

Patrycja Sujka-Kordowska

**Ocena ekspresji czynników
regulujących angiogenezę
w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci**

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Michał Nowicki

**Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Poznań 2011

Badania finansowane z projektu MNiSW
nr umowy 0059/B/P01/2008/35

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi – **dr. hab. Michałowi Nowickiemu**,
za ogromne wsparcie i wyjątkowy czas,
którym było przygotowywanie niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję także
Panu Profesorowi Maciejowi Zabłowi
oraz wszystkim **Pracownikom Katedry**,
za pomoc, życzliwość i wyjątkową atmosferę.*

Ukochanym Rodzicom i Pawłowi

Spis treści

| | |
|---|----|
| WYKAZ SKRÓTÓW | 7 |
| 1. WSTĘP | 9 |
| 1.1 Angiogeneza | 9 |
| 1.1.1 Angiogeneza – definicja, mechanizm i znaczenie | 9 |
| 1.1.2 Regulacja procesu angiogenezy | 12 |
| 1.1.2.1 Rodzina naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF | 13 |
| 1.1.2.2 Łożyskowy czynnik wzrostu PlGF | 15 |
| 1.1.2.3 Endoglina ENG /antygen CD105..... | 17 |
| 1.1.2.4 Cyklooksygenaza 1 COX-1/PTGS1 | 19 |
| 1.1.3 Angiogeneza a proces nowotworowy | 20 |
| 1.1.3.1 Angiogeneza w guzach litych | 21 |
| 1.1.3.2 Angiogeneza w nowotworach limfoproliferacyjnych..... | 22 |
| 1.2 Ostra białaczka limfoblastyczna ALL u dzieci | 24 |
| 1.2.1 Epidemiologia i etiologia ostrej białaczki limfoblastycznej | 25 |
| 1.2.2 Diagnostyka ostrej białaczki limfoblastycznej | 25 |
| 1.2.3 Angiogeneza a ostra białaczka limfoblastyczna | 27 |
| 1.3 Metody oceny ekspresji genów | 28 |
| 1.3.1 Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA | 29 |
| 1.3.2 Analiza ekspresji genów na poziomie białka | 30 |
| 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY | 32 |
| 3. MATERIAŁY I METODY | 33 |
| 3.1 Pacjenci | 33 |
| 3.2 Profil ekspresji genów | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.1 | Izolacja frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej | 33 |
| 3.2.2 | Izolacja RNA | 34 |
| 3.2.3 | Odwrotna transkrypcja..... | 35 |
| 3.2.4 | Reakcja łańcuchowej polimerazy PCR w czasie rzeczywistym | 35 |
| 3.3 | Ekspresja białek | 39 |
| 3.3.1 | Badania immunocytochemiczne | 39 |
| 3.3.2 | Badania immunofluorescencyjne..... | 40 |
| 3.3.3 | Ocena reakcji immunocytochemicznych i immunofluorescencyjnych .. | 41 |
| 3.4 | Analiza kliniczna | 41 |
| 3.5 | Analiza statystyczna..... | 42 |
| 3.5.1 | Analiza profilu ekspresji genów | 42 |
| 3.5.2 | Analiza ekspresji białka | 43 |
| 3.5.3 | Zagadnienia etyczne..... | 43 |
| 4. | WYNIKI | 44 |
| 4.1 | Obserwacja kliniczna | 44 |
| 4.2 | Profil ekspresji genów..... | 45 |
| 4.2.1 | Izolacja RNA | 45 |
| 4.2.2 | Ocena jakości uzyskanych w wyniku reakcji PCR danych | 45 |
| 4.2.3 | Analiza profilu ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w grupie pacjentów z ALL w porównaniu do grupy kontrolnej bez rozpoznania choroby nowotworowej | 47 |
| 4.3 | Ekspresja białka | 51 |
| 4.3.1 | Ekspresja antygenu CD10..... | 51 |
| 4.3.2 | Ekspresja endogliny/CD105 | 52 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.3.3 | Ekspresja łożyskowego czynnik wzrostu PIGF | 53 |
| 4.3.4 | Ekspresja cyklooksygenazy 1 COX-1 | 54 |
| 4.3.5 | Porównanie ekspresji antygenów CD105, PIGF, COX-1 i CD10 z obrazem klinicznym choroby..... | 55 |
| 5. | OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA..... | 57 |
| 6. | WNIOSKI | 74 |
| 7. | STRESZCZENIE..... | 75 |
| 8. | SUMMARY | 78 |
| 9. | PIŚMIENNICTWO..... | 81 |
| 10. | DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA | 105 |
| 11. | ZAŁĄCZNIK 1..... | 116 |

WYKAZ SKRÓTÓW

| | |
|----------|--|
| (b)FGF – | <i>(basic) fibroblast growth factor</i> , (zasadowy) czynnik wzrostu fibroblastów |
| ACTB – | <i>β-actin</i> , β-aktyna |
| ALK – | <i>activin receptor-like kinase</i> , kinaza ALK |
| ALL – | <i>acute lymphoblastic leukemia</i> , ostra białaczka limfoblastyczna |
| AML – | <i>acute myeloid leukemia</i> , ostra białaczka nieлимfoblastyczna |
| Ang – | angiopetin, angipoetyna |
| ANPEP – | <i>alanyl (membrane) aminopeptidase</i> , aminopeptydaza alanylowa |
| APL – | <i>acute promyelocytic leukemia</i> , ostra białaczka promielocytowa |
| B2M – | <i>β-2-microglobulin</i> , mikroglobulina β-2 |
| BMP – | <i>bone morphogenetic protein</i> , białko morfogenetyczne kości |
| CALLA – | <i>common acute lymphoblastic leukemia antigen</i> , antygen ostrej białaczki limfoblastycznej |
| CD – | cluster of differentiation, kompleks różnicowania, symbolem i liczbą oznaczane są poszczególne antygeny powierzchniowe |
| COX – | <i>cyclooxygenase</i> , cyklooksigenaza |
| DAB – | 3,3'-diaminobenzodyna |
| ECM – | <i>extracellular matrix</i> , macierz zewnątrzkomórkowa |
| EDTA – | kwas etylenodiaminotetraoctowy, antykoagulant |
| EGF – | <i>epithelial growth factor</i> , nabłonkowy czynnik wzrostu |
| ENG – | <i>endoglin</i> , endoglina |
| eNOS – | <i>endothelial nitric oxide synthase</i> , synteza tlenku azotu pochodzenia śródbłonkowego |
| GAPDH – | <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza aldehydowa 3-fosfoglicerynowa |
| HGF – | <i>hepatocyte growth factor</i> , czynnik wzrostu hepatocytów |
| HIF – | <i>hypoxia inducible factor</i> , czynnik aktywowany przez niedotlenienie |
| HPRT1 – | <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> , fosforybozyltransferaza hipoksantynowa 1 |
| HPSE – | <i>heparanase</i> , heparanaza |
| HUVEC – | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> , komórki śródbłonkowe ludzkiej żyły pępowinowej |

| | |
|----------------|---|
| Ki-67 – | antygen komórek proliferujących |
| MDR – | <i>minimal residual disease</i> , choroba resztkowa |
| MLL – | <i>mixed-lineage leukemia gene</i> , gen białaczki mieszano-liniowej |
| MM – | <i>multiple myeloma</i> , szpiczak mnogi |
| MMP – | <i>matrix metalloproteinases</i> , metaloproteiny |
| MVD – | <i>microvessel density</i> , gęstość unaczynienia |
| Nrp – | <i>neuropilin</i> , neuropilina |
| PBMCs – | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , komórki jednojądrzaste krwi |
| PBS – | <i>phosphate buffered saline</i> , sól fizjologiczna buforowana fosforanami |
| PDGF – | <i>platelet derived growth factor</i> , płytkowy czynnik wzrostu |
| PGs – | <i>prostaglandins</i> , prostaglandyny |
| Ph – | chromosom Philadelphia |
| PIGF – | <i>placental growth factor</i> , łożyskowy czynnik wzrostu |
| PTGS1 – | <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i> , cyklooksygenaza 1 |
| RPL13a – | <i>ribosomal protein L13a</i> , białko rybosomalne L13a |
| TF – | <i>tissue factor</i> , czynnik tkankowy |
| TGF β – | <i>transforming growth factor β</i> , transformujący czynnik wzrostu β |
| Tie – | <i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i> , receptor dla angiopoetyny o aktywności kinazy tyrozynowej |
| TIMP2 – | <i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i> , inhibitor 2 metaproteinaz |
| TNFAIP2 – | <i>tumor necrosis factor, α-induced protein 2</i> , białko 2 indukowane TNF α |
| TNF α – | <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów α |
| TNM – | <i>tumor-node-metastasis</i> , klasyfikacja służąca do oceny stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu |
| TVA – | <i>total vascular area</i> , całkowity obszar naczyń |
| TYMP – | <i>thymidine phosphorylase</i> , fosforylaza tymidyny |
| VEGF – | <i>vascular endothelial growth factor</i> , naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu |
| VEGFR – | receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu |

1. WSTĘP

1.1 Angiogeneza

1.1.1 Angiogeneza – definicja, mechanizm i znaczenie

Powstawanie naczyń krwionośnych jest warunkiem koniecznym rozwoju i różnicowania organizmu podczas embriogenezy. Z tego też powodu układ krążenia u kręgowców rozwija się jako pierwszy (Breier, 2000). Również w trakcie życia pozapłodowego tworzenie naczyń ma olbrzymie znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Nieprawidłowa waskulatura oraz zaburzenia budowy lub funkcji naczyń mogą być przyczyną wielu chorób organizmu, a nawet mieć charakter letalny (Carmeliet, 2003).

Tworzenie nowych naczyń następuje w wyniku zachodzenia trzech procesów: waskulogenezy, angiogenezy oraz arteriogenezy.

Pierwszy z nich charakterystyczny jest dla okresu embrionalnego i polega na formowaniu naczyń krwionośnych z komórek macierzystych śródbłonka – hemangioblastów, powstających w wyspach krwionośnych woreczka żółtkowego zarodka. Efektem jest wytworzenie pierwotnego splotu naczyniowego w 3 tygodniu embriogenezy w obszarach nieunaczynionych (Battegay, 1995, Risau i Flamme, 1995, Dvorak, 2000, Giordano, 1999, Distler i wsp., 2003). W życiu pozapłodowym nie dochodzi do tworzenia naczyń krwionośnych na drodze waskulogenezy (Risau i Flamme, 1995). Wyjątkiem są pewne stany patologiczne takie jak: choroby nowotworowe, uszkodzona rogówka czy niedokrwienie kończyn dolnych, gdzie obserwuje się powstawanie nowych naczyń krwionośnych z udziałem komórek prekursorowych śródbłonka (Nacov, 1990, Asahara i wsp., 1997, Takahashi i wsp., 1999).

