

Strokovni prispevek/Professional article

KONCENTRACIJE NEKATERIH DEJAVNIKOV ANGIOGENEZE V SERUMU PRI DISEMINIRANEM PLAZMOCITOMU: VEGF, bFGF in MMP-9

SERUM CONCENTRATIONS OF SOME ANGIOGENEIC FACTORS IN MULTIPLE MYELOMA: VEGF, bFGF IN MMP-9

Mojca Modic, Jana Kralj, Lara Čibej, Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-02-26, sprejeto 2004-03-05; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 39-42

Ključne besede: vaskularni endotelijski rastni dejavnik; bazični fibroblastni rastni dejavnik; matriks metaloproteinaza-9; diseminirani plazmocitom

Izvleček – Izhodišča. Angiogeneza ima pomembno vlogo v patogenezi in napredovanju diseminiranega plazmocitoma (DP). Žilni endotelijski rastni dejavnik A (VEGF-A) in bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF, FGF2) sta citokina, ki spodbujata angiogenezo in delitev plazmocitomskih celic. Matriks metaloproteaza-9 je encim, ki razgrajuje zunajcelični matriks. Njegovo delovanje je pomembno pri angiogenezi, širjenju celic novotvorbe v sosednje tkivo in za osteolitično razgradnjo kosti pri plazmocitomu. V naši raziskavi smo analizirali serumske koncentracije omenjenih dejavnikov pri DP.

Preiskovanci in metode. Koncentracije VEGF-A, bFGF in MMP-9 smo določili pri 36 bolnikih z DP. Dvanajst bolnikov z DP v obdobju določanja dejavnikov angiogeneze ni potrebovalo zdravljenja, 14 bolnikov je prejelo talidomid. Pri desetih bolnikih z razširjeno boleznijo smo določili angiogenetične dejavnike tik pred ali kmalu po začetku zdravljenja s citostatikami. Serumske koncentracije MMP-9, VEGF-A in bFGF smo določili na encimsko imunski način z reagenčnimi kompleti Quantikine® (R&D Systems, USA).

Rezultati. Koncentraciji MMP-9 in VEGF sta bili največji v skupini bolnikov z aktivno boleznijo. Koncentracija bFGF je bila najmanjša pri bolnikih, ki niso potrebovali zdravljenja, ker je bila bolezen v obdobju remisije. Ugotovili smo dobro statistično povezanost med MMP-9 in VEGF. Koncentraciji VEGF in bFGF nista bili medsebojno povezani. Število trombocitov pa je bilo povezano z VEGF in MMP-9.

Zaključki. Določanje dejavnikov angiogeneze je pomembno pri oceni aktivnosti bolezni. Koncentracije teh dejavnikov so večje pri bolnikih z aktivno razširjeno boleznijo.

Uvod

Angiogeneza je nastajanje novih kapilar iz obstoječih krvnih žil. Pomembna je za razvoj in rast otroka pred in po rojstvu, pri odrasli ženski pa pri ovulaciji, menstruaciji in razvoju placent.

Keywords: vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor; matrix metalloproteinase-9; multiple myeloma

Abstract – Background. Angiogenesis is a crucial process in progression of multiple myeloma. Vascular endothelial growth factor (VEGF), and basic fibroblast growth factor (bFGF) are multifunctional cytokines that stimulate angiogenesis and myeloma growth. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) plays a critical role in osteolytic bone destruction, angiogenesis and invasive growth of myeloma cells. We evaluated serum concentrations of these factors in patients with multiple myeloma.

Methods. Levels of active and pro-matrix metalloproteinase 9 (total MMP-9), basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined with a commercial quantitative enzyme immunoassay Quantikine® (R&D Systems, USA). All of these factors were measured in the serum obtained from peripheral blood of 36 patients affected by multiple myeloma. This series included 12 patients with disease in plateau phase and without treatment, 14 patients on Thalidomide therapy and 10 patients at the beginning of chemotherapy because of active disease.

Results. VEGF showed a strong correlation with MMP-9 while VEGF and bFGF did not correlate with each other. Blood platelets correlated with VEGF and MMP-9. The concentration of MMP-9 and VEGF were the highest in group of patients with active disease where the chemotherapy started. The level of bFGF was the lowest in the group devoid of treatment (plateau phase of disease).

Conclusions. Production of the angiogenic factors such as VEGF, bFGF and MMP-9 are increased in multiple myeloma patients. The levels of these factors correlate with the activity of disease.

