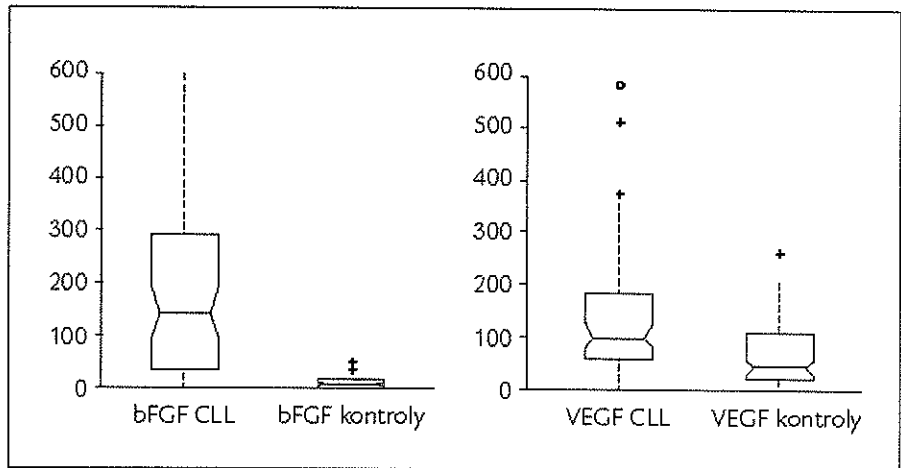
Výsledky

Deskriptivní statistika i výsledky testování rozdílu v koncentracích bFGF a VEGF mezi jednotlivými skupinami a kontrolami jsou uvedeny v tab. 1. Koncentrace obou cytokinů u nemocných s CLL byly signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (bFGF: průměr ± standardní odchylka 177,1 ± 167,3 pg/ml, 95% IC - interval spolehlivosti - průměru 140,9–213,5 pg/ml vs 11,1 ± 11,3 pg/ml, 95% IC 8,6 až 13,6 pg/ml, p < 0,0001; VEGF: 144,2 ± 141,6 pg/ml, 95 % IC 113,4 až 174,9 pg/ml vs 64,2 ± 59,6 pg/ml, 95% IS 51,0–77,5 pg/ml, p < 0,0001), obr. 1. Počet leukocytů v době odběru nekoreloval s koncentracemi angiogenních faktorů (bFGF: r = 0,1; VEGF: r = 0,17), z čehož vyplývá, že hodnoty angiogenních cytokinů nejsou prostým ukazatelem nádorové masy (tab. 2). Z hlediska prognostických faktorů nebyly nalezeny rozdíly v koncentracích bFGF či VEGF u nemocných s nízkým vs středním vs vysokým rizikem dle Raie (což také hovoří proti lineární souvislosti intenzity angiogeneze a nádorové nálože) či u mužů vs u žen

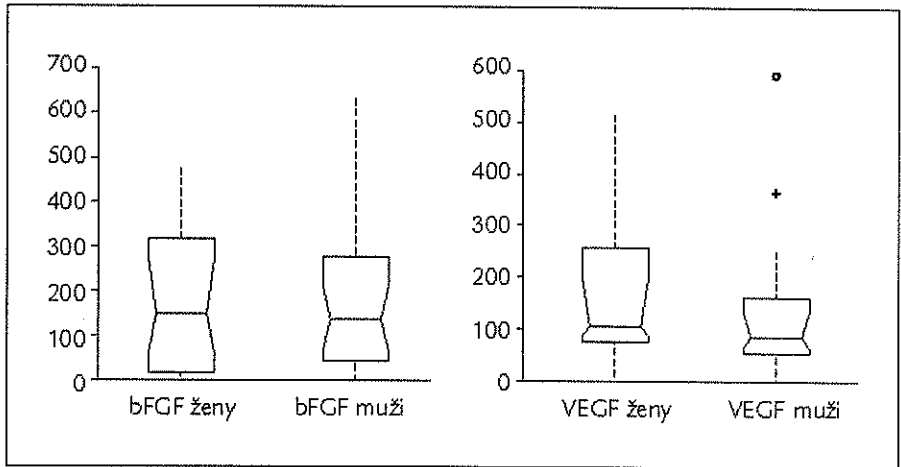
Tab. 2. Koncentrace angiogenních faktorů ani jejich pokles po léčbě nekorelují s hodnotou leukocytů.

skupina	r	p
bFGF, leuko	0,1	0,449
VEGF, leuko	0,17	0,201
bFGF, leuko před léčbou	0,48	0,114
bFGF, leuko po léčbě	0,27	0,403
VEGF, leuko před léčbou	0,5	0,097
VEGF, leuko po léčbě	-0,24	0,455

Leuko – leukocyty, r – Spearmanův korelační koeficient



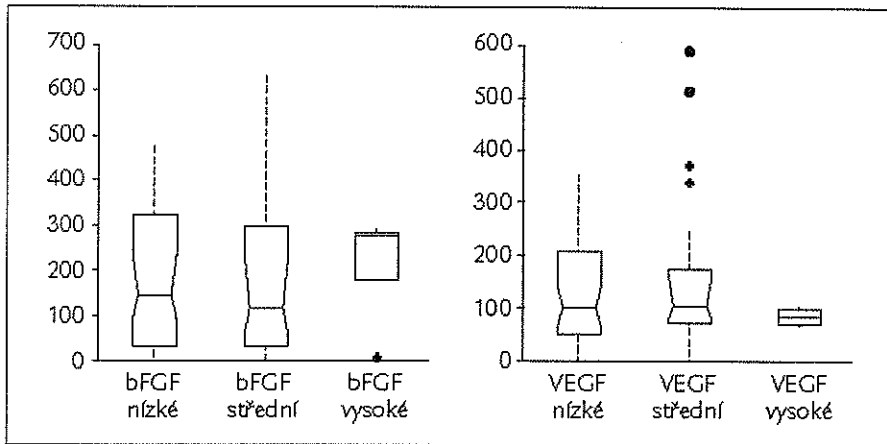
Graf 1. Statisticky významné zvýšení bFGF (a) i VEGF (b) u skupiny nemocných s CLL vs kontrol. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



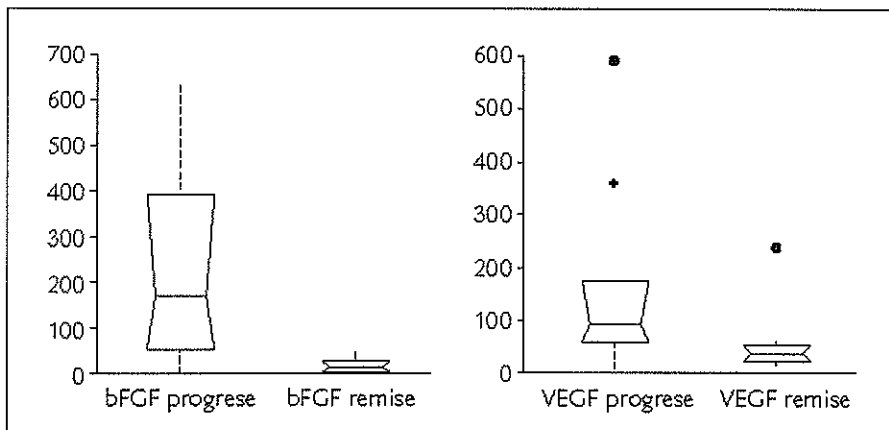
Graf 2. Plazmatické koncentrace bFGF (a) a VEGF (b) se neliší mezi muži a ženami. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

(obr. 2 a 3). U 12 nemocných, kteří podstoupili intenzivní léčbu obsahující fludarabin (režim FCR – fludarabin + cyklofosamid + rituximab, n = 9; protokol FC – fludarabin + cyklofosamid, n = 3) došlo po léčbě ksignifi-

kantnímu poklesu koncentrace bFGF (p = 0,0005) i VEGF (p = 0,0068), aniž by pokles angiogenních cytokinů po léčbě koreloval s počtem leukocytů (obr. 4, tab. 2). Hodnoty bFGF i VEGF u CLL pacientů po léčbě byly



Graf 3. Hodnoty bFGF (a) ani VEGF (b) nejsou závislé na klinickém stadiu dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 4. Statisticky významný pokles koncentrací bFGF (a) i VEGF (b) po intenzivní léčbě založené na fludarabinu. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

již bez statisticky významného rozdílu vůči zdravým kontrolám ($p = 0,524$, resp. $0,728$).

Diskuse

V posledních letech přibývá důkazů o významu angiogeneze u hematologických malignit. Zvýšené koncentrace angiogenních aktivátorů v periferní krvi byly zjištěny u prakticky všech maligních krevních onemocnění [3-9]. První zmínka o angiogenních ukazatelích u chronické lymfocytární leukemie pochází z roku 1995, kdy Duensing et al prokázali zvýšení bFGF v séru u pilotního souboru 18 pacientů s CLL [23]. V pozdějších letech bylo publikováno několik prací zkoumajících cirkulující bFGF i VEGF [5,13,24-29], některé však vykazovaly metodické nedostatky v podobě naprosté absence

či nedostatečného rozsahu kontrolní skupiny [5,23,25,29], ev. zařazení nemocných, kteří před hodnocením angiogeneze již podstoupili cytoredukční léčbu [5,23,25,29]. V naší práci jsou proto zařazení výhradně nemocní s neléčenou CLL a kontrolní skupina 80 zdravých dobrovolníků (největší ze všech publikovaných prací na dané téma) prakticky vylučuje chybu malých čísel. V naší práci jsme v souladu s literaturou zjistili statisticky významné zvýšení klíčových aktivátorů angiogeneze bFGF a VEGF v periferní krvi ve srovnání s kontrolní skupinou. Co se týče prognostického významu ukazatelů angiogeneze, ve 3 studiích byly nalezeny vyšší koncentrace bFGF u pokročilých vs časných stadií [13, 26,28]. Molica et al navíc zjistili souvislost mezi vyšší koncentrací VEGF

a časnější progresí nemocných z časných stadií [13]. Bairey et al publikovali korelaci mezi sérovým bFGF a antiapoptotickým proteinem bcl-2 [25]. V našem souboru jsme neshledali signifikantních rozdílů v bFGF či VEGF mezi nemocnými různých klinických stadií. Jednou z možných příčin je odlišné spektrum pacientů (pouze 5 nemocných v pokročilém stadiu) a také použití odlišného materiálu pro hodnocení angiogenních faktorů (plazma vs sérum). Z technického hlediska je zajímavé, že naprostá většina studií hodnotila angiogenní aktivátory v krevním séru periferní krve [14,24-27], pouze ve 2 pracích byla použita krevní plazma [5,29]. Otázka, zda je vhodnější měřit ukazatele angiogeneze v séru či plazmě, je kontroverzní a dosud nedořešená, nicméně řada prací dokazuje, že zejména v případě VEGF je kvantifikace v séru zatížena chybou způsobenou uvolněním tohoto faktoru z trombocytů při tvorbě krevní sraženiny, z čehož vyplývají vyšší hodnoty v séru ve srovnání s plazmou a pozitivní korelace s počtem trombocytů [30-33]. Z tohoto důvodu považujeme za přesnější stanovení angiogenních faktorů v plazmě.

Naše pilotní data prokázala významné snížení bFGF i VEGF po chemo(imuno)terapii na bázi fludarabinu, na základě čehož vyslovujeme hypotézu, že tato léčba by mohla mít také antiangiogenní účinky. Tuto domněnku nepřímo podporují publikace dokazující antiangiogenní efekt u některých klasických cytostatik [34,35]. V jediné předchozí studii hodnotící vliv léčby na angiogenní faktory u CLL zjistila Gora-Tybor et al signifikantní pokles bFGF a TGF- β (transformujícího růstového faktoru β) u 18 nemocných léčených monoterapií kladribinem [17]. Dosud neexistuje práce hodnotící angiogenní faktory v závislosti na kombinované léčbě obsahující fludarabin, stejně tak nebyla dosud publikována studie hodnotící vývoj koncentrací VEGF po léčbě CLL. V tomto jsou naše výsledky prioritní. Nedostatkem naší

studie je absence srovnání angiogenních faktorů s moderními prognostickými faktory (mutační stav IgVH, genetické aberace vyšetřované pomocí FISH). Souvislost mutačního stavu IgVH a angiogenních aktivátorů jsme již publikovali jako pilotní studii u 46 nemocných [36]. V nynější rozšířené kohortě však nebylo možné z finančních důvodů tato vyšetření provést u starých či polymorbidních nemocných vzhledem k tomu, že velmi drahé stanovení mutačního stavu IgVH či genetických aberací u nich neovlivní volbu terapie.

Závěr

Závěrem shrnujeme, že v naší studii jsme prokázali signifikantní zvýšení zásadních angiogenních cytokinů bFGF a VEGF u skupiny nemocných s dosud neléčenou CLL. Nebyla prokázána souvislost koncentrací těchto faktorů s klinickým stadiem dle Raie, či pohlavím. Agresivní léčba složená z fludarabinu, cyklofosfamidu + rituximabu vedla k významnému snížení koncentrací těchto angiogenních aktivátorů na hodnoty srovnatelné s kontrolní skupinou. Tyto výsledky by tedy mohly ukazovat na antiangiogenní působení této terapie. Delší doba sledování je nutná k posouzení eventuální spojitosti mezi angiogenními ukazateli parametry jako doba dogrese či celkové přežití; rozsáhlejší kohorta nemocných pak k potvrzení pilotních dat týkajících se poklesu angiogenních faktorů po léčbě. Další výzkum angiogeneze u CLL je cenný nejen z prognostického, ale také léčebného hlediska, neboť v současné době jsou již k dispozici nadějná data z klinických studií využívajících antiangiogenní léky, jako je thalidomid či lenalidomid [37,38].

Tato práce byla podpořena grantem NR/8373-3 IGA MZ ČR.

Literatura

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.

2. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763

3. Pour L, Hájek R, Büchler T et al. Angiogeneze a antiangiogenní léčba u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50(12): 930-938.

4. Smolej L, Benešová P. Význam angiogeneze u maligních nádorů. *Acta Medica (Hradec Králové) Suppl* 2005; 48: 69-72.

5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-2245.

6. Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt H et al. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 227-244.

7. Rajkumar SV, Witzig TE. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 351-362.

8. 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.

9. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821.

10. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103: 1202-1210.

11. Papajik T, Jarošová M, Pikalová Z et al. Chronická B-lymfocytární leukemie. Část II: Diagnostická kritéria a význam stanovení individuální prognózy nemocného. *Trans Hematol* 2006; 12: 132-139.

12. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and antiangiogenic molecules. *Leukemia* 2002; 16: 911-919.

13. Molica S, Vitelli G, Levato D et al. Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 2002; 86: 31-35.

14. Menzel T, Rahman Z, Calleja E et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia

and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996; 87: 1056-1063.

15. Konig A, Menzel T, Lynen S et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997; 11: 258-265.

16. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 795-799.

17. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Cladribine decreases the level of angiogenic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2002; 49: 145-148.

18. Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 200; 314: 157-166.

19. Šimíčková M, Dubská L, Kocáková I et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie se zaměřením na cirkulující vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF). *Klin Onkol* 2006; 19: 212-216.

20. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391-400.

21. Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-4997.

22. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR (eds). *Chronic Lymphocytic Leukemia. Recent Progress and Future Direction*. New York (NY): AR Liss 1987: 253.

23. Duensing S, Atzpodien J. Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 1978-1980.

24. Molica S, Vitelli G, Levato D et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 107: 605-610.

25. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M et al. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia.

mia. *Br J Haematol* 2001; 113: 400–406.

26. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 167–171.

27. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 41–46.

28. Wolowiec D, Dybko J, Wrobel 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; 3: 1–6.

29. Krejci P, Dvorakova D, Krahulcova E. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 228–237.

30. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 343–350.

31. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 395–404.

32. George ML, Eccles SA, Tutton MG et al. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3147–3152.

33. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956–964.

34. Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood* 1999; 94: 4143–4155.

35. Kerbel KS, Vioria-Petit A, Klement G et al. „Accidental“ anti-angiogenic drugs: anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemo-

therapeutic agents as examples. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1248–1257.

36. Smolej L, Andrys C, Pekova S et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 1432–1433.

37. Chanan-Khan A, Miller KC, Takeshita K et al. Results of a phase 1 clinical trial of thalidomide in combination with fludarabine as initial therapy for patients with treatment-requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2005; 106: 3348–3352.

38. Chanan-Khan A. Targeting the microenvironment: a new treatment paradigm for chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica Reports* 2006; 2: 22–27.