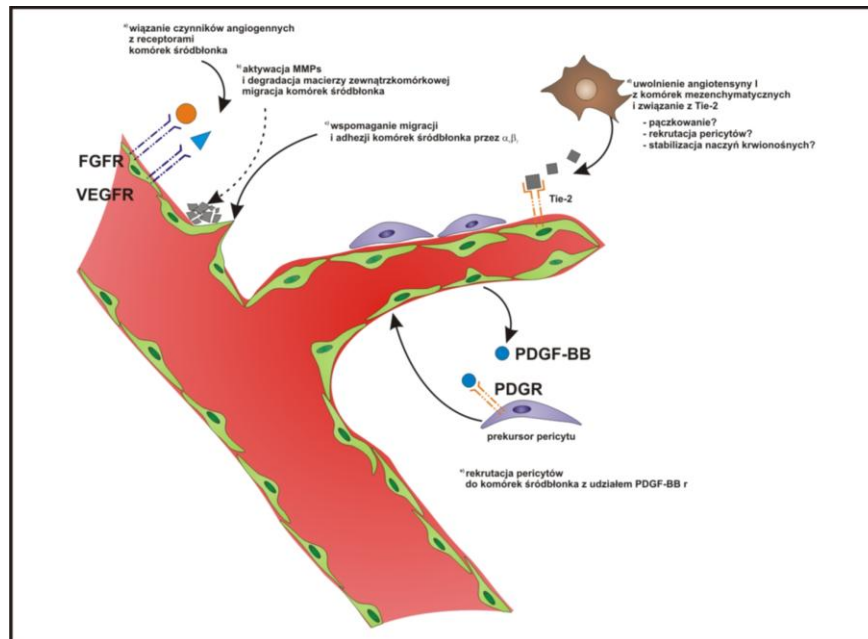
W dalszych etapach rozwoju płodowego naczynia krwionośne powstają w wyniku angiogenezy (zwanej także neowaskularyzacją) oraz arteriogenezy. Arteriogeneza polega na przekształcaniu istniejących tętniczek kolateralnych w funkcjonalne tętnice w następstwie pogrubienia ich warstwy mięśniowej, czego efektem jest nabywanie przez nie właściwości wazomotorycznych (Koerselman i wsp., 2003). W wyniku transformacji małych naczyń powstają tętnice przewodzące o 20-krotnie większej średnicy. Zachodzenie arteriogenezy jest także obecne w życiu

pozapłodowym organizmie (np. w dojrzałym niedokrwionym i niedotlenionym sercu (van Royen i wsp., 2001).

Z kolei angiogeneza jest procesem, w którym z naczyń krwionośnych już istniejących powstają nowe, co odbywa się przez pączkowanie komórek śródbłonka ścian i końców kapilar. Angiogeneza jest także główną drogą tworzenia naczyń w okresie życia pozapłodowego. W tym przypadku jest ona charakterystyczna dla specyficznych, fizjologicznych sytuacji. Zachodzi w pewnych etapach cyklu menstruacyjnego – podczas remodelowania śluzówki macicy oraz formowania ciała żółtego (Hazzard i Stouffer, 2000). Jest także niezbędna podczas implantacji zarodka do błony śluzowej macicy i formowania łożyska (Smith, 2000). Fizjologiczną angiogenezę obserwuje się również w krezce jelita oraz w trakcie kostnienia na podłożu chrzęstnym (Gerber i wsp., 1999b, Horner i wsp., 1999, Carlevaro i wsp., 2000, Haigh i wsp., 2000). Proces neowaskularyzacji towarzyszy także powstawaniu ziarniny podczas gojenia się ran (Witte i Barbul, 1997). Angiogeneza jest również kluczową komponentą patogenezy wielu chorób. Odgrywa ona istotną rolę w rozwoju przewlekłych zapaleń: łuszczycy, reumatoidalnego zapalenia stawów czy astmy (Folkman, 1995a, Carmeliet i Jain, 2000). Jest jednym z elementów zaangażowanych w powstawanie i przebieg schorzeń gastrologicznych (choroba Crohna, wrzodziejące zapalenia jelita grubego), kardiologicznych (miażdżyca, choroba niedokrwienności mięśnia sercowego, siniczne wady serca, neuroinfekcji oraz cukrzyca) (Ferrara i Henzel, 1989, Folkman, 1995b, Limb i wsp., 1999, Salgado i wsp., 2001, Carmeliet, 2003, Terai i wsp., 2003). Proces ten związany jest także z tworzeniem tkanki tłuszczowej, co sugeruje jego udział w powstawaniu otyłości (Bouloumié i wsp., 1998). Bez wątplenia, angiogeneza odgrywa ogromną rolę w rozwoju chorób nowotworowych, warunkując zarówno wzrost guza, jak i tworzenie przerzutów (Folkman, 1971, Folkman, 1995a, Folkman, 1995b).

Angiogeneza jest procesem złożonym i wieloetapowym (Carmeliet i Jain, 2000). W pierwszym etapie dochodzi do zwiótczenia naczyń krwionośnych oraz aktywacji komórek śródbłonka naczyniowego, co jest uwarunkowane niektórymi czynnikami fizycznymi i humoralnymi (hipoksemia, hipoglikemia). Powoduje to uwolnienie i związanie czynników proangiogennych do ich receptorów na powierzchni komórek śródbłonka. Zasadniczą rolę w inicjacji angiogenezy odgrywają białka należące do rodziny VEGF – naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF). W wyniku działania lokalnie aktywowanych enzymów proteolitycznych, takich jak metaloproteinazy (MMP), błona podstawna, na której

spoczywają komórki endotelium, oraz macierz zewnątrzkomórkowa (*extracellular matrix*, ECM) ulegają degradacji. Jest to warunek konieczny dla penetracji komórek śródbłonna do nowych miejsc. Dodatkowo, w wyniku proteolizy ECM powstają produkty powodujące uwalnianie związanych w podścielisku czynników wzrostu oraz związki o działaniu chemotaktycznym, ułatwiające następującą kolejno migrację komórek śródbłonna. W tym etapie udział biorą cząsteczki adhezyjne, znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonna (integryny $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, selektyna E), które wchodzi w interakcje ze specyficznymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (witronektyna, fibronektyna, laminina) (Eliceiri i Cheresch, 1999). Jednocześnie zachodzi proliferacja komórek śródbłonna (Juczewska i wsp., 2001). W stanie spoczynku cykl życiowy komórek śródbłonna przekracza 1000 dni, natomiast w czasie angiogenezy ulega skróceniu do 5 dni (Folkman, 1995b). Podziały komórek śródbłonkowych zapewniają ciągłość naczynia i wytworzenie jego błony wewnętrznej. W kolejnym etapie następuje tworzenie światła naczynia – powstają wydłużone, rurkowate struktury, które łączą się końcami tworząc pętle kapilar. Wytwarza się również błona podstawna (Juczewska i wsp., 2001). Wytworzenie pełnowartościowego naczynia krwionośnego wymaga rekrutacji i związania komórek przydanki (pericytów), a w przypadku dużych naczyń – również komórek mięśni gładkich. Etap ten regulowany jest przez płytkowy czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor*, PDGF) (Sato i wsp., 1993). W późnej fazie angiogenezy dochodzi do połączenia komórek śródbłonna z otaczającymi je komórkami mezenchymalnymi i wytworzenia stabilnych interakcji komórkowych i biochemicznych, w czym główną rolę odgrywają angiopoetyny i receptory Tie 1 i 2 (Maisonpierre i wsp., 1997).



Rycina 1. Etapy angiogenezy (Klagsbrun i Moses, 1999, zmodyfikowane)

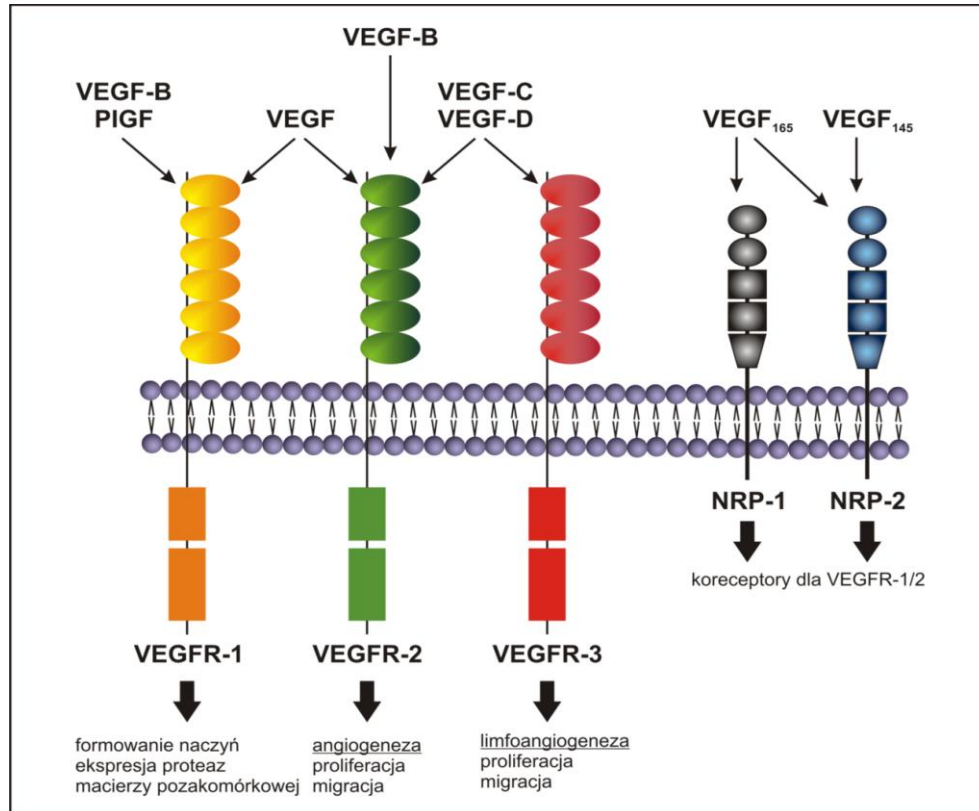
1.1.2 Regulacja procesu angiogenezy

Angiogeneza jest procesem złożonym, wymagającym zaangażowania wielu czynników. Do inicjacji tego procesu niezbędne jest współdziałanie: 1) różnego rodzaju komórek, 2) składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz 3) związków o charakterze stymulującym bądź hamującym angiogenezę (Skóra, 2006). Należy zaznaczyć, że kluczową rolę pełni tu ostatnia grupa czynników. Uważa się, że angiogeneza regulowana jest przez zrównoważoną ekspresją czynników o charakterze pro- i antyangiogennym, przy czym u zdrowych dorosłych osób równowaga ta przesunięta jest na stronę tych ostatnich (Hanahan i Folkman 1996, Hazzard i Stouffer, 2000). Z kolei uruchomienie „programu” angiogenezy spowodowane jest zwiększoną ekspresją stymulatorów i/lub obniżoną ekspresją inhibitorów. Nabywanie fenotypu angiogenego nazywane jest także „przełącznikiem angiogennym” (*angiogenic switch*) (Hanahan i Folkman, 1996).

Do czynników o charakterze proangiogennym zalicza się szereg cytokin i mediatorów, które stymulują wzrost i proliferację komórek śródbłona, degradują macierz zewnątrzkomórkową bądź wpływają na dojrzewanie naczyń krwionośnych.

