

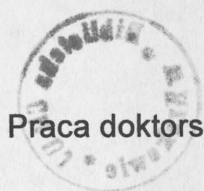
351603

Mesa

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
WYDZIAŁ LEKARSKI

**Artur Jurczyszyn** — —

**Cytokiny w patogenezie szpiczaka mnogiego**



Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

Bibl. Medyczna CM UJ



1816035567

Praca wykonana w Katedrze i Klinice Hematologii Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

**Kraków 2003**

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy Profesorowi Aleksandrowi Skotnickiemu za opiekę, pomoc oraz czas poświęcony w toku realizacji przewodu doktorskiego.*

*Podziękowania składam również pracownikom Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie za życzliwość oraz udzielone wskazówki związane z moimi badaniami.*

Spis treści	3
Spis skrótów oraz zakresy norm osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów	5
Spis rycin	7
Spis tabel	8
1. Wstęp	10
1.1. Etiopatogeneza oraz charakterystyka kliniczna szpiczaka mnogiego	10
1.2. Postacie kliniczne, kryteria diagnostycznej i prognostycznej w szpiczaku mnogi	13
1.3. Znaczenie cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w patofizjologii szpiczaka mnogiego	15
1.4 . Interleukina-6 i rozpuszczalna forma receptora dla Interleukiny-6	17
1.5. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu i rozpuszczalny receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu	19
1.6. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów	21
1.7. Transformujący czynnik wzrostu - $\beta_1$	21
1.8. Czynnik wzrostu hepatocytów	22
2. Cele pracy	24
3. Metodyka oraz analiza badanych grup pacjentów	25
3.1. Charakterystyka kliniczna badanych grup chorych	27
3.2. Badania kliniczne oraz metody oznaczeń laboratoryjnych	
3.2.1. Analiza osoczowych stężeń badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów	28
3.3. Metody statystyczne	30

4. Wyniki	31
4.1. Ocena osoczowych stężeń cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w grupie chorych na szpiczaka mnogiego i grupie kontrolnej	31
4.2. Ocena korelacji pomiędzy wybranymi osoczowymi stężeniami cytokin i ich rozpuszczalnymi receptorami u chorych na szpiczaka mnogiego	35
4.3. Osoczowe stężenia cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów u chorych przed i po rozpoczęciu leczenia	37
4.4. Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w zależności od czasu leczenia	39
4.5. Ocena osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w zależności od progresji choroby	46
4.6. Analiza krzywych ROC dla wybranych parametrów jako czynników prognostycznych szpiczaka mnogiego	48
5. Dyskusja	52
6. Wnioski	64
7. Streszczenie	65
8. Piśmiennictwo	67

Spis skrótów oraz zakresy norm osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów

As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trójtlenek arsenu (Trisenox)
AL	Białko amyloidozy
b-FGF	Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
CC-5013	Pochodna talidomidu (Revimid)
CRP	Białko C-reaktywne
CFU – GEMM	Komórkowe kolonie multipotencjalne
CK	Kinaza kreatynowa
CK-MB	Izoenzym pochodzenia sercowego kinazy kreatynowej
E2F1	Czynnik transkrypcyjny
FGFR3	Receptor FGF
Fik-1/KDR	Receptor kinazy wątrobowej płodu
Fit-1	Receptor wątrobowej kinazy tyrozynowej-1
FISH	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
HCC	Rak wątrobowo-komórkowy
HGF	Czynnik wzrostu hepatocytów
ICAM-1	Cząstka adhezji międzykomórkowej-1
IgH	Łańcuch ciężki immunoglobulin
IL-6	Interleukina-6
IPI	Międzynarodowy Indeks Prognostyczny
JAK	Kinazy Janusa
LDH	Dehydrogenaza mleczanowa
M	Białko monoklonalne
MAPK	Kinaza proteinowa aktywowana mitogenem
M-CSF	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii monocytów
MGUS	Gammapatia monoklonalna nieznanego znaczenia
MM	Szpiczak mnogi
MHC	Antygeny głównego układu zgodności tkankowej
MVD	Wskaźnik gęstości drobnych naczyń krwionośnych
NS	Brak znamienności statystycznej
ND	Nie oznaczalne (nie wykrywalne)

OB	Odczyn opadania krwinek czerwonych
pRB	Białko retinoblastoma
PCL	Białaczka plazmocytoza
PDGF	Płytkopochodny czynnik wzrostu
PF-4	Czynnik płytkowy 4
PIGF	Łożyskowy czynnik wzrostu
PS-341	Inhibitor proteasomu (Velcade)
RB	Retinoblastoma
RKT	Receptory kinazy tyrozynowej
SMM	„Tłący się” szpiczak mnogi
TGF- $\beta_1$	Transformujący czynnik wzrostu- $\beta_1$
TNF- $\alpha$	Czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$
VEGF	Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
sIL-6R	Rozpuszczalny receptor dla IL-6
sVEGF R2	Rozpuszczalny receptor dla VEGF
VLA-4	Antygen późnej aktywacji-4

Zakresy stężeń norm cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów (osocze EDTA), wg. zastosowanych protokołów (R&D Systems)

Badane cytokiny i ich rozpuszczalne receptory	Norma	Jednostka
IL-6	0 – 5	pg/ml
sIL-6R	17 – 46	ng/ml
VEGF	0 – 115	pg/ml
sVEGF R2	6635 – 13553	pg/ml
HGF	301 – 960	pg/ml
b-FGF	0 – 14,6	pg/ml
TGF- $\beta_1$ / osocze EDTA ubogopłytkowe/	34,7 – 63,9	ng/ml

## Spis rycin

Rycina 1. Rozmaz szpiku kostnego pacjenta chorego na szpiczaka mnogiego, w obrazie czerwoną strzałką wskazany patologiczny plazmocyty (ze zbiorów Katedry i Kliniki Hematologii Collegium Medicum UJ w Krakowie)

Rycina 2. Schemat autokrynnego i parakrynnego wytwarzania IL-6 przez patologiczne plazmocyty oraz komórki podścieliska szpiku kostnego u chorego na szpiczaka mnogiego

Rycina 3. Charakterystyka badanych chorych na szpiczaka mnogiego (n=76)

Rycina 4. Rodzaj stosowanej terapii w badanej grupie S (n=47)

Rycina 5. Średnie osoczowe stężenia IL-6 w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 6. Średnie osoczowe stężenia sIL-6R w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 7. Średnie osoczowe stężenia VEGF w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 8. Średnie osoczowe stężenia sVEGF-R2 w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 9. Średnie osoczowe stężenia HGF w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 10. Średnie osoczowe stężenia b-FGF w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 11. Średnie osoczowe stężenia TGF-beta1 w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 12. Osoczowe stężenia sIL-6R u chorych na MM w zależności od czasu trwania leczenia

Rycina 13. Osoczowe stężenia TGF- $\beta_1$  u chorych na MM w zależności od czasu trwania leczenia

Rycina 14. Analiza krzywych ROC dla badanych cytokin prozapalnych i proangiogennych oraz ich rozpuszczalnych receptorów – próba oceny progresji szpiczaka mnogiego

Rycina 15. Schemat autokrynnego i parakrynnego wytwarzania HGF przez komórki podścieliska szpiku kostnego oraz patologiczne plazmocyty

Rycina 16. Schemat wzajemnych interakcji pomiędzy patologicznym plazmocytem a komórką podścieliska szpiku kostnego

## Spis tabel

Tabela 1. Aberracje chromosomowe, całkowite przeżycie i prognoza w MM

Tabela 2. Stadia zaawansowania klinicznego MM wg Durie i Salmona

Tabela 3. Kryteria diagnostyczne szpiczaka mnogiego

Tabela 4. Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla szpiczaka mnogiego – *International Prognostic Index (IPI)*

Tabela 5. Osoczowe stężenia cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów u chorych na MM

Tabela 6. Zależność pomiędzy badanymi cytokinami i ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie dotychczas nieleczonych pacjentów (grupa N)

Tabela 7. Zależność pomiędzy badanymi cytokinami i ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie pacjentów poddanych terapii (grupa S)

Tabela 8. Stężenia cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin w grupie pacjentów nie leczonych (N) w porównaniu z grupą kontrolną

Tabela 9. Stężenia cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin w grupie pacjentów poddanych terapii (S) w porównaniu z grupą kontrolną.

Tabela 10. Zestawienie osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w grupach N i S

Tabela 11. Zestawienie osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w poszczególnych podgrupach chorych i w grupie kontrolnej

Tabela 12. Zestawienie współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny oraz wapnia w surowicy krwi, a osoczowymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie N

Tabela 13. Zestawienie współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny oraz wapnia w surowicy krwi, a osoczowymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie S

Tabela 14. Zestawienie współzależności pomiędzy stężeniami poszczególnych frakcji elektroforetycznych białek surowicy krwi oraz stężeniem CRP i  $\beta_2$ mikroglobuliny, a osoczowymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie S



Tabela 15. Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów, a występowanie progresji choroby

Tabela 16. Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów - analiza krzywych ROC

Tabela 17. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia IL-6 od odpowiedzi na leczenie

Tabela 18. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia sIL-6R od odpowiedzi na leczenie

Tabela 19. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia VEGF od odpowiedzi na leczenie

Tabela 20. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia sVEGF-R2 od odpowiedzi na leczenie

Tabela 21. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia HGF od odpowiedzi na leczenie

Tabela 22. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia b-FGF od odpowiedzi na leczenie

Tabela 23. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia TGF- $\beta_1$  od odpowiedzi na leczenie

## 1. Wstęp

### 1.1. Etiopatogeneza oraz charakterystyka kliniczna szpiczaka mnogiego

Szpiczak mnogi (*multiple myeloma, myeloma multiplex, MM*) jest chorobą rozrostową układu krwiotwórczego, wywołaną nowotworową transformacją limfocytów B lub wcześniejszych komórek pre-B [94]. Stanowi on 1% wszystkich nowotworów, zaś 10% hematologicznych schorzeń rozrostowych [95]. MM charakteryzuje się monoklonalną proliferacją patologicznych plazmocytów (rycina 1), produkcją białka monoklonalnego M i występowaniem wyraźnie odgraniczonych ognisk osteolitycznych w kościach [97, 98]. Ponadto w MM występuje zmniejszona produkcja prawidłowych immunoglobulin, upośledzona hemopoeza, hyperkalcemia oraz często zaburzona funkcja nerek. Nowotworowe plazmocyty wytwarzają monoklonalne białko o charakterze immunoglobuliny (najczęściej IgG, rzadziej IgA, IgD bądź inne), stwierdzone w surowicy krwi lub wydalane z moczem (łańcuchy lekkie immunoglobulin - tak zwane białko Bence-Jonesa). Średni czas przeżycia pacjentów poddanych chemioterapii wynosi 3 - 4 lata. Wśród chorych stwierdza się niewielką przewagę mężczyzn (mężczyźni / kobiety około 1,6 / 1,0), zaś częstość zachorowań wzrasta z wiekiem (najwięcej między 50 a 70 rokiem życia) [95].

Etiopatogeneza szpiczaka mnogiego pozostaje wciąż nieznaną, natomiast anomalie chromosomowe stwierdza się u około 65% chorych [3, 7].

Jedna z hipotez przyjmuje, iż patogeneza choroby jest wieloetapowym procesem, w którym dochodzi do zmian chromosomowych, zapoczątkowanych przez translokację w genie IgH [39]. Zgodnie z tą teorią, progresja nowotworowego rozrostu plazmocytarnego związana jest z niestabilnością i nasileniem zmian genetycznych. Zasadniczą zmianą inicjującą patologiczny rozrost jest typowa dla limfoproliferacji translokacja t(4;14) regionu 14q32, natomiast delecja chromosomu 13 związana jest z dalszą ewolucją choroby [3]. W szpiczaku mnogim zmiany strukturalne dotyczą najczęściej chromosomów: 14(14q+), 1(złamania p11 – p21), 6 (6q-) i 13 (del 13). Wiele danych wskazuje na istotne znaczenie w rozwoju nowotworu onkogenów z rodziny *ras*, *c-myc*, *bcl-2* oraz białek supresorowych *p53* i *Rb* [3].

Poniżej zestawiono (tabela 1) wynik oznaczeń zaburzeń cytogenetycznych, wykonanych techniką FISH, u pacjentów ze szpiczakiem mnogim, wraz z całkowitym czasem przeżycia i prognozą [7].

Tabela 1. Aberracje chromosomowe, całkowity czas przeżycia i prognoza w MM

	Ilość pacjentów	Całkowity czas przeżycia*	Prognoza
t(4;14)	13%	23%	zła
t(11,14)	16%	88%	dobra
del 13	29%	46%	umiarkowana
brak del 13	42%	68%	dość dobra

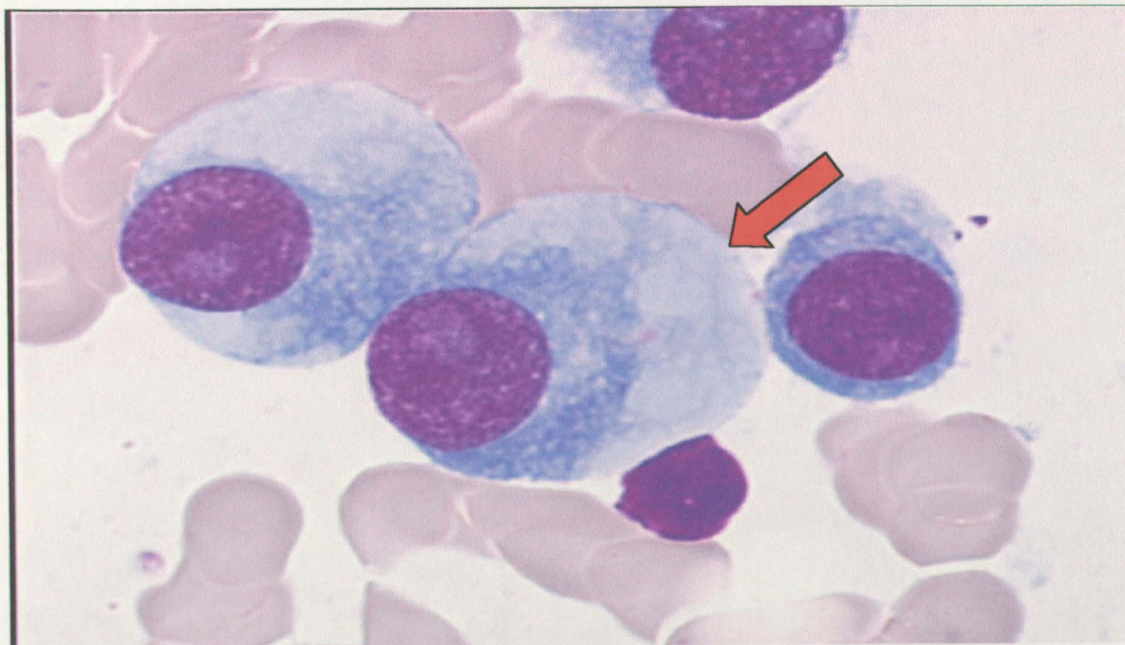
\*czas obserwacji trwającej 80 miesięcy

Na podstawie licznych obserwacji wydaje się, iż u chorych rokowniczo najważniejsze są: aberracje chromosomalne (del 13 i inne) oraz stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny w surowicy krwi [3, 7, 29].

Początek choroby zwykle jest mało charakterystyczny. Często wyraża się osłabieniem, zmniejszeniem sprawności fizycznej, uporczywymi bólami kostnymi, skłonnością do infekcji i stopniowo postępującą utratą masy ciała. W badaniach laboratoryjnych zazwyczaj stwierdzany jest białkomocz i podwyższone, dwu lub trójcyfrowe OB o małej amplitudzie między pierwszą a drugą godziną. Rozrost plazmocytarny, naciekający szpik kostny powoduje wyparcie prawidłowych układów krwiotwórczych oraz wtórnie niedokrwistość,

a wraz z postępowaniem choroby również leukopenię i małopłytkowość. Niedokrwistość w MM ma złożoną patogenezę i może być uwarunkowana nie tylko wyparciem prawidłowej tkanki krwiotwórczej przez komórki szpiczakowe, ale również niewydolnością nerek oraz mielosupresyjnym wpływem niektórych cytokin, zwłaszcza  $TNF-\alpha$  i IL-6 [88]. Objawy kliniczne choroby wywołane są: 1. bezpośrednim efektem masy guza, 2. wpływem cytokin uwalnianych przez patologiczne plazmocyty lub pośrednio przez podścielisko szpiku kostnego wraz z komórkami tkanki kostnej, 3. obecnością oraz odkładaniem się w narządach patologicznych białek (np. białko AL – amyloidoza), 4. zaburzeniami autoimmunologicznymi (koagulopatie).

Wysokie stężenie monoklonalnego białka M w surowicy krwi wiąże się z wystąpieniem tzw. zespołu nadlepkkości. Charakteryzuje się on niewydolnością nerek (tzw. "nerka szpiczakowa"), zaburzeniami widzenia spowodowanymi zmianami naczyniowymi na dnie oczu (*fundus paraproteinaemicus*), rozszianymi mikrozakrzepami w drobnych naczyniach mózgowych, a nawet w krańcowych przypadkach śpiączką paraproteinemiczną (*coma paraproteinaemica*) [46].



Rycina 1. Rozmaz szpiku kostnego pacjenta chorego na szpiczaka mnogiego, w obrazie czerwoną strzałką wskazany patologiczny plazmocyty (ze zbiorów Katedry i Kliniki Hematologii Collegium Medicum UJ w Krakowie)

## 1.2. Postacie kliniczne, kryteria diagnostyczne i prognostyczne w szpiczaku mnogim

Choroba przebiegać może pod kilkoma różnymi postaciami klinicznymi:

1. Gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance - MGUS*) - stan, w którym stwierdzana jest obecność białka monoklonalnego, lecz brak jest innych objawów klinicznych szpiczaka mnogiego, czy chorób mogących być przyczyną gammapatii. W MGUS immunofenotyp plazmocytów jest pośredni pomiędzy prawidłowym a nowotworowym [87].
2. „Tłący się” szpiczak mnogi (*smouldering multiple myeloma – SMM*) [59]. W części przypadków MGUS z czasem wzrasta stężenie białka M, osiągając wartości jak w aktywnej postaci choroby, brak jest jednak nadal innych typowych objawów.
3. Mało agresywny MM, określane też jako szpiczak mnogi o powolnym przebiegu (*indolent myeloma*) jest stanem, w którym obecne są już niektóre ewidentne objawy choroby (na przykład destrukcja kości), ale pojawiają się one stopniowo i postępują bardzo wolno [58].
4. Aktywny szpiczak mnogi – stan, w którym występują typowe objawy kliniczne choroby. Dalszy przebieg schorzenia zależy od zastosowanego leczenia i odpowiedzi na terapię [97, 98].
5. Białaczka plazmocytoza (*plasma cell leukemia - PCL*) jest często końcowym stadium progresji szpiczaka mnogiego, choć zdarzają się postaci *de novo* diagnozowane. W PCL odsetek plazmocytów we krwi obwodowej przekracza 10% lub w liczbie bezwzględnej powyżej  $0,5 \times 10^9/l$  przy spełnieniu pozostałych kryteriów rozrostu nowotworowego [118].

Mechanizmy związane z progresją choroby nie są jeszcze dokładnie poznane. Wydaje się, iż towarzyszy im wzrost wskaźnika gęstości drobnych naczyń krwionośnych w szpiku kostnym (*MVD – microvessel density*) [122].

W ostatnim okresie wielu zwolenników zyskała teoria, iż MGUS i nieaktywne postaci choroby reprezentują stadia prewaskularne, zaś aktywny MM – formę waskularną, gdzie nowotworowa angiogeneza jest wzmożona, a wskaźnik MVD podwyższony [62, 86, 121, 122].

Kryteria diagnostyczne choroby zamieszczone w tabeli 2 wykorzystywane są w praktyce klinicznej celem potwierdzenia rozpoznania nowotworu [26].

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne szpiczaka mnogiego [26]

Kryteria duże	Obecność plazmocytów w biopsji tkankowej Plazmocyty w szpiku kostnym > 30% Białko monoklonalne: IgG w surowicy > 3500 mg/dl IgA w surowicy > 2000 mg/dl Łańcuchy lekkie w moczu > 1000 mg/24h
Kryteria małe	Plazmocyty w szpiku kostnym 10% - 30% Białko M w surowicy w mniejszym stężeniu Ogniska osteolityczne w kościach IgG < 600 mg/dl, IgA < 100 mg/dl, IgM < 50 mg/dl
Rozpoznanie	1 kryterium duże + 1 kryterium małe 3 kryteria małe, w tym 1 + 2

Od wielu lat, nadal aktualna jest klasyfikacja kliniczna, opracowana przez Durie i Salmona [27], pozwalająca na ustalenie stopnia zaawansowania klinicznego choroby (tabela 3).

Tabela 3. Stadia zaawansowania klinicznego MM wg Durie i Salmona [27]

Stadium I (mała masa nowotworu)	Wszystkie wymienione parametry: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stężenie Hb &gt; 10 g/dl (6,205 mmol/l)</li> <li>▪ stężenie białka monoklonalnego M: IgG &lt; 50 g/l</li> <li>▪ IgA &lt; 30 g/l</li> <li>▪ stężenie wapnia w surowicy &lt; 2,75 mmol/l (5,5 mg/dl)</li> <li>▪ dobowe wydalanie wapnia z moczem &lt; 4 mmol/l (150 mg)</li> <li>▪ dobowe wydalanie monoklonalnych łańcuchów lekkich &lt; 4 g</li> <li>▪ bez zmian kostnych lub pojedyncze ogniska osteolityczne</li> </ul>
Stadium II (pośrednia masa nowotworu)	Parametry nie odpowiadające stadium I i III
Stadium III (duża masa nowotworu)	Obecny przynajmniej jeden z następujących parametrów: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stężenie Hb &lt; 8,5 g/dl (5,27 mmol/l)</li> <li>▪ stężenie białka monoklonalnego M: IgG &gt; 70 g/l</li> <li>▪ IgA &gt; 50 g/l</li> <li>▪ stężenie wapnia w surowicy &gt; 2,75 mmol/l (5,5 mg/dl)</li> <li>▪ dobowe wydalanie wapnia z moczem &gt; 4 mmol/l (150 mg)</li> <li>▪ dobowe wydalanie monoklonalnych łańcuchów lekkich &gt; 12 g</li> <li>▪ liczne zmiany osteolityczne</li> </ul>

W maju 2003 roku, w Salamance odbył się „9th International Multiple Myeloma Workshop”, gdzie został oficjalnie zaproponowany przez Greippa i wsp. [36] *International Prognostic Index (IPI)*, czyli Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla szpiczaka mnogiego, który przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla szpiczaka mnogiego – *International Prognostic Index (IPI)* [36]

Stadium 1	$\beta_2$ mikroglobulina < 3,5 mg/dl albumina $\geq$ 3,5 g/dl
Stadium 2	$\beta_2$ mikroglobulina < 3,5 mg/dl albumina < 3,5 g/dl lub $\beta_2$ mikroglobulina 3,5 – 5,5 mg/dl
Stadium 3	$\beta_2$ mikroglobulina > 5,5 mg/dl

*IPI* ponadto wskazuje, iż wiek pacjenta jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym choroby. Całkowite przeżycie pacjentów powyżej pięciu lat związane jest z wiekiem poniżej 60 roku życia przy rozpoznaniu, zaś całkowite przeżycie poniżej dwóch lat dotyczy chorych powyżej 60 roku życia. Ponadto ilość płytek krwi poniżej  $130.000/\text{mm}^3$  i podwyższona aktywność LDH w surowicy krwi to czynniki związane z przeżyciem poniżej dwóch lat.