V patoloških okoliščinah igra angiogeneza pomembno vlogo pri celjenju ran, v patogenezi proliferativne retinopatije, revmatoidnega artritisa in nastanku novotvorb. Angiogeneza omogoča rast novotvorbe, vdor v sosednje tkivo in nastanek zasev-

kov. Poteka v več stopnjah: razkroj zunajceličnega matriksa (razgradnja bazalne membrane), migracija, proliferacija in diferenciacija endotelijskih celic. Posledica opisanih sprememb je nastanek novih kapilar. Pri razgradnji zunajceličnega matriksa, ki omogoči migracijo endotelijskih celic, sodelujejo različne proteaze. Proces angiogeneze uravnavajo številni citokini. Pomembno vlogo pri začetku angiogeneze imata žilni endotelijski rastni dejavnik A (VEGF-A) in bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF, FGF2).

VEGF-A je glavni predstavnik družine žilnih endotelijskih rastnih dejavnikov. To je rastni dejavnik, pomemben za preživetje in rast endotelijskih celic. Poleg spodbujanja k delitvi, spodbuja tudi migracijo in zavira apoptozo endotelijskih celic. Izločajo ga številne celice, razen endotelijskih. VEGF je glikoprotein z vezalnimi mestom za heparin. Ta mu omogoča vezavo na zunajcelični matriks in olajša povezavo z receptorji na celicah.

Fibroblastni rastni dejavniki so skupina citokinov, ki so udeleženi v angiogenezi in hematopoezi. Najpomembnejši predstavnik je bFGF. Proizvajajo ga megakariociti, trombociti, endotelijske celice, limfociti T, makrofagi in fibroblasti. Spodbuja zorenje teh celic, med drugimi tudi endotelijskih (1, 2).

Matriks metaloproteaze (MMP) so endopeptidaze z atomom cinka na katalitičnem mestu. Razgrajujejo različne sestavine zunajceličnega matriksa in imajo pomembno vlogo pri migraciji normalnih in rakavih celic. Glavni izvor MMP so makrofagi. Nastajajo tudi v celicah vezivnega tkiva, endotelijskih celicah in celicah malignih tumorjev. Delovanje MMP se uravnava na treh ravneh: z vplivom na prepisovanje DNK, z aktivacijo proencima in z zaviranjem aktiviranih encimov (tkivni inhibitorji MMP, TIM) (3).

Tako kot v drugih tkivih je delitev in zorenje mieloidnega in limfatičnega tkiva odvisno tudi od njihovega ožilja. V zadnjem času se posveča vedno večja pozornost angiogenezi pri mieloidnih in limfatičnih novotvorbah.

Z našim delom smo želeli določiti referenčne vrednosti serumskih koncentracij treh dejavnikov angiogeneze (VEGF-A, FGF2 in MMP-9) in analizirati koncentracije omenjenih dejavnikov pri skupini bolnikov z disseminiranim plazmocitomom (DP).

Preiskovanci in metode

Za določitev referenčnih vrednosti smo naključno izbrali 79 zdravih oseb, ki so darovale kri na krvodajalskih akcijah na Zavodu RS za transfuzijo krvi. Povprečna starost preiskovanih oseb je bila 38 let (19–63 let).

Koncentracije VEGF-A, bFGF in MMP-9 smo določili tudi pri 36 bolnikih (18 moških, 18 žensk) z DP. 25 bolnikov je imelo DP IgG, 6 DP IgA in 5 Bence-Jonesovo vrsto DP. Mediana starosti je bila 69 let (45–92 let). Bolniki z DP so bili v različnih obdobjih bolezni in zdravljenja. Štirim bolnikom z novo-odkritim simptomatičnim DP smo določili koncentracije angiogenetičnih dejavnikov pred začetkom zdravljenja. Šest bolnikov je že prejemale citostatike (5 bolnikov melfalan, 1 bolnik VAD). Štirinajst bolnikov je prejemale talidomid. Dvanajst bolnikov zdravljenja ni potrebovalo, ker je bila bolezen v obdobju izboljšanja. Pet od teh bolnikov je bilo po avtologni presaditvi krvotvornih matičnih celic.