1.1.2.1 Rodzina naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF

Kluczową rolę w inicjacji fizjologicznej i patologicznej angiogenezy, limfoangiogenezy, a także waskulogenezy, odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Został odkryty w 1983 r. przez Dvoraka i opisany jako czynnik przepuszczalności naczyń (Senger i wsp., 1983, Senger i wsp., 1986, Ferrara, 1999). VEGF jest najsilniejszym i najbardziej swoistym czynnikiem wzrostu komórek śródbłonka. Rodzina VEGF składa się z: VEGF-A (zwyczajowo określanego jako VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F oraz łożyskowego czynnika wzrostu PlGF (*placental growth factor*). (Tammela i wsp., 2005). Czynniki te wiążą się do ich specyficznych receptorów obecnych na komórkach śródbłonka VEGFR-1, VEGFR-2 oraz VEGFR-3, jak również do neuropiliny 1 i 2 (Nrp-1 i Nrp-2), będących receptorami semaforyn – czynników ukierunkowanego wzrostu aksonów. Interakcje pomiędzy cząsteczkami rodziny VEGF i ich receptorami są złożone. Oddziaływania te, w zależności od typu wytworzonego połączenia, inicjują odmienne szlaki, co przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Oddziaływania pomiędzy białkami należącymi do rodziny VEGF i ich receptorami; specyficzne oddziaływanie ligand – receptor wywołuje odmienny efekt na komórki śródbłonka (Harper i Moses, 2006, zmodyfikowane)

Gen VEGF składa się z 8 egzonów. W wyniku alternatywnego składania podczas transkrypcji powstaje przynajmniej 6 izoform białka: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, przy czym izoformy VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ są najczęściej produkowane przez wiele typów komórek (Ferrara i Gerber 2003, Robinson i Stringer., 2001, Tisher i wsp., 1991, Houck i wsp., 1991). Obecność domen wiążących heparynę na niektórych izoformach sprzyja połączeniom VEGF-proteoglikany macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do kumulacji tych molekuł w ECM.

Synteza VEGF jest indukowana w warunkach niedotlenienia za pomocą czynnika transkrypcyjnego HIF (*hypoxia inducible factor*) (Pugh i Ratcliffe., 2003). W takiej sytuacji następuje zahamowanie konstytutywnej degradacji HIF-1 α zależnej od tlenu. HIF wiąże się z promotorem genu VEGF i stymuluje jego transkrypcję (Pugh i Ratcliffe., 2003, Luttun i wsp., 2002a).

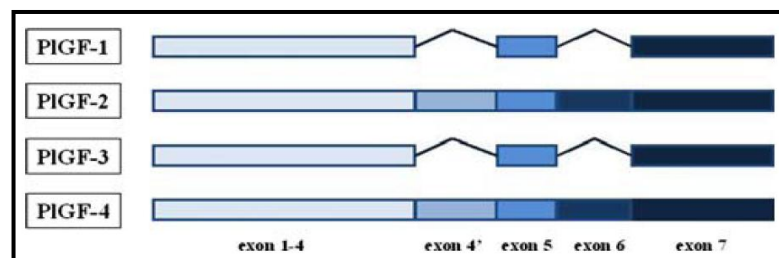
Wpływ funkcjonowania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu na angiogenezę jest szeroki i ujawnia się na wielu polach. Indukuje on proliferację, wzrost, migrację komórek śródbłonka oraz ich organizację przestrzenną podczas formowania naczynia (Ferrara i Gerber, 2003). Zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych m.in. poprzez formowanie przerw między komórkami (Bates i wsp., 2002). Aktywując syntazę tlenu azotu (eNOS) oraz związaną z tym produkcję tlenu azotu powoduje wazodylatację podczas początkowych stadiów angiogenezy (Hood i wsp., 1998, Kroll i Waltenberg., 1999, Singer, 1983, Bates i Curry, 1997). Stymuluje również ekspresję proteaz zaangażowanych w degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (Pepper i wsp., 1991, Unemori i wsp., 1992, Mandriota i wsp., 1995). Ponadto, aktywuje ekspresję czynników antyapoptotycznych, stając się tym samym czynnikiem warunkującym przeżycie komórek śródbłonka (Benjamin i Keshet, 1997, Gerber i wsp., 1998, Gerber i wsp., 1999a).

Uważa się, że wiele czynników stymulujących proces angiogenezy, oddziałuje pośrednio – poprzez indukcję ekspresji VEGF. Należą do nich m. in. transformujący czynnik wzrostu TGF β , płytkowy czynnik wzrostu PDGF, nabłonkowy czynnik wzrostu EGF, interleukina 1 β i 6 (Siegfried i wsp., 2003, Saharinen i wsp., 2004, Kukk i wsp., 1996, Oh i wsp., 1997). Stwierdza się także, iż tlenek azotu może stymulować ekspresję VEGF, tworząc tym samym autokrynną pętlę z VEGF (Ristimäki i wsp., 1998, Chilov i wsp., 1997, Su i wsp., 2004, Kerjaschki i wsp., 2004).

1.1.2.2 Łożyskowy czynnik wzrostu PlGF

Łożyskowy czynnik wzrostu PlGF, należący do rodziny VEGF, został odkryty w 1991 roku przez Graziellę Perscio (Maglione i wsp., 1991). Jednocześnie stwierdzono, że PlGF wiąże się do receptora 1 VEGF. Ponadto zaobserwowano, że u myszy pozbawionych genu PlGF proces angio- i arteriogenezy jest znacznie osłabiony mimo wysokiego poziomu VEGF (Maglione i wsp., 1991).

Gen PlGF zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 14 w miejscu 24 i obejmuje 7 egzonów. Sekwencja aminokwasowa PlGF jest w 42% identyczna z sekwencją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu i PlGF wykazuje duże podobieństwo strukturalne do VEGF (Maglione i wsp., 1993). PlGF funkcjonuje jako dimer. Do chwili obecnej zidentyfikowano 4 izoformy różniące się ilością aminokwasów: PlGF-1 (PlGF₁₃₁), PlGF-2 (PlGF₁₅₂), PlGF-3 (PlGF₂₀₃) i PlGF-4 (PlGF₂₂₄), powstające w wyniku zachodzenia alternatywnego splicingu. Izofomy wykazują także powinowactwo do innych receptorów. PlGF-1, PlGF-3 i PlGF-4 wiążą się do receptora 1 VEGF, a PlGF-2 dodatkowo przyłącza się do neuropiliny 1 i 2. Ponadto, izoforma 2 i 4 posiadają domeny wiążące heparynę, mogą zatem wiązać się do proteoglikanów macierzy zewnątrzkomórkowej i tam być magazynowane.



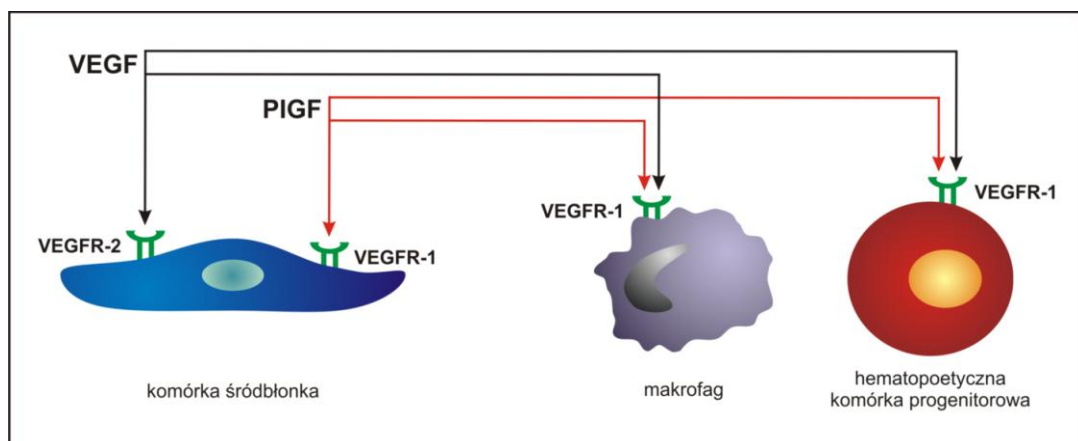
Rycina 3. Warianty splicingowe genu PlGF (Ribatti, 2008)

Obecność PlGF pierwotnie wykazano w łożysku, gdzie przypisywano mu funkcję kontrolną nad wzrostem i różnicowaniem trofoblastu (Maglione i wsp., 1993, Khaliq i wsp., 1996). Badania immunocytochemiczne wykazały obecność łożyskowego czynnika wzrostu w warstwie środkowej dużych naczyń łożyska (Khaliq i wsp., 1996). Badania stwierdzające ekspresję PlGF we wczesnych etapach embriogenezy u myszy sugerują jego udział w inicjacji i koordynacji procesu waskularyzacji (Achen i wsp., 1997). PlGF obecny jest także w sercu, płucach, tarczycy, mięśniach szkieletowych oraz tkance tłuszczowej (Persico i wsp., 1999, Voros i wsp., 2005).

Łożyskowy czynnik wzrostu jest pozytywnym regulatorem angiogenezy. Uważa się, że może stymulować ten proces za pomocą kilku mechanizmów (Rycina 4):

- bezpośrednio oddziaływanie na komórki śródbłonna przez VEGFR-1 (Maglione i wsp., 1991),
- separację VEGF od receptora 1, jednocześnie umożliwiające wiązanie VEGF do VEGFR-2 (Luttun i wsp., 2002b),
- uwrażliwienie komórek na działanie VEGF-VEGFR-2 przez oddziaływanie PlGF-VEGFR-1 (Viita i wsp., 2008),
- rekrutację monocytów/makrofagów zaangażowanych w proces wzrostu naczyń (Carmeliet i wsp., 2001)
- mobilizację progenitorowych komórek hematopoetycznych ze szpiku kostnego (Carmeliet i wsp., 2001).

Łożyskowy czynnik wzrostu może również działać jako inhibitor angiogenezy. Dzieje się tak wtedy, gdy PlGF tworzy heterodimer z VEGF. Kompleks ten ma od 20 do 50 razy słabszy wpływ stymulujący angiogenezę w porównaniu do homodimeru VEGF (Cao i wsp., 1996, Schomber i wsp., 2007). Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że PlGF może blokować angiogenezę stymulowaną naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu poprzez zmniejszanie puli homodimerów VEGF (Xu i wsp., 2006).



