

Artur JURCZYSZYN
Teresa WOLSKA-SMOLEŃ
Aleksander B. SKOTNICKI

Szpiczak mnogi – rola angiogenezy i zastosowanie talidomidu

Multiple myeloma – the role of angiogenesis and therapeutic application of thalidomide

Katedra i Klinika Hematologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik:
Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

Dodatkowe słowa kluczowe:

szpiczak mnogi
angiogeneza
VEGF
b-FGF
IL-6
talidomid

Additional key words:

multiple myeloma
angiogenesis
VEGF
b-FGF
IL-6
thalidomide

Artykuł zawiera dane dotyczące biologii, epidemiologii i kliniki szpiczaka mnogiego oraz roli cytokin proangiogenicznych w rozwoju tego nowotworu. Angiogeneza w transformacji oraz rozwoju MM jest aktualnie gorącym tematem, którym zajmują się badacze w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Stężenia czynników proangiogenicznych: VEGF, b-FGF, IL-6, sIL-6R, HGF w surowicy krwi oraz szpiku kostnym są znacznie podwyższone u chorych z MM, w porównaniu do osób zdrowych; ich wartości korelują z ciężkością choroby i uznawane są obecnie za czynniki rokownicze w progresji choroby. W poszukiwaniu skutecznej terapii w MM stwierdzono, że talidomid - lek o właściwościach przeciwpalniczych i immunomodulujących ma również działanie hamujące angiogenezę, jednakowoż dokładny mechanizm działania wciąż do końca nie został poznany. Lek ten jest aktualnie wykorzystywany do leczenia pacjentów z oporną i nawrotową postacią MM; efekty jego działania wydają się bardzo obiecujące dla chorych.

This article contains biological, epidemiological and clinical data on multiple myeloma and the role of proangiogenic cytokines in the development of this neoplasm. The role of angiogenesis in the transformation and development of multiple myeloma is a topic which is presently readily studied in leading scientific centres in many parts of the world. Serum and bone marrow levels of cytokines such as VEGF, b-FGF, IL-6, sIL-6R, HGF are raised in patients with multiple myeloma as compared to healthy subjects; their values correlate with the severity of disease and are presently recognised as prognostic factors. Thalidomide has anti-inflammatory, immunomodulating and antiangiogenic properties but the mechanism of its action is not yet completely understood. Thalidomide is presently used in therapy of patients with resistant and relapsed multiple myeloma with very promising results.

Wstęp

Szpiczak mnogi (MM) jest złośliwą, nieuleczalną chorobą nowotworową, której istotą jest powolny rozrost monoklonalnych plazmacytów lub plazmoblastów w szpiku kostnym. Rzadziej, możliwe jest również pozaszpikowe naciekanie różnych tkanek i narządów. Nowotworowe plazmocyty wytwarzają nadmierne ilości monoklonalnego białka (białko M) o charakterze immunoglobuliny (IgG, IgA, IgD), stwierdzanego w surowicy krwi lub wydalanego z moczem (łańcuchy lekkie immunoglobulin – tak zwane białko *Bence-Jonesa*). W nielicznych przypadkach choroba może przebiegać jako odosobniony guz szpiczakowy (*plasmocytoma solitaria*) lub jako postać uogólniona, zwana białczą plazmocytową. W około 1% przypadków nie stwierdza się w surowicy krwi obecności białka M (szpiczak niewydzielający).

Epidemiologia i etiopatogeneza szpiczaka mnogiego

Zapadalność na szpiczaka mnogiego wynosi od 3 do 9 przypadków na 100 000 ludności na rok i różni się nieco pomiędzy

poszczególnymi obszarami geograficznymi: od <1 w Chinach, do około 9 na zachodzie USA (częściej wśród murzynów amerykańskich) [60,66]. MM stanowi od około 1 do 2% wszystkich nowotworów w hematologii i jest odpowiedzialny za blisko 20% zgonów z powodu nowotworów hematologicznych. Każdego roku w Europie diagnozowana MM dotyka 3-4 osób na każde 100 tysięcy ludności, zaś w USA corocznie diagnozowanych jest 14 400 nowych przypadków z MM, wśród których 11 200 kończy się zgonem. Wśród chorych stwierdza się niewielką przewagę mężczyzn (stosunek ilościowy mężczyźni/kobiety wynosi około 3:2), a częstość zachorowania wzrasta z wiekiem – najwięcej nowych przypadków odnotowuje się między 50 a 70 rokiem życia. Przyczyny choroby pozostają wciąż nieznanymi. Bierze się pod uwagę bliżej jeszcze nie zbadane czynniki genetyczne, a wzrastająca w ostatnim okresie zapadalność wśród osób poniżej 55 roku życia sugeruje oddziaływanie w ostatnich 60 latach czynników środowiskowych [66]. Od kilku lat postuluje się również współdziałanie niektórych wirusów w patogenezie choroby. Stwierdzono między

Adres do korespondencji:

Dr Artur Jurczyszyn
Katedra i Klinika Hematologii CM UJ
31-501 Kraków, ul. Kopernika 17
Tel./Fax: (+12) 421 36 93
e-mail: mmjurczy@cyf-kr.edu.pl

innymi występowanie wirusa typu herpes (*Human Herpesvirus 8* – HHV-8) w komórkach dendrytycznych szpiku kostnego chorych [4,9,58]. Wcześniejsze obserwacje oparte na sero-epidemiologii i badaniach metodami polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) sugerowały udział tego wirusa w patogenezie mięsaka *Kaposiego*, choroby *Castleman'a* i niektórych chłoniaków [9]. Genom HHV-8 zawiera wirusowy analog ludzkiego genu dla interleukiny 6. Sekwencja aminokwasowa wirusowej interleukiny 6 jest w 24,7% identyczna z jej ludzkim odpowiednikiem, a rola interleukiny 6, czynnika wzrostu i różnicowania limfocytów B, w etiopatogenezie chorób rozrostowych z komórek B jest dobrze udokumentowana [4]. Wiadomo również, że HHV-8 stymuluje receptor dla IL-8 może promować zjawisko angiogenezy, będąc w ten sposób swoistym czynnikiem wyzwalającym (ang. *triggering factor*) w patogenezie szpiczaka mnogiego.

