

Wstęp: W raku płuca wyróżnia się ponad 150 czynników prognostycznych, dzielących się na 3 zasadnicze grupy – czynniki podstawowe, czynniki dodatkowe, czynniki nowe lub obiecujące. W tej ostatniej grupie znajdują się m.in. surowicze markery nowotworowe, wskaźniki proliferacji i adhezji komórkowej, białka apoptozy, regulatory cyklu komórkowego oraz czynniki wzrostowe.

Za niekorzystny czynnik rokowniczy w raku płuca uznawana jest zwiększona ekspresja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF). Zdecydowanie mniej wiadomo natomiast na temat wartości prognostycznej metaloproteinazy 9 (MMP-9). Oba te czynniki, VEGF i MMP-9, odgrywają istotną rolę w angiogenezie nowotworowej, wzroście guza, inwazji i przerzutowaniu.

Cel pracy: Porównanie znaczenia zwiększonego stężenia VEGF i MMP-9 w ocenie czasu przeżycia i ryzyka nawrotów u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w 3-letniej obserwacji po leczeniu przeciwnowotworowym.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowili chorzy na raka niedrobnokomórkowego płuca, u których stwierdzono zwiększone stężenie VEGF (grupa A) i zwiększone stężenie MMP-9 (grupa B). Stężenia VEGF i MMP-9 oznaczano w surowicy metodą ELISA.

Wyniki: Odsetek 3-letniego przeżycia: 1) całkowitego w grupie A wynosił 80%, natomiast w grupie B – 82,6%, 2) bezobjawowego w grupie A – 32,4%, w grupie B – 30,9%, 3) wolnego od wznowy miejscowej w grupie A – 73,5%, w grupie B – 68,2%, 4) wolnego od przerzutów odległych – w grupie A – 58,3%, w grupie B – 57,7%. Mediana przeżycia chorych w obu grupach była identyczna i wynosiła 31 mies.

Wnioski: Wartość prognostyczna zwiększonych stężeń VEGF i MMP-9 w surowicy u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca jest podobna.

Słowa kluczowe: rak płuca, VEGF, MMP-9, wartość prognostyczna.

Porównanie wartości prognostycznej VEGF i MMP-9 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w trzyletniej obserwacji po leczeniu przeciwnowotworowym

The comparison of prognostic value of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer during three-year observation after anti-tumour treatment

Ewa Kopczyńska¹, Maciej Dancewicz², Janusz Kowalewski², Tomasz Tyrakowski¹

¹Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wstęp

Pierwotny rak płuca jest najczęściej występującym u ludzi nowotworem złośliwym. Wśród chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) największą szansę na wieloletnie przeżycie mają ci, u których możliwe jest radykalne leczenie operacyjne. Niestety, do nawrotu choroby nowotworowej dochodzi nawet u 50% operowanych chorych. Dlatego tak ważne jest wyłonienie chorych szczególnie zagrożonych reaktywacją procesu nowotworowego.

Jak wynika z metaanalizy przeprowadzonej przez Brundage i wsp. [1] istnieje ponad 150 czynników prognostycznych dla chorych na NDRP. Wyróżnia się wśród nich trzy zasadnicze grupy:

- czynniki podstawowe (stadium zaawansowania klinicznego, hiperkalcemia),
- czynniki dodatkowe (cechy T, N, M, stopień zróżnicowania histologicznego),
- czynniki nowe lub obiecujące.

W tej ostatniej grupie znalazły się m.in. surowicze markery nowotworowe (cyfra 21-1, TPA), wskaźniki proliferacji komórkowej (ploidia DNA, PCNA, Ki-67), markery adhezji komórkowej (CD44), białka apoptozy (TP53, bcl-2), regulatory cyklu komórkowego (RAS, RB), czynniki wzrostowe (EGF, HER2, HGF, VEGF).

Z cytowanej analizy [1] wynika, że naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) jako czynnik prognostyczny był badany często, i co więcej, w 7 na 11 (64%) przeprowadzonych badań stwierdzono istotny jego związek z czasem przeżycia. Również w innych dużych analizach [2, 3] zwiększoną ekspresję VEGF uznano za niekorzystny czynnik rokowniczy NDRP. Zdecydowanie rzadziej pod kątem wartości prognostycznej badana była metaloproteinaza 9 (MMP-9). Oba te czynniki, VEGF i MMP-9, odgrywają istotną rolę w angiogenezie nowotworowej, wzroście guza, inwazji i przerzutowaniu.

Ekspresja VEGF u chorych na raka płuca jest zwiększona. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu jest czynnikiem rokowniczym w tej grupie pacjentów dzięki temu, że uczestniczy w progresji nowotworowej na dwa sposoby – jako czynnik wzrostu komórek nowotworowych i jako czynnik mitotyczny dla komórek śródbłonka naczyń krwionośnych [4, 5]. Ekspresja MMP-9, podobnie jak VEGF, zwiększona u chorych na raka płuca i wykazująca korelację ze stadium zaawansowania klinicznego również mogłaby być

Background: There are over 150 prognostic factors in lung cancer. Among these factors three groups of factors are distinguished: essential, additional, and new or promising. This last group includes: serum tumour markers, markers of cellular proliferation and adhesion, regulators of cellular growth and growth factors.

Increased expression of vascular-endothelial growth factor is recognized to be an unfavourable prognostic factor in lung cancer. On the other hand, decidedly less is known about the prognostic value of metalloproteinase 9. Both factors, VEGF and MMP-9, play an important role in tumour angiogenesis, tumour growth, invasion and metastasis.

Aim of the study: The aim of this study was to compare the value of increased concentration of VEGF and MMP-9 in estimation of survival time and relapse in non-small cell lung cancer during three-year observation after anti-tumour treatment.

Material and methods: The study group constituted patients with non-small cell lung cancer, in whom increased concentrations of VEGF (group A) and MMP-9 (group B) were found. Serum concentrations of VEGF and MMP-9 were evaluated by ELISA test.

Results: The percentage of three-year: 1) overall survival in group A was 80%, in group B 82.6%, 2) disease-free survival in group A was 32.4%, in group B 30.9%, 3) locoregional recurrence-free survival in group A was 73.5%, in group B 68.2%, 4) metastasis-free survival in group A was 58.3%, in group B 57.7%. Median overall survival in both groups was identical and it was 31 months.

Conclusions: The prognostic value of increased serum VEGF and MMP-9 concentration in non-small cell lung cancer patients is similar.

Key words: lung cancer, VEGF, MMP-9, prognostic value.

rozważana jako czynnik prognostyczny. Metaloproteinaza 9 jest żelatynazą zaangażowaną w degradację macierzy zewnątrzkomórkowej i przez to uczestniczącą w inwazji nowotworowej [6].

Cel pracy

Autorzy niniejszej pracy postawili sobie za cel odpowiedź na pytanie, czy zwiększone stężenie MMP-9 ma podobne do VEGF znaczenie w ocenie czasu przeżycia i ryzyka nawrotów u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w 3-letniej obserwacji po leczeniu przeciwnowotworowym.

Materiał i metody

Osoby badane

Pierwotnie grupę badaną stanowiło 50 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w różnym stadium zaawansowania klinicznego. W momencie rozpoznania choroby, przed leczeniem oznaczono u nich w surowicy stężenie VEGF i MMP-9. Zwiększone stężenie VEGF (>707 pg/ml) stwierdzono u 15 chorych (30%) (grupa A), natomiast zwiększone stężenie MMP-9 (>705 ng/ml) u 23 osób (46%) (grupa B). Tylko te wyniki poddano analizie, zgodnie z postawionym celem pracy.

Ponieważ zależność przeżycia od zaawansowania nowotworu jest bardzo wyraźna, dlatego porównano obie grupy, grupę A i grupę B, pod względem odsetka chorych we wczesnym stadium choroby (stoperie I i II) oraz w stadium zaawansowanym (stoperie III i IV). Okazało się, że grupy te są podobne (tab. 1).

Badane osoby były pacjentami Katedry i Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, mieszczącej się w Centrum Onkologii w Bydgoszczy.

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy.

Materiał do badań

Stężenia VEGF i MMP-9 oznaczano w surowicy. Krew pobierano z żyły odłokciowej w ilości 3 ml. Próbkę krwi po wykrzepieniu wirowano przez 15 min przy 3000 obr./min. Surowicę przechowywano w temperaturze -70°C .

Metody oznaczania

Stężenia VEGF i MMP-9 oznaczano za pomocą komercyjnych testów immunoenzymatycznych ELISA (Quantikine Human Immunoassay, R&D Systems).

Analiza statystyczna

Wartość prognostyczna markera nowotworowego definiowana jest jako czas bezobjawowego i całkowitego przeżycia chorych. W badaniu tym do oceny ryzyka nawrotów choroby i czasu przeżycia chorych wykorzystano:

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanych grup

Table 1. Clinical characteristics of study groups

TNM	Grupa A (↑VEGF) n (%)	Grupa B (↑MMP-9) n (%)
I-II	7 (46,7)	13 (56,5)
III-IV	8 (53,3)	10 (43,5)

TNM – stadium zaawansowania klinicznego
n – liczebność

Tabela 2. Ocena częstości zgonu lub nawrotu choroby w 3-letniej obserwacji w badanych grupach

Table 2. Assessment of frequency of death or tumour recurrence during three-yearly observation in study groups

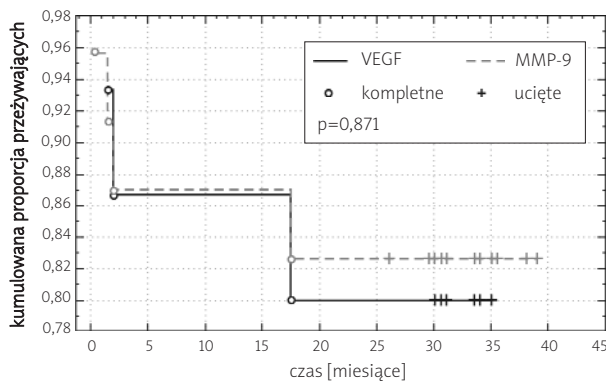
Parametr prognostyczny	Grupa A (↑VEGF) n (%)	Grupa B (↑MMP-9) n (%)
zgon chorego	3 (20)	4 (17,4)
nawrót choroby nowotworowej	8 (53,3)	13 (56,5)
wznowa miejscowa	3 (20)	6 (26,1)
przerzuty odległe	5 (33,3)	8 (34,8)

Tabela 3. Czas przeżycia całkowitego chorych w dwóch badanych grupach

Table 3. Overall survival of patients in two study groups

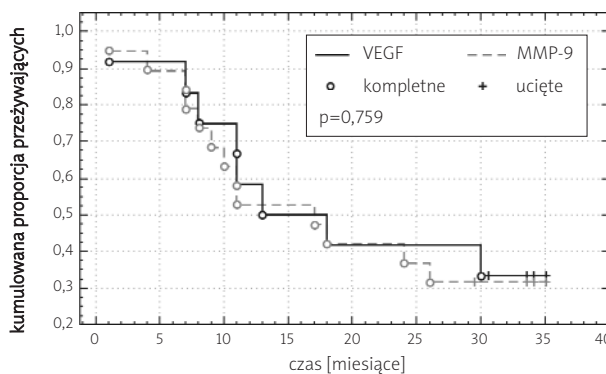
Grupa badana	n	Mediana	X±SD	minimum – – maksimum	25–75%	Istotność różnic
A	15	31	27,3±11,17	1,5–35	30–34	
B	23	31	27,7±11,30	0,5–39	29,5–34	NS

NS – różnica nieistotna statystycznie



Ryc. 1. Porównanie czasu przeżycia całkowitego chorych w grupach ze zwiększonym stężeniem VEGF (grupa A) i MMP-9 (grupa B)

Fig. 1. The comparison of overall survival of patients with increased concentrations of VEGF (group A) and MMP-9 (group B)



Ryc. 2. Porównanie czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby nowotworowej w grupach A i B

Fig. 2. The comparison of disease-free survival in groups A and B

- czas przeżycia całkowitego (ang. *overall survival* – OS),
- czas przeżycia wolnego od nawrotu choroby nowotworowej (wznowy miejscowej i przerzutów odległych), czas przeżycia bezobjawowego (ang. *disease-free survival* – DFS),
- czas przeżycia wolnego od wznowy miejscowej (ang. *local recurrence-free survival* – LRFs),
- czas przeżycia wolnego od wystąpienia przerzutów odległych (ang. *metastasis-free survival* – MFS).

Czasy przeżycia liczone od daty rozpoczęcia leczenia, zależnego od stadium zaawansowania klinicznego do daty zgonu lub wykrycia nawrotu choroby podczas badań kontrolnych w przedziale 3-letnim.

Analizę statystyczną przeprowadzono stosując metodę (estymator) Kaplana-Meiera do obliczenia skumulowanej proporcji przeżyjących oraz test *log-rank* do porównywania krzywych przeżycia (określenia istotności różnic). Przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

Wyniki

W obu badanych grupach częstość występowania zgonu i nawrotu choroby nowotworowej była podobna (tab. 2.).

Wszyscy chorzy, u których w ciągu 3 lat od rozpoczęcia leczenia nastąpił zgon, byli w stadium IIIB lub IV. Z kolei zarówno wznowa miejscowa, jak i przerzuty odległe występowały u chorych we wszystkich stadiach choroby (I–IV). Przerzuty odległe były zlokalizowane w ośrodkowym układzie nerwowym, drugim płucu lub węzłach chłonnych śródpiersia i nadobojczykowych.

Odsetek 3-letniego przeżycia:

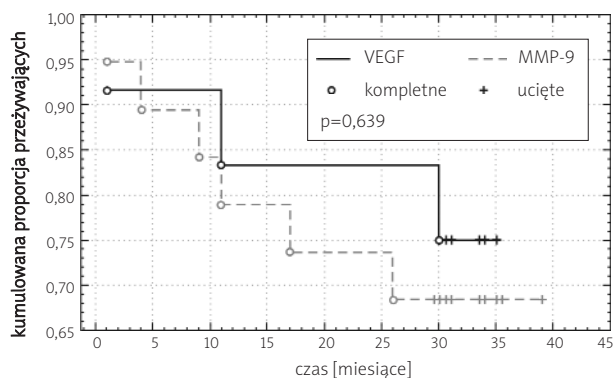
- całkowitego w grupie A wyniósł 80%, natomiast w grupie B – 82,6% [różnica nieistotna statystycznie (NS), $p=0,871$] (ryc. 1),
- bezobjawowego w grupie A – 32,4%, w grupie B – 30,9% (NS, $p=0,759$) (ryc. 2.),
- wolnego od wznowy miejscowej w grupie A – 73,5%, w grupie B – 68,2% (NS, $p=0,639$) (ryc. 3.),
- wolnego od przerzutów odległych – w grupie A – 58,3%, w grupie B – 57,7% (NS, $p=0,985$) (ryc. 4.).

U badanych chorych zgon nastąpił w czasie od 0,5 do 17,5 mies. od wykonania analiz, wznowa miejscowa pojawiła się w czasie 1–30 mies., natomiast przerzuty odległe – w czasie 7–26 mies. (ryc. 1, 3., 4.). U jednego chorego po nieradikalnej mikroskopowo resekcji w zdrowym oskrzeli stwierdzono nawrót po miesiącu.

Mediana przeżycia chorych w obu grupach była identyczna i wyniosła 31 mies. (tab. 3.).

Omówienie wyników

W ostatnich latach wartość prognostyczna VEGF była badana u chorych na NDRP w różnych stadiach zaawansowania klinicznego, z różnymi typami histologicznymi, po zastosowaniu odmiennych schematów leczenia, z uwzględnieniem różnych przedziałów czasowych i różnej wartości odcinającej w przypadku stężenia w surowicy [7–12]. Dlatego też trudno odnieść wyniki badań własnych do danych literaturowych. Niemniej jednak, pomimo tych różnych kryteriów zawsze wysoka ekspresja/stężenie VEGF korelowały z gorszym rokowaniem. Tym samym wartość prognostyczna VEGF jest niezaprzeczalna.