Rycina 4. PlGF oraz VEGF mogą stymulować angiogenezę przez receptory 1 i 2 VEGF, obecne na komórkach śródbłonna. VEGFR-1 jest obecny także na makrofagach i progenitorowych komórkach hematopoetycznych (Ribatti, 2008, zmodyfikowane)

1.1.2.3 Endoglina ENG /antygen CD105

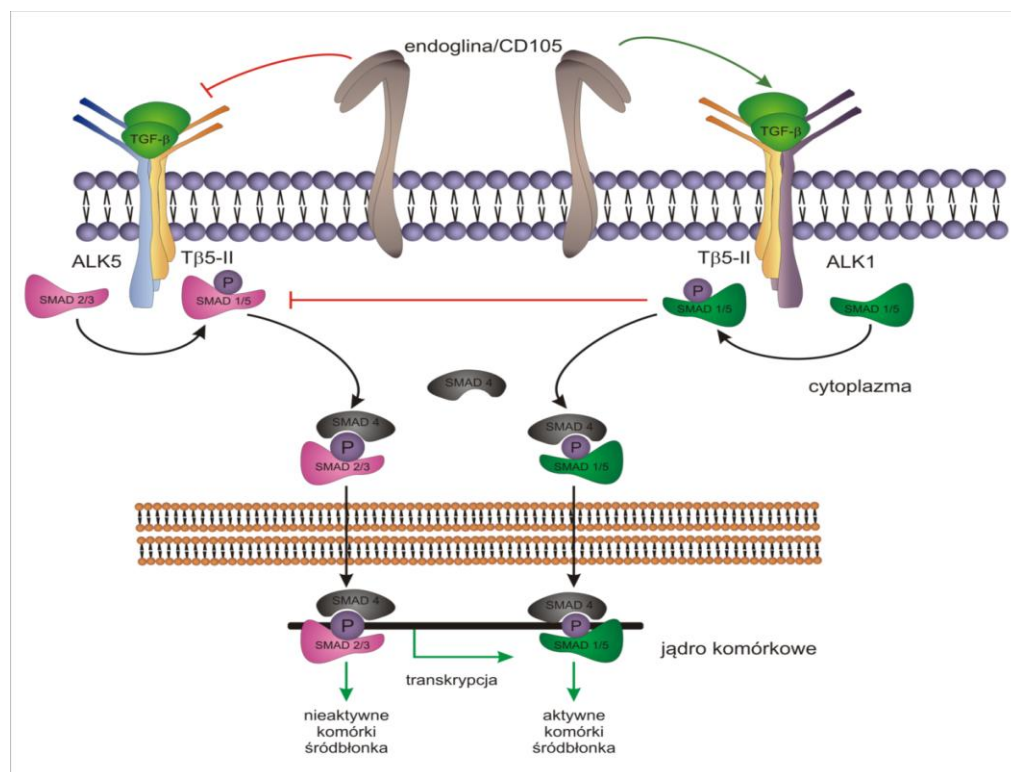
Endoglina/CD105 jest homodimerycznym, transbłonowym białkiem o masie 180 kDa (Quackenbush i Letarte, 1985, Gougos i Letarte, 1988b, Cheifetz i wsp., 1992, Barbara i wsp., 1999). Zidentyfikowano ją w 1985 roku przez grupę Letarte'a (Gougos i Letarte, 1988a). Gen CD105 znajduje się na chromosomie 9q34 i zawiera 14 egzonów (Fernández-Ruiz i wsp., 1993, Pichuantes i wsp., 1997). Zawiera krótkie domeny cytoplazmatyczną i przezbłonową oraz dużą domenę zewnątrzkomórkową, zawierającą motyw RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy). Ulega N- i O-glikozylacji. Znane są dwie izoformy endogliny, różniące się długością końca cytozolowego: L-CD105 (633 aa, 47 tworzy domenę wewnątrzkomórkową) oraz S-CD105 (600 aa, 14 na końcu cytoplazmatycznym) (Bellón i wsp., 1993). Sugeruje się, że forma L jest przeważająca (Li i wsp., 2000b).

Uważa się, że endoglina jest białkiem zaangażowanym w angiogenezę, dojrzewanie naczyń oraz utrzymanie homeostazy organizmu. CD105 wykazuje silną ekspresję w komórkach śródbłonka we wczesnych stadiach embriogenezy (4 – 8 tydzień) oraz podczas powstawania przegród i zastawek w mięśniu sercowym (Qu i wsp., 1998). Brak endogliny u zarodków myszy ma charakter letalny (Li i wsp., 1999). W tkankach ludzkich CD105 wykazuje ekspresję głównie w komórkach śródbłonka naczyń i zrębu (Burrows i wsp., 1995, Fonsatti i wsp., 2001) oraz syncytiotrofoblaście łożyska (St-Jacques i wsp., 1994). Jej słabą ekspresję obserwuje się także w aktywowanych monocytach, makrofagach, prekursorach erytrocytów, fibroblastach, komórkach mezangium, komórkach dendrytycznych i melanocytach (Fonsatti i wsp., 2001, Dallas i wsp., 2008). Poziom endogliny pozytywnie koreluje ze stopniem proliferacji ludzkich komórek śródbłonkowych żyły pępowinowej (HUVEC) oraz z ekspresją markerów proliferacji Ki-67 czy cyklina A (Miller i wsp., 1999, Fonsatti i wsp., 2000, Fonsatti i wsp., 2001). CD 105 wykazuje nadekspresję w komórkach śródbłonka nowo powstałych naczyń guzów nowotworowych (Wang i wsp., 1993, Wang i wsp., 1994, Burrows i wsp., 1995, Fonsatti i wsp., 2000). Obecna jest także w niedojrzałych naczyniach i ulegających przebudowie.

Endoglina wykazuje dużą homologię z receptorem III (betaglikan) transformującego czynnika wzrostu β i funkcjonuje jako jego receptor pomocniczy, modulując odpowiedź komórki na działanie TGF β (Cheifetz i wsp., 1992, Li i wsp., 2000b, Bernabeu i wsp., 2009). Ma zdolność wiązania TGF β 1 i 3 (ale nie TGF β 2) oraz

innych ligandów, np. aktywiny A czy białka morfogenetycznego kości (BMP) 7 i 2 (Cheifetz i wsp., 1992, Letamendia i wsp., 1998, Barbara i wsp., 1999). Wykazano, że CD105 wymaga obecności receptora II TGF β , aby móc przyłączać ligand. Ponadto, ENG wchodząc w interakcje z receptorem I i II TGF β , reguluje ich stopień fosforylacji i tym samym wpływa na ich zdolność przekazywania sygnałów (Guerrero-Esteo i wsp., 2002). Może jednak funkcjonować niezależnie na powierzchni komórek (Bernabeu i wsp., 2009).

Mechanizm funkcjonowania endogliny jako cząsteczki o charakterze proangiogennym nie jest do końca znany. Wydaje się, że endoglina stymuluje ścieżkę sygnałową TGF β /ALK1, która indukuje fosforylację cząsteczek Smad 1 i 5, co w efekcie promuje proliferację i migrację komórek śródbłonka do miejsca formowania naczynia (Goumans i wsp., 2009). Jednocześnie, pośrednio hamuje szlak TGF β /ALK5 fosforylujący Smad 2 i 3, odpowiedzialny za inhibicję podziałów komórkowych.



Rycina 5. Hipotetyczny wpływ endogliny/CD105 na funkcjonowanie ścieżki sygnałowej zależnej od TGF β , modulujący odpowiedź komórek śródbłonka na cytokinę (Fonsatti i wsp., 2010, zmodyfikowane)

Sugeruje się, że endoglina jest także komponentą ścieżki aktywującej syntazę tlenu azotu i modulatorem cyklooksyzogeny 2 (COX-2) i w ten sposób – pośrednio – reguluje napięcie ściany naczynia (Jerkic i wsp., 2004, Toporsian i wsp., 2005,

Santibanez i wsp., 2007). Prawdopodobnie wpływa również na aktywację ekspresji cząsteczek o działaniu antyapoptotycznym w komórkach śródbłonka naczyń podczas angiogenezy nowotworowej (Li i wsp., 2003, Tanaka i wsp., 2003).

Udział endogliny w nowotworzeniu naczyń guza nowotworowego nie jest potwierdzony, jednak *in vitro* wykazano podwyższony poziom ekspresji tego białka w przerzutach nowotworu prostaty i raka jajnika (Jovanovic i wsp., 2001, Liu i wsp., 2002, Oxmann i wsp., 2008). Stwierdzono ponadto, że deficyt molekuly u myszy CD105^{+/-} z nowotworem płuc Lewis'a wiązał się ze znacznym zmniejszeniem unaczynienia guza oraz jego wielkości (Düwel i wsp., 2007). Uważa się również, że ocena gęstości naczyń (*microvessel den sity*, MVD) guza za pomocą przeciwciał anti-CD105 jest dobrym narzędziem do oceny prognozy (Kumar i wsp., 1999, Brewer i wsp., 2000, Saad i wsp., 2003, Fonsatti i wsp., 2003, Shariat i wsp., 2008).

1.1.2.4 Cyklooksygenaza 1 COX-1/PTGS1

Cyklooksygenaza (zwana także syntazą prostaglandyn G/H) jest kluczowym enzymem katalizującym przemianę kwasu arachidonowego (AA) do prostaglandyn G₂ i H₂, zaangażowanych m. in. w regulację zapalenia, gorączki i bólu (Tanabe i Tohnai, 2002). Istnieją dwie izoformy enzymu: COX-1 oraz COX-2. Ekspresja COX-1 jest konstytutywna, natomiast COX-2 jest aktywowana przez stymulatory zapalenia i proliferacji (Smith i wsp., 2000, Rouzer i Mariett, 2003).

Badania nad cyklooksygenazą 1 sięgają lat 70-tych XX wieku, ale sekwencja ludzkiej COX-1 została określona w 1989 roku (Yokoyama i wsp., 1989). Gen enzymu zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 9 w miejscu 32 i składa się z 11 egzonów. Powstające białko ma długość 576 aminokwasów i masę 70 kDa.

COX-1 ulega ekspresji w prawie wszystkich typach tkanek ludzkich. Szczególnie wysoki poziom białka obecny jest w śródbłonku naczyń krwionośnych, komórkach mięśni gładkich, pęcherzykach nasiennych, płytkach krwi, monocytach, komórkach mezotelialnych i cewkach zbiorczych nefronu (Zidar i wsp., 2009, Tanabe i Tohnai, 2002). COX-1 stymuluje syntezę PGs niezbędnych do utrzymania homeostazy (m. in. w przewodzie pokarmowym czy hemostazy) (Rouzer i Marnett, 2009). Mimo tezy o stałej obecności PTGS1 w tkankach, obserwuje się indukcję ekspresji enzymu w wielu liniach komórkowych, w których komórki różnicują się (m. in. w komórkach śródbłonka) (Murakami i wsp., 1995, Bryant i wsp., 1998, Jun i wsp., 1998, Kirtikara

i wsp., 1998, Okahara i wsp., 1998, Bogar i wsp., 1999, Rioux i wsp., 2000, Schneider i wsp., 2001). Wykazano również zwiększoną ekspresję COX-1 w stanie ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego u świnki morskiej (Bogar i wsp., 1999). Ponadto obserwuje się podwyższony poziom enzymu w niektórych nowotworach (rak piersi, gruczolakorak przełyku, rak szyjki macicy), a także podczas rozwoju polipów w jelicie grubym (Sales i wsp., 2002, Li i wsp., 2009, Murphy i Fitzgerald, 2001, Murphy i wsp., 2003). Fakt ten tłumaczy się zaangażowaniem COX-1 w proces angiogenezy.

