

# ANGIOGENEZA W SZPIKU KOSTNYM U CHORYCH NA CHŁONIAKI NIEZIARNICZE

Rafał Becht

Klinika Hematologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

## 1 WPROWADZENIE

Angiogeneza (neowaskularyzacja) nazywamy tworzenie się nowych naczyń krwionośnych z uprzednio już istniejącej sieci naczyniowej w odpowiedzi na lokalną stymulację [13]. Ten wieloetapowy proces obejmuje: proteolizę białek błony podstawnej naczyń krwionośnych i macierzy zewnątrzkomórkowej, pobudzenie pozostających w spoczynku komórek śródbłonna naczyniowego do proliferacji i migracji oraz przebudowę nowopowstałych sznurów naczyniowych, z wytworzeniem ich światła i powstaniem połączeń (anastomoz) pomiędzy nimi. Angiogeneza odgrywa ważną rolę w życiu embrionalnym podczas organogenezy, bierze również udział: przy odbudowie endometrium w trakcie cyklu menstruacyjnego, w formowaniu łożyska, w naprawie tkanek oraz w procesie gojenia się ran. Pobudzenie angiogenezy stwierdzono w przebiegu różnych chorób, między innymi w: reumatoidalnym zapaleniu stawów, sarkoidozie, łuszczycy, retinopatii cukrzycowej, a także w chorobach nowotworowych [1].

W 1971 roku Folkman opublikował pierwsze hipotezy dotyczące angiogenezy nowotworowej. Stwierdził on wówczas, że unaczynienie guza nowotworowego jest niezbędne do jego wzrostu poza stadium *in situ*. Tworzące się liczne nowe naczynia w obrębie guza zaopatrują go w substancje odżywcze i w konsekwencji stymulują proliferację i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych drogą krwionośną, determinując tym samym powstawanie i rozwój przerzutów. W nowotworach pozbawionych własnej sieci naczyniowej zachowana jest równowaga pomiędzy apoptozą (fizjologicznym obumiera-

niem komórek) a proliferacją, czyli wzrostem komórkowym, dzięki czemu nowotwór może znajdować się w stanie uśpienia. Stan ten jednak zostaje zaburzony poprzez uzyskanie zdolności do promowania wzrostu (pączkowania) nowych naczyń z sąsiednich kapilar – w procesie angiogenezy. Rozpoczęcie angiogenezy, zwane „przełomem angiogennym” (ang. *angiogenic switch*), powoduje wyhamowanie apoptozy, pobudzenie niepohamowanej proliferacji, co w konsekwencji daje szybki wzrost guza nowotworowego oraz tworzenie przerzutów odległych [2].

Do bezpośrednich stymulatorów angiogenezy zalicza się: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – *vascular endothelial growth factor*), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF – *basic fibroblast growth factor*) oraz czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – *hepatocyte growth factor*) [4].

W celu oceny angiogenezy stosowane są różne metody badawcze. Zasadniczo można je podzielić na dwie grupy, zaliczając do pierwszej ocenę stopnia unaczynienia tkanek, a do drugiej ocenę aktywności stymulatorów i inhibitorów endogennych lub egzogennych angiogenezy.

Po wielu latach pracy nad angiogenezą guzów litych, w ostatnich latach rozpoczęto badania nad angiogenezą w nowotworach hematologicznych [6, 7].

Pionierami w badaniach dotyczących angiogenezy w przebiegu rozrostów hematologicznych byli Perez-Atayde ze współpracownikami, którzy w 1997 roku wykazali wzrost gęstości naczyń w szpiku kostnym u dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej [8]. Podobne wyniki otrzymali Husong i wsp., badając trepanobioptaty od pacjentów z ostrą białaczką

szpikową, w porównaniu z grupą kontrolną [5]. Padro i współpracownicy wykazali ponadto korelację pomiędzy gęstością drobnych naczyń krwionośnych (MVD – *microvessel density*) w szpiku kostnym a wrażliwością na chemioterapię u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Badając angiogenezę w przebiegu szpiczaka mnogiego (MM – *multiple myeloma*) stwierdzono korelację MVD ze stadium klinicznego zaawansowania choroby, co przekładało się na złą prognozę choroby [10]. Zauważono również, że wysokiej neowaskularyzacji szpiku kostnego u pacjentów z MM towarzyszy delecja w chromosomie 13q, która jest jednym z niekorzystnych czynników prognostycznych w szpiczaku mnogim. Ribatti wraz ze współpracownikami w swych badaniach zauważył zwiększenie liczby kapilar w wycinkach z węzłów chłonnych u pacjentów z NHL o wysokim stopniu złośliwości [11]. Podobnie stwierdzono większe unaczynienie w biopsjach skóry w przypadkach progresywnego ziarniniaka grzybiastego. Wykazano również podwyższony poziom VEGF w surowicy u chorych z NHL przed rozpoczęciem leczenia. Po wieloczynnikowej analizie udowodniono, że wysoki poziom bFGF w surowicy jest niezależnym markerem prognostycznym u pacjentów z NHL, a co więcej Salven ze współpracownikami stwierdzili, że może on lepiej informować o przebiegu choroby niż dotychczas znane czynniki rokownicze, jak poziom dehydrogenazy kwasu mlekowego w surowicy oraz liczba pozawęzłowych lokalizacji chłoniaka [12]. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań można wnioskować, że poziom VEGF lub bFGF w surowicy przed rozpoczęciem leczenia może być nowym czynnikiem prognostycznym w przebiegu NHL [6, 12].

