

Stężenia VEGF i bFGF w surowicy krwi chorych na chłoniaka Hodgkina

Maria Kowalska¹, Janina Kamińska¹, Małgorzata Fuksiewicz¹, Beata Kotowicz¹,
Alicja Siedlecka¹, Joanna Tajer², Jan Walewski²

Wstęp. Celem pracy było określenie zależności pomiędzy stężeniami VEGF i bFGF w surowicy krwi, a parametrami kliniczno-patologicznymi oraz wybranymi parametrami laboratoryjnymi u chorych na chłoniaka Hodgkina (HL).

Pacjenci i metody. Badaniami objęto 61 chorych w wieku 15-63 lat (mediana wieku: 26 lat) z potwierdzonym histopatologicznie chłoniakiem Hodgkina, leczonych w latach 1997-2003 w Centrum Onkologii - Instytucie, w Warszawie. U chorych tych badaniami histopatologicznymi wykluczono infekcję wirusem EBV. Cytokiny oznaczano w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA, zestawami firmy R&D. Zakres normy dla cytokin określano na podstawie badań wykonanych u 50 zdrowych osób. Do analiz statystycznych zastosowano test Mann-Whitney'a i test Kruskalla-Wallisa.

Wyniki. Wykazano istotnie wyższe stężenia cytokin u chorych na HL w porównaniu do osób zdrowych. Wykazano istotnie wyższe stężenia obu badanych cytokin u chorych z objawami ogólnymi. Natomiast tylko stężenia bFGF korelowały ze stopniem zaawansowania klinicznego. Nie wykazano zależności statystycznych pomiędzy stężeniami badanych cytokin a wiekiem, płcią, podtypem histopatologicznym, liczbą zajętych chorobą miejsc limfatycznych i wielkością zmian w śródpiersiu. Z badanych parametrów laboratoryjnych wykazano korelację pomiędzy wartością OB, a stężeniami obu cytokin.

Podsumowanie. Wstępne wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania oznaczeń stężeń bFGF w monitorowaniu leczenia chorych na HL.

Serum VEGF and bFGF levels in patients with Hodgkin's lymphoma

Introduction. The study aimed to relate serum VEGF and bFGF concentrations to the clinico-pathological and blood parameters of patients with Hodgkin's lymphoma (HL).

Patients and methods. Sixty one patients (age 15–63 years, median age 26 years) with pathologically confirmed HL and no EBV infection, treated in the Cancer Center and Institute of Oncology in Warsaw between 1997 and 2003, were included. Serum cytokine levels were measured by the commercially available kits of R&D Systems, Minneapolis. Normal ranges were assessed in 50 healthy blood donors. For the statistical analysis Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were employed.

Results. Serum VEGF and bFGF levels were found to be significantly higher in HL patients than in normals. Within the patients group, those with systemic symptoms presented significantly higher concentrations of VEGF and bFGF. However, only bFGF concentrations correlated with the clinical stage of HL. The cytokines studied did not relate to patient age, sex, histopathological type of tumour, the number of lymph node regions involved or the extent of mediastinum involvement. Both cytokines were found to correlate with the erythrocyte sedimentation rate.

Conclusions. The preliminary results presented here suggest the potential use of bFGF assessment for monitoring of patients treated for HL.

Słowa kluczowe: chłoniak Hodgkina, VEGF, bFGF, angiogeneza

Key words: Hodgkin's lymphoma, VEGF, bFGF, angiogenesis

Wstęp

W diagnostyce chorób nowotworowych poszukuje się nieustannie nowych markerów nowotworowych, których oznaczanie mogłoby być pomocne zarówno w szeroko pojętej diagnostyce, jak i w monitorowaniu leczenia chorych. Szczególnie przydatne byłyby markery, których stężenia można oznaczać w surowicy krwi. W ostatnich latach zwrócono uwagę na cytokiny, w tym proangiogen-

¹ Zakład Markerów Nowotworowych

² Klinika Nowotworów Układu Chłonnego
Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie

ne, których rola w przebiegu procesów nowotworowych jest udowodniona. Wiadomo, że cytokiny proangiogenne biorą udział w angiogenezie, czyli powstawaniu nowych naczyń z już istniejących. Proces ten jest niezbędny nie tylko do wzrostu guza, ale również umożliwia przedostanie się komórek nowotworowych do światła naczyń i powstawania przerzutów. W piśmiennictwie liczne prace dotyczyły przede wszystkim naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) oraz zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF). Autorzy prac badali zależności pomiędzy ich stężeniami w surowicy krwi, a parametrami kliniczno-patologicznymi [1-9].

