

167808

TC
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MULTİPLE MYELOM HASTALARINDA DOLAŞAN ENDOTEL HÜCRELERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hava ÜSKÜDAR

ESKİŞEHİR 2005

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KISALTMALAR.....	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA.....	41
SONUÇLAR.....	45
ÖZET.....	47
KAYNAKLAR.....	48

KISALTMALAR

CEC	Dolaşan endotelyal hücre
EC	Endotel hücresi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IL-6	Interlökin-6
IL-1	Interlökin-1
INF	Interferon
MVD	Mikrodamar dansitesi
NHL	Non-Hodgkin lenfoma
OAF	Osteoklast aktive edici faktör
PDGF	Platelet türevi büyüme faktörü
PIGF	Plasental kaynaklı büyüme faktörü
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VWF	Von Willebrand faktör

GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple myeloma, plazma hücrelerinin klonal bir hastalığıdır. Plazma hücre hastalıklarının tümünde klinik bulgular tümör hücrelerinin genişlemesi, hücrelerin salgıladığı ürünler ve konakçının tümöre cevabının derecesi ile ilgilidir.

Multiple myelomada anjiogenezis artmaktadır ve anjiogenezis multiple myelom progresyonunda anahtar rol oynamaktadır. Multiple myelomada VEGF (vasculer endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), HGF (hepatosit growth factor) artmaktadır ve tedaviye yanıt ile düzeyleri azalmakta, yanıt yoksa düzeyleri değişmemektedir. Evre ilerledikçe düzeyleri artmaktadır.

Dolaşan endotel hücresi (CEC; circulation endothelial cell) anjiogenezisin bir markıdır. Tümör gelişimi ve vaskülarizasyonda önemli rol oynamaktadır. sCD146 ise soluble endotel markıdır.

Dolaşan endotel hücresi (CEC) sayısının myokard infarktüsü, orak hücreli anemi gibi vasküler zedelenmenin olduğu veya meme kanseri gibi neovaskülarizasyonun görüldüğü malign hastalıklarda arttığı saptanmıştır.

Endotelyal araştırmalar için noninvaziv testler kullanışlı olabilir ve endotelin patobiyolojisi için yeni bir bakış açısı sağlayabilir. CEC'in hastalarda veya normaldeki biyolojik yarı ömrü hakkında bilgi yoktur. CEC klinik ve terapötik olarak hipotekal bir markır olmaya devam etmektedir. Multiple myelomlu hastalarda anjiogenezis artmaktadır ve VEGF düzeyi yüksektir, fakat CEC düzeyi hakkında yeterli bilgimiz yoktur. Bu nokta daha fazla araştırma yapmayı gerektirmektedir.

Çalışmamızda multiple myelomalı hastalarda:

- Tedavi ncesi ve sonrası CEC düzeylerini saptamak
- CEC düzeyi ile sCD146 ilişkisini belirlemek
- CEC düzeyinin multiple myelomada hastalığın aktivasyonu ve tedavi etkinliğini belirlemede markır olarak değerini saptamayı amağladık.

GENEL BİLGİLER

MULTİPLE MYELOMA

Plazma hücre hastalıkları B lenfosit serisinin ortak öncüllerinden birinin üstünlüğü ile ilgili olarak gelişen monoklonal tümörlerdir. Multiple Myeloma, Waldenstrom makroglobulinemisi, primer amiloidoz ve ağır zincir hastalıklarından oluşan bu monoklonal gammopatiler paraproteinemiler olarak da isimlendirilmektedir. Multiple Myeloma tek bir klondan çıkan plazma hücrelerinin malign proliferasyonunu tanımlar (1).

Serum protein komponentlerinin elektroforetik analizi serum immunglobulin miktarının belirlenmesini sağlar. Farklı immunglobulinler elektiriki bir ortamda heterojen hareket ederler ve gamma bölgede açık bir pik oluşur. Bu bölgede varolan keskin pik M komponent olarak isimlendirilir (1).

Multiple myeloma; organ fonksiyon bozuklukları, kemik ağrısı veya kırığı, böbrek yetmezliği, enfeksiyona yatkınlık, anemi, hiperkalsemi ve bazen pıhtılaşma bozuklukları, nörolojik semptomlar ve hipervizkositenin damarsal bulguları ile sonuçlanabilir (2).

ETYOLOJİ:

Myeloma nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Radyasyon maruziyeti sonrası myelom sıklığında artış bildirilmiştir. Myelomlu hastalarda 13q14 delesyonları, 17p13 delesyonları ve 11q anormallikleri başta olmak üzere farklı kromozomal değişiklikler bulunmuştur (3).

En sık görülen translokasyon t (11;14) (q13;q32)'dir. Bazı olgularda myc ve ras genlerinde aşırı ekspresyon bildirilmiştir. IL-6 myeloma hücre proliferasyonu oluşumunda rol oynamaktadır (4).

EPİDEMİYOLOJİ

Yaşla birlikte myeloma sıklığı artar. İnsidans yıllık 4/100.000'dir. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülür. Zencilerde beyazlardan iki kat fazla gözlenir. Myeloma, beyazlarda tüm hematolojik tümörlerin % 13' ünü zencilerde ise % 33 ünü oluşturur (5).

PATOGENEZ VE KLİNİK BULGULAR

Myeloma olgularında kemik ağrısı en sık semptom olup yaklaşık vakaların % 70'inde bulunur. Ağrı genellikle sırt ve kaburgaları tutar, gece daha çok olur ve myeloma ağrısı hareket etmekle artar (2).

Myelomadaki kemik lezyonları tümör hücrelerinin proliferasyonu ve osteoklast aktivasyonu sonucu kemik yıkımına bağlı gelişir. Osteoklastlar myeloma hücreleri tarafından oluşturulan osteoklast aktivatör faktöre (OAF) duyarlıdır. OAF aktivitesi; IL-1, lenfotoksin ve TNF gibi birçok sitokin tarafından etkilenebilmektedir (6,15).

Myelomalı hastalarda, sonraki en sık klinik problem bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıktır. En sık görülen enfeksiyonlar pnömoni ve pyelonefrittir. Enfeksiyona yatkınlık için katkıda bulunan pek çok neden vardır. Myelomalı hastalar yaygın hipogammaglobulinemiye sahiptir. Hipogammaglobulinemi hem üretimin azalmasına hem de normal antikorların yıkımının artmasına bağlıdır. Bundan başka bazı hastalarda myelomaya cevap olarak oluşan dolaşan regülatuar hücreler normal antikor sentezini baskılayabilmektedir. Myelomada T hücre fonksiyonlarının çoğu normaldir, fakat CD4 hücreleri azalmış olabilir (7).

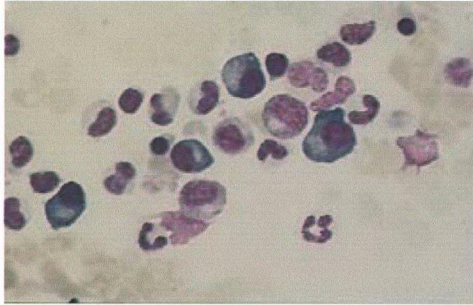
Myelomalı hastaların yaklaşık % 25'inde böbrek yetmezliği oluşur. En sık sebep hiperkalsemidir. Granüler amiloid depositler, hiperürisemi, tekrarlayan enfeksiyonlar ve bazen myeloma hücreleri tarafından böbreğin infiltre edilmesi gibi nedenler böbrek fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunabilir. Hafif zincir ekskresyonu ile tübüler hasar oluşabilir (8).

Myelomalı hastaların yaklaşık % 80'inde anemi oluşur. Bu genellikle normokrom-normositer olup genişleyen tümör hücreleri tarafından yapılan faktörlerin hematopoezi baskılaması sonucudur. Hemolize bağlı anemi, B12 veya folat eksikliğine bağlı megaloblastik anemi görülebilir (9).

Antikor kaplı trombositlerin fonksiyonlarını yapamaması veya I, II, V, VII veya VIII gibi pıhtılaşma faktörleri ile M komponentin etkileşimine bağlı olarak pıhtılaşma bozuklukları görülebilir. M proteininin fiziksel özelliğine bağlı hipervizkosite sendromu gelişebilir (10).

TANI VE EVRELEME

Multiple Myeloma'da ana bulgular; kemik iliğinde % 10 üzerinde plazma hücre artışı (şekil 1), litik lezyonlar ve serum ve/veya idrar M komponentinin saptanmasıdır.



Şekil 1:Kemik iliğinde plazma hücre artışı

Multiple Myeloma Tanı Kriterleri

Majör Kriterler:

1. Biopside plazmositom tanısı
2. Kemik iliğinde plazmasitoz (>% 30)
3. M komponent varlığı:

Serum: Ig G >3,5 g/dL

Ig A > 2 g/dL

İdrar: amiloidoz olmaksızın

>1g/24 saat kappa ve veya lambda hafif zincir atılımı
(Bence Jones protein)

Minör Kriterler:

1. Kemik iliğinde plazmositoz (% 10-30)
2. M komponentinin yukarıda belirtilen değerlerden daha az miktarda var olması
3. Litik kemik lezyonları
4. Azalmış normal immüoglobulinler (normalin>%50' si) ;

Ig G<600mg/dl

Ig A <100mg/dl

Ig M> 50 mg/dl

Myelom tanısı için en az bir majör ve bir minör veya 2 tanesi (1). ve (2). maddeler olmak üzere 3 minör kriter bulunması şarttır. Bu kriterler ilerleyici hastalığı olan semptomatik hastalarda değerlendirilmelidir.

Myeloma hastalarının klinik değerlendirmesi dikkatli bir fizik muayene ile kemiklerde hassasiyet ve kitle araştırmayı kapsamaktadır. Gögüs ve kemik radyografileri litik lezyonları veya diffüz osteopeniyi gösterebilir. Eritrosit, kalsiyum, üre-nitrojen, kreatinin ve ürik asit düzeyleri yükselmiş olabilir. Protein elektroforezi ve serum immünoglobulinlerinin ölçümü tanınması ve karakteristik M spike için faydalıdır (11).