MUDr. Lukáš Smolej

www.fnhk.cz

e-mail: smolej@seznam.cz

Doručeno do redakce: 18. 5. 2007

Přijato po recenzi: 17. 7. 2007

www.geriatrickarevue.cz

Commentary

Modern prognostic factors and angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia: More data needed

Lukas Smolej^{a,*}, Ctirad Andrys^b, Vladimira Vroblova^b

^a 2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove, Czech Republic

^b Institute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove, Czech Republic

Received 18 May 2007; received in revised form 18 May 2007; accepted 19 May 2007
Available online 6 July 2007

Abstract

Angiogenesis appears to be an important player in biology of chronic lymphocytic leukemia (CLL). We present here data on association of ZAP-70 expression measured by flow cytometry and plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in 27 untreated CLL patients. We found significantly higher VEGF (but not bFGF) in ZAP-negative patients. Likewise, there was a negative correlation between percentage of ZAP-70 expression and VEGF. Larger, prospective studies are needed to confirm our pilot data.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: CLL; Angiogenesis; ZAP-70; bFGF; VEGF; Prognostic factors

Molica et al. [1] recently published their data on angiogenic markers and their relationship to prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Because the authors state that “reports addressing the relationship between angiogenic phenotype of CLL and new biological parameters of prognostic relevance such as IgV_H gene mutational status and expression of ZAP-70 are absent”, we would like to draw their and readers’ attention to study by Shanafelt published in abstract form [2] and to our results [3]. While we found significantly higher *plasma* levels of bFGF (but not VEGF) in IgV_H-mutated patients, Shanafelt’s study failed to show association of IgV_H mutational status or CD38 expression with *serum*, cellular or secreted levels of VEGF, bFGF or thrombospondin-1 in a large patient cohort. Results reported by Molica et al. show that serum VEGF (but not bFGF or microvessel density) correlated with IgV_H muta-

tional status, CD38 and ZAP-70 expression in 23 CLL patients. In our own series we compared ZAP-70 expression with plasma levels of bFGF and VEGF in 27 untreated CLL patients (18 males, 9 females, median age 64 years [range, 31–83], Rai stage 0/III in 14/10/3 patients). ZAP-70 was quantified using phycoerythrin-conjugated antibody (clone 1E7.2, Caltag Laboratories, Burlingame, CA), isotype control for positivity threshold and 20% positivity cut-off. Plasma bFGF and VEGF were measured using commercial ELISA Quantikine kits (R&D Systems, MN, USA). Ten patients were ZAP-70 positive and 17 ZAP-negative. Interestingly, we found significantly higher VEGF in ZAP-negative versus positive patients ($p = 0.018$, Mann-Whitney test); ZAP-negative patients had also higher bFGF levels but the difference did not reach statistical significance ($p = 0.088$, Mann-Whitney test). Similarly, we found a significantly *negative* correlation between plasma VEGF and ZAP-70 expression as a continuous variable ($r = -0.53$, $p = 0.0049$, Spearman correlation) while relationship between bFGF and

* Corresponding author.

E-mail address: smolej@seznam.cz (L. Smolej).

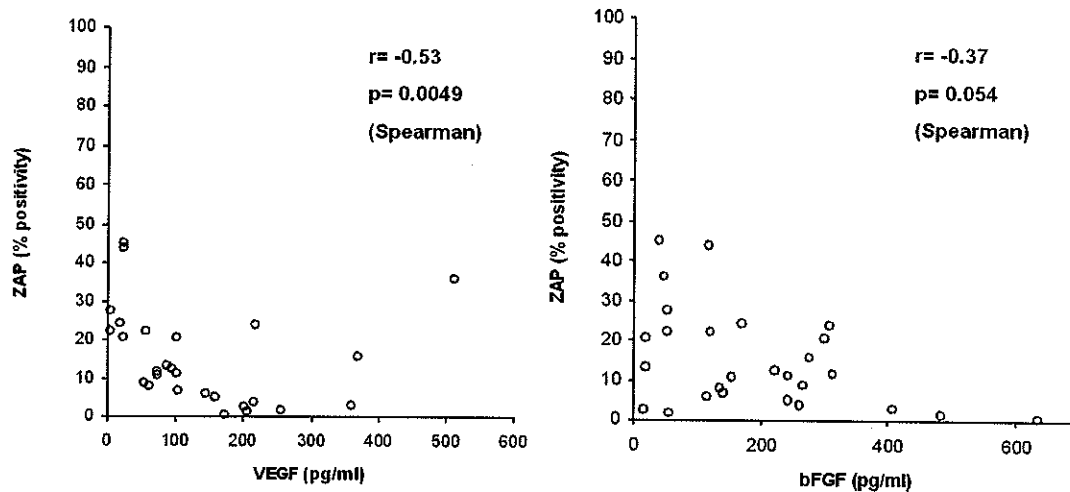


Fig. 1. Correlation between angiogenic cytokines and ZAP-70 expression in CLL patients ($n = 27$).

ZAP-70 was of borderline significance ($r = -0.37$, $p = 0.054$, Spearman correlation Fig. 1). There are two main reasons for these conflicting results. First (and perhaps most importantly), both studies dealt with limited number of patients, and selection bias is likely to be significant; therefore, both studies strongly need confirmation in a larger series. Secondly, the results are not directly comparable due to different material used (serum versus EDTA plasma) and different method for ZAP-70 quantification (FITC-conjugated antibody clone 2F3.2 versus PE-conjugated 1E7.2 antibody) which is a well-known problem precluding standardization. Taken together, these results point out the need for large prospective studies using comparable methods in order to further elucidate the significance of angiogenesis in CLL.

Conflicts of interest

The authors state no relevant conflict of interest.

Acknowledgment

This work was supported in part by grant from Internal Grant Agency, Ministry of Health, Czech Republic (No. NR/8373-3).

References

- [1] Molica S, Cutrona G, Vitelli G, et al. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*; 2007, ePub May 7.
- [2] Shanafelt TD, Geyer S, Bone N, et al. Evaluation of the prognostic implications of pro- and anti-angiogenic cytokines in 311 patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106(11) [abstract 712].
- [3] Smolej L, Andrys C, Pekova S, et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91(10):1432–3.

Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií.

L.Smolej¹, C.Andrýs², D.Belada¹, M.Hrudková¹, J.Krejsek², J.Malý¹

II. interní klinika, oddělení klinické hematologie¹ a Ústav klinické imunologie a alergologie², Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Souhrn

Angiogeneze je v posledních letech intenzivně studována u celého spektra hematologických malignit. Endoglin (CD105) je součástí komplexu receptorů pro transformující růstový faktor beta (TGF-beta) a je nepostradatelný pro novotvorbu cév. Cirkulující solubilní forma endoglinu (sCD105) byla zjištěna ve zvýšených koncentracích v krvi u nemocných se solidními nádory a některými hematologickými malignitami. V naší studii jsme měřili sCD105 ELISA metodou v plazmě periferní krve u 79 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a 69 zdravých dobrovolníků. Zjistili jsme signifikantně zvýšené koncentrace sCD105 u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou (průměr ± standardní odchylka: $6,8 \pm 2,1$ vs. $4,6 \pm 1,5$ ng/ml, 95% interval spolehlivosti průměru $6,4-7,3$ vs. $4,2-4,9$ ng/ml, $p < 0,0001$). Nemocní s progresivní chorobou měli významně vyšší koncentrace sCD105 v porovnání s pacienty s indolentním průběhem ($p = 0,0016$). Byly prokázány významné rozdíly v koncentracích sCD105 v souvislosti s klinickým stádiem dle Raie ve smyslu vzestupu endoglinu od časných přes intermediární k pokročilým stádiím ($p = 0,009$ a $p = 0,04$). Přežití do progresu bylo významně kratší u nemocných s CLL, kteří měli hodnotu sCD105 vyšší než průměr (medián 15 měs. vs. nedosažen, $p = 0,0045$). Naše výsledky naznačují, že endoglin by mohl hrát významnou roli v patogenezi a progresi CLL a jeho hodnocení by mohlo přispět ke zlepšení poznání angiogenních procesů u CLL a individuální prognostické stratifikaci. Klíčová slova: endoglin; CD105; angiogeneze; CLL; prognóza

Plasma levels of soluble endoglin have prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Summary

Angiogenesis has been recently extensively studied in a wide spectrum of hematological malignancies. Endoglin (CD105), member of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor family, modulates cellular responses to TGF-beta and is essential for angiogenic processes. Elevated circulating levels of soluble endoglin (sCD105) have been reported in patients with various solid tumors and several hematological malignancies. In the present study, we measured peripheral blood plasma concentrations of sCD105 using enzyme-linked immunosorbent assay in 79 patients with chronic lymphocytic leukemia and 69 healthy donors. We found a statistically significant increase in sCD105 concentrations in patients with CLL compared to controls (mean \pm standard deviation: 6.8 ± 2.1 vs. 4.6 ± 1.5 ng/ml, 95% confidence interval of mean: 6.4-7.3 vs. 4.2-4.9 ng/ml, $p < 0.0001$). Patients with progressive CLL had higher sCD105 than patients with indolent disease ($p = 0.0016$). Soluble endoglin increased significantly with Rai stage (Rai 0 vs. I-II vs. III-IV, $p = 0.009$ and $p = 0.04$). Progression-free survival was significantly shorter in patients with sCD105 levels above mean (median 15 months vs. not reached, $p = 0.0045$). In conclusion, our data suggest that endoglin may play a significant role in CLL biology and progression; its quantification could contribute to better understanding of angiogenic processes and refine prognostication of individual patients in this disease. Keywords: endoglin; CD105; angiogenesis; CLL; prognosis

Úvod

Angiogeneze, tedy tvorba nových cév z již existující vaskulatury, je zcela nepostradatelným procesem při rozvoji zhoubných nádorů (1-3). Zvýšená neovaskularizace byla také v od poloviny 90 let 20. století zjištěna u řady hematologických malignit (2-7). Některé práce našly souvislost mezi zvýšenými ukazateli angiogeneze a nepříznivým klinickým průběhem (6-7). Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělých v západním světě; typickým rysem je mimořádná různorodost prognózy s přežitím od několika měsíců po desítky let (8). Proto jsou v současné době hledány prognostické faktory, které by bylo možno použít ke zpřesnění individuální prognózy nemocných s CLL (8,9). Také u tohoto onemocnění byly zjištěny zvýšené hladiny cirkulujících angiogenních cytokinů či neovaskularizace v kostní dřeni (5,7,10). Endoglin (CD105) je homodimerický transmembránový glykoprotein, tvořící součást receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta (TGF-beta) (11-12). CD105 ovlivňuje buněčné

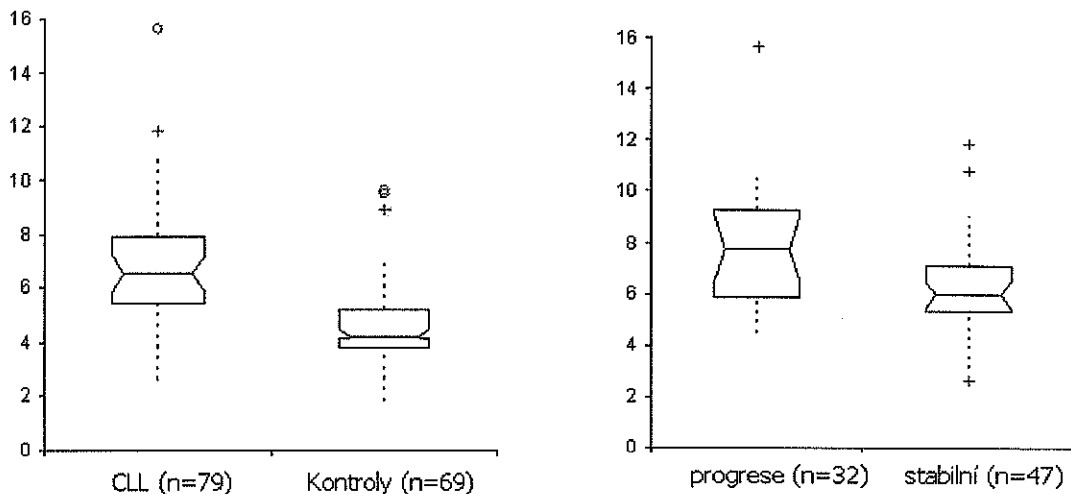
odpovědi na TGF-beta, čímž se účastní na vývoji a remodelaci cév, zejména jako induktor proliferace endotelií. Tím je dána jeho nepostradatelná role v angiogenních pochodech (12-15). Endoglin může být uvolněn v solubilní formě (sCD105) do krevního oběhu; zvýšené koncentrace byly zjištěny u nemocných se solidními tumory, u myeloidních malignit a akutní lymfoblastické leukémie (16-22). V naší pilotní studii jsme zjistili zvýšené koncentrace sCD105 u lymfoidních malignit (23). Cílem nynější práce bylo zjištění prognostického významu sCD105 u CLL.

Nemocní a metody

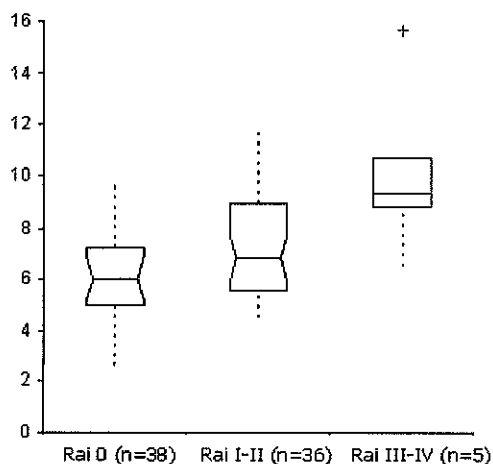
V naší práci jsme stanovili plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u 79 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. V souboru bylo zastoupeno 29 žen a 50 mužů s průměrným věkem 63 let (rozmezí 31-88). Kontrolní skupinu tvořilo 69 zdravých dobrovolníků. Diagnóza CLL byla stanovena dle kritérií National Cancer Institute-Sponsored Working Group z roku 1996 (24). Kohorta nemocných s CLL byla dále rozdělena na podskupiny dle prognostických faktorů: pohlaví, klinický průběh (stabilní vs. progresivní), klinické stádium dle Raije (0 vs. I-II vs. III-IV). Data týkající se přežití bez progresu byla dostupná u 64 nemocných. Veškeré patientské vzorky byly získány od neléčených nemocných. Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) byla použita jako antikoagulans. Všechny vzorky plazmy byly po centrifugaci zamraženy při teplotě -80°C až do měření. Solubilní endoglin byl stanoven pomocí komerčně dostupného ELISA kitu (Human Endoglin Quantikine ELISA kit, R & D Systems, MN, USA) Měření bylo provedeno podle standardní metodiky doporučené výrobcem. Citlivost metody je 0,007 ng/ml. Studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace, schválena etickou komisí a nemocní podepsali informovaný souhlas. Statistická analýza byla provedena pomocí software Analyse-it (Analyse-it Software Ltd., Velká Británie) a MedCalc (Mariakerke, Belgie). Všechna data byla testována na normalitu Shapiro-Wilkovým testem. Pokud bylo rozdělení dat normální, byl k testování rozdílů koncentrací vůči kontrolní skupině užit parametrický t-test, jinak byl použit neparametrický Mann-Whitneyův U test. Křivky přežití bez progresu byly konstruovány dle Kaplan-Meierovy metody, ke stanovení rozdílu v přežití byl použit log-rank test. Období do progresu bylo definováno jako časový interval mezi datem odběru krve na hladinu sCD105 a progresí, a to vzhledem k tomu, že u některých nemocných byl vzorek krve získán po více než 6 měsících od diagnózy CLL. p-hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za statisticky signifikantní.

Výsledky

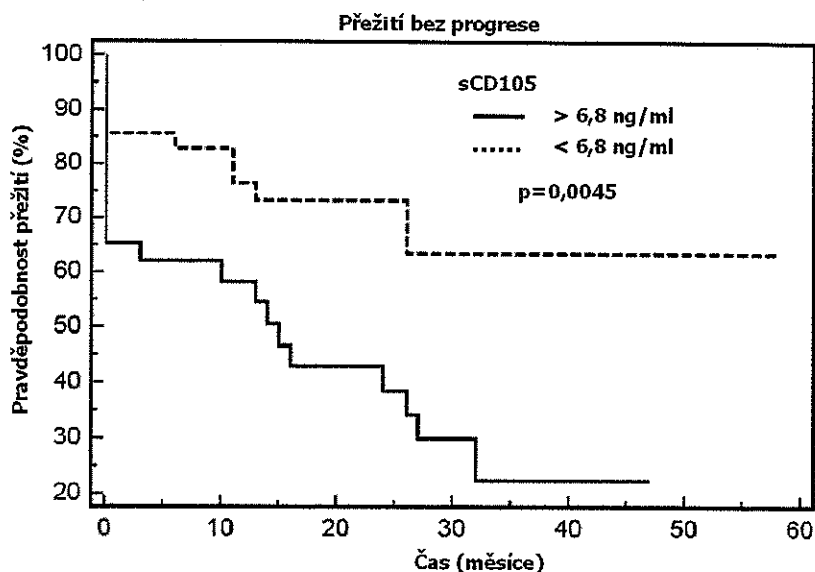
Solubilní endoglin byl detekovatelný ve všech vzorcích. Koncentrace u nemocných s CLL byly signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině ($p < 0,0001$, Obr.1a). Nemocní s progresivní chorobou měli vyšší koncentrace sCD105 v porovnání s pacienty bez progresie ($p = 0,0016$, Obr.1b). Dále byly zjištěny významné rozdíly v koncentracích sCD105 v souvislosti s klinickým stádiem dle Raie ve smyslu vzestupu endoglinu od časných přes intermediární k pokročilým stádiím ($p = 0,009$ a $p = 0,02$, Obr.1c). Nebyl významný rozdíl v koncentracích sCD105 mezi muži a ženami ($p = 0,422$). Přežití bez progresie bylo významně kratší u nemocných s CLL, kteří měli hodnotu sCD105 vyšší než aritmetický průměr (medián 15 měs. vs. nedosažen, $p = 0,0045$, Obr.2). Deskriptivní statistika i výsledky testování rozdílů v koncentracích sCD105 mezi jednotlivými podskupinami jsou uvedeny v tab.1.