Rola cyklooksygenazy 1 w angiogenezie nie jest jasna. Wydaje się, że białko to zaangażowane jest w tworzenie naczyń krwionośnych. Dane te dotyczą głównie modeli eksperymentalnych. Ta funkcja COX-1 potwierdzana jest głównie przez fakt, że selektywne inhibitory COX-1 blokują również neowaskularyzację (Murphy i Fitzgerald, 2001, Sales i wsp., 2002, Murphy i wsp., 2003, von Rahden i wsp., 2005, Sano i wsp., 2006, Li i wsp., 2009, Li i wsp., 2010). Ponadto obserwuje się korelację ekspresji PTGS1 oraz czynników o charakterze proangiogennym: VEGF, bFGF, angiopoetyny 1 i 2 (Li i wsp., 2009, Sales i wsp., 2002, Murphy i Fitzgerald, 2001). Dodatkowo stwierdza się blokowanie uwalniania tych czynników przy zastosowaniu inhibitorów COX-1. Mechanizm, za pomocą którego cyklooksygenaza 1 reguluje angiogenezę nie jest znany. Prawdopodobnie ma on związek z zaangażowaniem enzymu w syntezę prostaglandyn, które w znacznym stopniu wpływają na formowanie naczyń krwionośnych (Tsuji i wsp., 1998). COX-1 prawdopodobnie bierze udział w jednym z ostatnich etapów angiogenezy – formowaniu światła naczynia i wydłużaniu go (Tsuji i wsp., 1998).

1.1.3 Angiogeneza a proces nowotworowy

Krokiem milowym w dziedzinie biologii nowotworów była teza postawiona przez amerykańskiego naukowca Judah Folkmana w 1971 roku, która dotyczyła znaczenia procesu angiogenezy dla rozwoju nowotworu (Folkman, 1971). W początkowej fazie progresji nowotworu guz jest skupiskiem składającym się z około 1 miliona komórek i nie przekracza wielkości 1 – 2 mm³. W tej fazie jego wzrost i rozwój jest niezależny od sieci naczyniowej, tlen i substancje odżywcze transportowane są do komórek guza na drodze dyfuzji. Natomiast w dalszych etapach kancerogenezy guz stymuluje wytwarzanie nowych naczyń krwionośnych, gdyż dotychczasowy sposób zaopatrywania guza staje się niewystarczający – w centralnej

jego części może dochodzić do martwicy. Jednocześnie nowotwór wykorzystuje sieć naczyniową do rozprzestrzeniania się w organizmie – tworzenia przerzutów (Folkman, 1971, Folkman, 1985, Cavallaro i Christofori, 2000, Fidler, 2001). Doniesienia ostatnich lat wskazują na to, że nowo powstałe naczynia pełnią dodatkowe funkcje: są źródłem czynników wzrostu, cytokin oraz hormonów, stymulujących rozwój guza (Rak i wsp., 1996), jak również wykazują aktywność proteolityczną promującą inwazyjność nowotworu (Brooks i wsp., 1995, Skobe i wsp., 1997). Proces angiogenezy, w warunkach fizjologicznych ściśle regulowany, w chorobie nowotworowej wymyka się spod mechanizmów kontrolnych. Dochodzi do stałej produkcji czynników o działaniu proangiogennym, a zmniejszona zostaje ekspresja inhibitorów neowaskularyzacji – „przełącznik angiogeny” zostaje włączony (Hanahan i Folkman, 1996).

Fakt, iż angiogeneza wiąże się ściśle z rozwojem nowotworów, stał się punktem wyjścia do badań nad nowym sposobem leczenia w walce z chorobami nowotworowymi – terapią antyangiogenną. Idea ta pojawiła się już w rok po przełomowym odkryciu Folkmana (Folkman i wsp., 1972). Ponad 30 lat później, pierwszy lek hamujący angiogenezę nowotworową (Avastin/bevacizumab) został zaakceptowany do klinicznego użycia (McCarthy, 2003, Hurwitz i wsp., 2004, [brak listy autorów], 2003).

1.1.3.1 Angiogeneza w guzach litych

Nasiloną angiogenezę obserwuje się w szeregu guzów litych, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. U dorosłych nasilenie naczyniotworzenia silnie koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby, rokowaniem oraz częstością występowania przerzutów (Mizia-Malarz i wsp., 2008). Zachodzenie tego procesu monitoruje się głównie przez ocenę ekspresji czynników o charakterze proangiogennym. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają podwyższony poziom naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu oraz jego receptorów w nowotworach piersi, raku jelita grubego, raku przełyku, pęcherzyka żółciowego, nowotworze trzustki czy raku prostaty (Maeda i wsp., 1996, Seo i wsp., 2000, Bachelder i wsp., 2001, Price i wsp., 2001, Stewart i wsp., 2003). Stwierdza się także podwyższony poziom innych molekuł biorących udział w procesie angiogenezy, takich jak: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), angiogenina (Ang), transformujący czynnik wzrostu (TGF β),

czynnik tkankowy (TF) i inne (Saito i wsp., 1999, Yamanaka i wsp., 1993, Etoh i wsp., 2000, Poon i wsp., 2003, Makrilia i wsp., 2009). Czynnikiem prognostycznym dla wielu nowotworów wydaje się być także ocena gęstości naczyń guza (MVD) (Makrilia i wsp., 2009).

Nowotwory występujące u dzieci mają inną biologię niż nowotwory osób dorosłych. Charakteryzują się mniejszym zróżnicowaniem komórek, intensywnym wzrostem oraz silnym unaczynieniem, dlatego też rozpatruje się je niezależnie (Mizia-Malarz i wsp., 2008). Natomiast w wielu nowotworach wieku dziecięcego, podobnie jak u osób dorosłych, m.in. w glejakach złośliwych, nerwiakach, mięsakach, nowotworach wątroby obserwuje się podwyższony poziom VEGF (Ozer i wsp., 2004, El-Houseini i wsp., 2004, Sun i wsp., 2005). Stwierdza się także zwiększoną ekspresję bFGF, angiopoetyny, PDGF-A w nerwiakach zarodkowych (Eggert i wsp., 2000) oraz czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) w guzie Wilmsa (Sköldenberg i wsp., 2001). Podwyższone stężenie czynników proangiogennych, szczególnie VEGF, jest złym wskaźnikiem rokowniczym (Lin i wsp., 1995).

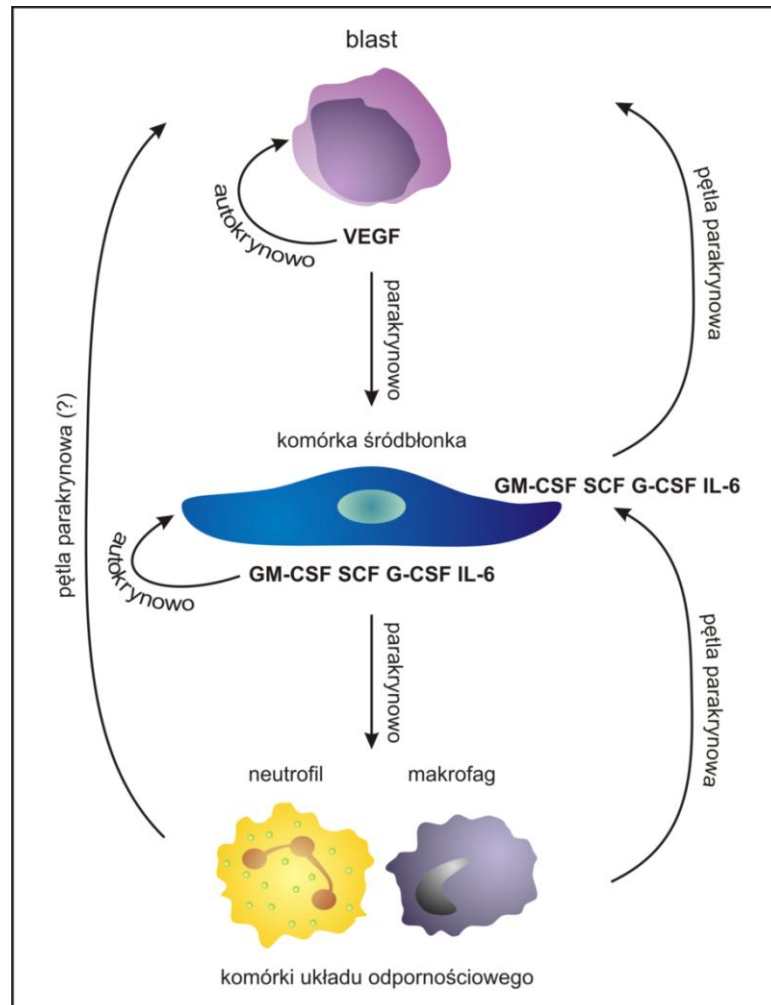
1.1.3.2 Angiogeneza w nowotworach limfoproliferacyjnych

W roku 1994 ukazała się praca zespołu Vacca, wykazująca zależność pomiędzy progresją szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma*, MM) a nasilonym powstawaniem nowych naczyń krwionośnych w szpiku kostnym (Vacca i wsp., 1994). Te obserwacje oraz późniejsze doniesienia tej samej grupy (Vacca i wsp., 1995, Vacca i wsp., 1998) stały się punktem wyjścia dla badań nad angiogenezą w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. Kolejne lata przyniosły potwierdzenie zachodzenia zjawiska angiogenezy w tym typie nowotworów (Foss i wsp., 1997, Barthlen i wsp., 2003, Ho i wsp., 2003, Aboudola i Kini, 2005, Khnykin i wsp., 2006). Poczynione przez wiele grup badawczych obserwacje dotyczą osób dorosłych oraz dzieci, u których nowotwory hematologiczne są najczęstszą grupą nowotworów w tym okresie życia (Radwańska (red.), 1998).

Objawem nasilonej angiogenezy w nowotworach krwi jest przede wszystkim zwiększona liczba naczyń krwionośnych w szpiku kostnym, co po raz pierwszy zaobserwował Perez-Atayde w 1997 roku u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, a później potwierdzili inni naukowcy (Hussong i wsp., 2000, Pulè i wsp., 2002, Norén-Nyström i wsp., 2009). Obserwuje się ponadto zwiększoną produkcję czynników

proangiogennych (nasiloną ekspresja genów oraz białek) zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki śródbłonna i podścieliska szpiku kostnego (Wróbel, 2004). Wyraża się to podwyższonym stężeniem stymulatorów angiogenezy w płynach ustrojowych organizmu (Yetgin i wsp., 2001, Avramis i wsp., 2006). Zdecydowana większość badań dotyczy białaczek, stanowiących najczęstszy rodzaj nowotworów hematologicznych.