Ryc. 3. Porównanie czasu przeżycia wolnego od wznowy miejscowej w grupach A i B

Fig. 3. The comparison of locoregional recurrence-free survival in groups A and B

W dostępnej literaturze nie znaleziono pracy porównującej wartość prognostyczną VEGF i MMP-9. Jedynie Laack i wsp. [6] równocześnie analizowali wartość rokowniczą tych 2 czynników angiogennych u chorych na raka płuca w stadium I/II. Stwierdzono istotną różnicę w czasie przeżycia chorych ze stężeniem MMP-9 >1293 ng/ml i mniejszym od tej wartości. Odsetki przeżycia 3-letniego wynosiły odpowiednio ~30% i ~65%. Podobną zależność obserwowano dla VEGF, odsetki przeżycia wynosiły: ~40% dla stężeń >630 pg/ml i ~60% dla stężeń niższych. W badaniach własnych odsetek przeżycia chorych, u których stężenie VEGF było większe od 707 pg/ml, wynosił 80%, natomiast w grupie ze stężeniem MMP9 >705 ng/ml – 82,6%. Zatem w obu tych badaniach odsetki przeżycia całkowitego w grupach ze zwiększonym stężeniem VEGF i MMP-9 były zbliżone.

W innym badaniu Iniesta i wsp. [13] oceniali biologiczne i kliniczne znaczenie ekspresji metaloproteinaz 9 i 2 oraz ich inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 w NDRP. Okazało się, że wartość prognostyczną wykazywała tylko wysoka ekspresja MMP-9 oraz niska ekspresja TIMP-1. Odsetek 3-letnich przeżyć bez nawrotu choroby nowotworowej w grupie z ekspresją MMP-9 powyżej mediany wynosił ok. 50%, natomiast w grupie z ekspresją niższą – ok. 80%. Na tej podstawie autorzy cytowanej pracy twierdzą, że parametr ten jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w NDRP. Poza tym u chorych z większą ekspresją MMP-9 ryzyko nawrotu choroby było 2-krotne większe [13, 14].

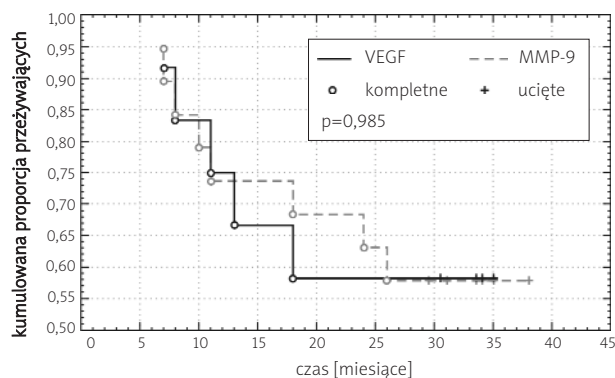
Podobnie jak Iniesta, autorzy tej pracy widzą potrzebę dalszych badań nad wartością prognostyczną MMP-9 u chorych na raka płuca.

Wnioski

Uzyskane wyniki mogą sugerować podobne znaczenie prognostyczne ocenianych czynników.

Piśmiennictwo

1. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer. A decade of progress. *Chest* 2002; 122: 1037-57.
2. Delmotte P, Martin B, Paesmans M, et al. VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Rev Mal Respir* 2002; 19: 577-84.



Ryc. 4. Porównanie czasu przeżycia wolnego od wystąpienia przerzutów odległych w grupach A i B

Fig. 4. The comparison of metastasis-free survival in groups A and B

3. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006; 51: 143-58.
4. Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol* 2005; 32: 56-65.
5. Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 77-85.
6. Laack E, Köhler A, Kugler C, et al. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1550-7.
7. Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, Weyant RJ, Landreneau RJ. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 72-9.
8. Baillie R, Carlile J, Pendleton N, Schor AM. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 116-120.
9. Brattström D, Bergqvist M, Hesselius P, Larsson A, Lamberg K, Wernlund J, Brodin O, Wagenius G. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung patients. *Lung Cancer* 2002; 37: 57-63.
10. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, Poyraz BM, Celik G, Sen E, Savas H, Savas I. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004; 98: 632-6.
11. Zhao J, Liu XY, Zhang QY, Jiang W. Plasma level and prognostic significance of VEGF, bFGF and MMP-9 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2005; 27: 676-9.
12. Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R, Hori S, Takahashi F, Miyamoto H, Fukuchi Y. Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005; 183: 29-42.
13. Iniesta P, Morán A, De Juan C, et al. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 217-23.
14. Hoikkala S, Pääkkö P, Soini Y, Mäkitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue MMP-2 and MMP-9 are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2-complex or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma. *Cancer Lett* 2007; 247: 359.

Adres do korespondencji

dr med. **Ewa Kopczyńska**
Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
tel. +48 51 585 36 00
e-mail: kopczynska@cm.umk.pl