## 2 CELE

Celem pracy było ustalenie przydatności klinicznej oceny angiogenezy w szpiku kostnym u chorych na chłoniaki nieziarnicze, a w szczególności: ocena angiogenezy w szpiku kostnym w poszczególnych typach histologicznych chłoniaków nieziarniczych w porównaniu z grupą kontrolną. Podjęto również próbę ustalenia zależności między stopniem angiogenezy w szpiku kostnym a stopniem nacieczenia szpiku przez komórki chłoniaka. Badano wpływ leczenia przeciwnowotworowego (chemioterapia I linii)

na angiogenezę w szpiku kostnym. Analizowano angiogenezę w szpiku kostnym jako czynnik rokowniczy w nowotworach układu chłonnego.

## 3 MATERIAŁ I METODY

Analizą objęto 103 chorych (22 przypadki szpiczaka plazmocytozowego (*multiple myeloma*) – MM, 38 przypadków chłoniaka o niskim stopniu złośliwości – NHLLM, 43 przypadki chłoniaka o wysokim stopniu złośliwości – NHLHM), w tym 47 kobiet i 56 mężczyzn, z rozpoznaniem chłoniaka nieziarniczego (NHL – *non-Hodgkin lymphoma*), hospitalizowanych w Klinice Hematologii Pomorskiej Akademii Medycznej.

Biopsje szpiku zostały pobrane jako badania rutynowe przed wdrożeniem leczenia cytostatykami oraz po 4-6 tygodniach od zakończenia leczenia pierwszej linii, w celu ustalenia skuteczności leczenia.

Grupę kontrolną stanowiło 31 pacjentów (18 kobiet i 13 mężczyzn), u których badanie histologiczne szpiku kostnego wykonane było w trakcie rutynowego procesu diagnostycznego, przeprowadzanego z powodu innych (nienowotworowych) schorzeń hematologicznych.

Skrawki cylindra kostnego odpowiednio utrwalone i odwapnione, o grubości 2  $\mu\text{m}$  barwiono: hematoksyliną-eozyną, a w celu uwidocznienia unaczynienia w badanym materiale wykonano barwienia immunohistochemiczne, używając mysiego przeciwciała monoklonalnego przeciwko antygenowi CD34 – Class II clone QBEnd 10 (DakoCytomation) w rozcieńczeniu 1:50. Celem wizualizacji zastosowanych przeciwciał monoklonalnych użyto zestawu LSAB plus, HRP, DAB(+) (DakoCytomation, Dania) według instrukcji producenta.

Wykonano kontrolę pozytywną dla przeciwciała (skrawki śledziony) oraz kontrolę ujemną: poprzez reakcje z pominięciem przeciwciała swoistego oraz reakcję z zastąpieniem swoistego przeciwciała nieswoistą surowicą zwierzęcą (Mouse IgG1; DakoCytomation, Dania). Jądra komórkowe podbarwiono hematoksyliną Meyera.

Oceny angiogenezy w szpiku kostnym dokonano przy użyciu dwóch metod badawczych: analizy półilościowej w mikroskopie świetlnym oraz analizy morfometrycznej z zastosowaniem komputerowej analizy obrazu. W pierwszej metodzie preparaty szpiku kostnego wyznakowane przeciwciałem przeciw antygenowi CD34

oceniano w mikroskopie świetlnym (powiększenie  $\times 400$ ) i dokonano oceny wizualnej (tzw. subiektywnego wrażenia intensywności), stosując skalę intensywności barwnej struktur błonowych (*score*) od 1 do 3, przy czym 0 oznaczało brak barwienia lub barwienie nienadające się do analizy z innych przyczyn, 1 – słabą intensywność barwienia („niski stopień unaczynienia”), 2 – barwienie o średniej intensywności („pośredni stopień unaczynienia”) oraz 3 – barwienie o dużej intensywności („wysoki stopień unaczynienia”). W ocenie morfometrycznej w wybarwionych immunohistochemicznie preparatach szpiku kostnego, pod mikroskopem świetlnym w powiększeniu  $\times 400$  wyznaczano losowo trzy różne pola widzenia, z widoczną prawidłową reakcją barwną na komórki śródbłonna naczyniowego, które definiowano jako obszar pomiarowy. W każdym analizowanym preparacie zdefiniowany powyżej obszar pomiarowy (o wymiarach 0,20x0,15mm) rejestrowano i przenoszono za pomocą kamery cyfrowej (Sony Hyper HAD Model DXC-151AP) do komputera z programem do komputerowej analizy obrazu KS-300 wersja 3.0 (Carl Zeiss Vision GmbH, 1997). Przy jego użyciu dokonano pomiaru następujących parametrów: liczby naczyń, pola powierzchni naczyń (wyrażony w piksel<sup>2</sup>) oraz obwodu naczyń (wyrażony w pikselach).

