

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION IN ADULT NEWLY DIAGNOSED NON-HODGKINS'S LYMPHOMA PATIENTS

Sheniz Yuzeir

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, shenizyuzeir@abv.bg

Nadezhda Stefanova

Department of Pathology, Medical University in Varna, Bulgaria, nadezhda_stefanova@yahoo.com

Ilina Micheva

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, ilinamicheva@gmail.com

Abstract: Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is a highly heterogeneous group of lymphoproliferative malignancies characterized by clonal abnormal proliferation and/or accumulation of B or T lymphocytes. Angiogenesis is a crucial process in the growth, development, and metastasis of many tumor types, including NHL. VEGF is an important proangiogenic factor in many malignancies. The prognostic role of angiogenic factors in lymphomas is still debatable because of the heterogeneity of the nosological unit, the presence of different classification systems and methods of analysis.

Aims: We aimed to investigate vascular endothelial growth factor expression in newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients and their relationship with clinicopathological characteristics and prognostic parameters. **Methods:** VEGF expression was detected by immunohistochemistry in 60 patients with pathologically verified NHL before chemotherapy, and in 20 healthy controls.

Results: A total of 60 patients with NHL, 32 men and 28 women. 24 were with Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), 8 with Mantel cell lymphoma (MCL), 2 with Peripheral T-cell lymphoma (PTCL), 9 with Marginal zone lymphoma (MZL), 10 with Follicular lymphoma (FL), 1 patient with Plasmablastic lymphoma (PBL) and 6 with Small-cell lymphoma (SCL). There was significant differences in the expression of VEGF between NHL patients and controls ($p < 0.001$). VEGF expression were significantly different in the group of patients with indolent NHL compared with the group of patients with aggressive NHL (respectively $p = 0.016$). Also, VEGF expression was elevated in the group of patients with high level LDH ($p = 0.015$) compared with the group of patients with a normal level. No correlation was found with hemoglobin, leukocyte count, platelet count, B symptoms and β_2 -microglobulin. Multivariate analysis showed a significant difference between the two study groups in terms of IPI ($p = 0.005$), with a moderate correlation between the type of lymphoma and the risk profile of patients ($r = 0.399$; $p = 0.002$). In the group of patients with intermediate and high IPI risk and high VEGF expression have an unfavorable prognosis and short overall survival.

Conclusion: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a vital role in the development and progression of Non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Our data suggest that overexpression of VEGF in lymphoma tissue represents a promising potential prognostic factor in NHL.

Keywords: VEGF, aggressive and indolent Non-Hodgkin's lymphoma

ВИСОКИ НИВА НА VEGF ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С НЕХОЧКИНОВИ ЛИМФОМИ

Шениз Юзеир

Клиника по Хематология, УМБАЛ "Света Марина", Медицински университет, Варна, България, shenizyuzeir@abv.bg

Надежда Стефанова

Катедра по Обща и клинична патология, УМБАЛ "Света Марина", Медицински университет, Варна, България, nadezhda_stefanova@yahoo.com

Илина Мичева

Клиника по Хематология, УМБАЛ "Света Марина", Медицински университет, Варна, България, ilinamicheva@gmail.com

Резюме: Нехочкиновите лимфоми (НХЛ) са хетерогенна група лимфопролиферативни заболявания, характеризирани се с абнормна пролиферация или акумулация на В и Т лимфоцити. Ангиогенезата е решаващ процес в туморния растеж, развитието и процесите на метастазиране при много малигнени

заболявания, включително НХЛ. VEGF е един от проангиогенните фактори, който играе важна роля в ангиогенезата при много злокачествени заболявания. Прогностичното значение на ангиогенните фактори при НХЛ е все още дискусативно, поради хетерогенността на нозологичната група, наличието на различни класификационни системи и методи за анализ.

Цел на изследването: да се изследва нивото на експресия на VEGF при новодиагностицирани пациенти с агресивни и индолентни НХЛ и да се потърси връзката с клинично-патологичните характеристики и прогностични параметри.

Методи: Чрез имунохистохимична реакция е определена степента на експресия на VEGF, като маркер на костно-мозъчната ангиогенеза при 60 пациенти с хистологично верифицирани НХЛ преди химиотерапевтично лечение и при 20 здрави контроли.