Osteoblastik aktivite yokluğu nedeniyle yaygın kemik tutulumu olmasına karşın serum alkalen fosfataz genellikle normaldir. Bu hastalarda serum soluble IL-6 reseptör düzeyleri ve C-reaktif protein, IL-6'nın fizyolojik düzeylerini yansıtabilir.

Serum M komponenti hastaların % 53'ünde Ig G, %25'inde Ig A ve %1'inde Ig D iken; hastaların % 20'si serum ve idrarda sadece hafif zincire sahiptir. Hafif zincir izotipi yaşama süresi üzerine etkiye sahip olabilmektedir. λ hafif zincir sekrete eden hastalar kappa hafif zincir sekrete eden hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha kısa ortalama yaşama sürelerine sahiptirler.

Myeloma hastalarında evreleme sistemi klinik ve labaratuvar testlerine dayanan ve yaşama süresini önceden tahmin edebilecek fonksiyonel bir sistemdir. Bugün için kullanılan evreleme sistemi Durie-Salmon evrelemesidir. Bu evreleme sisteminde Hemoglobin, kalsiyum, M komponenti, iskelet tutulumunu derecesi ve total vücut tümör yükü temelinde düşük, orta veya yüksek evre belirlenir

(Tablo1) (11). Ayrıca multiple myelomlu hastalar serum kreatinin düzeylerine göre sınıflandırmaya edilmiş (Tablo2) ve yaşam süresi ile ilişkili saptanan β 2-mikroglobulin düzeylerine göre de sınıflandırılmıştır (Tablo3) (12).

Tablo1. Multiple Myelomada Durie-Salmon sınıflandırma sistemi

MULTİPL MYELOMA'DA DURİE-SALMON SINIFLANDIRMA SİSTEMİ:	
EVRE	KRİTER
I	Aşağıdakilerin hepsi <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobin >100 g/L (10g/dL)2. Serum kalsiyum <3 mmol/L (<12mg/dL)3. Normal kemik grafisi veya soliter lezyon4. Düşük M-komponent üretimi<ol style="list-style-type: none">a. Ig G düzeyi <50 g/L (5 g/dL)b. Ig A düzeyi >30 g/dL (3 g/dL)c. idrar hafif zincir <4 g/24 saat
II	Ne I'e ne de III'e uygun
III	Aşağıdakilerden bir veya birkaçı: <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobin <85g/dL (<8,5 g/dL)2. Serum kalsiyum >3 mmol/L (12 mg/dL)3. İleri litik kemik lezyonları4. Yüksek M-komponent üretimi<ol style="list-style-type: none">a. Ig G düzeyi >70 g/L (>7 g/dL)b. Ig A düzeyi >50 g/L (> 5g/dL)c. İdrar hafif zincirleri >12g/24 saat

Tablo 2. Multipl myelomalı hastalarda serum kreatinin düzeylerine göre subklasifikasyon

SERUM KREATİNİN DÜZEYLERİNE GÖRE SUBKLASİFİKASYON		
Düzy	Evre	Ortalama Yaşama Süresi, Ay olarak
A <177 µmol/L (< 2 mg/dL)	IA	61
B >177 µmol/L (>2 mg/dL)	IIA, B	55
	IIIA	30
	IIIB	15

Tablo 3. Multipl myelomalı hastalarda serum β2-mikroglobulin düzeylerine göre evreleme

SERUM β2-MİKROGLOBULİN DÜZEYLERİNE GÖRE EVRELEME		
Düzy	Evre	Ortalama Yaşama Süresi, Ay Olarak
<0,004 g/L (<4µg/mL)	I	43
>0,004 g/L (>4µg/mL)	II	12

Prognoz üzerine etki eden diğer faktörler sitogenetik bozukluktur. En sık görülen kromozomal anomali kromozom 13q ve t(4;14)'dür. Kemik iliğindeki plazma hücre yüzdesi, performans statusu ve serum IL-6, soluble IL-6 reseptörleri, C reaktif protein, hepatosit büyüme faktörü, kollajenin C terminal çapraz-bağlı telopeptidi, TGF- β ve sindekon 1 düzeyleri prognoz üzerine etkili diğer faktörlerdir (13).

ENDOTEL-ANGİOGENEZİS-VEGF

Endotel

Yarı geçirgen bir membran olarak endotel, arteriyel duvar içine ve kapiller ile venüllerin duvarları içinden, küçük ve büyük moleküllerin geçişlerini kontrol eder. Birçok bölgede intersellüler bileşkeler normalde böyle moleküllere geçirgen değildir. Fakat endotelyal hücreler arasındaki göreceli olarak labil olan bileşkeler yüksek kan basıncı gibi hemodinamik faktörler ve inflamasyondaki histamin gibi vazoaaktif ajanlar etkisinde genişleyebilir. Endotel hücre özellikleri ve fonksiyonları(14);

1. Permeabilite engelinin sürdürülmesi
2. Antikoagülan ve antitrombotik moleküllerin ayarlanması, hazırlanması (Prostosiklin, trombomodulin, plazminojen aktivatör, heparin benzeri molekül)
3. Protrombotik moleküllerin hazırlanması (von Willebrand faktörü, doku faktörü)
4. Plazminojen aktivatör inhibitörü
5. Extrasellüler matriks yapımı (kollajen, proteoglikan)
6. Kan akımı ve vasküler

reaktivitenin (Vazokonstriktörler: Endotelin, ACE) (Vazodilatörler: NO/EDRF, Prostosiklin) **7.** İnflamasyon ve immünitinin değerlendirilmesi (IL-1, IL-6, IL-8, adezyon molekülleri, HLA) **8.** Hücre büyümesinin düzenlenmesi (Büyümeyi uyarıcılar: PDGF, CSF, FGF) (Büyüme inhibitörleri: Heparin, TGF- β) **9.** DDL'nin oksidasyonu (15).

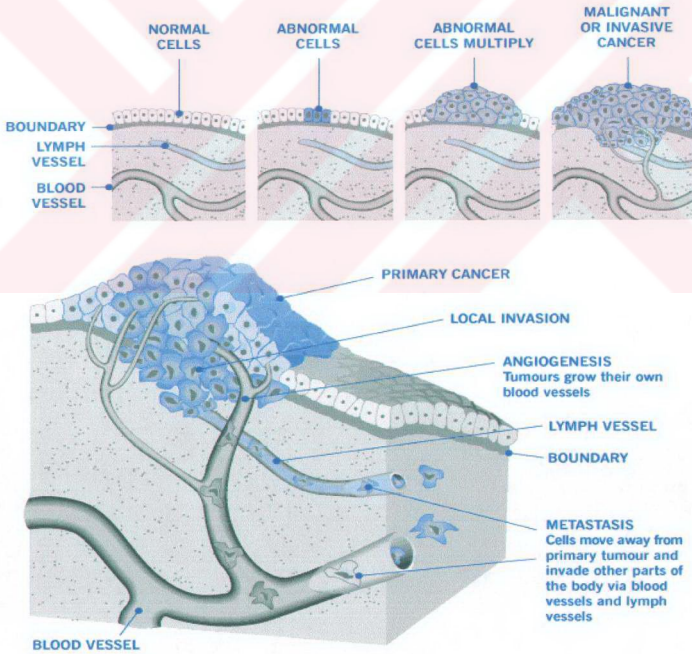
Endotel hemostaz, inflamasyon ve anjiogenez gibi ciddi biyolojik olaylarda önemli rol oynar. Vasküler hemostazın devam etmesi için endotelin yapısı ve fonksiyonları önemlidir. Kan ve doku arasındaki stratejik lokalizasyonu nedeni ile vasküler endotel mikroçevre kontrolü altında çok dinamik hücre popülasyonu içerir. Lokal, spesifik fonksiyonel ihtiyaçlara adaptasyon için, endotel hücreleri proinflamatuvar sitokinler, growth faktörler, infeksiyon ajanları, lipoproteinler ve oksidatif stres gibi patofizyolojik stimulus veya agonistlere yanıt verir. Bu çevresel baskı ile endotelial aktivasyonun uzaması disfonksiyon, hücre bağlantıları arasındaki irreversible kayıp, apoptoz ve nekroza yol açar.

Anjiogenezis

Anjiogenik süreç farklı fizyolojik ve patolojik durumlardaki vasküler desteğin sağlanmasında önemli rol oynar(16). Neovaskülarizasyon farklı solid tümörlerin büyüme, progresyon ve yayılımında anahtar bir basamak gibi tanımlanmıştır. Vaskülarizasyon artışı birçok tümörde kötü prognoz ile ilişkilidir(17-18). Anjiogenik

anahtar olarak da isimlendirilen tümör büyümesinin kritik proçesinin, angiogenesis stimülütatör ve inhibitörlerinin ekspresyon ve down-regülasyonunun dengesizliğinin başlattığı düşünülebilir (19). VEGF, b-FGF, HGF (hepatosit growth faktör) gibi farklı anjiogenik sitokinler anjiogenik aktiviteli potent mitojenlerdir (20-22). Onarım alanında bulunan damarların tomurcuklanması ile yeni damarların oluşumuna anjiogenesis veya neovaskularizasyon denir (Şekil 1).

Şekil 1. Angiogenesis



Anjiogenezis dört evrede ilerler;

- 1-) Bazal membran ve extrasellüler matriks parçalanması
- 2-) Endotel migrasyonu
- 3-) Endotel proliferasyonu (Mitoz)
- 4-) Organizasyon ve matürasyon (23).

VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü) ve b-FGF (Fibroblast büyüme faktörü) anjiogenezisi uyarıcı en önemli faktörlerdir. Her ikisi bazal membrandaki proteoglikanlara bağlanır ve bu yapılar hasarlanınca serbestleşir. Direkt veya indirekt olarak endotel hücrelerini uyarır. Bu ise bazal membranı parçalayan proteinazları salgılar, endotel hücre göçü ve proliferasyonu uyarır. Ve direkt olarak endotel hücre popülasyonunun ilerlemesi ile damarları oluşturur (24,25).

FGF; heparin ve diğer anyonik moleküllere sıkıca bağlanan polipeptid ailesidir. Bu nedenle bazal membrana karşı yoğun bir affinite gösterirler. Büyüme stimülasyonu yanı sıra temel FGF (b-FGF) anjiogenezisteki tüm basamaklarda uyarıcı etkiye sahiptir. Aktive makrofaj ve diğer hücrelerce serbestleştirilir.