Otrzymane dane liczbowe poddano opracowaniu matematycznemu (sumowanie, uśrednianie) i ostatecznie do analiz porównawczych użyto następujących parametrów ilościowych:

- 1 Liczba naczyń (LN) – będąca łączną liczbą naczyń z 3 pól widzenia w danym preparacie.
- 2 Suma powierzchni naczyń (SUM\_POW) – będąca sumą powierzchni naczyń z 3 pól widzenia.
- 3 Suma obwodów naczyń (SUM\_OBW) – będąca sumą obwodów naczyń z 3 pól widzenia.
- 4 Średnia powierzchnia naczynia ( $\bar{S}R\_POW$ ) – jest to średnia powierzchni pojedynczego naczynia w preparacie ( $SUM\_POW / LN$ ).
- 5 Średni obwód naczynia ( $\bar{S}R\_OBW$ ) – jest to średni obwód pojedynczego naczynia w preparacie ( $SUM\_OBW / LN$ ).

#### 4 METODY STATYSTYCZNE

Statystykę opisową podano w postaci średnich wartości, odchylenia standardowego oraz

wartości mediany. Badanie normalności rozkładu przeprowadzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Badanie jednorodności wariancji wykonano w przypadku porównywania dwóch grup testem F Snedecora. Ze względu na to, że rozkład większości parametrów odbiegał od rozkładu normalnego oraz nie było jednorodności wariancji w porównywanych grupach, a również ze względu na ujednoczenie obliczeń, przyjęto, tam gdzie to było konieczne, metody nieparametryczne.

Dla porównywania rozkładu pomiędzy parametrami angiogenezy (wartości średnich, mediany) a niektórymi czynnikami kliniczno-morfologicznymi dla zmiennych niezależnych użyto testu Kruskala-Wallisa i testu U-Manna-Whitney'a, a dla zmiennych zależnych test kolejności rang Wilcozona. Analizę parametrów jakościowych przeprowadzono metodami stosowanymi dla tablic wielodzzielczych, wstępnie zależności testowano testem Chi<sup>2</sup>, a siłę związku statystycznego oceniano za pomocą współczynnika Fi lub V<sub>c</sub>Cramera. Jednowariantowy związek między parametrami angiogenezy a czasem całkowitego przeżycia przedstawiono za pomocą krzywych Kaplana-Meiera. Porównanie przeżycia wykonano testem log-rank.

Wszystkie obliczenia wykonano, stosując jako graniczny poziom istotności  $p=0,05$ .

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet *STATISTICA*.

#### 5 WYNIKI BADAŃ

##### 5.1 Ocena półilościowa angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym (NHL) w czasie rozpoznania choroby

W analizowanej grupie 103 pacjentów w ocenie półilościowej angiogenezy (subiektywna ocena intensywności reakcji barwnej) u 47 pacjentów stwierdzono niski (*score 1*), u 41 pośredni (*score 2*), a u 15 wysoki (*score 3*) stopień unaczynienia w szpiku kostnym. Wykazano istotną statystycznie różnicę w unaczynieniu szpiku kostnego u pacjentów z NHL w porównaniu do szpiku grupy kontrolnej (tabela 1).

Tabela 1. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej u pacjentów z NHL.

p = 0,00006		Ocena półilościowa		
Grupa	N	score 1	score 2	score 3
NHL	103	47	41	15
Kontrola	31	28	3	0

### 5.2 Ocena morfometryczna angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów ze szpiczakiem plazmatycznokomórkowym (MM) w czasie rozpoznania choroby

Tabela 2. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie morfometrycznej u pacjentów z MM.

Rozpoznanie	N	Ocena morfometryczna					
		LN	SUM_POW	SUM_OBW	ŚR_POW	ŚR_OBW	
MM	22	75,36	58120,23	16669,78	882,63	238,59	Średnia
		51,98	37683,97	10433,85	567,77	89,70	SD
		66,00	64286,00	15491,64	828,15	236,30	Mediana
Kontrola	31	13,52	19237,52	4785,92	1504,96	369,88	Średnia
		7,04	10472,55	2415,97	603,09	114,38	SD
		11,00	17140,00	4318,76	1448,00	363,65	Mediana
P		0,000001	0,000150	0,000001	0,000840	0,000140	

### 5.3 Ocena półilościowa angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów ze szpiczakiem plazmatycznokomórkowym (MM) a stadium zaawansowania klinicznego choroby

W ocenie półilościowej unaczynienia w szpiku kostnym u pacjentów z MM stwierdzono, że w pierwszym stadium zaawansowania klinicznego według Durie i Salmona ponad połowa (66,7%) analizowanych przypadków miała niski stopień unaczynienia (*score 1*). Podobnie u ponad połowy (66,7%) pacjentów w drugim stadium zaawansowania klinicznego oceniono *score 2*. Wśród 10 pacjentów, u których w momencie rozpoznania szpiczaka plazmacytowego ustalono trzecie stadium zaawansowania klinicznego według Durie i Salmona, stwierdzono 4 przypadki z niskim stopniem unaczynienia w szpiku, 4 z pośrednim stopniem oraz w dwóch przypadkach wysoki stopień unaczynienia *score 3*. Wszystkie wymienione zależności pomiędzy stopniem unaczynienia szpiku ocenionym w metodzie półilościowej a stadium klinicznego zaawansowania choroby u pacjentów z MM nie były istotne statystycznie (tabela 3).