Natomiast wg Barlogiego i wsp. [4], wydaje się, iż najważniejsze prognostycznie niekorzystne czynniki to: obecność jakichkolwiek aberracji cytogenetycznych [najczęściej del13, t(4;14) i t(11;14)], wiek chorych powyżej 60 roku życia,  $\beta_2$ mikroglobulina  $\geq$  3 mg/dl, albumina < 3,5 g/dl, płytki krwi <  $130.000/\text{mm}^3$ , aktywność LDH  $\geq$  190 U/l w surowicy krwi oraz postać IgA szpiczaka mnogiego.

### 1.3 Znaczenie cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w patofizjologii szpiczaka mnogiego

Cytokiny są grupą białek o masie cząsteczkowej 15 – 25 kDa [73], spełniających rolę mediatorów sygnalizacji międzykomórkowej. Pełnią one ważną rolę w kontroli kluczowych procesów życiowych organizmu, inicjując proliferację, różnicowanie i śmierć komórki. Wpływają także na wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej, zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego, poprzez oddziaływanie na limfocyty B, T, komórki NK,

układ monocytów / makrofagów i granulocyty. Większość cytokin produkowana jest w postaci prekursorów białek, które poprzez hydrofobową sekwencję aminokwasową (peptyd sygnałowy) włączane są w mechanizm transportu przez błonowy. Cytokiny w przeciwieństwie do hormonów nie są magazynowane w komórkach je produkujących, lecz są szybko syntetyzowane i wydzielane przez różne rodzaje komórek po ich stymulacji. Działanie cytokin ogranicza się najczęściej do mikrośrodowiska wokół komórek je wydzielających, część z nich ma jednak działanie systemowe [57].

Poszczególne cytokiny mogą działać antagonistycznie, addycyjnie lub synergistycznie na te same procesy biologiczne. Dotyczy to zwłaszcza ich wpływu na hematopoezę, odpowiedź immunologiczną i reakcję zapalną [18, 89]. Wspólną cechą wszystkich cytokin jest działanie plejotropowe, które polega na indukowaniu przez określoną cytokinę jednej lub wielu rodzajów odpowiedzi w różnych typach komórek efektorowych. Z drugiej strony poszczególne cytokiny mogą działać w ten sam lub podobny sposób na jeden typ komórek dzieląc się "biologiczną odpowiedzialnością" za ich prawidłowe funkcjonowanie. Zjawisko to, noszące nazwę redundancji cytokinowej ma na celu zabezpieczenie prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego oraz właściwego ukierunkowania reakcji immunologicznych. Wyżej wymienione zjawiska mogą zachodzić na trzech różnych poziomach: wytwarzania, gromadzenia i wiązania cytokin [49]. Działanie poszczególnych cytokin może odbywać się w sposób kaskadowy - jedna wyzwala syntezę kilku innych i w ten sposób rozszerza pośrednio spektrum swojego działania biologicznego. Końcowy efekt działania cytokin może wynikać również z kolejności ich aktywowania [83].

Cytokiny wywierają swój efekt biologiczny za pośrednictwem swoistych receptorów [89], wiążąc się z zewnątrz błonowymi fragmentami komórki docelowej. Niezależnie od struktury receptora, dla jego poprawnego funkcjonowania potrzebne są trzy elementy: domena zewnątrzkomórkowa obdarzona zdolnością wiązania cytokiny, domena przez błonową przekazująca sygnał indukowany przez wiązanie cytokiny do wnętrza komórki oraz domena cytoplazmatyczna mająca zwykle aktywność kinazy, aktywująca system przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego. Niektóre receptory występują zarówno w formie błonowej, jak i rozpuszczalnej.



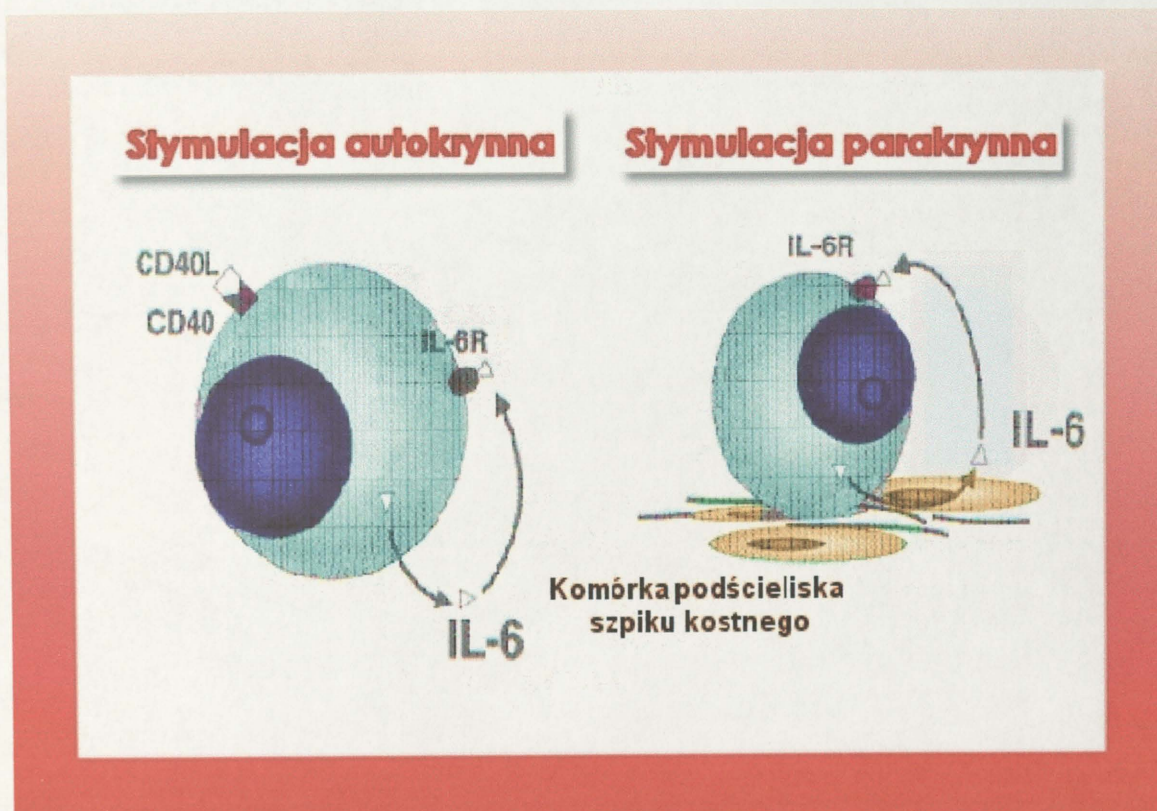
Rozpuszczalne receptory cytokin mogą występować w formie wolnej lub związanej z mikrofragmentami błonowymi. Rozpuszczalne receptory uczestniczą w regulacji funkcji komórek ustroju [49, 89]. Jedną z ról jaką mogą odgrywać, jest konkurencja z receptorami błonowymi poprzez wychwytywanie i blokowanie cytokin, a więc działanie antagonistyczne do nich. Inną możliwością jest wzmacnianie sygnału poprzez kooperację z receptorem błonowym, kiedy kompleks rozpuszczalny receptor - cytokina aktywuje receptor błonowy (np. w przypadku IL-6).

#### 1.4. Interleukina - 6 i rozpuszczalna forma receptora dla Interleukiny - 6

IL-6 i rozpuszczalna forma receptora dla interleukiny-6 (sIL-6R) pełnią kluczową rolę w proliferacji plazmacytów szpiczakowych [56, 113, 119]. W warunkach prawidłowych IL-6 wywołuje różnicowanie limfocytów B i jest najważniejszym czynnikiem podtrzymującym zdolności ich przeżycia [111, 130]. W szpiczaku mnogim IL-6 powoduje przekształcenie nieufosforylowanej postaci białka retinoblastoma (pRB) w aktywną postać ufosforylowaną, co prowadzi do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F1 i proliferacji komórek szpiczakowych. Rolę genu RB w szpiczaku mnogim podkreśla sięgająca 70% częstość zarówno mutacji genu jak i obecności jego produktu białka RB [109]. W przeciwieństwie do oddziaływania na prawidłowe plazmocyty IL-6 wzbudza proliferację komórek szpiczakowych *in vitro* i *in vivo*, ale nie indukuje wydzielania immunoglobulin [52, 111, 130].

Zasadniczym mechanizmem działania IL-6 jest najprawdopodobniej hamowanie apoptozy komórki szpiczakowej. IL-6 obficie wydzielana przez komórki nowotworowe zaangażowana jest w patogenezę niektórych zmian patologicznych typowych dla MM. Wykazuje bezpośrednie działanie osteoklastyczne oraz uszkodzające nerki, sprzyjając powstaniu tzw. „nerki szpiczakowej” [30, 53, 65]. IL-6 może być produkowana w sposób autokryny przez nowotworowe plazmocyty lub parakryny przez komórki podścieliska szpiku kostnego wzbudzone w wyniku adhezji komórek szpiczakowych (rycina 2) [110]. Dla proliferacji plazmocytarnej podstawowe znaczenie ma parakryna droga sekrecji IL-6. Mniej istotny patogenetycznie autokryny sposób wydzielania IL-6 zachodzi po związaniu CD40L do

powierzchniowego CD40 na plazmocytach, co powoduje przejście pRB do aktywnej postaci ufosforylowanej [111, 114].



Rycina 2. Schemat autokrynnego i parakrynnego wytwarzania IL-6 przez patologiczne plazmocyty oraz komórki podścieliska szpiku kostnego u chorego na szpiczaka mnogiego

Receptor IL-6 składa się z dwóch podjednostek: łańcucha  $\alpha$  (CD126) oraz łańcucha  $\beta$  - glikoproteiny gp 130 (CD130), stanowiącej właściwy przekaźnik sygnałów do wnętrza komórki [85]. Interleukina-6, jak i inne cytokiny z rodziny IL-6, o podstawowym znaczeniu dla rozrostu nowotworowego, łączą się z antygenem CD126 i aktywują białko pełniące rolę przekaźnika sygnałów gp130. W komórce szpiczakowej istnieją dwie drogi wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów: szlak JAK – STAT-3 i szlak Ras – MAPK. W tym pierwszym istotną rolę odgrywają nieodłącznie związane z receptorem IL-6 kinazy tyrozynowe Janusa JAK1, JAK2 i TYK2, które fosforylują komórkowe substraty – czynniki transkrypcyjne STAT. Szczególną rolę odgrywa STAT-3, który po fosforylacji przechodzi do jądra komórkowego i działa jako czynnik

inicjujący transkrypcję genu kodującego IL-6 [14, 23, 40]. Szlak ten może być odpowiedzialny za wywoływanie oporności komórki szpiczakowej na apoptozę. Uważa się, że bardziej istotna dla proliferacji nowotworowej jest druga ścieżka transmisji sygnałów związana z onkogenem Ras i kinazą białkową aktywowaną przez mitogeny (MAPK) [78]. Różnice w udziale odpowiednich kaskad przekazywania sygnałów w komórce mogą przekładać się między innymi na różnice odpowiedzi niektórych komórek szpiczakowych na IL-6 [126].

Rozpuszczalna forma receptora dla IL-6 (sIL-6R), o masie cząsteczkowej 55 KD, została wyizolowana z surowicy krwi i moczu chorych na MM [76]. Co ciekawe sIL-6R tworząc kompleks z IL-6 zachowuje zdolność do wiązania się z gp130 i aktywacji komórki docelowej [127]. Odwrotnie zachowuje się większość pozostałych rozpuszczalnych receptorów cytokinowych, które po połączeniu ze swym rozpuszczalnym ligandem tracą swoją aktywność. sIL-6R poszerza więc spektrum komórek, które aktywować może IL-6, o komórki posiadające gp130, a nie posiadające IL-6R [93]. Wykazano, że stężenie sIL-6R w surowicy krwi jest podwyższone u chorych na szpiczaka mnogiego w porównaniu do osób zdrowych [93] i koreluje z ciężkością choroby [60]. Aktualnie ocena stężenia sIL-6R w surowicy krwi uznawana jest za jeden z czynników rokowniczych w MM [45, 82].

#### 1.5. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu i rozpuszczalny receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) jest jednym z najsilniejszych czynników stymulujących angiogenezę. Gen dla VEGF znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 6 [117, 125]. VEGF jest wydzielany zarówno przez komórki nowotworowe, jak i przez podścielisko szpiku kostnego. Działanie biologiczne VEGF jest bardzo różnorodne. Jako silny stymulator mitotyczny dla komórek śródbłonka reguluje rozwój płodowych komórek macierzystych, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej i miejscowe wydzielanie cytokin (między innymi metaloproteinaz i integryn) [75, 81, 124]. W badaniach *in vitro* wykazuje działanie cytoprotekcyjne. W hodowlach plazmocytołów inkubowanych z VEGF apoptozie ulegało mniej komórek w porównaniu do hodowli bez VEGF [51].

Rodzina VEGF składa się z VEGF (zwanym też VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i PlGF. Z kolei jedynie VEGF (czyli VEGF-A) występuje w postaci pięciu izoform (VEGF 121, 145, 165, 181, 206). Najsilniejszym czynnikiem stymulującym transkrypcję i sekrecję VEGF jest hipoksja. W ostatnich latach wykazano, iż wiele innych czynników reguluje transkrypcję VEGF m.in. aktywacja niektórych onkogenów H-ras, K-ras, raf lub inaktywacja genu supresorowego p53 [75]. VEGF wywiera biologiczny efekt za pośrednictwem receptorów wysokiego powinowactwa należących do grupy receptorów kinazy tyrozynowej (RKT) [13]. Poznane są trzy receptory dla VEGF: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) i VEGFR-3. W szpiczaku mnogim znaczenie ma przede wszystkim receptor flt1. Receptory VEGF zbudowane są z domeny zewnątrzkomórkowej składającej się z siedmiu domen immunoglobulinopodobnych, pojedynczego przezbłonowego odcinka i wewnątrzkomórkowej rozszczepionej domeny – kinazy tyrozynowej. Autofosforylacja kinazy tyrozynowej, wywołana przyłączeniem ligandu (tj. VEGF) do zewnątrzkomórkowej części receptora, umożliwia przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych. Połączenie VEGF z receptorem inicjuje aktywację szeregu kinaz i czynników transkrypcyjnych, spośród których istotne są dwa szlaki przewodzenia sygnału: Ras-MAPK oraz droga związana z pobudzeniem kinazy tyrozynowej C. VEGF wpływa również na zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, pobudza osteoklastogenezę i produkcję IL-6 przez komórki podścieliska szpiku kostnego. VEGFR-2 zwany również KDR/flk-1 odgrywa kluczową rolę w procesie naczyniotworzenia i krwiotworzenia w okresie rozwoju embrionalnego. W warunkach fizjologicznych receptor ten występuje wyłącznie na powierzchni zdrowych komórek śródbłonna oraz komórek macierzystych pnia; posiada decydujące znaczenie w proliferacji i różnicowaniu komórek śródbłonna oraz angiogenezie [69, 75]. W szpiczaku mnogim połączenie VEGF z VEGFR-1 i VEGFR-2 indukuje angiogenezę oraz prowadzi do ekspansywnego rozwoju nowotworu. Ponadto w wyniku aktywacji receptorów, dochodzi do zwiększonej ekspresji integryn na powierzchni komórek, co ułatwia ich adhezję i migrację [13]. Wykazano także, iż VEGFR-2 poprzez hamowanie apoptozy, ma znaczący wpływ na regulację czasu przeżycia komórek [35].

## 1.6. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic Fibroblast Growth Factor, b-FGF) jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 18 kD. Gen dla b-FGF znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 4 [89]. Wytwarzany jest przez różne typy komórek m.in. fibroblasty i keratynocyty. Cytokina ta wywiera biologiczne działanie za pośrednictwem receptorów należących do rodziny receptorów związanych z kinazą tyrozynową. *In vitro* b-FGF działa silnie chemotaktycznie i mitogennie na komórki śródbłonna i fibroblasty, zaś *in vivo* jest silnym czynnikiem stymulującym angiogenezę. Ponadto b-FGF zwiększa aktywność kolagenaz, przyczynia się do destrukcji błony podstawnej i w sposób istotny zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych.

Zwiększoną produkcję b-FGF obserwowano w różnych liniach komórek nowotworowych, a podwyższone stężenia tej cytokiny w surowicy i/lub moczu u chorych z aktywną chorobą nowotworową [10, 74, 80, 120].

W szpiczaku mnogim stężenie b-FGF w surowicy krwi wzrasta w miarę progresji choroby. W MGUS surowicze stężenie b-FGF jest takie samo jak u osób zdrowych, w SMM bywa podwyższone, a w aktywnej postaci choroby (szczególnie w szpiczaku mnogim wydzielającym łańcuchy lekkie) następuje dalszy jego wzrost [108]. Stwierdzono również, iż komórki szpiczakowe posiadające na swej powierzchni receptor FGFR3 (którego nie mają prawidłowe komórki limfoidalne), szybciej ulegają podziałom i rzadziej apoptozie, niż komórki bez FGFR3 [132]. Skuteczne leczenie antyproliferacyjne powoduje często obniżenie stężenia b-FGF w surowicy krwi u chorych na MM [50].

## 1.7. Transformujący czynnik wzrostu - $\beta_1$

TGF- $\beta_1$  syntetyzowany jest przez niemal wszystkie komórki ustroju [15, 79] i wykazuje działanie: 1. przeciwzapalne, 2. indukuje supresję funkcjonalną limfocytów T, B, monocytów / makrofagów oraz komórek NK; 3. pobudza syntezę kolagenu, stymuluje proliferację fibroblastów i wzmacnia ekspresję receptorów komórkowych dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej,

Aktualnie, podkreślane są antyproliferacyjne mechanizmy działania TGF- $\beta_1$ . Gen kodujący dla TGF- $\beta_1$  zlokalizowano w chromosomie 19 (19q13)

[89]. Wydaje się, że zwiększona sieć mikrokrążenia szpikowego w MM jest m.in. wynikiem wydzielania przez plazmocyty również TGF- $\beta_1$ , który stymuluje uwalnianie PDGF, a przez to nasila angiogenezę [9]. TGF- $\beta_1$  przede wszystkim jest inhibitorem odpowiedzi immunologicznej – *in vivo* hamuje aktywność makrofagów i proliferację komórek T w reakcji na poliklonalne mitogeny. Ponadto hamuje działanie prozapalnych cytokin (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) na neutrofile i komórki śródbłonna naczyniowego. TGF- $\beta_1$  hamuje aktywność układu monocytów - makrofagów poprzez zmniejszenie wytwarzania wolnych rodników tlenowych i azotowych. TGF- $\beta_1$  może być wydzielany przez komórki szpiczakowe obok znanego mechanizmu zależnego od IL-6 [54], gdzie proliferacja plazmocytów pobudzana jest drogą autokrynną i parakrynną.

TGF- $\beta_1$  reguluje ekspresję fibronektyny w podścielisku szpiku kostnego. Fibronektyna wraz z lamininą mają szczególne znaczenie w adhezji plazmocytów w szpiku kostnym chorych na MM [9].

#### 1.8. Czynniki wzrostu hepatocytów

Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) ma właściwości mitogenne, chemotaktyczne i morfogenne [48]. Produkowany jest przez komórki pochodzenia mezenchymalnego, głównie fibroblasty i komórki mięśni gładkich. Wykazano, iż wiele czynników, m.in. b-FGF, pobudza syntezę i wydzielanie HGF [91]. Cytokina ta działa na komórki za pośrednictwem receptora powierzchniowego kodowanego przez proto-onkogen *c-met*.

HGF indukuje angiogenezę poprzez stymulację proliferacji, migracji i adhezji komórek śródbłonna. Ponadto wywiera istotny wpływ na morfogenezę nowych naczyń krwionośnych oraz pobudza podścielisko szpiku kostnego do syntezy czynników angiogennych [48].

Podwyższone stężenia HGF w surowicy krwi obserwowano u osób z zaburzeniami czynności wątroby [34] oraz u chorych na nowotwory hematologiczne, takie jak: białaczki, chłoniaki [11, 84] i szpiczak mnogi [34, 42, 99, 100].

Wykazano, iż HGF może też pobudzać rozmnażanie i różnicowanie krwiotwórczych komórek progenitorowych [11, 12]. Cytokina ta współdziała *in vitro* z erytropoetyną, wywołując formowanie kolonii linii czerwonokrwinkowej.

W obecności erytropoetyny i czynnika wzrostu komórek pnia, HGF pobudza *in vitro* formowanie kolonii multipotencjalnych (CFU - GEMM). HGF ma działanie motogeniczne względem komórek nabłonkowych, śródbłonkowych i mezenchymalnych.

Podwyższone stężenie HGF w surowicy krwi u chorych na MM związane jest z niekorzystną prognozą. Liczne badania dowodzą, iż HGF zaangażowany jest w proliferacji nowotworowej, uszkodzeniu kości, angiogenezie oraz adhezji komórek szpiczakowych do podścieliska w szpiku kostnym [42, 100]. Wydaje się, iż bardzo istotną rolę odgrywa tutaj mechanizm parakryny i autokryny stymulacji HGF i *c-met* [11]. Receptor *c-met* nie występuje na limfocytach B krwi obwodowej, natomiast jego obecność została potwierdzona w 100% komórek szpiczakowych na poziomie mRNA, a także na poziomie białka [11, 12]. Najnowsze badania wskazują na istotną rolę osi HGF-*c-met* w stymulacji proliferacji oraz zahamowaniu apoptozy komórek MM.

## 2. Cele pracy

1. Porównanie osoczowych stężeń interleukiny-6 (IL-6), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (b-FGF), transformującego czynnika wzrostu -  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i wybranych rozpuszczalnych receptorów cytokin: sIL-6R, sVEGF R2 u chorych na szpiczaka mnogiego oraz w grupie kontrolnej.
2. Analiza osoczowych stężeń interleukiny-6 (IL-6), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (b-FGF) transformującego czynnika wzrostu -  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i wybranych rozpuszczalnych receptorów cytokin: sIL-6R, sVEGF R2 u chorych w zależności od czasu trwania zastosowanej terapii antyproliferacyjnej.
3. Badanie wartości prognostycznej osoczowych stężeń interleukiny-6 (IL-6), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (b-FGF), transformującego czynnika wzrostu -  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i wybranych rozpuszczalnych receptorów cytokin: sIL-6R, sVEGF R2 u chorych na szpiczaka mnogiego.

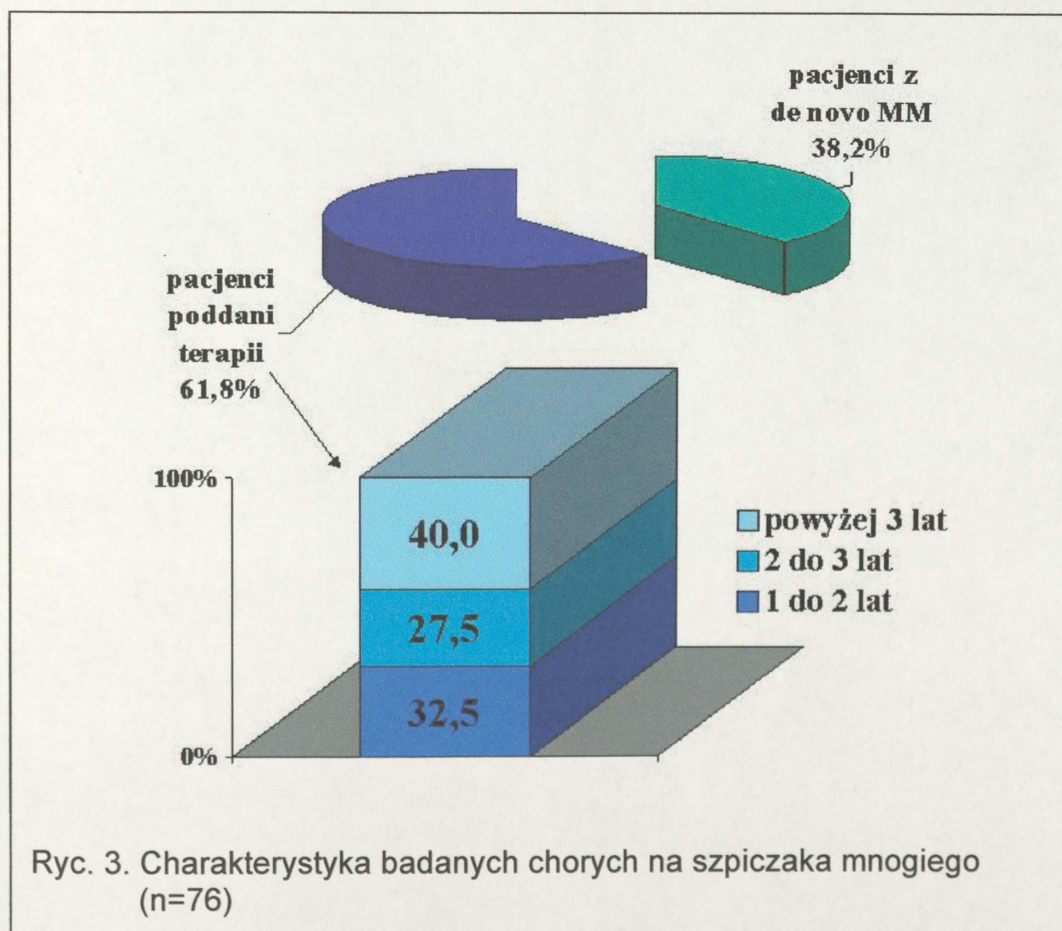


### 3. Metodyka oraz analiza badanych grup pacjentów

#### 3.1. Charakterystyka kliniczna badanych grup chorych

Badaniem objęto 76 chorych na szpiczaka mnogiego leczonych w Klinice Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w okresie od listopada 2001 do października 2002 roku. Wiek badanych pacjentów pozostawał w granicach od 22 do 77 lat (średnia 60 lat  $\pm$  10). Grupa badana składała się z:

1. 29 osób (38,2 %) - grupa N - *de novo* rozpoznanych, dotychczas nie leczonych,
2. 47 osób (61,8 %) - grupa S – objętych leczeniem antyproliferacyjnym, przed włączeniem do badania (rycina 3).



Poddano analizie - grupa N i S:

1. osoby z *de novo* rozpoznaną chorobą (n=29),
2. pacjentów leczonych chemioterapią (n=37),
3. kilka osób poddanych procedurze wysokodozowanej chemioterapii, wspomaganej auto przeszczepieniem komórek macierzystych z krwi obwodowej (n=6) oraz leczonych talidomidem (n=4).

W trakcie badania z grupy S wyróżniono:

Podgrupę S1- pacjenci pozostający w leczeniu od 1 roku do 2 lat (n=13),

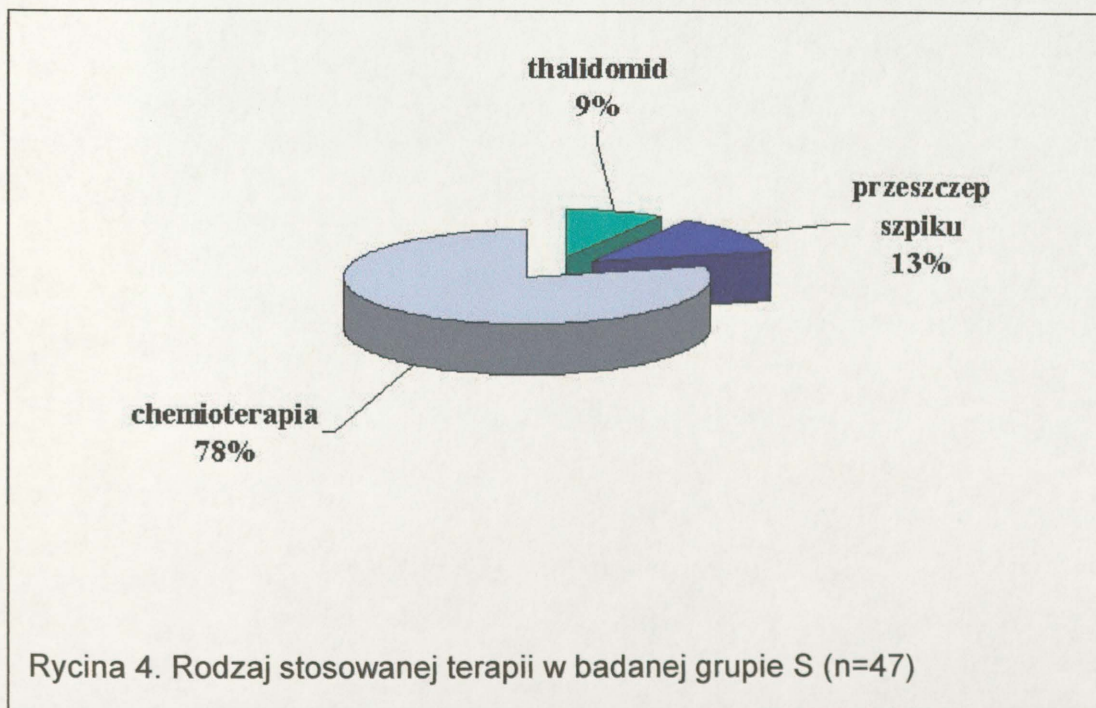
Podgrupę S2- pacjenci pozostający w leczeniu od 2 do 3 lat (n=11),

Podgrupę S3- pacjenci pozostający w leczeniu powyżej 3 lat (n=23).

Ponadto z grupy S wyodrębniono:

Podgrupę SZP (n=11) - pacjenci z progresją choroby, oporni na terapię.

Podgrupę SBP (n=23) - chorzy odpowiadający na terapię, bez progresji choroby. Rodzaj terapii w grupie S przedstawiono schematycznie na rycinie 4.



Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy, pracownicy Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (n=35) w wieku od 20 do 63 lat (średnia 33 lata  $\pm$  10). Obie grupy, zarówno badana jak i kontrolna nie różniły się rozkładem płci. Grupa pacjentów obejmowała 38 kobiet oraz 38 mężczyzn – wskaźnik K/M=1. W grupie kontrolnej było 19 kobiet (54,3%) i 16 mężczyzn (45,7%) – wskaźnik K/M=1,2.

### 3.2. Badania kliniczne oraz metody oznaczeń laboratoryjnych

Rozpoznanie szpiczaka mnogiego ustalono na podstawie stwierdzenia w badaniu cytologicznym aspiratu szpiku kostnego obecności plazmocytów w odsetku co najmniej 15%, obecności białka monoklonalnego w surowicy lub moczu oraz zmian osteolitycznych kości. Okres choroby ustalono zgodnie z klasyfikacją kliniczną opracowaną wg Durie i Salmona [27, 124]. Wszyscy analizowani pacjenci byli w drugim bądź trzecim stadium zaawansowania klinicznego choroby. U każdej osoby przeprowadzono szczegółowy wywiad lekarski, badanie fizykalne oraz testy laboratoryjne: morfologię krwi obwodowej z oceną obrazu odsetkowego komórek, badanie cytologiczne szpiku kostnego uzyskanego drogą biopsji aspiracyjnej z tylnego kolca talerza kości biodrowej, badanie trepanobiopsyjne szpiku kostnego. W surowicy oznaczano: aktywność dehydrogenazy mleczanowej, stężenie mocznika, kreatyniny, wapnia całkowitego, CRP,  $\beta_2$ mikroglobuliny, elektroforezę białek. Ponadto wykonano badania podstawowe układu krzepnięcia oraz zdjęcia radiologiczne klatki piersiowej, kości płaskich i badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. Przeprowadzono również badanie ogólne moczu oraz odczyn opadania krwinek czerwonych - OB.

Pacjentów włączono do badania po wyjaśnieniu procedury badawczej i po wyrażeniu pisemnej zgody. Materiał do oznaczania cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów stanowiła krew obwodowa pozyskiwana z żyły łokciowej. Krew pobierano pomiędzy godziną 7.30 a 8.30 do jałowych probówek typu Vacutainer (Becton Dickinson) na antykoagulant (EDTA). Probówki następnie wirowano przez 10 minut z szybkością 1000

obrotów/minutę. Osocze odpipetowywano do jałowych probówek (Nunc) i przechowywano w temperaturze  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez okres nie więcej niż 12 miesięcy, do czasu wykonania analizy. Wyniki morfologii krwi uzyskiwano w Pracowni Analitycznej Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego metodą fotooptyczną i konduktometryczną, przy użyciu analizatora hematologicznego Cell-Dyn 1700 firmy Abbott. Oznaczenia biochemiczne (aktywność dehydrogenazy mleczanowej, stężenie mocznika, kreatyniny, stężenie wapnia całkowitego, CRP,  $\beta_2$ mikroglobuliny, elektroforezę białek surowicy krwi, badanie układu krzepnięcia, badanie ogólne moczu) wykonywano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

### 3.2.1. Analiza osoczowych stężeń badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów

W celu oznaczania osoczowych stężeń: VEGF, s VEGF R2, IL-6, s IL-6R, b-FGF, HGF, TGF- $\beta_1$  wykorzystywano metodę immunoenzymatyczną ELISA. W badaniach zastosowano gotowe zestawy: Quantikine, R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA.

Zakupione płytki reakcyjne opłaszczane przeciwciałem monoklonalnym specyficznym dla badanego czynnika inkubowano z analizowanym osoczem chorego. Cytokiny bądź ich rozpuszczalne receptory zawarte w osoczu (VEGF, sVEGF R2, IL-6, sIL-6R, b-FGF, HGF) były specyficznie wiązane i unieruchamiane na powierzchni, tworząc fazę stałą reakcji. Po wypłukaniu zbędnych składników, do studzienki dodawano przeciwciała specyficzne dla badanego składnika, sprzężone z peroksydazą chrzanową. W wyniku reakcji otrzymywano kompleks immunologiczny o strukturze „kanapkowej”: opłaszczony na płytce przeciwciałem monoklonalnym I rzędu – badana cytokina – przeciwciałem monoklonalnym II rzędu znakowane enzymem. Po usunięciu substancji nie związanych z kompleksem immunologicznym do układu reakcyjnego dodawano roztwór substratu dla enzymu znacznikowego: tetrametylobenzydynę i nadtlenek wodoru. Do pomiaru absorbancji użyto czytnika do mikropłytetek Elx 800 firmy Bio - Tek Instruments (USA). Wartość absorbancji odczytywano dla długości fali  $\lambda=450\text{ nm}$  i przeliczano na jednostki

stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną. Oznaczenia osoczowych stężeń: IL-6, VEGF, HGF, sVEGF R2, b-FGF wyrażano w pg/ml, zaś sIL-6R w ng/ml.

Pomiar stężenia wolnego osoczowego TGF- $\beta_1$  był wykonywany w osoczu ubogo płytkowym. W ten sposób minimalizowano wpływ TGF- $\beta_1$  pochodzenia płytkowego. Występujący w osoczu TGF- $\beta_1$  w formie latentnej aktywowano przez zakwaszenie, a następnie zobojętnienie badanej próbki w ściśle określonych warunkach.

W systemie ELISA (Quantikine, human TGF- $\beta_1$ , R&D Systems Inc.) studzienki na mikropłytkce opłaszczane były rozpuszczalnym receptorem TGF- $\beta_1$  typu II, który całkowicie wiązał obecny w badanej próbce TGF- $\beta_1$  i unieruchomił go w fazie stałej. Po usunięciu niezwiązanych substancji (płukanie) do studzienek wprowadzano koniugat – roztwór poliklonalnych przeciwciał specyficznych dla oznaczanego peptydu i sprzężonych z enzymem peroksydazą chrzanową. W wyniku reakcji powstawał kompleks immunologiczny o strukturze kanapkowej:

powierzchnia płytki z receptorem II dla TGF beta1  $\rightarrow$  TGF beta1  $\rightarrow$  koniugat  
Po usunięciu substancji nie związanych z kompleksem immunologicznym do układu reakcyjnego dodawano roztwór dla enzymu znacznikowego: tetrametylobenzydynamę i nadtlenuk wodoru. Do pomiaru absorbancji użyto czytnika do mikropłytek Elx 800 firmy Bio - Tek Instruments (USA). Wartość absorbancji dla TGF- $\beta_1$  odczytywano dla długości fali  $\lambda=450$  nm i przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną. Oznaczenia stężenia TGF- $\beta_1$  w osoczu krwi wyrażano w ng/ml.

### 3.3. Metody statystyczne

Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów oznaczone w badanych grupach opracowywano wykorzystując elementy statystyki opisowej (średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, mediana, minimum, maksimum) oraz przedstawiono w postaci tabel, rycin, wykresów słupkowych, pudełkowych i liniowych [43]. Podczas przeprowadzonej analizy statystycznej porównywano obserwowane parametry w grupie badanej i kontrolnej jak również w grupie badanej pomiędzy pacjentami w zależności od długości stosowania terapii antyproliferacyjnej. Analizę oparto na testach nieparametrycznych ze względu na brak normalności rozkładu.

Podczas wnioskowania statystycznego wykorzystywano:

- test U Manna-Whitneya
- test niezależności  $\chi^2$
- analizę współczynników korelacji Pearsona i Spearmana

Za znamienne statystycznie przyjmowano wyniki, dla których poziom istotności był mniejszy lub równy 0,05.

Podjęto również próbę określenia punktu krytycznego dla analizowanych osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów, który mógłby być przydatny w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie antyproliferacyjne.

Do tego celu wykorzystywano metodę krzywych ROC (Receiver Operating Characteristic) [44]. W metodzie tej wykonywano obliczenia czułości i swoistości, co pewien krok, od wartości minimum do maksimum przyjmując za punkt odniesienia podział na pacjentów pozytywnie odpowiadających i opornych na stosowaną terapię. Na podstawie uzyskanych wartości czułości i swoistości wkreślana była krzywa ROC, dla której powierzchnia pod krzywą zawierała się w przedziale od 0 do 1. Im większa powierzchnia pod krzywą tym większa wartość diagnostyczna badania. Punkt krytyczny wyznaczany był dla optymalnie największych wartości czułości i swoistości.

W analizie wykorzystano pakiety statystyczne:

- Statystyka opisowa i testy nieparametryczne porównujące badane grupy: STATISTICA 5.0
- Analiza krzywych ROC: Stats Direct 2.2.4 firmy Status Direct Limited 1990-2003.

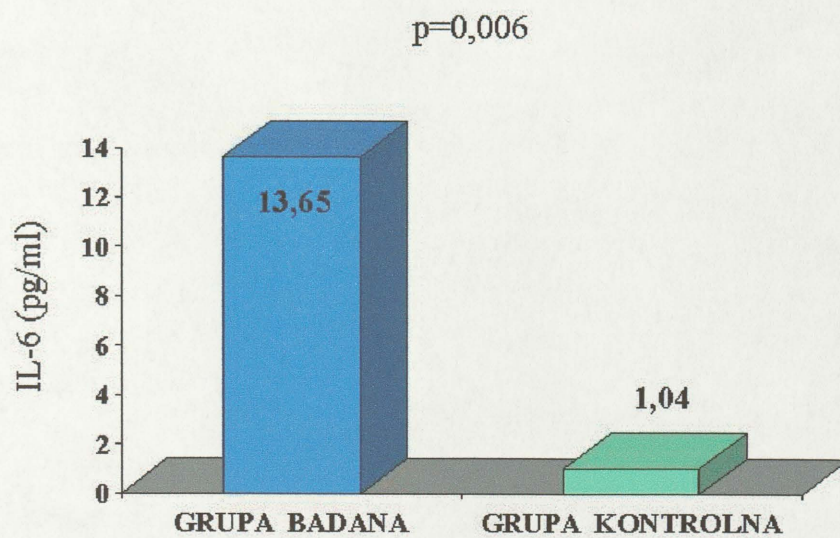
#### 4. Wyniki

##### 4.1. Ocena osoczowych stężeń cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w grupie chorych na szpiczaka mnogiego i grupie kontrolnej

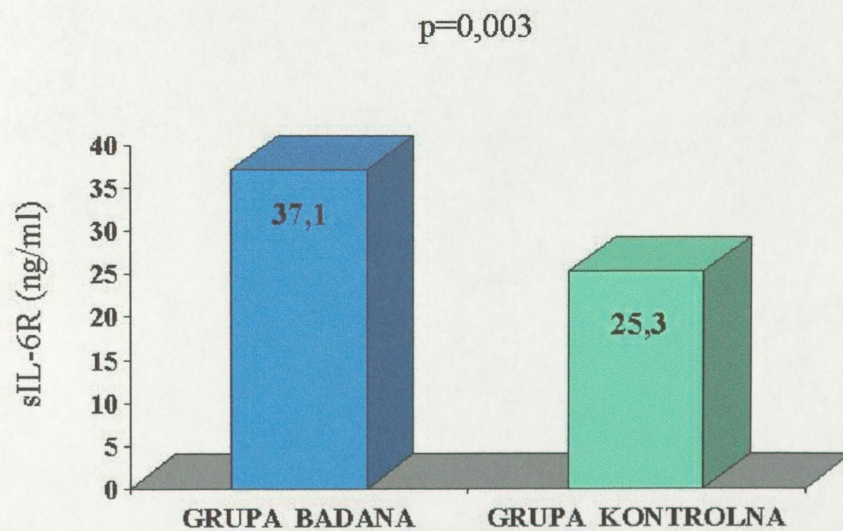
W osoczu krwi chorych na MM stwierdzono znamienne wyższe stężenia HGF ( $p < 0,001$ ) oraz b-FGF ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Również w grupie chorych stwierdzono istotnie wyższe osoczowe stężenia IL-6 ( $p = 0,006$ ) oraz sIL-6R ( $p = 0,003$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast osoczowe stężenie sVEGF-R2/KDR było w grupie chorych istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,001$ ). Zaobserwowano także wyższe wartości osoczowych stężeń VEGF w grupie chorych ( $56,8 \pm 46,7$  pg/ml), w porównaniu do grupy kontrolnej ( $49,9 \pm 49,9$  pg/ml) - jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Nie wykazano również różnic istotnych statystycznie pomiędzy osoczowymi stężeniami TGF- $\beta_1$  w badanych grupach. Poniżej umieszczono zestawienie osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w badanych grupach (tabela 5 oraz ryciny od 5 do 11).