Резултати: От общо изследваните 60 пациенти с НХЛ, 32 са мъже и 28 жени. Разпределението според вида на лимфома е както следва: 24 са с Дифузен В-едроклетъчен НХЛ, 8 с Мантиноклетъчен НХЛ, 2 пациенти с Периферен Т-клетъчен НХЛ, 9 с Маргинално зонови НХЛ, 10 с Фоликуларен НХЛ, 1 пациент с Плазмобластен и 6 с Дребноклетъчни НХЛ. Установихме статистически значима корелационна зависимост между групата пациенти с НХЛ и групата от здравите контроли ($p < 0.001$). В групата пациенти с индолентни НХЛ се регистрира два пъти по-високи нива на VEGF в сравнение с групата на агресивните НХЛ ($p = 0.016$). Значима сигнификантна зависимост се установява и в групата пациенти с високи стойности на ЛДХ ($p = 0.015$), в сравнение с контролната група. Не се намери връзка между VEGF и хемоглобин, левкоцити, тромбоцити, бета2 микроглобулин и В симптоми. Мултивариационният анализ доказва съществена разлика между двете изследвани групи по отношение на IPI ($p = 0.005$), като се установи умерена корелация между вида на лимфома и рисковия профил на пациентите ($r = 0.399$; $p = 0.002$). Пациентите с НХЛ с интермедиерен и висок риск и повишени нива на VEGF имат неблагоприятна прогноза и кратка обща преживяемост. Заключение: VEGF играе жизненоважна роля в развитието и прогресията на Неходжкиновите лимфоми. Основавайки се на получените резултати нашата хипотеза е, че свръхекспресията на VEGF представлява обещаващ потенциален прогностичен фактор при НХЛ.

Ключови думи: VEGF, агресивни и индолентни Неходжкинови лимфоми

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Ангиогенезата е решаващ процес в туморния растеж, развитието и процесите на метастазиране при много малигнени заболявания, включително НХЛ (Jain et al, 2002). Тя е основен процес във всеки етап от развитието и прогресията на малигнени тумори, допринасяйки за трансформиране на карциномите от „спящи“ *in situ* лезии към животозастрашаваща метастатична болест (неоангиогенеза) (Byrne et al, 2000). Съдов ендотелният растежен фактор (VEGF) и неговият рецептор VEGF рецептор 2 (VEGFR 2) играят ключова роля в предаването на проангиогенни сигнали в хода на неоангиогенеза при много злокачествени заболявания (Ito et al, 2002; Ferrara, 2002). VEGF съществува в няколко структурно свързани форми, които се обединяват в едно семейство: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарен растежен фактор (PlGF) (Ferrara et al, 2003). Главен медиатор на туморната неоангиогенеза е VEGF-A или само VEGF (Podar et al, 2001). Семейството на VEGF провежда ангиогенни сигнали чрез тирозинкиназни рецептори (VEGFR 1 и 2) и играе първостепенна роля в регулирането на неоангиогенезата във физиологични и патологични условия като ефектите, които медира, са предимно проангиогенни. (Jain et al, 2002). Прогностичното значение на ангиогенните фактори при НХЛ е все още дискусативно, поради хетерогенността на нозологичната група, наличието на различни класификационни системи и методи за анализ.

VEGF играе важна роля в патогенезата на НХЛ чрез два основни механизма на действие. Първият механизъм е експресията от лимфомните клетки на VEGF и VEGF рецептори (VEGFR) чрез автокринна стимулация. Dias и сътрудници установяват, че *in vivo* и *in vitro* лимфомните клетки произвеждат не само VEGF, но също така експресират функционален VEGFR-2 рецептор. Това води до генериране на автокринна бримка и стимулира пролиферацията на туморните клетки (Dias et al, 2000). Вторият механизъм се характеризира с паракринно влияние на други растежни фактори върху експресията на VEGF (Ruan et al, 2009). В това проучване нашата цел е да оценим степента на експресия на VEGF при новодиагностицирани пациенти с индолентни и агресивни НХЛ и да се потърси връзка с клинично-патологичните характеристики и прогностичните параметри.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пациентска популация: В проучването са включени общо 60 новодиагностицирани пациенти с хистологично верифицирана диагноза Неходжкинови лимфоми, съобразно патолого-анатомичните критерии за поставяне на диагнозата. В изследването са включени и 20 здрави индивиди, служещи за контроли.