Tabela 3. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej a stadium klinicznego zaawansowania choroby wg Durie i Salmona u pacjentów z MM.

p = 0,57407		Ocena półilościowa		
Stadium	N	Score 1	Score 2	Score 3
I	3	2(66,67%)	1(33,33%)	0(0%)
II	9	2(22,22%)	6(66,67%)	1(11,1%)
III	10	4(40,00%)	4(40,00%)	2(20,00%)

### 5.4 Ocena półilościowa angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym o wysokim stopniu złośliwości (NHLHM) a typ rozrostu komórek chłoniaka

W grupie pacjentów z NHLHM w 12 przypadkach nie stwierdzono nacieku komórek chłoniaka w szpiku kostnym. U tych chorych unaczynienie w stopniu niskim stwierdzono w 6 przypadkach, unaczynienie w stopniu pośrednim w 5 przypadkach, a w stopniu wysokim w 1 przypadku. Rozrost typu śródmiąższowego był najczęściej rozpoznawany u pacjentów z NHLHM i towarzyszył mu najczęściej niski stopień unaczynienia w szpiku kostnym. Natomiast w litym rozroście komórek chłoniaka stwierdzano przede wszystkim pośredni

i wysoki stopień unaczynienia szpiku. Przedstawione powyżej różnice dotyczące zależności między stopniem angiogenezy w ocenie półilościowej a typem rozrostu komórek chłoniaka w szpiku kostnym u pacjentów z NHLHM były istotne statystycznie (tabela 4).

Tabela 4. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej a typ rozrostu komórek chłoniaka w szpiku u pacjentów z NHLHM.

P = 0,00426		Ocena półilościowa		
Typ rozrostu	N	Score 1	Score 2	Score 3
brak rozrostu	12	6(50,0%)	5(41,67%)	1(8,33%)
rozrost śródmiąższowy	25	16(64,0%)	9(36,0%)	0(0%)
rozrost rozlany	6	0(0%)	3(50,0%)	3(50,0%)

### 5.5 Angiogeneza w szpiku kostnym u pacjentów z NHL w różnych stopniach nacieku komórek chłoniaka

W analizowanych 22 preparatach szpiku kostnego pacjentów z MM stwierdzono 4 przypadki w stopniu I (<20% komórek), 4 przypadki w stopniu II (20-50% komórek) oraz 14 pacjentów miało nacieki w stopniu III (> 50% komórek). Największy stopień unaczynienia (*score* 3) stwierdzano tylko u 3 pacjentów z III stopniem nacieku, natomiast ponad połowa tych pacjentów miała unaczynienie ocenione w stopniu pośrednim (*score* 2). Wśród pacjentów z I stopniem nacieku ponad 75% miało angiogenezę ocenioną jako niską (*score* 1). Różnice te nie były istotne statystycznie.

O ile w grupie pacjentów z MM nie udało się wykazać istotności statystycznej dotyczących zależności pomiędzy stopniem nacieku komórek chłoniaka a angiogenezą w ocenie półilościowej, o tyle w przypadku pacjentów z NHLHM widać taką zależność, a różnice są istotne statystycznie (tabela 5).

Tabela 5. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej a stopień nacieku komórek chłoniaka w szpiku u pacjentów z NHLHM.

P = 0,03437		Ocena półilościowa		
Stopień nacieku	N	Score 1	Score 2	Score 3
NI(< 20%)	6	4(66,67%)	2(33,33%)	0(0%)
NII(20-50%)	9	7(77,78%)	2(22,22%)	0(0%)
NIII(>50%)	23	6(26,09%)	9(39,13%)	8(34,78%)

W grupie 43 pacjentów z NHLHM zwraca uwagę fakt, że ponad połowa pacjentów,

u których oceniono unaczynienie w szpiku jako niskie (*score* 1), miała nacieki komórek chłoniaka poniżej 20% (I stopień). Przedstawione różnice były istotne statystycznie (tabela 6).

Tabela 6. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej a stopień nacieku komórek chłoniaka w szpiku u pacjentów z NHLHM.