Wydaje się zatem, że angiogeneza jest częścią obrazu patomechanizmu nowotworów limfoproliferacyjnych. O ile jednak przyczyna tworzenia nowych naczyń w guzach litych jest oczywista, w przypadku rozrostów hematologicznych określenie roli angiogenezy pozostaje zagadką. Istnieje kilka hipotez tłumaczących to zjawisko. Jedną z nich zakłada, że pomiędzy komórkami zrębu szpiku (również śródbłonna) i komórkami nowotworowymi istnieje szereg auto- i parakrynych pętli, stymulujących wzrost i proliferację obydwu typów komórek (Rycina 6) (Keyhani i wsp., 2001). Sugeruje się również, że nowo powstałe naczynia szpiku kostnego nie ulegające destrukcji podczas chemioterapii, są swego rodzaju niszą, w której komórki nowotworowe znajdują schronienie. Jednocześnie są one źródłem czynników o charakterze parakrynym umożliwiającym wzrost „ocalałych” komórek (Ratajczak i wsp., 1998)



Rycina 6. Model auto- i parakrynych zależności pomiędzy różnymi typami komórek obecnych w mikrośrodkowisku szpiku kostnego. Blasty uwalniają czynniki proangiogenne, które łączą się z receptorami na ich powierzchni (pętla autokrynowa) i powierzchni komórek śródbłonki (pętla parakrynowa). Zaktywowane komórki śródbłonki produkują inne czynniki wzrostu, które stymulują proliferację ich samych, komórek białczkowych oraz komórek zapalnych (np. neutrofilów i makrofagów), które wzmacniają działanie pętli parakrynowej (Keyhani i wsp. 2001, zmodyfikowane)

1.2 Ostra białaczka limfoblastyczna ALL u dzieci

Termin ostra białaczka limfoblastyczna (*acute lymphoblastic leukemia, ALL*) obejmuje grupę nowotworów, których komórki wykazują zbliżoną do prekursorów limfocytów linii B i T morfologię i immunofenotyp (Onciu, 2009). Choroba ta charakteryzuje się klonalną proliferacją komórek białczkowych (blastów) i zajęciem przez nie szpiku kostnego oraz krwi (Harrison, 2001). Może być także ograniczona do tkanek, z ograniczonym (< 25%) lub brakiem zajęcia szpiku. Tę ostatnią grupę określa się mianem chłoniaków (*lymphoma*) (Onciu, 2009).

1.2.1 Epidemiologia i etiologia ostrej białaczki limfoblastycznej

Białaczki są najczęstszym typem nowotworu wieku dziecięcego i stanowią 30% wszystkich nowotworów tego okresu życia (Radwańska (red.), 1998). Każdego roku notuje się na świecie około 4 nowych przypadków białaczki na 100 000 dzieci w wieku do 14 r.ż. (Radwańska (red.), 1998). 80% wszystkich rozpoznań białaczek u dzieci stanowi ostra białaczka limfoblastyczna (Radwańska (red.), 1998). Najwyższy odsetek zachorowań przypada na wiek od 2 do 5 lat i dotyczy obu płci, z niewielką przewagą chłopców (Gurney i wsp., 1995). ALL jest najczęściej chorobą powstającą *de novo*, w niewielkim stopniu występuje jako nowotwór wtórny (Shivakumar i wsp., 2008). W chwili obecnej nie można wskazać jednoznacznie przyczyny białaczki, natomiast istnieje szereg różnorodnych czynników, które mogą zwiększać ryzyko zachorowania. Niektóre zespoły genetyczne, takie jak zespół Downa, zespół Klinefeltera, ataksja teleangiektazja czy neurofibromatoza predysponują do wystąpienia białaczki. Pewne czynniki środowiskowe – ekspozycja na promieniowanie jonizujące w macicy, pestycydy, rozpuszczalniki – zwiększają ryzyko białaczki u dzieci. Obserwuje się także zwiększony odsetek zachorowań w populacjach o wyższym statusie socjo-ekonomicznym.

1.2.2 Diagnostyka ostrej białaczki limfoblastycznej

Diagnostykę ostrej białaczki limfoblastycznej rozpoczyna się od badania morfologicznego krwi, gdzie stwierdza się niedokrwistość, małopłytkowość oraz granulocytopenię przy ogólnej leukocytozie, która może być prawidłowa, obniżona lub też znacznie podwyższona (Kowalczyk, 2009). Badaniem decydującym o rozpoznaniu ostrej białaczki jest aspiracja szpiku kostnego i stwierdzenie w mielogramie przeważającej liczby blastów białaczkowych (Radwańska (red.), 1998). Szpik zostaje również poddany badaniom cytochemicznym, immunologicznym, cytogenetycznym i molekularnym (Kowalczyk, 2009).

Ocena mielogramów pozwala na określenie typu morfologicznego białaczki. Dokonuje się jej zgodnie z klasyfikacją FAB (francusko – amerykańsko – brytyjską), według której wyróżnia się 3 grupy morfologiczne blastów: L1, L2, L3 (Tabela 1). Typowy dla wieku dziecięcego jest L1, stanowiący zdecydowaną większość ALL. Komórki tego typu, podobnie jak L3, można łatwo wyróżnić. Natomiast blasty L2

bywają mylone z nisko zróżnicowanymi blastami linii mieloidalnej. Pomocne są w tej sytuacji badania immunologiczne, określające profil ekspresji antygenów na powierzchni komórek nowotworowych (Radwańska (red.), 1998).

Tabela 1. Charakterystyka morfologiczna ALL wg klasyfikacji FAB (Radwańska)

| Cechy | L1 (85-88%) | L2 (8-14%) | L3 (1-2%) |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Wielkość komórki | Małe | Heterogenna populacja komórek większych | Jednorodna populacja dużych komórek |
| Chromatyna jądrowa | Homogenna, często zbita | Delikatna, zwykle jednorodna | Homogenna o delikatnej, drobnopłamistej strukturze |
| Kształt jądra | Regularny, wyjątkowo wgłobienia i pokarbowania | Nieregularny, częste wgłobienia i pokarbowania | Regularny, owalny lub okrągły |
| Jąderka | Niewidoczne | Jedno lub więcej, duże, wyraźne | Jedno lub więcej, wyraźne |
| Cytoplazma | Uboga | Umiarkowanie obfita | Umiarkowanie obfita |
| Zasadochłonność cytoplazmy | Słaba | Zmienna | Bardzo silna |
| Wakuole | Rzadko | Rzadko | Silnie wyrażone |

Określenie immunofenotypu jest niezwykle istotną częścią diagnostyki ostrej białaczki limfoblastycznej. Biorąc pod uwagę to kryterium, ALL dzieli się na dwa biologicznie i klinicznie różne typy: wywodzącą się z limfocytów B, stanowiącą 86% wszystkich ALL oraz ALL linii T (14%) (Radwańska (red.), 1998)

Limfoblasty każdego typu ALL charakteryzują się ekspresją specyficznych dla nich antygenów, których ekspresję nabywają stopniowo w miarę rozwoju choroby. Na tej podstawie wśród białaczek B-komórkowych wyodrębnia się 6 grup o różnym stopniu zróżnicowania (Tabela 2). Cztery pierwsze grupy należą do wczesnych pre B-ALL i stanowią większość (67%) wszystkich ALL. Grupa V (18%) określana jest jako pre B-ALL, a grupa VI to zdeterminowana ALL (0,6%) (Radwańska (red.), 1998). ALL wywodzące się z linii limfocytów T dzieli się na 2 grupy: pre T-ALL, wykazującą ekspresję antygenów CD1, CD2, CD5, CD7 oraz T-ALL, które dodatkowo prezentuje antygeny CD3, CD4 i CD8 (Radwańska (red.), 1998, Onciu, 2009).

Tabela 2. Klasyfikacja immunologiczna ALL B-komórkowych (Radwańska, zmodyfikowane)

| Grupa | Antygeny | | | | Cytoplazmatyczna IgM | Powierzchniowa IgM | Fenotyp |
|-------|------------|------|------|------|-------------------------|-----------------------|------------------|
| | HLA- DR | CD19 | CD10 | CD20 | | | |
| I | + | - | - | - | - | - | |
| II | + | + | - | - | - | - | Wczesne pre-B |
| III | + | + | + | - | - | - | |
| IV | + | + | + | + | - | - | |
| V | + | + | + | + | + | - | Pre-B |
| VI | + | + | +/- | + | - | + | B |

Ponadto przeprowadza się badania cytogenetyczne i molekularne (Kowalczyk, 2009). Zmiany na poziomie genomu określają biologię choroby oraz reakcję na leczenie i z tego względu wykorzystywane są w definiowaniu oceny ryzyka (Onciu, 2009). Zmiany, które można wykryć za pomocą tego typu analiz to, m.in.: hiperdiploidia, hipodiploidia, translokacje chromosomowe (chromosom Philadelphia, t(1,19)) czy rearanżacje genów (upośledzenie funkcji genu metabolizmu MLL) (Greaves, 1997).

Na podstawie zebranych informacji pacjentów zalicza się do określonych grup ryzyka. Podział taki jest niezbędny do zastosowania określonego protokołu leczenia (Kowalczyk, 2009).

Tabela 3. Grupy ryzyka w ALL (Kowalczyk)

| Grupa standardowego ryzyka SR | Grupa pośredniego ryzyka IR | Grupa wysokiego ryzyka HR |
|--|---|--|
| Krew obwodowa: w 8. dobie: < 1000 blastów/ μ l i wiek \geq 1 rok do < 6 lat i wstępna leukocytoza (WBC) < 20 000/ μ l i w 15. dobie szpik M1 lub M2 i w 33. dobie szpik M1 | Krew obwodowa: 1. W 8. dobie: < 1000 blastów/ μ l i wiek < 1 roku lub \geq 6 lat i/lub WBC \geq 20 000 w μ l i w 15. dobie szpik M1 lub M2 i w 33. dobie szpik M1 lub 2. Kryteria standardowego ryzyka, ale w 15. dobie szpik M3 i w 33. dobie szpik M1 | 1. Kryteria IR i w 15. dobie szpik M3 (ale nie SR i w 15. dobie szpik M3!) 2. Krew obwodowa: w 8. dobie \geq 1000 blastów/ μ l 3. W 33. dobie szpik M2 lub M3 4. Translokacje t(9;22) [BCR/ABL] lub t(4;11) [MLL/AF4] Przynajmniej 1 kryterium musi być spełnione |

M1 – szpik kostny z < 5% blastów
M2 – szpik kostny z 5 – 25% blastów
M3 – szpik kostny z > 25% blastów

1.2.3 Angiogeneza a ostra białaczka limfoblastyczna

Potencjalny udział angiogenezy w patofizjologii nowotworów układu krwiotwórczego jest przedmiotem intensywnych badań od wielu lat. Część ich dotyczy także ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci, choć literatura przedmiotu jest dosyć uboga i niejednoznaczna.