Za določitev celotne (proencim in encim) koncentracije MMP-9 (gelatinaza, kolagenaza za kolagen IV), VEGF-A in bFGF v serumu smo uporabili 5 ml krvi, ki smo jo odvzeli v epruvete za vakumski odvzem. Epruvete smo pustili 30 minut pri sobni temperaturi, da se je kri strdila. Nato smo vsebino epruvete centrifugirali, serum prenesli v drugo epruveto in ga zamrzili na -20°C . Pripravljeni vzorce smo analizirali po 30 dneh. Pred analizo smo vzorce odtalili na sobni temperaturi.

Koncentracijo MMP-9, VEGF-A in bFGF smo določili na encimsko imunski način z reagenčnimi kompleti Quantikine® (R&D Systems, USA). Način uporablja na steno mikrotiterskih plošč

pritrjena monoklonska protitelesa in z encimom označena poliklonska protitelesa proti humanemu MMP-9, VEGF-A ali bFGF. Pri vsaki seriji preiskav smo napravili umeritvene krivulje s pomočjo raztopin znanih koncentracij rekombinantnega humanega MMP-9, VEGF-A in bFGF. Vzorce in standarde smo določili dvakrat. Ker slina vsebuje velike koncentracije MMP-9, VEGF in bFGF smo pri določanju uporabili zaščitne obrazne maske in rokavice. Spodnja meja ločljivosti metode, ki jo navaja proizvajalec, je za MMP-9 0,156 ng/ml, za VEGF 9,0 pg/ml in za bFGF 3 pg/ml.

Medsebojno povezanost spremenljivk smo ugotavljali s Spearmanovim koeficientom korelacije (r). Razlike med posameznimi skupinami bolnikov smo ugotavljali z Mann-Whitneyevim poskusom.

Rezultati

Mediana, prvi in tretji kvartil izmerjenih koncentracij pri zdravih osebah so prikazani v razpredelnici 1. Za zgornjo referenčno vrednost smo izbrali 95. centil.

Razpr. 1. VEGF, bFGF, MMP-9 pri 79 zdravih osebah.

Table 1. VEGF, bFGF, MMP-9 in 79 healthy persons.

	Me	Q1	Q3	95. centil
VEGF pg/ml	259	125	425	788
bFGF pg/ml	0	0	0	3,2
MMP-9 ng/ml	315	231	448	748

Me - mediana / median, Q1 - prvi kvartil / first quartile, Q3 - tretji kvartil / third quartile

Pri bolnikih z DP smo ugotovili dobro povezavo med VEGF in MMP-9. Število trombocitov je bilo povezano z VEGF in MMP-6. Koncentracija monoklonskega imunoglobulina (MIg) v serumu je bila soodvisna s koncentracijo beta2-mikroglobulinom (B2M) in albuminov (Razpr. 2).

Razpr. 2. Povezave med nekaterimi parametri pri bolnikih z disseminiranim plazmocitomom.

Table 2. Correlations between some parameters in patients with multiple myeloma.

Korelacija	ρ	p
VEGF - MMP9	0,61	<0,01
VEGF - Tr	0,67	<0,01
MMP9 - Tr	0,48	0,03
MIg - B2M	0,45	0,01
MIg - Alb	-0,46	0,01

ρ - Spearmanov koeficient korelacije / Spearman's coefficient of correlation
p - statistična značilnost / statistic significance

Vrednosti angiogenetičnih dejavnikov pri treh skupinah bolnikov so prikazane v razpredelnici 3. V prvi skupini (DP_{kem}) so bili novo-odkriti bolniki z razširjenim simptomatičnim DP tik pred začetkom zdravljenja in bolniki, pri katerih smo začeli zdravljenje s citostatiki. V drugi skupini (DP_{tal}) so bili bolniki z razširjeno boleznijo, ki so prejemale talidomid. V tretjo skupino (DP_0) smo uvrstili bolnike, pri katerih zdravljenje ni bilo potrebno, ker je bila bolezen v obdobju remisije. Ta skupina se je statistično pomembno razlikovala od skupine DP_{tal} in skupine DP_{kem} po majhni koncentraciji bFGF (Mann-Whitneyev poskus, $p < 0,05$). Skupina bolnikov DP_{tal} pa se je razlikovala od skupine DP_{kem} po manjši koncentraciji MMP-9 ($p < 0,05$).

Povečano koncentracijo VEGF nad referenčno vrednostjo so imeli trije bolniki (3/10) v skupini DP_{kem} , dva bolnika (2/14) v DP_{tal} in trije bolniki (3/12) v DP_0 . MMP-9 je bila povečana samo pri treh bolnikih v skupini DP_{kem} . Koncentracija bFGF je bila

povečana pri petih bolnikih (5/10) v DP_{kem}, sedmih (7/14) v DP_{Tal} in dveh (2/12) v DP₀.

