

Značaj određivanja koncentracije VEGF i ICAM-1 u plazmi radi procene rizika za razvoj venskog tromboembolizma kod pacijenata sa difuznim B-krupnoćelijskim limfomom

Uvod

Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL) predstavlja najčešći agresivni non-Hoćkin limfom (NHL) kod odraslih, čineći oko 30% svih slučajeva NHL. Odlikuju ga izrazito heterogene biološke osobine i varijabilan klinički tok (1). Iako je u eri imunohemioterapije postignut značajan napredak, između 30 i 40% pacijenata i dalje ima nepovoljan ishod, rani relaps ili refraktarnost na terapiju prve linije (2). Ovi podaci ukazuju na postojanje bioloških faktora rizika koji još uvek nisu adekvatno de inisani. Kao entitet koji pripada grupi agresivnih limfoma, DBKL je često praćen komplikacijama koje mogu kompromitovati ishod le enja i skratiti ukupno preživljavanje. Jedna od klinički najrelevantnijih komplikacija je povišen rizik od nastanka tromboznog događaja, odnosno tromboze udružene sa malignitetom (engl. cancer-associated thrombosis, CAT). U ovom kontekstu, pod tromboznim događajem podrazumevamo venski tromboembolizam (VTE), koji obuhvata duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu tromboemboliju (PTE), potvrđene odgovarajućim radiološkim metodama (3).

Učestalost tromboze kod onkoloških pacijenata je i do 18 puta viša nego u opštoj populaciji (4) i VTE predstavlja drugi najčešći uzrok smrtnosti kod ovih pacijenata, odmah nakon osnovne maligne bolesti (5). Aktivni malignitet prisutan je kod oko 20% pacijenata sa verifikovanim VTE, a VTE, posebno kod prethodno asimptomatskih osoba, može biti prvi klinički znak okultnog maligniteta; kod približno 4% pacijenata maligna bolest se dijagnostikuje unutar mesec dana nakon epizode VTE, dok rizik ostaje povišen tokom prve godine praćenja (4).

Među hematološkim malignitetima, DBKL se izdvaja visokim trombogenim potencijalom. Incidenca VTE iznosi i do 18.1% prema podacima iz realne kliničke prakse, što DBKL svrstava u grupu limfoma sa značajnim trombogenim potencijalom (6). Nasuprot tome, kod indolentnih limfoma stope VTE su značajno niže (1,5–4%), što dodatno naglašava biološku specifičnost i agresivnost DBKL-a (7).

Iako postoje klinički modeli za procenu rizika od VTE, njihova primena i preciznost kod limfoma su predmet debata. Najpoznatiji, Khorana skor (8), međutim, kako je ovaj skor razvijen i validiran prvenstveno u populaciji pacijenata sa solidnim tumorima, on pokazuje ograničenu diskriminativnu sposobnost kada se primeni na pacijente sa limfomima.

Sa ciljem prevazilaženja ovih ograničenja i preciznije procene rizika specifično kod limfomima, razvijen je i, interno i eksterno validiran, ThroLy skor, koji je sveobuhvatniji (9).

Ipak, zajednička karakteristika oba navedena modela je da se dominantno oslanjaju na kliničke karakteristike i standardne laboratorijske parametre. Ono što ovim kliničkim skorovima nedostaje jeste direktan uvid u molekularne mehanizme koji leže u osnovi hiperkoagulabilnog stanja. S obzirom na to da je tromboza kod maligniteta rezultat složene interakcije između tumorskih ćelija, hemostatskog sistema i krvnih sudova, postoji potreba za ispitivanjem specifičnih bioloških markera. Identifikacija biomarkera koji reflektuju procese angiogeneze

(kao što je vaskularni endotelni factor rasta, VEGF) i endotelne disfunkcije (kao što je intercelularni adhezioni molekul-1, ICAM-1) mogla bi da pomogne u razumevanju patofiziologije tromboze kod DBKL-a i omogući procenu rizika koja je biološki utemeljenija od isključivo kliničke stratifikacije.

Navedeni podaci ukazuju na imperativ identifikacije pouzdanih biomarkera koji bi, kao dopuna postojećim kliničkim modelima, omogućili individualizovanu procenu trombotskog rizika. Takav pristup bi olakšao donošenje odluke o primeni tromboprotekce, uz optimalno balansiranje koristi od prevencije VTE i rizika od hemoragijskih komplikacija.