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono tylko nieliczne prace, których tematem była najczęściej ekspresja VEGF i bFGF w komórkach Hodgkina i Reed-Sternberga (H-RS) [10-13]. Natomiast nie znaleziono żadnych doniesień, w których autorzy analizowaliby związek stężeń VEGF i bFGF w surowicy krwi z parametrami kliniczno-patologicznymi u chorych na chłoniaka Hodgkina.

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy stężeniami VEGF i bFGF w surowicy krwi, a parametrami kliniczno-patologicznymi i wybranymi parametrami laboratoryjnymi.

Pacjenci i metody

Badaniami objęto 61 chorych z potwierdzonym histopatologicznie chłoniakiem Hodgkina, w tym 37 kobiet i 24 mężczyzn w wieku 15-63 lat (mediana wieku: 26 lat), leczonych w latach 1997-2003 w Centrum Onkologii – Instytucie, w Warszawie. U chorych badaniami histopatologicznymi wykluczono infekcję wirusem EBV. Charakterystykę chorych przedstawiono w Tabeli I.

U badanych chorych w surowicy krwi oznaczano stężenia VEGF i bFGF zestawami firmy R&D Systems (Minneapolis, USA). Ustalono własne normy dla stężeń cytokin u 50 zdrowych osób (grupa referencyjna) w wieku od 19 do 74 lat (mediana wieku: 42 lata) dla punktów odcięcia przyjęto jako wartość odcinającą 5 i 95 percentyla.

Do obliczeń statystycznych stosowano program Statistica PL. 6.0 for Windows, oraz Excel 7.0 for Windows oraz program MedCalc.

Dla porównania dwóch niezależnych prób korzystano z testu U Mann-Whitney'a, a dla więcej niż dwóch niezależnych prób z testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Dla określenia siły związku pomiędzy analizowanymi zmiennymi i kierunku ich zależności korzystano z rachunku korelacji rang Spearmana.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Centrum Onkologii-Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Tab. I. Charakterystyka kliniczno-patologiczna chorych na HL

	Liczba chorych
Wiek	
≤30	40/61
>30	21/61
Płeć	
kobiety	37/61
mężczyźni	24/61
Stopień zaawansowania klinicznego (wg Ann Arbor)	
I	7/61
II	41/61
III	8/61
IV	5/61
Klasyfikacja histopatologiczna	
NS – stwardnienie guzkowe	45/61
MC – postać mieszano-komórkowa	7/61
LD – z zanikiem limfocytów	5/61
LP – z przewagą limfocytów	1/61
nie oceniano	3/61
Objawy ogólne	
brak	35/61
obecne	26/61
MMR*	
<1/3	34/61
>1/3	27/61
Liczba zajętych miejsc limfatycznych	
<3	24/61
≥3	37/61