Obr.1 a,b. Krabičkové grafy koncentrací sCD105. a – CLL vs. kontroly; b – progresivní vs. stabilní choroba.



Obr.2. Krabičkový graf koncentrací sCD105 v závislosti na klinických stádiích: Rai 0 vs. I-II vs. III-IV. Všechny hodnoty jsou v ng/ml.



Obr. 2. Přežití bez progresu je významně kratší u nemocných s CLL a koncentracemi sCD105 vyššími než aritmetický průměr.

sCD105	n	medián	průměr	SD	95% IS průměru	p
CLL	79	6,5	6,8	2,1	6,4-7,4	<0,0001
kontroly	69	4,2	4,6	1,5	4,3-4,9	
muži	50	6,6	7,0	2,2	6,4-7,6	0,42
ženy	29	6,2	6,6	2,1	5,8-7,4	
progresivní choroba	32	7,7	7,8	2,3	6,9-8,6	0,002
stabilní choroba	47	6,0	6,2	1,7	5,7-6,7	
Rai 0	38	6,0	6,1	1,6	5,5-7,9	0,009
Rai I-II	36	6,9	7,2	1,9	6,6-7,9	
Rai III-IV	5	9,3	10,2	3,4	6,0-14,4	0,04

Tab. 1 sCD105 – deskriptivní statistika. Zkratky: CLL - chronická lymfocytární leukémie; SD – standardní odchylka (standard deviation); IS, interval spolehlivosti. Všechny koncentrace jsou uvedeny v ng/ml.

Diskuze

V posledních letech přibývá důkazů o významu angiogeneze u CLL. V naší práci jsme se zaměřili na solubilní endoglin, který se účastní angiogenních procesů prostřednictvím signální cesty TGF-beta, ovlivňováním buněčných odpovědí na tento cytokin. Existuje několik publikací vyzdvihující prognostický význam solubilního endoglinu u solidních nádorů (16-20), avšak pouze dvě práce z oblasti hematologických malignit (20-21). Jedinou předchozí prací na téma solubilního endoglinu u CLL je naše předchozí pilotní

studie, kdy byly zjištěny zvýšené plazmatické koncentrace v porovnání s kontrolami (23). V této studii jsme pilotní data potvrdili, navíc jsme zjistili možný prognostický význam sCD105, a to nejen z hlediska souvislosti s klinickým stádiem (vzestup ve směru Rai 0 vs. I-II vs. III-IV), ale také klinickým průběhem (vyšší sCD105 u progresivního onemocnění, kratší období bez progresu u hodnot vyšších než průměr). Ke stanovení souvislosti sCD105 s moderními prognostickými ukazateli (mutační stav IgVH, genetické aberace, exprese ZAP-70) nebylo k dispozici dostatek dat. Zhodnocení případného prediktivního významu sCD105 pro celkové přežití nebylo možné v námi studovaném souboru provést vzhledem k malému počtu úmrtí. Bude též zapotřebí delšího sledování a zvýšení rozsahu vyšetřované skupiny CLL pacientů k potvrzení těchto dat. Naše práce nicméně ukazuje, že endoglin by mohl hrát významnou úlohu v patogenezi CLL a stanovení jeho solubilní formy v plazmě periferní krve by mohlo napomoci k dalšímu poznání komplexní problematiky angiogeneze u tohoto onemocnění a eventuálně i zpřesnění prognostické stratifikace u jednotlivého pacienta.

Literatura

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
2. Rajkumar SV, Mesa RA, Tefferi A. A review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematological malignancies. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 11: 33-47.
3. Pour L, Hájek R, Büchler T, Maisnar V, Smolej L: Angiogeneze a antiangiogenní léčba u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 12:930-8.
4. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95:309.
5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M: Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96:2240-5
6. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR: Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3111–3116
7. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, Vitelli G, Tucci L, Roccaro AM, Dammacco F: Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:3344-51

8. Smolej L, Žák P, Belada D, Malý J. Diagnostika a léčba chronické lymfocytární leukemie. *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové* 2007;52(1):23–34
9. Papajík T, Jarošová M, Pikalová Z, Indrák K. Chronická B-lymfocytární leukemie Část II: Diagnostická kritéria a význam stanovení individuální prognózy nemocného. *Trans Hemat dnes* 2006; 3: 132-9
10. Kašparová P, Smolej L. Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. *Čes-slov Patol* 2007;43(2):50-58
11. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992; 267(27):19027-30.
12. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-92
13. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* 2003; 22:6557-63
14. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG: Endoglin, an ancillary TGF-beta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 2000; 217: 42–53
15. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, Dijke Pt P: Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004;1-11
16. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R, Adamkiewicz J: Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 1999; 81:568-72
17. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S: Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000; 89:122-6
18. Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N, Kumar S: Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 88:1424-31

19. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK: Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001; 7:524-32.
20. Yagmur E, Rizk M, Stanzel S, Hellerbrand C, Lammert F, Trautwein C, Wasmuth HE, Gressner AM. Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(9):755-61.
21. Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C, Maio M: Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 2003; 194:171-5
22. Catchpole D, Lail A, Guo D, Chen QR, Khan J. Gene expression profiles that segregate patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia: An independent validation study identifies that endoglin associates with patient outcome. *Leuk Res.* 2007;31(12):1741-7.
23. Smolej L., Andrýs C., Belada D., Maisnar V., Žák P., Široký O., Malý J.: Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u nemocných s lymfoidními malignitami. *Trans Hemat dnes* 2006;12(1):37–39.
24. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay NE, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87:4990-7.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem IGA NR/8373 – 3 a výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Plasma Endostatin Levels in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: Relationship to Prognostic Factors.

Lukas Smolej¹, Ctirad Andrys², Sona Pekova³, Lenka Kucerova⁴

1 - Department of Clinical Hematology, 2nd Department of Internal Medicine, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove, Czech Republic

2 – Institute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove, Czech Republic

3 - Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology, Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic

4 - Department of Medical Genetics, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove, Czech Republic

Abstract

Background: Angiogenesis is considered a possible prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL). While there are numerous reports on angiogenic activators in CLL, little is known about clinical significance of angiogenic inhibitors in this disease. The present study evaluated plasma levels of endostatin, a naturally-occurring antiangiogenic cytokine, and its possible relationship to prognostic factors in CLL. **Methods:** Endostatin was quantified using commercially available sandwich ELISA in peripheral blood plasma of 62 patients with never-treated CLL and 34 healthy age-matched controls. In ten patients, endostatin levels were measured before and after intensive fludarabine-based therapy. **Results:** Endostatin was significantly elevated in CLL patients over controls ($p=0.0494$). However, endostatin levels did not differ in patients with Rai low vs. intermediate vs. high risk. Similarly, there was no difference in endostatin between males vs. females ($p=0.686$), patients with stable vs. progressive disease ($p=0.173$), unfavourable cytogenetics (del 11q, del 17p and/or trisomy 12) vs. favourable aberrations (no abnormality or del 13q) ($p=0.133$), or IgVH-mutated vs. unmutated patients ($p=0.249$). In ten patients treated with intensive fludarabine-based regimens, there was no significant change in endostatin levels ($p=0.131$). Patients with endostatin values above the 95% confidence interval of mean of normal controls had shorter progression-free survival (30 vs. 101 months); however, the difference was not significant

($p=0,301$). Conclusions: In the present study, plasma endostatin was elevated in CLL; however, no association with classical or novel prognostic factors was detected so far. There was a trend towards shorter PFS in patients with high endostatin levels. Plasma endostatin might be useful as a part of complex assessment of angiogenesis in CLL. Further studies with larger cohorts and longer follow-up are warranted to elucidate its role as a prognostic factor in this disease.

Keywords: CLL; angiogenesis; endostatin; treatment; prognosis

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignant lymphoproliferative disorder with a characteristic feature of extraordinary heterogeneity in overall survival (1). Because aggressive form of the disease and resulting inferior clinical outcome cannot be accurately predicted using the traditional clinical staging systems, novel prognostic factors are being sought in order to identify high-risk patients at the time of diagnosis and to optimize their treatment (2). Angiogenesis, i.e. development of new vessels from pre-existing vascular network, has been studied as a new potential prognostic factor in CLL since mid 1990s. Several studies have shown that CLL has increased vascularity in bone marrow (reviewed in 3). In addition, angiogenic activators such as vascular endothelial growth factor (VEGF) or basic fibroblast growth factor (bFGF) were reported to be produced by CLL cells (4) and their plasma/serum levels to be elevated in CLL patients (5-8). On the other hand, knowledge regarding angiogenic inhibitors in CLL is rather limited. Endostatin is a naturally-occurring 20 kDa cleavage C-terminal fragment of collagen XVIII with potent antiangiogenic and anticancer properties such as inhibition endothelial cell proliferation *in vitro*, and more importantly, inhibition of endothelial cell migration, vascular morphogenesis, recruitment of perivascular cells and growth inhibition of primary and metastatic tumors *in vivo* (9-12). There are several reports on circulating levels of endostatin in solid tumors (12-16) and hematological malignancies (17-21). To the best of our knowledge, however, there have been only two studies published on circulating endostatin in CLL (22-23); furthermore, no data is available on possible association of endostatin with powerful prognostic markers such as mutation status of variable region of immunoglobulin heavy chain (IgVH) or genetic aberrations. The objective of the present study was therefore to evaluate potential significance of circulating plasma endostatin in relationship to these prognostic factors in CLL.

Methods

Patients

The study included 62 patients with untreated CLL diagnosed according to NCI-WG criteria (43 males, 19 females, median age 65 years, range, 31-83 years). Control group consisted of 34 age-matched healthy blood donors. Low/intermediate/high clinical risk according to Rai modified staging was present in 23/33/6 patients; twenty-nine subjects had progressive disease while 32 were clinically stable without the need for therapeutic intervention. Ten patients were treated for disease progression by FC (fludarabine, cyclophosphamide) or FCR (fludarabine, cyclophosphamide, rituximab) regimens. Serial endostatin measurements were performed before initiation of therapy and at the time of remission in these patients. All treated patients achieved at least in partial remission. The study was conducted according to Helsinki Declaration, approved by local ethics committee and study participants signed a written informed consent.

Measurement of circulating endostatin, determination of IgVH mutation status and genetic abnormalities

To measure the levels of endostatin in peripheral blood, we used ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) plasma from peripheral venous blood stored at -70°C until the time of analysis. Measurement was done using sandwich ELISA kit (Human Endostatin Quantikine[®] Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to instructions supplied by the manufacturer. Endostatin concentrations are reported in ng/ml. Sensitivity of the assay is 0.023 ng/ml. The inter-assay coefficients of variation (CV) reported by the manufacturer vary from 5.7 to 7.9 %. IgV_H mutation status was determined as described in detail elsewhere (24). Genetic abnormalities were detected by fluorescent in situ hybridization (FISH) using commercially available Vysis probes and kits for del 13q, del 11q, del 17p, and trisomy 12 (Abbott, Chicago, IL, USA). Data on IgVH mutation status and FISH were available in 52 and 51 patients, respectively. Mutated IgVH genes were present in 26/52 patients; 32 patients had favourable (no abnormality or del 13q) and 19 unfavourable genetic abnormalities (i.e., del 11q, del 17p and/or trisomy 12).

Statistical analysis

Software Analyse-It (Analyse-It Software Ltd., Leeds, UK) and MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) were used for statistical analysis. Shapiro-Wilk normality test showed non-normal distribution in all analyzed cohorts; therefore, non-parametrical Mann-Whitney U test was used to compare differences between groups and Wilcoxon signed-rank test to compare endostatin levels before and after treatment. Survival curves were constructed according to Kaplan-Meier and log-rank test was utilized for progression-free survival analysis (data available in 59 patients). All p-values reported are two-sided; values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Plasma endostatin concentrations were significantly elevated in the entire CLL cohort when compared to controls (mean \pm SD [standard deviation], 187.7 ± 72.4 ng/ml, 95% CI [confidence interval] of mean, 206.7-249.4 ng/ml vs 153.8 ± 47.4 ng/ml, 95%CI, 137.3-170.4 ng/ml, $p=0.0494$) (Fig.1). A total of 30/62 patients (48 %) had endostatin values within or below 95% CI of mean for healthy controls while 32/62 (52 %) had elevated levels. However, endostatin levels did not differ in patients with Rai low vs. intermediate vs. high risk, patients with stable vs. progressive disease ($p=0.414$ and 0.186 , respectively) or males vs. females ($p=0.686$). Similarly, there was no difference in subgroups with unfavourable cytogenetics (del 11q, del 17p and/or trisomy 12) vs. favourable aberrations (no abnormality or del 13q) ($p=0.133$), or IgVH-mutated vs. unmutated patients ($p=0.249$) (Fig.2-3). Regarding progression-free survival (PFS), patients with endostatin levels above the 95 % confidence interval of mean for controls (170.4 ng/ml) had shorter PFS than those with values below this threshold (median PFS 33 vs. 101 months); however, this difference was not statistically significant ($p=0.301$). Statistical results are summarized in Table 1.

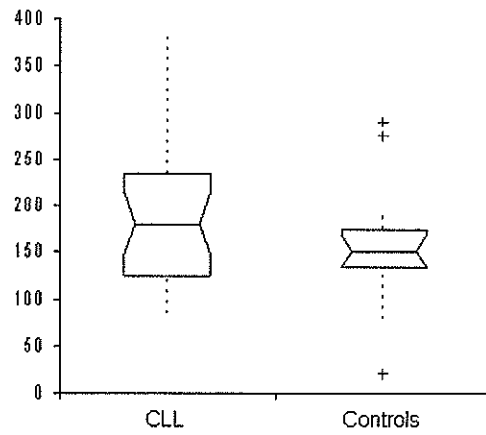


Fig. 1: Significantly higher endostatin in CLL patients compared to controls.

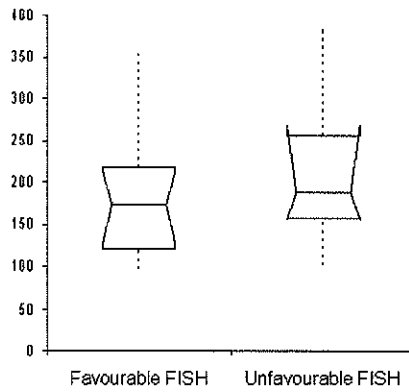


Fig. 2: No significant differences in endostatin values according to FISH aberrations.

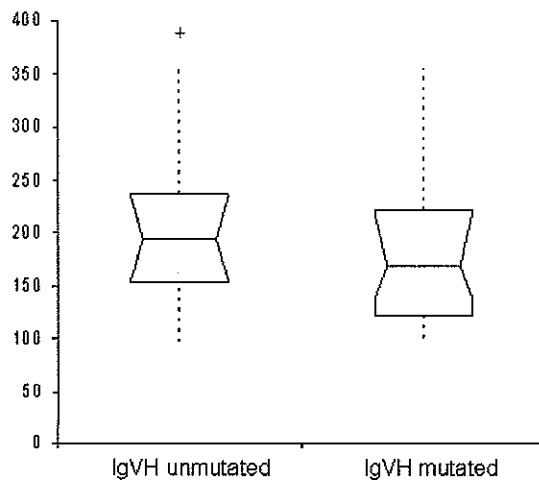


Fig. 3: No significant association of endostatin with IgVH mutation status.

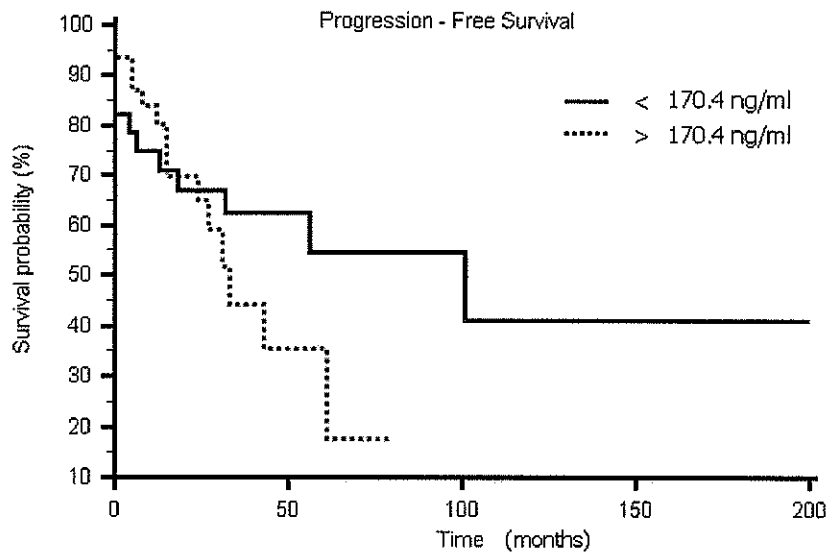


Fig. 4: Progression-free survival is not significantly different between CLL patients with high vs. normal endostatin levels (median PFS, 33 vs. 101 months, $p=0.301$).