Методи: Костно-мозъчно изследване при всички пациенти с НХЛ (n=60) и здрави контроли (n=20) бе извършено еднократно. Биопсичните материали (фиксираны в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5 микрона и поставени върху силанизирани стъкла. Депарафинизацията се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylol 3 x 10 мин. Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност, както при депарафинизацията, поставяне в монтираща среда. Имунохистохимичната експресия на моноклонално антитялото за VEGF-clone VG1, Dako бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните проби. Първо, за всяка клетка в различни полета бе определяна мембранната и цитоплазматична интензивност (0, 1+, 2+, или 3+). Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет бе пресметнат, като накрая H-score бе изчислен посредством следната формула: $[1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+)]$, в диапазон от 0 до 300.

Статистически анализ: Всичките данни са анализирани чрез статистически метод SPSS v. 20.0, като са използвани, дисперсионен, вариационен, сравнителен и корелационен анализи. За ниво на значимост приемаме $p < 0.05$.

3. РЕЗУЛТАТИ

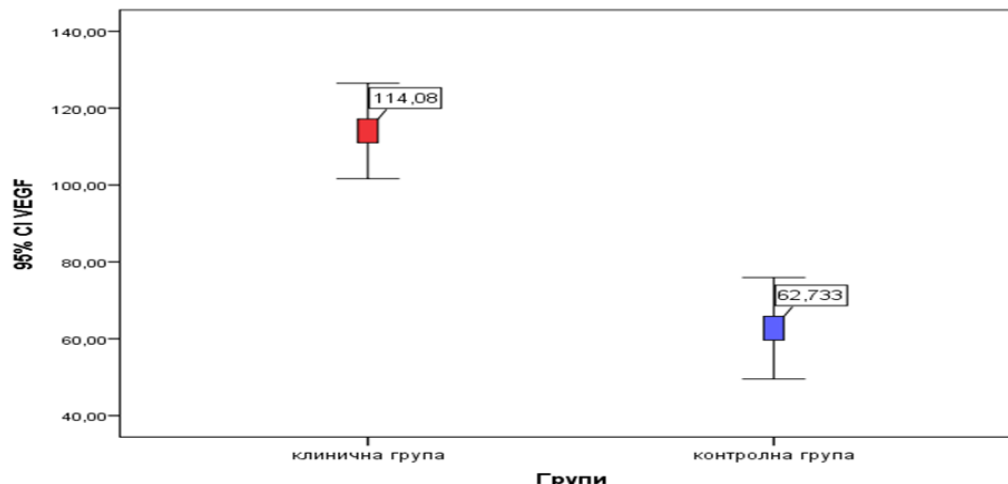
Пациентската популация е със съотношение мъже: жени 32/28, със средна възраст 59,1 г. (39-79), като 35 от пациентите са с агресивни НХЛ, а 25 с индолентни лимфоми. Не се наблюдава сигнификантна разлика във възрастовите групи между изследваните пациенти и здравите контроли. Основните характеристики на пациентите с НХЛ са посочени в таблица 1. При анализ на данните се установяват високи нива на VEGF при новодиагностицираните пациенти с НХЛ в сравнение с контролната група ($p < 0.001$) (Фигура 1). Също така съществена разлика се регистрира между двете групи агресивни и индолентни НХЛ, като статистическият анализ показва два пъти по-високи нива на VEGF при индолентните лимфоми. По отношение на постигнат терапевтичен отговор не се установява значима статистическа разлика. В проучването използваните химиотерапевтични режими са предимно ритуксимаб- базирани (R-CHOP) и антрациклин- базирани режими (CHOP), като прави впечатление, че 30 пациенти са постигнали пълен отговор, 6 частичен отговор, 10 са прогресирали и при 5 от тях е регистриран летален изход.

Таблица 1. Характеристика на пациентите с индолентни и агресивни НХЛ според демографски, клиничко-лабораторни показатели и терапевтичен отговор.