Vaskularni endotelni faktor rasta je ključni regulator angiogeneze, procesa esencijalnog za rast i diseminaciju malignih ćelija (10, 11). Prekomerna ekspresija VEGF-a, zabeležena kod brojnih solidnih tumora i DBKL-a, korelira sa agresivnošću bolesti i lošijim ishodom (11, 12). Pored angiogeneze, VEGF indukuje aktivaciju endotela, povećava vaskularnu permeabilnost i ekspresiju tkivnog faktora, stvarajući protrombogeno mikrokruženje (13). Meta-analize sugerisu da su nivoi cirkulišućeg VEGF-a značajno viši kod onkoloških pacijenata sa trombozom u poređenju sa onima bez tromboze (13).

Intercelularni adhezioni molekul-1, transmembranski glikoprotein imunoglobulinske superfamilije, u fiziološkim uslovima ima nisku ekspresiju, koja se značajno povećava pod dejstvom proinflamatornih citokina. U tumorskom mikrokruženju, povišen nivo ICAM-1 na malignim i endotelnim ćelijama doprinosi adheziji leukocita i metastatskom potencijalu (14, 15). Značajno je da VEGF direktno indukuje ekspresiju ICAM-1 na endotelnim ćelijama (16), čime se uspostavlja veza između angiogeneze i inflamacije. Povišena ekspresija ICAM-1 olakšava adheziju leukocita i trombocita, što je inicijalni korak u trombogenezi (17). Međutim, prognostički značaj ICAM-1 za nastanak tromboze kod limfoma nije sistematski istražen.

Do danas, nijedna studija nije istovremeno ispitala koncentracije VEGF i ICAM-1 u plazmi kao biomarkere rizika za VTE specifično kod bolesnika sa DBKL-om. S obzirom na odsustvo adekvatnih prediktora koji bi obuhvatili molekularne mehanizme trombogeneze, istraživanje ovih biomarkera moglo bi značajno doprineti razumevanju patofiziologije tromboze i unapređenju stratifikacije rizika u ovoj populaciji.

Radna hipoteza

Koncentracije VEGF i ICAM-1 u plazmi, određene odmah nakon postavljanja dijagnoze, a pre započinjanja lečenja, kod bolesnika sa novodijagnostikovanim difuznim B-krupnoćelijskim limfomom, koreliraju sa rizikom od razvoja venskog tromboembolizma, kao i terapijskim ishodom, procenjenim kao ukupno preživljavanje i preživljavanje bez progresije bolesti.

Ciljevi istraživanja

1. Ispitati koncentracije VEGF-i ICAM-1 markera u plazmi i utvrditi njihovu povezanost sa prisustvom venskog tromboembolizma kod pacijenata sa novodijagnostikovanim difuznim B-krupnoćelijskim limfomom.
2. Utvrditi uticaj prisustva venskog tromboembolizma na terapijski odgovor, procenjen kao ukupno preživljavanje i preživljavanjem bez progresije bolesti kod pacijenata sa novodijagnostikovanim difuznim B-krupnoćelijskim limfomom.
3. Utvrditi povezanost demografskih karakteristika, kliničkih parametara bolesti i laboratorijskih nalaza, kao i koncentracija VEGF i ICAM-1 markera u plazmi sa terapijskim odgovorom procenjenim kao ukupno preživljavanje i preživljavanje bez progresije bolesti kod pacijenata sa novodijagnostikovanim difuznim B-krupnoćelijskim limfomom.

Matrijal i metode

Dizajn studije

Istraživanje će biti sprovedeno kao retrospektivno-prospektivna opservaciona studija. Podaci će biti prikupljeni iz medicinske dokumentacije pacijenata Klinike za hematologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS). Pre započinjanja lečenja za svakog pacijenta evidentiraće se demografske karakteristike, klinički parametri bolesti (prisustvo B simptoma, klinički stadijum limfoma, veličina tumorske mase), kao i laboratorijski nalazi (krvna slika, biohumoralni status, testovi hemostaze).