* rozległość zmiany w śródpiersiu

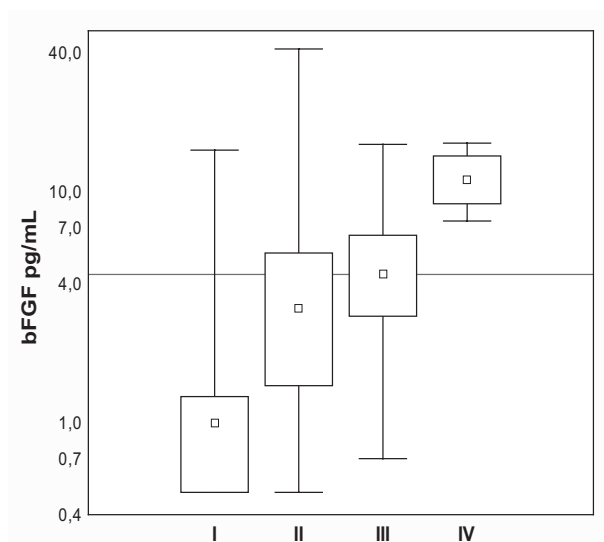
Wyniki

Stężenia badanych cytokin u chorych na HL

U badanych chorych oznaczono w surowicy krwi stężenia cytokin proangiogennych VEGF i bFGF. W Tabeli II przedstawiono wartość median, zakres stężeń u osób zdrowych i chorych oraz procent podwyższonych wyników cytokin oznaczonych u badanych chorych. W oparciu o porównanie testem Mann-Whitney'a stwierdzono istotnie wyższe stężenia cytokin u chorych. Wykazane różnice były na wysokim poziomie istotności wynoszącym

Tab. II. Wartości median oraz zakres stężeń VEGF i bFGF (pg/ml) u osób zdrowych i chorych na HL

Cytokiny	Zdrowi		Chorzy		Chorzy vs Zdrowi	Odsetek chorych z podwyższonymi stężeniami (%)
	mediana	zakres	mediana	zakres		
VEGF	94,0	(9-325)	353	(66-2000)	p<0,0000	55
bFGF	1,0	(0,5-4,4)	3,35	(0,5-41,7)	p<0,0001	39



Ryc. 1. Rozkład stężeń i median bFGF w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego chorych na HL

$p < 0,0001$. U ponad 50% chorych stwierdzono podwyższone stężenia VEGF.

Korelacja stężeń cytokin z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi

Testem Kruskal-Wallis'a ANOVA i współczynnikiem korelacji rang Spearmana stwierdzono, że tylko stężenia bFGF ($R=0,41$; $p < 0,002$) narastają wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego (Ryc. 1). Wykazano istotnie wyższe stężenia obu badanych cytokin VEGF i bFGF u chorych z objawami ogólnymi (Ryc. 2). Nie wykazano natomiast zależności statystycznych pomiędzy stężenia-

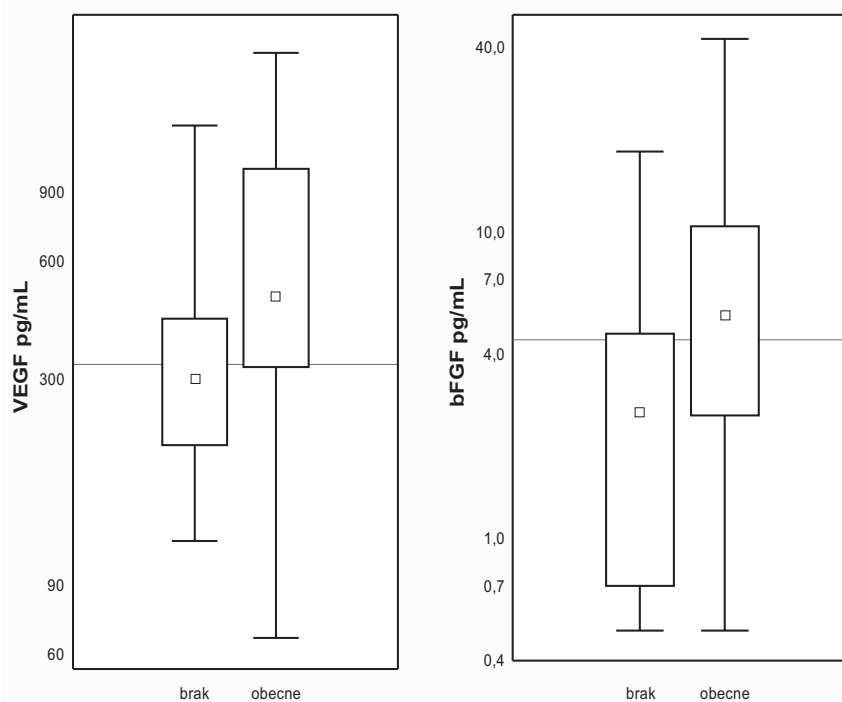
Tab. III. Zależności pomiędzy stężeniami VEGF i bFGF, a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi

Cechy kliniczno-patologiczne	VEGF	bFGF
Wiek		
≤30 vs >30	NS	NS
Stopień zaawansowania klinicznego		
I vs II vs III vs IV	NS	$p < 0,016$
Objawy ogólne		
brak vs obecne	$p < 0,029$	$p < 0,011$
MMR*		
<1/3 vs >1/3	NS	NS
Liczba zajętych miejsc limfatycznych		
< 3 vs ≥ 3	NS	NS
Płeć		
kobiety vs mężczyźni	NS	NS
Klasyfikacja histopatologiczna	NS	NS
NS vs inne		

* rozległość zmiany w śródpiersiu

mi tych cytokin, a wiekiem, płcią, podtypem histopatologicznym, liczbą zajętych chorobą miejsc limfatycznych i wielkością zmian w śródpiersiu. Zależności pomiędzy stężeniami badanych cytokin, a parametrami kliniczno-patologicznymi przedstawiono w Tabeli III.

Z badanych parametrów laboratoryjnych wykazano korelację pomiędzy wartością OB, a stężeniami VEGF ($p < 0,001$, $R=0,42$) i bFGF ($p < 0,000007$, $R=0,58$). Nie wykazano natomiast takiej zależności dla aktywności LDH.



Ryc. 2. Rozkład stężeń i median VEGF i bFGF w zależności od występowania objawów ogólnych u chorych na HL

Dyskusja

Przedstawione badania są jednymi z pierwszych, w których analizowane są zależności pomiędzy stężeniami w surowicy krwi cytokin proangiogennych VEGF i bFGF z parametrami kliniczno-patologicznymi u chorych na chłoniaka Hodgkina. U chorych na HL wykazano znamienne statystycznie podwyższone stężenia VEGF i bFGF u znacznego odsetka chorych. W dostępnym piśmiennictwie spotkano tylko jedną pracę, w której autorzy stwierdzili znamienne wyższe stężenia VEGF u chorych, nie obserwując takich różnic w stężeniach bFGF [14]. Pomimo, że u chorych na HL populacja komórek nowotworowych jest niewielka, to podobnie jak u chorych na nowotwory nielimfoidalne obserwuje się również istotnie wyższe stężenia cytokin proangiogennych VEGF i bFGF [1, 5-7, 15-18]. Wykazano również korelację pomiędzy stężeniami bFGF, a stopniem zaawansowania klinicznego. Natomiast w prowadzonych wcześniej badaniach u chorych na raka jelita grubego i płuca nie obserwowano takiej zależności [6, 7]. W badanej grupie chorych na HL wykazano istotnie wyższe stężenia w surowicy krwi VEGF i bFGF u chorych z objawami ogólnymi. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy stężeniami obu cytokin, a liczbą zajętych miejsc limfatycznych, podtypami histopatologicznymi, rozległością zmian w śródpiersiu, wiekiem i płcią. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono podobnych prac.

Interesujące również było określenie zależności pomiędzy stężeniami bFGF, a podtypami histopatologicznymi. Z danych literaturowych wiadomo, że jednym z wielu czynników odpowiedzialnych za proces włóknienia jest bFGF [10]. Cytokina ta, oprócz działania angiogenego, stymuluje również powstawanie zwłóknień w najczęstszym podtypie – *nodular sclerosis* [12, 19]. W naszych badaniach nie obserwowano w surowicy krwi żadnych zależności pomiędzy stężeniami bFGF, a podtypami histopatologicznymi.