Показател		Идолентни лимфоми Брой / %	Агресивни лимфоми Брой / %	P-value
Пол	Мъж	11/ 44.0 %	21/ 60.0 %	0.168
	Жена	14/ 56.0 %	14/ 40.0 %	
Възраст	mean±SD (range)	61.6 ± 11.4 (39-79)	59.4±13.9 (28-88)	0.506
Стадий	I	3/ 12.0 %	2/ 5.7 %	0.237
	II	4/ 16.0 %	4/ 11.4 %	
	III	2/ 8.0 %	10/ 28.6 %	
	IV	16/ 64.0 %	19/ 54.3 %	
IPI риск	Нисък	11/ 44.0 %	3/ 8.6 %	0.005
	Интермедиерен	7/ 28.0 %	12/ 34.3 %	
	Висок	7/ 28.0 %	20/ 57.1 %	
В симптоми	ДА	8/ 32.0 %	16/ 45.7 %	0.212
	НЕ	17/ 68.0 %	19/ 54.3 %	
Хемоглобин g/L	mean±SD (range)	116.6 ± 28.5 (43-161)	116.4 ± 19.3 (62-151)	0.969
Левкоцити (x10 ⁹ /L)	mean±SD (range)	11.6 ± 10.9 (2.64-41.54)	11.7 ± 17.8 (2.01-82.81)	0.969
Тромбоцити (x10 ⁹ /L)	mean±SD (range)	195.8±92.1 (72-479)	264.2±193.9 (62-1117)	0.108
ЛДХ (U/L)	mean±SD (range)	492.6±292.5 (143-1352)	848.4±1289.8 (289-5935)	< 0.05
Бета 2 микроглобулин (mg/l)	mean±SD (range)	4.14±1.98 (1.7-8.2)	3.79±2.12 (1.6-8.5)	0.524
VEGF %	mean±SD (range)	121.83±50.2 (40.0-260.0)	96.33±45.14 (30.0-200.0)	< 0.001
Терапевтичен отговор	Пълен отговор	12/ 48.0 %	18/ 51.4 %	0.094
	Частичен отговор	2/ 8.0 %	4/ 11.4 %	
	Проследяване	4/ 16.0 %	1/ 2.9 %	
	Прогресия	3/ 12.0 %	7/ 20.0 %	
	Стабилна болест	3/ 12.0 %	1/ 2.9 %	
	Починал	2/ 8.0 %	3/ 8.6 %	

При анализ на нивото на VEGF и останалите изследвани параметри, като стадий на заболяването, В симптоми, бета2-микроглобулин, стойности на хемоглобин, левкоцити и тромбоцити не се установява статистически значима връзка (Таблица 1).

Фигура 1. Сравнителен анализ на средните стойности на VEGF% при пациенти с НХЛ и здрави контроли.



Статистическата обработка на данните показва значима позитивна корелационна зависимост между изследваните нива на VEGF и прогностичния риск IPI ($p\text{-value} < 0.005$), както и със стойностите на ЛДХ ($p\text{-value} < 0.05$) (Таблица 1). Сравнителният анализ според IPI- риска установява сигнификантна разлика между групите пациенти с интермедиерен и висок риск и вида на лимфома, както и умерена зависимост между изследваните показатели ($r=0.399$; $p=0.008$). Установи се зависимост между IPI и типа на лимфома ($r=-0.352$; $p=0.001$). При 57,1% от пациентите с агресивни лимфоми се отчете висок прогностичен риск спрямо IPI, за разлика от тези с индолентни НХЛ, които в преобладаващата си част са с нисък риск (44.0 %) ($p=0.003$). В нашето проучване установихме, че пациентите с индолентни НХЛ имат над два пъти по-висок риск от костно-мозъчно ангажиране и висока експресия на VEGF, в сравнение с агресивните НХЛ {OR=2.25 (0.801-6.321)}.

4. ОБСЪЖДАНЕ

Нехочкиновите лимфоми (НХЛ) са хетерогенна група лимфопролиферативни заболявания, характеризиращи се с абнормна пролиферация или акумулация на В и Т лимфоцити (Swerdlow et al, 2008). VEGF играе неизменна роля в развитието и прогресията на Нехочкиновите лимфоми. Първо, VEGF може да стимулира ангиогенезата и лимфомагенезата и да увеличи съдовата пропускливост, което е свързано с негативно въздействие върху процесите на метастазиране (Rujirojindakul et al, 2012). Второ, VEGF индуцира активиране на антиапоптотични гени, включително bcl-2, които предпазват туморните клетки от апоптоза (Hajitou et al, 2002). Трето, VEGF въздейства върху хемопоезата чрез блокиране процесите на диференциация на множество хемопоеични клетъчни линии и инхибира матurationта и диференциацията на дендритните клетки чрез намаляване на активирането на NF- κ B (Gerber et al, 2002). Настоящите резултати показват значително високи нива на VEGF при пациенти с НХЛ в сравнение с контролна група, като подобни резултати са докладвани и от други изследователски групи (Jørgensen et al, 2009). Установихме статистическа разлика в нивата на VEGF според типа на лимфома, като по-високи стойности се наблюдаваха при пациентите с индолентни НХЛ. Сходни резултати са представени и в литературата, където подобно на нашия анализ се установява съществена разлика в степента на експресия на VEGF при двете групи НХЛ, като по-високи нива са регистрирани при индолентни лимфоми (Ozbudak et al, 2011). В проспективното ни проучване VEGF не показва значима връзка с анализирания клинично-биологични параметри, като възраст, пол, наличие на В симптоми, стадий на заболяването, кръвни показатели и β 2-микроглобулин, с изключение на биологичните прогностични фактори като LDH и IPI- риска. В нашият анализ установихме по-висока експресия на VEGF при пациенти с доказана прогресия на заболяването, в сравнение с тези болни постигнали пълен отговор. Подобни резултати са предствени и в проучването на Bertolini, където са