Postacie kliniczne szpiczaka mnogiego

Szpiczak mnogi może przebiegać pod kilkoma różnymi postaciami klinicznymi:

1. Zespół MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*) – stan, w którym stwierdzamy obecność białka monoklonalnego (w postaci charakterystycznego piku w elektroforezie) lecz brak jest innych objawów szpiczaka czy chorób mogących być przyczyną gammopatii monoklonalnej (np. chorób autoimmunologicznych, infekcji, itp). Fenotyp plazmocytów jest w MGUS pośredni pomiędzy fenotypem prawidłowych plazmocytów i plazmocytów szpiczakowych [56]. MGUS może pozostawać przez wiele lat w fazie stabilnej, a stężenie białka nie narastać. Stwierdzono, że jeżeli stężenie białka monoklonalnego nie wzrasta przez dwa lata, prawdopodobieństwo transformacji MGUS do aktywnej postaci szpiczaka plazmocytowego w ciągu dziesięciu lat waha się od dwudziestu do trzydziestu procent [39].

2. W części przypadków MGUS z czasem wzrasta stężenie białka monoklonalnego, osiągając wartości jak w aktywnej postaci choroby, brak jest jednak nadal innych jej objawów – jest to „tłący się” szpiczak plazmocytowy (ang. *smouldering multiple myeloma*) [39].

3. Mało agresywny szpiczak plazmocytowy (lub szpiczak plazmocytowy o powolnym przebiegu – ang. *indolent myeloma*) jest stanem, w którym są już obecne niektóre ewidentne objawy choroby (na przykład destrukcja kości), ale pojawiają się one stopniowo i postępują bardzo wolno [38].

4. Aktywny szpiczak mnogi, w którym występują typowe objawy choroby. Dalszy przebieg choroby zależy już od zastosowanego leczenia i odpowiedzi na terapię.

5. Białaczka plazmocytowa (ang. *plasma cell leukemia* – PCL) jest najczęściej końcowym stadium progresji szpiczaka plazmocytowego, choć zdarzają się postacie diagnozowane *de novo*. W PCL odsetek plazmocytów we krwi obwodowej przekracza

20% (w liczbach bezwzględnych ponad $2 \times 10^9/L$ plazmocytów).

Mechanizmy regulujące poszczególne etapy przemian nie są znane, zauważono jednak, że towarzyszy im wzrost gęstości naczyń krwionośnych w szpiku kostnym. Oceny tego zjawiska dokonano można znając materiał uzyskany drogą biopsji szpiku przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko antygenom obecnym na powierzchni komórek śródbłonna – CD34 i CD31. Gęstość naczyń w szpiku określana jest tzw. wskaźnikiem gęstości naczyń (MVD – *microvascular density*). W aktywnej postaci szpiczaka wskaźnik MVD był 5-6 krotnie większy niż w MGUS i nieaktywnym szpiczaku [74]. Stąd wysuwany przez niektórych badaczy wniosek, że MGUS i nieaktywne postacie choroby reprezentują jej przewaskularne formy, a aktywny szpiczak – formę waskularną [42,59,72,74] (rycina 1).

Rola angiogenezy i waskulogenezy w procesach fizjologicznych i patologicznych

Angiogeneza odgrywa bardzo istotną rolę w rozwoju szpiczaka mnogiego [42,47,59,74,75].

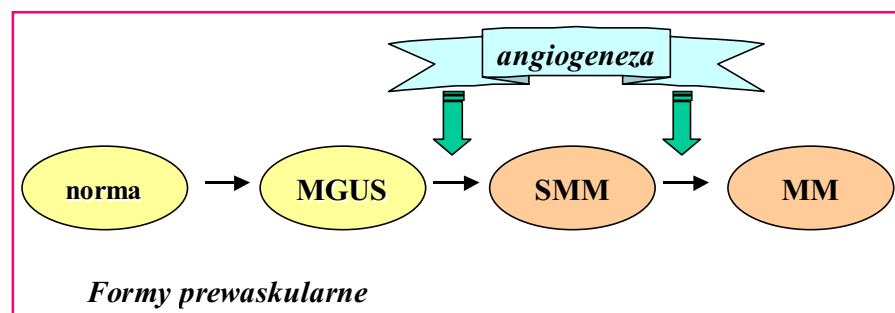
W dosłownym tłumaczeniu termin ten oznacza „narodziny naczyń” i polega na tworzeniu nowych naczyń z dotychczas już istniejących. Nie należy jej mylić z waskulogenezą, czyli powstawaniem naczyń z komórek progenitorowych, które po transformacji do cewkowych struktur utworzonych z komórek śródbłonna zapewniają perfuzję w nowopowstających tkankach [13]. Waskulogeneza i angiogeneza przebiegają bardzo dynamicznie w okresie rozwoju płodowego, podczas gdy u osób dorosłych, w zasadzie mamy do czynienia już tylko z angiogenezą. Komórki śródbłonna są komórkami uspiętymi, ich cykl komórkowy (ang. *turnover time*) mierzy się w latach [15], jednak w pewnych sytuacjach-fizjologicznych i patologicznych – kiedy zwiększa się zapotrzebowanie na składniki odżywcze, dochodzi może do szybkiej aktywacji procesu powstawania nowych naczyń. Dzieje się tak w czasie procesów reparacji, reprodukcji i rozwoju. Angiogeneza jest także niezbędnym ele-