Badania z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych wskazują na zwiększone nowotworzenie naczyń krwionośnych w szpiku kostnym u dzieci z ALL w momencie rozpoznania (Pereze-Atayde i wsp., 1997, Pulè i wsp., 2002, Norén-Nyström i wsp., 2009). Co interesujące, doniesienia dotyczące ilości naczyń w szpiku w okresie remisji są sprzeczne: niektórzy badacze stwierdzają ich zmniejszoną ilość (Pulè i wsp., 2002), inni nie obserwują różnicy (Perez-Atayde i wsp., 1997). Jednakże pomiar MVD nie wykazuje znaczenia prognostycznego. Jedynie Norén-Nyström zaobserwował, że wysoki odsetek naczyń krwionośnych w szpiku może być traktowany jako czynnik predysponujący do wystąpienia nawrotu, ale tylko u pacjentów zaliczanych do grupy wysokiego ryzyka (Norén-Nyström i wsp., 2009). Zdecydowana większość badań odnosząca się do zagadnienia angiogenezy w ALL dotyczy analizy ekspresji czynników stymulujących neowaskularyzację. Ocena poziomu stężenia tych czynników, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, jest pośrednim dowodem na zachodzenie tego procesu. Doświadczenia te skupiają się głównie na najważniejszych regulatorach angiogenezy: VEGF i bFGF. Istnieją prace stwierdzające podwyższony poziom bFGF w płynach ustrojowych dzieci z ALL w porównaniu do grupy kontrolnej (Perez-Atayde i wsp., 1997, Lyu i wsp., 2007), jak również takie, które temu zaprzeczają (Yetgin i wsp., 2001, Schneider i wsp., 2003, Stachel i wsp., 2007). Podobnie sytuacja wygląda w przypadku naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. W wielu badaniach obserwuje się podwyższony poziom białka VEGF oraz zwiększoną ekspresję genu, wykazując jednocześnie znaczenie prognostyczne tego czynnika (Koomagi i wsp., 2001, Schneider i wsp., 2003, Avramis i wsp., 2006, Lyu i wsp., 2007, Stachel i wsp., 2007). Niektórzy autorzy nie obserwują nasilonej produkcji VEGF (Yetgin i wsp., 2001). Stwierdza się także wzmożoną ekspresję innych czynników proangiogennych, takich jak: TGF β (Stachel i wsp., 2007) oraz receptora 3 VEGF (Kivivuori i wsp., 2007). Rozbieżności uzyskanych wyników tłumaczy się doбором różnych technik pomiaru, jak i niejednorodnością badanych grup. Nie ulega zatem wątpliwości, że sprzeczność w/w doniesień niesie ze sobą potrzebę dalszej inwigilacji zagadnienia angiogenezy w odniesieniu do ostrej białaczki limfoblastycznej.

1.3 Metody oceny ekspresji genów

Z uwagi na słabo poznane mechanizmy angiogenezy w ostrej białaczce limfoblastycznej, wartości informacyjne mogą być uzyskane z analizy ekspresji genów,

które biorą udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Wynika to z faktu, że tkankę/chorobę można opisać przez jej wzór ekspresji genów. Postępowanie takie umożliwia identyfikację problemu na poziomie molekularnym i lepsze zrozumienie zagadnienia.

Ekspresję genów można określić jako przepływ informacji genetycznej z genu do białka (Stryer, 2003). Na to zjawisko składają się dwa procesy: transkrypcja, polegająca na przepisaniu informacji z DNA na RNA (mRNA), oraz translacja, podczas której informacja zostaje przekazana z RNA na powstające białko. Biorąc ten fakt pod uwagę, ekspresję genów można oceniać na poziomie RNA i białka (Stryer, 2003).

1.3.1 Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA

Aktywność procesów zachodzących w komórce można analizować poprzez śledzenie transkrypcji genów w te procesy zaangażowanych. Z kolei na ocenę intensywności zachodzenia tego etapu pozwala pomiar stężenia mRNA. Obecność mRNA w cytoplazmie komórki świadczy o aktywności genu.

Technikami umożliwiającymi ocenę ekspresji genów na poziomie RNA są m.in.: Northern blotting, hybrydyzacja *in-situ* czy RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Ostatnia z nich jest metodą najbardziej popularną (Słomski (red.), 2008, Romanowski i wsp., 2007, Zabel (red.), 1999).

W technice RT-PCR reakcję łańcuchowej polimerazy poprzedza reakcja odwrotnej transkrypcji, w trakcie której mRNA przepisany jest na cDNA. Istnieje kilka wariantów tej techniki, m.in. RT-PCR z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (real-time PCR), pozwalający na ocenę ekspresji genów w trakcie zachodzenia reakcji. Jest to możliwe poprzez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do stężenia produktu PCR w czasie trwania reakcji. Metoda ta wykazuje się dużą czułością, dającą możliwość detekcji nawet jednej kopii transkryptu oraz jest narzędziem umożliwiającym jednoczesny pomiar dużej liczby genów (Romanowski i wsp., 2007, Słomski (red.), 2008). Ta ostatnia cecha wykorzystywana jest do oceny profilu ekspresji genów. Możliwość taką stwarzają macierze PCR (produkowane m.in. przez firmę SABiosciences). Macierze takie są zestawem kilkudziesięciu par starterów reakcji real-time PCR, komplementarnych do sekwencji określonych genów, zaangażowanych w przebieg chorób, procesów biologicznych i szlaków metabolicznych. Narzędzie to jest niezwykle przydatne – jednoczesna analiza ekspresji panelu genów daje możliwość

szybkiego wyboru genu/genów, których poziom w jakiś sposób odbiega od normy (jest podwyższony lub obniżony). Narzędzie to może zatem służyć do badań „przesiewowych” mających na celu wytypowanie genów kandydatów – o potencjalnie istotnym znaczeniu dla przebiegu danego procesu/choroby.

1.3.2 Analiza ekspresji genów na poziomie białka

Proces powstawania białek jest wyrazem aktywności genu. Należy jednak pamiętać, że ilość powstającego białka nie zawsze równa jest ilości mRNA wytworzonego podczas reakcji transkrypcji. Wynika to z faktu, że białka podlegają procesowi obróbki potranslacyjnej. W efekcie odczytanie informacji z jednego genu może prowadzić do powstania kilku białek. Dlatego też niezwykle istotny przy ocenie ekspresji genów jest pomiar stężenia białek, ponieważ to one są „siłą wykonawczą” w komórce.

W zależności od tego, w jakim typie materiału dokonuje się oceny ekspresji białek, wykorzystuje się różne techniki. Należą do nich m.in.: Western blotting, test immunoenzymatyczny ELISA czy techniki immunohistochemiczne.

Metody immunohistochemiczne służą zarówno wykrywaniu, jak i lokalizacji różnych składników białkowych w tkankach i komórkach. Funkcjonują one na zasadzie reakcji antygen-przeciwciała. Za pomocą swoistych przeciwciał i gotowych kompleksów z odpowiednimi znacznikami można obserwować barwną reakcję w miejscu występowania poszukiwanego antygeny. Jednym z częściej stosowanych wariantów tej metody jest technika ABC. Jest to metoda pośrednia wykrywająca antygen za pomocą biotynylowanego przeciwciała II rzędu i kompleksu awidyna-biotynylowana peroksydaza. Enzym rozkłada wprowadzany do reakcji substrat dając barwny odczyn w miejscu poszukiwanego białka (Zabel (red.), 1999). Ocena intensywności otrzymanego odczynu pozwala także na ocenę półilościową, będącą wyrazem ekspresji białka w komórce.

Innym rodzajem technik bazujących na reakcji antygen-przeciwciała jest metoda immunofluorescencyjna (IMF). Dużą popularnością cieszy się pośrednia reakcja IMF, w której do antygeny w pierwszej kolejności wiąże się przeciwciało specyficzne (anty-antygen), a następnie przeciwciało II rzędu znakowane barwnikiem fluorescencyjnym, który pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali wzbudzenia emituje

fluorescencję. Technika ta znajduje zastosowanie przede wszystkim w jakościowej ocenie ekspresji białek.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Udział angiogenezy w patogenezie ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci nie jest w pełni jednoznaczny. Uboga literatura przedmiotu oraz sprzeczność doniesień świadczą o skomplikowaniu zagadnienia, a z drugiej strony wyraźnie wskazują na zaangażowanie procesu w rozwój choroby. Poznanie zatem mechanizmu i znaczenia tego procesu dla rozwoju i przebiegu ALL jest niezwykle istotne ze względu na charakter poznawczy oraz, przede wszystkim, możliwość wykorzystania tego faktu w praktyce – terapii pacjenta. W związku z powyższym postanowiono dokonać analizy mającej polegającej na ocenie ekspresji genów zaangażowanych w regulację angiogenezy u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną oraz porównać uzyskane wyniki z przebiegiem klinicznym choroby celem wyodrębnienia czynników o potencjalnym znaczeniu prognostycznym.

W szczególności postanowiono:

1. Określić profil ekspresji genów zaangażowanych w proces angiogenezy nowotworowej u dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej oraz na tej podstawie wyselekcjonować grupę „genów kandydatów” o potencjalnym znaczeniu w patogenezie tego procesu
2. Dokonać analizy ekspresji wybranych „genów kandydatów” na poziomie białka w komórkach szpiku kostnego dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej
3. Porównać uzyskane wyniki z obrazem klinicznym choroby, celem próby wyłonienia czynników o możliwym znaczeniu prognostycznym w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Pacjenci

Badaniem objęto grupę 72 dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej oraz grupę 13 osób zdrowych bądź cierpiących z powodu odmiennych niż ALL chorób.

W pierwszym etapie badań mającym na celu ocenę profilu ekspresji genów zabezpieczono materiał pochodzący od 23 dzieci chorych, będących pacjentami Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przyjętych w latach 2008 – 2010. Od tych pacjentów pobrano krew obwodową o objętości 10 ml do probówek zawierających EDTA – czynnik antykoagulujący. W grupie tej było 9 dziewcząt i 14 chłopców w wieku od 4 do 16 lat. Grupę kontrolną dla tej fazy badań stanowiły 4 osoby zdrowe.

Do kolejnej fazy badań wykorzystano materiał archiwalny – 74 rozmazy biopsji szpiku kostnego, pochodzące od 49 dzieci, które w latach 1997 – 2005 były hospitalizowane z powodu rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupa ta, w wieku od 4 do 16 lat, składała się z 29 chłopców oraz 20 dziewcząt. Preparaty w ciągu 24 godzin od pobrania utrwalano w 96% etanolu, po czym zamrażano w temperaturze -20°C i w tej temperaturze przechowywano. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 9 osób, u których zdiagnozowano: ziarnicę złośliwą (2 dzieci), mononukleozę zakaźną (jeden pacjent), *rhabdomyosarcoma* uda (jedno dziecko), przewlekłą białaczkę szpikową (2 pacjentów), nerwiaka zarodkowego (1 pacjent) oraz pacjenta z powiększonymi węzłami chłonnymi szyi i pacjenta bez choroby nowotworowej.

3.2 Profil ekspresji genów

3.2.1 Izolacja frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej

W pierwszym etapie dokonywano izolacji frakcji komórek jednojądrzastych PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) z krwi obwodowej pacjentów. Około 10 ml krwi nawarstwiano na 10 ml odczynnika Ficoll-Paque (GE Healthcare) unikając

zmieszania warstw. Następnie krew wirowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 800 g. W wyniku wirowania uzyskiwano mieszaninę składającą się z 4 warstw:

- erytrocytów wraz z granulocytami na dnie probówki,
- Ficoll-Paque,
- limfocytów, monocytów oraz płytek krwi na granicy roztworów
- osocza krwi na powierzchni

Za pomocą pipety Pasteura warstwę limfocytów przenoszono do czystej probówki i mieszano z czystym roztworem PBS (pH 7,6). Mieszaninę wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 200 g. Po usunięciu PBS czynność powtarzano. Po kolejnym usunięciu PBS komórki zawieszano w odczynniku do izolacji RNA.