P = 0,00435		Ocena półilościowa		
Stopień nacieku	N	Score 1	Score 2	Score 3
NI (< 20%)	19	12(63,16%)	7(36,84%)	0(0%)
NII (20-50%)	16	10(62,50%)	5(31,25%)	1(6,25%)
NIII (>50%)	8	0(0%)	5(62,50%)	3(37,50%)

### 5.6 Angiogeneza w szpiku kostnym u pacjentów z NHL w różnych stopniach włóknienia w szpiku kostnym

W 103 preparatach histologicznych szpiku kostnego od pacjentów z NHL oceniono grubość włókien retikuliny wg Hernandez-Garcii i wsp. i po barwieniu immunohistochemicznym przeciwciałem CD34 dokonano oceny ekspresji komórek śródbłonka naczyniowego. Nie stwierdzono istotnych zależności między stopniem włóknienia a unaczynieniem szpiku (tabela 7). Podobnie jak w całej grupie badanej, tak i w poszczególnych typach histologicznych NHL nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy włóknieniem a stopniem unaczynienia szpiku.

Tabela 7. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej a stopień włóknienia w szpiku u pacjentów z NHL.

p = 0,21602		Ocena półilościowa		
Stopień włóknienia	N	Score 1	Score 2	Score 3
WI°	36	47,22%	47,22%	5,56%
WII°	45	48,89%	35,56%	15,56%
WIII°	22	36,36%	36,36%	27,27%

### 5.7 Angiogeneza w szpiku kostnym u pacjentów z NHL po chemioterapii I linii

W 4-6 tygodni po zakończeniu leczenia I linii wykonano trepanobiopsję szpiku kostnego celem oceny efektów leczenia. W pobranych biopsjach wykonano barwienia immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciała CD34 celem uwidocznienia komórek śródbłonka naczyniowego. Tak wybarwione preparaty poddano następnie ocenie półilościowej i ilościowej z zamiarem określenia angiogenezy.

W ocenie półilościowej zbadano 103 preparaty szpiku kostnego od pacjentów z NHL po przeprowadzonym leczeniu pierwszej linii. W 39 przypadkach stwierdzono niski stopień angiogenezy (*score 1*), w 48 oceniono pośredni stopień (*score 2*), natomiast u 16 pacjentów stopień unaczynienia szpiku był wysoki (*score 3*). Przeanalizowano różnice pomiędzy oceną półilościową angiogenezy u tych pacjentów w chwili rozpoznania choroby (przed rozpoczęciem leczenia I linii) a oceną dokonaną po zakończeniu leczenia (badanie 2) i stwierdzono, że zwiększył się odsetek pacjentów z pośrednim stopniem unaczynienia z 39, 81% w badaniu 1 do 46,60% w badaniu 2, jak również z wysokim stopniem angiogenezy z 14,56% w badaniu 1 do 15,53% w badaniu 2. Zauważyć należy, że wzrostowi stopnia unaczynienia szpiku w analizowanych przypadkach towarzyszył spadek odsetka pacjentów, u których wyjściowo (badanie 1) oceniano niski stopień unaczynienia z 45,63% do 37,86% w badaniu po zakończeniu leczenia. Przedstawione powyżej różnice były istotne statystycznie. Sprawdzone również, jak przedstawiały się różnice w ocenie półilościowej angiogenezy przed i po leczeniu I linii w poszczególnych grupach chłoniaków i stwierdzono, że zaobserwowane różnice były istotne statystycznie (tabela 8). Sprawdzone również, jak przedstawiały się różnice w ocenie półilościowej angiogenezy przed i po leczeniu I linii w poszczególnych grupach MM, NHLLM i NHLHM. Wyniki przedstawiono zbiorczo w tabeli 9, wszystkie różnice były istotne statystycznie.

Tabela 8. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej u pacjentów z NHL przed rozpoczęciem leczenia (badanie 1) oraz po zakończeniu leczenia pierwszej linii (badanie 2).

p = 0,00001		Angiogeneza badanie 2		
Angiogeneza badanie 1	Score 1	Score 2	Score 3	
Score 1	47	32	15	0
Score 2	41	7	27	7
Score 3	15	0	6	9
	103	39 (37,86%)	48 (46,60%)	16 (15,53%)

### 5.8 Angiogeneza w szpiku kostnym a przeżycie pacjentów z NHL

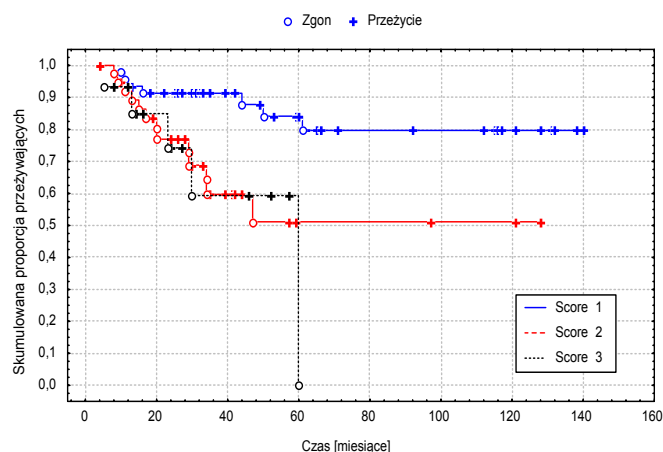
Spośród 103 pacjentów zakwalifikowanych do badania do chwili zakończenia poszczególnych obserwacji przeżyło 78 (75,73%), a 25 (24,27%) pacjentów zmarło. W grupie pacjentów, którzy

zmarli, było 18 (72%) mężczyzn i 7 (28%) kobiet, średnia wieku wśród tych pacjentów wynosiła 55,72 (17–75, mediana: 57, SD – 53,92). Najwięcej zgonów odnotowano w grupie pacjentów z MM, bo aż 40,91% (9/22), następnie 25,58% (11/43) z rozpoznaniem NHLHM oraz 13,16% (5/38) z grupy NHLLM.