Evidentiraće se sve DVT i/ili PTE koji prethode do 3 meseca postavljanju dijagnoze DBKL, koje se dese od trenutka postavljanja dijagnoze do trenutka završetka lečenja primenom prve terapijske linije, kao i one dijagnostikovane u periodu praćenja od 6 meseci nakon završetka primene prve terapijske linije, uz podatak da li je primenjivana tromboprofilaksa. Takođe, za svakog pacijenta biće izračunati i vrednosti kliničkih modela, Khorana score i ThroLy score, skladu sa originalno publikovanim modelima (8,9). Khorana score bazira se na tipu maligniteta, vrednostima trombocita, hemoglobina i leukocita, kao i indeksu telesne mase (BMI) većem od 35 kg/m². Throly score uključuje: prethodni VTE, redukovanu pokretljivost, anamnezu o akutnom infarktu miokarda ili cerebrovaskularnom insultu, gojaznost (BMI >30 kg/m²), ektranodalnu lokalizaciju bolesti, zahvaćenost medijastinuma, neutropeniju i snižene vrednosti hemoglobina. Dobijeni skorovi biće korišćeni kao kovarijate u analizi rizika za nastanak VTE i terapijskih ishoda. Ishodi lečenja pratiće se kroz ukupno preživljavanje (overall survival, OS) i preživljavanje bez progresije bolesti (progression free survival, PFS).

Mesto i period

U istraživanje će biti uključeni pacijenti kod kojih je dijagnoza difuznog B-krupnoćelijskog limfoma postavljena u periodu od 2022. do 2024. godine. Određivanje parametara krvne slike, biohemije i testova hemostaze biće urađeno u Centru za medicinsku biohemiju UKCS i Odeljenju za visokospecijalizovanu hematološku dijagnostiku, Klinike za hematologiju,

UKCS. U cilju određivanja koncentracije VEGF i ICAM-1, od svih ispitanika biće uzeti uzorci pune krvi sa EDTA kao antikoagulansom. Uzorci će nakon prikupljanja biti transportovani u Institut za medicinska istraživanja, gde će se izdvojiti plazma, a zatim će se koncentracije faktora VEGF i ICAM-1 određivati primenom odgovarajućih ELISA kitova prema uputstvima proizvođača, uz očitavanje na ELISA Multiscan Plus čitaču ploča. Dobijeni rezultati biće upoređeni između grupa pacijenata koji su razvili VTE i onih koji nisu. Period ukupnog praćenja preživljavanja pacijenata definisan je od trenutka postavljanja dijagnoze DBKL-a zaključno sa januarom 2026, sa presekom praćenja na 12 meseci.

Selekcija ispitanika

U studiju će biti uključeni svi pacijenti sa histopatološki potvrđenom dijagnozom DBKL, stariji od 18 godina, prethodno nelečeni. Isključujući kriterijumi biće drugi tipovi NHL, prethodna antineoplastična terapija, kao i nepotpuna medicinska dokumentacija.

Pravni i etički preduslovi

Studija će biti sprovedena u skladu sa smernicama dobre kliničke i laboratorijske prakse, Helsinškom deklaracijom i važećom lokalnom regulativom. Za istraživanje je dobijeno odobrenje od strane Etičkog odbora Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (broj 95/90, 936/14 i 672/6), kao i odobrenje od strane Etičkog odbora Instituta za medicinska istraživanja (broj EO134/2020 i EO173/2026).

Statistička analiza

U radu će se koristiti metode deskriptivne i inferencijalne statistike. Od metoda deskriptivne statistike biće korišćene: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije, standardna devijacija i interkvartilni opseg) za numeričke podatke i relativni brojevi za kategorijalne podatke. Procena normalnosti raspodele podataka biće vršena primenom Shapiro–Wilk testa. Od metoda za testiranje statističkih hipoteza koristiće se Studentov t- test, Mann-Whitney test i Hi kvadrat test. U cilju identifikacije značajnih prediktora tromboze biće primenjena logistička regresiona analiza. U analizi preživljavanja biće primenjene Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja, Log-rank test i Cox-ova regresiona analiza. Vrednosti $p < 0.05$ biće smatrane pokazateljem statističke značajnosti. Sve statističke analize biće sprovedene korišćenjem IBM SPSS statističkog softvera (SPSS for Windows, release 25.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Potrebna veličina uzorka za detekciju veličine efekta od 0.3 u analizi varijanse sa dve grupe za varijable VEGF i ICAM-1 za nivo statističke značajnosti od 0.05 i statističku snagu od 0.95 iznosi 148. Veličina efekta dobijena je na osnovu pretpostavljenih odnosa vrednosti objašnjene i rezidualne varijanse od 0.1 prema 0.9. Izračunavanje veličine uzorka urađeno je pomoću programa G-power 3.1.6.