Natomiast Ohshima i wsp. [10] obserwowali różnice pomiędzy ekspresją mRNA bFGF, a podtypami histopatologicznymi. Autorzy wykazali wyraźnie wyższą ekspresję bFGF w podtypie NS w stosunku do podtypów LP i MC. Interesujące było również to, że zwiększonej ekspresji bFGF w komórkach H-RS towarzyszyła również zwiększona ekspresja bFGF w komórkach podścieliska jak również w histiocytach. Niewielka ekspresja bFGF w podtypie MC i LP związana była z jego rzadko spotykaną ekspresją w komórkach naciekających.

Tylko nieliczni autorzy analizowali u chorych na HL znaczenie stężeń cytokin proangiogennych jako czynników prognostycznych. Giles i wsp. [14] wykazali wartość VEGF jako niezależnego czynnika prognostycznego. W naszych badaniach zbyt krótki czas obserwacji nie pozwolił na przeprowadzenie takiej analizy.

Przedstawione wyniki dotyczące zachowania się stężeń VEGF i bFGF w surowicy krwi chorych na HL w aspekcie podobnych analiz u chorych na raka jelita grubego, mięsaki tkanek miękkich i kości, potwierdzają skomplikowany charakter wzajemnych oddziaływań,

jakie zachodzą pomiędzy komórkami nowotworowymi, bez względu na ich stosunek ilościowy do komórek naciekających. Powyższe wyniki naszych badań, jak i innych autorów, sugerują, że w tak istotnym dla choroby nowotworowej procesie, jakim jest angiogeneza, odgrywają istotną rolę również inne cytokiny, a być może również inne nieokreślone białka.

Wstępne wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania oznaczeń stężeń bFGF w monitorowaniu leczenia chorych na HL

Dr Maria Kowalska

Zakład Markerów Nowotworowych
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Piśmiennictwo

1. Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A i wsp. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 249-52.
2. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K i wsp. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 144-6.
3. Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L i wsp. Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 85: 40-5.
4. Wu Y, Saldana L, Chillar R i wsp. Plasma vascular endothelial growth factor is useful in assessing progression of breast cancer post surgery and during adjuvant treatment. *Int J Oncol* 2002; 20: 509-16.
5. Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M i wsp. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 2003; 84: 151-9.
6. Kaminska J, Nowacki MP, Kowalska M i wsp. Clinical significance of serum cytokines measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I – an independent prognostic factor. *Tumor Biol* 2005; 26: 186-94.
7. Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B i wsp. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. *Oncology* 2006; 70: 115-25.
8. Ueno K, Inoue Y, Kawaguchi T i wsp. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in lung cancer patients: relevance to response of therapy and prognosis. *Lung Cancer* 2001; 31: 213-9.
9. Granato AM, Nanni O, Falcini F i wsp. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? *Breast Cancer Res* 2004; 6: 38-45.
10. Ohshima K, Sugihara M, Suzumiya J i wsp. Basis fibroblast growth factor and fibrosis in Hodgkin's disease. *Path Res Prac* 1999; 195: 149-55.
11. Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 2003; 201: 334-5.
12. Aldinucci D, Lorenzon D, Olivo K i wsp. Interactions between tissue fibroblasts in lymph nodes and Hodgkin/Reed-Sternberg-cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1731-9.
13. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzis N i wsp. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia* 2005; 19: 894-900.
14. Giles FJ, Vose JM, Do Kim-Anh i wsp. Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma. *Leukemia Res* 2004; 28: 595-604.
15. Davies MM, Jonas SK, Kaur S i wsp. Plasma vascular endothelial but not fibroblast growth factor levels correlate with colorectal liver metastasis vascularity and volume. *Br J Cancer* 2000; 82: 1004-8.
16. Graeven U, Andre N, Achilles E i wsp. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 577-81.

17. Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M i wsp. Cytokines serum levels in soft tissue sarcoma patients: correlations with clinico-pathological features and prognosis. *Int J Cancer* 2002; 100: 463-71.
18. Kumar H, Heer K, Lee P i wsp. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1279-85.
19. Skinnider BF, Mak Tak W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-97.

Otrzymano: 3 sierpnia 2006 r.

Przyjęto do druku: 12 grudnia 2006 r.