Tabela 5. Osoczowe stężenia cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów u chorych na MM

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	GRUPA				p
	BADANA		KONTROLNA		
	n	x $\pm$ SD (min-max)	n	x $\pm$ SD (min-max)	
IL-6(pg/ml)	65	13,65 $\pm$ 42,61 (0 - 251,13)	35	1,04 $\pm$ 1,12 (0 - 3,04)	0,006
sIL-6R(ng/ml)	65	37,1 $\pm$ 14,2 (15,7 - 78,3)	35	25,3 $\pm$ 6,4 (14,6 - 38,4)	0,003
VEGF(pg/ml)	65	56,8 $\pm$ 46,7 (5 - 219)	35	49,9 $\pm$ 49,9 (0 - 176,3)	NS
s VEGF-R2(pg/ml)	65	7518 $\pm$ 2119 (1103 - 12728)	35	8725 $\pm$ 1281 (6957 - 12234)	<0,001
HGF (pg/ml)	76	2174 $\pm$ 2714 (475 - 17327)	35	648 $\pm$ 130 (426 - 916)	<0,001
b-FGF(pg/ml)	76	7,92 $\pm$ 10,78 (0 - 53,5)	35	2,54 $\pm$ 5,38 (0 - 24,22)	<0,001
TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	75	12,41 $\pm$ 6,64 (2,83 - 33,25)	35	13,72 $\pm$ 8,17 (3,7 - 51,27)	NS

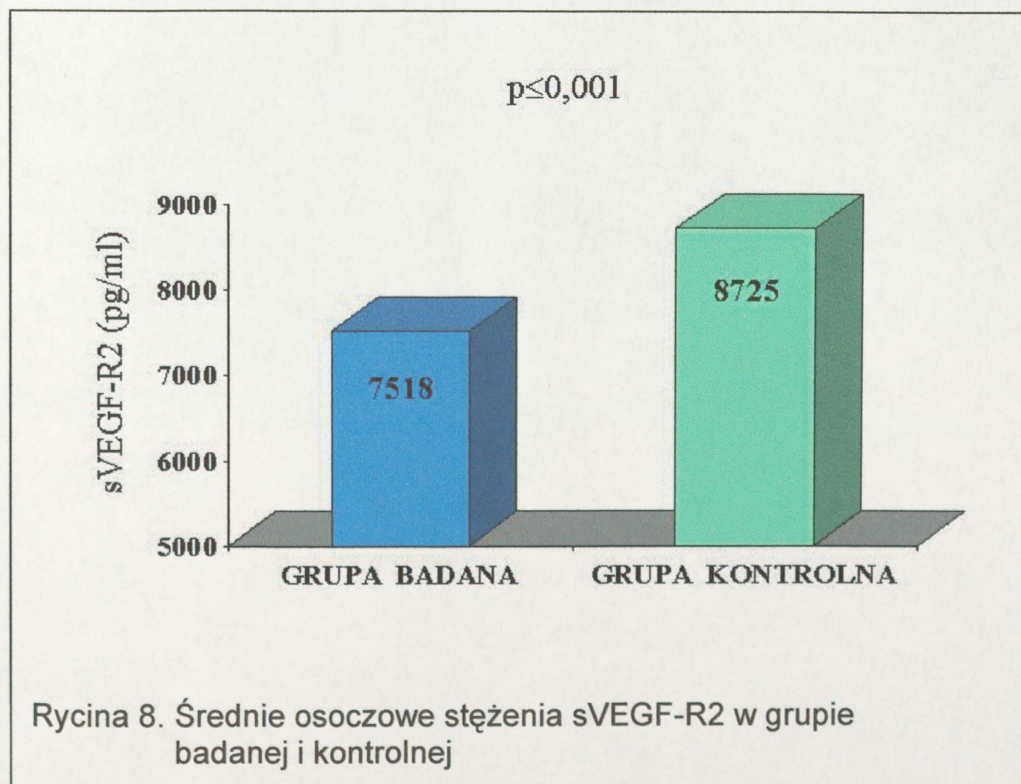
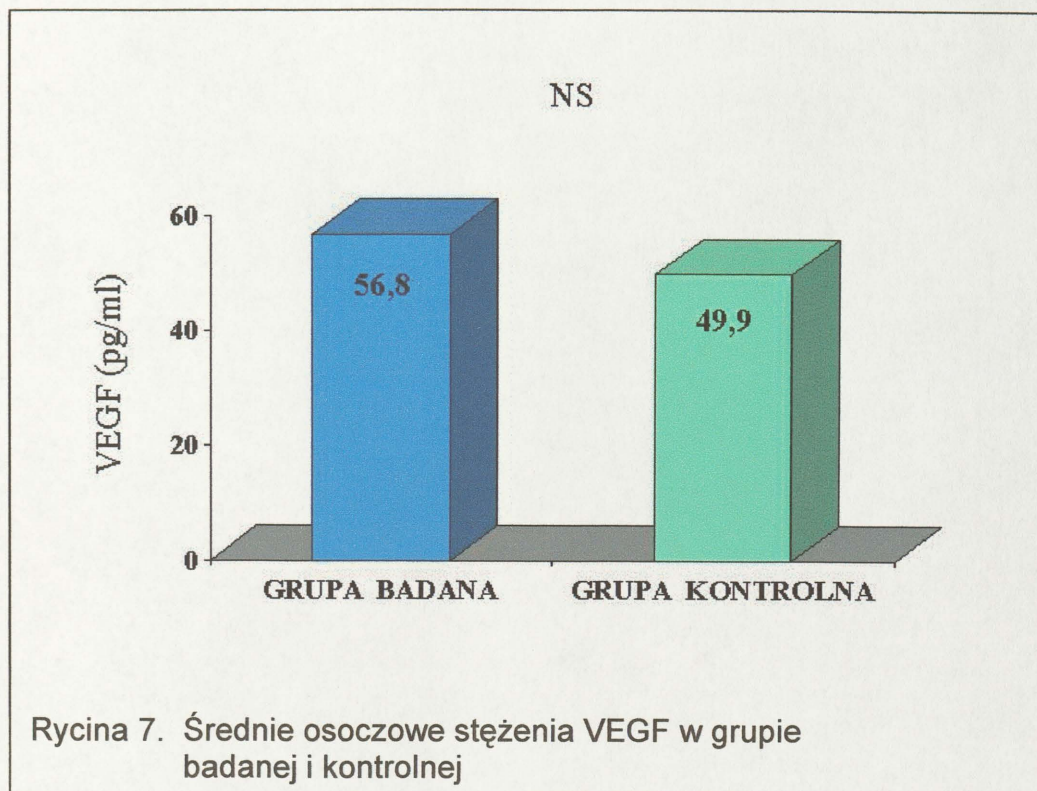


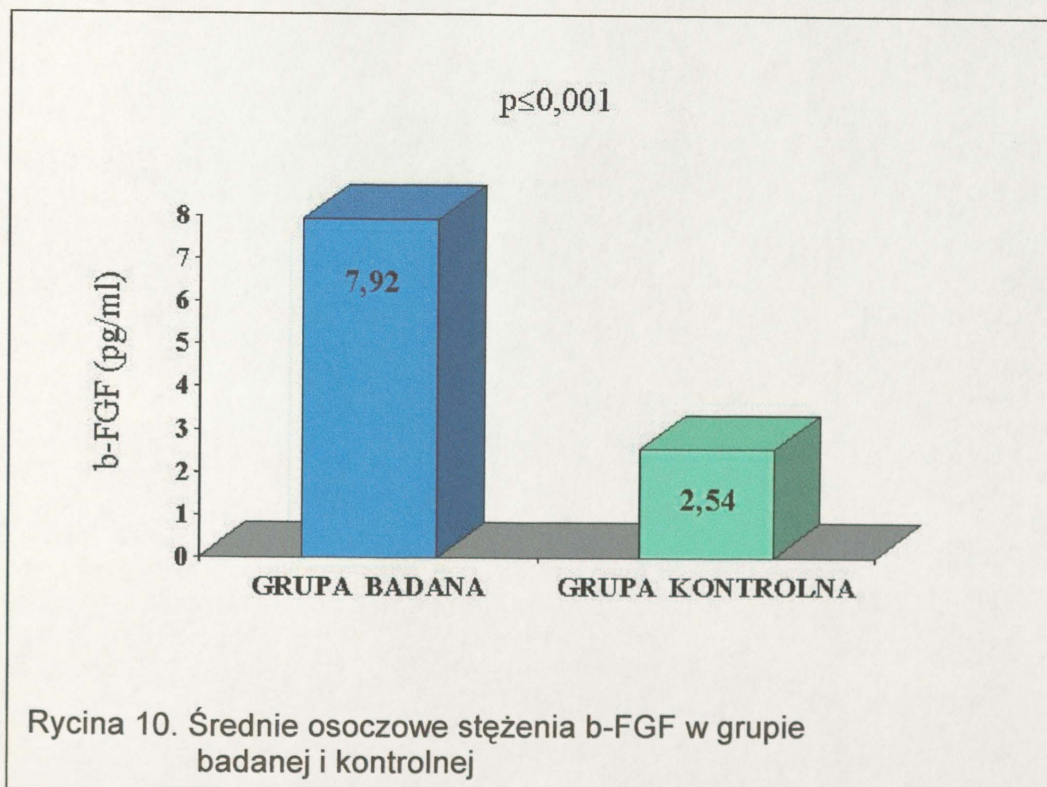
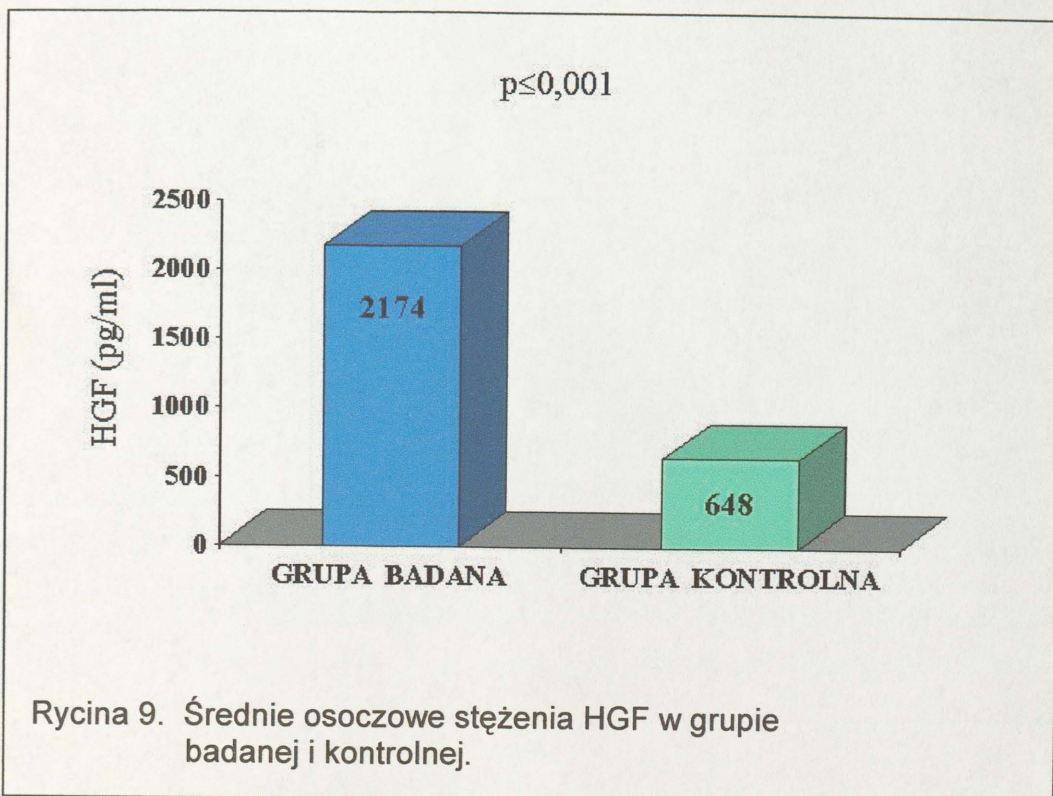
Rycina 5. Średnie osoczowe stężenia IL-6 w grupie badanej i kontrolnej

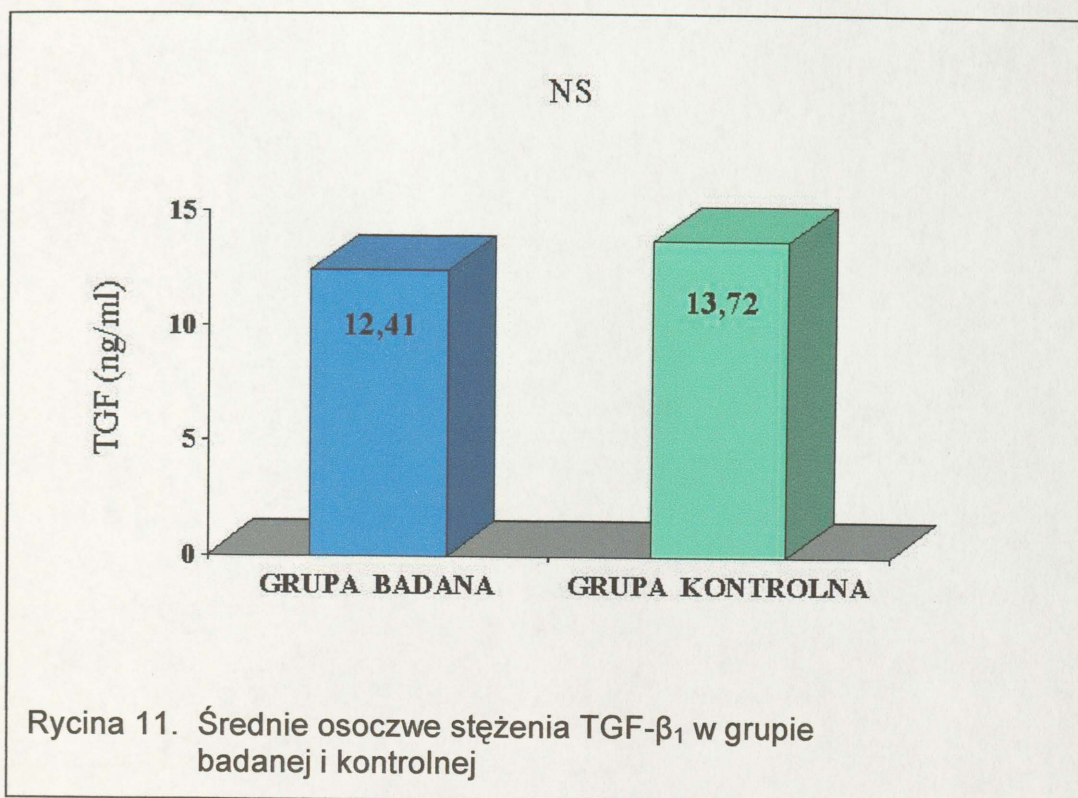


Rycina 6. Średnie osoczowe stężenia sIL-6R w grupie badanej i kontrolnej









#### 4.2. Ocena korelacji pomiędzy wybranymi osoczowymi stężeniami cytokin i ich rozpuszczalnymi receptorami u chorych na szpiczaka mnogiego

Analiza przedstawiona w formie macierzy korelacji w tabeli 6 wskazuje na istnienie statystycznie znamiennej dodatniej współzależności pomiędzy osoczowymi stężeniami cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w grupie pacjentów *de novo* rozpoznanych, nie leczonych (grupa N):

- IL-6 i sIL-6R ( $r=0,471$  ;  $p=0,03$ )
- HGF i sIL-6R ( $r=0,438$  ;  $p=0,04$ )
- HGF i sVEGF-R2 ( $r=0,481$  ;  $p=0,02$ )

Tabela 6. Zależność pomiędzy badanymi cytokinami i ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie dotychczas nieleczonych pacjentów (grupa N)

Cytokiny i rozpuszczalne receptory		sIL-6R	VEGF	sVEGF R2	HGF	b-FGF	TGF- $\beta_1$
IL-6	r	0,471	0,386	0,201	0,368	-0,182	0,182
	p	0,03	0,08	0,37	0,09	0,42	0,42
sIL-6R	r		0,011	0,302	0,438	-0,021	-0,036
	p		0,96	0,17	0,04	0,92	0,87
VEGF	r			0,223	0,166	-0,274	0,405
	p			0,32	0,46	0,22	0,06
sVEGF-R2	r				0,481	-0,131	-0,084
	p				0,02	0,56	0,71
HGF	r					-0,002	-0,195
	p					0,99	0,31
b-FGF	r						0,157
	p						0,42

r – współczynnik korelacji Pearsona

p – poziom prawdopodobieństwa istotności dla  $p \leq 0,05$

n – liczna oznaczeń dla których obliczono współczynnik korelacji

W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie korelacje.

W tabeli 7 przedstawiono macierz korelacji analizowanych osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w grupie S - pacjentów poddanych leczeniu w różnym okresie czasu, przed badaniem.

Znamienną dodatnią współzależność wykazano pomiędzy:

- HGF i IL-6 ( $r=0,742$  ;  $p=0,001$ )
- b-FGF i HGF ( $r=0,345$  ;  $p=0,02$ )
- TGF- $\beta_1$  i VEGF ( $r=0,544$  ;  $p=0,001$ )

Natomiast znamienną ujemną współzależność wykazano pomiędzy:

- b-FGF i sIL-6R ( $r= -0,346$  ;  $p=0,02$ )

Tabela 7. Zależność pomiędzy badanymi cytokinami i ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie pacjentów poddanych terapii (grupa S)

Cytokiny i rozpuszczalne receptory		sIL-6R	VEGF	sVEGFR2	HGF	b-FGF	TGF- $\beta_1$
IL-6	r	-0,079	-0,021	0,020	0,742	0,054	0,110
	p	0,62	0,89	0,90	0,001	0,73	0,49
sIL-6R	r		0,142	-0,013	0,086	-0,346	-0,075
	p		0,36	0,93	0,58	0,02	0,64
VEGF	r			-0,50	0,051	-0,091	0,544
	p			0,75	0,75	0,56	0,001
sVEGF-R2	r				-0,096	-0,101	0,056
	p				0,54	0,52	0,72
HGF	r					0,345	0,163
	p					0,02	0,28
b-FGF	r						0,050
	p						0,74

r – współczynnik korelacji Pearsona

p – poziom prawdopodobieństwa istotność dla  $p \leq 0,05$

n – liczba oznaczeń dla których obliczono współczynnik korelacji

W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie korelacje.

#### 4.3. Osoczowe stężenia cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów u chorych przed i po rozpoczęciu leczenia

U chorych na MM przed rozpoczęciem leczenia (grupa N) stwierdzono znamienne wyższe osoczowe stężenia HGF ( $p < 0,001$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ) oraz sIL-6R ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto w grupie N stwierdzono istotnie wyższe osoczowe stężenia b-FGF ( $p = 0,012$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w grupie tej osoczowe stężenia sVEGF-R2/KDR były znamienne niższe w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,0029$ ). Zaobserwowano także wyższe wartości osoczowych stężeń VEGF ( $64,5 \pm 52,6$  pg/ml) w grupie N w porównaniu do grupy kontrolnej ( $49,9 \pm 44,9$  pg/ml), jednak różnice te nie były istotne statystycznie.

Nie wykazano różnic pomiędzy stężeniami TGF- $\beta_1$  w badanych grupach. Powyższe analizy przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Stężenia cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin w grupie pacjentów nie leczonych (N) w porównaniu z grupą kontrolną

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	GRUPA				p
	kontrola		N		
	n	x $\pm$ SD (min-max)	n	x $\pm$ SD (min-max)	
IL-6(pg/ml)	35	1,05 $\pm$ 1,12 (0 – 3,04)	22	17,2 $\pm$ 20,7 (0 – 241,8)	<0,001
sIL-6R(ng/ml)	35	25,3 $\pm$ 6,43 (14,6 – 38,4)	22	42,9 $\pm$ 15,9 (21 – 78,3)	<0,001
VEGF(pg/ml)	35	49,9 $\pm$ 44,9 (0 – 176,3)	22	64,5 $\pm$ 52,6 (13,6 – 175,5)	NS
s VEGF-R2(pg/ml)	35	8725 $\pm$ 1281 (6957 – 12234)	22	7734 $\pm$ 2007 (2775 – 12728)	0,029
HGF (pg/ml)	35	648 $\pm$ 130 (426 – 916)	29	2007 $\pm$ 1660 (475 – 7317)	<0,001
b-FGF(pg/ml)	35	2,55 $\pm$ 5,39 (0 – 24,22)	29	7,44 $\pm$ 11,11 (0 – 49,6)	0,012
TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	35	13,72 $\pm$ 8,17 (3,7 – 51,27)	29	14,24 $\pm$ 7,00 (6,53 – 33,25)	NS

U chorych na MM objętych leczeniem antyproliferacyjnym, przed włączeniem do badania (grupa S) stwierdzono znamienne wyższe osoczowe stężenia HGF ( $p < 0,001$ ), b-FGF ( $p < 0,001$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ) oraz sIL-6R ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie S osoczowe stężenia sVEGF-R2/KDR były znamienne niższe w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,004$ ). Nie wykazano różnic pomiędzy osoczowymi stężeniami VEGF i TGF- $\beta_1$  w badanych grupach. Powyższe analizy przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Stężenia cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin w grupie pacjentów poddanych terapii (S) w porównaniu z grupą kontrolną

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	GRUPA				p
	kontrola		S		
	n	x ± SD (min-max)	n	x ± SD (min-max)	
IL-6(pg/ml)	35	1,05 ± 1,12 (0 – 3,04)	43	11,8 ± 38,5 (0 – 251,13)	<0,001
sIL-6R(ng/ml)	35	25,3 ± 6,43 (14,6 – 38,4)	43	34,1 ± 12,4 (15,7 – 72,4)	<0,001
VEGF(pg/ml)	35	49,9 ± 44,9 (0 – 176,3)	43	52,9 ± 43,4 (5 – 219)	NS
s VEGF-R2(pg/ml)	35	8725 ± 1281 (6957 – 12234)	43	7407 ± 2188 (1103 – 11947)	0,004
HGF (pg/ml)	35	648 ± 130 (426 – 916)	47	2277 ± 3210 (580 – 17327)	<0,001
b-FGF(pg/ml)	35	2,55 ± 5,39 (0 – 24,22)	47	8,21 ± 10,69 (0 – 53,5)	<0,001
TGF-β <sub>1</sub> (ng/ml)	35	13,72 ± 8,17 (3,7 – 51,27)	46	11,26 ± 6,20 (2,83 – 26,29)	NS

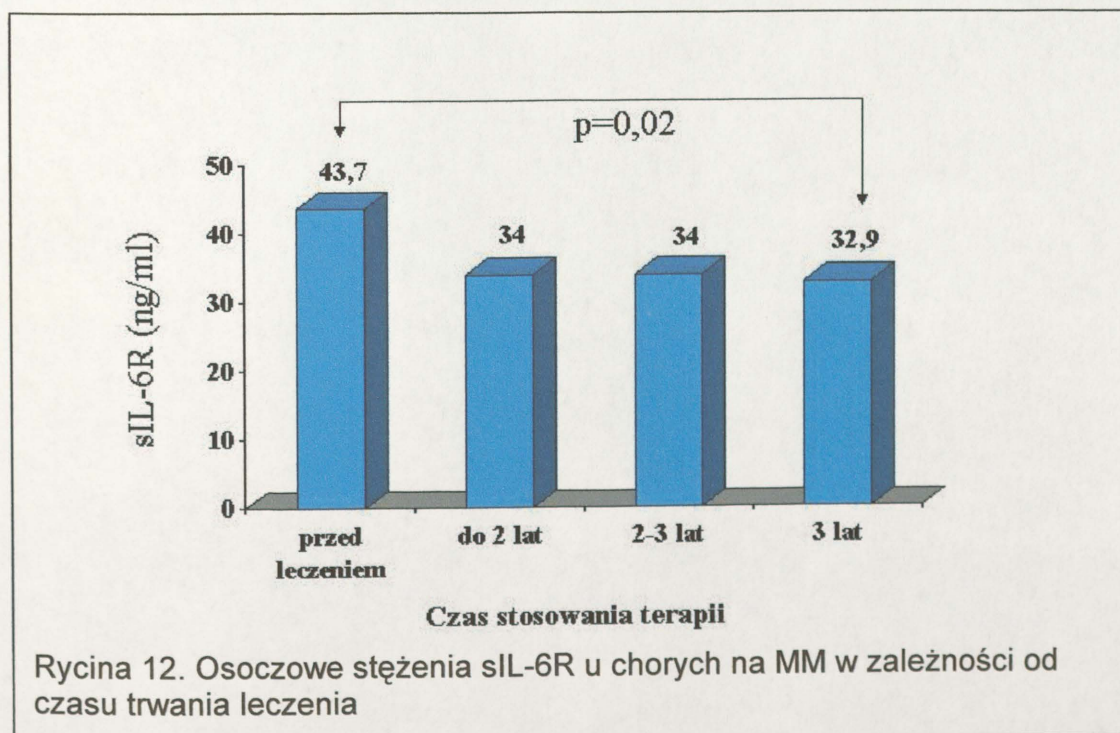
4.4. Stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w osoczu w zależności od czasu leczenia.