Procena kandidata o potencijalnom naučnom doprinosu

Očekuje se da će rezultati ovog istraživanja pružiti precizniji uvid u ulogu VEGF i ICAM-1 u patofiziologiji tromboze kod pacijenata sa difuznim B-krupnoćelijskim limfomom. Identifikacija ovih biomarkera kao nezavisnih prediktora venskog tromboembolizma mogla bi značajno unaprediti postojeće kliničke modele procene rizika, koji su trenutno ograničene prediktivne vrednosti u populaciji pacijenata sa limfomima.

Potvrđivanje prediktivne vrednosti ovih molekula omogućilo bi precizniju stratifikaciju pacijenata i razvoj individualizovanog pristupa u primeni tromboprolifakse. To bi direktno doprinelo smanjenju incidence VTE, kao i redukciji morbiditeta i mortaliteta povezanog sa trombotskim komplikacijama, uz istovremenu redukciju rizika za razvoj hemoragijskih komplikacija kod pacijenata sa niskim trombogenim rizikom. Nadalje, rezultati studije mogu poslužiti kao osnova za dalja istraživanja usmerena na razvoj ciljanih terapijskih strategija koje bi delovale na stabilizaciju endotela i inhibiciju pro-trombogenih mehanizama u malignitetu.

Reference

1. Sehn LH, Salles G. Diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2021;384:842–858.
2. Bock AM, Epperla N. Therapeutic landscape of primary refractory and relapsed diffuse large B-cell lymphoma: recent advances and emerging therapies. *J Hematol Oncol*. 2025;18(1):68.
3. Cox C, Roberts L. Basics of diagnosis and treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2025;23:1185–1202.
4. Tsantes AG, Petrou E, Tsante KA, Papadopoulos N, Panagiotou I. Cancer-associated thrombosis. *Cancers (Basel)*. 2024;16:2082.
5. Nguyen TTH, Do HN, Le TY, Nguyen TT, Nguyen TL, Le VQ. Venous thromboembolism risk in newly diagnosed lymphoma patients: a real-world prospective observational study from Vietnam National Cancer Hospital. *BMC Cancer*. 2025;25(1):1301.
6. Otasevic V, Gran C, Milic N, Ivanovic J, Kozarac S, Vukovic V, et al. Extracellular vesicles profile and risk of venous thromboembolism in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2025;26(12):5655.
7. Hohaus S, Bartolomei F, Cuccaro A, Di Rocco A, Patti C, Giachelia M, et al. VTE in lymphoma: risk stratification and prophylaxis. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1291.
8. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008;111:4902–4907.
9. Antic D, Milic N, Nikolovski S, Jovic S, Ristic S, Stanojevic P, et al. Development and validation of multivariable predictive model for thromboembolic events in lymphoma patients. *Am J Hematol*. 2016;91:1014–1019.
10. Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, Pourgholami MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol*. 2023;949:175586.
11. Nishida N, Yano H, Nishida T, Arakawa T, Matsuura N, et al. Angiogenesis and VEGF signaling. *Cancer Sci*. 2021;112:3671–3681.

12. Jiang L, Sun JH, Quan LN, Zhang Y, Li X, et al. Abnormal vascular endothelial growth factor protein expression may be correlated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):605–611.
13. Brown AM, Nock S, Musgrave K, Unsworth AJ. VEGF as biomarker for cancer-associated thrombosis: meta-analysis. *TH Open.* 2025;9:e25134381.
14. Chen Z, Wang H, Li J, Zhang Q, Liu Y, et al. ICAM-1–suPAR–CD11b axis and metastasis. *Cancer Res.* 2023;83:2561–2574.
15. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1379–1386.
16. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Kim DH. VEGF induces ICAM-1 via p38 MAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1379–1386.
17. Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta.* 2023;548:117487.