Group	n	Mean	Median	SD	95% CI of Mean	p-value
CLL	62	187.7	180.3	72.4	169.4-206.1	0.0494
Controls	34	153.8	150.4	47.4	137.3-170.4	
Males	43	191.5	185.6	77.2	167.7-215.2	0.686
Females	19	179.3	176.3	61.1	149.9-208.8	
Rai Low Risk	23	175.5	158.8	70.7	144.9-206.0	0.414
Rai Intermediate Risk	33	188.4	169.2	70.8	163.3-213.5	
Rai High Risk	6	231.0	205.7	82.5	144.4-317.7	0.186
Stable Disease	33	178.2	155.1	77.8	150.6-205.8	
Progressive Disease	29	198.6	185.6	65.2	173.8-223.4	0.173
Mutated IgVH	26	180.0	168.4	64.9	153.8-206.2	
Unmutated IgVH	26	205.6	194.0	76.2	174.8-236.3	0.249
Favourable FISH	32	179.5	172.8	66.3	155.6-203.4	
Unfavourable FISH	19	213.5	187.4	77.3	176.2-250.8	0.134
Before treatment	10	203.7	189.8	59.6	161.1-246.3	
After treatment	10	226.3	200.8	71.3	175.3-277.3	0.131

Table 2: Summary of statistical results. SD, standard deviation; CI, confidence interval. Endostatin concentrations are reported in ng/ml.

Discussion

Endostatin is one of potent natural inhibitors of angiogenesis. The mechanism of angiogenesis suppression includes inhibition of endothelial cell proliferation *in vitro*, and more importantly, inhibition of endothelial cell migration, vascular morphogenesis and recruitment of perivascular cells *in vivo* (9-12). Elevated levels of endostatin were found in head and neck cancer, colorectal carcinoma, renal tumors, soft tissue sarcomas, and hepatic tumors (12-16). Regarding hematological malignancies, increased endostatin was identified in acute myelogenous leukemia, Non-Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma (17-21). Prognostic significance of circulating endostatin in terms of inferior progression-free or overall survival has been identified in some of these studies (15, 20). The importance of endostatin also lies in its possible future use as an antiangiogenic agent as it inhibits 65 different tumor types and modifies 12% of the human genome to downregulate pathological angiogenesis without severe side-effects; clinical studies using endostatin in various malignancies are currently running (22).

In the current study, peripheral blood plasma endostatin was significantly increased in CLL patients when compared to healthy controls. On the other hand, there was no difference in endostatin levels when we subdivided the CLL cohort according to known prognostic factors (gender, clinical course, Rai stage, IgVH mutation status, and genetic abnormalities). In a pilot group treated with intensive fludarabine-based combination regimens, there was no change of endostatin after therapy. Gora-Tybor et al. did not find significant difference between serum endostatin in 80 untreated CLL patients and 27 controls. On the other hand, endostatin levels were lower in patients with Rai stage III/IV vs. 0-II and in patients with progressive vs. indolent disease; endostatin correlated significantly with lymphocyte count (23). Wolowiec et al measured serum endostatin in 52 patients with previously untreated CLL patients and 12 controls (24) and did not detect significant differences in endostatin levels between CLL group and controls or patients with stable vs. progressive disease. In addition, lower endostatin were associated (on the limit of significance) with longer PFS. The differences between our results and previously published studies may be caused by several factors. Firstly, there are some potential technical differences. The ELISA kit used in the current study is made by a different manufacturer. Secondly, we used EDTA plasma while the other groups utilized serum for endostatin quantification. Our reason for using plasma for the determination of angiogenic cytokines is the potential danger of distorted results due to release of various factors such as VEGF during clot formation resulting in falsely higher

concentrations (26-28). Indeed, it has been also reported that endostatin is contained within platelets and increases after platelet stimulation by thrombin. (29-30). Thirdly, the patient cohorts were not directly comparable (e.g., only Rai 0-II stage patients enrolled in Wolowiec's study, only six patients in advanced stages in our CLL group). We hypothesize that significantly elevated endostatin levels might mirror increased proteolysis of collagen XVIII due to larger tumour burden. It remains to be seen whether lack of impact of plasma endostatin on progression-free survival is caused simply by limited number of patients and relatively short follow-up. In conclusion, our preliminary results suggests that endostatin is aberrantly expressed in CLL and its quantification might add to complex assessment of angiogenesis in this disease. Larger studies are needed to confirm our pilot results and further elucidate role of endostatin as a prognostic factor in this disease, especially with regard to established prognostic markers.

Acknowledgements: Grant NR/8373-3 and research project MZO 00179906 from Ministry of Health, Czech Republic

References

1. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005;90:391-92.
2. Montserrat E. New Prognostic Markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 279-84.
3. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006; 33(2):174-85.
4. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, Hanson CA, Jelinek DF. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti- angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002;16(5):911-9.
5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000; 96(6):2240-5.

6. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999; 107(3):605-10.
7. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001; 113(2):400-6
8. Smolej L., Maisnar V., Andryš C., Pour L., Malý J. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005; 48 (1): 57-8
9. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997; 88(2):277-85.
10. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274(17):11721-6.
11. Skovseth DK, Veuger MJT, Sorensen DR, De Angelis PM, Garaldsen G. Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo. *Blood.* 2005;105:1044-1051
12. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2002;27(1):32-7.
13. Feldman AL, Alexander HR Jr, Bartlett DL, Kranda KC, Miller MS, Costouros NG, Choyke PL, Libutti SK. A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(9):741-5.
14. Feldman AL, Alexander HR Jr, Yang JC, Linehan WM, Eyler RA, Miller MS, Steinberg SM, Libutti SK. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer.* 2002;95(8):1637-43.
15. Feldman AL, Pak H, Yang JC, Alexander HR Jr, Libutti SK. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer.* 2001;91(8):1525-9.
16. Miyashita M, Tajiri T, Yanagi K, Shimizu T, Futami R, Sasajima K, Tokunaga

- A. Serum levels of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and endostatin in human metastatic liver tumors. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(50):308-9
17. Urbanska-Rys H, Robak T. High serum level of endostatin in multiple myeloma at diagnosis but not in the plateau phase after treatment. *Mediators Inflamm*. 2003; 12(4):229-35.
 18. Lai R, Estey E, Shen Y, Despa S, Kantarjian H, Beran M, Maushouri T, Quackenbush RC, Keating M, Albitar M. Clinical significance of plasma endostatin in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2002 1;94(1):14-7.
 19. Glenjen N, Mosevoll KA, Bruserud O. Serum levels of angiogenin, basic fibroblast growth factor and endostatin in patients receiving intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Int J Cancer*. 2002 1;101(1):86-94.
 20. Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2003 1;97(11):2767-75.
 21. Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F, Cinieri S, Agazzi A, Ferrucci PF, Coccorocchio E, Goldhirsch A, Martinelli G. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 1999;106(2):504-9.
 22. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):594-607.
 23. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm*. 2003;12(3):167-71.
 24. Wolowiec D, Dybko J, Wrobel T, Urbaniak-Kujda D, Jazwiec B, Tomaszewska-Toporska B, Kapelko-Slowik K, Potoczek S, Kuliczkowski K. Circulating sCD138 and some angiogenesis-involved cytokines help to anticipate the disease progression of early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm*. 2006; (3):42394.
 25. Pekova S, Markova J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn*. 2005;9(1):23-34.

26. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(4):395-404.
27. George ML, Eccles SA, Tutton MG et al. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clin Cancer Res* 2000;6(8): 3147-52.
28. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998;77(6):956-64.
29. Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(1):216-20.
30. Ma L, Hollenberg MD, Wallace JL. Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor-4 (PAR4) antagonist. *Br J Pharmacol*. 2001;134(4):701-4.

5.2 Vaskularita dřeně u CLL

5.2.1 Smolej L, Benesova P. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006;107(11):2742-3. **IF=4,800**

5.2.2 Kašparová P., Smolej L. Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. *Čes.-slov. Patol.* 2007;43(2):50-58

5.2.3 Smolej L, Kašparová P. Choice of endothelial marker is crucial for assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia. *APMIS*, v recenzním řízení.

Role of Angiogenesis in Chronic Lymphocytic Leukemia

We read with interest the review on angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) by Leti-
lovic et al.¹ that was recently published *Cancer*. We
would like make several comments on bone marrow
neovascularization in CLL, because we still find this
issue controversial.

Surprisingly, 2 important recent studies were not
mentioned in the review: Wolowiec et al.² reported a
significant elevation of microvessel density (MVD) and
a positive correlation between the proliferative activity
of CLL in bone marrow and angiogenesis in a cohort of
46 patients with CLL; however, those authors failed to

demonstrate the prognostic impact of MVD on clinical course. In a study by De Raeye et al.,³ only samples with diffuse infiltration by CLL had elevated MVD and endothelial cell proliferation compared with control samples.

In our unpublished series of 22 patients with untreated CLL, we observed increased MVD, as assessed by the "hot-spot" method and using CD34 monoclonal antibody, compared with 17 controls (mean \pm standard deviation: 75.6 ± 50.6 vessels/mm² vs. 47.4 ± 21.8 vessels/mm²; 95% confidence interval [95%CI], 53.2–98.1 vessels/mm² vs. 36.2–58.6 vessels/mm²; $P = .039$). However, when we divided CLL samples according to patterns of bone marrow infiltration, only biopsies with diffuse growth ($n = 11$ biopsies; 93.1 ± 49.6 vessels/mm²; 95%CI, 59.8–126.4 vessels/mm²) differed significantly in MVD from controls ($P = .011$). In addition, we observed no association between MVD and other prognostic factors (Rai stage, genetic aberrations detected by fluorescent in situ hybridization, immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status).

There are several reasons for these conflicting results. First, several studies published to date have dealt with rather limited numbers of patients (e.g., the study by Kini et al. of 12 patients with CLL, including 3 patients after treatment⁴). Moreover, results from some studies are not directly comparable because of the different antibodies that were used to detect microvessels and the different techniques for MVD quantification (e.g. the "hot-spot" method²⁻⁴ vs. the random areas method used by Aguayo et al.⁵). Only large, prospective studies that employ reproducible and comparable methods can elucidate the exact role of bone marrow angiogenesis in CLL biology.

REFERENCES

1. Letilovic T, Vrhovac R, Verstovsek S, Jaksic B, Ferrajoli A. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107:925–934.
2. Wolowicz D, Wozniak Z, Potoczek S, et al. Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26:263–270.
3. De Raeye HR, Vermeulen PB, Vanderkerken K, Harris AL, Van Marck E. Microvessel density, endothelial-cell proliferation and carbonic anhydrase IX expression in haematological malignancies, bone-marrow metastases and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Virchows Arch*. 2004;445:27–35.
4. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:1414–1418.
5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;95:2240–2245.

Lukas Smolej, MD

Second Department of Internal Medicine
Department of Clinical Hematology
University Hospital and Medical School
Hradec Kralove, Czech Republic

Petra Benesova, MD

Fingerland Department of Pathology
University Hospital and Medical School
Hradec Kralove, Czech Republic

DOI 10.1002/encr.22303

Published online 25 October 2006 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com).

Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Kašparová P.¹, Smolej L.²

¹Fingerlandův ústav patologie a

²Oddělení klinické hematologie, II. interní klinika,

Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Souhrn

Angiogeneze je proces formování nových cév ze stávajících. Je zahrnuta v mnoha fyziologických procesech, zároveň se však podílí na postupu nádorového růstu. Jakkoliv mnoho je známo o angiogenezi u solidních nádorů, kde hraje roli v nádorové invazi a jejich metastatickém potenciálu, u nádorů krve tvorné tkáně začala být zkoumána teprve v posledních letech. Výsledky studií o angiogenezi u hematologických malignit jsou dosud nesourodé.

Nádorová angiogeneze může být studována na různých úrovních; histologicky je studována v nádorových tkáních (lymfatické uzliny, kostní dřev) a kvantifikována jako mikrovaskulární denzita (MVD).

Cílem naší studie bylo zavést metodu kvantifikace MVD v kostní dřev pomocí imunohistochemického průkazu endoteliálních markerů (fVIII) a dále zhodnotit MVD ve vzorcích kostní dřev pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a výsledky porovnat s kontrolní skupinou pacientů (CON).

CLL je typickou malignitou hematopoetické tkáně, ale průběh a prognóza se u jednotlivých pacientů zřetelně liší. Z tohoto důvodu je snaha o nalezení prognostických markerů. Angiogeneze je jedním z možných znaků, které by mohly dodat více informací o průběhu tohoto onemocnění. Ale dosud bylo u CLL publikováno jen málo studií o angiogenezi měřené jako MVD a výsledky jednotlivých studií se liší.

V naší studii byl zjištěn zvýšený počet a plocha kapilár (oproti kontrolní skupině), ale nikoliv počet či plocha sinusů. Můžeme tedy shrnout, že jsme našli známky abnormální angiogeneze v kostní dřev u pacientů s CLL, ale bude zapotřebí dlouhodobějších studií, aby se prokázal prognostický význam těchto nálezů.

Klíčová slova: angiogeneze - kostní dřev - chronická lymfocytární leukémie - CLL - mikrovaskulární denzita - MVD

Summary

Angiogenesis in the Bone Marrow of Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia

Angiogenesis is a process of formation of new vessels from the preexisting ones. It is involved in many physiological processes, at the same time, however, it is involved also in the progress of tumoral growth. Although a lot is known about angiogenesis in solid tumors where it plays a role in tumoral invasion and its metastatic potential, in hematological malignancies it has been appreciated only recently. However, the results of studies on abnormal angiogenesis in hematological malignancies are inconsistent. Angiogenesis can be studied at different levels; histologically, it is studied in the infiltrated tissues (lymph nodes, bone marrow) and quantified as microvessel density (MVD).

The aims of our study were to introduce the method of MVD quantification in the bone marrow using immunohistochemical detection of endothelial markers (fVIII) and then evaluate MVD in bone marrow samples in a group of patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and compare the results with a control group of patients (CON).

CLL is a typical malignancy of the hematopoietic tissue but the course and the prognosis of patients with this disease vary considerably. For this reason there is urgent need for novel prognostic markers in order to assess individual patient prognosis and tailor treatment. Angiogenesis is one of the possible markers which may add more informations about the course of this disease. So far only few studies have been published about angiogenesis measured as MVD in CLL patients and the results are inconsistent. In our study, both the number and the area of microvessels were increased in bone marrow of patients with CLL, but the number and area of sinuses were not. It can be concluded that there are signs of abnormal angiogenesis in bone marrow of patients with CLL but larger study with longer follow-up is needed to give more specific information about prognostic value of these findings.

Key words: angiogenesis - bone marrow - chronic lymphocytic leukaemia - CLL - microvessel density - MVD

Čes.-slov. Patol., 43, 2007, No. 2, p. 50-58

Angiogeneze je proces tvorby nových cév z cév stávajících. Podílí se na mnoha fyziologických procesech, jako je hojení a embryogeneze, zároveň je však zapojena do rozvoje nádorového bujení.

Ačkoliv je již hodně známo o angiogenezi u solidních tumorů, kde nádorová angiogeneze přispívá k invazivitě nádoru a k jeho metastatickému potenciálu (byly již zjištěny markery přesvědčivě se podílející na nádorové angiogenezi a mající prognostický význam), angiogeneze u hematologických malignit se dostala do středu zájmu teprve v nedávné době. Ale přestože se ukazuje, že u hematologických nádorů jsou patrné známky abnormální angiogeneze, výsledky příslušných studií nejsou dosud zcela jednotné a v některých případech jsou spíše rozporuplné (6).

Nádorová angiogeneze může být studována na různých úrovních: na klinické úrovni je nejznámější sledování hladin angiogenních faktorů v krvi, nejčastěji hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF) a bazického fibroblastického růstového faktoru (basic fibroblastic growth factor, bFGF), nověji např. i solubilní frakce CD105 endoglinu (sCD105) (1, 4, 7, 10). Na histologické úrovni je angiogeneze studována v infiltrovaných tkáních; v naší studii ve vzorcích kostní dřeni. Stupeň angiogenních změn na histologické úrovni může být kvantifikován měřením mikrovasculární denzity (MVD). K tomuto měření je používán imunohistochemický průkaz různých endoteliálních markerů (5, 9, 12).

