

## Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu u nemocných s lymfoidními malignitami

Smolej L.<sup>1</sup>, Andrýs C.<sup>2</sup>, Belada D.<sup>1</sup>, V. Maisnar<sup>1</sup>, Žák P.<sup>1</sup>, Široký O.<sup>1</sup>, Malý J.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Oddělení klinické hematologie a Ústav klinické imunologie a alergologie

### Souhrn

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

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

### Summary

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

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

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

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

### Úvod

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

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

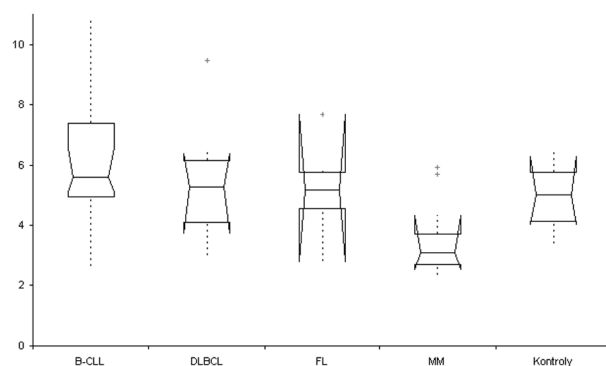
### Nemocní a metody

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

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

## Výsledky

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



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

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

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

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

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

## Diskuse

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

## Literatura

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

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

MUDr. Lukáš Smolej

2. interní klinika, Oddělení klinické hematologie

UK v Praze, LF a FN v Hradci Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: smolej@seznam.cz

Poděkování

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

MZ ČR a výzkumným záměrem MZO 00179906.

Došlo do redakce: 14. 11. 2005

Přijato: 5. 1. 2006

## MEZINÁRODNÍ AKREDITAČNÍ STANDARDY PRO ZDRAVOTNÍ TRANSPORT - komentovaný oficiální překlad

*Joint Commission International*

Český překlad vychází z vypracovaného a vydaného Joint Commission International. Tyto publikace drží světovou prioritu. Ke každému standardu je uvedena metodika jeho měření, detailně je rozepsáno, jak daná instituce může standard naplnit a připojeny jsou i měřitelné indikátory standardu. České vydání je doplněno o krátký komentář o případných odlišnostech vyplývajících z legislativního prostředí ČR. Publikaci využijí nejen manažeri zařízení usilujících o mezinárodní akreditaci, ale všichni ti, kteří ji chtějí použít jako manažerský nástroj sloužící ke zmapování kvality v daném zdravotnickém zařízení a k jejímu zlepšování. Zajímat bude nepochybně i úředníky státní správy v oblasti zdravotnictví, pracovníky zdravotních pojišťoven, teoretiky kvality ve zdravotnictví a v neposlední řadě širokou patientskou veřejnost.

Vydala Grada Publishing v roce 2005. ISBN 80-247-1002-1, kat. číslo 1035, 17 x 23 cm, pevná vazba, 164 stran, cena 790 Kč.

**Objednávky můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz**