
Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Kašparová P.¹, Smolej L.²

¹Fingerlandův ústav patologie a

²Oddělení klinické hematologie, II. interní klinika,

Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Souhrn

Angiogeneze je proces formování nových cév ze stávajících. Je zahrnuta v mnoha fyziologických procesech, zároveň se však podílí na postupu nádorového růstu. Jakkoliv mnoho je známo o angiogenezi u solidních nádorů, kde hraje roli v nádorové invazi a jejich metastatickém potenciálu, u nádorů krevetvorné tkáně začala být zkoumána teprve v posledních letech. Výsledky studií o angiogenezi u hematologických malignit jsou dosud nesourodé.

Nádorová angiogeneze může být studována na různých úrovních; histologicky je studována v nádorových tkáních (lymfatické uzliny, kostní dřev) a kvantifikována jako mikrovaskulární denzita (MVD).

Cílem naší studie bylo zavést metodu kvantifikace MVD v kostní dřev pomocí imunohistochemického průkazu endoteliálních markerů (fVIII) a dále zhodnotit MVD ve vzorcích kostní dřev pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a výsledky porovnat s kontrolní skupinou pacientů (CON).

CLL je typickou malignitou hematopoetické tkáně, ale průběh a prognóza se u jednotlivých pacientů zřetelně liší. Z tohoto důvodu je snaha o nalezení prognostických markerů. Angiogeneze je jedním z možných znaků, které by mohly dodat více informací o průběhu tohoto onemocnění. Ale dosud bylo u CLL publikováno jen málo studií o angiogenezi měřené jako MVD a výsledky jednotlivých studií se liší.

V naší studii byl zjištěn zvýšený počet a plocha kapilár (oproti kontrolní skupině), ale nikoliv počet či plocha sinusů. Můžeme tedy shrnout, že jsme našli známky abnormální angiogeneze v kostní dřev u pacientů s CLL, ale bude zapotřebí dlouhodobějších studií, aby se prokázal prognostický význam těchto nálezů.

Klíčová slova: angiogeneze – kostní dřev – chronická lymfocytární leukémie – CLL – mikrovaskulární denzita – MVD

Summary

Angiogenesis in the Bone Marrow of Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia

Angiogenesis is a process of formation of new vessels from the preexisting ones. It is involved in many physiological processes, at the same time, however, it is involved also in the progress of tumoral growth. Although a lot is known about angiogenesis in solid tumors where it plays a role in tumoral invasion and its metastatic potential, in hematological malignancies it has been appreciated only recently. However, the results of studies on abnormal angiogenesis in hematological malignancies are inconsistent. Angiogenesis can be studied at different levels; histologically, it is studied in the infiltrated tissues (lymph nodes, bone marrow) and quantified as microvessel density (MVD).

The aims of our study were to introduce the method of MVD quantification in the bone marrow using immunohistochemical detection of endothelial markers (fVIII) and then evaluate MVD in bone marrow samples in a group of patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and compare the results with a control group of patients (CON).

CLL is a typical malignancy of the hematopoietic tissue but the course and the prognosis of patients with this disease vary considerably. For this reason there is urgent need for novel prognostic markers in order to assess individual patient prognosis and tailor treatment. Angiogenesis is one of the possible markers which may add more informations about the course of this disease. So far only few studies have been published about angiogenesis measured as MVD in CLL patients and the results are inconsistent. In our study, both the number and the area of microvessels were increased in bone marrow of patients with CLL, but the number and area of sinuses were not. It can be concluded that there are signs of abnormal angiogenesis in bone marrow of patients with CLL but larger study with longer follow-up is needed to give more specific information about prognostic value of these findings.

Key words: angiogenesis – bone marrow – chronic lymphocytic leukaemia – CLL – microvessel density – MVD

Čes.-slov. Patol., 43, 2007, No. 2, p. 50–58

Angiogeneze je proces tvorby nových cév z cév stávajících. Podílí se na mnoha fyziologických procesech, jako je hojení a embryogeneze, zároveň je však zapojena do rozvoje nádorového bujení.

Ačkoliv je již hodně známo o angiogenezi u solidních tumorů, kde nádorová angiogeneze přispívá k invazivitě nádoru a k jeho metastatickému potenciálu (byly již zjištěny markery přesvědčivě se podílející na nádorové angiogenezi a mající prognostický význam), angiogeneze u hematologických malignit se dostala do středu zájmu teprve v nedávné době. Ale přestože se ukazuje, že u hematologických nádorů jsou patrné známky abnormální angiogeneze, výsledky příslušných studií nejsou dosud zcela jednotné a v některých případech jsou spíše rozporuplné (6).

Nádorová angiogeneze může být studována na různých úrovních: na klinické úrovni je nejznámější sledování hladin angiogenních faktorů v krvi, nejčastěji hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF) a bazického fibroblastického růstového faktoru (basic fibroblastic growth factor, bFGF), nověji např. i solubilní frakce CD105 endoglinu (sCD105) (1, 4, 7, 10). Na histologické úrovni je angiogeneze studována v infiltrovaných tkáních; v naší studii ve vzorcích kostní dřeni. Stupeň angiogenních změn na histologické úrovni může být kvantifikován měřením mikrovaskulární denzity (MVD). K tomuto měření je používán imunohistochemický průkaz různých endoteliálních markerů (5, 9, 12).

V angiogenezi je zapojeno mnoho cest, ale většina dosavadních studií se věnovala odděleně vždy jen jedné z nich – buď sledovala jen klinické či naopak jen histologické známky zvýšené angiogeneze. Jen málo studií korelovalo histologické znaky s klinickými. Málo studií se také zabývalo porovnáním známek angiogeneze s dalšími parametry onemocnění. A pokud ano, byl v těchto studiích většinou sledován pouze jeden vybraný faktor, který byl dále porovnáván s ostatními (5, 11, 12).

Pokud jde o diagnostické jednotky, v hematologické oblasti se dosud nejvíce prací o angiogenezi týkalo mnohočetného myelomu (multiple myeloma, MM). Tato jednotka vykazuje některé vlastnosti solidních tumorů, a proto se při jejím studiu dalo dobře využít poznatků získaných předchozími studii solidních nehematologických malignit. Tím však zároveň tato afekce z hematologické problematiky poněkud vybočuje a poznatky získané studii tohoto nádoru nelze pak zcela jednoznačně přenést na jiné, „klasické“ hematologické jednotky.

Naproti tomu CLL patří k typickým hematologickým onemocněním; její diagnostika se však v minulosti opírala téměř výhradně o klinické nálezy. Trepanobiopsický odběr kostní dřeni se

stal standardní součástí vyšetřovacího protokolu teprve v poměrně nedávné době, a proto histologické nálezy z kostní dřeni nejsou dosud důkladně prostudovány. Ukazuje se však, že i tyto nálezy mohou mít diagnostický a prognostický význam.

Ve spolupráci s Oddělením klinické hematologie (OKH, II. interní klinika LF UK a FN v Hradci Králové) bylo u pacientů s CLL, kteří splňovali dále uvedená kritéria a u kontrolní skupiny (pacienti vyšetřovaní pro jiná onemocnění, s negativním nálezem v kostní dřeni), sledováno několik parametrů charakterizujících stav onemocnění. Důraz byl kladen na hodnocení intenzity angiogeneze, a to jak na úrovni klinické, tak i histologické. Na úrovni klinické byly u pacientů s CLL měřeny hladiny angiogenních faktorů v krvi. Na histologické úrovni bylo cílem studie studovat známky angiogeneze u pacientů s CLL v kostní dřeni, kvantifikovat ji pomocí měření MVD a tyto nálezy porovnat s některými dalšími parametry.

Nálezy byly korelovány v rámci skupiny s dalšími parametry popisujícími stav onemocnění a zároveň porovnávány s kontrolní skupinou. Bylo tak možné korelovat nejen histologické a klinické známky angiogeneze, ale i porovnat tyto známky s dalšími histologickými a klinickými parametry, které mají nebo by mohly mít vztah ke stavu a vývoji onemocnění.

Chronická lymfocytární leukémie

CLL je nejběžnější leukémie dospělých (11). Přestože klinický průběh může být indolentní, je onemocnění běžnou terapií nevléčitelné a průměrné přežití pacientů je 7 let. Průběh onemocnění je u CLL typický extrémní různorodostí. U části pacientů je průběh pomalý, pouze s pozvolným narůstáním nádorové populace, nikdy nepotřebují léčbu a jejich přežití je totožné s vrstevníky nepostíženými CLL. U jiných však dochází k poměrně časně infiltraci mnoha orgánů, s narušením jejich funkce a paraneoplastickými projevy způsobovanými cytokiny vyplavovanými nádorovými buňkami. V takových případech se přežití může pohybovat v řádu pouze několika měsíců. U všech pacientů s CLL hrozí také velkobuněčný zvrát nádorového onemocnění, tzv. Richterův syndrom, který je popisován ve 3,5 % případů. Proto byla a je snaha o nalezení markerů, které by dovedly odlišit pacienty s dlouhodobým stacionárním průběhem od pacientů, kde bude možné očekávat rychle nastupující progresi a agresivní průběh onemocnění. V případě objevení se takovýchto varovných znaků pak použít způsob léčby, který by byl zaměřen na potlačení progresu nebo by ji v ideálním případě předcházel.

Na základě řady studií byl nalezeno několik markerů, včetně chromozomálních odchylek, mutačního stavu genu pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinu (immunoglobulin variable heavy, IgVH), zdvojovacího času lymfocytů (lymphocyte doubling time, LDT) a dalších, které mají vztah k vývoji onemocnění a prognóze pacienta; některé z nich jsou již uznané, ověřené, jiné teprve ve fázi výzkumu a prověřování. Žádný z faktorů však dosud není považován za definitivní a absolutní (10).

O stupni angiogeneze je spekulováno jako o dalším možném prognostickém markeru CLL. V naší studii jsme proto sledovali několik markerů, které by mohly odpovídat angiogenezi:

- a) mikrovaskulární denzita v kostní dřeni,
- b) počet mastocytů v kostní dřeni,
- c) plazmatické hladiny angiogenních faktorů.

Známky abnormální angiogeneze v kostní dřeni a v lymfatických uzlinách u B-CLL jsou zřejmé (4). Dosud však bylo publikováno jen málo studií o tomto tématu a jejich výsledky jsou značně rozporuplné. Přesto se má za to, že angiogeneze je součástí patogeneze CLL a její klinicko-prognostický význam byl již demonstrován u pacientů v časně fázi onemocnění (10). U pacientů s B-CLL byly prokázány i zvýšené hladiny VEGF a bFGF (3, 8) a také zvýšená MVD v kostní dřeni (2, 3, 10). Při porovnávání MVD s dalšími parametry onemocnění bylo zjištěno, že genomické aberace jsou nezávislými prediktory progresu nemoci B-CLL, dosud však nebyla nalezena korelace mezi těmito aberacemi a MVD ani mezi MVD a vyšší hladinou sérového VEGF (8).

Materiál a metodika

Soubor tvořili pacienti, kterým bylo v období let 1999–2005 provedeno bioptické vyšetření kostní dřene a současně splňovali následující kritéria:

a) byli nebo jsou v dispenzarizaci Oddělení klinické hematologie (OKH) II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové a bylo u nich možné dohledat sledované klinické údaje (věk, klinické stadium onemocnění a dobu sledování),

b) nález v kostní dřeni splňoval požadovaná diagnostická kritéria (infiltrace při CLL), materiál byl vhodně fixován (Löwyho roztok) a jeho množství bylo dostatečné pro další vyšetřování,

c) v době odběru vzorku byl pacient bez léčby,

d) byla provedena další klinická vyšetření (stanovení plazmatické hladiny bFGF, VEGF, sCD105, mutační stav IgVH, LDT).

Tato kritéria byla splněna u 22 případů CLL.

Jako kontrolní skupina (CON) sloužily vzorky kostní dřene od pacientů vyšetřovaných v rámci

stagingu Hodgkinovy nemoci, non-Hodgkinových lymfomů a solidních tumorů a vzorky pacientů vyšetřovaných s podezřením na bližší neurčenou hematologickou malignitu, s normálním histologickým nálezem nebo jen s reaktivními změnami krvevorné tkáně.

Skupinu CON tvořilo 11 vzorků od pacientů s rovnoměrným zastoupením pohlaví a věkově srovnatelných s vlastním souborem.

Ke studiu angiogeneze byly použity trepanobiopsky odebrané vzorky kostní dřene z lopaty kosti kyčelní. Materiál každého vzorku byl zpracován v celém rozsahu a po zalití do parafinu byly z každého vzorku krájeny řezy o tloušťce 3 μ m. Vždy byla nejprve zhotovena sada sériových preparátů zahrnující barvení: hematoxylin-eozin, May-Grünwald-Giemsa (MGG), PAS, průkaz chloracetátsterázy, Perlsovo barvení na průkaz trojmočného železa a impregnace retikulinových vláken dle Gömöriho. Dále dle potřeby imunohistochemické vyšetření ke stanovení základní diagnózy a vždy imunohistochemický průkaz fVIII (von Willebrandova faktor).

K imunohistochemickému vyšetření byla pro zhodnocení angiogeneze v kostní dřeni použita monoklonální myši protilátka proti lidskému fVIII, klon F8/86 (Dako, Dánsko), ředění 1:2000. Bylo provedeno tepelné demaskování antigenů s použitím Target Retrieval Solution (TRS) S1700 (Dako). Při průkazu byla použita nepřímá imunohistochemická metoda s použitím vizualizačního systému EnVision Dual Link System (Dako) značeného peroxidázou. Jako chromogen byl použit diaminobenzidin (DAB). Jako pozitivní byly hodnoceny všechny hnědě zbarvené buňky bez morfologie megakaryocytů, bez ohledu na to, zda bylo či nebylo přítomno lumen.

Od klinických lékařů byly získány výsledky dalších vyšetření, která byla prováděna na specializovaných pracovištích podle standardů daných metod. Takto byly získány údaje o hladinách angiogenních faktorů VEGF a bFGF, mutačním stavu IgVH, chromozomálních odchylkách a LDT.

Histologické parametry vyšetřované ve vzorcích kostní dřene:

a) Typ infiltrace kostní dřene (obr. 1)

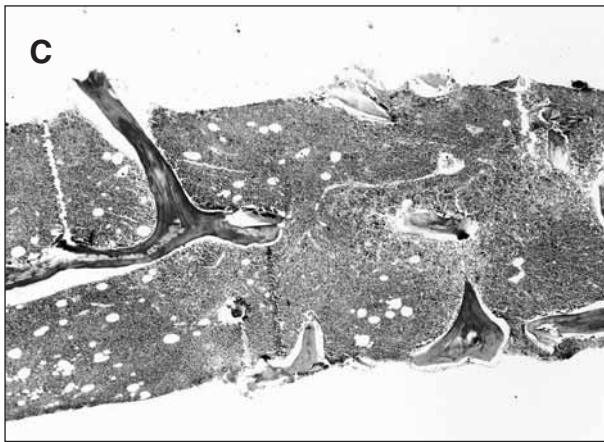
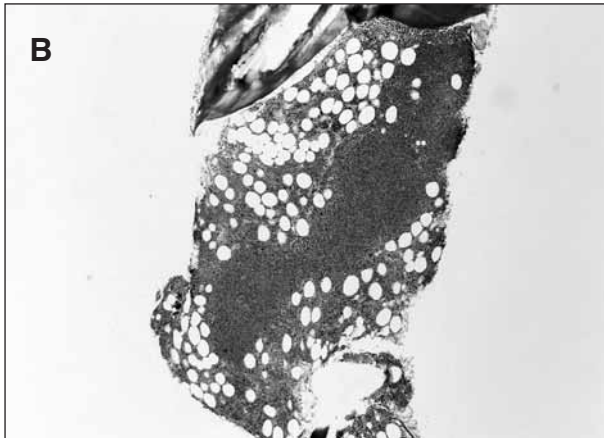
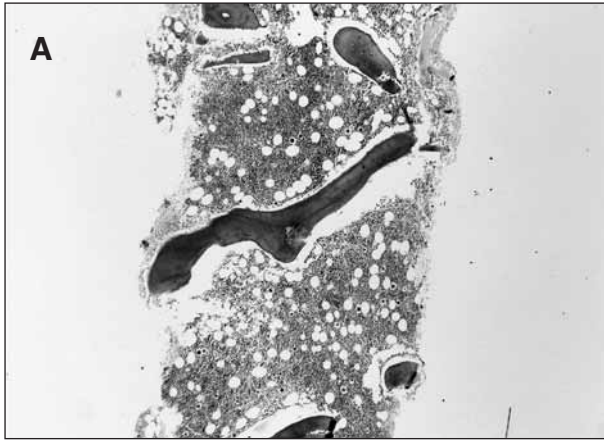
1 = intersticiální: nádorové buňky jednotlivě či v malých skupinkách (do 10 buněk), celkově převažuje nepostížená krvevorná tkáň,

2 = fokální (nodulární nebo patchy): jasně patrné ostrůvky nádorových buněk (řádově desítky buněk), nádorová a krvevorná tkáň zhruba ve stejném zastoupení,

3 = difúzní: splývající nádorové infiltráty, zřetelně převažuje nádorová tkáň nad krvevornou.

b) Počet mastocytů (obr. 2).

Při celkovém zvětšení 400krát (= 1 zorné pole při velkém zvětšení, high power field, HPF) bylo



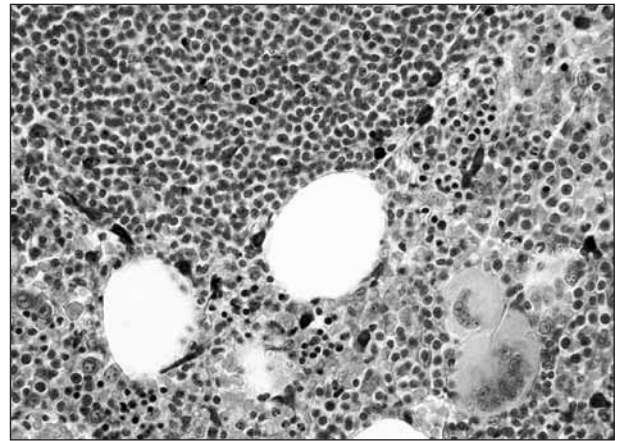
Obr. 1: CLL, typy infiltrace (a)intersticiální, (b) fokální, (c) difuzní. MGG, 40krát.

hodnoceno tolik zorných polí, aby byla zaujata celá plocha vzorku. Ve výsledku udáván maximální počet mastocytů na jedno velké zorné pole.

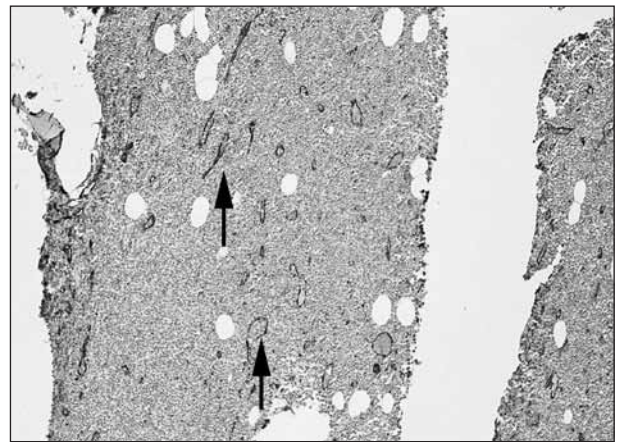
c) Imunohistochemické vyšetření MVD (obr. 3, 4, 5)

Preparáty s imunohistochemickým průkazem fVIII byly hodnoceny počítačovou analýzou obrazu za použití software LUCIA M/Comet 3.52 od firmy Laboratory Imaging (Praha, Česká republika).

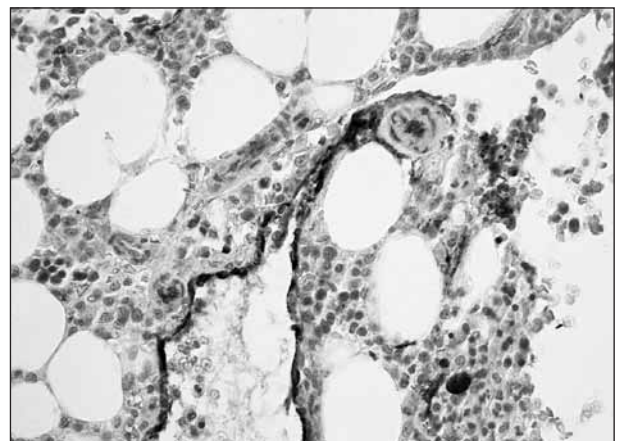
Při histologickém vyšetření byla angiogeneze



Obr. 2. CLL, mastocyty (šipka) v okolí nádorového infiltrátu. MGG, 200krát.

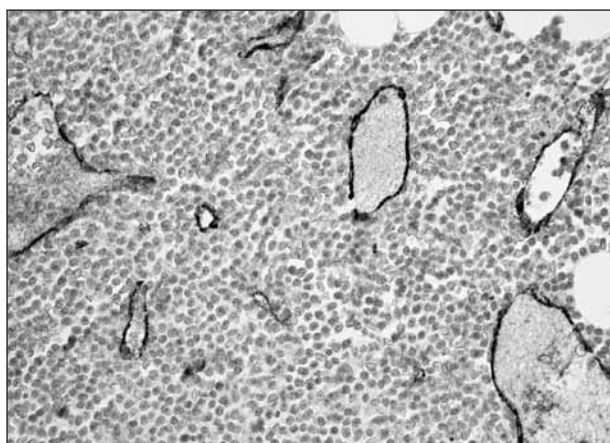


Obr. 3. CLL, MVD „hot-spot“ (cévy označeny šipkou). fVIII, 100krát.



Obr. 4. CLL, sinus a silnostěnná céva. fVIII, 400krát.

v kostní dřeni hodnocena jako mikrovaskulární denzita. Preparáty s imunohistochemickým průkazem fVIII byly nejprve celkově zhodnoceny při přehledném zvětšení 100krát nebo 200krát a pokud možno, byly vybrány tři oblasti s nejvyšším počtem patrných cév, tzv. „hot spots“. V při-



Obr. 5. CLL, MVD, vícečetné cévy. fvIII, 400krát.

padě menšího množství materiálu bylo další vyšetření provedeno na dosažitelném materiálu kontinuálně, bez výběru.

Dále byl při zvětšení 400krát (měřená plocha v jednom zorném poli 0,069 mm²) manuálně označen obvod zastižených cév a vyznačena jejich plocha. Byl zaznamenán:

- počet cév,
- jejich plocha vyjádřená v mm²,
- plocha vyjádřená v procentuálním zastoupení z celkové měřené plochy.

Byly hodnoceny vždy jen cévy, jejichž stěna byla tvořena pouze jednou vrstvou endotelií a neobsahovaly ve stěně hladkou svalovinu. Odděleně byly hodnoceny cévy s průměrem menším než 10 μm a větším než 10 μm. Takto bylo hodnoceno v každém vzorku 9 zorných polí (3 v každém hot spot).

Tab. 1.: Popis sledovaných proměnných

Jsou uváděny medián a minimální a maximální hodnota sledovaných proměnných

	CLL	CON
m:ž	16 : 6	6 : 5
Věk	57 (44-74)	56 (27-77)
K mm	22,4 (1,6-102,6)	9,6 (0-12,8)
K	1,56 (0,1-3,9)	0,7 (0-0,9)
Plocha K	255,4 (47,1-638,6)	152,7 (0-300,0)
% K	0,4 (0,1-4,2)	0,2 (0-0,7)
S mm	11,2 (0-27,3)	11,2 (1,6-25,6)
S	0,8 (0-1,9)	0,8 (0,1-1,8)
Plocha S	1257,8 (0-5608,2)	1755,6 (448,4-9691,1)
% S	0,2 (0-13,0)	0,3 (0,7-0,1)
mastocyty	5 (0-20)	1 (0-4)
VEGF	94,5 (5,5-589,4)	x
b FGF	121,2 (7,5-222,9)	x

K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; plocha K – celková plocha kapilár v 1HPF [μm²]; % K – plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy; Smm – průměrný počet sinusů na 1 mm²; S – průměrný počet sinusů na 1 HPF; plocha S – celková plocha sinusů v 1 HPF [μm²]; % S – plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF; VEGF – plazmatická hladina VEGF [ng/l]; bFGF – plazmatická hladina bFGF [ng/l]; x – nezjištěno

Tabulka 2: Statistické srovnání angiogeneze s ostatními prognostickými markery ve skupině pacientů s CLL

	IgVH (p)	test	genetika (p)	test	st Rai (p)	test	infiltrace (p)	test
K mm	0,4033	MW	0,5315	MW	0,1197	KW	0,8743	KW
K	0,4033	MW	0,5315	MW	0,1197	KW	0,8743	KW
% K	0,1604	KW	0,3577	MW	0,1617	KW	0,6544	KW
plocha K	0,08878	MW	0,3579	MW	0,1446	KW	0,6544	KW
S mm	0,1745	t-test	0,8179	MW	0,5144	KW	0,5325	KW
S	0,1745	t-test	0,8179	MW	0,5144	KW	0,5314	KW
% S	0,3825	t-test	0,3579	MW	0,4148	KW	0,5339	anova
plocha S	0,3922	t-test	0,3579	MW	0,2095	anova	0,5345	anova
mastocyty	0,3822	MW	0,6921	MW	0,7197	KW	0,2699	KW

MW – neparametrický Mann-Whitney test; anova – jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním; KW – neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu; K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; plocha K – celková plocha kapilár v 1HPF [μm²]; % K – plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy; S mm – průměrný počet sinusů na 1 mm²; S – průměrný počet sinusů na 1 HPF; plocha S – celková plocha sinusů v 1 HPF [μm²]; % S – plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF; VEGF – plazmatická hladina VEGF [ng/l]; bFGF – plazmatická hladina bFGF [ng/l]

Statistické zpracování provedla RNDr. Eva Čermáková z Ústavu biofyziky LF UK v Hradci Králové. Ke statistické analýze získaných dat byl použit program NCSS 2004. Byly provedeny

deskriptivní statistické testy. Korelace mezi jednotlivými parametry byly hodnoceny korelačním koeficientem (Spearmanovým). Ke zhodnocení vztahu mezi sledovanými parametry byly použity

Tab. 3.: Porovnání histologických parametrů mezi skupinami pacientů s CLL a CON

Jsou uvedeny parametry, ve kterých byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou CLL a CON. Jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti (p) a použité testy.

	p	test
K mm	0,00002	KW
K	0,00002	KW
masto	0,00001	KW

KW – neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu; K mm – průměrný počet kapilár na 1 mm²; K – průměrný počet kapilár na 1HPF; masto – maximální počet mastocytů na 1 HPF

dvouvýběrový t-test, případně neparametrický Mann-Whitney (MW) test a dále jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním (anova), případně neparametrická Kruskal-Wallisova (KW) analýza rozptylu.

Výsledky

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1–3.

Diskuse

Výsledky této práce navazují na výsledky předchozích prací jiných autorů a rozšiřují je o některé nové údaje. Studie věnující se angiogenezi u hematologických onemocnění jsou často zaměřené jednostranně: sledují buď převážně klinické známky zvýšené angiogeneze – nejčastěji hladiny angiogenních faktorů v krvi, nebo převážně histologický korelát angiogeneze – mikrovaskulární denzitu (MVD) v kostní dřeni či v jiných tkáních. Nedostatkem většiny těchto studií je chybějící propojení těchto dvou oblastí. Ve spolupráci s klinickými lékaři jsme se proto v této studii pokusili o poněkud komplexnější pohled.

U pacientů jsme sledovali histologické i klinické koreláty zvýšené angiogeneze. Na histologické úrovni byla angiogeneze měřena jako MVD, byl sledován počet kapilár na zorné pole při velkém zvětšení, s přepočtem na 1mm² (pro snadnější srovnání s jinými studiemi) a jejich plocha, vyjádřená jednak v μm^2 , jednak v procentuálním poměru z celkové měřené plochy. Současně jsme však sledovali i klinické znaky angiogeneze, reprezentované plazmatickými hladinami angiogenních faktorů VEGF a bFGF.

Kromě toho jsme hodnotili i další faktory hovořící o stavu onemocnění a pacienta, ať už

s uznávanou prognostickou hodnotou (věk, klinické stadium onemocnění, chromozomální odchylky, mutační stav variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů), nebo ty, které se jeví jako nápadné v průběhu zpracování vzorků, a byly proto rovněž zavzaty mezi vyšetřované parametry (sinusy, mastocyty).