V angiogenezi je zapojeno mnoho cest, ale většina dosavadních studií se věnovala odděleně vždy jen jedné z nich – buď sledovala jen klinické či naopak jen histologické známky zvýšené angiogeneze. Jen málo studií korelovalo histologické znaky s klinickými. Málo studií se také zabývalo porovnáním známek angiogeneze s dalšími parametry onemocnění. A pokud ano, byl v těchto studiích většinou sledován pouze jeden vybraný faktor, který byl dále porovnáván s ostatními (5, 11, 12).

Pokud jde o diagnostické jednotky, v hematologické oblasti se dosud nejvíce prací o angiogenezi týkalo mnohočetného myelomu (multiple myeloma, MM). Tato jednotka vykazuje některé vlastnosti solidních tumorů, a proto se při jejím studiu dalo dobře využít poznatků získaných předchozím studiem solidních nehematologických malignit. Tím však zároveň tato afekce z hematologické problematiky poněkud vybočuje a poznatky získané studiem tohoto nádoru nelze pak zcela jednoznačně přenést na jiné, „klasické“ hematologické jednotky.

Naproti tomu CLL patří k typickým hematologickým onemocněním; její diagnostika se však v minulosti opírala téměř výhradně o klinické nálezy. Trepanobiopsický odběr kostní dřeni se

stal standardní součástí vyšetřovacího protokolu teprve v poměrně nedávné době, a proto histologické nálezy z kostní dřeni nejsou dosud důkladně prostudovány. Ukazuje se však, že i tyto nálezy mohou mít diagnostický a prognostický význam.

Ve spolupráci s Oddělením klinické hematologie (OKH, II. interní klinika LF UK a FN v Hradci Králové) bylo u pacientů s CLL, kteří splňovali dále uvedená kritéria a u kontrolní skupiny (pacienti vyšetřovaní pro jiná onemocnění, s negativním nálezem v kostní dřeni), sledováno několik parametrů charakterizujících stav onemocnění. Důraz byl kladen na hodnocení intenzity angiogeneze, a to jak na úrovni klinické, tak i histologické. Na úrovni klinické byly u pacientů s CLL měřeny hladiny angiogenních faktorů v krvi. Na histologické úrovni bylo cílem studie studovat známky angiogeneze u pacientů s CLL v kostní dřeni, kvantifikovat ji pomocí měření MVD a tyto nálezy porovnat s některými dalšími parametry.

Nálezy byly korelovány v rámci skupiny s dalšími parametry popisujícími stav onemocnění a zároveň porovnávány s kontrolní skupinou. Bylo tak možné korelovat nejen histologické a klinické známky angiogeneze, ale i porovnat tyto známky s dalšími histologickými a klinickými parametry, které mají nebo by mohly mít vztah ke stavu a vývoji onemocnění.

Chronická lymfocytární leukémie

CLL je nejběžnější leukémie dospělých (11). Přestože klinický průběh může být indolentní, je onemocnění běžnou terapií nevléčitelné a průměrné přežití pacientů je 7 let. Průběh onemocnění je u CLL typický extrémní různorodostí. U části pacientů je průběh pomalý, pouze s pozvolným narůstáním nádorové populace, nikdy nepotřebují léčbu a jejich přežití je totožné s vrstevníky nepostiženými CLL. U jiných však dochází k poměrně časně infiltraci mnoha orgánů, s narušením jejich funkce a paraneoplastickými projevy způsobovanými cytokiny vyplavovanými nádorovými buňkami. V takových případech se přežití může pohybovat v řádu pouze několika měsíců. U všech pacientů s CLL hrozí také velkobuněčný zvrát nádorového onemocnění, tzv. Richterův syndrom, který je popisován ve 3,5 % případů. Proto byla a je snaha o nalezení markerů, které by dovedly odlišit pacienty s dlouhodobým stacionárním průběhem od pacientů, kde bude možné očekávat rychle nastupující progresi a agresivní průběh onemocnění. V případě objevení se takovýchto varovných znaků pak použít způsob léčby, který by byl zaměřen na potlačení progresu nebo by ji v ideálním případě předcházel.

Na základě řady studií byl nalezeno několik markerů, včetně chromozomálních odchylek, mutačního stavu genu pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinu (immunoglobulin variable heavy, IgVH), zdvojení času lymfocytů (lymphocyte doubling time, LDT) a dalších, které mají vztah k vývoji onemocnění a prognóze pacienta; některé z nich jsou již uznané, ověřené, jiné teprve ve fázi výzkumu a prověřování. Žádný z faktorů však dosud není považován za definitivní a absolutní (10).

O stupni angiogeneze je spekulováno jako o dalším možném prognostickém markeru CLL. V naší studii jsme proto sledovali několik markerů, které by mohly odpovídat angiogenezi:

- a) mikrovaskulární denzita v kostní dřeni,
- b) počet mastocytů v kostní dřeni,
- c) plazmatické hladiny angiogenních faktorů.

Známky abnormální angiogeneze v kostní dřeni a v lymfatických uzlinách u B-CLL jsou zřejmé (4). Dosud však bylo publikováno jen málo studií o tomto tématu a jejich výsledky jsou značně rozporuplné. Přesto se má za to, že angiogeneze je součástí patogeneze CLL a její klinicko-prognostický význam byl již demonstrován u pacientů v časně fázi onemocnění (10). U pacientů s B-CLL byly prokázány i zvýšené hladiny VEGF a bFGF (3, 8) a také zvýšená MVD v kostní dřeni (2, 3, 10). Při porovnávání MVD s dalšími parametry onemocnění bylo zjištěno, že genomické aberace jsou nezávislými prediktory progresse nemoci B-CLL, dosud však nebyla nalezena korelace mezi těmito aberacemi a MVD ani mezi MVD a vyšší hladinou sérového VEGF (8).

Materiál a metodika

Soubor tvořili pacienti, kterým bylo v období let 1999–2005 provedeno bioptické vyšetření kostní dřene a současně splňovali následující kritéria:

- a) byli nebo jsou v dispenzarizaci Oddělení klinické hematologie (OKH) II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové a bylo u nich možné dohledat sledované klinické údaje (věk, klinické stadium onemocnění a dobu sledování),
- b) nález v kostní dřeni splňoval požadovaná diagnostická kritéria (infiltrace při CLL), materiál byl vhodně fixován (Löwyho roztok) a jeho množství bylo dostatečné pro další vyšetřování,
- c) v době odběru vzorku byl pacient bez léčby,
- d) byla provedena další klinická vyšetření (stanovení plazmatické hladiny bFGF, VEGF, sCD105, mutační stav IgVH, LDT).

Tato kritéria byla splněna u 22 případů CLL.

Jako kontrolní skupina (CON) sloužily vzorky kostní dřene od pacientů vyšetřovaných v rámci

stagingu Hodgkinovy nemoci, non-Hodgkinových lymfomů a solidních tumorů a vzorky pacientů vyšetřovaných s podezřením na blíže neurčenou hematologickou malignitu, s normálním histologickým nálezem nebo jen s reaktivními změnami krvevorné tkáně.

Skupinu CON tvořilo 11 vzorků od pacientů s rovnoměrným zastoupením pohlaví a věkově srovnatelných s vlastním souborem.

Ke studiu angiogeneze byly použity trepanobiopsticky odebrané vzorky kostní dřene z lopaty kosti kyčelní. Materiál každého vzorku byl zpracován v celém rozsahu a po zalití do parafínu byly z každého vzorku krájeny řezy o tloušťce 3 μ m. Vždy byla nejprve zhotovena sada sériových preparátů zahrnující barvení: hematoxylin-eozin, May-Grünwald-Giemsa (MGG), PAS, průkaz chloracetátsterázy, Perlsovo barvení na průkaz trojmocného železa a impregnace retikulinových vláken dle Gömöriho. Dále dle potřeby imunohistochemické vyšetření ke stanovení základní diagnózy a vždy imunohistochemický průkaz fVIII (von Willebrandova faktoru).

K imunohistochemickému vyšetření byla pro zhodnocení angiogeneze v kostní dřeni použita monoklonální myší protilátka proti lidskému fVIII, klon F8/86 (Dako, Dánsko), ředění 1:2000. Bylo provedeno tepelné demaskování antigenů s použitím Target Retrieval Solution (TRS) S1700 (Dako). Při průkazu byla použita nepřímá imunohistochemická metoda s použitím vizualizačního systému EnVision Dual Link System (Dako) značeného peroxidázou. Jako chromogen byl použit diaminobenzidin (DAB). Jako pozitivní byly hodnoceny všechny hnědě zbarvené buňky bez morfologie megakaryocytů, bez ohledu na to, zda bylo či nebylo přítomno lumen.

Od klinických lékařů byly získány výsledky dalších vyšetření, která byla prováděna na specializovaných pracovištích podle standardů daných metod. Takto byly získány údaje o hladinách angiogenních faktorů VEGF a bFGF, mutačním stavu IgVH, chromozomálních odchylkách a LDT.

Histologické parametry vyšetřované ve vzorcích kostní dřene:

- a) Typ infiltrace kostní dřene (obr. 1)

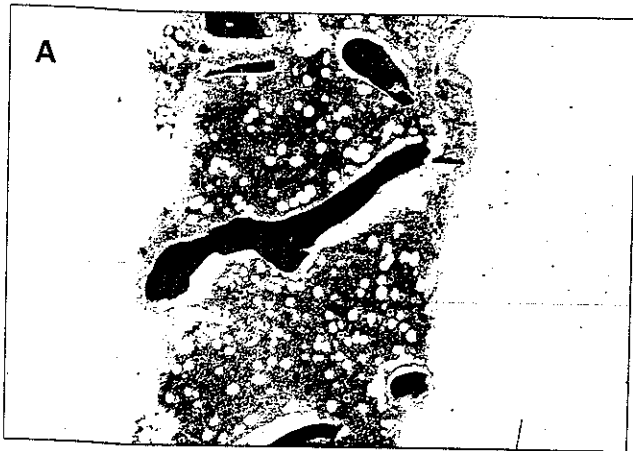
1 = intersticiální: nádorové buňky jednotlivě či v malých skupinkách (do 10 buněk), celkově převažuje nepostížená krvevorná tkáň,

2 = fokální (nodulární nebo patchy): jasně patrné ostrůvky nádorových buněk (řádově desítky buněk), nádorová a krvevorná tkáň zhruba ve stejném zastoupení,

3 = difuzní: splývající nádorové infiltráty, zřetelně převažuje nádorová tkáň nad krvevornou.

- b) Počet mastocytů (obr. 2).

Při celkovém zvětšení 400krát (= 1 zorné pole při velkém zvětšení, high power field, HPF) bylo



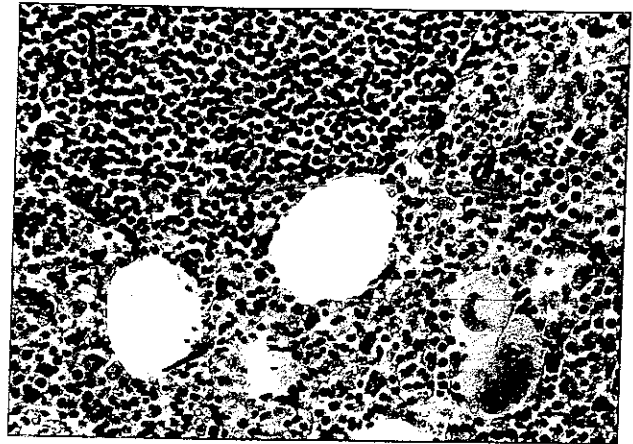
Obr. 1: CLL, typy infiltrace (a) intersticiální, (b) fokální, (c) difuzní. MGG, 40krát.

hodnoceno tolik zorných polí, aby byla zaujata celá plocha vzorku. Ve výsledku udáván maximální počet mastocytů na jedno velké zorné pole.

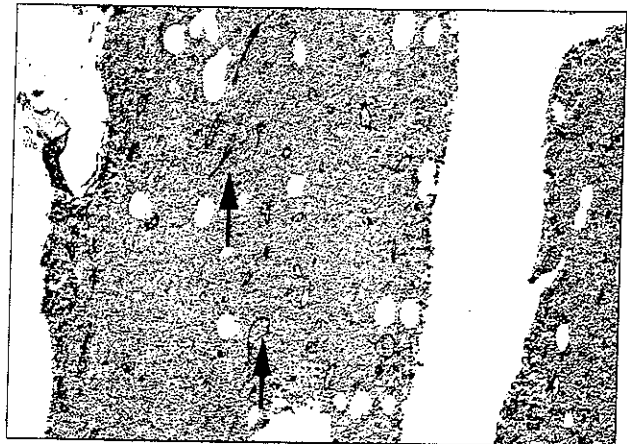
c) Imunohistochemické vyšetření MVD (obr. 3, 4, 5)

Preparáty s imunohistochemickým průkazem fVIII byly hodnoceny počítačovou analýzou obrazu za použití software LUCIA M/Comet 3.52 od firmy Laboratory Imaging (Praha, Česká republika).

Při histologickém vyšetření byla angiogeneze



Obr. 2. CLL, mastocyty (šipka) v okolí nádorového infiltrátu. MGG, 200krát.



Obr. 3. CLL, MVD „hot-spot“ (cévy označeny šipkou). fVIII, 100krát.



Obr. 4. CLL, sinus a silnostěnná céva. fVIII, 400krát.

v kostní dřeni hodnocena jako mikrovaskulární denzita. Preparáty s imunohistochemickým průkazem fVIII byly nejprve celkově zhodnoceny při přehledném zvětšení 100krát nebo 200krát a pokud možno, byly vybrány tři oblasti s nejvyšším počtem patrných cév, tzv. „hot spots“. V pří-



Obr. 5. CLL, MVD, vícečetné cévy. FVIII, 400krát.

padě menšího množství materiálu bylo další vyšetření provedeno na dosažitelném materiálu kontinuálně, bez výběru.

Dále byl při zvětšení 400krát (měřená plocha v jednom zorném poli 0,069 mm²) manuálně označen obvod zastížených cév a vyznačena jejich plocha. Byl zaznamenán:

- počet cév,
- jejich plocha vyjádřená v mm²,
- plocha vyjádřená v procentuálním zastoupení z celkové měřené plochy.

Byly hodnoceny vždy jen cévy, jejichž stěna byla tvořena pouze jednou vrstvou endotelií a neobsahovaly ve stěně hladkou svalovinu. Odděleně byly hodnoceny cévy s průměrem menším než 10 μm a větším než 10 μm. Takto bylo hodnoceno v každém vzorku 9 zorných polí (3 v každém hot spot).

Tab. 1.: Popis sledovaných proměnných

Jsou uváděny medián a minimální a maximální hodnota sledovaných proměnných

	CLL	CON
m:ž	16 : 6	6 : 5
Věk	57 (44-74)	56 (27-77)
K mm	22,4 (1,6-102,6)	9,6 (0-12,8)
K	1,56 (0,1-3,9)	0,7 (0-0,9)
Plocha K	255,4 (47,1-638,6)	152,7 (0-300,0)
% K	0,4 (0,1-4,2)	0,2 (0-0,7)
S mm	11,2 (0-27,3)	11,2 (1,6-25,6)
S	0,8 (0-1,9)	0,8 (0,1-1,8)
Plocha S	1257,8 (0-5608,2)	1755,6 (448,4-9691,1)
% S	0,2 (0-13,0)	0,3 (0,7-0,1)
mastocyty	5 (0-20)	1 (0-4)
VEGF	94,5 (5,5-589,4)	x
b FGF	121,2 (7,5-222,9)	x

K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; plocha K – celková plocha kapilár v 1HPF [μm²]; % K – plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy; Smm – průměrný počet sinusů na 1 mm²; S – průměrný počet sinusů na 1 HPF; plocha S – celková plocha sinusů v 1 HPF [μm²]; % S – plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF; VEGF – plazmatická hladina VEGF [ng/l]; bFGF – plazmatická hladina bFGF [ng/l]; x – nejištěno

Tabulka 2: Statistické srovnání angiogeneze s ostatními prognostickými markery ve skupině pacientů s CLL

	IgVH (p)	test	genetika (p)	test	st Rai (p)	test	infiltrace (p)	test
K mm	0,4033	MW	0,5315	MW	0,1197	KW	0,8743	KW
K	0,4033	MW	0,5315	MW	0,1197	KW	0,8743	KW
% K	0,1604	KW	0,3577	MW	0,1617	KW	0,6544	KW
plocha K	0,08878	MW	0,3579	MW	0,1446	KW	0,6544	KW
S mm	0,1745	t-test	0,8179	MW	0,5144	KW	0,5325	KW
S	0,1745	t-test	0,8179	MW	0,5144	KW	0,5314	KW
% S	0,3825	t-test	0,3579	MW	0,4148	KW	0,5339	anova
plocha S	0,3922	t-test	0,3579	MW	0,2095	anova	0,5345	anova
mastocyty	0,3822	MW	0,6921	MW	0,7197	KW	0,2699	KW

MW – neparametrický Mann-Whitney test; anova – jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním; KW – neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu; K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; plocha K – celková plocha kapilár v 1HPF [μm²]; % K – plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy; S mm – průměrný počet sinusů na 1 mm²; S – průměrný počet sinusů na 1 HPF; plocha S – celková plocha sinusů v 1 HPF [μm²]; % S – plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF; VEGF – plazmatická hladina VEGF [ng/l]; bFGF – plazmatická hladina bFGF [ng/l]

Statistické zpracování provedla RNDr. Eva Čermáková z Ústavu biofyziky LF UK v Hradci Králové. Ke statistické analýze získaných dat byl použit program NCSS 2004. Byly provedeny

deskriptivní statistické testy. Korelace mezi jednotlivými parametry byly hodnoceny korelačním koeficientem (Spearmanovým). Ke zhodnocení vztahu mezi sledovanými parametry byly použity

Tab. 3.: Porovnání histologických parametrů mezi skupinami pacientů s CLL a CON

Jsou uvedeny parametry, ve kterých byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou CLL a CON. Jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti (p) a použité testy.

	p	test
K mm	0,00002	KW
K	0,00002	KW
masto	0,00001	KW

KW – neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu; K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF

dvouvýběrový t-test, případně neparametrický Mann-Whitney (MW) test a dále jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním (anova), případně neparametrická Kruskal-Wallisova (KW) analýza rozptylu.