W wyniku porównania badanych parametrów w grupach chorych N i S wykazano jedynie znamienne podwyższone średnie osoczowe stężenia TGF-β<sub>1</sub> w grupie N w porównaniu do grupy S (p=0,025). Natomiast osoczowe stężenia pozostałych badanych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów, nie różniły się w badanych grupach N i S (tabela 10).

Tabela 10. Zestawienie osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w grupach N i S

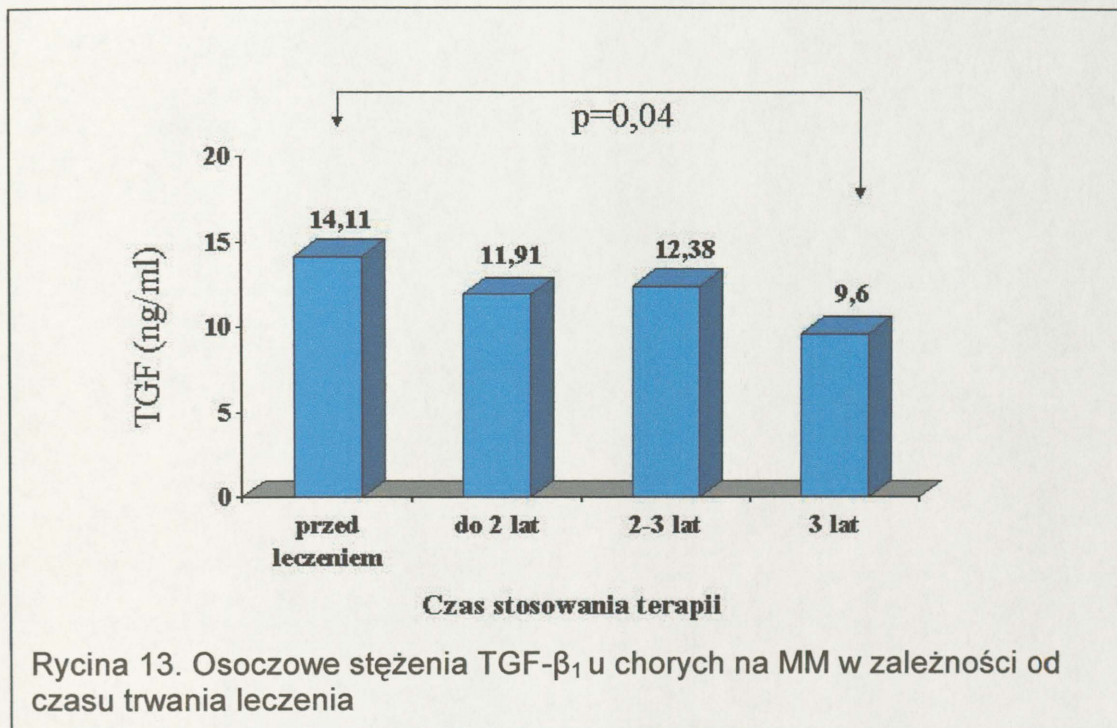
Cytokiny i rozpuszczalne receptory	GRUPA				p
	N		S		
	n	x ± SD (min-max)	n	x ± SD (min-max)	
IL-6(pg/ml)	22	17,2 ± 20,7 (0 – 241,8)	43	11,8 ± 38,5 (0 – 251,13)	NS
sIL-6R(ng/ml)	22	42,9 ± 15,9 (21 – 78,3)	43	34,1 ± 12,4 (15,7 – 72,4)	NS
VEGF(pg/ml)	22	64,5 ± 52,6 (13,6 – 175,5)	43	52,9 ± 43,4 (5 – 219)	NS
s VEGF-R2(pg/ml)	22	7734 ± 2007 (2775 – 12728)	43	7407 ± 2188 (1103 – 11947)	NS
HGF (pg/ml)	29	2007 ± 1660 (475 – 7317)	47	2277 ± 3210 (580 – 17327)	NS
b-FGF(pg/ml)	29	7,44 ± 11,11 (0 – 49,6)	47	8,21 ± 10,69 (0 – 53,5)	NS
TGF-beta1(ng/ml)	29	14,24 ± 7,00 (6,53 – 33,25)	46	11,26 ± 6,20 (2,83 – 26,29)	0,025

Porównanie stężenia sIL-6R w zależności od czasu trwania terapii wykazuje znamienne niższe stężenia w grupie chorych leczonych ponad trzy lata w porównaniu do grupy pacjentów z *de novo* rozpoznanym MM (rycina 12).





Podobnie u chorych leczonych ponad trzy lata, osoczowe stężenie TGF- $\beta_1$  było niższe, niż u pacjentów w chwili rozpoznania choroby. ( $p=0,04$ ) (rycina 13).



Analiza porównawcza osoczowych stężeń cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w grupie pacjentów z MM wskazała, iż różniły się one w zależności od czasu prowadzenia terapii. Wykazano także różnice badanych parametrów w porównaniu z grupą kontrolną. Osoczowe stężenia HGF, IL-6, sIL-6R i b-FGF w grupie N, S1, S2 i S3 były istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (K) ( $p<0,001$ ). Natomiast osoczowe stężenia s VEGF R2 w grupie N, S1, S2 i S3 były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej (K) ( $p<0,001$ ).

Nie stwierdzono różnic pomiędzy osoczowymi stężeniami VEGF i TGF- $\beta_1$  w badanych grupach (tabela 11).

Tabela 11. Zestawienie osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w poszczególnych podgrupach chorych i w grupie kontrolnej

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	GRUPA	n	$x \pm SD$	min-max	p
IL-6(pg/ml)	K	35	$1,05 \pm 1,12$	0 – 3,04	p<0,001
	N	21	$18,03 \pm 51,83$	0 – 241,8	
	S1	12	$7,21 \pm 7,58$	0 – 25,69	
	S2	9	$6,34 \pm 7,96$	0 – 20,81	
	S3	16	$19,80 \pm 62,30$	0 – 251,13	
sIL-6R(ng/ml)	K	35	$25,3 \pm 6,43$	14,6 – 38,4	p<0,001
	N	21	$43,79 \pm 15,72$	21 – 78,3	
	S1	12	$34,02 \pm 12,77$	21,5 – 72,4	
	S2	9	$34,02 \pm 13,72$	16,6 – 57,1	
	S3	16	$32,92 \pm 11,29$	15,8 – 59,3	
VEGF(pg/ml)	K	35	$49,9 \pm 44,9$	0 – 176,3	NS
	N	21	$64,87 \pm 53,90$	13,56 – 175,5	
	S1	12	$71,69 \pm 64,67$	23,9 – 219	
	S2	9	$39,27 \pm 29,72$	13 – 101,2	
	S3	16	$40,68 \pm 23,76$	13,4 – 97	
s VEGF-R2(pg/ml)	K	35	$8725 \pm 1281$	6957 – 12234	p=0,03
	N	21	$7652 \pm 2019$	3775 – 12728	
	S1	12	$7874 \pm 2545$	4296 – 11693	
	S2	9	$6985 \pm 1706$	4224 – 9140	
	S3	16	$7278 \pm 2143$	1103 – 10642	
HGF (pg/ml)	K	35	$648 \pm 130$	426 – 916	p<0,001
	N	28	$2001 \pm 1690$	475 – 7317	
	S1	13	$2570 \pm 3489$	643 – 13515	
	S2	11	$2186 \pm 2306$	831 – 8413	
	S3	16	$2073 \pm 4089$	604 – 17327	
b-FGF (pg/ml)	K	35	$2,55 \pm 5,39$	0 – 24,22	p<0,001
	N	28	$7,71 \pm 11,22$	0 – 49,6	
	S1	13	$10,54 \pm 15,83$	0 – 53,5	
	S2	11	$7,10 \pm 5,97$	0 – 20,6	
	S3	16	$5,68 \pm 6,07$	0 – 23,13	
TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	K	35	$13,72 \pm 8,17$	3,7 – 51,27	NS
	N	28	$14,11 \pm 7,09$	6,53 – 33,25	
	S1	13	$11,91 \pm 6,06$	3,33 – 25,1	
	S2	11	$12,39 \pm 7,95$	4,26 – 26,29	
	S3	16	$9,60 \pm 4,38$	4,07 – 16,74	

W tabeli 12 przedstawiono współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny

oraz wapnia w surowicy krwi, a stężeniami badanych cytokin oraz rozpuszczalnych receptorów cytokin w osoczu krwi, w grupie N.

Tabela 12. Zestawienie współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny oraz wapnia w surowicy krwi, a osoczwymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie N

		IL-6	sIL-6R	VEGF	sVEGF-R2	HGF	b-FGF	TGF- $\beta_1$
Hb	r	-0,501	-0,600	-0,200	-0,238	-0,345	0,052	0,284
	p	0,02	0,001	0,38	0,30	0,08	0,80	0,15
PLT	r	-0,263	-0,508	0,274	0,175	-0,449	-0,059	0,205
	p	0,25	0,02	0,23	0,45	0,02	0,77	0,31
Mocznik	r	0,021	0,561	0,118	0,506	0,043	-0,006	-0,219
	p	0,95	0,05	0,70	0,08	0,87	0,98	0,40
Kreatynina	r	0,125	0,437	0,318	0,490	0,009	-0,114	-0,199
	p	0,68	0,14	0,29	0,09	0,97	0,66	0,44
Wapń	r	0,279	-0,217	0,450	0,279	0,043	-0,221	0,259
	p	0,31	0,44	0,09	0,31	0,87	0,38	0,30
LDH	r	0,176	0,319	-0,059	0,170	0,118	-0,348	-0,536
	p	0,57	0,29	0,85	0,58	0,65	0,17	0,03

r – współczynnik korelacji Pearsona

p – poziom prawdopodobieństwa istotności dla  $p \leq 0,05$

n – liczba oznaczeń dla których obliczono współczynnik korelacji

W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie korelacje.

Analiza wykazała, iż w grupie tej występuje statystycznie znamienne dodatnia współzależność pomiędzy:

- stężeniami mocznika i sIL-6R ( $r=0,506$  ;  $p=0,05$ )

Ponadto analiza wykazała, iż w grupie tej występuje statystycznie znamienne ujemna współzależność pomiędzy:

- wartością Hb i stężeniem IL-6 ( $r=-0,501$  ;  $p=0,02$ )
- wartością Hb i stężeniem sIL-6R ( $r=-0,600$  ;  $p=0,001$ )
- wartością PLT i stężeniem sIL-6R ( $r=-0,508$  ;  $p=0,02$ )
- wartością PLT i stężeniem HGF ( $r=-0,449$  ;  $p=0,02$ )
- aktywnością LDH i stężeniem TGF- $\beta_1$  ( $r=-0,536$  ;  $p=0,03$ )

W tabeli 13 przedstawiono współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny oraz wapnia w surowicy krwi, a stężeniem badanych cytokin oraz rozpuszczalnych receptorów cytokin w osoczu krwi, w grupie S.

Tabela 13. Zestawienie współzależności pomiędzy wartościami hemoglobiny, płytek krwi, aktywnością LDH, stężeniem mocznika, kreatyniny oraz wapnia w surowicy krwi, a osoczowymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie S.

		IL-6	sIL-6R	VEGF	sVEG F-R2	HGF	b-FGF	TGF- $\beta_1$
Hb	r	-0,230	-0,013	0,185	0,266	-0,297	-0,163	0,309
	p	0,17	0,94	0,27	0,11	0,07	0,32	0,06
PLT	r	-0,167	-0,021	0,186	0,302	-0,092	0,065	0,366
	p	0,32	0,90	0,27	0,07	0,58	0,69	0,02
Mocznik	r	0,450	0,214	0,382	0,123	0,171	-0,060	0,277
	p	0,03	0,33	0,07	0,58	0,41	0,78	0,18
Kreatynina	r	0,432	0,028	0,099	0,210	0,087	0,000	0,090
	p	0,04	0,90	0,65	0,34	0,68	1,00	0,67
Wapń	r	0,071	0,043	0,164	-0,000	0,056	-0,303	-0,264
	p	0,75	0,85	0,46	1,00	0,79	0,14	0,20
LDH	r	-0,207	0,172	0,292	-0,073	-0,278	-0,503	-0,278
	p	0,41	0,49	0,24	0,77	0,24	0,02	0,24

r – współczynnik korelacji Pearsona

p – poziom prawdopodobieństwa istotność dla  $p \leq 0,05$

n – liczna oznaczeń dla których obliczono współczynnik korelacji

W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie korelacje.

Analiza wykazała, iż w grupie tej występuje statystycznie znamienne dodatnia współzależność pomiędzy:

- stężeniami mocznika i IL-6 ( $r=0,450$  ;  $p=0,03$ )
- wartością PLT i stężeniem TGF- $\beta_1$  ( $r=0,366$  ;  $p=0,02$ )
- stężeniami kreatyniny i IL-6 ( $r=0,432$  ;  $p=0,04$ )

Ponadto analiza wykazała, iż w grupie tej występuje statystycznie znamienne ujemna współzależność pomiędzy:

- aktywnością LDH i stężeniem TGF- $\beta_1$  ( $r=-0,503$  ;  $p=0,02$ )

W tabeli 14 przedstawiono zestawienie współzależności pomiędzy stężeniami poszczególnych frakcji elektroforetycznych białek surowicy krwi oraz stężeniem CRP i  $\beta_2$ mikroglobuliny, a stężeniami badanych cytokin oraz rozpuszczalnych receptorów cytokin w grupach N i S łącznie.

Tabela 14. Zestawienie współzależności pomiędzy stężeniami poszczególnych frakcji elektroforetycznych białek surowicy krwi oraz stężeniem CRP i  $\beta_2$ mikroglobuliny, a osoczwymi stężeniami badanych cytokin oraz ich rozpuszczalnymi receptorami w grupie N i S łącznie.

		IL-6	sIL-6R	VEGF	sVEGF-R2	HGF	b-FGF	TGF- $\beta_1$
Albumina (g/l)	r	-0,018	0,162	0,174	0,257	-0,171	-0,437	-0,158
	p	0,89	0,22	0,19	0,05	0,16	0,001	0,20
Alfa 1 globulina (g/l)	r	0,581	0,055	0,051	0,106	0,456	-0,133	0,036
	p	0,001	0,68	0,71	0,43	0,001	0,28	0,77
Alfa 2 globulina (g/l)	r	0,464	0,071	0,147	0,206	0,161	-0,202	-0,137
	p	0,001	0,60	0,27	0,12	0,19	0,10	0,27
Beta globulina (g/l)	r	-0,008	0,015	0,074	-0,095	0,402	0,584	0,103
	p	0,95	0,91	0,58	0,48	0,001	0,001	0,41
Gamma globulina (g/l)	r	-0,181	0,059	-0,114	-0,147	-0,242	-0,023	0,088
	p	0,17	0,66	0,40	0,27	0,05	0,85	0,48
Białko całkowite (g/l)	r	-0,255	0,071	-0,051	-0,198	-0,114	0,231	0,127
	p	0,05	0,59	0,70	0,13	0,35	0,06	0,31
CRP (mg/l)	r	0,619	0,739	0,195	0,201	0,361	-0,217	0,281
	p	0,03	0,01	0,54	0,53	0,15	0,40	0,27
$\beta_2$ mikroglobulina (mg/dl)	r	0,307	0,391	0,356	-0,217	-0,124	-0,293	0,008
	p	0,29	0,17	0,21	0,46	0,63	0,24	0,98

r – współczynnik korelacji Pearsona

p – poziom prawdopodobieństwa istotność dla  $p \leq 0,05$

n – liczba oznaczeń dla których obliczono współczynnik korelacji

W kolorze czerwonym zaznaczono istotne statystycznie korelacje.

Analiza wykazała, iż występuje statystycznie znamienne dodatnia współzależność pomiędzy:

- stężeniami albuminy i sVEGF R2 ( $r=0,257$  ;  $p=0,05$ )
- stężeniami alfa1 globuliny i HGF ( $r=0,456$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami alfa1 globuliny i IL-6 ( $r=0,581$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami alfa2 globuliny i IL-6 ( $r=0,464$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami beta globuliny i HGF ( $r=0,402$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami beta globuliny i b-FGF ( $r=0,584$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami CRP i IL-6 ( $r=0,619$  ;  $p=0,03$ )
- stężeniami CRP i sIL-6R ( $r=0,739$  ;  $p=0,01$ )

Ponadto wykazano statystycznie znamienne ujemną współzależność pomiędzy:

- stężeniami albuminy i b-FGF ( $r= -0,437$  ;  $p=0,001$ )
- stężeniami gamma globuliny i HGF ( $r= -0,242$  ;  $p=0,05$ )
- stężeniami białka całkowitego i IL-6 ( $r= -0,255$  ;  $p=0,05$ )

4.5. Ocena stężeń cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin w zależności od progresji choroby.

W grupie S (47 pacjentów), u których leczenie trwało ponad rok oceniano odpowiedź na zastosowaną terapię antyproliferacyjną. Sprawdzano czy wystąpiła progresja, oporność na leczenie, czy też osiągnięto remisję bądź częściową remisję choroby. Analizę oparto o ocenę szpiku kostnego (odsetek patologicznych plazmacytów w biopsji aspiracyjnej), parametrów białkowych (immunoelktroforeza białek surowicy krwi) oraz biochemicznych (stężenie CRP,  $\beta_2$  mikroglobuliny, wapń). Analizie statystycznej poddano 41 chorych z grupy S. U 23 chorych (56,1%) zaobserwowano brak progresji choroby (pozytywną odpowiedź na leczenie), zaś u 18 chorych (43,9%) progresję MM.

W podgrupie odpowiadającej na zastosowane leczenie (SBP - bez progresji choroby) średnie osoczowe stężenie HGF wynosiło  $1283 \pm 1583$  pg/ml, zaś w podgrupie z progresją (SZP - wykazującej oporność na leczenie) średnie osoczowe stężenie było 2,5 x wyższe i wynosiło  $3555 \pm 4498$  pg/ml ( $p < 0,001$ ). Ponadto stwierdzono, iż średnie osoczowe stężenie IL-6 w podgrupie SZP było wyższe ( $19,59 \pm 58,15$  pg/ml), niż w podgrupie SBP ( $4,14 \pm 5,75$  pg/ml), jednak różnica nie była istotna statystycznie. Zbadano również, iż średnie osoczowe stężenie b-FGF w podgrupie SZP było wyższe ( $9,71 \pm 12,51$  pg/ml), niż w podgrupie SBP ( $6,46 \pm 9,17$  pg/ml), jednak również i tutaj różnica nie była istotna statystycznie. Średnie osoczowe stężenia pozostałych cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w badanych grupach nie wykazywały różnicy (tabela 15).

Tabela 15. Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów, a występowanie progresji choroby.

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	Podgrupy chorych				p
	bez progresji MM (SBP)		z progresją MM (SZP)		
	n	x ± SD (min-max)	n	x ± SD (min-max)	
IL-6(pg/ml)	20	4,14 ± 5,75 (0 – 20,81)	18	19,59 ± 58,15 (0 – 251,13)	NS
sIL-6R(ng/ml)	20	31,2 ± 9,1 (15,7 – 57,2)	18	38,4 ± 15,4 (16,6 – 72,4)	NS
VEGF(pg/ml)	20	47,4 ± 33,9 (13,4 – 154,5)	18	55,2 ± 54,0 (5 – 219)	NS
sVEGF-R2(pg/ml)	20	7591 ± 1612 (4224 – 9470)	18	7066 ± 2682 (1103 – 11947)	NS
HGF (pg/ml)	23	1283 ± 1583 (580 – 8413)	18	3555 ± 4498 (954 – 17327)	<0,001
b-FGF(pg/ml)	23	6,46 ± 9,17 (0 – 33,1)	18	9,71 ± 12,51 (1 – 53,5)	NS
TGF-beta1(ng/ml)	22	10,84 ± 6,28 (2,83 – 25,10)	18	12,33 ± 6,33 (4,07 – 26,29)	NS

#### 4.6. Analiza krzywych ROC dla wybranych parametrów jako czynników prognostycznych szpiczaka mnogiego

Ocena osoczowego stężenia HGF pozwoliła na stwierdzenie braku odpowiedzi na zastosowane leczenie z 94,4 % czułością i 73,9 % swoistością przy wartościach powyżej 1048 pg/ml.

Powierzchnia pod krzywą ROC wykreśloną dla pozostałych cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin wahała się od 0,50 do 0,64. Taki wynik wskazywał na brak zdolności dyskryminacyjnej tych parametrów do oceny progresji choroby, co przedstawiono na rycinie 14.

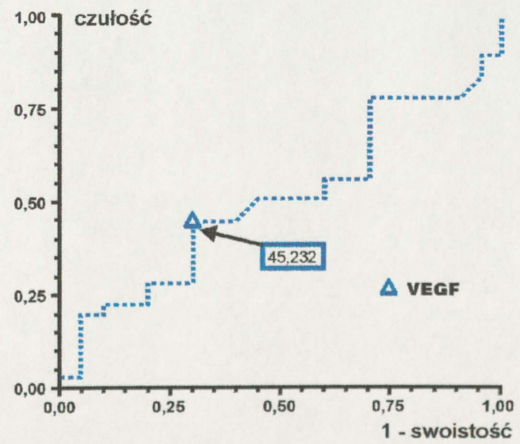
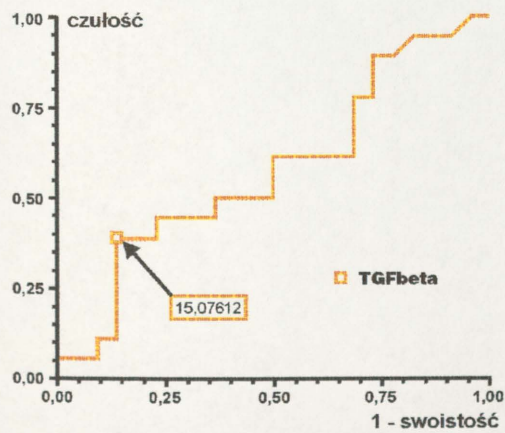
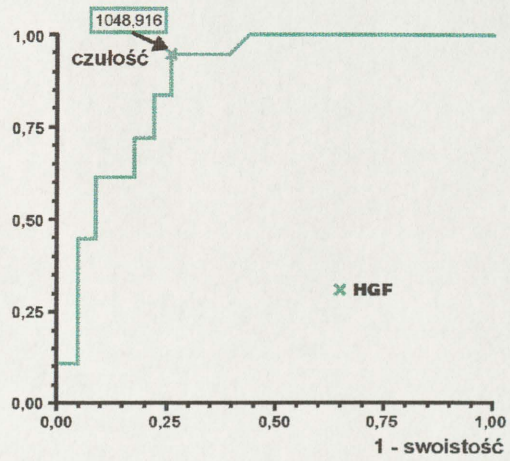
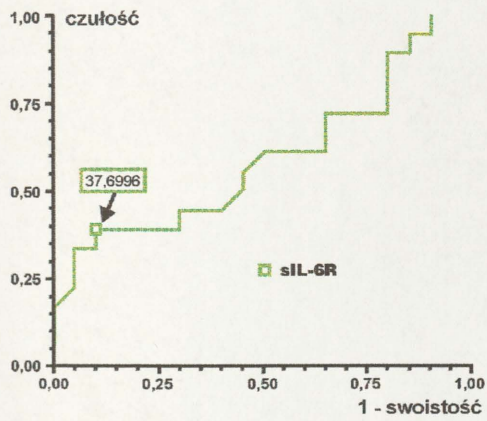
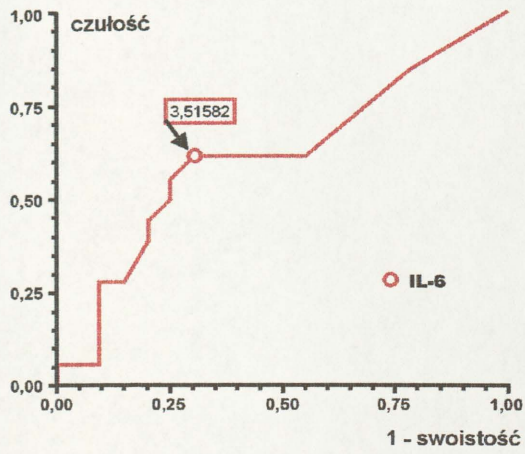
W tabelach od 16 do 23 przedstawiono analizę krzywych ROC dla poszczególnych cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin celem określenia czynnika dyskryminującego progresję choroby.