Pri dveh bolnikih z novo-odkritim simptomatičnim DP so bile sočasno povečane koncentracije VEGF (> 1200 pg/ml), bFGF (> 10 pg/ml) in MMP-9 (> 1000 pg/ml). Sočasno povečanje VEGF in MMP-9 smo ugotovili tudi pri bolniku med zdravljenjem s citostatiki.

Razpr. 3. VEGF, bFGF in MMP-9 glede na način zdravljenja.

Table 3. VEGF, bFGF in MMP-9 in three groups of patients.

Zdravljenje	N	VEGF mediana	bFGF mediana	MMP-9 mediana
DP _{kem}	10	560	4,3	253
DP _{Tal}	14	386	3,3	80
DP ₀	12	304	0,6	138

DP_{kem} – bolniki na kemoterapiji in novoodkriti pred kemoterapijo, DP_{Tal} – Talidomid, DP₀ – bolniki brez zdravljenja, N – število bolnikov, DP_{kem} – chemotherapy and newly diagnosed before chemotherapy, DP_{Tal} – Thalidomide, DP₀ – without therapy, N – number of patients, zdravljenje – therapy, mediana – median

Razpravljanje

Pri bolnikih z DP so z merjenjem gostote kapilar v kostnem mozgu ugotovili povečan obseg angiogeneze (4–6). Povečanje angiogeneze ni samo posledica izločanja citokinov s strani plazmocitomskih celic. Angiogeneza ima tudi pomembno vlogo v patogenezi in napredovanju bolezn. To predpostavko podpira ugotovitev povezave med povečanim obsegom angiogeneze in slabo prognozo. VEGF poleg spodbujanja angiogeneze pospešuje tudi delitev plazmocitomskih celic. Delovanje VEGF poteka preko avtokrine in parakrine zanke. Plazmocitomske celice izločajo VEGF in imajo hkrati na površini receptorje za VEGF (avtokrino delovanje). Izločen VEGF povzroči izločanje IL-6 s strani endotelijskih celic in celic strome, kar spodbuja delitev plazmocitomskih celic in poveča tvorbo VEGF (parakrino delovanje) (7, 8).

Bolniki z DP imajo v krvi povečano koncentracijo VEGF in bFGF. Glavni izvor teh dejavnikov je kostni mozeg. To potrjuje tudi ugotovitev, da je koncentracija VEGF in bFGF v kostnem mozgu večja kot v krvi (9). Ugotovili so, da sta koncentraciji VEGF in bFGF v plazmi povezani z aktivnostjo plazmocitoma. Obstaja pozitivna soodvisnost med VEGF in reaktivnim proteinom C (CRP) ter beta2 mikroglobulinom (B2M) in negativna soodvisnost med bFGF in koncentracijo albumina (9). Tudi pri naših bolnikih so bile povečane koncentracije dejavnikov angiogeneze bolj pogoste v skupini (DP_{kem}) z bolj aktivno boleznijo. Le v tej skupini so bili tudi bolniki, ki so imeli hkrati povečano koncentracijo več dejavnikov angiogeneze. Soodvisnosti VEGF – B2M in bFGF – albumini pri nas nismo ugotovili, verjetno zaradi majhnega števila bolnikov v istem obdobju bolezn (npr. ob ugotovitvi bolezn). Podobno kot pri Di Raimondo in sod. (9) tudi pri nas koncentraciji VEGF in bFGF nista bili medsebojno povezani. Pri novotvorbah hematopoetičnega tkiva je potrebna previdnost pri sklepanju na povečano angiogenezo iz koncentracij VEGF in bFGF v krvi, ker ta dejavnika proizvajata in sproščata večina krvnih celic. Povečana koncentracija omenjenih dejavnikov je lahko prisotna tudi pri okužbah in vnetjih. Če merimo VEGF v serumu, je potrebno upoštevati, da je koncentracija v serumu večja od koncentracije v plazmi. Vzrok je dodatno sproščanje VEGF iz trombocitov med koagulacijo krvi (10). Pri naših bolnikih si povežemo števila trombocitov v krvi z VEGF in MMP-9 razlagamo z učinkom citokinov na trombo-poezo. VEGF ima vlogo tudi pri dozorevanju megakariocitov (11). Opazovana soodvisnost med koncentracijo MIg in B2M je posledica povezave obeh kazalcev s številom plazmocitomskih celic v telesu (tumorsko maso). Prav tako je vzrok za negativno povezavo MIg z albumini večja tumorska masa pri hi-

tro napredujočih plazmocitomih. Pri hitro napredujočem plazmocitomu se poveča tvorba IL-6, ki zavira sintezo albuminov v jetrnih celicah.