Výsledky

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1–3.

Diskuse

Výsledky této práce navazují na výsledky předchozích prací jiných autorů a rozšiřují je o některé nové údaje. Studie věnující se angiogenezi u hematologických onemocnění jsou často zaměřené jednostranně: sledují buď převážně klinické známky zvýšené angiogeneze – nejčastěji hladiny angiogenních faktorů v krvi, nebo převážně histologický korelát angiogeneze – mikrovaskulární denzitu (MVD) v kostní dřeni či v jiných tkáních. Nedostatkem většiny těchto studií je chybějící propojení těchto dvou oblastí. Ve spolupráci s klinickými lékaři jsme se proto v této studii pokusili o poněkud komplexnější pohled.

U pacientů jsme sledovali histologické i klinické koreláty zvýšené angiogeneze. Na histologické úrovni byla angiogeneze měřena jako MVD, byl sledován počet kapilár na zorné pole při velkém zvětšení, s přepočtem na 1mm² (pro snadnější srovnání s jinými studiemi) a jejich plocha, vyjádřená jednak v μm^2 , jednak v procentuálním poměru z celkové měřené plochy. Současně jsme však sledovali i klinické znaky angiogeneze, reprezentované plazmatickými hladinami angiogenních faktorů VEGF a bFGF.

Kromě toho jsme hodnotili i další faktory hovořící o stavu onemocnění a pacienta, ať už

s uznávanou prognostickou hodnotou (věk, klinické stadium onemocnění, chromozomální odchylky, mutační stav variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů), nebo ty, které se jeví jako nápadné v průběhu zpracování vzorků, a byly proto rovněž zavzaty mezi vyšetřované parametry (sinusy, mastocyty).

Chronická lymfocytární leukémie

CLL patří k velmi častým hematologickým malignitám, do nedávné doby však byla považována za velmi pomalu progredující onemocnění jen s velmi nízkým maligním potenciálem. Pro stanovení diagnózy CLL bylo postačující klinické vyšetření a nález v periferní krvi. V současné době se však v novými poznatky náhled na toto onemocnění změnil. Standardizace vyšetření se stanovováním sérologických hladin výše zmiňovaných látek v krvi, s odběrem trepanobiopsického vzorku kostní dřene a spolu s dalšími vyšetřeními jako je chromosomální a genetické vyšetření a mutační stav IgVH, vedlo k poznání dalších typických znaků CLL. Je patrná snaha o využití těchto nově zjištěných znaků, především jako možných prediktorů průběhu a prognózy tohoto vysoce heterogenního onemocnění.

Doba sledování našich pacientů s CLL byla 12–150 měsíců (medián 36,5; průměr 51,5 měsíce), což je téměř trojnásobně více než v obdobné studii autorů Wolowiec a spol. (12). Během této doby došlo k ověřenému úmrtí 2 pacientů, stav 9 pacientů dosud nevyžadoval žádnou léčbu pro základní diagnózu, 8 pacientů bylo nebo je léčeno a jejich stav je v současnosti stabilizován a 3 pacienti se nedostavili do dispenzáře a byli ztraceni z evidence. Tyto údaje odpovídají údajům o pomalé progresi tohoto onemocnění.

Od sledování angiogeneze se očekává, že by mohla dále doplnit znalosti o tomto onemocnění a popř. se stát dalším prognostickým markerem.

Histologické vyšetření a hodnocení vzorků v naší studii probíhalo zpočátku stejným způsobem jako u MM. Avšak vzhledem k tomu, že při vyšetřování vzorků pacientů s CLL byly často nápadně výrazně dilatované cévy (sinusy), byly i tyto cévy zařazeny mezi hodnocené parametry. Tento způsob hodnocení MVD je poněkud odlišný od způsobu používaného u solidních tumorů, kde jsou hodnoceny vždy pouze cévy menší než 10 μm v průměru. Takto je postupováno na základě zkušeností, že u cév větších bývá zastižena vyvinutá cévní stěna a tudíž již nemohou být hodnoceny jako novotvořené kapiláry.

Postup obdobný jako u solidních tumorů byl jako výchozí použit při hodnocení MVD

u MM. MM se totiž svými vlastnostmi z hematologických malignit poněkud vymyká; v některých oblastech se chová spíše jako solidní tumor. Při hodnocení vzorků typické hematologické malignity jako je CLL se však tento postup ukázal jako nedostačující. Často byly totiž zastiženy velmi objemné cévy, avšak stále se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií.

Na rozdíl od většiny solidních tumorů, ve kterých byla angiogeneze zkoumána, obsahuje normální kostní dřev jen velmi málo cév s plně vyvinutou, několikvrstevnou stěnou. Naopak zde převládají hojné preformované sinusy, se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií, již uzpůsobené k průniku buněk z kostní dřevě do periferní krve. Autoři Molica a spol. (8) ve své studii sice tyto „nápadně dilatované cévy“ popsali, avšak jejich kvantifikaci a případným vlivem angiogenních působků na tyto preformované sinusy se dosud, pokud je nám známo, u CLL tito autoři ani nikdo další nezabýval. Naše hypotéza byla, že by nádorové buňky mohly této vlastnosti kostní dřev využít a místo novotvorby dalších malých cév pouze zvětšovat stávající sinusy nebo zkombinovat oba procesy (novotvorba malých cév a dilatace sinusů). Na základě této hypotézy by se v kostní dřev u CLL dal očekávat stejný nebo vyšší počet kapilár než v kontrolních vzorcích a obdobný počet, avšak plošně rozsáhlejších sinusů.

Ve vzorcích pacientů s CLL a v kontrolních vzorcích byly tak posléze v každém zorném poli odděleně hodnoceny kapiláry a sinusy (viz výše) – u každé skupiny počet a plocha daných cév.

Průměrný počet kapilár u pacientů s CLL byl v naší studii signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (medián 22 K/mm² u CLL oproti 10 K/mm² v kontrolní skupině; $p = 0,0002$). Nebyl však nalezen statisticky významný rozdíl mezi plochou kapilár (plocha K, % K) ve skupině pacientů s CLL a kontrolní skupinou.

Počet, plocha ani procentuální zastoupení sinusů (S, S mm, plocha S, % S) se statisticky významně nelišila mezi žádnými z hodnocených skupin.

Rovněž nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi počtem, plochou a zastoupením kapilár a sinusů mezi skupinami pacientů s CLL s odlišnými parametry IgVH, genetickým stavem, klinickým stadiem dle Raie a typem nádorové infiltrace kostní dřevě.

Nález vyššího počtu kapilár ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL oproti kontrolní skupině je ve shodě se studií autorů Wolowiec a spol. (12), která rovněž zaznamenala zvýšenou MVD v kostní dřevě u pacientů s CLL.

Z výsledků naší studie je možné usuzovat, že v procesu angiogeneze převládá tvorba mnoha malých cév nad rozšiřováním cév stávajících, byť by byly tenkostěnné. Pro tento závěr svědčí

jednak nezměněný počet a hlavně statisticky nevýznamný rozdíl v ploše mezi sinusy u CLL a kontrolní skupiny a dále také fakt, že přestože se nezměnila plocha zastižených kapilár ve skupině CLL oproti kontrolní skupině, bylo patrné statisticky významné zvýšení počtu těchto kapilár. Tedy kapiláry jsou menší a četnější.

Hodnotili jsme i typ nádorové infiltrace, a to ve třech kategoriích jako intersticiální, fokální a difuzní. U pacientů s CLL nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými kategoriemi podle typu infiltrace. Tento výsledek je odlišný od výše zmiňované studie (12), kde byl průměrný počet kapilár na velké zorné pole signifikantně vyšší u difuzní než u nedifuzní infiltrace kostní dřevě u CLL. Je možné že na této neshodě se podílí rozdělení nádorové infiltrace do tří kategorií (v naší studii), protože jejich studie hodnotila infiltraci pouze ve dvou skupinách, jako difuzní a nedifuzní. V našem souboru bylo i dosti nerovnoměrné zastoupení pacientů v jednotlivých skupinách (5 pacientů s intersticiální, 6 s fokální a 12 s difuzní infiltrací), takže je možné, že jde i o chybu v souboru s malým počtem čísel. Vzhledem k tomu, že podle nových názorů typ infiltrace koreluje s klinickou progresí onemocnění, je nutné považovat naše nálezy za prozatímní a zaměřit se na jejich ověření či upřesnění v rozsáhlejších souborech pacientů.

Ve shodě s výše zmiňovanou studií (12) jsme i my pozorovali, že zatímco u difuzní infiltrace je vaskularizace pravidelná, u nodulární je vyšší na okrajích nádorových uzlů. Nepodařilo se nám prokázat souvislost mezi MVD a v současnosti uznávanými prognostickými markery CLL. Je tedy otázkou rozsáhlejších a dlouhodobějších studií, zda se v budoucnu prokáže nějaký prognostický význam angiogeneze u CLL.

Dalším nápadným znakem ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL byly zmnožené mastocyty. O mastocytech je známo, že mohou být reaktivně zmnoženy u mnoha hematologických onemocnění, např. u útlumu kostní dřevě, anémií, maligních lymfomů i myelodysplastického syndromu. Bývají však zmiňovány i v souvislosti s angiogenezí, jako možní producenti angiogenních faktorů i proteáz, které se podílejí na destrukci stěny původních cév i stromatu. V této souvislosti jsou zmiňovány dva základní typy mastocytů: s převládající sekrecí tryptázy (Mc-t) a s převládající sekrecí chymázy (Mc-c). Pro angiogenezi jsou pokládány za klíčové mastocyty s převažující produkcí tryptázy. Ale práci zabývajících se přesným zařazením mastocytů, které se na tomto procesu podílí, a jejich kvantifikací je velmi málo.

V naší studii dosahovaly ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL maximální hodnoty masto-

cytů na jedno velké zorné pole počtu až 20 (medián 5). Na základě těchto pozorování byly tedy i mastocyty zahrnuty do hodnocených parametrů. Maximální hodnoty ve vzorcích kontrolní skupiny byly 4 mastocyty na velké zorné pole (medián 1).

Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi počtem mastocytů ve skupině pacientů s CLL (medián 5) a kontrolní skupinou (medián 1, $p = 0,00001$).

Tento výsledek by jistě stál za další zkoumání. Obecně je CLL onemocněním, kde jsou v kostní dřeni mastocyty častým nálezem. Další studie by se tedy mohly věnovat významu mastocytů u CLL.

Nebyly však nalezeny žádné významné korelace mezi počtem mastocytů, MVD a klinickými parametry (VEGF, bFGF, věk).

Vzhledem k tomu, že byl prováděn pouze prostý součet všech zastížených mastocytů a přitom v literatuře jsou v souvislosti s angiogenezí zmiňovány hlavně MC-t, bylo by jistě také vhodné ověřit, jaké enzymy převažovaly v zastížených mastocytech v našem souboru a zda by se potom údaje o počtu mastocytů v souvislosti s ostatními známkami angiogeneze nezměnily. Přestože se tedy v našem souboru nepodařilo prokázat výraznou souvislost počtu mastocytů s angiogenezí, nápadně zvýšený počet těchto buněk se jeví jako inspirace pro další studium.

Naměřené plazmatické hodnoty angiogenních faktorů u pacientů s CLL byly u VEGF v rozmezí 5,5–589,4 ng/l (medián 94,5 ng/l) a u bFGF 7,5–222,9 ng/l (medián 121,2 ng/l).

Neměřili jsme hladiny angiogenních faktorů u kontrolní skupiny, neboť bylo již opakovaně prokázáno, že tyto jsou u pacientů s CLL zvýšené oproti normálu (1). Nás zajímala spíše korelace s histologickými znaky angiogeneze a s dalšími prognostickými markery, neboť v této oblasti je dosud málo známých informací a nejsou jednoznačné.

V naší studii nebyla patrná korelace mezi hladinami angiogenních faktorů a dalšími sledovanými prognostickými markery.

I v dalších studiích jsou dosud korelace pouze vágní. Zatím se zdá, že hladiny VEGF by mohly dodat prognostický význam u časných stadií CLL, kdy u pacientů ve stadiu Rai I-II s vyššími hladinami VEGF byl zaznamenán kratší čas do progresu. Naše studie je dosud malá, s malým počtem zachycených nádorových progresí, ale očekáváme, že s časovým odstupem bude možné některé proměnné znovu zhodnotit z dlouhodobého hlediska.

Celkově nebyly patrné žádné významnější korelace mezi sledovanými proměnnými. Korelační koeficient mezi sledovanými histologickými (mikrovaskulární denzitou v kostní dře-

ni ať už měřenou jako počet kapilár nebo sinusů) a klinickými parametry angiogeneze (hladinami VEGF a bFGF v krvi) byl velmi nízký. Rovněž nebyla patrná žádná významnější korelace mezi MVD a hladinami β 2-mikroglobulinu a věkem. Tento nálezn je ve shodě se studií autorů Molica a spol. (7), kteří rovněž nezastihli korelace mezi VEGF a ostatními klinicko-biologickými parametry (absolutní lymfocytóza v periferní krvi, β 2-mikroglobulin, histologie kostní dřeni, IL-6) nebo progresí onemocnění (LDT).

Porovnávali jsme histologické parametry (MVD a počet mastocytů) s prognostickými markery, a to histologickými i klinickými. Neprokázali jsme signifikantní rozdíl v histologických parametrech angiogeneze a počtu mastocytů při srovnání s mutačním stavem IgVH, genetickým vyšetřením FISH, stadiem dle Raie a typem infiltrace.

Tato práce byla částečně podpořena granty NR/8076-3 a NR/8373-3 IGA, MZ České republiky a výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR

Literatura

1. Bairey, O., Zimra, Y., Shaklai, M., Rabizadeh, E.: Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 113, 2001, s. 400–406.
2. Byrd, J.C., Wasilenko, J.K., Keating, M. et al.: Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia in the 21st century. *Seminars in Oncology*, 5, 2000, s. 587–597.
3. Chen, H., Treweeke, A.T., West, D.C. et al.: In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 96, 2000, s. 3181–3187.
4. Kay, N.E., Jelinek, D.F., Peterson, L.: Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 25, 2001, s. 709–710.
5. Korkolopoulou, P., Gribabis, D.A., Kavantzias, N. et al.: A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Brit. J. Haematol.*, 122, 2003, s. 900–910.
6. Koster, A., Van Krieken, H.J.M., MacKenzie, M.A. et al.: Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 11, 2005, s. 154–161.
7. Molica, S., Vitelli, G., Levato, D. et al.: Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 107, 1999, s. 605–610.
8. Molica, S., Vacca, A., Levato, D. et al.: Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 28, 2004, s. 321–324.
9. Molica, S., Vacca, A., Tucc, L., Ribatti, D.: Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia following fludarabine therapy. *Haematologica*, 90, 2005, s. 698–700.

-
10. **Molica, S., Vitelli, G., Levato, D. et al.:** Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *Eur. J. Haematol.*, 73, 2004, s. 36–42.
 11. **Molica, S., Vacca, A., Ribatti, D. et al.:** Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100, 2002, s. 3344–3351.
 12. **Wolowiec, D., Wozniak, Z., Potoczek, S. et al.:** Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic

lymphocytic leukemia. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 26, 2004, s. 263–270.

MUDr. Petra Kašparová, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
Tel.: 495 832 287
e-mail: benespet@seznam.cz

Choice of endothelial marker is crucial for assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia.

Smolej L.¹, Kašparová P.²

¹2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic

²Fingerland Department of Pathology, University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic

Correspondence:

Lukáš Smolej, M.D.