установени високи нива на VEGF при пациенти с регистрирана прогресия на лимфома, в сравнение с тези болни, постигнали пълна ремисия (Bertolini et al, 1999). Според литературни данни високата експресия на VEGF се свързва с лоша прогноза и кратка обща преживяемост при пациентите с НХЛ (Ganjoo et al, 2008; Jørgensen et al, 2009; Salven et al, 2000). Прави впечатление, че пет от изследваните пациенти с НХЛ с висок риск и високи нива на VEGF са починали по време на проследяването, което корелира с негативното въздействие на този растежен фактор върху прогнозата и общата преживяемост. Въз основа на получените резултати можем да обобщим, че експресията на VEGF, като основен маркер за определяне степента на костно-мозъчна ангиогенеза е паралелно свързан процес с клетъчните особености, пролиферативната активност и начина на разпространение на различните видове НХЛ.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

VEGF играе жизненоважна роля в развитието и прогресията на Неходжкиновите лимфоми. Основавайки се на получените резултати нашата хипотеза е, че свръхекспресията на VEGF представлява обещаващ потенциален прогностичен фактор при НХЛ.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Bertolini, F., Paolucci, M., Peccatori, F., Cinieri, S., Agazzi, A., & Ferrucci, P.F. (1999). Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 106:504-509.
- Byrne, G.J., & Bundred, N.J. (2000). Surrogate markers of tumoral angiogenesis. *Int J Biol Markers*, 15:334-339.
- Dias, S., Hattori, K., Zhu, Z., Heissig, B., Choy, M., & Lane, W. (2000). Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest.*; 106: 511-521.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*; 9:669-676.
- Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*, 29:10-14.
- Ganjoo, K.N., Moore, A.M., Orazi, A., Sen, J.A., Johnson, C.S., & An, C.S. (2008). The importance of angiogenesis markers in the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study of 97 patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134:381-387.
- Gerber, H.P., Malik, A. K., & Solar, G. P. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*; 417(6892):954-958. doi: 10.1038/nature00821. Hajitou
- Grignet, C., & Devy, L. (2002). The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *The FASEB Journal.*; 16(13):1802-1804.
- Ito, H., Oshita, F., Kameda, Y., Suzuki, R., Ikehara, M., & Arai, H. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small adenocarcinomas. *Oncol Rep*, 9:119-123.
- Jain, R.K. (2002). Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*, 29:3-9.
- Jørgensen, J.M., Sørensen, F.B., Bendix, K., Nielsen, J.L., Funder, A., & Karkkainen, M.J. (2009). Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 50:1647-1660.
- Ozbudak, I.H., Akkaya, B., & Karpuzoğlu, G. (2011). Vascular endothelial growth factor expression in low and high grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Turk Patoloji Derg* ;27(3):204-9. doi: 10.5146/tjpath.2011.01076.
- Podar, K., Tai, Y.T., & Davies, F.E. (2001). Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*; 98:428-435. Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard, J.P. (2009). Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*; 20:413-424.
- Rujirojindakul, P., & Lekhakula, A. (2012). Prognostic significance of serum proangiogenic molecules in patients with de novo non-hodgkin lymphomas. *The Scientific World Journal.*; 2012:5. doi: 10.1100/2012/215231.2152
- Salven, P., Orpana, A., Teerenhovi, L., & Joensuu, H. (2000). Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood*, 96:3712-3718.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., & Stein, H. (2008). World Health Organization (WHO) Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed., Lyon, IARC Press.