Chronická lymfocytární leukémie

CLL patří k velmi častým hematologickým malignitám, do nedávné doby však byla považována za velmi pomalu progredující onemocnění jen s velmi nízkým maligním potenciálem. Pro stanovení diagnózy CLL bylo postačující klinické vyšetření a nález v periferní krvi. V současné době se však s novými poznatky náhled na toto onemocnění změnil. Standardizace vyšetření se stanovováním sérologických hladin výše zmiňovaných látek v krvi, s odběrem trepanobiopsického vzorku kostní dřene a spolu s dalšími vyšetřeními jako je chromosomální a genetické vyšetření a mutační stav IgVH, vedlo k poznání dalších typických znaků CLL. Je patrná snaha o využití těchto nově zjištěných znaků, především jako možných prediktorů průběhu a prognózy tohoto vysoce heterogenního onemocnění.

Doba sledování našich pacientů s CLL byla 12–150 měsíců (medián 36,5; průměr 51,5 měsíce), což je téměř trojnásobně více než v obdobné studii autorů Wolowiec a spol. (12). Během této doby došlo k ověřenému úmrtí 2 pacientů, stav 9 pacientů dosud nevyžadoval žádnou léčbu pro základní diagnózu, 8 pacientů bylo nebo je léčeno a jejich stav je v současnosti stabilizován a 3 pacienti se nedostavili do dispenzáře a byli ztraceni z evidence. Tyto údaje odpovídají údajům o pomalé progresi tohoto onemocnění.

Od sledování angiogeneze se očekává, že by mohla dále doplnit znalosti o tomto onemocnění a popř. se stát dalším prognostickým markerem.

Histologické vyšetření a hodnocení vzorků v naší studii probíhalo zpočátku stejným způsobem jako u MM. Avšak vzhledem k tomu, že při vyšetřování vzorků pacientů s CLL byly často nápadně výrazně dilatované cévy (sinusy), byly i tyto cévy zařazeny mezi hodnocené parametry. Tento způsob hodnocení MVD je poněkud odlišný od způsobu používaného u solidních tumorů, kde jsou hodnoceny vždy pouze cévy menší než 10 μm v průměru. Takto je postupováno na základě zkušeností, že u cév větších bývá zastižena vyvinutá cévní stěna a tudíž již nemohou být hodnoceny jako novotvořené kapiláry.

Postup obdobný jako u solidních tumorů byl jako výchozí použit při hodnocení MVD

u MM. MM se totiž svými vlastnostmi z hematologických malignit poněkud vymyká; v některých oblastech se chová spíše jako solidní tumor. Při hodnocení vzorků typické hematologické malignity jako je CLL se však tento postup ukázal jako nedostačující. Často byly totiž zastiženy velmi objemné cévy, avšak stále se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií.

Na rozdíl od většiny solidních tumorů, ve kterých byla angiogeneze zkoumána, obsahuje normální kostní dřev jen velmi málo cév s plně vyvinutou, několikavrstevnou stěnou. Naopak zde převládají hojně preformované sinusy, se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií, již uzpůsobené k průniku buněk z kostní dřevě do periferní krve. Autoři Molica a spol. (8) ve své studii sice tyto „nápadně dilatované cévy“ popsali, avšak jejich kvantifikací a případným vlivem angiogenních působků na tyto preformované sinusy se dosud, pokud je nám známo, u CLL tito autoři ani nikdo další nezabýval. Naše hypotéza byla, že by nádorové buňky mohly této vlastnosti kostní dřevě využít a místo novotvorby dalších malých cév pouze zvětšovat stávající sinusy nebo zkombinovat oba procesy (novotvorba malých cév a dilatace sinusů). Na základě této hypotézy by se v kostní dřevě u CLL dal očekávat stejný nebo vyšší počet kapilár než v kontrolních vzorcích a obdobný počet, avšak plošně rozsáhlejších sinusů.

Ve vzorcích pacientů s CLL a v kontrolních vzorcích byly tak posléze v každém zorném poli odděleně hodnoceny kapiláry a sinusy (viz výše) – u každé skupiny počet a plocha daných cév.

Průměrný počet kapilár u pacientů s CLL byl v naší studii signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (medián 22 K/mm² u CLL oproti 10 K/mm² v kontrolní skupině; $p = 0,0002$). Nebyl však nalezen statisticky významný rozdíl mezi plochou kapilár (plocha K, % K) ve skupině pacientů s CLL a kontrolní skupinou.

Počet, plocha ani procentuální zastoupení sinusů (S, S mm, plocha S, % S) se statisticky významně nelišila mezi žádnými z hodnocených skupin.

Rovněž nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi počtem, plochou a zastoupením kapilár a sinusů mezi skupinami pacientů s CLL s odlišnými parametry IgVH, genetickým stavem, klinickým stadiem dle Raie a typem nádorové infiltrace kostní dřevě.

Nález vyššího počtu kapilár ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL oproti kontrolní skupině je ve shodě se studií autorů Wolowiec a spol. (12), která rovněž zaznamenala zvýšenou MVD v kostní dřevě u pacientů s CLL.

Z výsledků naší studie je možné usuzovat, že v procesu angiogeneze převládá tvorba mnoha malých cév nad rozšiřováním cév stávajících, byť by byly tenkostěnné. Pro tento závěr svědčí

jednak nezměněný počet a hlavně statisticky nevýznamný rozdíl v ploše mezi sinusy u CLL a kontrolní skupiny a dále také fakt, že přestože se nezměnila plocha zastižených kapilár ve skupině CLL oproti kontrolní skupině, bylo patrné statisticky významné zvýšení počtu těchto kapilár. Tedy kapiláry jsou menší a četnější.