Department of Clinical Hematology

2nd Department of Internal Medicine

University Hospital and Medical School

Sokolská 581

Hradec Kralove, 50005

Czech Republic

tel.: +420495832686

fax: +420495832011

e-mail: smolej@seznam.cz

Acknowledgements

We would like to thank Soňa Peková, M.D., Ph.D. and Jiří Schwarz, M.D., Ph.D. for analysis of IgVH mutation status and Lenka Kučerová, M.S., Vladimíra Holubová, M.S. and Jiří Sobotka, Ph.D. for assessment of genetic abnormalities. Supported by grant NR/8373-3 and research project MZO 00179906 from Ministry of Health, Czech Republic.

Abstract

Introduction: Angiogenesis is a potential prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Elevated circulating levels of angiogenic factors have been reported. Nevertheless, results of studies assessing bone marrow neovascularization in CLL are controversial, partly due to different methods of assessing microvessel density (MVD). Moreover, there is insufficient data regarding relationship of marrow angiogenesis to prognostic markers in CLL. **Objectives:** 1. To assess bone marrow MVD in CLL using two different monoclonal antibodies and reproducible method of MVD quantification; 2. To examine possible association of marrow MVD and prognostic factors. **Patients and Methods:** MVD was analysed immunohistochemically in bone marrow biopsies from untreated CLL patients using antibodies anti-CD34 (n=22) and von Willebrand factor (vWF, n=17); seventeen age- and sex-matched individuals served as controls. **Results:** MVD was significantly higher in CLL in comparison to controls using either antibody (CD34, p=0.039; vWF, p=0.017). However, no MVD differences were detected between CLL subgroups subdivided according to clinical course, pattern of marrow infiltration, Rai stage, FISH abnormalities or IgVH mutation status. MVD was higher using CD34 vs. vWF antibody in CLL and controls (p<0.0001 for both). In conclusion, we detected increased marrow angiogenesis in CLL. However, no association of MVD with any prognostic factors was observed. Staining with anti-CD34 resulted in higher MVD counts than with anti-vWF antibody. Our results point out the need for standardized method of neovascularization assessment to enable direct comparison of results between different centers in order to elucidate the real clinical significance of bone marrow angiogenesis in CLL.

Keywords:

Chronic lymphocytic leukemia, angiogenesis, neovascularization, microvessel density, CD34, von Willebrand factor, bone marrow biopsy.

Introduction

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a disease with an extremely variable clinical course. Some patients never require therapy and live as long as their CLL-free counterparts while others experience aggressive disease and die within few years. Therefore, novel prognostic factors such as mutation status of variable region of immunoglobulin heavy chain genes (IgVH) or genetic aberrations detected by fluorescent in situ hybridization are being sought in order to identify patients with poor prognosis at the time of diagnosis and to adjust

the intensity of treatment according to overall risk (1). It has been shown that angiogenesis plays a role in the pathogenesis of CLL and might serve as one of new prognostic factors (2,3). It is well-known that CLL cells are capable of producing many angiogenic molecules (4) and that various circulating angiogenic factors are elevated in peripheral blood of CLL patients (5-10). Elevated bone marrow neovascularization has been widely reported in various hematological malignancies (11-14); however, it is still controversial whether in CLL bone marrow is elevated, in part because methods of angiogenesis assessment are not directly comparable between published studies (due to different antibodies used for immunohistochemical identification of vessels and different methods of calculating microvessel density [MVD]) (15-20). Moreover, there is insufficient data on the association of bone marrow angiogenesis with prognostic factors, especially modern ones (IgVH mutation status, genetic abnormalities). The aims of this study were therefore: 1. to find out whether there are any differences in MVD in CLL if different endothelial markers are used; 2. to assess a possible association of MVD with prognostic markers.

Patients and Methods

We evaluated trephine bone marrow biopsies from 22 patients with never-treated chronic lymphocytic leukemia (CLL) diagnosed according to National Cancer Institute-sponsored Working Group (NCI-WG) criteria. Control group consisted of 17 samples of marrow biopsies without any evidence of solid tumor or hematological malignancy. The study was approved by local ethical committee and conducted according to Helsinki Declaration. CLL cohort was further subdivided according to clinical course (stable vs. progressive), Rai stage (0 vs. I-IV), pattern of marrow infiltration (non-diffuse vs. diffuse), genetic abnormalities (favourable, i.e. no abnormality or del13q14 as a sole aberration vs. unfavourable, i.e. del 17p / del11q / trisomy 12), and IgVH mutation status (mutated vs. unmutated).

Microvessel density assessment

Trephine bone marrow biopsy samples were done from anterior or posterior iliac crest using Islam or Sterylab biopsy needles. Samples were processed according to standard technique and paraffin-embedded section were made for microscopic evaluation. Samples were stained immunohistochemically with CD34 (n=22) and von Willebrand factor (vWF) / factor VIII-related antigen (fVIIIrAg, n=17) monoclonal antibodies purchased from DakoCytomation, Hamburg, Germany. Microvessel density was determined by "hot spot" method: Digital images of marrow slides were processed using image analysis software LUCIA M/Comet

3.52 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) and were examined at low magnification (x100), where three areas with highest accumulation of small vessels („hot spots“) were identified in every specimen. These areas were then examined at high (x400) magnification and microvessels were counted in three high-power fields. Megakaryocytes which also stain with CD34 and vWF could be easily distinguished from microvessels on the basis of morphology. The presence of lumen was not required for definition of a microvessel. Large vessels and sinuses were excluded from counting. The area of one high-power field is 0.069mm². Results were expressed as number of microvessels/mm². IgVH mutation status was determined as described in detail elsewhere (22). Genetic abnormalities were detected by fluorescent in situ hybridization (FISH) using commercially available Vysis probes and kits (Abbott, Chicago, IL, USA) and standard methodology recommended by manufacturer.

Statistical assessment

Software Analyse-It (Analyse-It Software Ltd., UK) was used for statistical evaluation.. Each group was tested by Shapiro-Wilk test for data normality. As data in all groups showed non-normal distribution, non-parametrical Mann-whitney U test was utilised; p-levels lower than 0.05 were considered statistically significant. All p-levels are 2-sided.

Results

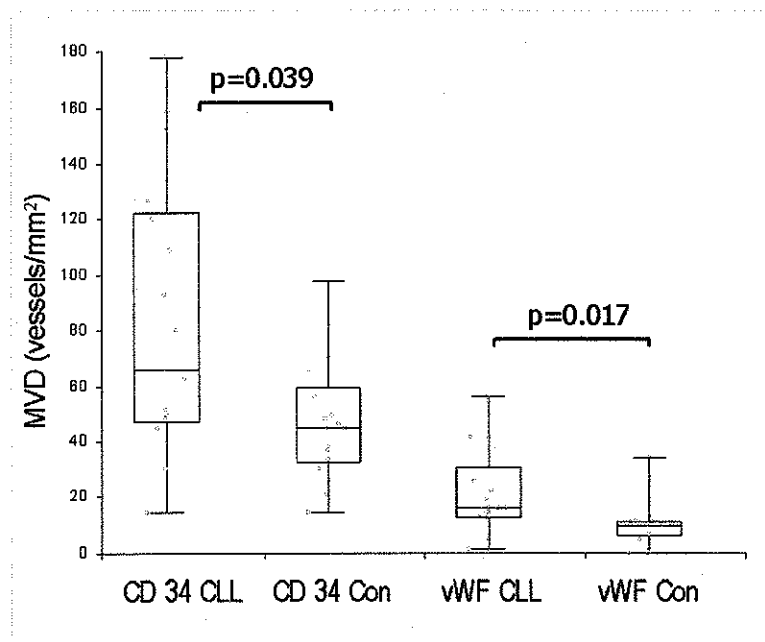
MVD was significantly elevated in CLL group in comparison to controls using either antibody (CD34, mean \pm standard deviation [SD], 75.6 \pm 50.6, 95% confidence interval of mean [CI], 53.2-98.1 vessels/mm² vs. 47.4 \pm 21.8, 95% CI, 36.2-58.6 vessels/mm², p=0.039; vWF, 21.3 \pm 16.5 vessels/mm², 95% CI, 13.1-29.5 vs. 11.5 \pm 8.5, 95% CI, 6.8-16.2 vessels/mm², p=0.017). However, no significant MVD differences were detected between CLL subgroups with regard to clinical course, pattern of marrow infiltration, Rai stage, FISH abnormalities or IgVH mutation status (data not shown). Interestingly, there was a significant difference between MVD counts according to antibody used: MVD was higher using CD34 vs.vWF in CLL as well as control group (p<0.0001 for both). Results are summarized in Table 1.

	Microvessel density	
	CD34	vWF
CLL vs. controls	0.039	0.017
Diffuse vs. non-diffuse infiltration	0.133	0.536
Rai 0 vs. I-IV	0.144	0.139
Stable vs. progressive disease	0.898	0.114
IgVH mutated vs. unmutated	0.172	0.383
Favourable vs. unfavourable FISH	0.705	0.105

CD 34 vs. vWF CLL 0.0002

CD 34 vs. vWF controls <0.0001

Table 1: Results of statistical comparisons between the subgroups. All p-levels are 2-sided.



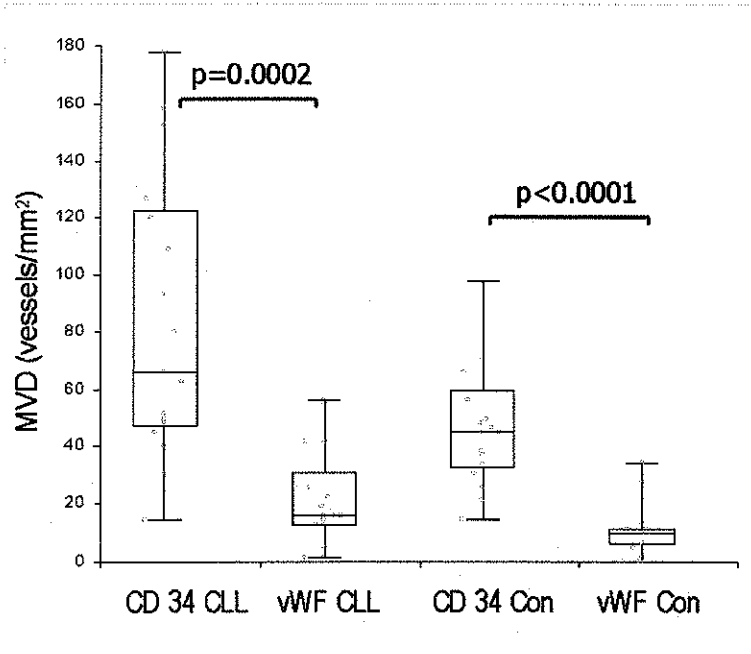


Fig. 1 a,b: Box and dot plots showing significantly higher microvessel density in CLL vs. controls using either of the antibodies (Fig. 1a) and significantly higher MVD obtained with CD34 vs. vWF antibody in both groups (Fig. 1b). Con, controls.

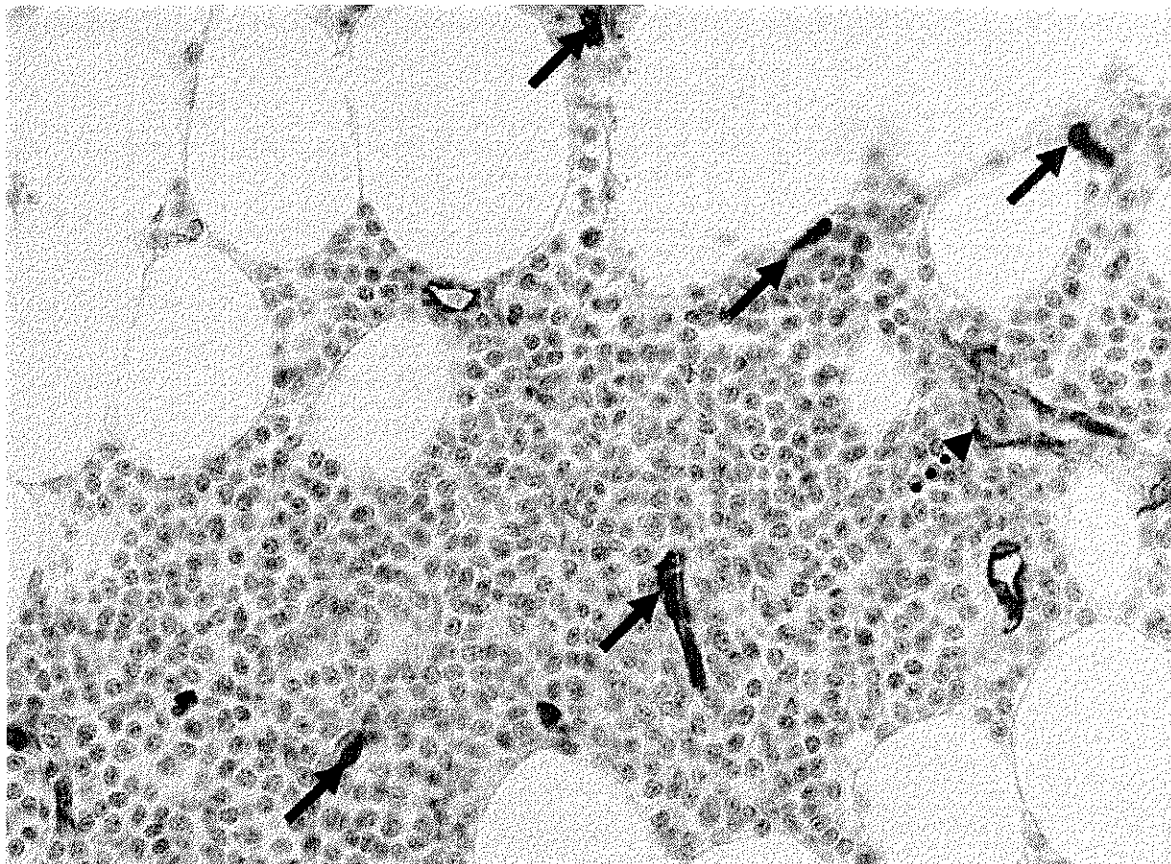


Fig. 2a

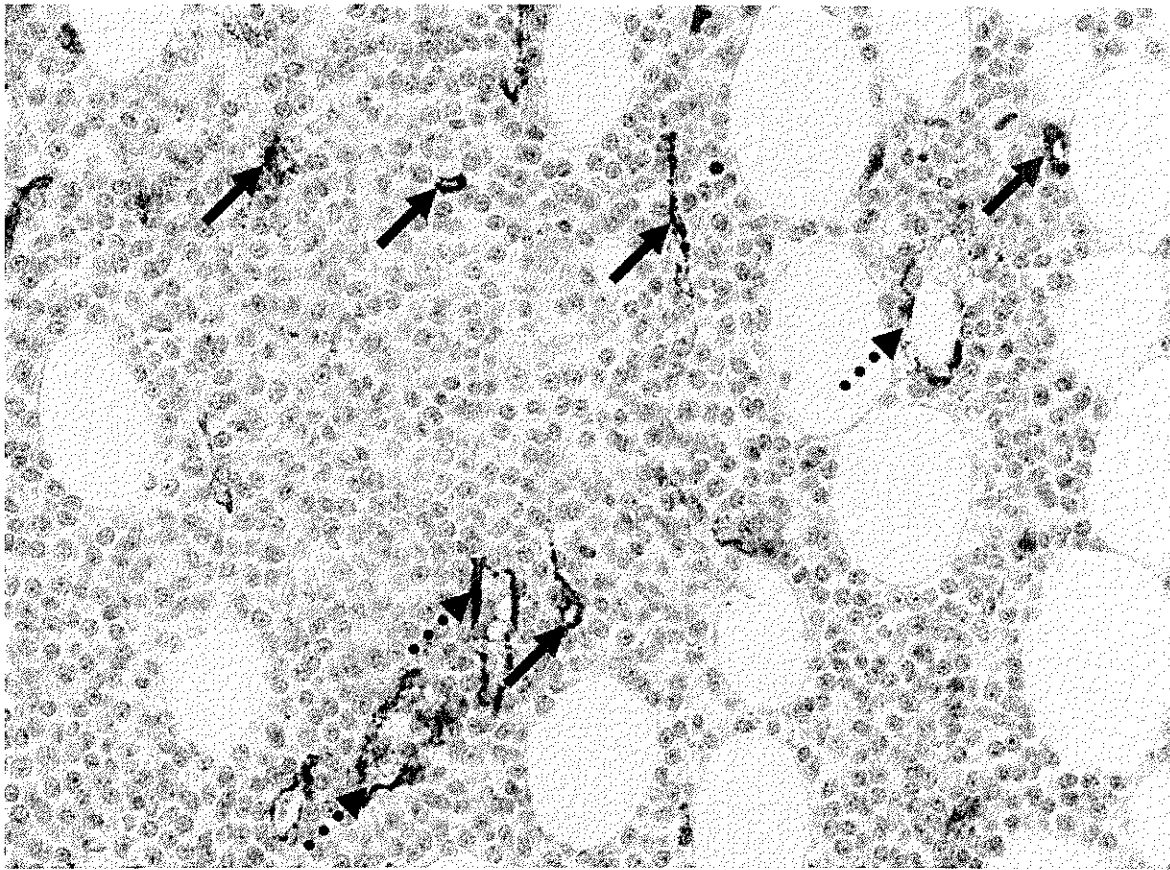


Fig. 2b

Fig. 2 a,b: Immunohistochemical staining using CD34 (Fig. 2a) and vWF (Fig. 2b) monoclonal antibodies. Magnification x400. Examples of microvessels are marked with full arrows, sinuses and large vessels (which must not be counted) with dashed arrows.