Tabela 16. Osoczowe stężenia cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów - analiza krzywych ROC

Cytokiny i rozpuszczalne receptory	wartość krytyczna	czułość		swoistość	
		wartość (%)	95% przedział ufności	wartość (%)	95% przedział ufności
IL-6 (pg/ml)	3,51	61,1	35,7 – 82,7	70,0	45,7 – 88,1
sIL-6R (ng/ml)	37,69	38,9	21,5 – 69,2	90,0	68,3 – 98,7
VEGF (pg/ml)	45,2	44,4	21,5 – 69,2	70,0	45,7 – 88,1
sVEGF-R2 (pg/ml)	7305	66,6	40,9 – 86,6	55,0	31,5 – 76,9
HGF (pg/ml)	1048	94,4	72,7 – 99,8	73,9	51,6 – 89,8
b-FGF (pg/ml)	1,49	94,4	72,7 – 99,8	43,5	23,2 – 65,5
TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	15,07	38,9	17,2 – 64,2	86,3	65,1 – 97,1



Rycina 14. Analiza krzywych ROC dla badanych cytokin prozapalnych i proangiogennych oraz ich rozpuszczalnych receptorów celem oceny progresji szpiczaka mnogiego



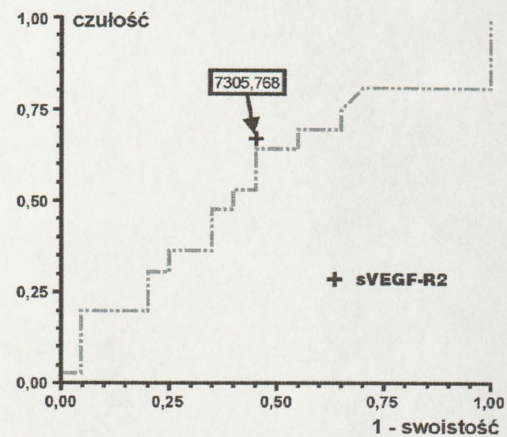
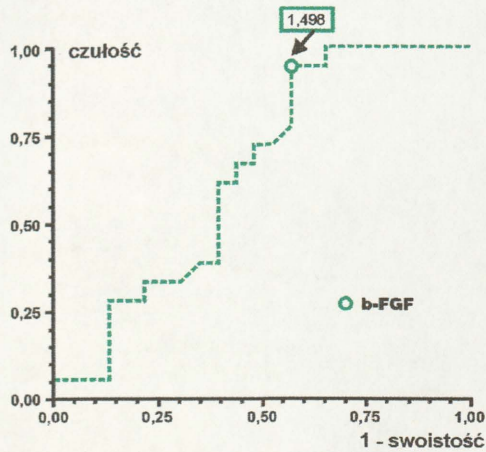


Tabela 17. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia IL-6 od odpowiedzi na leczenie

	n	IL-6 (pg/ml)		p
		<3,51	≥3,51	
brak odpowiedzi	18	7	11	NS
odpowiedź pozytywna	20	14	6	

Tabela 18. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia sIL-6R od odpowiedzi na leczenie

	n	sIL-6R (pg/ml)		p
		<37,69	≥37,69	
brak odpowiedzi	18	11	7	NS
odpowiedź pozytywna	20	18	2	

Tabela 19. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia VEGF od odpowiedzi na leczenie

	n	VEGF (pg/ml)		p
		<45,23	≥45,23	
brak odpowiedzi	18	10	8	NS
odpowiedź pozytywna	20	14	6	

Tabela 20. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia sVEGFR-2 od odpowiedzi na leczenie

	n	sVEGFR-2 (pg/ml)		p
		<7306	≥7306	
brak odpowiedzi	18	6	12	NS
odpowiedź pozytywna	20	11	9	

Tabela 21. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia HGF od odpowiedzi na leczenie

	n	HGF (pg/ml)		p
		<1048	≥1048	
brak odpowiedzi	18	1	17	<0,001
odpowiedź pozytywna	23	17	6	

Tabela 22. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia b-FGF od odpowiedzi na leczenie

	n	b-FGF (pg/ml)		p
		<1,49	≥1,49	
brak odpowiedzi	18	1	17	0,018
odpowiedź pozytywna	23	10	13	

Tabela 23. Ocena metodą krzywej ROC zdolności diagnostycznej osoczowego stężenia TGF-β<sub>1</sub> od odpowiedzi na leczenie

	n	TGF-β <sub>1</sub> (pg/ml)		p
		<15,07	≥15,07	
brak odpowiedzi	18	11	7	NS
odpowiedź pozytywna	23	19	3	

## 5. Dyskusja

Badania ostatnich lat potwierdziły istotne znaczenie cytokin oraz ich rozpuszczalnych receptorów w biologii szpiczaka mnogiego. Dowiedziono, iż te drobnocząsteczkowe glikoproteiny kontrolują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek szpiczakowych. Nieprawidłowe, często zwiększone wydzielanie cytokin przez podścielisko szpiku kostnego odgrywa ważną rolę w patogenezie niektórych objawów klinicznych, np. zmian kostnych.

Wyniki przeprowadzonych badań własnych zaowocowały interesującymi obserwacjami, które wydają się być istotne w patofizjologii i patogenezie szpiczaka mnogiego. W wielu analizach dowiedziono, iż osoczowe stężenia IL-6 oraz sIL-6R pozostają podwyższone u chorych na MM i korelują z zaawansowaniem procesu nowotworowego [5, 90].

W badaniach własnych wśród analizowanych pacjentów (grupa N i S) średnie osoczowe stężenia IL-6 wynosiły  $13,65 \pm 42,61$  pg/ml, zaś w grupie kontrolnej  $1,04 \pm 1,12$  pg/ml ( $p=0,006$ ). Natomiast średnie osoczowe stężenia sIL-6R u chorych wynosiły  $37,1 \pm 14,2$  ng/ml i odpowiednio w grupie kontrolnej  $25,3 \pm 6,4$  ng/ml ( $p=0,003$ ). Również w grupie pacjentów, u których obserwowano progresję procesu nowotworowego i oporność na leczenie, średnie osoczowe stężenia IL-6 były wyższe w porównaniu do grupy chorych bez progresji MM ( $19,59 \pm 58,15$  pg/ml vs  $4,14 \pm 5,77$  pg/ml) - jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Natomiast wartości średnich osoczowych stężeń sIL-6R były wyższe i wynosiły w grupie z progresją MM:  $38,4 \pm 15,4$  mg/ml, zaś w grupie bez progresji choroby odpowiednio:  $31,2 \pm 9,1$  mg/ml - różnice też nie były istotne statystycznie. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone badaniami m.in. Reibneggera i wsp. [90] oraz Bataille i wsp. [5]. Uzyskali oni zbliżone wyniki, ponadto wykazali zależności pomiędzy stężeniem IL-6, a klinicznym stopniem zaawansowania choroby. U chorych z III stadium zaawansowania, wg. klasyfikacji Durie i Salmona, stężenie IL-6 było znamienne wyższe w porównaniu do pacjentów z I i II stadium choroby. Ponadto zauważono, iż ocena podwyższonego stężenia IL-6 w surowicy była dobrym czynnikiem rokowniczym choroby. Kyrstsonis i wsp. [61] oceniali stężenie IL-6 w surowicy chorych na szpiczaka mnogiego leczonych chemioterapią. Stężenie IL-6 w surowicy znacznie podwyższone przed

rozpoczęciem leczenia, zmniejszyła się do wartości nieoznaczalnych w czasie remisji hematologicznej. Ponowny, stopniowy wzrost stężenia IL-6 obserwowano w okresie nawrotu choroby [61].

Interleukina-6 jest głównym czynnikiem wzrostowym patologicznych plazmacytów i odgrywa kluczową rolę w patofizjologii choroby [2, 54, 131]. Poszukując źródła jej pochodzenia Kawano i wsp. [55] udowodnili, iż nowotworowe plazmocyty mogą wydzielać IL-6 samodzielnie na drodze autokrynnej. Nieco później Klein i wsp. [54], Uchiyama i wsp. [112] oraz Lokhorst i wsp. [64] stwierdzili, iż komórki szpiczakowe mogą indukować sekrecję IL-6 w podścielisku szpiku kostnego poprzez bezpośredni kontakt lub wydzielanie VEGF. Z kolei Rawstron i wsp. [85] badając ekspresję antygenu CD126 (podjednostka  $\alpha$  receptora dla IL-6) zauważyli jego obecność jedynie na komórkach szpiczakowych, nie znajdując go na powierzchni prawidłowych plazmacytów. IL-6 doprowadza do rozrostu nowotworu nie tylko poprzez bezpośrednie pobudzanie proliferacji, ale i hamowanie apoptozy nowotworowych plazmacytów [15, 38, 63]. Ponadto stwierdzono, iż przeciwciała monoklonalne anti-IL-6 hamowały wzrost komórek szpiczakowych *in vitro* i *in vivo*, zaś próby leczenia pacjentów przy ich udziale, choć na razie znacznie ograniczone, przynoszą obiecujące rezultaty [54, 109, 131].

Produkcja IL-6 przez komórki podścieliska szpiku kostnego jest stymulowana m. in. przez TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ <sub>1</sub> oraz IL-4 [110]. Cytokiny: IL-6 i IL-1 $\beta$  posiadają właściwości wzajemnej regulacji swych stężeń. Istotną rolę w pobudzeniu sekrecji IL-6 pełni również naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, natomiast IL-6 posiada właściwości stymulujące produkcję VEGF [20]. VEGF oraz inne cytokiny proangiogenne odgrywają zasadniczą rolę w neowaskularyzacji szpiku kostnego u chorych na MM. Nowotworowa angiogeneza to temat, którym zajmowali się m.in. Vacca i wsp. [121, 122], którzy porównywali powierzchnię zajmowaną przez drobne naczynia krwionośne znajdujące się na przekrojach preparatów szpiku kostnego chorych na szpiczaka mnogiego i osób zdrowych. Powierzchnia obejmująca przekroje z drobnymi naczyniami krwionośnymi była znamienne większa w grupie chorych z aktywną postacią MM w porównaniu do pacjentów z nieaktywną postacią choroby, MGUS i osobami zdrowymi. Ponadto oceniano zdolności patologicznych plazmacytów do stymulacji angiogenezy *in vitro*.

Najbardziej aktywne były w tym względzie plazmocyty chorych z zaawansowaną postacią szpiczaka mnogiego. Co więcej, stwierdzono silną korelację aktywności angiogennej plazmocytów szpikowych z gęstością naczyń krwionośnych w macierzystym szpiku kostnym, z którego zostały pobrane.

Nieco innej metody pomiaru gęstości drobnych naczyń krwionośnych, opartej na liczeniu komórek znaczonej specyficznymi przeciwciałami przeciwko antygenom śródbłonna (m. in. CD34, CD31, czynniki von Willebranda, trombomodulinie) używali w swych badaniach: Rajkumar i wsp. [92], Sjak-Shie i wsp. [106], Sezer i wsp. [104, 105] i Cheng i wsp. [17]. Obserwacje ich były zgodne, zaś obliczany wskaźnik gęstości drobnych naczyń krwionośnych (*microvessel density* - *MVD*) był istotnie podwyższony w szpiku kostnym chorych na MM w porównaniu do osób zdrowych i korelował z klinicznym przebiegiem nowotworu.

Badania dotyczące wpływu stosowanego leczenia na stopień angiogenezy w szpiczaku mnogim nie są jednoznaczne. Rajkumar i wsp. [92] porównywali wskaźnik *MVD* u 13 chorych przed i po leczeniu wysoko-dawkowaną chemioterapią z przeszczepieniem komórek macierzystych. Nie stwierdzono istotnego statystycznie zmniejszenia *MVD* u chorych, którzy osiągnęli częściową lub całkowitą remisję po leczeniu. Na tej podstawie stwierdzono, iż zwiększone unaczynienie szpiku kostnego nie ulega regresji u chorych utrzymując się nawet w okresie całkowitej remisji hematologicznej. Odmienne spostrzeżenia poczynili Sezer i wsp. [105] oraz Sjak-Shie i wsp. [106], donosząc o zmniejszaniu się wskaźnika *MVD* w szpiku kostnym w okresie prowadzonej chemioterapii oraz po jej zakończeniu. W badaniu Sezera i wsp. [105] wskaźnik *MVD* malał w grupie chorych reagujących na leczenie, nie ulegając zmianie u pozostałych pacjentów. Wartość wskaźnika gęstości drobnych naczyń krwionośnych u osób w III stadium zaawansowania choroby po osiągnięciu remisji były takie same jak u chorych w I stadium MM. Rozbieżność w wynikach badań poszczególnych autorów wydaje się wskazywać na ograniczoną wartość wskaźnika *MVD* jako markera skuteczności terapii antyangiogennej. Problem ten szczegółowo omawiał w swoich badaniach Folkman - pionier w dziedzinie nowotworowej angiogenezy, zajmujący się tym zagadnieniem już w latach siedemdziesiątych na przykładzie pacjentów z guzami litymi [32, 33]. Twierdził on, iż zmiany *MVD* zależą od szybkości

obumierania komórek patologicznych i śródbłónka w czasie leczenia [42]. Przy przewadze obumierania komórek endotelium wskaźnik *MVD* malał, zaś gdy lizie ulegało więcej komórek nowotworowych, wskaźnik gęstości drobnych naczyń krwionośnych ulegał zwiększeniu. W związku z tym podczas skutecznej terapii antyangiogennej wskaźnik *MVD* może ulegać zmniejszeniu, zwiększeniu, lub nie ulegać zmianie. Według danych Folkmana i wsp., zmniejszanie się *MVD* w czasie terapii antyangiogennej sugeruje, iż dany lek jest skuteczny. Brak takiego efektu (zmniejszenia *MVD*) nie znaczy jednak, iż badany lek nie hamuje angiogenezy. Powyższe rozważania jednoznacznie wskazują, iż ocena zmian wskaźnika *MVD* jako jedynego parametru służącego do określenia skuteczności terapii antyangiogennej jest niewystarczająca. Zatem konieczne stało się wyróżnienie innego markera angiogenezy, który korelowałby z efektem klinicznym stosowanego leczenia. Jak udowodnili Bertolini i wsp.[8] takim parametrem wydaje się być ocena stężeń cytokin proangiogennych – VEGF i b-FGF, zaś w badaniach własnych ocena osoczowego stężenia HGF.

W badaniach własnych uzyskane średnie osoczowe stężenie VEGF w grupie chorych na MM wynosiło  $56,8 \pm 46,7$  pg/ml i było podwyższone w porównaniu do grupy kontrolnej, gdzie wartości wynosiły:  $49,9 \pm 49,9$  pg/ml, jednak różnica nie była istotna statystycznie. Natomiast średnie osoczowe stężenie b-FGF u chorych na MM wynosiło  $7,92 \pm 10,78$  pg/ml i było ponad trzykrotnie wyższe w stosunku do grupy kontrolnej, gdzie wartość ta wynosiła odpowiednio:  $2,54 \pm 5,38$  pg/ml ( $p < 0,001$ ). Ponadto wartości średnich stężeń HGF w osoczu w grupie chorych na MM wynosiły  $2174 \pm 2714$  pg/ml i były również ponad trzykrotnie podniesione w stosunku do grupy kontrolnej, gdzie odpowiednio wynosiły  $648 \pm 130$  pg/ml ( $p < 0,001$ ). Zauważono również, iż średnie stężenie b-FGF w osoczu w grupie chorych z progresją MM było wyższe ( $9,71 \pm 12,51$  pg/ml), niż w grupie bez progresji MM ( $6,46 \pm 9,17$  pg/ml), jednak różnica nie była istotna statystycznie. Obserwacje własne pokazują, iż badane markery angiogenezy – wartości wybranych osoczowych stężeń cytokin proangiogennych są podwyższone u chorych na szpiczaka mnogiego.

Rola b-FGF w patogenezie szpiczaka mnogiego nie została do tej pory optymalnie opracowana. Badania dotyczące ekspresji poszczególnych izoform tej cytokiny i jej receptorów w szpiczakowych liniach komórkowych podjęli



Witzig i wsp. [120], którzy przy użyciu metod biologii molekularnej badali występowanie mRNA dla czynników FGF 1-7 oraz 9. W żadnej z ocenianych linii komórkowych nie stwierdzono mRNA czynników FGF 1, 3, 4, 6 i 7, podczas gdy kilka z nich produkowało mRNA dla FGF 2, 5 i 9. Szpiczakowe linie komórkowe produkowały również mRNA receptorów dla FGF: FGFR-1 (ligand dla FGF-2 i FGF-5), FGFR-2 (ligand dla FGF-2 i FGF-5) oraz FGFR-4 (ligand dla FGF-2). Plowright i wsp. [80] badali z kolei efekty obserwowanej u około 25% chorych na szpiczaka mnogiego ektopowej ekspresji FGFR-3. Okazało się, iż komórki o ekspresji FGFR-3 charakteryzują się całkowitą niezależnością od IL-6, zmniejszonym stopniem apoptozy i nasiloną odpowiedzią proliferacyjną po stymulacji IL-6. W obecności FGF-9, liganda FGFR-3, badane komórki szybciej proliferowały i były bardziej żywotne niż komórki z prawidłową ekspresją FGFR-3.

Di Raimondo i wsp. [28], opierając się o stopień zaawansowania nowotworu (choroba ograniczona do szpiku kostnego i z lokalizacją pozaszpikową) podzielili chorych na dwie grupy. W obu grupach pacjentów uzyskano znamienne podwyższone stężenia VEGF i b-FGF w szpiku kostnym w porównaniu do surowicy krwi. O podniesionym stężeniu VEGF i b-FGF w szpiku kostnym i surowicy u chorych na szpiczaka mnogiego donosili również w swoich badaniach Weber i wsp. [116] oraz Zhu i wsp. [132]. Stężenia poszczególnych cytokin były znamienne podwyższone w szpiku kostnym w porównaniu do krwi obwodowej, co wskazuje, iż najprawdopodobniej szpik kostny jest głównym miejscem ich wytwarzania.

W świetle przeprowadzonych badań własnych, biorąc pod uwagę odpowiedź na zastosowane leczenie wydaje się, iż pomiar osoczowego stężenia HGF może być optymalnym markerem prognostycznym różnicującym pacjentów. Prawdopodobnie im wyższe osoczowe stężenie HGF tym gorsze rokowanie i większe zaawansowanie choroby. W grupie odpowiadającej na zastosowane leczenie (bez progresji) wykazano osoczowe stężenia HGF o wartościach  $1283 \pm 1583$  pg/ml, zaś w grupie z progresją choroby (lub oporność na leczenie) uzyskano wartości  $3555 \pm 4498$  pg/ml ( $p < 0,001$ ). Pomiar osoczowego stężenia HGF przy wykorzystaniu krzywych ROC pozwolił na ocenę braku odpowiedzi na zastosowane leczenie z 94,4 % czułością i 73,9 % swoistością, przy osoczowych wartościach stężeń powyżej 1048 pg/ml.



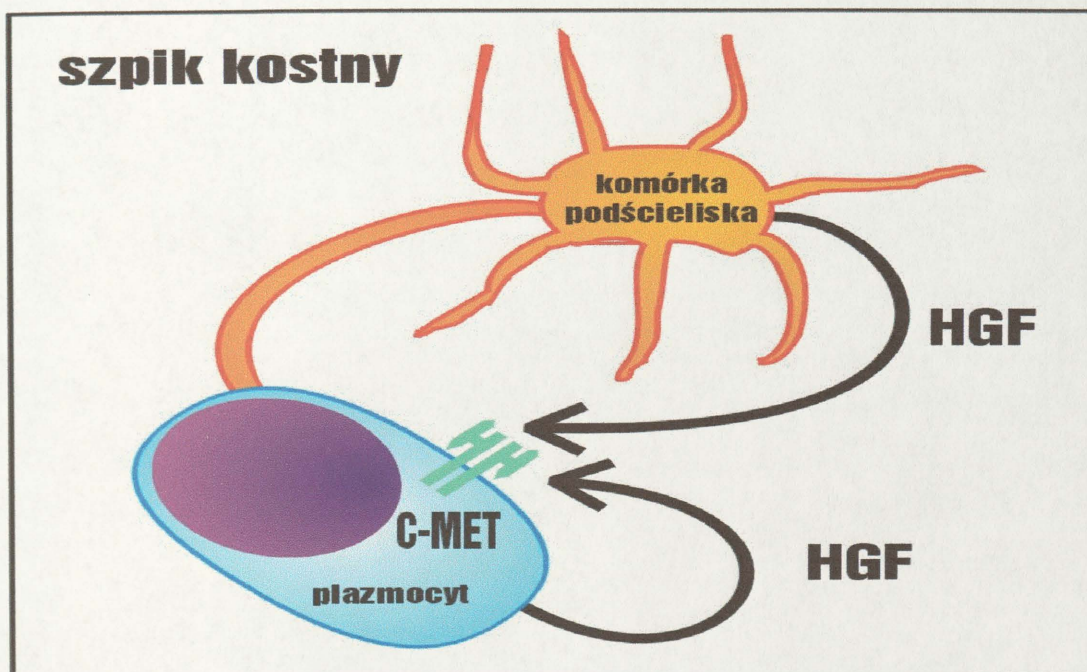
Około 70% osoczowego HGF jest metabolizowane w wątrobie, a jedynie 10% w nerkach [34]. HGF został pierwotnie wyodrębniony i sklonowany jako silny czynnik mitogenny hodowli komórek wątrobowych. Uczestniczy on w wewnątrzwątrobowych procesach regeneracyjnych, odgrywa także rolę w modyfikacji przebiegu licznych schorzeń. Osoczowe stężenie HGF jest znacznie wyższe u chorych na ostre i przewlekłe zapalenie wątroby w porównaniu do osób zdrowych [101, 102]. Spośród wszystkich odmian ostrego zapalenia wątroby, najwyższy poziom HGF występuje w przypadku *hepatitis C*. Ponadto, podwyższony poziom HGF w osoczu przemawia za znacznym zaawansowaniem klinicznym marskości wątroby po *hepatitis C* oraz u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby [128]. Podniesione stężenie HGF stwierdzono także u chorych na raka wątrobowokomórkowego (HCC) i wątrobiaka zarodkowego (*hepatoblastoma*), przy czym stężenie HGF jest wyższe u chorych na HCC z przerzutami, niż w przypadkach ich braku. Pozwala to przypuszczać, iż HGF może stanowić marker biologiczny, przydatny w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu HCC [47]. Wysokie osoczowe stężenie HGF występuje u chorych na bakteryjne zapalenie płuc. U pacjentów, u których zastosowana terapia przyniosła poprawę kliniczną stwierdzano zmniejszenie poziomu HGF, natomiast w przypadkach opornych na leczenie, stężenie HGF utrzymywało się na wysokim poziomie. Świadczyło to o związku pomiędzy wartością stężenia HGF, a rokowaniem w zapaleniu płuc [66, 77].