Hodnotili jsme i typ nádorové infiltrace, a to ve třech kategoriích jako intersticiální, fokální a difuzní. U pacientů s CLL nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými kategoriemi podle typu infiltrace. Tento výsledek je odlišný od výše zmiňované studie (12), kde byl průměrný počet kapilár na velké zorné pole signifikantně vyšší u difuzní než u nedifuzní infiltrace kostní dřevě u CLL. Je možné že na této neshodě se podílí rozdělení nádorové infiltrace do tří kategorií (v naší studii), protože jejich studie hodnotila infiltraci pouze ve dvou skupinách, jako difuzní a nedifuzní. V našem souboru bylo i dosti nerovnoměrné zastoupení pacientů v jednotlivých skupinách (5 pacientů s intersticiální, 6 s fokální a 12 s difuzní infiltrací), takže je možné, že jde i o chybu v souboru s malým počtem čísel. Vzhledem k tomu, že podle nových názorů typ infiltrace koreluje s klinickou progresí onemocnění, je nutné považovat naše nálezy za prozatímní a zaměřit se na jejich ověření či upřesnění v rozsáhlejších souborech pacientů.

Ve shodě s výše zmiňovanou studií (12) jsme i my pozorovali, že zatímco u difuzní infiltrace je vaskularizace pravidelná, u nodulární je vyšší na okrajích nádorových uzlů. Nepodařilo se nám prokázat souvislost mezi MVD a v současnosti uznávanými prognostickými markery CLL. Je tedy otázkou rozsáhlejších a dlouhodobějších studií, zda se v budoucnu prokáže nějaký prognostický význam angiogeneze u CLL.

Dalším nápadným znakem ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL byly zmnožené mastocyty. O mastocytech je známo, že mohou být reaktivně zmnoženy u mnoha hematologických onemocnění, např. u útlumu kostní dřevě, anémií, maligních lymfomů i myelodysplastického syndromu. Bývají však zmiňovány i v souvislosti s angiogenezí, jako možní producenti angiogenních faktorů i proteáz, které se podílejí na destrukci stěny původních cév i stromatu. V této souvislosti jsou zmiňovány dva základní typy mastocytů: s převládající sekrecí tryptázy (Mc-t) a s převládající sekrecí chymázy (Mc-c). Pro angiogenezi jsou pokládány za klíčové mastocyty s převažující produkcí tryptázy. Ale práci zabývajících se přesným zařazením mastocytů, které se na tomto procesu podílí, a jejich kvantifikací je velmi málo.

V naší studii dosahovaly ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL maximální hodnoty masto-

cytů na jedno velké zorné pole počtu až 20 (medián 5). Na základě těchto pozorování byly tedy i mastocyty zahrnuty do hodnocených parametrů. Maximální hodnoty ve vzorcích kontrolní skupiny byly 4 mastocyty na velké zorné pole (medián 1).

Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi počtem mastocytů ve skupině pacientů s CLL (medián 5) a kontrolní skupinou (medián 1, $p = 0,00001$).

Tento výsledek by jistě stál za další zkoumání. Obecně je CLL onemocněním, kde jsou v kostní dřeni mastocyty častým nálezem. Další studie by se tedy mohly věnovat významu mastocytů u CLL.

Nebyly však nalezeny žádné významné korelace mezi počtem mastocytů, MVD a klinickými parametry (VEGF, bFGF, věk).

Vzhledem k tomu, že byl prováděn pouze prostý součet všech zastižených mastocytů a přitom v literatuře jsou v souvislosti s angiogenezí zmiňovány hlavně MC-t, bylo by jistě také vhodné ověřit, jaké enzymy převažovaly v zastižených mastocytech v našem souboru a zda by se potom údaje o počtu mastocytů v souvislosti s ostatními známkami angiogeneze nezměnily. Přestože se tedy v našem souboru nepodařilo prokázat výraznou souvislost počtu mastocytů s angiogenezí, nápadně zvýšený počet těchto buněk se jeví jako inspirace pro další studium.

Naměřené plazmatické hodnoty angiogenních faktorů u pacientů s CLL byly u VEGF v rozmezí 5,5–589,4 ng/l (medián 94,5 ng/l) a u bFGF 7,5–222,9 ng/l (medián 121,2 ng/l).

Neměřili jsme hladiny angiogenních faktorů u kontrolní skupiny, neboť bylo již opakovaně prokázáno, že tyto jsou u pacientů s CLL zvýšené oproti normálu (1). Nás zajímala spíše korelace s histologickými znaky angiogeneze a s dalšími prognostickými markery, neboť v této oblasti je dosud málo známých informací a nejsou jednoznačné.

V naší studii nebyla patrná korelace mezi hladinami angiogenních faktorů a dalšími sledovanými prognostickými markery.

I v dalších studiích jsou dosud korelace pouze vágní. Zatím se zdá, že hladiny VEGF by mohly dodat prognostický význam u časných stadií CLL, kdy u pacientů ve stadiu Rai I-II s vyššími hladinami VEGF byl zaznamenán kratší čas do progresu. Naše studie je dosud malá, s malým počtem zachycených nádorových progresí, ale očekáváme, že s časovým odstupem bude možné některé proměnné znovu zhodnotit z dlouhodobého hlediska.

Celkově nebyly patrné žádné významnější korelace mezi sledovanými proměnnými. Korelační koeficient mezi sledovanými histologickými (mikrovaskulární denzitou v kostní dře-

ni ať už měřenou jako počet kapilár nebo sinusů) a klinickými parametry angiogeneze (hladinami VEGF a bFGF v krvi) byl velmi nízký. Rovněž nebyla patrná žádná významnější korelace mezi MVD a hladinami β 2-mikroglobulinu a věkem. Tento nález je ve shodě se studií autorů Molica a spol. (7), kteří rovněž nezastihli korelace mezi VEGF a ostatními klinicko-biologickými parametry (absolutní lymfocytóza v periferní krvi, β 2-mikroglobulin, histologie kostní dřene, IL-6) nebo progresí onemocnění (LDT).

Porovnávali jsme histologické parametry (MVD a počet mastocytů) s prognostickými markery, a to histologickými i klinickými. Neprokázali jsme signifikantní rozdíl v histologických parametrech angiogeneze a počtu mastocytů při srovnání s mutačním stavem IgVH, genetickým vyšetřením FISH, stadiem dle Raie a typem infiltrace.

Tato práce byla částečně podpořena granty NR/8076-3 a NR/8373-3 IGA, MZ České republiky a výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR

Literatura

1. **Bairey, O., Zimra, Y., Shaklai, M., Rabizadeh, E.:** Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 113, 2001, s. 400–406.
2. **Byrd, J.C., Waselenko, J.K., Keating, M. et al.:** Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia in the 21st century. *Seminars in Oncology*, 5, 2000, s. 587–597.
3. **Chen, H., Treweeke, A.T., West, D.C. et al.:** In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 96, 2000, s. 3181–3187.
4. **Kay, N.E., Jelinek, D.F., Peterson, L.:** Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 25, 2001, s. 709–710.
5. **Korkolopoulou, P., Gribabis, D.A., Kavantzias, N. et al.:** A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Brit. J. Haematol.*, 122, 2003, s. 900–910.
6. **Koster, A., Van Krieken, H.J.M., MacKenzie, M.A. et al.:** Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 11, 2005, s. 154–161.
7. **Molica, S., Vitelli, G., Levato, D. et al.:** Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 107, 1999, s. 605–610.
8. **Molica, S., Vacca, A., Levato, D. et al.:** Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 28, 2004, s. 321–324.
9. **Molica, S., Vacca, A., Tucc, L., Ribatti, D.:** Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia following fludarabine therapy. *Haematologica*, 90, 2005, s. 698–700.

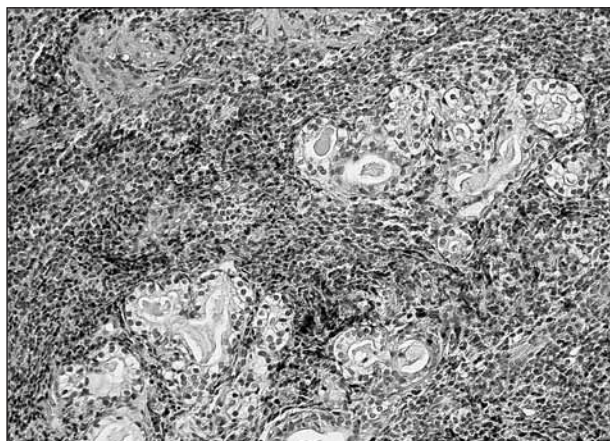
10. **Molica, S., Vitelli, G., Levato, D. et al.:** Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *Eur. J. Haematol.*, 73, 2004, s. 36–42.
11. **Molica, S., Vacca, A., Ribatti, D. et al.:** Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100, 2002, s. 3344–3351.
12. **Wolowiec, D., Wozniak, Z., Potoczek, S. et al.:** Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic

lymphocytic leukemia. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 26, 2004, s. 263–270.

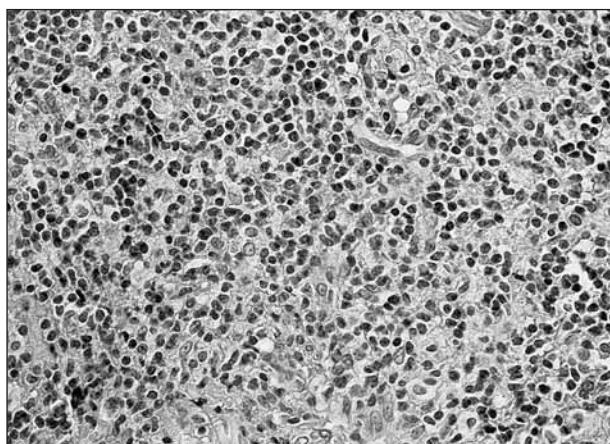
MUDr. Petra Kašparová, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
Tel.: 495 832 287
e-mail: benespet@seznam.cz

JAKÁ JE VAŠE DIAGNÓZA?

Pacientka (17 let) si asi rok stěžovala na chronickou rýmu, pro kterou byla vyšetřena na ORL oddělení. V dutině nosní byly zjištěny polypoidní



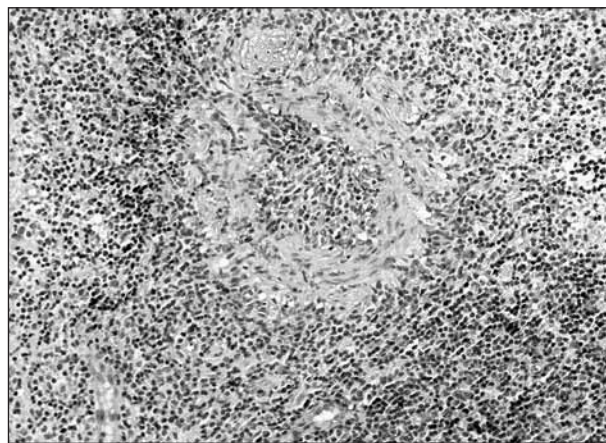
Obr. 1.



Obr. 2.

tumorózní hmoty. K histologickému vyšetření byly zaslány fragmenty tkáně do průměru 10 mm. **Mikroskopicky** se jednalo o difúzně uspořádanou lymfoidní tkáň, ve které byly přítomny ojedinělé zachovalé žlázy a na části povrchu byl respirační epitel. Některé ze zavzatých žlázek vykazovaly světlobuněčné změny (obr. 1). Lymfoidní elementy byly převážně drobné až střední velikosti (obr. 2). Jejich jádra byla nepravidelná (i protažená), s denzním chromatinem či světlejší s patrnými jadérky; zřetelná byla i mitotická aktivita. Ložiskově byl zastížen angiocentrický a angiodestruktivní růst těchto buněk (obr. 3). Povrchový epitel ani žlázy nebyly infiltrovány. V rozsahu vyšetřeného materiálu jsme nenašli nekrózy ani ulcerace.

Odpověď na str. 73



Obr. 3.