mentem procesu nowotworzenia. Tkanki nowotworowe, jako bardzo aktywne metabolicznie, ulegają szybkim podziałom i przemianom, w związku z tym wymagają bardzo dobrego unaczynienia. W początkowym okresie, kiedy rozmiary guza nie przekraczają kilku milimetrów, jest on w stanie odżywiać się korzystając z naczyń przebiegających w pobliżu. Później jednak dochodzi do martwicy w strefach centralnych guza, i bez dodatkowego zaopatrzenia w krew niemożliwy byłby dalszy jego wzrost i rozwój – wytworzyłaby się równowaga pomiędzy komórkami proliferującymi i obumierającymi [10,32,37]. Komórki nowotworowe są jednak w stanie „przełączać” (ang. *switch*) swój fenotyp na tzw. angiogeny, co prowadzi do zaburzenia lokalnej równowagi między czynnikami stymulującymi i hamującymi tworzenie naczyń na korzyść tych pierwszych. Dochodzi wtedy do zwiększonej ekspresji czynników pro-angiogeny, a także mobilizacji substancji o takim działaniu z macierzy zewnątrzkomórkowej i komórek gospodarza (na przykład makrofagów zdolnych produkować własne białka regulujące angiogenezę) [79]. Nie zawsze zwiększona ekspresja czynników stymulujących wystarcza do zmiany fenotypu komórek na angiogeny, dowiedziono jednak, że komórki nowotworowe są także w stanie hamować ekspresję inhibitorów angiogenezy [79].

Na poziomie komórkowym, waskularyzacja guza umożliwia jego wzrost z dwóch niezależnych powodów [79]:

1. zwiększonej perfuzji, która przy dużej masie „opakowanych” w ciasne struktury komórek odgrywa znacznie większą rolę niż prosta dyfuzja;

2. efektwi parakrynnemu, wynikającemu z wytwarzania przez komórki śródbłonna szeregu różnych czynników wzrostowych i wydzieleniu ich przez makrofagi i inne komórki gospodarza. Czynniki te są między innymi: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic-Fibroblast Growth Factor* – bFGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (*Insulin-like Growth Factor* – IGF), płytkowopochodny czynnik wzrostu (*Platelet Derived Growth Factor* – PDGF) oraz czynnik stymulujący kolonie granulocytów (*Granulocy-*



Formy przewaskularne

Rycina 1

Transformacja prawidłowych plazmocytów do komórek szpiczakowych.

Schemat przedstawiający prawdopodobny mechanizm wielostopniowej transformacji prowadzący do rozwoju szpiczaka mnogiego. Mechanizmy odpowiedzialne za poszczególne przemiany nie są dotychczas znane, jednak z pewnością istotną rolę odgrywa tu angiogeneza, niezbędna podczas przejścia form mniej agresywnych w bardziej agresywne.

Transformation of plasmocytes to multiple myeloma cells.

Probable mechanism of multi-step transformation leading to multiple myeloma. The mechanisms of specific transformations are not yet described, although most probably angiogenesis has an important role in the transformation from less malignant to more malignant forms.

te-Colony Stimulating Factor – G-CSF).

Z klinicznego punktu widzenia podkreślić należy, iż angiogeneza umożliwia nie tylko wzrost i rozwój guza, ale i powstawanie przerzutów i w większości nowotworów wiąże się z ich przejściem w fazę objawową. Paradoksalnie, zmniejsza też ona stopniowo dostępność guza dla chemioterapeutyków.

Dzieliące się komórki nowotworowe nie tworzą bowiem struktur rosnących odśrodkowo i otaczających naczynia krwionośne, lecz je uciskają [79].

Endogenne stymulatory i inhibitory angiogenezy

W chwili obecnej znanych jest już cały szereg czynników endogennych zarówno stymulujących jak i hamujących proces angiogenezy. Najważniejsze spośród nich wyszczególniono w poniższych tabelach (tabela I i II).

Obecnie wiele nadziei wiąże się z możliwością kontrolowania procesu angiogenezy. Potencjalnie mogłoby to umożliwić skuteczne leczenie nowotworów [18,20,21,32,79].

Rola wybranych cytokin w szpiczaku mnogim

Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF)

Czynnik wzrostu fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), zidentyfikowany w roku 1984 jako 146-aminokwasowe białko wyizolowane z przysadki mózgowej [8], uznany został najpierw za czynnik odpowiedzialny za indukowaną przez nowotwory an-

giogenezę (ang. *tumor angiogenic factor* – TAF). Początkowo znane były tylko dwie jego postaci: kwaśna (*acidic* FGF, aFGF, FGF1) odkryta w roku 1984, o masie cząsteczkowej 16400 D, i zasadowa (*basic* FGF, bFGF, FGF2), o masie cząsteczkowej 18000 D, odkryta również w roku 1984 [69]. Obydwie formy w warunkach *in vitro* działały silnie mitogennie na komórki śródbłonna. Obecnie znanych jest już dziewiętnaście transkryptów genu FGF, różniących się między sobą liczbą aminokwasów i komórkami, które mogą je syntetyzować. Stwierdzono, że komórki szpiczakowe produkują i wydzielają FGF typu: 2, 5 i 9, nie wytwarzają natomiast czynników 1, 3, 4, 6, 7 [78]. Znałe są cztery receptory dla czynnika wzrostu fibroblastów: FGFR1 przyłączający czynniki FGF2 i FGF5, FGFR2 (bek) łączący się z FGF2 i FGF5, FGFR3 będący ligandem dla FGF9, oraz FGFR4, ligand FGF2 [78]. Szczególne znaczenie przypisuje się zasadowemu czynnikowi wzrostu fibroblastów (b-FGF), jest on bowiem najczęściej znajdowaną formą FGF i występuje w podwyższonych stężeniach w wielu różnych nowotworach [7,62,83]. W szpiczaku mnogim stężenie b-FGF wzrasta w miarę postępu choroby: w MGUS jest takie same jak u osób zdrowych, w SMM bywa podwyższone, a w aktywnej postaci choroby (szczególnie w szpiczaku mnogim wydzielającym łańcuchy lekkie) następuje dalszy jego wzrost [83]. Stwierdzono też, że komórki szpiczakowe posiadające na swej powierzchni receptor FGFR3 (którego nie mają prawidłowe komórki limfoidalne), szybciej ulegają podziałom i rzadziej apoptozie niż komórki nie posiadające FGFR3 [53]. Skuteczne leczenie powoduje często obniżenie stężenia b-FGF.