VEGF; PDGF (Platlet türevi büyüme faktörü) ile kısmen homolog dimerik glikoprotein izoformları serisidir. VEGF aktivitesi ilk olarak tümörlerde gösterilmiştir. Tümörlerde yeni damar oluşumu (anjiogenezis) için merkezi bir rol üstlenir. Normal embriyonik gelişimde, yara iyileşmesinde, kronik iltihabi olaylarda yeni damar

oluşumunu uyarır ve vasküler geçirgenliğin belirgin olarak artmasından sorumludur. Hücre dışı matrikse plazma proteinlerinin birikiminin artmasına öncülük eder ve fibroblast ile endotelial hücreler için stroma sağlar. VEGF reseptörleri sadece endotelial hücreler üzerinde bulunur. Bu yüzden diğer hücrelere etkisi dolaylı yoldan olmaktadır (24-25).

VEGF ailesi yeni klasifikasyona göre VEGF-A (6p12-p21), VEGF-B (11q13), VEGF-C (4q34), VEGF-D (Xp22.31), VEGF-E (viral) ve PlGF (14q24-q31) içerir (26-31). Kromozom 6q12 de lokalize olan VEGF geni 7 intronun ayırdığı 8 exon'dan oluşur. Kode bölgesi 14kb'dır. En azından VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF 206 olmak üzere 5 protein ürünü vardır. Farklı VEGF izoformlarının heparin ve heparin sülfata affinitesi farklıdır. Bir çok hücre özellikle VEGF 121 ve VEGF 165 olmak üzere farklı tip VEGF'leri ifade eder.

Yapısal olarak VEGF-B, VEGF ile yakından ilişkilidir (32). Reseptöre bağlanan 167 aminoasitli ve çözünür serbest sekrete edilen 186 aminoasitli olmak üzere iki tipi içerir (33). VEGF-B, VEGF-A ve diğer büyüme faktörleri ile heterodimer oluşturabilir.

VEGF-C; prostat kansinomundan klonlanmıştır ve VEGF 165 ile % 30 homologdur (28). VEGF-C preprotein olarak sentezlenir ve basamak basamak proteolitik olarak yıkılarak reseptörüne afinitesi ve aktivitesi artar. VEGF-D (c-fos-uyarımlı büyüme faktörü) ise yeni

keşfedilen memeli VEGF'lerindendir (34).% 61 oranında yapısal ve proteolitik basamak olarak VEGF-C 'ye benzer. VEGF-E parapoxvirus genomunda keşfedilmiştir. OV-VEGF2 ve OV-VEGF7 olmak üzere iki tip VEGF benzeri form saptanmıştır. VEGF 121'e sırasıyla %29 ve %23 oranında benzer (35). İnsan plasentasından izole edilen PlGF, VEGF ile % 50 homologdur (31). 3 parçalı izoform izole edilmiştir. Bunlardan biri olan PlGF2 reseptör için neredeyse VEGF165 ile örtüşür (36-37). Biyolojik aktivite için PlGF/VEGF heterodimeri PlGF homodimerinden daha potenttir (38). Tüm VEGF proteinleri yapısal olarak benzerdir ancak reseptör bağlanması için farklı spektrumlara ayrılır.

VEGF reseptör ailesi en azından yüksek affiniteli 4 tiptir. Bu reseptörlerin üçü hücre yüzey proteini olan tyrosine kinase ailesindedir. Bu reseptörleri ligand spesifitesi VEGFR-1; VEGF-A, VEGF-B, PlGF1 ve PlGF 2 VEGFR-2; VEGF-A, C, D ve E. VEGFR-3; VEGF-C ve D 'dir (39). VEGFR-1 ve2 özellikle vasküler endotelde VEGFR-3 ise özellikle lenfatik endotelde bulunur (40). Neuropilin-1,2 (NRP-1 ve NRP-2) yüksek affiniteli, tyrosine kinase olmayan VEGF reseptörleridir ve VEGF-A, B, E, PlGF-2 yi bağlar. NRP'ler kısa sitoplazmik fonksiyonu tam olarak bilinmeyen reseptörlerdir. NRP-1 VEGF 165'in VEGFR-2 ye bağlanmasını 10 kat artırarak VEGF subtiplerinin en güçlü sinyal ileticisi olmasını sağlar co-reseptör) (39). NRP-1 vasküler endotel, nöron ve bazı tümör hücrelerinde bulunur ve VEGFR-1,2 ile birlikte expresse edilir. NRP-2 VEGF-C

bağlar, VEGFR-3 ile birlikte expresse edilir ve lenfatik sistemde bulunur (40).

VEGF kanser biyolojisinde kritik rol oynar. Tümör metastazi ve gelişimi için vazgeçilmez; anjiogenez ve lenfanjiogenez için anahtar olan endotel hücreleri için mitogen, motogen ve morfojendir. Son bilgiler VEGF nin tümör patogenezindeki rolünün daha önce bilinenlerden daha önemli olduğunu düşündürmektedir. VEGF'nin aşırı üretimi tümör ilişkili immünsüpresyon ile ilgilidir (41-43).

VEGF'nin tümör biyolojisindeki rolü kanser tanısı, prognozu ve tedavisi için klinik önemini işaret eder. Çalışmalar VEGF ekspresyonunun tümör dokusunda normal dokuya göre belirgin arttığını göstermektedir ve tümör grade' i, invazyon derinliği, nodal ve distal metastaz, TNM ve klinik stage ilişkilidir (44-48). VEGF ayrıca birçok kanser için prognostik faktördür. Bunlar arasında meme Ca, Over Ca, kolorectal Ca, küçük hücreli olmayan akciğer Ca, pankreas Ca sayılabilir (49-50). Tedavi amaçlı olarak birçok tümör tipi üzerinde çalışılmakta ve VEGF hedeflenerek anjiogenez inhibitörü test edilmektedir (35-36).

Tümörlerin büyümesini hücre kinetiği dışındaki faktörler de etkiler. Bunlardan en önemlisi kan akımıdır. Tümörler damarlanmadıkça 1-2 mm çap veya kalınlığı geçemez. Ayrıca anjiogenez malignite için gerekli bir olaydır, çünkü damar olmadıkça

tümör metastaz yapamaz. Tümörle ilişkili anjiogenik faktörler tümör hücrelerinin kendinde ve tümörü infiltre eden iltihabi hücrelerde yapılır .Tümörle ilişkili anjiogenik faktörlerden en önemli olan ikisi b-FGF ve VEGF'dir. TNF- α gibi makrofajdan kaynaklanan diğer anjiogenik faktörler de katkıda bulunur. Anjiogenezis tümör büyümesi üzerine iki yönlü etki gösterir; perfüzyonla besin maddeleri ve oksijen gelir ve yeni oluşan endotel hücreleri salgıladığı büyüme faktörleri ile tümörün büyümesini uyarır.

Anjiogenez sadece primer tümör büyümesi için değil, aynı zamanda metastaz içinde gereklidir. Oldukça vasküler tümörler, damarlara kolaylıkla ulaşacağından metastaza daha meyillidir(53).

MULTİPLE MYELOMADA ANJİOGENEZİS

Anjiogenezis üzerine yapılan son çalışmalarda kemik iliğinde neovaskülarizasyon ve anjiogenik faktörlerin ekspresyonun hematolojik malignensilerin patojenik mekanizmaları ile ilişkili olduğu saptanmıştır (54-55). Son çalışmalarda kemik iliği mikrovessel dansitesi(MVD)' nin artışının multiple myelomda prognostik faktör olduğu gözlenmiştir (56).

Multiple myelomda kemik iliği neovaskülarizasyonun multipl basamaklarında anjiogenik sitokin b-FGF önemli rol oynar. b-FGF'nin düşük affinite reseptörü syndecan-1 (CD138) myeloma hücrelerinin ve diğer neoplastik B hücrelerinin (46) yüzeyinde saptanmıştır ve

myeloma hücrelerinin büyümesinde düzenleyici etkisi vardır (58). Yapılan çalışmalarda syndecan-1 seviyesi myeloma hastalarında bağımsız bir prognostik faktör olarak tanımlanmıştır (59).

b-FGF ve VEGF lenfoproliferatif bozukluklardaki prognostik kullanımı NHL'lı hastalarla yapılan iki çalışmada gösterilmiştir (60-61). VEGF spesifik endotelial hücre mitojeni gibi vasküler permeabiliteyi potansiyel olarak uyarmıştır. Bunun multiple myelomlu hastaların kemik iliğindeki plazma hücreleri ve myelom hücre dizilerinde eksprese edildiği bulunmuştur (62). Başka bir anjiogenik faktör olan HGF, kan-damar oluşumu (22) ve tight-junction hasarına yol açarak hücre invazyonunu uyaran potansiyel bir mitojenik aktiviteye sahiptir (63). Bu karakteristik özelliklerinden dolayı yayılma (scatter) faktörü olarak isimlendirilir. Ek olarak HGF reseptörü protoonkogenik c-met (64) olarak tanımlanır ve myeloma hücre serilerinde saptanmıştır (65). Ayrıca myeloma büyüme faktörü IL-6, multiple myeloma anjiogenik aktivasyon yoluna dahil edilebilir (66).

DOLAŞAN ENDOTEL HÜCRELERİ (CEC)

Vasküler bozukluklarda endotelin önemli rol oynadığına dair geniş bir literatür desteği olmasına rağmen, hastalıkların gelişiminde *invivo* endotelial ilişki anlaşılabilmiştir. Çünkü vasküler doku non-invazif olarak ulaşılamaz ve birkaç spesifik markır vardır (67).

Bu problemi çözmek için ciddi patofizyolojik olaylarda kan damarlarından kopan dolaşan endotel hücre çalışmalarına ilgi artmıştır.

Endotoksin enjeksiyonu sonrası tavşan kanında hematopoetik olmayan muhtemel endotelial orjinli hücre varlığını ilk rapor eden Bouvier ve Lhadovec CEC (dolaşan endotel hücreleri) konsepti için öncüdür (68-69).

1970-1980 arasında birçok otör, riketsiya infeksiyonu, homosistein kullanımı veya kolesterolden zengin diyet kullanımı gibi durumlarda yapılan biyopsilerin vasküler alanlarında, sirkulatuar hücrelere benzer hücreler tanımlamışlardır. Bununla birlikte endotel hücre (EC) belirleme metodları (May Grünwald Giemsa boyama maddesini de içeren) endotel spesifik antikor yokluğunda kan örneklerinden EC belirlenmesinde yetersiz kalmıştır.

CEC'lerin periferik kandan saptanması ile ilgili; spesifik ayrımı ve çalışılması gibi iki problem mevcuttur. Bu sorunları çözmek için dolaşan lökositlerde bulunmayan ancak tüm tip endotel hücrelerinde var olan CD146'yı tanıyan endotelial hücre antikorunu (S-Endo 1) geliştirildi (70-71) (Şekil 2).

CEC ve CEP'ler cluster differentiation antijen (CD)'lere göre şu şekilde adlandırılır:

CEC'ler:

İstirahat CEC; CD45(-), CD133(-), CD105(-)

Aktive CEC ; CD45(-), CD133(-), CD105(+)

CEP'ler;

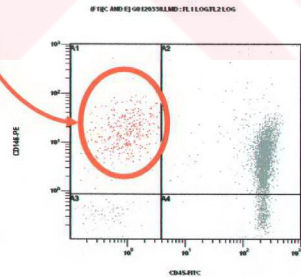
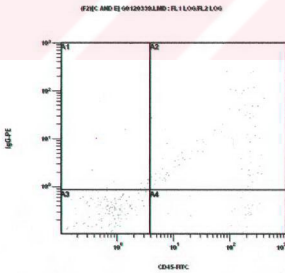
CEP hücresi; CD45(-), CD133(+), CD105(-)

İstirahat CEP; CD45(-), CD133(+), CD105(-)

Aktive CEP; CD45(-), CD133(+), CD105(+)) olarak tanımlanır.

Şekil 2. Dolaşan endotel hücrelerinin akım sitometresi ile belirlenmesi

CD45^{neg}CD146^{pos} Dolaşan Endotel Hücresel



•Negatif Kontrol: İzotipik Kontrol, CD45-FITC

•Test: CD146-PE, CD45-FITC

CD146 hücreleri; endotel hücrelerinde, melanoma hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, intermediate trofoblastlarda, belli hücre serilerinde; HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ve hematopoetik hücrelerin; yalnızca aktive T hücrelerinin bir alt grubunda bulunur.

Normal kişilerde seviyesi 3 hücre/ml altındadır.

CEC, intravasküler girişim, sickle cell anemi, riketsiyal ve CMV infeksiyonu, trombotik trombositopenik purpura, akut koroner sendrom ve Behçet gibi vasküler hasar yapan farklı durumlarda saptandı. Tüm bu durumlarda CEC düzeyi kanda 0-1500 hücre/ml saptanmıştır.

CEC hücreleri mevcut vasküler zedelenmeyi, neovaskülarizasyon potansiyelini gösterir.

Dolaşan endotel hücreleri vasküler hasarın ex vivo belirteci olarak rapor edilmektedir. Sayısı endotelyal lezyonun boyutuna bağlı olarak değişiyor olarak görünmektedir. Yüksek CEC sayısı yaygın vasküler hasar ile ilişkili olarak riketsiyal vaskülit, sickle cell krizi veya CMV infeksiyonunda saptanmıştır. Buna karşın koroner anjioplasti gibi lokalize damar hasarında da CEC sayısı yüksek-normal saptanmıştır. İlginç olarak sickle cell anemisinin ağrı epizodu, trombotik trombositopenik purpura hastalarında akut trombositopeni veya Behçet hastalığında akut serebral tromboz gibi hastalıkların akut fazlarında daha yüksek sayıda ölçülmüştür.

Akut fazlar arasında tedaviye yanıt veya klinik iyileşmeye bağlı olarak CEC sayısı normal değerlere yaklaşmaktadır.

Birçok olguda yüksek CEC sayımı; VWF, t-PA, PAI-1, solubl trombomodulin ve lökosit solubl adeziv molekül (ICAM-1, VCAM-1, E ve P selektin) gibi endotelial aktivasyonu yansıtan önemli plazmatik markır artışı ile ilişkilidir. Bu ilişki endotelin kronik aktivasyonunun hücre ayrılması ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu kantitatif bakışın yanında CEC'in sitolojik heterojenitesi patofizyolojik durumla ilişkilidir. Boyut olarak farklı, morfolojik olarak intakt hücreler anjioplasti ve sickle cell anemide; piknotik nükleuslu nekrotik hücreler riketsiyal enfeksiyonda; korunmuş nükleus ve sitoplazmalı nekrotik hücreler akut koroner sendromda sıklıkla gözlenir. Bu polimorfizmin nedeni bilinmemektedir. Farklı vasküler yataktan orjin alması ile veya farklı patolojik stimulus ile ilişkili olabilir. İlginç olarak akut koroner sendromlu ve sickle cell anemili donörlerin CEC'lerinin bir kısmı apoptotik patern gösterir. Bu durum endotelial özellikler için vasküler materyal sağlar (72-73).

Endotelden Hücre Ayrılma Mekanizması

Endotelin yapısal bütünlüğünden sorumlu mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. İnter endotelial reseptör, matriks adeziv protein, sitoskeletal komponentler, pro ve antianjiogenik growth faktör gibi birçok faktör önemli rol oynar. Vitronektin ve

fibronektin gibi matriks komponentlerine adezyonu sağlayan integrin ailesine ait adeziv moleküller ve ek olarak özellikle tek tabaka bütünlüğü kontrolünü içeren VE katherin üzerine özel bir ilgi gösterilmektedir. Bu moleküller spesifik ligandlarına bağlandıktan sonra sitoskeletal protein yapısını destekler.

İnvivo, CMV enfeksiyonu sırasında endotelyal ayrılma integrin $\alpha v\beta 3$ yokluğuna bağlıdır (74). İnvitro deneyimler enfekte hücrelerin defektif bağlanmasını fibronektin, laminin veya tip IV kollagen gibi matriks bağlanma proteinleri ile ilişkili göstermektedir. Bu invitro çalışmalar viral enfeksiyonun EC'nin bazal membran proteinleri ile interaksiyonunu inhibe ettiğini düşündürür(75). Bu etki HSV enfeksiyonundaki yaygın endotelyal ayrılmayı ve yetersiz vasküler onarımla sonuçlanabilir. Endotelyal ayrılma serin proteaz inhibitörleri ile inhibe edilir, bu durum proteaz salan granüositlerin önemli bir rol oynadığını düşündürür.

İntegrin $\alpha v\beta 3$ 'ün TNF ve INF ile indüklenen tümör EC ayrılmasının bir parçası olduğu bilinmektedir (76). İnvitro bu sitokinlere maruziyet EC'nin integrin $\alpha v\beta 3$ 'ün aktivasyonunu azaltarak $\alpha v\beta 3$ bağımlı EC bağlanma ve surveyini azaltmıştır. İnvivo olarak EC'nin apoptoz ve ayrılması TNF ve INF ile tedavi edilen melanom metastazlı hastalarda gösterilmiştir. Apoptozis hücre ayrılmasından sorumlu tek mekanizma değildir. Sickle cell hastalarda veya akut koroner sendrom hastalarında CEC apoptozu düşük seviyelerdedir(72-73). Sickle cell anemi hastalarında VEGF düzeyi

belirgin artmıştır. Bu durum VEGF'nin antiapoptotik özelliğini düşündürür.

Yapılan çalışmalar dolaşan endotelial prekürsör (CEP) olarak isimlendirilen potansiyel proliferatif CEC varlığını periferik kanda göstermiştir. Bu hücreler normal olgularda da doğal olarak vardır ve endotelial hücre ayrılması mekanizmasının her zaman hasara yanıt olarak oluşan patolojik bir durum olmadığını düşündürür (77-78). CEP damar duvarı kaynaklı EC'ye benzer endotel spesifik markırları eksprese eder.

Dolaşan endotel hücrelerini arttıran ve azaltan faktörler:

Arttıranlar:Anjina pectoris, ADP, adrenerjik uyarı, atheroskleroz, kalsiyum klorid 4 (yüksek doz) , kolesterol, endotoksin, egzersiz, homosistein, HT, hipertonic tuz solusyonu, hipotonik tuz solusyonu, iskemi, laktat, protamin, sigara içimi (80-81).

Azaltanlar: ACE inhibisyonu, düşük doz ASA, Ca kanal blokerleri, kalsiyom klorid 4 (düşük doz), klofibrat, digoxin, heparin, prostosiklin (82-84).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilimdalı Hematoloji Bilim Dalında yapılmıştır.

Çalışmaya, Eskişehir Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bölümünde tanı alan 24 yeni tanı almış olan veya relaps multiple myelomlu olgu ve 10 sağlıklı kontrol grubu alındı. Hastaların 12'si erkek 12'si kadındı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

Multiple myelomlu yeni tanı almış olgular veya relaps olan olgular

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

Bilinen koroner arter hastalığı, vaskülit, SLE, Behçet hastalığı olanlar

Heparin alanlar

Vasküler girişim yapılanlar

Trombotik olayı olanlar

CEC Bakılma Yöntemi

-K3EDTA 'lı tüplere her hastadan 2cc periferik kan alındı (12x75mm falkon[polystyrene round-bottom tube]).

-Daha sonra hazırlanan aşağıdaki 3 ayrı antikorlu tüplere 100'er µ/L kan, K3EDTA 'lı tüpten alınarak konuldu.

Tüp 1: MIgG1 FITC (fluorecein izothiocyanat), MouseIgG1PE (phycoerytrin), CD45 PerCp (peridinin chlorophyllprotein)

TÜP 2: CD105 FITC, CD34 PE, CD 45 PerCp

TÜP 3: CD146 FITC, CD133 PE, CD 45 PerCp

-Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübasyon sonrası, üzerlerine 2'şer cc dilue lysing solusyonu (eritrositleri lizis yaparak ortamdan uzaklaştırmak için) ilave edilerek 10 dakika beklenildi.

-1800 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan supernatant dökülüp, 2'şer cc PBS (fosfat buffer saline) ile yıkandı.

-Tekrar 1800 rpm'de santrifuj edildi. Oluşan süpernatant tekrar döküldü. 2'şer cc PBS konulup yıkanıp (toplam 2 kez yıkandı) 1800rpm'de santrifüj yapıldı. Dipte kalan pellet üzerine 500µL PBS konup resüspanse edildi.

-Becton Dickinson FACS Calibur (akım sitometri) cihazında cellquest programında 60.000 hücre acquisition ve analiz yapıldı.

Analizde: **CD34⁺ 105⁻** hücreler → İstirahat CEC
CD34⁺ 105⁺ hücreler → Aktive CEC
CD133⁺ hücreler → İstirahat CEP
CD146⁺133⁺ hücreler → Aktive CEP hücre
markırı olarak değerlendirildi.

%3,2` lik sitratlı tüplere aç olarak kan alındı. 3500 rpm`de 20 dakika santrifüj edilerek, plazmalar ayrılıp -70°C`de saklandı. Sonra toplu olarak; soluble CD146 (Biocytex kitleri) ve VCAM, VEGF (Biosource kitleri) düzeyleri ELISA yöntemi ile çalışıldı.

Çalışma verileri SPSS programında analiz edildi. İstatistiksel analizler Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İstatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Analiz için tek yönlü varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılmasında Chi-Square ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya, Eskişehir Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bölümünde yeni tanı alan ve relaps olan 24 multiple myeloma hastası ve 10 sağlıklı kontrol grubu alındı. Hastaların 12'si erkek 12'si kadındı.

Hematolojik parametrelerden hemoglobin, beyazküre, platelet, Immunglobülin G(IgG), IgM, IgA, protein elektroforezi, CRP, sedimentasyon, biyokimyasal parametrelerden kalsiyum, total protein, albumin, LDH çalışıldı. Hastaların çalışılan hematolojik ve biyokimyasal parametreleri, minimum, maksimum, ortalama değer ve standart sapmaları ile tablo 4'de toplu halde verilmiştir.

Tablo 4. Olguların Tedavi Öncesi Laboratuvar Değerleri

	Minumum	Maximum	Ortalama	Standart Sapma
Yaş	44	76	63,75	8,157
Hb(g/dl)	5,8	13,9	9,989	2,421
Beyazküre	2000	11800	6422,22	2673,52
Trombosit	23000	370000	183444,44	106572,4
Ca (mg/dl)	8,1	14,5	10,071	1,824
T.protein(g/dl)	6,3	11,7	7,829	1,59
Albumin (g/dl)	3,2	4,7	3,921	0,491
LDH	127	870	320,67	204,541
IgG	346	5880	2131,5	1906,43
IgA	15,7	4880	824,225	1469,93
IgM	6	74	27,17	22,667
CRP	0,156	28,8	6,30	9,55
Sedimantasyon	28	140	98,73	37,73

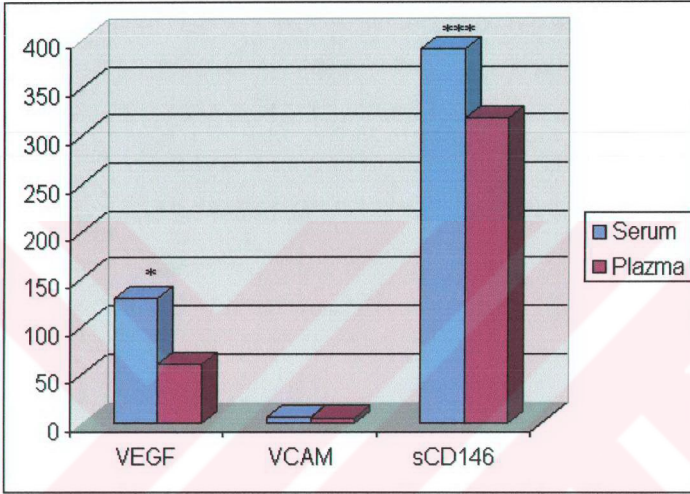
Multiple myelom tanısı alan 24 hastanın serum ve plazmalarında VEGF, VCAM ve sCD 146 çalışıldı. Serum ve plazmada çalışılan VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). VCAM ve sCD146 düzeyleri serumda plazmaya göre daha yüksekti; istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$) (Tablo 5, Grafik 1).

Tablo 5. Multipl myelom hastalarının serum ve plazmada çalışılan VEGFp, VEGFs, VCAMs, VCAMp, sCD146s, sCD146p düzeylerinin tedavi öncesi değerleri

	VEGF	VCAM	sCD146
SERUM	129,99±85,532	6,01±8,84	390,19±93,423
PLAZMA	61,19±56,541	4,9±6,81	317,96±84,099
P	*	***	***

* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Grafik 1. Multiple myeloma hastalarının serum ve plazmada çalışılan VEGFp, VEGFs, VCAMs, VCAMP, sCD146s, sCD146p düzeylerinin tedavi öncesi değerleri



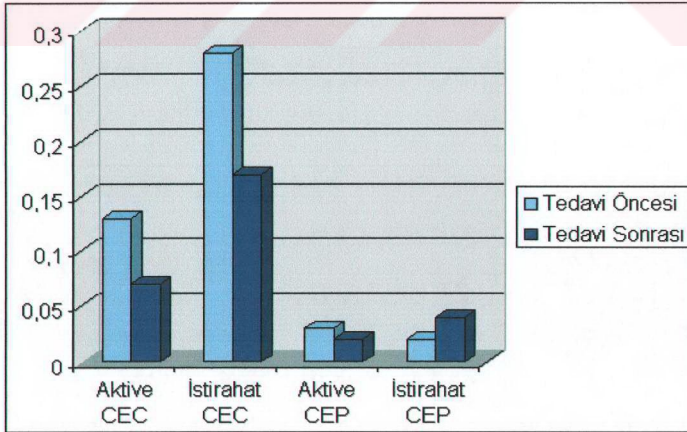
*P<0.05, *** P<0.001

Multiple myelomlu 24 olgudan 7'si (%29,1) tedavi öncesi ve sonrası değerlendirildi. Tedavi öncesi aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeylerinde tedavi sonrası azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p<0,05$) (Tablo 6,Grafik 2).

Tablo 6. MM'li Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Aktive CEC ve CEP ile İstirahat CEC ve CEP Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Tedavi Öncesi (n=7)	Tedavi Sonrası (n=7)	P
Aktive CEC (CD34⁺ 105⁺) %	0,13±0,1	0,07±0,12	>0.05
İstirahat CEC (CD34⁺ 105⁺) %	0,28±0,23	0,17±0,26	>0.05
Aktive CEP (CD146⁺ 133⁺) %	0,03±0,4	0,02±0,03	>0.05
İstirahat CEP (CD133⁺) %	0,02±0,02	0,04±0,05	>0.05

Grafik2. MM'li Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Aktive CEC ve CEP ile İstirahat CEC ve CEP Düzeylerinin Akım Sitometri Yöntemi İle Karşılaştırılması



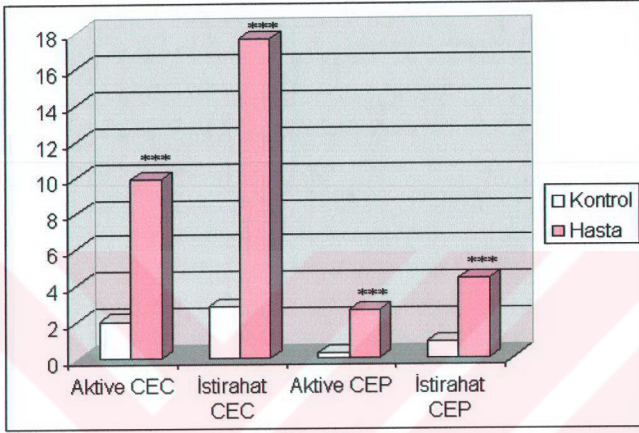
Multiple myelomlu 24 olgu ile 10 sağlıklı kontrol grubunun periferik kanındaki aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeyleri akım sitometri yöntemi ile karşılaştırıldı. Olguların periferik kanında aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 7, Grafik 3).

Tablo 7. MM'li Hastalarla Kontrol Grubunun Aktive CEC ve CEP ile İstirahat CEC ve CEP Düzeylerinin Akım Sitometri Yöntemi İle Karşılaştırılması

GRUP	N	ORTALAMA	SS	P
Aktive CEC CD34⁺ 105⁺				
Hasta	24	9,88	±6,952	***
Kontrol	10	2,04	±2,111	
İstirahat CEC CD34⁺ 105⁻				
Hasta	24	17,6	±16,54	***
Kontrol	10	2,86	±3,03	
Aktive CEP CD146⁺ 133⁺				
Hasta	24	2,650	±2,44	***
Kontrol	10	0,270	±0,43	
İstirahat CEP CD133⁺				
Hasta	24	4,379	±4,66	***
Kontrol	10	0,9	±0,84	

*** $P < 0,001$

Grafik 3. MM'li Hastalarla Kontrol Grubunun Aktive CEC ve CEP ile İstirahat CEC ve CEP Düzeylerinin Akım Sitometri Yöntemi İle Karşılaştırılması



*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

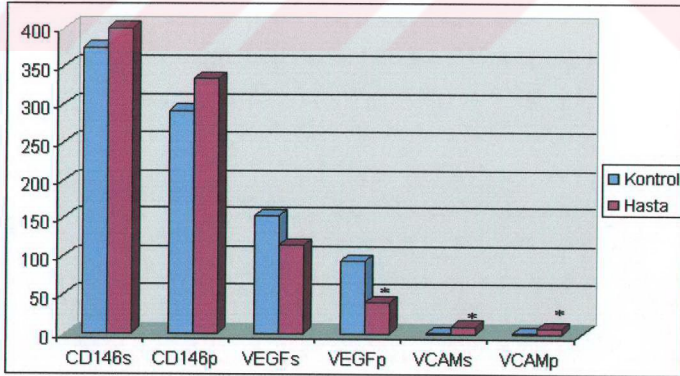
Multiple myelomlu olgular ile sağlıklı kontrol grubunda serum ve plazmada soluble CD146, VEGF ve VCAM düzeyleri karşılaştırıldı. Olgular ve kontrol grubu kıyaslandığında serum ve plazmada bakılan soluble CD146 değerlerinde her iki grupta anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). Olguların serumunda bakılan VEGF değerinde kontrol grubuna göre azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Multiple myelomlu olgularla kontrol grubu, plazma VEGF düzeyine göre kıyaslandığında kontrol grubunda VEGFp düzeyleri hasta grubuna göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). Multiple myelomlu olgularda kontrol grubuna göre hem serum hem de plazma VCAM düzeyleri yüksek gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 8, Grafik 4).

Tablo 8. MM'li Hastalarla Kontrol Grubunda Serum ve Plazma sCD146, VEGF, VCAM Düzeylerinin Karşılaştırılması

GRUP	N	ORTALAMA	SS	P
CD146s(+)				
Hasta	16	399,88	±88,84	
Kontrol	10	374,70	±103,22	
CD146p(+)				
Hasta	16	334,19	±80,474	
Kontrol	10	292,0	±87,383	
VEGFs(+)				
Hasta	16	115,10	±92,13	
Kontrol	10	153,61	±71,839	
VEGFp(+)				
Hasta	16	40,57	±42,22	*
Kontrol	10	94,19	±62,79	
VCAMs(+)				
Hasta	16	9,488	±9,77	*
Kontrol	10	0,454	±1,43	
VCAMP(+)				
Hasta	16	7,80	±7,32	*
Kontrol	10	0,256	±0,80	

*p<0.05

Grafik4. MM'li Hastalarla Kontrol Grubunda Serum ve Plazma sCD 146, VEGF, VCAM Düzeylerinin Karşılaştırılması



*P<0.05

	Hb	BK	Pt	Ca	T.prot	Alb	LDH	lg0	lgA	lgM	CRP	sedim
CD44_CD146	r=0,219 p>0,05	r=0,216 p>0,05	r=0,464 p>0,05	r=0,028 p>0,05	r=0,380 p>0,05	r=0,340 p>0,05	r=0,128 p>0,05	r=0,124 p>0,05	r=0,003 p>0,05	r=0,348 p>0,05	r=0,409 p>0,05	r=0,098 p>0,05
CD44	r=0,387 p<0,05	r=0,163 p>0,05	r=0,884 p<0,01	r=0,187 p>0,05	r=0,468 p>0,05	r=0,271 p>0,05	r=0,301 p>0,05	r=0,284 p>0,05	r=0,129 p>0,05	r=0,194 p>0,05	r=0,359 p<0,01	r=0,379 p>0,05
CD44s_133	r=0,085 p>0,05	r=0,043 p>0,05	r=0,018 p>0,05	r=0,083 p>0,05	r=0,179 p>0,05	r=0,264 p>0,05	r=0,254 p>0,05	r=0,457 p>0,05	r=0,047 p>0,05	r=0,374 p>0,05	r=0,210 p<0,05	r=0,404 p>0,05
CD44s	r=0,068 p>0,05	r=0,068 p>0,05	r=0,201 p>0,05	r=0,205 p>0,05	r=0,009 p>0,05	r=0,288 p>0,05	r=0,438 p>0,05	r=0,109 p>0,05	r=0,203 p>0,05	r=0,133 p>0,05	r=0,109 p>0,05	r=0,073 p>0,05
CD44s_1	r=0,333 p>0,05	r=0,160 p>0,05	r=0,561 p<0,05	r=0,024 p>0,05	r=0,589 p>0,05	r=0,200 p>0,05	r=0,238 p>0,05	r=0,377 p>0,05	r=0,128 p>0,05	r=0,887 p<0,05	r=0,333 p>0,05	r=0,041 p>0,05
CD44sp	r=0,164 p>0,05	r=0,048 p>0,05	r=0,305 p>0,05	r=0,043 p>0,05	r=0,213 p>0,05	r=0,335 p>0,05	r=0,624 p>0,05	r=0,359 p>0,05	r=0,122 p>0,05	r=0,385 p>0,05	r=0,088 p>0,05	r=0,028 p>0,05
VEGFa	r=0,600 p>0,05	r=0,455 p>0,05	r=0,609 p<0,05	r=0,288 p>0,05	r=0,133 p>0,05	r=0,418 p>0,05	r=0,202 p>0,05	r=0,430 p>0,05	r=0,287 p>0,05	r=0,042 p>0,05	r=0,273 p>0,05	r=0,138 p>0,05
VEGFp	r=0,084 p>0,05	r=0,064 p>0,05	r=0,145 p>0,05	r=0,238 p<0,05	r=0,374 p>0,05	r=0,168 p>0,05	r=0,048 p>0,05	r=0,091 p>0,05	r=0,127 p>0,05	r=0,224 p>0,05	r=0,027 p>0,05	r=0,165 p>0,05
VCAMa	r=0,147 p>0,05	r=0,028 p>0,05	r=0,037 p>0,05	r=0,122 p>0,05	r=0,728 p<0,05	r=0,368 p>0,05	r=0,610 p>0,05	r=0,163 p>0,05	r=0,585 p>0,05	r=0,166 p>0,05	r=0,330 p>0,05	r=0,111 p>0,05
VCAMp	r=0,284 p>0,05	r=0,101 p>0,05	r=0,147 p>0,05	r=0,122 p>0,05	r=0,728 p<0,05	r=0,368 p>0,05	r=0,610 p>0,05	r=0,087 p>0,05	r=0,160 p>0,05	r=0,117 p>0,05	r=0,488 p>0,05	r=0,213 p>0,05

Tablo 9. CEC, CD146 s-p hücrelerinin ve VEGF s-p, VCAM s-p düzeylerinin ile hematolojik ve biyokimyasal parametrelerle ilişkisi

Yapılan çoklu varyans analizinde multiple myelomlu olguların istirahat CEC düzeyleri ile hemoglobin ve trombosit arasında pozitif, CRP arasında ise negatif ilişki saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,01$).

Aktive CEP düzeyleri ile CRP düzeyleri arasında negatif korelasyon ve istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$).

Multiple myelomlu olguların serumunda bakılan VEGF düzeyi ile trombosit düzeyi arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel açıdan anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$). Olguların plazmasında bakılan VEGF düzeyi ile kalsiyum düzeyi arasında negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0,05$).

Multiple myelomlu olguların serumunda bakılan soluble CD146 düzeyi ile trombosit sayısı arasında negatif ilişki saptandı ve istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0,05$). Olguların serum ve plazmasında bakılan VCAM düzeyleri ile total protein arasında pozitif ilişki saptandı ve istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0,05$) (Tablo 9).

Multiple myeloma olgularında aktive CEC ile istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP arasında pozitif ilişki saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,01$). Plazma VEGF düzeyi ile aktive CEC düzeyi arasında ise negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0,05$). İstirahat CEC düzeyleri ile

aktive CEC, aktive CEP ve istirahat CEP arasında pozitif ilişki ve istatistiksel açıdan anlamlılık saptandı ($p<0,01$).

Aktive CEP düzeyleri ile aktive CEC ve istirahat CEP arasında pozitif korelasyon; plazma VEGF düzeyleri ile negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$, $p<0,05$).İstirahat CEP düzeyleri ile aktive CEC, istirahat CEC ve aktive CEP düzeyleri arasında pozitif, plazma VEGF düzeyleri ile negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0,01$) (Tablo 10)

Tablo 10. MM'li Hastalarda Aktive-İstirahat CEC ve CEP Düzeylerinin Serum ve Plazma VEGF ve Birbirleri İle Karşılaştırılması

	Aktive CEC	İstirahat CEC	Aktive CEP	İstirahat CEP	VEGFs	VEGFp
CD34⁺ 105⁺ Aktive CEC	$r=1,0$	$r=0,748$ P<0,01	$r=0,759$ P<0,01	$r=0,718$ P<0,01	$r=0,100$ P>0,05	$r=-0,429$ P<0,05
CD34⁺ 105⁻ İstirahat CEC	$r=0,748$ P<0,01	$r=1,0$	$r=0,684$ P<0,01	$r=0,473$ P<0,01	$r=0,110$ P>0,05	$r=-0,271$ P>0,05
CD146⁺ 133⁺ Aktive CEP	$r=0,759$ P<0,01	$r=0,684$ P<0,01	$R=1,0$	$r=0,686$ P<0,01	$r=0,230$ P>0,05	$r=-0,430$ P<0,05
CD133⁺ İstirahat CEP	$r=0,718$ P<0,01	$r=0,473$ P<0,01	$r=0,686$ P<0,01	$r=1,0$	$r=0,045$ P>0,05	$r=-0,552$ P<0,01

TARTIŞMA

Çalışmamızda yeni tanı almış olan veya relaps olan multiple myelom hastalarının periferik kanlarında akım sitometri ile dolaşan endotel hücrelerini gösteren CD34⁺ 105⁺ (aktive CEC), CD34⁺ 105⁻ (istirahat CEC), CD146⁺133⁺ (aktive CEP), CD133⁺ (istirahat CEP); serum ve plazmalarında VEGF, VCAM ve soluble CD146⁺'yı araştırdık.

Anjiogenezis ilerlemesi süren solid tümörlerde anahtar basamaktır. Myelomlu hastalarda hastalığın aktivitesine paralel olarak damarlanma artmıştır. Literatürde multiple myelomalı hastalarda yapılan CEC ile ilişkili bulgu bulamadık. Çalışmamızda multiple myelomlu 24 hastanın 7'sini tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırdık. Tedavi sonrası dönemde periferik kanda bakılan aktive-istirahat CEC ve aktive-istirahat CEP düzeylerinin düştüğünü ve kontrol grubu düzeylerine geldiğini saptadık ancak istatistiki anlamlılık derecesinde değildi. Olgu sayısının artırılması ile anlamlı düzeye çıkacağını düşünüyoruz.

Literatürdeki kanserli hastalarda tedavi öncesi ve sonrası CEC düzeyleri ile yapılan çalışmalardan biri; Orhan Sezer ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 20 kontrol grubu ve 76 yeni tanı almış kanser hastasında 4 renkli akım sitometri ile 46 meme Ca ve 36 lenfoma hastasında hem istirahat hem de aktive CEC düzeyi

beş kat yüksek saptanmıştır (85). Periferik kandaki istirahat ve aktive CEC düzeyleri kemoterapi sonrası tam remisyon sağlanan yedi lenfomalı hastada sağlıklı grupta benzer bulunmuş ve aktive CEC düzeyi 24 saat sonrasında on üç meme Ca 'lı hastada düşük saptanmıştır.

Çalışmamızda myelom hastalarında anjiogenezisi gösteren markır olan VEGF serum ve plazma düzeylerini araştırdık. Multiple myelomlu olguların serumunda VEGF değerlerini sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük saptadık. Serum VEGF artışı ile CEC düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptayamadık. Plazma VEGF ile aktive CEC düzeyi arasında ise negatif yönde ilişki saptadık. Orhan Sezer ve arkadaşlarının 67 Multiple Myelom ve MUGUS 'lu hastada yaptıkları çalışmada kemoterapiye yanıt veren hastalarda VEGF, b-FGF ve HGF seviyelerinde belirgin düşme saptamıştır (85). Literatürdeki diğer iki çalışmada Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda VEGF ve b-FGF 'nin prognostik etkileri gösterilmiştir (86). Bizim bulgularımız literatürdeki az sayıda çalışmadan farklı olup bu konunun yapılacak çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.

Çalışmamızda multiple myelom hastalarının plazma ve serumlarında soluble CD146 araştırdık. Fakat sCD146'nın serum ve plazma düzeylerini hasta ve kontrol grubu arasında farklı saptamadık. MM'da sCD146 ile ilgili literatürde veri bulamadık. Çalışmamızın sonucu sCD146'nın MM'da CEC markırı olarak kullanılamayacağını düşündürdü.

Çalışmamızda multiple myelomlu olguların periferik kanındaki aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeylerini sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptadık. Beerepoot LV ve arkadaşlarının 45 progresif kanser hastasında yaptıkları çalışmada normal hastalara kıyasla 3,6 kat daha fazla dolaşan endotel hücrlerine sahip oldukları saptanmışken, stabil hastalığı olanlarda ise sağlıklılara göre aynı oran tespit edilmiştir (87). Bu sonuç MM'li hastalarda periferik kandan aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeylerine bakılarak hastalığın aktivasyonunun saptanabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda relaps multiple myelom olgularında da CEC düzeylerinde artış tespit ettik. Beerepoot LV ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanser hastaları kendi aralarında, farklı CEC düzeylerine sahip oldukları için progresyonun rolü sorgulanmış ve hastalığın progresyonunun CEC artışına eşlik ettiği görülmüştür (87). Periferik kandaki CEC düzeylerine bakılarak MM progresyonu hakkında yorum yapılabilir sonucuna vardık.

Multiple myelomlu hastalarımızın CEC miktarında yaş ile artış yoktu. Meme Ca 'lı hastalarla yapılan bir çalışmada CEC düzeyi ile yaş arasında fark saptanmamıştır (85).

Çalışmamızda istirahat CEC düzeyleri ile hemoglobin ve trombosit sayıları arasında pozitif, CRP arasında negatif; aktive CEP düzeyleri ile CRP arasında negatif, serumda bakılan soluble CD146

ile trombosit sayıları arasında negatif, serum VEGF ile trombosit arasında negatif, plazma VEGF ile Ca arasında negatif, serum ve plazma VCAM düzeyleri ile total protein arasında pozitif ilişki saptadık. Meme ca'lı hastalarla yapılan çalışmada hasta grubunda istirahat ve aktive CEC düzeyleri ile beyaz küre, trombosit sayıları arasında korelasyon saptanmamıştır. Saptadığımız bu ilişkilerin yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda yeni tanı multiple myelom hastalarında CEC düzeylerini artmış saptadık. Artmış CEC düzeyi koroner arter hastalığı, akut myokard infarktüsü, infeksiyöz vaskülit, Behçet hastalığı, trombotik trombositopenik purpura, vasküler girişim gibi vasküler hasarın olduğu durumlarda artar. Yapılan çalışmalarda yeni tanı konmuş kanser hastalarında istirahat ve aktive CEC'ler artmış ve kürden sonra CEC düzeyleri azalmış olarak saptanmıştır. Bu artış tümör dokusundaki damarların artışıdır ya da tümör dokusundan salınan sitokinlerin komşu ya da uzak endotel hücre proliferasyonunu arttırmamasından ortaya çıkar. Hem solid tümör hem de hematolojik malignensilerde anjiogenez önemli rol oynar. Multiple myelomada da anjiogenez artmaktadır. CEC düzeylerinin artışı anjiogenezin bir göstergesi olabilir.

Çalışmamızda plazma VEGF ile CEC arasında kanser ile ilgili yapılan çalışmalardan farklı olarak negatif korelasyon tespit ettik. Literatürde meme Ca'lı hastalarda CEC ve plazma VEGF arasında ise pozitif korelasyon saptanmıştır (85).VEGF en çok tümör hücreleri

tarafından üretilir ve progenitör dolaşan endotel hücresi mobilizasyonunda görevlidir. Bu çelişkili sonuç daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesi için birçok yeni çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.



SONUÇLAR

1. Çalışmaya yaş ortalaması $63,75 \pm 8,157$ olan 12'si erkek, 12'si kadın toplam 24 multiple myelom hastalığı olan olgu dahil edildi.

2. Multiple myelomda olguların % 43,75'i Ig G, % 25 'i Ig A tipi MM idi.

3. Multiple myelomlu 24 olgunun serum ve plazmasında çalışılan VEGF düzeyleri sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede yüksek saptandı ($p < 0,05$).

4. Multiple myelomlu 24 olgunun 7 'si tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeylerinde tedavi sonrası azalma gözlemlendi ancak istatistiksel önemlilik düzeyin ulaşmadı.

5. Multiple myelomlu olguların tedavi öncesi periferik kanındaki aktive CEC, istirahat CEC, aktive CEP ve istirahat CEP düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p < 0,05$).

6. Multipl myelomlu 24 olgunun 16 'sı ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kandan bakılan plazma ve serum soluble CD146 düzeyleri arasında ilişki saptanmadı ($p > 0,05$).

7. Multiple myelomlu olguların serumunda bakılan VEGF değerleri kontrol grubuna göre daha düşük saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı değildi.

8. Multiple myelomlu olguların hem serum hemde plazma VCAM düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($p<0,05$).

9. Multiple myelomlu olguların istirahat CEC düzeyleri ile hemoglobin ve trombosit arasında pozitif, CRP ile arasında negatif ilişki saptandı.

10. Multiple myelomlu olguların sCD146 düzeyi ile trombosit arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı

11. Multiple myelomlu olguların serum VEGF düzeyi ile trombosit arasında pozitif, plazma VEGF ile Ca arasında negatif ilişki saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

12. Multiple myelomlu olguların serum ve plazma VCAM düzeyleri ile total protein arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı.

13. Multiple myelomlu olgularda aktive CEC, aktive ve istirahat CEP ile plazma VEGF arasında negatif korelasyon saptandı.

ÖZET

Multiple myelomada anjiogenezis artmaktadır. Dolaşan endotel hücreleri anjiogenezisin bir markıdır. Tümör gelişimi ve vaskülarizasyonda önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalında yeni tanı alan veya relaps olan multiple myelomlu 24 olguda ve 10 sağlıklı kontrolde istirahat CEC ve CEP düzeyleri ile aktive CEC ve CEP düzeylerini araştırdık.

Çalışmaya alınan 24 multiple myelom hastasının 12'si erkek 12'si kadındı. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası 7 hastanın aktive, istirahat CEC ve CEP düzeyleri MIgG1 FITC, MIgG1PE, CD45 PerCp, CD105 FITC, CD34 PE, CD146 FITC, CD133PE monoklonal antikorları kullanılarak akım sitometride (FACS Calibur BD) 3 renkli olarak analiz edildi. VEGF, VCAM ve sCD146 düzeyleri ELİSA yöntemi ile bakıldı. Tedavi öncesi CEC ve CEP düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekti ve tedavi sonrası CEC ve CEP düzeylerinde tedavi öncesi ile karşılaştırıldığında düşme saptandı.

Sonuç olarak; multiple myelomlu yeni tanı ve relaps olgularının periferik kanında CEC, CEP düzeyleri artmaktadır ve düzeylerine bakılarak hastalığın aktivasyonu ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

- 1.**Kyle RA,Therneau TM,Rajkumer SV,et al.A long term study of prognose in monoclonal gammopathy of undetermined significiance.N.Engl. J. Med 2002;346:564-569
- 2.**Kyle RA,Gertz MA,Witzing TE,et al.Rewiewof 1027 patient with newly diagnosid multiple myeloma.Mayo Clin Proc 2003;78:21-33.
- 3.**Greenlee RT,Hill-Harman MB,Murray T,et al.Cancer statistics,2001.CA Cancer J Clin 2001;15-36.
- 4.**French JD,Tsohumber RC,Jelinek DF.Dissection of the signaling requirements of interleukin 6 stimulated myeloma cell growth.Aota Oncol 2000 ;39:777-781.
- 5.**Howe HL,Winga PA,Thun MJ,et al.Annual report to the nation on the status of cencer,featuring cancers with recent increasing trends.J Nat Cacer Inst 2001;93:824-842
- 6.**Gherardi RK et al:Overproduction of proinflammatory cytokines imbalanced by their antagonists in POEMS syndrome.Blood 87:1458,1996
- 7.**Perri RT,Hebbel RP,Oken MM.İnfluence of treatment and responce status on infection risks in multiple myeloma.Am J Med 1981;71:935-940
- 8.**Knudsen LM,Hjarth M,Hippe E.Renal failure in multiple myeloma;reversibility and impact on the prognosis.Nardic Myeloma Study Group.Eur J Haematol 2000;65:175-181.
- 9.**İliçin G., Ünal s., Biberoğlu K. Temel İç Hastalıkları 1996; 1.cilt:1326-1332