Discussion and conclusions

Assesment of bone marrow microvessel density has been widely reported as a standard method of investigation of angiogenesis in hematological malignancies (11-14). Nevethless, results of studies on marrow neovascularization in CLL are inconsistant (15-20), possibly due to limited number of patient cohorts and different method of MVD assessment methodology, including use of different monoclonal antibodies for endothelial cells staining. In the present study, we examined bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia patients using two most commonly applied endothelial markers, CD34 and vWF. MVD was significantly higher in CLL in comparison to age- and sex-matched controls using either antibody. This is in agreement with studies using similar methodology (15,16,18-20).

Importantly, staining with anti-CD34 resulted in significantly higher MVD counts than with anti-vWF antibody. These results are in concordance with the only similar study by Norrby et al. who compared three different antibodies in B-cell lymphomas including five cases of CLL (21). In addition, when subgroups divided according to various prognostic factors were analysed, different results were obtained with CD34 vs. vWF. These results have nevertheless to be interpreted with caution owing to small numbers of samples in the subgroups and possible selection bias in our cohort.

Bone marrow microvessel density is a simple, relatively inexpensive and feasible method of angiogenesis assessment. The main disadvantage of this approach is the need for histological specimen. Bone marrow trephine biopsy is a painful and demanding procedure for the patient; more importantly, the prognostic value of bone marrow examination (the pattern of infiltration) is becoming limited at present time due to effective treatment options probably capable of erasing its prognostic significance. Therefore, the proportion of patients undergoing bone marrow biopsy is decreasing.

In conclusion, our study highlights the importance of selection of endothelial marker for MVD quantification. Larger studies using standardized methods are needed to enable direct comparison of results between different centers and to help to elucidate the real clinical significance of bone marrow angiogenesis in this disease.

References

1. Montillo M., Hamblin T., Hallek M. et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005;90(3):391-9.
2. Molica S, Vacca A, Levato D et al. Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2004; 28(4):321-4.
3. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006; 33(2):174-85.
4. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002;16(5):911-9.
5. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96(6):2240-5
6. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. Bcl-2 expression correlates positively

- with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;113(2): 400-6.
7. Molica S, Vitelli G, Levato D et al. Clinicoprognotic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer.* 2002; 86: 31-35
 8. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm.* 2003;12(3):167-71.
 9. Smolej L., Maisnar V., Andrýs C., Pour L., Malý J. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005; 48 (1): 57-8
 10. Smolej L, Andrys C, Pekova S et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91(10): 1432-1433.
 11. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):3111-6.
 12. Niemoller K, Jakob C, Heider U et al. Bone marrow angiogenesis and its correlation with other disease characteristics in multiple myeloma in stage I versus stage II-III. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(4):234-8
 13. Korkolopoulou P, Gribabis DA, Kavantzias N et al. A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Br J Haematol.* 2003;122(6):900-10.
 14. Panteli K, Zagorianakou N, Bai M et al. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. *Eur J Haematol.* 2004;72(6):410-5.
 15. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000;14(8):1414-8.
 16. Sezer O, Niemöller K, Jakob C et al. Increased bone marrow angiogenesis is of prognostic relevance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001; 98 (11):361a (abstract)
 17. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, Vitelli G, Tucci L, Roccaro AM, Dammacco F. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(9):3344-51.

18. Wolowiec D, Wozniak Z, Potoczek S, Ganczarski G, Wrobel T, Kuliczkowski K et al. Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004;26(5):263-70.
19. Kašparová P., Smolej L. Angiogenesis in the bone marrow of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ces.-slov. Patol.* 2007; 43(2):50-58
20. De Raeve HR, Vermeulen PB, Vanderkerken K et al. Microvessel density, endothelial-cell proliferation and carbonic anhydrase IX expression in haematological malignancies, bone-marrow metastases and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Virchows Arch.* 2004;445(1):27-35.
21. Norrby K, Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS.* 2003;111(4):483-9.
22. Pekova S, Markova J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn.* 2005;9(1):23-34.

6. Závěry a diskuze

V rámci dizertační práce byly zjištěny následující skutečnosti:

- 1) Angiogenní aktivátory bFGF, VEGF, sCD105 a inhibitor endostatin byly významně zvýšeny v plazmě periferní krve nemocných s neléčenou CLL.
- 2) Koncentrace sCD105 byly významně vyšší u nemocných s pokročilým klinickým stádiem a progresivním průběhem onemocnění.
- 3) Koncentrace bFGF byly významně zvýšeny u nemocných s mutovanými vs. nemutovanými geny pro IgVH.
- 4) Koncentrace VEGF byly významně vyšší u nemocných s nízkou expresí ZAP-70.
- 5) Nebyla prokázána souvislost endostatinu s klasickými či moderními prognostickými ukazateli u CLL.
- 6) bFGF a VEGF v plazmě periferní krve významně poklesly po úspěšné léčbě založené na fludarabinu.
- 7) Mikrovaskulární denzita byla významně zvýšena v kostní dřeni CLL pacientů.
- 8) Nebyla prokázána souvislost mikrovaskulární denzity s prognostickými faktory.
- 9) Nebyla prokázána korelace mezi mikrovaskulární denzitou v kostní dřeni a koncentracemi angiogenních faktorů v periferní krvi.
- 10) Hodnoty mikrovaskulární denzity byly významně závislé na druhu použitého endotelového markeru (významně vyšší MVD při použití CD34 vs. vWF).

Zvýšení cirkulujících angiogenních faktorů v periferní krvi u nemocných s CLL bylo prvně publikováno v práci Duensinga v r. 1995, který popsal zvýšení bFGF v séru u pilotního souboru 18 pacientů s CLL. Lze říci, že nejvíce prací bylo publikováno na téma dvou nejznámějších aktivátorů angiogeneze, tedy VEGF a bFGF, zatímco u ostatních ukazatelů angiogeneze jde často o jednu až dvě studie. Přímému porovnání mezi jednotlivými publikacemi často brání různorodost patientských kohort z hlediska věku či klinického stádia, v některých publikacích se setkáváme se závažnějšími metodickými problémy, jako je naprostá absence či nedostatečný rozsah kontrolní skupiny či zařazení nemocných, kteří před hodnocením angiogeneze již podstoupili cytoredukční léčbu. V naší práci jsou proto zařazení výhradně nemocní s neléčenou CLL a kontrolní skupiny jsou použity v takovém rozsahu, aby minimalizovaly chybu malých čísel. Další zásadní otázkou z metodického hlediska je materiál, ve kterém cirkulující angiogenní faktory stanovovat. Ačkoliv naprostá většina studií použila krevní sérum, v našich pracech používáme krevní plazmu, a to z důvodů možného významného zvýšení konečných koncentrací angiogenních faktorů v séru v důsledku jejich uvolnění z trombocytů během tvorby krevního koláče – to platí především pro VEGF, ale také např. pro endostatin. Vycházíme přitom

z několika publikací, které upřednostňují krevní plazmu před krevním sérem z hlediska přesnějšího a realitě lépe odpovídajícího hodnocení angiogenních faktorů. V otázce konkrétních výsledků se naše závěry týkající se zvýšení bFGF a VEGF shodují se studii Duensinga et al., 1995, Aguayo et al., 2000, Molica et al. 2002, Gora-Tybor et al., 2002. Wolowiec et al., 2006 pozoroval signifikantní zvýšení bFGF, nikoliv však VEGF u skupiny nemocných s CLL. Podobně Molica et al., 1999, nezjistil významné zvýšení VEGF vůči kontrolám. Domnívám se, že jde o vliv výběru pacientů do studie a také vliv malých čísel na statistické testy, pro což svědčí i fakt, že v následující studii již Molica et al. (2002) signifikantní zvýšení zjistili. Stejných výsledků jsme dosáhli při porovnání naší pilotní studie z roku 2005 (zvýšení bFGF, ne však VEGF) a rozšířené kohorty pacientů i kontrol z r.2007, kde již bylo zvýšení VEGF vysoce signifikantní. Vyhodnocení souvislosti angiogenních faktorů s již zavedenými prognostickými faktory je nutno považovat za pilotní data vzhledem k počtu dosud vyhodnocených pacientů. Zajímavým (a prioritním) nálezem týkajícím se moderních prognostických faktorů bylo hraniční zvýšení bFGF u nemocných s mutovanými vs. nemutovanými geny pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH), které by bylo možné vysvětlit odlišným profilem genové exprese těchto dvou podskupin CLL. Mezi geny odlišujícími tyto dvě podskupiny je mimo jiné i receptor pro FGF. V každém případě je však nutné data ověřit na větším počtu nemocných a problematikou zkoumat také z hlediska receptorů pro FGF, což je oblast, kde je k dispozici naprosté minimum dat. V otázce solubilního endoglinu (sCD105) jsou naše práce zcela prioritní. Hodnocení angiogenního inhibitoru endostatinu je možné porovnávat pouze s dvěma pracemi polských autorů (Gora-Tybor et al., 2003 a Wolowiec et al., 2006), kteří navíc hodnotili endostatin v séru. Ani jedna z těchto prací neprokázala signifikantní zvýšení endostatinu vůči kontrolám. V první z těchto studií byly koncentrace endostatinu nižší u pacientů v pokročilých stádiích a u nemocných s progresivním průběhem choroby. Wolowiec et al. naopak nezjistili významných rozdílů v koncentracích endostatinu mezi stabilní a progresivní chorobou; nižší endostatin byl (na hranici statistické významnosti) spojen s delším obdobím do progresu. Tento trend jsme pozorovali i v naší studii, nebyl však statisticky významný. Data týkající se významného poklesu bFGF a VEGF po intenzivní léčbě fludarabinovými kombinačními režimy jsou ve shodě s prací Gora-Tybor et al., která pozorovala významné snížení bFGF po léčbě kladribinem.

V oblasti hodnocení mikrovaskulární denzity ve dřeni pacientů s CLL jsou naše výsledky v otázce zvýšení MVD vůči kontrolám ve shodě s pracemi Kini et al., 2001, Molica et al., 2002, De Raeve et al., 2004 či Wolowiec et al., 2004. Složitější je dále porovnání výsledků týkající se závislosti MVD na typu infiltrace, kde jsou výsledky zcela rozporuplné – to je dáno mj. i omezeným rozsahem patientských souborů a z toho plynoucí nízkou silou statistických testů.

V naší práci jsme se pokusili i o zhodnocení souvislosti MVD a prognostických faktorů, data je však nutno považovat za zcela pilotní. Vzhledem k tomu, že trepanobiopsické vyšetření se u CLL provádí stále méně (např. ke stanovení diagnózy CLL není vůbec zapotřebí a od vyšetření při progresi se také ustupuje), je velmi obtížné shromáždit dostatečně velký soubor pacientů, kde by byla histologie dřeně k dispozici. Vyšetření je pro nemocného také výrazně více zatěžující než odběr krve pro stanovení angiogenních faktorů a hodnocení MVD lze považovat za méně exaktní než kvantifikaci angiogenních faktorů v periferní krvi, proto tento typ hodnocení angiogeneze u CLL pokládám pro budoucnost za málo přínosný.

Domnívám se, že ve výše uvedených pracech jsme přispěli k posunu znalostí o angiogenezi u chronické lymfocytární leukémie. Řada výsledků je pilotního charakteru a je nutné jejich ověření a podrobnější vyhodnocení v této dosud málo prozkoumané oblasti. Metodami, které by do budoucna mohly obohatit výzkum angiogeneze u CLL, a u kterých již máme k dispozici úvodní data, jsou např. stanovení exprese angiogenních faktorů či jejich receptorů pomocí PCR či vyšetření endoteliálních mikropartikulí a/nebo cirkulujících endoteliálních buněk a jejich prekurzorů v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie. Věřím, že výzkumem v této oblasti bude možno přispět nejen k dalšímu poznání etiopatogeneze CLL a lepší prognostické stratifikaci jednotlivých nemocných, ale také ke zlepšení léčebných výsledků, ať již individualizovanější klasickou chemo(imuno)terapií, či použitím antiangiogenní léčby.

7. Přílohy

7.1 Literatura

1. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E et al. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res.* 2004; 28: 243-248.
2. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 1999;59:728-733
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981;48:198-206.
4. Byrd JC, Rai K, Peterson BL et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood.* 2005;105(1):49-53.
5. Chanan-Khan A, Porter CW. Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2006;7(6):480-8.
6. Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al. National Cancer Institute–sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87:4990-4997.
7. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-6.
8. Eichhorst B, Busch R, Hopfinger G et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107:885-891
9. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795—803.

10. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1(1):27-31.
11. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000;95:309-313.
12. Kay NE, Jelinek DF, Peterson L. Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2001;25(8):709-10.
13. Keating MJ, Flinn I, Jain V et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood.* 2002; 99(10):3554-61.
14. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23:4079-4088.
15. Korkolopoulou P, Gribabis DA, Kavantzias N et al. A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Br J Haematol.* 2003;122(6):900-10.
16. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1245-60.
17. Leparrier M, Chevret S, Cazin B et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood.* 2001;98:2319-2325.
18. Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000; 111(1):43-51.

19. Mavromatis B.H., Cheson B.D. Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 2004;18(2):137-48.
20. Molica S, Vacca A, Tucc L, Ribatti D. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia following fludarabine therapy. *Haematologica.* 2005;90(5):698-700.
21. Moreton P, Kennedy B, Lucas G et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol.* 2005;23:2971-2979.
22. Niemoller K, Jakob C, Heider U et al. Bone marrow angiogenesis and its correlation with other disease characteristics in multiple myeloma in stage I versus stage II-III. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(4):234-8
23. Oscier D, Fegan C, Hillmen P et al. Guidelines Working Group of the UK CLL Forum. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125(3):294-317.
24. Paneesha S, Milligan DW Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;128(2):145-52.
25. Panteli K, Zagorianakou N, Bai M et al. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. *Eur J Haematol.* 2004;72(6):410-5.
26. Peterson LC, Kini AR, Kay NE. Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001; 97: 2529.
27. Rajkumar SV, Witzig TE. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev.* 2000;26: 351-362.
28. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46:219-234.

29. Ribatti D, Molica S, Vacca A et al. Tryptase-positive mast cells correlate positively with bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17(7):1428-30.
30. Sezer O, Niemoeller K, Jakob C et al. Increased bone marrow angiogenesis is of prognostic relevance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98 (11):361a (abstract)
31. Shanafelt TD, Call TG. Current Approach to Diagnosis and Management of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:388-398
32. Vacca A, Ribatti D, Roncali L et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994;87:503-508.
33. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H et al. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost*. 1998;80(1):171-5.

7.2 Seznam použitých zkratk

ANG	angiopoetin
ATP	adenosin trifosfát
ATM	gen mutovaný u ataxie-telangiektázie
bFGF	bazický růstový faktor pro fibroblasty
CD105	endoglin
CHOP	cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison
CLB	chlorambucil
COP	cyklofosfamid, vinkristin, prednison
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CLLU-1	gen zvýšený u CLL-1
CML	chronická myeloidní leukémie
CMV	cytomegalovirus
CR	kompletní remise
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
del	delece
FC	fludarabin, cyklofosfamid
FCR	fludarabin, cyklofosfamid, rituximab
FR	fludarabin, rituximab
FGF	růstový faktor pro fibroblasty
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
Flt	fms-like tyrozinová kináza
Flk	fetální jaterní kináza
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor
GvL	reakce štěpu proti leukémii
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli
Hb	hemoglobin
HGF	hepatocytární růstový faktor
HIF	hypoxií indukovaný faktor
IL-4	interleukin-4
IgVH	geny pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu
LDH	laktát dehydrogenáza
LDT	zdvojovací čas lymfocytů

LPL	lipoproteinová lipáza
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu
MM	mnohočetný myelom
MMP	matrix metaloproteináza
MSA	mikrovaskulární plocha cév
MVD	mikrovaskulární denzita
NCI	Národní institut pro výzkum rakoviny
NHL	ne-Hodgkinův lymfom
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFS	období bez progresu
PR	částečná odpověď
sCD23	solubilní CD23
sCD105	solubilní endoglin
sIg	povrchový imunoglobulin
SDF-1	faktor derivovaný ze stromatu-1
TGF-beta	transformující růstový faktor-beta
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TNF-alfa	tumor nekrotizující faktor alfa
TSP-1	trombospondin-1
VEGF	cévní endotelový růstový faktor
vWF	von Willebrandův faktor
ZAP-70	zeta-asociovaný protein o 70 kilodaltonech