Interleukina-6 (IL-6)

Interleukina-6 jest jedną z cytokin o kluczowym znaczeniu w szpiczaku mnogim. Odkryta została jako czynnik stymulujący różnicowanie i końcowe dojrzewanie limfocytów B, stąd początkowo określano ją mianem czynnika stymulującego limfocyty B-2

(ang. *B-cell stimulating factor-2*, BSF-2) lub czynnika różnicowania limfocytów B (ang. *B-cell differentiating factor* – BCDF) [25,48,79]. Głównym źródłem IL-6 są monocyty i makrofagi, ale wydzielają ją też limfocyty T i B, keratynocyty, komórki śródbłonna i fibroblasty. Interleukina-1 (IL-1), interferony (IFN), TNF i wirusy są czynnikami indukującymi produkcję IL-6.

IL-6 jest cytokiną o jednoczesnym działaniu pro- i przeciwzapalnym. Stymuluje ona aktywację i ekspansję limfocytów T, wzrost i być może różnicowanie limfocytów B oraz pobudza produkcję białek ostrej fazy w wątrobie [3,33].

W pewnych stanach jest ona jednak zdolna hamować procesy zapalne [73,80].

W szpiczaku mnogim najistotniejsze znaczenie ma działanie IL-6 na plazmocyty. Liczne badania wykazały, że IL-6 jest silnie działającym czynnikiem wzrostowym nowotworowych plazmocytoz, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [35,36,73]. Co równie istotne z klinicznego punktu widzenia, IL-6 hamuje proces apoptozy komórek szpiczakowych, indukowany zarówno bodźcami endogennymi (antygen Fas) [11] jak i egzogennymi (deksametazon) [24,44]. Stężenia IL-6 we krwi chorych na szpiczaka mnogiego są znacznie podwyższone i koreluje z ciężkością choroby, dlatego uznaje się ją za jeden z czynników prognostycznych [5,57,65]. IL-6 nie jest natomiast czynnikiem różnicującym dla komórek szpiczaka mnogiego, choć prawidłowe limfocyty B ulegają transformacji do produkujących immunoglobuliny plazmocytoz właśnie pod jej wpływem [3,26,33,34]. Wiąże się to być może z pewnymi nieprawidłowościami w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału z receptora [71,72].

Receptor IL-6 zbudowany jest z 2 łańcuchów białkowych: związanego na powierzchni komórki łańcucha α (IL-6R, CD126) o masie 80 kD oraz przezbłonowego łańcucha β (gp130, CD130) o masie 130 kD, przekazującego sygnał do wnętrza komórki. W warunkach fizjologicznych cza-

Tabela I

Endogenne stymulatory angiogenezy.

Endogenic stimulators of angiogenesis.

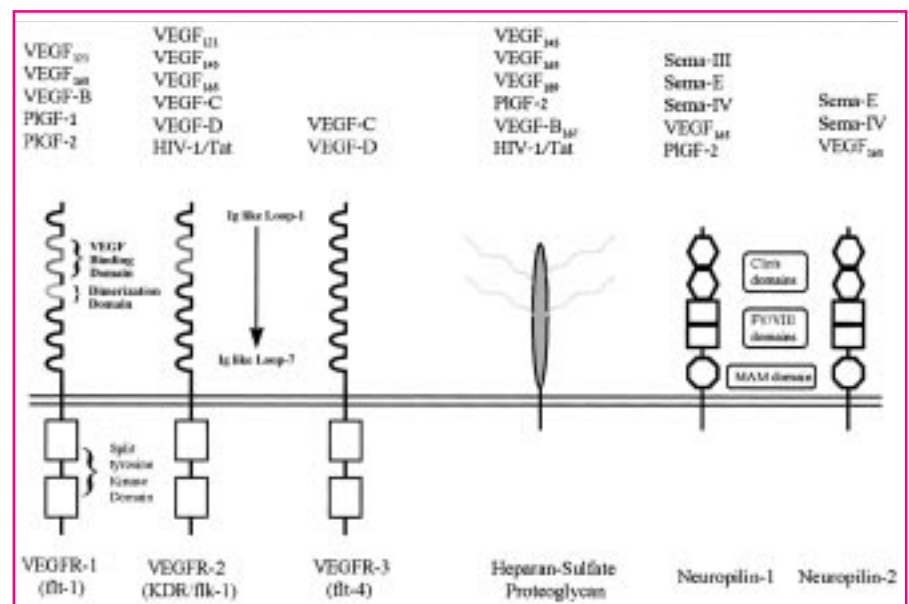
- Czynniki wzrostu fibroblastów (Fibroblast Growth Factor, FGF)
- Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)
- Łożyskowy czynnik wzrostu (Placental Growth Factor, PIGF)
- Czynniki martwicy nowotworów- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)
- Czynniki stymulujący kolonie granulocytów (G-CSF)
- Interleukina 8 (IL-8)
- Czynniki wzrostu hepatocytów (Hepatocyte Growth Factor, HGF)
- Angiogenina
- Transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β)
- Płytkowo-pochodny czynnik wzrostu komórek śródbłonna (Platelet Derived Endothelial cell Growth Factor, PDGF)
- Proliferyna