W chorobie niedokrwiennej serca nie obserwowano podwyższonego osoczowego stężenia HGF, natomiast zawałowi serca towarzyszył znaczny wzrost jego poziomu, który korelował z aktywnością kinazy kreatynowej i CK-MB, przy czym wzrost stężenia HGF następował znacznie wcześniej bo już po 3 godzinach od zamknięcia tętnicy wieńcowej. W związku z tym wydaje się, że osoczowy poziom stężenia HGF może służyć jako wczesny marker zawału serca [129]. Poziom stężenia HGF może również odzwierciedlać ewolucję zmian i rokowanie w zawale serca. U osób z chorobą niedokrwinną serca obok oceny stężenia troponiny, CK-MB i HGF w osoczu, ważną rolę pełnią cytokiny prozapalne tj. IL-6 i TNF- $\alpha$ . Przeprowadzone badania wskazują, iż leczenie statynami, które mają udowodnione właściwości przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe znacząco obniżają markery stanu zapalnego, m. in. stężenie CRP, IL-6 i TNF- $\alpha$  [115]. W schorzeniach przebiegających

z zakrzepicą tętnic obwodowych, poziom HGF jest podwyższony, jeśli występują oboczne połączenia naczyniowe, niż w przypadku ich braku [123]. Ponadto, u chorych po zabiegach wytworzenia połączeń omijających lub angioplastyce, stwierdzono zmniejszenie średniego osoczowego stężenia HGF, w porównaniu do stanu sprzed leczenia. Wydaje się, iż HGF odgrywa znaczącą rolę w procesie angiogenezy i rozwoju krążenia obocznego u pacjentów z zarostową miażdżycą naczyń obwodowych. W związku z tym ocena stężenia HGF może stanowić cenne narzędzie w diagnostyce chorób naczyń obwodowych. Stwierdzono, że w przebiegu miażdżycy zarostowej dochodzi do znacznego zmniejszenia stężenia HGF w zmienionych chorobowo odcinkach naczyń krwionośnych w porównaniu z odcinkami wolnymi od zmian patologicznych [71]. Również osoczowe stężenie HGF u pacjentów z miażdżycą zarostową jest wyraźnie podwyższone, w porównaniu z chorymi na nadciśnienie tętnicze nie powikłane zmianami naczyniowymi [70].

Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy poziomem HGF w tkance płucnej, a rokowaniem i występowaniem nawrotów raka płuca. Siegfried i wsp. na podstawie badania 56 pacjentów z rakiem płuca (z wyjątkiem raka drobnokomórkowego) stwierdzili, iż zawartość HGF w tkance płucnej jest związana z nawrotowym przebiegiem choroby i gorszym rokowaniem, przy czym ryzyko względne rosło wraz ze wzrostem poziomu HGF [107]. Rokowanie u chorych bez przerzutów w węzłach chłonnych, u których stwierdzono zwiększoną ekspresję HGF w tkance nowotworowej było znacznie gorsze, niż w przypadku pacjentów z przerzutami w węzłach, ale z niską ekspresją HGF w tkance guza. Również sugerowano, że zwiększone stężenie HGF u chorych na raka płuca (z wyjątkiem raka drobnokomórkowego), może zwiastować bardziej agresywny charakter schorzenia. Wydaje się zatem, iż poziom HGF może stanowić cenny wskaźnik rokowniczy w przypadku wczesnych stadiów klinicznych raka płuca [107]. Na podstawie powyższych danych wykazano, iż zwiększone osoczowe stężenie HGF wyraźnie koreluje ze stopniem zaawansowania i rokowaniem w różnych chorobach, w tym również w hematologicznych schorzeniach rozrostowych. Najprawdopodobniej osoczowe stężenie HGF może być pomocne w określeniu aktywności klinicznej i rokowaniu u chorych na MM, co potwierdzono w badaniach własnych. Borset i wsp. [12] badając autokrynną stymulację w MM opisali, iż HGF, który

jest wydzielany przez patologiczne plazmocyty stymuluje receptor c-MET obecny na komórkach szpiczakowych. Obok stymulacji autokrynnej, Derksen i wsp. [22] podali, iż HGF produkowany jest również w sposób parakrynnny przez komórki podścieliska szpiku kostnego (rycina 15).



Rycina 15. Schemat autokrynnego i parakrynnego wytwarzania HGF przez komórki podścieliska szpiku kostnego oraz patologiczne plazmocyty [22]

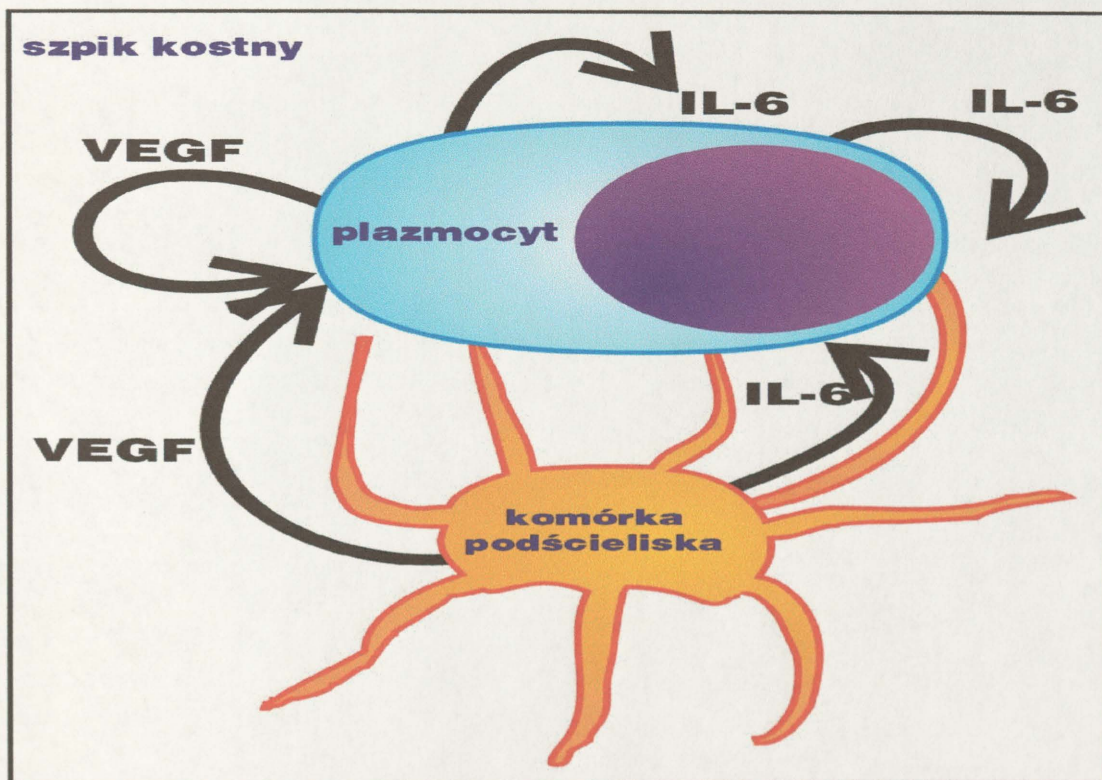
Nowotworowe plazmocyty obecne w szpiku kostnym wraz z „siecią cytokin”, oraz komórkami podścieliska szpiku kostnego są wspólnie odpowiedzialne za zmiany destrukcyjne i osteolityczne kości [97]. TGF- $\beta_1$  jest cytokiną związaną ze zwiększeniem bądź zmniejszeniem osteolizy kostnej [68]. Jednak w badaniach własnych średnie wartości osoczowych stężeń TGF- $\beta_1$  u chorych na MM i w grupie kontrolnej były zbliżone do siebie, nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Natomiast wykazano obniżanie się wartości osoczowych stężeń TGF- $\beta_1$  w zależności od czasu prowadzonej terapii antyproliferacyjnej.

Wielu badaczy potwierdziło fakt wydzielania przez patologiczne plazmocyty czynników stymulujących angiogenezę [21]. Bellamy i wsp. [6] oceniali ekspresję VEGF i jego receptorów w komórkach nowotworów hematologicznych. Niemalże wszystkie przebadane linie komórkowe produkowały i wydzielały VEGF (VEGF-A i VEGF-C), niektóre z nich syntetyzowały również receptory Flt-1 (VEGFR-1) i KDR (VEGFR-2), przy czym

ekspresja Flt-1 była znacznie częstsza. W badaniach własnych zaobserwowano, iż średnie osoczowe stężenia sVEGF R2 były znamienne obniżone ( $p < 0,001$ ) u chorych na MM ( $7518 \pm 2119$  pg/ml) w porównaniu do grupy kontrolnej ( $8725 \pm 1281$  pg/ml). Wydaje się, iż w podścielisku szpiku kostnego u chorych tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest najprawdopodobniej zwiększone w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych ochotników. Natomiast sVEGF-R2 głównie związany jest z komórkami śródbłonna naczyniowego u osób zdrowych, co wydaje się zostało potwierdzone obserwacjami uzyskanymi w badaniach własnych. Interesujące wyniki przyniosła analiza ekspresji VEGF i jego receptorów w szpiku kostnym chorych na szpiczaka mnogiego. Ekspresję VEGF stwierdzono na plazmocytach 78% badanych, co potwierdzono metodą hybrydyzacji *in situ*. Ekspresji receptorów Flt-1 i KDR nie obserwowano w nowotworowych plazmocytach, ale ich ekspresja była znacznie nasiloną w komórkach podścieliska szpiku kostnego [81, 37].

VEGF jest cytokiną bardzo ściśle związaną z patogenezą szpiczaka mnogiego. Jego funkcja nie ogranicza się jedynie do działania proangiogenego. Badania Podara i wsp. [81] wykazały jednoznacznie, iż VEGF działa również bezpośrednio na komórki nowotworowe pobudzając ich proliferację i migrację. Oceniając migrację plazmocytów stymulowanych VEGF stwierdzono dwukrotne zwiększenie zdolności migracji komórek chorych na szpiczaka mnogiego i ponad stukrotne jej zwiększenie w komórkach chorych na białaczkę plazmocytową. Wyniki Podara i wsp. [81] sugerują udział VEGF w progresji choroby ze stadium aktywnego szpiczaka do białaczki plazmocytovej. W trakcie powyższych badań potwierdzono również, iż komórki szpiczakowe nie tylko produkują i wydzielają VEGF, ale również posiadają na swojej powierzchni receptory dla tego czynnika. Przy wykorzystaniu technik biologii molekularnej wykryto mRNA i cząsteczkę białkową receptora Flt-1 (VEGFR-1) w komórkach szpiczakowych oraz udowodniono, że jest ona funkcjonalnie aktywna. Dzięki temu dochodzić może do efektu autokrynnego - samostymulacji nowotworowych plazmocytów za pośrednictwem VEGF/VEGFR-1. Podobny efekt zaobserwowali Masood i wsp. [67] w swych badaniach analizując komórki różnych nowotworów.

Badania Dankbara i wsp. [20] oraz Gupty i wsp. [37] związane z rolą VEGF w szpiczaku mnogim dostarczyły danych, iż jest on wydzielany przez patologiczne plazmocyty i powoduje wzrost wytwarzania IL-6 przez komórki podścieliska szpiku. Natomiast IL-6 zwiększa produkcję i wydzielanie VEGF przez komórki szpiczakowe, co zamyka pętlę sprzężenia zwrotnego tego układu. Wiadomo również, iż samo przyleganie nowotworowych plazmocytołów do komórek podścieliska szpiku kostnego powoduje zwiększenie wydzielania IL-6 i VEGF przez te ostatnie {Gupta i wsp. [37], Uchiyama i wsp. [112], Lockhorst i wsp. [64], Chauhan i wsp. [19]}. VEGF ma działanie nie tylko w mechanizmie autokrynnym, ale również i parakrynnym. Interakcje komórki szpiczakowej i podścieliska szpiku przedstawiono schematycznie na rycinie 16.



Rycina 16. Schemat wzajemnych interakcji pomiędzy patologicznym plazmocytem a komórką podścieliska szpiku kostnego

Ciekawe obserwacje poczynili Singhal i wsp. [103] oceniając unaczynienie szpiku kostnego (wskaźnik MVD) u chorych na MM w czasie terapii talidomidem. Stwierdzili oni stopniowe jego zmniejszanie się u osób dobrze reagujących na leczenie, choć różnice nie osiągnęły istotności

statystycznej i wskaźnik MVD korelował w czasie leczenia z malejącym odsetkiem plazmocytów w szpiku. Na podstawie tych obserwacji autorzy przypuszczają, że pomimo regresji choroby, przetrwały komórki szpiczakowe, mogą produkować cytokiny proangiogenne podtrzymujące proces chorobowy. Dowodzi to też, że efekt antyangiogeny nie może być jedynym mechanizmem działania talidomidu.

Aktualnie w Klinice Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie do programu leczenia talidomidem włączonych jest ponad 20 pacjentów i planowane są badania mające na celu określenie korelacji stężeń wybranych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w osoczu oraz szpiku kostnym w zależności od czasu terapii. Badania takie miały już miejsce m. in. w lubelskiej Klinice Hematoonkologii, gdzie od ponad czterech lat, pod przewodnictwem Prof. Anny Dmoszyńskiej są prowadzone szeroko zakrojone badania nad mechanizmem działania talidomidu. W ośrodku lubelskim potwierdzono, m.in., iż talidomid hamuje sekrecję cytokin prozapalnych i proangiogennych, takich jak: IL-6, TNF  $\alpha$ , VEGF, b-FGF, HGF [24, 25, 41] u chorych na MM. Wykazano również, iż lek ten ma wpływ immunomodulujący na sekrecję cytokin wydzielanych przez limfocyty T (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IFN  $\gamma$ ), zwiększa wytwarzanie IL-4, IL-5, IL-8 oraz hamuje wytwarzanie IL-12 i TNF  $\alpha$  [24]. Aktualnie w Krakowie planowane są badania kliniczne związane z wykorzystaniem najnowszych leków, takich jak: CC-5013 (Revimid - pochodna talidomidu), PS-341 (Velcade - inhibitor proteasomu) oraz As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Trisenox - trójtlenek arsenu) w terapii chorych na szpiczaka mnogiego. Liczne, dotychczasowe doniesienia dotyczące wykorzystania powyższych specyfików w terapii chorych na szpiczaka mnogiego są bardzo obiecujące.

Neben i wsp. zauważyli, iż wysokie stężenie b-FGF w surowicy krwi chorych z postępującą postacią szpiczaka mnogiego jest czynnikiem korzystnym prognostycznie odnośnie reakcji na leczenie talidomidem [72]. Fakt ten jest szczególnie interesujący, jako że wysokie stężenie b-FGF w surowicy krwi okazało się być równocześnie czynnikiem niekorzystnym prognostycznie odnośnie długości przeżycia. Podobne dane opublikowali też w swojej pracy Weber i wsp. [116]. Autorzy ci stwierdzili, iż chorzy z dynamiczniej przebiegającym procesem angiogenezy skuteczniej odpowiadają

na leczenie talidomidem. Fakt lepszej reakcji na leczenie u chorych z podwyższonymi stężeniami czynników angiogennych, a więc z bardziej nasiloną angiogenezą, wskazuje, że efekt antyangiogeny jest prawdopodobnie głównym mechanizmem działania tego leku.

Interesujących danych dostarczyły badania stężeń cytokin proangiogennych w innych chorobach hematologicznych. Aguayo i wsp. [1] zauważyli, iż w przewlekłej białaczce szpikowej, pomimo nasilonej angiogenezy, jedynie wzrosło stężenie VEGF w surowicy krwi. W przewlekłej białaczce limfatycznej, wzrostowi b-FGF nie towarzyszyła nasilona angiogeneza. Vacca i wsp. [121] stwierdzili, że blokowanie działania b-FGF specyficznymi przeciwciałami powodowało znaczne, ale nie całkowite, zahamowanie angiogenezy. Podobny efekt w przypadku VEGF opisali Bellamy i wsp. [6]. Wszystkie te fakty wskazują, iż cytokiny regulujące proces angiogenezy odgrywają różne role w poszczególnych chorobach hematologicznych. Zapewne wynika to z bardzo złożonych i rozbudowanych wzajemnych zależności pomiędzy cytokinami - „sieć cytokinowa”, jak również wzajemnego oddziaływania komórek nowotworowych i podścieliska szpiku kostnego [19, 64, 112].

Omówione zagadnienia stanowią jedynie niewielki wycinek patogenezy szpiczaka mnogiego. Najprawdopodobniej najbliższe lata przyniosą coraz większe możliwości praktycznego wykorzystania oznaczania osoczowych stężeń cytokin, rozpuszczalnych receptorów cytokin oraz traktowania ich jako kolejnego narzędzia laboratoryjnego w rękach lekarza, celem pełniejszej diagnostyki chorych na MM. Badania kliniczne prowadzone w wielu ośrodkach naukowych być może pozwolą przyspieszyć wprowadzenie tych testów do codziennej praktyki związanej z opieką nad chorymi na szpiczaka mnogiego. Wobec bardzo szybkiego rozwoju hematologii ze szczególnym uwzględnieniem auto i allo przeszczepiania szpiku kostnego, terapii genowej, użycia przeciwciał monoklonalnych oraz terapii antyangiogennej - te testy diagnostyczne mogą stać się szczególnie przydatne.

## 6. Wnioski

1. Badania osoczowych stężeń: HGF, b-FGF, IL-6 oraz jej rozpuszczalnego receptora (sIL-6R) u chorych na szpiczaka mnogiego wykazały znamienne podwyższone wartości w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto osoczowe stężenie rozpuszczalnego receptora dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGF-R2) u pacjentów było znamienne obniżone w porównaniu do grupy kontrolnej. Powyższe obserwacje wydają się wskazywać na istotną rolę badanych cytokin prozapalnych i proangiogennych w biologii szpiczaka mnogiego.
2. U chorych odpowiadających na terapię antyproliferacyjną dochodziło do zmniejszenia nie tylko wyjściowo wysokiego osoczowego stężenia sIL-6R, ale również TGF- $\beta_1$ , co może stanowić o ich wartości prognostycznej.
3. Podwyższony poziom osoczowego stężenia czynnika wzrostu hepatocytów (powyżej 1048 pg/ml) mógłby być uznany za niekorzystny czynnik rokowniczy, albowiem u tych chorych stwierdzono wyraźnie gorszą odpowiedź na leczenie antyproliferacyjne.



## 7. Streszczenie

Ogromny postęp jaki dokonał się w ostatnich latach w poznaniu skomplikowanej biologii szpiczaka mnogiego, dotyczył szeregu aspektów patogenezы tego nowotworu. Rola cytokin prozapalnych, proangiogennych oraz ich rozpuszczalnych receptorów wydaje się mieć istotne znaczenie w rozwoju i progresji choroby. Ważne jest również dokładne ustalenie mechanizmów wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów, aktywacji onkogenów i powiązań między nimi.

Celem przeprowadzonych badań była ocena osoczowych stężeń cytokin: IL-6, b-FGF, HGF, VEGF, TGF- $\beta_1$  i rozpuszczalnych receptorów cytokin: sIL-6R, sVEGF R2 u chorych na szpiczaka mnogiego. Poszukiwano związku pomiędzy osoczowymi stężeniami wybranych czynników, a czasem terapii antyproliferacyjnej. W pracy próbowano określić optymalny czynnik najlepiej korelujący z zaawansowaniem procesu chorobowego. Ponadto analizowano współzależności pomiędzy badanymi cytokinami i ich rozpuszczalnymi receptorami.

Badaniami objęto 76 chorych na szpiczaka mnogiego. Wiek pacjentów wahał się od 22 do 77 lat (średnio 60 lat  $\pm$  10). Do analizy włączono: 29 osób (38,2 %) *de novo* rozpoznanych, nieleczonych oraz 47 osób (61,8 %) objętych leczeniem antyproliferacyjnym w różnym okresie terapii, przed włączeniem do badania.

Grupę kontrolną (35 osób) stanowili zdrowi ochotnicy - głównie pracownicy Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Obie grupy: badana i kontrolna nie różniły się rozkładem płci. Wśród analizowanych pacjentów było 38 kobiet i 38 mężczyzn – wskaźnik K/M=1. W grupie kontrolnej było 19 kobiet (54,3%) i 16 mężczyzn (45,7%) – wskaźnik K/M=1,2.

Materiał do oznaczania cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokin stanowiło osocze pacjentów. W badaniach zastosowano zestawy do oznaczania wybranych parametrów osocza (Quantikine, R&D Systems, Inc. Minneapolis) wykorzystujące technikę immunoenzymatyczną ELISA. Do pomiaru absorbancji użyto czytnika do mikropłytek Elx 800 firmy Bio - Tek Instruments. Wartość absorbancji odczytywano dla długości fali  $\lambda=450$  nm

i przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną. Oznaczenia osoczowych stężeń: IL-6, VEGF, HGF, sVEGF R2, b-FGF wyrażano w pg/ml, zaś sIL-6R i TGF- $\beta_1$  w ng/ml. Podczas analizy wyników wykorzystano elementy statystyki opisowej, testy nieparametryczne oraz krzywe ROC. Za znamienne statystycznie przyjmowano wyniki testowania, dla których poziom istotności był mniejszy lub równy 0,05.