Za pomocą metody Kaplana-Meiera analizowano prawdopodobieństwo przeżycia wśród pacjentów z NHL, w zależności od: typu histologicznego NHL; wyniku oceny półilościowej angiogenezy w szpiku kostnym oraz wyniku oceny morfometrycznej (ilościowej) angiogenezy w szpiku, przed i po chemioterapii pierwszej linii.

Tabela 9. Angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie półilościowej u pacjentów z MM, NHLLM, NHLHM przed rozpoczęciem leczenia (badanie 1) oraz po zakończeniu leczenia pierwszej linii (badanie 2).

Ocena półilościowa	MM	NHLLM	NHLHM
Score 1 badanie 1	8 (36,36%)	17 (44,74%)	22 (51,16%)
Score 1 badanie 2	7 (31,82%)	16 (42,11%)	16 (37,21%)
Score 2 badanie 1	11 (50,00%)	13 (34,21%)	17 (39,53%)
Score 2 badanie 2	10 (45,45%)	15 (39,47%)	23 (53,49%)
Score 3 badanie 1	3 (13,64%)	8 (21,05%)	4 (9,30%)
Score 3 badanie 2	5 (22,73%)	7 (18,42%)	4 (9,30%)
P	0,00297	0,00083	0,00036



Rys. 1. Przeżycia chorych na NHL w zależności od stopnia angiogenezy, w szpiku kostnym, ocenionego w metodzie półilościowej (badanie w okresie rozpoznania choroby) *score 1* vs. *score 2* – p=0,00906; *score 1* vs. *score 3* – p=0,03418; *score 2* vs. *score 3* – p=0,72768.

Analiza prawdopodobieństwa przeżycia chorych w zależności od stopnia angiogenezy w szpiku kostnym w badaniu przed chemioterapią wykazała, że w grupie z niskim stopniem angiogenezy (*score 1*) przeżycie sześćdziesięciomiesięczne wynosiło 85%, w grupie o pośrednim stopniu angiogenezy (*score 2*) 52%, natomiast z wysokim stopniem angiogenezy (*score 3*) 60%. Różnice oceniane testem dla wielu grup były istotne statystycznie ( $p=0,02932$ ) (rys. 1).

## 6 Dyskusja

Znaczenie angiogenezy w patogenezie nowotworów badane jest już od kilkudziesięciu lat. W 1939 roku Ide obserwował na modelu zwierzęcym wzrost naczyń w implantowanych guzach nowotworowych. Opublikowana w 1945 roku praca Algiera i Chalkley'a dała podstawy do stworzenia metod ilościowej oceny naczyń w guzie nowotworowym [4]. Lata siedemdziesiąte przyniosły pierwsze nadzieje na stworzenie nowych metod walki z nowotworami, kiedy to Judah Folkman powiedział: "Być może uda się powstrzymać rozrost guzów, gdy nie pozwoli się im na tworzenie własnej sieci naczyń krwionośnych" [3]. Dzisiaj jakże blisko jesteśmy spełnienia tych marzeń. Jednak nadal jest wiele nie do końca poznanych zagadnień dotyczących angiogenezy w nowotworach. Coraz więcej pytań o mechanizmy neowaskularyzacji zadają sobie onkolodzy, patolodzy, biolodzy i genetycy. Na wiele z nich jak dotąd nie można jeszcze podać jasnych i wyczerpujących odpowiedzi.

W przeciwieństwie do guzów litych, rola angiogenezy w nowotworach hematologicznych jest zagadnieniem dość nowym i w ostatnim czasie przyciągającym uwagę wielu badaczy. Różnice w biologii tych nowotworów stwarzają konieczność innego podejścia poznawczego do tego zjawiska. Odmienność biologiczna to przede wszystkim charakter układowy nowotworów hematologicznych, to brak możliwości zlokalizowania guza pierwotnego i w większości przypadków uogólniony charakter choroby nowotworowej już w chwili rozpoznania.

Podobnie jak w guzach litych i tutaj proces tworzenia nowych naczyń w pierwszym etapie polega na zwiększeniu produkcji i wydzielaniu mediatorów proangiogennych (VEGF, bFGF, IL-6 i innych) nie tylko przez komórki nowotworowe, ale także przez makrofagi, komórki

tuczne, limfocyty i fibroblasty. Zasadniczą rolę w nowotworach hematologicznych przypisuje się VEGF. Jego zwiększona ekspresja powoduje wzrost gęstości naczyń, a tym samym sprawia, że nowotwór jest bardziej inwazyjny, a przekładając to na język kliniczny – źle rokuje. Oprócz bezpośredniego działania parakrynnego, VEGF może działać jeszcze na drodze autokrynej i powodować ekspansję klonu nowotworowego w szpiku kostnym, poprzez pobudzenie proliferacji i hamowanie apoptozy [6, 7]. Również w przypadku bFGF wykazano jego znaczącą rolę w rozwoju nowotworów układowych. Salven wraz ze współpracownikami w analizie wieloczynnikowej stwierdził, że wysoki poziom bFGF w surowicy u pacjentów z NHL przed leczeniem koreluje ze złą prognozą choroby, a korelacja ta jest silniejsza od powszechnie znanych czynników prognostycznych, takich jak liczba lokalizacji pozawęzłowych chłoniaka oraz aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego w surowicy [12]. Przytoczone, tylko niektóre, doniesienia na temat roli procesu angiogenezy w nowotworach hematologicznych tłumaczą tak wielkie zainteresowanie tym problemem. Poznanie angiogenezy w nowotworach hematologicznych to pierwszy krok w kierunku nowej i obiecującej terapii.

Jednak do wprowadzenia terapii antyangiogennej w rutynowym postępowaniu w nowotworach hematologicznych droga jeszcze daleka. Nasuwa się kilka podstawowych pytań: jak zbadać i co badać w celu określenia intensywności procesu angiogenezy, kogo badać i które nowotwory układowe są potencjalnie zależne od rozwoju sieci naczyniowej, kiedy rozpoczynać terapię antyangiogenną i w jaki sposób ją monitorować? Z powodu fascynacji problemem angiogenezy podjęto badania własne z myślą o zdobyciu doświadczeń w badaniu tego zjawiska i z nadzieją, że przynajmniej na część z tych pytań uzyska się odpowiedź.

W badaniach własnych wykazano, że stopień angiogenezy w szpiku kostnym oceniony w metodzie półilościowej był wyższy w grupie pacjentów z NHL w porównaniu do osób zdrowych z grupy kontrolnej, różnica ta była istotna statystycznie. Ocena morfometryczna wykazała również istotnie statystycznie większe wartości parametrów dotyczących liczby naczyń, sumy powierzchni i sumy obwodów naczyń w preparatach histologicznych szpiku, od pacjentów z NHL w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wyniki badań świadczą o zwiększonym unaczynieniu szpiku kostnego w przebiegu chorób rozrostowych układu chłonnego. Analizowane średnie wartości określające pole powierzchni i obwód pojedynczego naczynia były mniejsze w badanej grupie NHL niż w grupie osób zdrowych, co potwierdza, że zwiększenie unaczynienia w grupie NHL związane jest z procesem nowotworowym, ponieważ to właśnie naczynia powstałe w wyniku patologicznej, indukowanej nowotworem angiogenezy zazwyczaj są znacznie mniejsze, drobniejsze, ich kształty są bardzo nieregularne, czasem nawet zdeformowane w porównaniu do naczyń powstałych w procesie fizjologicznej angiogenezy [14].

W materiale własnym podjęto się oceny stopnia angiogenezy w szpiku kostnym w zależności od stadium zaawansowania klinicznego. W przypadku MM ponad połowa pacjentów w pierwszym stadium zaawansowania miała niski stopień angiogenezy w szpiku kostnym w metodzie półilościowej. Podobnie pacjenci w drugim stadium zaawansowania wg Durie i Salmona w ponad połowie przypadków mieli określony pośredni stopień angiogenezy. Różnice te nie były istotne statystycznie, ale wynikać to może z małej liczebności grupy MM. W grupie NHLLM i NHLHM, biorąc pod uwagę ocenę punktową, intensywności unaczynienia tkanki szpikowej oraz ocenę morfometryczną, nie wykazano istotnych różnic w stopniu angiogenezy w zależności od stadium klinicznego zaawansowania choroby określonego wg Ann Arbor. W przypadku pacjentów z MM dało się zaobserwować jednak tendencję wzrostową parametrów angiogenezy, takich jak: liczba naczyń, suma powierzchni i suma obwodu naczyń wraz ze wzrostem stadium zaawansowania klinicznego choroby, były to różnice bez istotności statystycznej, jednak jak wspomniano powyżej, wynikać to może najprawdopodobniej z małej liczebności grupy.

W badaniach własnych analizowano stopień nasilenia angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z NHL w zależności od stopnia włóknienia określonego według metody Hernandesa-Garcii. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między stopniem włóknienia a stopniem angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z NHL. Zwraca jednak uwagę, że liczba naczyń w biopsjach szpiku kostnego pochodzących od pacjentów z MM miała tendencję wzrostową wraz ze stopniem włóknienia.

Być może udałoby się wykazać zależność pomiędzy tymi parametrami, dokonując analizy na większej grupie pacjentów.