Tabela II

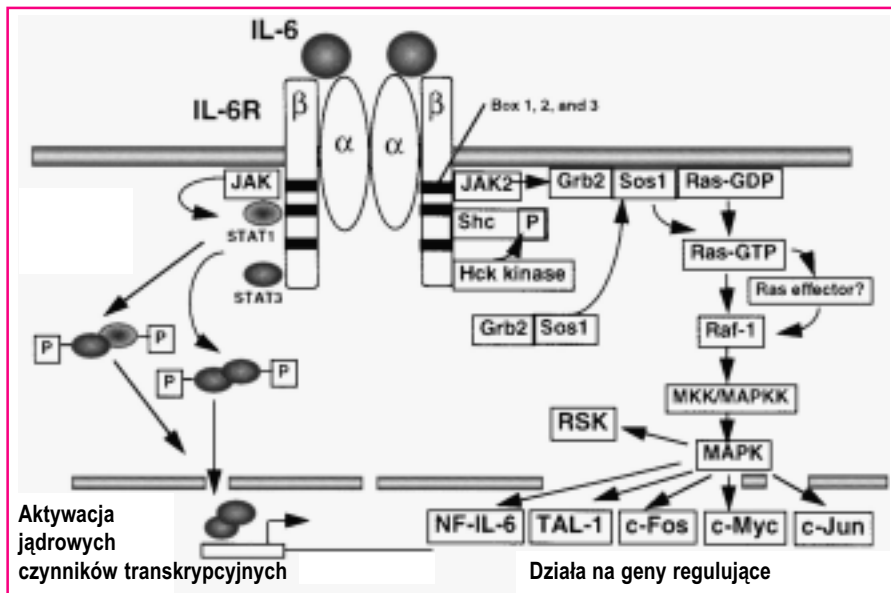
Endogenne inhibitory angiogenezy.

Endogenic inhibitors of angiogenesis.

- Czynniki płytkowy-4 (Platelet Factor-4, PF-4)
- Interferon- α (IFN- α)
- Trombospondyna
- Tkankowy inhibitor metaloproteinaz (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMP)
- Prolaktyna
- Angiostatyna
- Łożyskowe białko związane z proliferacją (Placental Proliferin-related Protein)
- Rozpuszczalny receptor zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów SFGF-R.



Rycina 2
Izoformy VEGF i ich receptory.
VEGF isoforms and their receptors.

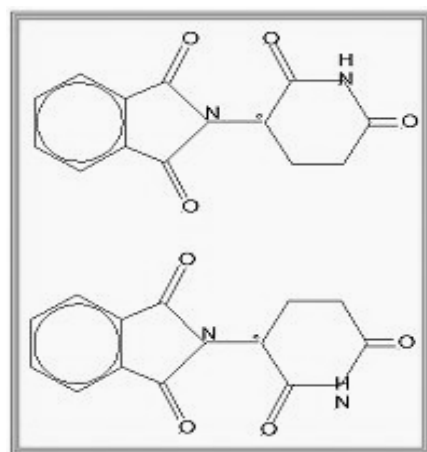


Rycina 3

Receptor IL-6. Po połączeniu IL-6 z IL-6R na powierzchni komórki tworzy się kompleks złożony z 2 cząsteczek IL-6, 2 cząsteczek IL-6R i 2 cząsteczek gp130. Do wnętrza komórki sygnał przekazywany jest 2 szlakami. Pierwszym są kinazy JAK (Janus kinase) i białka STAT (signal transducer and activation of transcription), które wnikają do jądra komórkowego i odpowiedzialne są głównie za efekty metaboliczne i hamowanie apoptozy. Drugi szlak tworzą kinazy Src białka Ras oraz kinazy Raf, MKK, MAPK. Kinazy MAPK (mitogen activated protein kinase) fosforylując m. in. fosfolipazy c-Myc, c-Jun i NF- α β odpowiedzialne są za proliferację komórek szpiczakowych. (wg 49 pozycji piśmiennictwa).

IL-6 receptor.

Following binding of IL-6 to IL-6R on the cell surface a complex of two IL-6, two IL-6R and two gp130 molecules is formed. The second messenger signal is transmitted via two pathways. The first pathway is comprised of Janus kinase (JAK) and STAT (signal transducer and activator of transcription) protein which penetrate the cell nucleus and are responsible for metabolic effects and inhibition of apoptosis. The second pathway is comprised of Src kinases, Ras protein and Raf, MKK and MAPK kinases. MAPK (mitogen activated protein kinase) which phosphorylates c-Myc, c-Jun and NF-kappa-beta fosfolipases is responsible for multiple myeloma cell proliferation [49].



Rycina 4

Talidomid w postaci enancjomerów R(+) i S(-).
Thalidomide as R(+) and S(-) enantiomer.

steczka IL-6 wiąże się najpierw z IL-6R, po czym tak powstały kompleks wspólnie z gp130 przekazuje sygnał dokomórkowo.

Z krwi i moczu chorych na HH wyizolowano również rozpuszczalną formę receptora dla IL-6 (sIL-6R) o masie cząsteczkowej 55 kD [51]. Co ciekawe, sIL-6R tworząc kompleks z IL-6 zachowuje zdolność do wiązania się z gp130 i aktywacji komórki docelowej [82]. Odwrotnie zachowuje się większość pozostałych rozpuszczalnych receptorów cytokinowych, które po połączeniu ze swym ligandem antagonizują jego działanie

(zapobiegają połączeniu się liganda z jego receptorem błonowym). sIL-6R poszerza więc spektrum komórek, które aktywować może IL-6, o komórki posiadające gp130 a nie posiadające IL-6R [61]. Stężenie sIL-6R jest znacznie większe u chorych na szpiczaka plazmocytozy niż u osób zdrowych [41], koreluje z ciężkością choroby [52] i uznawane jest obecnie za jeden z czynników rokowniczych [28,55].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) odkryty i opisany w roku 1983 [67], początkowo znany był jako czynnik przepuszczalności naczyń (*Vascular Permeability Factor*) [31,43]. Działanie biologiczne VEGF jest bardzo różnorodne: jako silny stymulator mitotyczny dla komórek śródbłonka reguluje on rozwój płodowych komórek macierzystych, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej i miejscowe wydzielanie cytokin prozapalnych. Zmienia też ekspresję niektórych genów (między innymi metaloproteinaz i integrzyn) [17,22,50,54,70,81], a także wykazuje działanie cytoprotekcyjne, co udowodniły doświadczenia, w których prawidłowe komórki macierzyste szpiku i komórki nowotworowe poddawano działaniu promieni rentgenowskich lub chemioterapeutyków. W obydwu przypadkach w hodowlach zawierających VEGF apoptozie ulegało mniej komórek niż w hodowlach go po-

zbawionych [29], Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu występuje w pięciu postaciach będących produktem transkrypcji jednego, zawierającego osiem exonów genu, w zależności od sposobu „złożenia” mRNA będącego jego bezpośrednim prekursorem. Poszczególne izoformy, VEGF1, VEGF2, VEGF3, VEGF4 i VEGF5, zawierają odpowiednio 121, 145, 165, 189 i 206 aminokwasów. VEGF1, VEGF2 i VEGF3 są wydzielane przez komórki, podczas gdy VEGF4 i VEGF5 pozostają na ich powierzchni związane domena heparynową. Dotychczas znane są trzy receptory dla VEGF. Wzajemne zależności pomiędzy izoformami VEGF i jego receptorami przedstawia poniższy rysunek (rycina 2).