- 10.** Kyle RA: Benign monoclonal gammopathy-after 20-35 yrs of follow up .Mayo Clin Proc 68:26, 1993
- 11.** Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma, correction of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 1975;36:842-854.
- 12.** Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, et al. β_2 mikroglobulin and bone marrow plasma cell involvement predict complete responders among patient undergoing blood cell transplantation for myeloma. Bone marrow transplant 1999;23:1261-1266.
- 13.** Griep PR: Prognosis in myeloma. Mayo Clin Proc 69:895, 1994
- 14.** Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P: Atherosclerosis, risk factors and vascular endothelium. Am Heart J 1996 (in press)
- 15.** Gimbrone MA Jr: Vascular endothelium in health and disease. In Haber E (ed): Molecular Cardiovascular Medicine. New York, Scientific American, 1995, pp 49-61
- 16.** Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med 1995;1:27-32.
- 17.** Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267:10931-10934
- 18.** Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation with invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991;324:1-8
- 19.** Hanhan D, folkman J. Patterns and emerging mechanisms of angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996;86:353,364

- 20.**Folkman J, Klagsbrun M.Vascular physiology.A family of angiogenic peptides.Nature 1987;329:671-672
- 21.**Schweigerer L, Neufeld G,Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D.Cappillary endothelial cells Express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth.Nature 1987;325:257-259
- 22.**Bussolino F, D Renzo MF, Ziche M, et al.Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth.J Cell Biol 1992;119:629-641
- 23.**Ausprunk DH:In Houck JC :Chemical Messengers of the KInflammatory Process.1999
- 24.**Dvorak HF, et al:Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor , microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.Am J Pathol 146:1029, 1995.
- 25.**Folkman J:Tumor angiogenesis.In Mendhelson J, et al :the Molecular Basis of Cancer.Philadelphia, WB Saunders, 1995, pp206-232
- 26.**MatteiMG,Borg JP,Rosnet O,Marme D,Birnbaum D,Assignment of vascular endothelial growth factor(VEGF)and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosomes 6p12-p21 ve 14q24-q31 regions,respectively.Genomics 1996;32;168-9
- 27.**Paavonen K,Horelli-Kuitunen N,Chilov D,Kukk E,Pennanen S,Kallioniemi OP,et al.Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34 ,respectively.Circulation 1996;93:1079-82

- 28.**Joukov V,Pajusola K,Kaipainen A,Chiolv D,Lahtinen I,Kukk E,et al.A novel vascular endothelial growth factor,VEGF-C,is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2)receptor tyrosine kinases.EMBO 1996;15(2):290-928(Erratum in :EMBO J.1996;15:1751).
- 29.**Yamada Y,Nezu J,Shimane M,Hirata Y,Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor,VEGF-D.Genomics 1997;42:483-8.
- 30.**Lyttle DJ,Fraser KM,Fleming SB,Mercer AA,Robinson AJ.Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxviruses orf virus.J.Virol 1994;68:84-92.
- 31.**Maglione D,Guerriero V,Viglietto G,Delik-Bovi P,Persico MG.Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:9267-71.
- 32.**Olofsson B,Korpelainen E,Pepper MS,Mandriota SJ,AaSE K,Kumar V,et al.Vascular endothelial growth factor B(VEGF-B)binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:11709-14.
- 33.**Makinen T,Olofsson B,Karpanen T,Hellman U,Soker S,Klagsbrun M,et al.Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoform to neuropilin-1.J Biol Chem 1999;274 :21217-22
- 34.**Achen MG,Jeltsch M,Kukk E,Makinen T,Vitalli A,Wilks AF,et al.Vascular endothelial growth factor D(VEGF-D)is a ligand for the

tyrosine kinases VEGF receptor (Flk 1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:548-53.

35. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR¹ and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3071-6.

36. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: Identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:493-8.

37. Park JE, Chen HH, Winner J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor . Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994 ;269:25646-54.

38. Disalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor. Placenta growth factor heterodimer . *J Biol Chem* 1995;270:7717-23.

39. Soker S, Takshima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin -1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform – specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45.

40. Stacher SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002;16:922-34.

41. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisselva E, Parman KS, Nadaf S, et al. VEGF inhibits T-cell development and may

contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003;101:4878-86.

42. Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res* 2001;23:263-72.

43. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1755-66

44. Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 1999;6:373-8.

45. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia SV. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999;5:823-9

46. Minagawa N, Nakayama Y, Hirata K, Onitsuka K, Inoue Y, Nagata N, et al. Correlation of plasma level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in patient with advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:2957-63

47. Chao C, Al-Saleem T, Brooks JJ, Rogatko A, Kraybill WG, Eisenberg B. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann Surg Oncol* 2001;8:260-7.

48. Lamszus K, Lengler U, Schmidt NO, Stavrou D, Ergun S, Westphal M. Vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor, basic fibroblast factor, and placenta growth factor in human meningiomas and their relation to angiogenesis and malignancy. *Neurosurgery* 2000;46:938-47.

- 49.**Dvorak HF.Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor:a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy.J.clin oncol 2002;20:4368-80.
- 50.**Toi M,Matsumoto T,Bando H.Vascular endothelial growth factor:its prognostic ,predictive ,and therapeutic implications.Lancet Oncol 2001;2:667-73.
- 51.**Rosen LS.Clinical experience with angiogenesis signalling inhibitors:focus on vascular endothelial growth factor(VEGF) blockers.Cancer Control 2002;9(2 suppl):36-44.
- 52.**Folkman J.Role of angiogenesis in tumor growth and metastasisi.Semin Oncol 2002;29(6 suppl 16):15-8.
- 53.**Folkman J : Clinical applications of research on angiogenesis.N Engl J Med 333:1757, 1995
- 54.**Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al.Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix matalloproteinase-2 secretion paralel progression of human multiple myelom.Blood 1999;93:3064-3073
- 55.**Perez –Atayde A, Ssllan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J.Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of childtren with acute lymhoblastic leukemia.Am J Pathol1997;150:815-821
- 56.**Sezer O, Niomöller K, Jakob C, et al.Bone marrow microvessel density is a prognostic for survival in patients with multiplr myeloma.Ann Hematol 2000;79:574-577

- 57.**Witzig T, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T.Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia.Leuk Lymphoma 1998;31:167-175
- 58.**Dhodapkar MV, Abe E,Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogte B, Sanderson RD,.Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology:control of tumor cell survival, growth and bone cell differentiation.Blood 1998;91:2679-2688
- 59.** Seidel C, Sundan a, Hjorth M, et al.Serum syndecan-1:a new independent prognostic marker in multiple myeloma.Blood 2000;95:388-392
- 60.**Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F, et al.Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma.Br J Haematol 1999;106:504-509
- 61.**Salven P, Teerenhon L,Joensuu H.A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma.Blood 1997;90:3167-3172
- 62.**Bellamy WT,Richter L,Frutiger Y,Grohan TM.Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hemotopoietic malinancies.Cancer Res 1999;59:728-733
- 63.**Stoker M,Gherardi E,Perryman M,Gray J.Scatter factor is a fibroblast –derived modulator of epithelial cell mobility.Nature 1987;327:239-242.

- 64.**Bottard DP,Rubin JS ,Faletto DL,et al.Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product.Science 1991;251:802-804.
- 65.**Borset M,Lien E,Espevik T,Helseth E,Wagge A,Sundan A.Concomitant expression of hepatocyte growth factor and the receptor c-met in human myeloma cell lines.J Biol Chem 1996;271:24655-24661.
- 66.**Dankbar B,Padro T,Leo R,et al.Vascular endothelial growth factor and interleukin -6 in paracrine tumor-stromal cell interaction in multiple myeloma.Blood 2000;95:2630-2636.
- 67.**Cines DB,Pollak ES ,Buck CA ,et al.Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.Blood 1999;91:3257-3561.
- 68.**Bouvier CA,Gaynor E,Cintron JR,Bernhardt B,Spaet TH.Circulating endothelium as an indication of vascular injury.Thromb Diath Haemorrh 1970;40:163
- 69.**Hladovec J.Circulating endothelial Cells as a sign of vessel wall lesion .Physiol Bohemoslov 1978;27:140
- 70.**George F,Poncellet P,Laurent JC,et al.Cytofluometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody.J Immunol Meth 1991;139:65-75.
- 71.**Bardin N,George F,Mutin M,et al.S-Endo 1,a panendothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen.Tissue Antigen 1996;48:531-539.
- 72.**Mutin M,Canavy I,Blann A,Borry M,Sampol J,Dignant-George F.Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction

and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999;9:2951-2953

73. Solevy A, Gui L, Ramakrishnan S, Steinberg MH, Herbel RP. Sick cell anemia as a possible state of enhanced antiapoptotic tone :survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood* 1999;11:3824-3830.

74. Grefte A, Van Der Giessen M, Van Son W, The H. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patting with an active CMV infection . *J infect Dis* 1993;167:270-277.

75. Visser MR, Vercellotti GM, McCarthy JB, et al. Herpes simplex virus inhibits endothelial cell attachment and migration to extracellular matrix proteins. *Am J Pathol* 1989;134:223-230.

76. Rüegg C, Yilmaz A, Bieller G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha v \beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN – gamma. *Nature Medecine* 1998;4:408-414.

77. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-968

78. Asahara T, Matsuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for pstrnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.

79. Ladovic J. Circulating endothelial cell as a sign of vessel wall lesion. *Physiol Bohemoslov* 1978;27:140-144

- 80.** Davis JW ,Shelton L,Eigenberg DA,et al.Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets.Clin Pharmacol Ther 1985;37:529-533.
- 81.** Davis JW,Levis IID Jr,Francis-Oliver A.Prevention of exercise – induced endothelium by isradipine in men with angina pectoris.Cardiology 1994;84:375-379
- 82.** Sinzinger II,Rauscha E,Fitsha P,et al.Beneficial effect of PGI₂ on circulating endothelial cells.Basic Res Cardiol 1988;83:597-601
- 83.** Ladovec J.The effect of digoxin on endothelium in rats and its modification by a combination of troxerutin and coumarin.Arzneimittelforschung 1978;28:982-983
- 84.** Ladovec J.The effect of heparin on endothelial stability.Thromb Res 1984;35:347-352
- 85.** Sezer O,Jakob C,Eucker J,Niemöller K,Gatz F,Wernecke K-D,Possinger K.Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor(bFGF),vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma.Eur J Haematol 2001;66:83-88:Munksgaard 2001.
- 86.** Vacca A,Ribatti D,Roncali L,et al.Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma.Br J Haematol 1994;87:503-508
- 87.** Beerpoot LV et al, Increase levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive diseases in cancer patients.Annals of Oncology 2004; 15:139-145