Matriks metaloproteaze imajo pomembno vlogo pri preoblikovanju zunajceličnega matriksa in osteolitični razgradnji kosti pri plazmocitomu. Razgradnja kosti začne MMP-1 (intersticijska kolagenaza), ki razgrajuje kolagen vrste I v manjše enote. Te potem razgradita želatinazi MMP-2 in MMP-9. Plazmocitomske celice proizvajajo MMP-9, aktivirajo proencimsko obliko MMP-2 in inducirajo MMP-1 v celicah strome (12). Ker MMP-9 razgrajuje tudi kolagen vrste IV, ki je sestavina bazalnih membran, je njeno delovanje pomembno pri angiogenezi in širjenju malignih celic v sosednje tkivo. Encimi skupine MMP verjetno tudi pospešujejo delitev plazmocitomskih celic (3). Zato ni presenečenje večja serumska koncentracija MMP-9 pri bolj aktivnih oblikah plazmocitoma.

Talidomid je zdravilo, ki zavira angiogenezo in se uspešno uporablja za zdravljenje plazmocitoma. Če je zdravljenje s talidomidom učinkovito, se zmanjša gostota kapilar v kostnem mozgu (13). O zmanjšanju koncentracije VEGF in bFGF v krvi po uspešnem zdravljenju s talidomidom so poročali Kakimoto in sod. in Bertolini in sod. (14, 15). Drugi omenjenega zmanjšanja VEGF in bFGF niso ugotovili (16). V naši raziskavi so imeli bolniki, ki smo jih zdravili s talidomidom, manjše koncentracije MMP-9 kot bolniki z aktivno boleznijo v skupini DP_{kem}. Iwasaki in sod. so ugotovili, da imajo bolniki s slabim odzivom na kemoterapijo povečano koncentracijo VEGF v serumu pred začetkom zdravljenja. Povečana je tudi umrljivost (17, 18). Ni še znano, ali je koncentracija VEGF in drugih dejavnikov angiogeneze v serumu neodvisen prognostični dejavnik. Čeprav ima angiogeneza pomembno vlogo v patogenezi DP, bodo šele večje prospektivne raziskave potrdile vrednost določanja različnih dejavnikov angiogeneze v krvi za oceno prognoze DP.

Literatura

- Orpana A, Salven P. Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 219–24.
- Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2002; 111: 43–51.
- Kelly T, Borset M, Abe E, Gaddy-Kurten D, Sanderson RD. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 273–81.
- Vacca A, Di Loreto M, Ribatti et al. Bone marrow of patients with active multiple myeloma: angiogenesis and plasma cell adhesion molecules LFA-1, VLA-4, LAM 1 and CD44. *Am J Hematol* 1995; 50: 9–14.
- Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F & Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 1994; 87: 503–8.
- Rajkumar SV, Leong T, Roche PC et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3111–6.
- Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V, Di Raimondo F, Dammacco F. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003; 88: 176–85.
- Podar K, Tai YT, Davies FE et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001; 98: 428–35.
- Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 2000; 85: 800–5.
- Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956–64.
- Casella I, Feccia T, Chelucci C et al. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 2003; 101: 1316–23.
- Barille S, Akhoundi C, Collette M et al. Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of pro-MMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood* 1997; 90: 1649–55.
- Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumour activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Eng J Med*. 1999; 341: 1565–71.
- Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S et al. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1029–36.

15. Bertolini F, Mingrone W, Alietti A et al. Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis. Analysis of clinical results and surrogate angiogenesis markers. *Annals of Oncology*. 2001; 12: 987-90.
 16. Neben K, Moehler T, Kraemer A, Benner A, Egerer G, Ho AD, Goldschmidt. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. *Br J Haematol* 2001; 115: 605-8.
 17. Iwasaki T, Sano H. Predicting treatment responses and disease progression in myeloma using serum vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 1275-9.
 18. Iwasaki T, Hamano T, Ogata A, Hashimoto N, Kitano M, Kakishita E. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; 116: 796-802.
-