W szpiczaku mnogim istotne znaczenie mają tylko dwa z powyższych receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2. VEGFR-3 jest receptorem, który stymuluje tworzenie naczyń chłonnych- limfangiogenezę oraz odpowiada za utrzymywanie ciągłości śródbłonka nowopowstałych naczyń guzów nowotworowych [23,38,45,76]. Na poziomie komórkowym, aktywacja receptorów VEGF prowadzi do wytwarzania proteaz potrzebnych do przzerwania ciągłości błony podstawnej naczyń w pierwszej fazie angiogenezy, następnie ekspresji swoistych integrzyn (między innymi α 11b β 3, α V β 3), i w końcu do proliferacji i migracji komórek śródbłonka. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu pełni jedną z kluczowych ról w stymulacji angiogenezy w chorobach nowotworowych. Jego stężenie jest większe u osób chorych niż u zdrowych, a w niektórych nowotworach jest nawet niezależnym czynnikiem prognostycznym [1].

Talidomid i nowe wskazania do leczenia

Po okrutnej i kompromitującej lekcji pokory (lat 50-te i 60-te terapii talidomidem), nikt chyba nie spodziewał się już powrotu talidomidu „do łask” i nie uwierzyłby, że kiedykolwiek znajdzie on jeszcze zastosowanie w medycynie. Tymczasem już w roku 1965 *Sheskin* doniósł o korzystnym wpływie talidomidu u pacjentów cierpiących na guzowatą postać trądu [68]. Podawany jako lek uspokajający (zgodnie ze swym pierwotnym wskazaniem) powodował gojenie się przewlekłych, guzowatych zmian zapalnych skóry i ustępowanie objawów ogólnych choroby [63,77]. Późniejsze badania dotyczące mechanizmu działania leku wykazały związek powyższych zmian ze zmniejszaniem się stężenia krążącego we krwi czynnika martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor* – TNF α) [63,64]. W efekcie, po wielu dodatkowych badaniach, w lipcu 1998 amerykański FDA (*Food and Drug Administration*) ponownie dopuścił talidomid do leczenia postaci guzowatej trądu – *erythema nodosum leprosum* oraz szpiczaka mnogiego.

Budowa chemiczna i działanie talidomidu

Z chemicznego punktu widzenia talidomid (alfa-[N-ftalimido]-glutarimid) jest pochodną kwasu glutaminowego o wzorze sumarycznym C13H10N2O4 i masie cząsteczkowej 258D (rycina 4).

Jako lek jest mieszaniną racemiczną

enancomerów R(+) i S(-), różniących się nie tylko kierunkiem skręcania światła spolaryzowanego, ale i działaniem: forma R(+) działa przede wszystkim sedatywnie, S(-) ma właściwości teratogenne. Bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie i alkoholu etylowym (stać nie udało się uzyskać rozpuszczonej postaci leku), natomiast dobrze rozpuszcza się w temperaturze pokojowej w dimetylosulfotlenku (DMSO).

Talidomid ma właściwości przeciwzapalne, immunomodulujące i jest inhibitorem angiogenezy [12,14,16,27,46], jednak dokładny mechanizm jego działania nie został dotychczas poznany. Wykazano, iż selektywnie, ale niecałkowicie blokuje produkcję cytokin prozapalnych, między innymi TNF α , IL-6, IL-8 oraz zmniejsza ekspresję niektórych cząsteczek adhezyjnych, np. ICAM-1 (ang. *Intracellular Adhesion Molecule-1*). Początkowo talidomidowi przypisywano właściwości immunosupresyjne, z czasem przeważał jednak pogląd, że jest to efekt immunomodulujący wyrażający się głównie poprzez jego wpływ na limfocyty T. W układzie odpornościowym limfocyty T pełnią centralną funkcję efektorową i regulatorową. Aktywacja komórek T wymaga co najmniej dwóch sygnałów: jednego poprzez specyficzny receptor limfocytów T-TCR (ang. *T-cell receptor*) oraz drugiego tzw. sygnału kostymulującego. W warunkach fizjologicznych sygnał kostymulujący pochodzi zwykle od wyspecjalizowanych komórek prezentujących antygen- APC (ang. *antigen presenting cell*) i przekazywany jest poprzez interakcje receptora B7 na komórce prezentującej antygen i CD28 obecnego na powierzchni limfocyta T. Talidomid sam może pełnić funkcję cząsteczki kostymulującej łącząc się bezpośrednio z receptorem CD28 i aktywując w ten sposób komórki T, co w konsekwencji prowadzi do mediowanej przez IL-2 proliferacji limfocytów T i zwiększenia produkcji cytokin, głównie IFN γ . Efekt ten jest silniej wyrażony w subpopulacji komórek CD8+ niż CD4+. Pod jego wpływem nasila się cytotoksyczny efekt komórek CD8+ indukowany przez allogeniczne komórki prezentujące antygen przy nieobecności limfocytów CD4+. Stwierdzono też, że dochodzi do przesunięcia równowagi pomiędzy subpopulacjami limfocytów pomocniczych: stymulacji linii Th2 i supresji linii Th1. Talidomid potęguje również cytotoksyczne właściwości komórek NK i zwiększa ich liczbę.