W niniejszej pracy porównano stopień angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z NHL przed i po leczeniu pierwszej linii. W biopsjach szpiku kostnego pobranych od pacjentów po zakończeniu chemioterapii wykonano barwienie immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciała anty CD34 celem uwidocznienia komórek śródbłonna naczyniowego, następnie preparaty poddano analogicznej jak przed leczeniem ocenie półilościowej i morfometrycznej, po czym uzyskane wyniki porównano z wynikami badania pierwszego (przed rozpoczęciem leczenia). W metodzie półilościowej wykazano, że w badaniu po zakończeniu leczenia zwiększył się istotnie odsetek pacjentów z pośrednim (z 39,81% do 46,60%) i wysokim (z 14,56% do 15,53%) stopniem angiogenezy, natomiast zmniejszył się odsetek pacjentów z niskim stopniem angiogenezy (z 45,63% do 37,86%) w porównaniu do badania wyjściowego. Takie same spostrzeżenia jak dla całej grupy badanej NHL dotyczyły poszczególnych grup histologicznych (MM, NHLLM, NHLHM). W ocenie morfometrycznej, pomimo że nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w porównywanych grupach dotyczących badania przed i po leczeniu chemioterapią, dało się zauważyć tendencję wzrostową średniej liczby naczyń u pacjentów z NHLLM i NHLHM oraz obniżenie średniej liczby naczyń u pacjentów z MM.

Reasumując to zagadnienie, należy stwierdzić, iż angiogeneza w szpiku kostnym w ocenie morfometrycznej nie zmieniła się znacząco po zastosowaniu chemioterapii pierwszej linii. Stwierdzenie to jest zgodne z niektórymi wynikami badań przeprowadzonych przez innych autorów, którzy nie wykazali zmiany gęstości naczyń w szpiku kostnym po zastosowanej terapii. A nawet obserwowali utrzymywanie się zwiększonej angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów, którzy osiągnęli całkowitą remisję choroby po wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganą przeszczepieniem komórek macierzystych [6]. Rzadko autorzy podają obniżenie gęstości naczyń w szpiku kostnym po zastosowaniu chemioterapii klasycznej u pacjentów z MM.

W badaniu własnym przeanalizowano związek między półilościowym stopniem angiogenezy, jej parametrami morfometrycznymi

w szpiku kostnym u pacjentów z NHL a czasem ich przeżycia. Wykazano, że w badanej grupie najkrótsze przeżycie było wśród pacjentów z MM, następnie w grupie NHLHM, a najwięcej pacjentów przeżyło z grupy NHLLM. Wykazano również, że przeżycie zależy od stopnia angiogenezy określonego w metodzie półilościowej, zarówno w ocenie przed, jak i po chemioterapii. Biorąc pod uwagę analizowane parametry morfometryczne angiogenezy, stwierdzono, że przeżycie pacjentów z NHL zależy od liczby naczyń w szpiku kostnym, sumy pola powierzchni naczyń oraz sumy obwodów. Przeżycie jest krótsze wraz ze wzrostem tych parametrów. Podobne wyniki otrzymali inni autorzy badający zależność przeżycia od nasilenia angiogenezy w szpiku kostnym u pacjentów z MM, wykazując, że u chorych, którzy mieli liczbę mikronaczyń mniejszą lub równą 50, średni czas przeżycia wynosił 5,1 lat, podczas gdy w grupie z gęstością ponad 50 mikronaczyń w polu widzenia czas przeżycia był o połowę krótszy [9, 10].

Angiogeneza w nowotworach jest badana od wielu lat i nadal nie do końca została poznana. Wiele pozostało do wyjaśnienia, szczególnie w hematoonkologii. Próby terapii antyangiogennej, jeszcze w fazie badań klinicznych, podejmowane są właśnie w tej grupie chorych. Stosowanie terapii hamujących unaczynienie wymaga stworzenia standardów wskazań do takiej terapii, ustalenia, w jakiej fazie choroby rozpocząć leczenie i jak długo je kontynuować oraz, co najważniejsze, jak monitorować przebieg terapii antyangiogennej u chorych na nowotwory hematologiczne. Stworzenie takich standardów wymaga jednak dokładnego zbadania samego procesu nowotworzenia naczyń, określenia jednolitych i porównywalnych metod oceny angiogenezy oraz zbadania korelacji z innymi czynnikami rokowniczymi (biologicznymi, molekularnymi i genetycznymi) w nowotworach hematologicznych.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Aiello AP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
- 2) Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-10.

- 3) Cavallo T, et al. Tumor angiogenesis. *J Cell Biol.* 1972; 54: 408-420.
- 4) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspect. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 1-30.
- 5) Husong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 309-313.
- 6) Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haemathological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111: 43-51.
- 7) Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmidt H. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol* 2001; 80 (12): 695-705.
- 8) Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al. Spectrum of angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821.
- 9) Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haemathol* 2002; 118: 817-820.
- 10) Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3111-3116.
- 11) Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haemathol* 1996; 56: 45-53.
- 12) Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3334-3339.
- 13) Scavelli C, Weber E, Agliano M, Cirulli T, Nico B, Vacca A, Ribatti D. Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Anat* 2004; 204: 433-449.
- 14) Zieliński K W, Strzelecki M. Komputerowa analiza obrazu biomedycznego. 2002. Wstęp do morfometrii i patologii ilościowej. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa-Łódź.