W grupie chorych na szpiczaka mnogiego stwierdzono znamienne podwyższone średnie osoczowe stężenia HGF ( $p < 0,001$ ) oraz b-FGF ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie pacjentów stwierdzono również istotnie podwyższone średnie osoczowe stężenia IL-6 ( $p = 0,006$ ) oraz sIL-6R ( $p = 0,003$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. U chorych na MM średnie osoczowe stężenia sVEGF-R2/KDR były znamienne obniżone niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Analiza grupy chorych *de novo* rozpoznanych, nie leczonych (grupa N) oraz leczonych w różnym okresie terapii (grupa S), przed badaniem, wykazała istotnie wyższe wartości osoczowych stężeń TGF- $\beta_1$  w grupie N w porównaniu do grupy S ( $p = 0,025$ ). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w wartościach osoczowych stężeń dla pozostałych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów w grupach N i S.

U chorych odpowiadających na terapię antyproliferacyjną dochodziło do zmniejszania nie tylko wyjściowo wysokiego osoczowego stężenia sIL-6R, ale również TGF- $\beta_1$ , co może stanowić o ich wartości prognostycznej.

Wyniki analizy statystycznej metodą krzywych ROC wskazują, iż najbardziej optymalnym parametrem w ocenie progresji szpiczaka mnogiego wydaje się być osoczowe stężenie czynnika wzrostu hepatocytów. Badania osoczowego stężenia HGF pozwoliły na ocenę odpowiedzi na zastosowane leczenie z 94,4 % czułością i 73,9 % swoistością przy wartościach powyżej 1048 pg/ml. Prawdopodobnie im wyższe osoczowe stężenie HGF tym gorsze rokowanie i większe zaawansowanie choroby. Krzywe ROC dla pozostałych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów wskazywały na brak zdolności diagnostycznej tych parametrów w ocenie progresji choroby.

Ponadto zaobserwowano znamiennej współzależność pomiędzy osoczymi stężeniami: IL-6 i sIL-6R, HGF i sIL-6R oraz HGF i sVEGF R2 w grupie chorych *de novo* rozpoznanych. Wykazano również istotną współzależność pomiędzy osoczymi stężeniami: HGF i IL-6, b-FGF i sIL-6R, b-FGF i HGF oraz TGF- $\beta_1$  i VEGF w grupie S.

Wyniki osoczowych stężeń cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów wydają się wskazywać na istotną rolę HGF w patogenezie szpiczaka mnogiego i roli w progresji tego nowotworu.

## 8. Piśmiennictwo

1. 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, 2240-2245.
2. Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules. *FASEB J.*, 1990, 4, 2860–2867.
3. Avet-Loiseau H., Facon T., Grosbois B., Mograugeas F., Rapp M.J., Harousseau J.L. Miuvielle S., Bataille R. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation. *Blood*, 2002, 99, 2185-2191.
4. Barlogie B., Jacobson J., Anaissie E., Fassas A., Lee C-K., Thertulien R., Tricot G., van Rhee F., Zangari M., Talamo G., McCoy J., Crowley J. Post-transplant consolidation therapy towards improving long-term disease-free survival: preliminary results of total therapy II (TTII). *The Hematology Journal*, 2003, 4, 1, P11.3.2.
5. Bataille R., Jourdan M., Zhang X.G., Klein B. Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 2008-2011.
6. Bellamy WT., Richter L., Frutiger Y., Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.*, 1999, 59, 728-733.
7. Bergsagel P.L. Prognostic Factors in Multiple Myeloma: It's in the Genes, *Clin. Can. Res.*, 2003, 9, 533-534.
8. Bertolini F., Mingrone W., Alietti A., Ferrucci PF., Coccorocchio E., Peccatori F., Cineri S., Mancuso P., Corsini C., Burlini A., Zucca E., Martinelli G., Cineri S. Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis. Analysis of clinical results and of surrogate angiogenesis markers. *Ann. Oncol.*, 2001, 12, 987-990.
9. Bertolini F., Mancuso O.P., Gobbi A. The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 1995, 23, 1-3.
10. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin DB. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Rev.*, 1997, 18, 1, 26-42.
11. Borset M., Seidel C., Hjorth-Hansen H., Waage A., Sundan A. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leukemia and Lymphoma*, 1999, 32 (3-4), 249-256.

12. Borset M., Lien E., Espevik T., Hesteh E., Waage A., Sundan A. Concomitant expression of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and the Receptor c-MET in Human Myeloma Cell Lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 40, 24655-24661.
13. Byzova TV., Goldman CK., Pampori N., Thomas KA., Bett A., Shattil SJ., Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell*. 2000, 6, 851-860.
14. Catlet-Falcone R., Landowski T.H., Oshiro M.M., Turskon J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernandez-Luna J.L., Nunez G., Dalton W.S., Jove R. Constitutive activation of Stat-3 signaling confers resistance to apoptosis in U266 myeloma cell. *Immunity* 1999, 10, 105-115.
15. Blobel G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 1350-1359.
16. Chauhan D., Kharbada S., Ogata A., Urashima M., Teoh G., Robertson M., Kufe DW., Anderson KC. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and SAP kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 1997, 89, 227-234.
17. Cheng D., Kini A.R., Rodriguez J. Microvascular density and cytotoxic T cell activation correlate with response to thalidomide therapy in myeloma patients. *Abstracts of 41<sup>st</sup> ASH Meeting*. *Blood*, 1999, [1408].
18. Chybicka A.: Interleukiny – funkcje biologiczne i zastosowanie kliniczne. *Acta Haemat. Pol.*, 1997, 28, 13-19.
19. Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y., Urashima M., Yamamoto K., Libermann TA., Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- $\kappa$ B. *Blood*, 1996, 87, 1104-1112.
20. Dankbar B., Padro T., Leo R., Feldmann B., Kropff M., Mesters R.M., Serve H., Berdel W.E., Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor – stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 2000, 95, 2630-2636.
21. Dankbar B., Pedro T., Mesters R.M. VEGF is expressed by myeloma cells and stimulates IL-6 secretion by microvascular endothelial and marrow stromal cells. *Blood*, 1998, 92, 681a.
22. Derksen P.W.B., de Gorter D.J.J., Meijer H.P., Bende R.J., van Dijk M., Lokhorst H.M., Bloem A.C., Spaargaren M., Pals S.T. The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia*, 2003, 17, 764-774.

23. De Vos J., Jourdan M., Tarte K., Jasmin C., Klein B. JAK 2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol*, 2000, 109, 823-828.
24. Dmoszyńska A. Immunomodulatory biologiczne w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego, *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2002, CVIII, 5, 11, 1091-1096.
25. Dmoszyńska A. Talidomid – nowe możliwości leczenia szpiczaka plazmocytoowego, *Acta Haematologica Polonica*, 2000, 31, 1, 5-9.
26. Dmoszyńska A. Leczenie rozrostowych chorób hematologicznych, *Wydawnictwo Folium*, Lublin 2002, 1-167.
27. Durie B.G., Salmon S.E., A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival, *Cancer*, 1975, 36, 842-854.
28. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G, Bagnato S, Giustolisi G, Florida P, Sortino G, Giustolisi R. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica*, 2000, 85, 800-805.
29. Facon T., Avet-Loiseau H., Guillemin G., Moreau P., Genevieve F., Zandeck M., Lai J.L., Leleu X., Jouet J.P. Batters F., Harousseau J.L., Bataille R., Mary J.Y. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta_2$  – microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*, 2001, 97, 1566-1571.
30. Fattori E., Della Rocca C., Costa P., Giorgio M., Dente B., Pozzi L., Ciliberto G. Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin-6 treated transgenic mice. *Blood* 1994, 83, 2570-2579.
31. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Seminars in oncology*, 2001, 28, 536- 542.
32. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N. Engl. J. Med.*, 1971, 285, 1182-1186.
33. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.*, 1972, 175, 409-416.
34. Funakoshi H., Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications, *Clinica Chimica Acta* 2003, 327, 1-23.
35. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998, 273, 30336 – 30343.

36. Greipp P.R., San Miguel J.F., Fonseca R., Avet-Loiseau, Jacobson J.L., Rasmussen, Crowley J.J., Durie B.G.M. Development of an International Prognostic Index (IPI) for myeloma: report of the International Myeloma Working Group. *The Hematology Journal*, 2003, 4, 1, P7.1.
37. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adhesion of human multiple myeloma cell lines to bone marrow stromal cells stimulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic application. *Leukemia*, 2001, 15, 1950-1961.
38. Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H, Epstein J. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*, 1994, 84, 3063-3070
39. Hallek M., Bergsagel L., Anderson KC, Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998, 91, 3-21.
40. Heinrich P.C., Behrman I., Muller-Neuwen G., Schaper F., Graeve L. Interleukin-6 type cytokine signalling through gp 130/JAK/SAT pathway. *Biochem J.* 1998, 334, 297-314.
41. Hus M., Dmoszyńska A. Talidomid - raz jeszcze. Nowe zastosowanie kliniczne, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia*, 1999, LIV, 119-126.
42. 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, 4, 796-802.
43. Jędrychowski W., Penar A.: Statystyczna analiza wyników badań naukowych w medycynie i biologii. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2000, 1-156.
44. Joeschke R., Cook D., Guyatt G.: Ocena artykułów na temat testów diagnostycznych, Cz. II – metody określania przydatności testów. *Medycyna Praktyczna: Kurier Elektroniczny*, 1999.
45. Jones S., Horiuchi S., Topley N. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.*, 2001, 15, 43-58.
46. Janicki K. *Hematologia*, Warszawa, 2001, PZWL.
47. Junbo H, Li Q, Zaide W, Yunde H. Increased level of serum hepatocyte growth factor/scatter factor in liver cancer is associated with tumor metastasis. *In Vivo* 1999; 3, 177-80.

48. Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 29, 209-248.
49. Jędrzejczak WW., Podolak-Dawidziak M. Cytokiny. Zastosowanie kliniczne. *Volumed*, 1997, 1-246.
50. Jurczyszyn A., Wolska-Smoleń T., Sobociński M., Fedak D., Naskalski J., Skotnicki A.B. Serum concentrations of proangiogenic cytokines in patients with multiple myeloma, *Acta Haematologica Polonica*, 2003, 34, 1, abstract 40.
51. Kato O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 1995, 55, 5687-5692.
52. Kawano M.M., Mihara K., Huang N., Tsujimoto T., Kuramoto A.: Differentiation of early plasma cells on bone marrow stroma cells, respectively. *Br. J. Haematol.* 1997, 99, 131-138.
53. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989, 74, 1-10.
54. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989, 73, 517-524.
55. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, et al. Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. *Nature*, 1988, 332(6159), 83-85.
56. Klein B., Zhang X.G., Lu Z.Y., Bataille R. Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma. *Blood*, 1995, 85, 863-872.
57. Kortylewski M., Mackiewicz A.: Cytokiny i procesy przekazywania sygnału: grupa cytokin typu interleukiny-6 jako układ modelowy. *Post. Biol. Kom.*, 2000, 27, 213-227.
58. Kyle R.A. Benign monoclonal gammopathy- after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clinic Proceedings*, 1993, 68, 26-36.
59. Kyle R.A., Greipp P.R. Smouldering multiple myeloma. *N. Eng. J. Med.*, 1980; 302: 1347-1349.
60. Kyriakou D, Papadaki H, Eliopoulos AG, Foudoulakis A, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Serum soluble IL-6 receptor concentrations correlate with stages of multiple myeloma defined by serum beta 2-microglobulin and C-reactive protein. *Int. J. Hematol.*, 1997, 66, 367-371.



61. Kyrstsonis MC, Dedoussis G, Baxevanis C, Stamatelou M, Maniatis A. Serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-4 (IL-4) in patients with multiple myeloma (MM). *Br. J. Haemat.*, 1996, 92, 420-422.
62. Laroche M, Brousset P, Ludot I, Mazieres B, Thiechart M, Attal M. Increased vascularization in myeloma. *Eur. J. Haemat.*, 2001, 66, 89-93.
63. Lichtenstein A., Tu Y., Fady C., Vescio R., Berenson J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells, *Cell Immunology* 1995, 162, 248-255.
64. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van Oers R, Bloem AC. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1994, 84, 2269-2277.
65. Ludwig H., Nachbaur D.M., Fritz E., Krainer M., Huber H. Intereukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 1991, 77, 2794-2795.
66. Maeda J, Ueki N, Hada T, Higashino K. Elevated serum hepatocyte growth factor/scatter factor levels in inflammatory lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152, 1587-1591.
67. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*, 2001, 98, 1904-1913.
68. Mundy G.R., Bonewald L.F. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990, 593, 91-97.
69. Millauner B., Wizigmann-Voos S., Schnurch H. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993, 72, 835-846.
70. Morishita R, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a potential index of severity of hypertension. *Hypertens Res* 1999, 22, 161-167.
71. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999, 33, 1379-1384.
72. Neben K., Moehler T., Egerer G., Kraemer A., Hillengass J., Benner A., Ho AD., Goldschmidt H., High plasma basic fibroblast growth factor concentration is associated with response to thalidomide in progressive multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7, 2675-2681.
73. Nicod L.P.: Cytokines: overview. *Thorax*, 1993, 48, 660-667.

74. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86, 356-361.
75. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 1999, 13, 9-22.
76. Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 1409-1414.
77. Nayeri F, Nilsson I, Skude G, Brudin L, Soderstrom C. Hepatocyte growth factor (HGF) in patients with pneumonia: a comparison between survivors and non-survivors. *Scand J Infect Dis* 1998, 30, 405-409.
78. Ogata A, Chauhan D, Urashima M., Teoh G., Treon S.P., Urashima M., Schlossman R.L., Anderson K.C. Il-6 triggers multiple myeloma cell growth via Ras dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 1997, 159, 2212-2221.
79. Palmblad J. Angiogenesis in hematological malignancies with focus on multiple myeloma. *Haema* 2001, 4(2), 89-98.
80. Plowright EE, Li Z, Bergsagel PL, Chesi M, Barber DL, Branch DR, Hawley RG, Stewart AK. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood*, 2000; 95, 992-998.
81. Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*, 2001, 98, 428-435.
82. Pulkki K, Pelliniemi TT, Rajamaki A, Tienhaara A, Laakso M, Lahtinen R. Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. Finnish Leukaemia Group. *Br. J. Haematol.*, 1996, 92, 370-374.
83. Ptak W., Ptak M.: *Podstawy immunologii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1999, 1-311.
84. Pons E., Uphoff C.C., Drexler H.G. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Res* 1998, 22, 797-804.
85. Rawstron AC, Fenton JA, Ashcroft J, English A, Jones RA, Richards SJ, Pratt G, Owen R, Davies FE, Child JA, Jack AS, Morgan G. The interleukin-6 receptor alpha-chain (CD126) is expressed by neoplastic but not normal plasma cells. *Blood*, 2000, 96, 3880-3886.

86. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Minischetti M, Marzullo A, Herken R, Roncali L, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br. J. Cancer*, 1999, 79, 451-455.
87. Raya J.M., Brito M.L., Gonzalez-Brito G. Plasma cells of patient with „smouldering” myeloma show intermediate phenotypic features between MGUS and multiple myeloma. *The Hematology Journal*, 2000, 1, 1, 165 – 70.
88. Robak T. *Hematologia kliniczna w zarysie*, 1998, AM w Łodzi.
89. Robak T.: *Biologia i farmakologia cytokin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1995, 1-295.
90. Reibnegger G, Krainer M, Herold M, Ludwig H, Wachter H, Huber H. Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma. *Cancer Res.*, 1991, 51, 6250-6253.
91. Roletto F, Galvani AP, Cristiani C, Valsasina B, Landonio A, Bertolero F. Basic fibroblast growth factor stimulates hepatocyte growth factor/scatter factor secretion by human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996, 166, 105-111.
92. Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*, 1999, 13, 469-472.
93. Rose-John S., Heinrich P.C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: their generation and biological function. *Biochem. J.*, 1994, 300, 281-290.
94. Ryoo J.J., Cole C.E., Anderson K.C. Novel therapies for multiple myeloma, *Blood Reviews*, 2002, 16, 167-174.
95. Riedel D.A., Pottern L.M., Blattner W.A. Epidemiology of multiple myeloma. [W:] Wiernik P.H., Canellos G.P., Kyle R.A., Schiffer C.A. (red.). *Neoplastic Diseases of the Blood*, 2<sup>nd</sup> edn. Wyd. Churchill Livingstone, New York, 1991, 347-372
96. Ohtani K, Ninomiya H, Hasegawa Y, Kobayashi T, Kojima H, Nagasawa T, Abe T. Clinical significance of elevated soluble interleukin-6 receptor levels in the sera of patients with plasma cell dyscrasias. *Br. J. Haematol.*, 1995, 91, 116-120.
97. Skotnicki A.B., Wolska-Smołeń T., Jurczyszyn A. Szpiczak mnogi – nowe perspektywy terapeutyczne, *Przegląd Lekarski*, 1999, 56, 67-72.
98. Skotnicki A.B., Jurczyszyn A., Wolska-Smołeń T. Szpiczak mnogi – rola wysokodozowanej chemioterapii, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 1999, 8, 3, 189-196.

99. Seidel C., Borset M., Turesson I., Abildgaard N., Sundan A., Wagge A. Elevated serum concentrations of Hepatocyte Growth Factor on patients with multiple myeloma, *Blood*, 1998, 91, 3, 806-812.
100. Sezer O., Jacob C., Eucker J., Niemoller K., Gatz F., Wernecke K-D., Possinger K.: Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) i multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2001, 66, 83-88.
101. Shiota G, Okano J, Umeki K, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor in acute hepatic failure in comparison with acute hepatitis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994, 85, 157-162.
102. Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology* 1995, 21, 106-112.
103. Singhal S., Mehta J., Desikan R., Ayers D., Roberson P., Eddlemon P., Munshi N., Anaissie E., Wilson C., Dhodapkar M., Zeddis J., Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Eng. J. Med.*, 1999, 341, 1565-1571.
104. Sezer O., Niemöller K., Kaufmann O. Prognostic relevance of bone marrow microvessel density in multiple myeloma. *Book of Abstracts, VIIIth International Myeloma Workshop, Banff, Canada; 2001, 156, abstract 80.*
105. Sezer O., Niemöller K., Kaufmann O. Treatment-related changes in bone marrow microvessel density in multiple myeloma. *Book of Abstracts, VIII th International Myeloma Workshop, Banff, Canada; 2001, 157, abstract 81.*
106. Sjak-Shie N. The role of angiogenesis and VEGF in multiple myeloma. *Abstract Book from Mayo Clinic Symposium „Innovate Research In Multiple Myeloma”. Amelia Island, USA, 2001, 210-216.*
107. Siegfried JM, Weissfeld LA, Luketich JD, Weyant RJ, Gubish CT, Landreneau RJ. The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1998, 66, 1915-1918.
108. Salven P., Teerenhovi L., Joensuu H. A High Pretreatment Serum Basic Fibroblast Growth factor Concentration Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 1999, 94:,3334-3339.
109. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 1994, 83, 113-118.
110. Thomas X. Anglaret B., Magaud J.P., Epstein J., Archimbaud E. Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 1998, 32, 107-119.

111. Urashima M., Ogata A., Chauhan D., Vidriales M.B., Teoh G., Hoshi Y., Schlossman R.L., DeCaprio J.A., Anderson K.C. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood* 1996, 88, 2219-2227.
112. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. 1993, 82, 3712- 3720.
113. Usnarska-Zubkiewicz L. Stężenie interleukiny-6 (IL-6), rozpuszczalnego receptora dla interleukiny-6 (sIL-6R) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa) w szpiczaku mnogim nie leczonym i w progresji. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 1998, 99, 30-37.
114. Urashima M., Chauhan D., Uchiyama H., Freeman G.J. Anderson K.C. CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. *Blood* 1995, 85, 1903-1912.
115. Undas A., Brożek J., Musiał J. Anti-inflammatory and antithrombotic effects of statins in the management of coronary artery disease. *Clin Lab* 2002, 48(5-6), 287-296.
116. Weber D.M., Rankin K., Gavino M. Angiogenesis factors and sensitivity to thalidomide in previously untreated multiple myeloma. Abstracts of 42<sup>nd</sup> ASH Meeting. *Blood*, 2000, 96 (1): 719a.
117. Wierzbowska A., Wrzesień-Kuś A., Robak T. Angiogeneza i jej znaczenie w biologii ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematologica Polonica*, 2002, 33, 1, 5-17.
118. Woodruff R.K., Malpas J.S., Paxton A.M., Lister T.A. Plasma cell leukemia (PCL): a report on 15 patients. *Blood* 1978, 52, 839-845.
119. Wierzbowska A., Robak T. Cytokiny w szpiczaku mnogim. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 1998, 99, 245-253.
120. Witzig T. FGF and FGFR3 in Multiple Myeloma Angiogenesis. Abstract Book from Mayo Clinic Symposium „Innovate Research In Multiple Myeloma”. Amelia Island, USA, 2001: 35.
121. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albin A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*, 1999, 93, 3064-3073
122. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 1994, 87, 503-508.

123. Yoshitomi Y, Kojima S, Umemoto T, et al. Serum hepatocyte growth factor in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84, 2425-8.
124. Yabkowitz R, Meyer S, Black T, Elliott G, Merewether LA, Yamane HK. Inflammatory Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor Stimulate the Release of Soluble Tie Receptor From Human Endothelial Cells Via Metalloprotease Activation. *Blood* 1999, 93, 1969-1979.
125. Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996, 93, 1493-1495.
126. Uchiyama H., Barut B.A., Mohrbacher A.F., Chauhan D., Anderson K.C. Adhesion of human myelomaderived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993, 82, 3712-3719.
127. Yasukawa K, Saito T, Fukunaga T, Sekimori Y, Koishihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Matsuda T, Yawata H, Hirano T. Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J. Biol. Chem.*, 1990, 108, 673-676.
128. Yamagami H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic human hepatocyte growth factor in patients with type C liver diseases. *Intervirology* 2001, 44, 36-42.
129. Zhu Y, Hojo Y, Ikeda U, Shimada K. Production of hepatocyte growth factor during acute myocardial infarction. *Heart* 2000, 83, 450-455.
130. Zhang X.G., Klein B., Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma, *Blood* 1989, 74, 11-13.
131. Xia X, Lee HK, Clark SC, Choi YS. Recombinant interleukin (IL)2- induced human B cell differentiation is mediated by autocrine IL6. *Eur. J. Immunol.*, 1989, 19, 2275-81.
132. Zhu A.Z., Fleischer M., Bush A. Elevated serum concentrations of fibroblast growth factor (FGF) in patients with multiple myeloma (MM). *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1999, 18A, 155-161.