Nadal istnieje wiele kontrowersji odnośnie mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie angiogenezy przez talidomid. W chwili obecnej efekt ten przypisuje się głównie zahamowaniu wytwarzania i wydzielania pewnych cytokin regulujących angiogenezę, między innymi b-FGF, VEGF i IL-8. Badania doświadczalne wykazały zmniejszenie stężenia VEGF i b-FGF u pacjentów leczonych talidomidem, jednak działanie to nie jest długotrwałe. Sugerować to może istnienie innych substancji przekazywanych i innych szlaków stymulujących angiogenezę, których funkcja ulega kompensacyjnemu wzmożeniu. Z drugiej strony, pomimo iż po kilku miesiącach stwierdzano zwykle ponowny wzrost stężeń VEGF i b-FGF do

Tabela III
Mechanizmy działania talidomidu.
Thalidomide mechanisms of action.

Hamuje syntezę TNF α ^{79,80}
Nie hamuje syntezy TNF α przez monocyty stymulowane anti-CD38 ⁸⁰
Wzmocnia odpowiedź immunologiczną typu Th-2 ⁷⁹
Zwiększa stężenie IL-2, ⁸⁰
Zwiększa stężenie IL-4 oraz IL-5 ⁷⁹
Hamuje produkcję IL-12 ⁷⁹
Zwiększa lub zmniejsza stężenie IL-12 ⁸⁰
Hamuje wytwarzanie IL-6, TNF α i IL-1 β przez komórki podścieliska szpiku
Stymuluje odpowiedź T- komórkową ⁷⁹
Wzmocnia funkcje CD40L ⁸⁰
Hamuje wydzielanie VEGF
Hamuje wydzielanie bFGF
Hamuje produkcję IFN α ⁷⁹
Hamuje ekspresję ICAM-1
Hamuje funkcję stymulowanych mitogenem obwodowych komórek Jednojądrzastych ^{79,80}

wartości sprzed leczenia, efekt antyangiogeny talidomidu utrzymywał się. Relacje te pozostają jak dotychczas niewyjaśnione. Udokumentowane do chwili obecnej efekty działania talidomidu zebrano w poniższej tabeli (tabela III).

Piśmiennictwo

1. Aguayo A., Estey E., Kantarjian H. et al.: Cellular Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Outcome in Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1999, 94, 3717.
2. Akira S., Hirano T., Taga T. et al.: Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules. *FASEB J.* 1990, 4, 2860.
3. Akira S., Taga T., Kishimoto T.: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 1993, 54, 1.
4. Aoki Y., Jaffe S.E., Chang Y. et al.: Angiogenesis and Hematopoiesis Induced by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Interleukin-6. *Blood* 1999, 93, 4034.
5. Bataille R., Jourdan M., Zhang X.G. et al.: 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.
6. Bauer J., Herrmann F.: Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann. Hematol.* 1991, 62, 203.
7. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G. et al.: Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews* 1997, 18, 26.
8. Bohlen P., Baird A., Esch F. et al.: Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984, 81, 5364.
9. Burger R., Neipel F., Fleckenstein B., et al.: Human Herpesvirus Type 8 Interleukin-6 Homologue Is Functionally Active on Human Myeloma Cells. *Blood* 1998, 91, 1858.
10. Carmeliet P., Jain R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407, 249.
11. Chauhan D., Kharbanda S., Ogata A. et al.: Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and SAP kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 1997, 89, 227.
12. Corral L.G., Kaplan G.: Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann. Rheum. Dis.* 1999, 58, (Suppl. I), 107.
13. Cramer D.A.: Applied Vascular Biology: Can Angiogenesis Inhibitors Help Control Malignant Growth? *Ann. Int. Med.* 1998, 129, 841.
14. D'Amato R.J., Loughnan M.S., Flynn E. et al.: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91, 4082.
15. Denekamp J.: Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 1993, 66, 181.
16. Dmoszyńska A.: Talidomid - nowe możliwości leczenia szpiczaka plazmocytoowego. *Acta Haematologica Polonica* 2000, 1, 5.

17. Ferrara N., Davis-Smyth T.: The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* 1997, 18, 4.
18. Fidler I.J., Ellis L.M.: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell.* 1994, 79, 185.
20. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N. Engl. J. Med.* 1971, 285, 1182.
21. Folkman J.: Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* 1972, 175, 409.
22. Grunstein J., Masbad J.J., Hickey R. et al.: Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor Act in a Coordinate Fashion To Recruit and Expand Tumor Vasculature. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 7282.
23. Hamada K., Oike Y., Takakura N. et al.: VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood* 2000, 96, 3793.
24. Hardin J., MacLeod S., Grigorieva I. et al.: Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 1994, 84, 3063.
25. Hirano T., Taga T., Nakano N. et al.: Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFP-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985, 82, 5490.
26. Hirano T., Akira S., Taga T. et al.: Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today* 1990, 11, 443.
27. Hus M., Dmoszyńska A., Soroka-Wojtaszko M. et al.: Thalidomide treatment of resistant or relapsed multiple myeloma patients. *Haematologica* 2001, 86, 404.
28. Jones S., Horiuchi S., Topley N. et al.: The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* 2001, 15, 43.
29. Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K. et al.: 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.
30. Kawano M., Hirano T., Matsuda T. et al.: Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. *Nature* 1988, 83, 332.
31. Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G. et al.: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989, 246, 1309.
32. Kerbel R.: Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000, 21, 505.
33. Kishimoto T.: The biology of interleukin-6. *Blood* 1989, 74, 1.
34. Kishimoto T., Akira S., Taga T.: IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992, 14, 431.
35. Klein B., Zhang X.G., Jourdan M. et al.: Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989, 73, 517.
36. Klein B., Zhang X.G., Lu Z.Y. et al.: Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma. *Blood* 1995, 85, 863.
37. Kopeć-Szlezak J.: Rola śródbłonka w funkcjonowaniu komórek krwi i szpiku. *Acta Haematologica Polonica* 2001, 4, 375.
38. Kubo H., Fujiwara T., Jussila L. et al.: Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000, 96, 546.
39. Kyle R.A.: Benign monoclonal gammopathy- after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clinic Proceedings*, 1993, 68, 26.
40. Kyle R.A., Greipp P.R.: Smoldering multiple myeloma. *N. Eng. J. Med.* 1980, 302, 1347.
41. Kyriakou D., Papadaki H., Eliopoulos A.G. et al.: 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.
42. Laroche M., Brousset P., Ludot I. et al.: Increased vascularization in myeloma. *Eur. J. Haematol.* 2001, 66, 238.
43. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J. et al.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989, 246, 1306.
44. Lichtenstein A., Tu Y., Fady C. et al.: Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol.* 1995, 162, 248.

45. Mandriota S., Jussila L., Jeltsch M. et al.: Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymph-angiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J.*, 2001, 20, 672.
46. Marriott J.B., Muller G.W., Dalgleish A.G.: Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunol. Today* 1999, 20, 538.
47. Munshi N., Wilson C.S., Penn J., et al.: Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma: poor prognosis with increased microvessel density (MVD) in bone marrow biopsies [abstract]. *Blood* 1998, 92, 98.
48. Muraguchi A., Hirano T., Tang B. et al.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 1988, 167, 332.
49. Nelson N.J.: Angiogenesis research is on fast forward. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 820.
50. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, 13, 9.
51. Novick D., Engelmann H., Wallach D. et al.: Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 1989, 170, 1409.
52. Ohtani K., Ninomiya H., Hasegawa Y. et al.: Clinical significance of elevated soluble interleukin-6 receptor levels in the sera of patients with plasma cell dyscrasias. *Br. J. Haematol.* 1995, 91, 116.
53. Plowright E., Li Z., Bergsagel P.L. et al.: Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood* 2000, 95, 992.
54. Podar K., Tai Y.T., Davies F.E. et al.: Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001, 98, 428.
55. Pulkki K., Pelliniemi T., Rajamaki A. et al.: Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 1996, 92, 370.
56. Raya J.M., Brito M.L., Gonzalez-Brito G. et al.: Plasma cells of patient with "smouldering" myeloma show intermediate phenotypic features between MGUS and multiple myeloma. *The Hematology Journal*, 2000, 1, (Suppl.1), 165.
57. Reibnegger G., Krainer M., Herold M. et al.: Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma. *Cancer Res.* 1991, 51, 6250.
58. Rettig M.B., Ma H.J., Vescio R. et al.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 1997, 276, 1851.
59. Ribatti D., Vacca A., Nico B. et al.: Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br. J. Cancer* 1999, 79, 451.
60. 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*, 2nd edn. Wyd. Churchill Livingstone, New York, 1991, 347-372.
61. Rose-John S., Heinrich P.C.: Soluble receptors for cytokines and growth factors: their generation and biological function. *Biochem. J.* 1994, 300, 281.
62. Salven P., Teerenhovi L., Joensuu H.: A High Pre-treatment Serum Basic Fibroblast Growth factor Concentration Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1999, 94, 3334.
63. Sampaio E.P., Kaplan G., Miranda J.A. et al.: The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 1993, 168, 408.
64. Sampaio E.P., Sarno E.N., Galilly R. et al.: Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 1991, 173, 699.
65. San Miguel J.F., Gonzalez M., Gascon A. et al.: Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 1992, 80, 305.
66. Schottenfeld D., Fraumeni J.F. Jr (red.): *Cancer Epidemiology and Prevention*, 2nd edn. Oxford University Press, New York, 1996, 946-970.
67. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M. et al.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983, 219, 983.
68. Sheskin J.: Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1965, 6, 303.
69. Shing Y., Folkman J., Sullivan R. et al.: Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 1984, 223, 1296.
70. Soldi R., Mitola S., Strasly M. et al.: Role of $\alpha V\beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 1999, 18, 882.
71. Sonneveld P., Schoester M., de Leeuw K. et al.: In vitro Ig-synthesis and proliferative activity in multiple myeloma are stimulated by different growth factor. *Br. J. Haematol.* 1991, 79, 589.
72. Tanabe O., Kawano M., Tanaka H. et al.: BSF-2/IL-6 does not augment Ig secretion but stimulates proliferation in myeloma cells. *Am. J. Hematol.* 1989, 31, 258.
73. Tilg H., Trehu E., Atkins M. et al.: 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.
74. Vacca A., Ribatti D., Roncali L. et al.: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 1994, 87, 503.
75. Vacca A., Ribatti D., Presta M. et al.: Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999, 93, 3064.
76. Veikkola T., Jussila L., Makinen T. et al.: Signalling via Vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001, 20, 1223.
77. Waters M.F.R.: An internally controlled double-blind trial of thalidomide in severe erythema nodosum leprosum. *Lepr. Rev.* 1971, 42, 26.
78. Witzig T.: FGF and FGFR3 in Multiple Myeloma Angiogenesis. W: Abstract Book from Mayo Clinic Symposium "Innovate Research In Multiple Myeloma". Amelia Island, USA, 2001, 36.
79. Xia X., Lee H.L., Clark S.C. et al.: Recombinant interleukin (IL)-2-induced human B cell differentiation is mediated by autocrine IL6. *Eur. J. Immunol.* 1989, 19, 2275.
79. Xia X., Lee H.L., Clark S.C. et al.: Recombinant interleukin (IL)-2-induced human B cell differentiation is mediated by autocrine IL6. *Eur. J. Immunol.* 1989, 19, 2275.
80. Xing Z., Gauldie J., Cox G. et al.: IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammation. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 311.
81. Yabkowitz R., Meyer S., Black T. et al.: 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.
82. Yasukawa K., Saito T., Fukunaga T. et al.: Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J. Biol. Chem.* 1990, 108, 673.
83. Zhu A.Z., Fleischer M., Bush A. et al.: Elevated serum concentrations of fibroblast growth factor (FGF) in patients with multiple myeloma (MM). *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1999; 18A: 155