3.2.2 Izolacja RNA

Wyizolowaną frakcję PBMCs zawieszano w 1 ml odczynnika lizującego TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Do probówek dodawano 200 µl chloroformu. Próby energicznie wytrząsano przez 15 sekund i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez około 15 minut. Następnie wirowano je w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 12 000 g. Górną warstwę zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek, gdzie wytrącano ją z fazy wodnej poprzez dodanie 0,5 ml izopropanolu. Po wymieszaniu całość pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 12 000 g. Następnie usuwano supernatant, a osad RNA rozpuszczano w 1 ml 75% etanolu i wytrząsano przez 20 sekund. Mieszaninę wirowano przy 20 000 g w temperaturze 4°C przez 5 minut. Po usunięciu alkoholu etylowego osad osuszano i rozpuszczano w odpowiedniej ilości (20 – 40 µl) czystej wody, wolnej od RN-az. Za pomocą spektrofotometru określano stężenie wyizolowanego RNA, a jego jakość sprawdzano przez rozdział elektroforetyczny na 0,7% żelu agarozowym (Agarosa Basica LE, Prona) z dodatkiem bromku etydy (Sigma-Aldrich).

3.2.3 Odwrotna transkrypcja

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji (przepisania RNA na cDNA) wykorzystywano gotowy zestaw odczynników Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Dla każdej próby zwiększano zalecaną przez producenta objętość odczynników sześciokrotnie ze względu na uzyskanie odpowiedniej ilości cDNA niezbędnej do wykonania testu przesiewowego. Do mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby dodawano 200 ng RNA, 1 µl startera oligo(dT)₁₈ o stężeniu 50 pmol/µl, 2 µl startera hexamer o stężeniu 600 pmol/ µl i dopełniano wodą dejonizowaną do objętości 13 µl. Mieszaninę poddawano 10-minutowej inkubacji w temperaturze 65°C, a następnie schładzano na lodzie. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano 4 µl buforu reakcyjnego RB (5x stężonego), 0,5 µl inhibitora RNaz (40 U/µl), 2 µl mieszaniny deoksynucleotydów dNTP (10mM) oraz 0,5 µl odwrotnej transkryptazy (20 U/µl). Wykorzystując termocykler Eppendorf przeprowadzano reakcję: w 25°C przez 10 minut, w 50°C przez 60 minut, w 85°C przez 5 minut, a następnie schładzano mieszaninę na lodzie.

3.2.4 Reakcja łańcuchowej polimerazy PCR w czasie rzeczywistym

Do oceny profilu ekspresji genów związanych z procesem angiogenezy wykorzystano macierze PCR Human Angiogenesis RT² Profiler™ PCR Array firmy SABiosciences (PAHS-024). Zastosowano macierze 96-dołkowe, zawierające startery dla 84 badanych genów, 5 genów metabolizmu podstawowego, tzw. genów referencyjnych HKG (*housekeeping genes*) oraz kontrole: wykrywanie zanieczyszczenia genomowym DNA, kontrolę reakcji odwrotnej transkrypcji oraz pozytywną kontrolę PCR sprawdzającą wydajność reakcji (Tabela 4). Ocenę ekspresji genów umożliwiły przeprowadzone na macierzach reakcje PCR w czasie rzeczywistym. Zastosowane macierze posiadały oznaczenia producenta. Sekwencje starterów oraz wielkość powstających produktów nie zostały podane.

Tabela 4. Wykaz genów oraz reakcji kontrolnych dla macierzy PCR Human Angiogenesis RT² Profiler™ PCR Array (PAHS-024, SABiosciences)

| Gene Table | | | | | |
|------------|-----------|--------------|---------|--|--|
| Position | Unigene | GeneBank | Symbol | Description | Gene Name |
| A01 | Hs.525622 | NM_005163 | AKT1 | V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 | AKT, MGC99656, PKB, PKB-ALPHA, PRKBA, RAC, RAC-ALPHA |
| A02 | Hs.369675 | NM_001146 | ANGPT1 | Angiopoietin 1 | AGP1, AGPT, ANG1 |
| A03 | Hs.583870 | NM_001147 | ANGPT2 | Angiopoietin 2 | AGPT2, ANG2 |
| A04 | Hs.209153 | NM_014495 | ANGPTL3 | Angiopoietin-like 3 | ANGPT5 |
| A05 | Hs.9613 | NM_001039667 | ANGPTL4 | Angiopoietin-like 4 | ANGPTL2, ARP4, FIAF, HFARP, NL2, PGAR, pp1158 |
| A06 | Hs.1239 | NM_001150 | ANPEP | Alanyl (membrane) aminopeptidase | APN, CD13, GP150, LAP1, P150, PEPN |
| A07 | Hs.194654 | NM_001702 | BAI1 | Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 | FLJ41988, GDAIF |
| A08 | Hs.54460 | NM_002986 | CCL11 | Chemokine (C-C motif) ligand 11 | MGC22554, SCYA11 |
| A09 | Hs.303649 | NM_002982 | CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 | GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF |
| A10 | Hs.76206 | NM_001795 | CDH5 | Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium) | 7B4, CD144, FLJ17376 |
| A11 | Hs.517356 | NM_030582 | COL18A1 | Collagen, type XVIII, alpha 1 | FLJ27325, FLJ34914, kNO, KNO1, MGC74745 |
| A12 | Hs.570065 | NM_000091 | COL4A3 | Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) | - |
| B01 | Hs.789 | NM_001511 | CXCL1 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | FSP, GRO1, GROa, MGSA, MGSA-a, NAP-3, SCYB1 |
| B02 | Hs.632586 | NM_001565 | CXCL10 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | C7, IFI10, INP10, IP-10, SCYB10, crg-2, gIP-10, mob-1 |
| B03 | Hs.89690 | NM_002090 | CXCL3 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 | CINC-2b, GRO3, GROg, MIP-2b, MIP2B, SCYB3 |
| B04 | Hs.89714 | NM_002994 | CXCL5 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 | ENA-78, SCYB5 |
| B05 | Hs.164021 | NM_002993 | CXCL6 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) | CKA-3, GCP-2, GCP2, SCYB6 |
| B06 | Hs.77367 | NM_002416 | CXCL9 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 | CMK, Humig, MIG, SCYB9, crg-10 |
| B07 | Hs.592212 | NM_001953 | TYMP | Thymidine phosphorylase | ECGF1, MNGIE, PDECGF, TP, hPD-ECGF |
| B08 | Hs.154210 | NM_001400 | S1PR1 | Sphingosine-1-phosphate receptor 1 | CHEDG1, D183362, ECGF1, EDG-1, EDG1, FLJ58121, S1P1 |
| B09 | Hs.516664 | NM_182685 | EFNA1 | Ephrin-A1 | B81, ECKLG, EFL1, EPLG1, LERK1, TNFAIP4 |
| B10 | Hs.516656 | NM_004952 | EFNA3 | Ephrin-A3 | EFL2, EPLG3, Ehk1-L, LERK3 |
| B11 | Hs.149239 | NM_004093 | EFNB2 | Ephrin-B2 | EPLG5, HTKL, Htk-L, LERK5, MGC126226, MGC126227, MGC126228 |
| B12 | Hs.419815 | NM_001963 | EGF | Epidermal growth factor (beta-urogastrone) | HOMG4, URG |
| C01 | Hs.76753 | NM_000118 | ENG | Endoglin | CD105, END, FLJ41744, HHT1, ORW, ORW1 |
| C02 | Hs.437008 | NM_004444 | EPHB4 | EPH receptor B4 | HTK, MYK1, TYRO11 |
| C03 | Hs.115263 | NM_001432 | EREG | Epiregulin | ER |
| C04 | Hs.483635 | NM_000800 | FGF1 | Fibroblast growth factor 1 (acidic) | AFGF, ECGF, ECGF-beta, ECGFA, ECGFB, FGF-alpha, FGFA, GLIO703, HBGF1 |
| C05 | Hs.284244 | NM_002006 | FGF2 | Fibroblast growth factor 2 (basic) | BFGF, FGFb, HBGF-2 |
| C06 | Hs.1420 | NM_000142 | FGFR3 | Fibroblast growth factor receptor 3 | ACH, CD333, CEK2, HSFGR3EX, JTK4 |
| C07 | Hs.11392 | NM_004469 | FIGF | C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D) | VEGF-D, VEGFD |
| C08 | Hs.654360 | NM_002019 | FLT1 | Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor) | FLT, VEGFR1 |

| | | | | | |
|-----|-----------|-----------|--------|---|---|
| C09 | Hs.388245 | NM_021973 | HAND2 | Heart and neural crest derivatives expressed 2 | DHAND2, FLJ16260, Hed, MGC125303, MGC125304, Thing2, bHLHa26, dHand |
| C10 | Hs.396530 | NM_000601 | HGF | Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) | F-TCF, HGFB, HPTA, SF |
| C11 | Hs.597216 | NM_001530 | HIF1A | Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) | HIF-1alpha, HIF1, HIF1-ALPHA, MOP1, PASD8, bHLHe78 |
| C12 | Hs.44227 | NM_006665 | HPSE | Heparanase | HPA, HPR1, HPSE1, HSE1 |
| D01 | Hs.504609 | NM_002165 | ID1 | Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein | ID, bHLHb24 |
| D02 | Hs.76884 | NM_002167 | ID3 | Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein | HEIR-1, bHLHb25 |
| D03 | Hs.37026 | NM_024013 | IFNA1 | Interferon, alpha 1 | IFL, IFN, IFN-ALPHA, IFNA13, IFNA@, MGC138207, MGC138505, MGC138507 |
| D04 | Hs.93177 | NM_002176 | IFNB1 | Interferon, beta 1, fibroblast | IFB, IFF, IFNB, MGC96956 |
| D05 | Hs.856 | NM_000619 | IFNG | Interferon, gamma | IFG, IFI |
| D06 | Hs.160562 | NM_000618 | IGF1 | Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | IGF1A, IGF1 |
| D07 | Hs.126256 | NM_000576 | IL1B | Interleukin 1, beta | IL-1, IL1-BETA, IL1F2 |
| D08 | Hs.654458 | NM_000600 | IL6 | Interleukin 6 (interferon, beta 2) | BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6 |
| D09 | Hs.624 | NM_000584 | IL8 | Interleukin 8 | CXCL8, GCP-1, GCP1, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1, NAP1 |
| D10 | Hs.436873 | NM_002210 | ITGAV | Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51) | CD51, DKFZp686A08142, MSK8, VNRA |
| D11 | Hs.218040 | NM_000212 | ITGB3 | Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) | CD61, GP3A, GPIIIa |
| D12 | Hs.224012 | NM_000214 | JAG1 | Jagged 1 (Alagille syndrome) | AGS, AHD, AWS, CD339, HJ1, JAGL1, MGC104644 |
| E01 | Hs.479756 | NM_002253 | KDR | Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) | CD309, FLK1, VEGFR, VEGFR2 |
| E02 | Hs.473256 | NM_005560 | LAMA5 | Laminin, alpha 5 | KIAA1907 |
| E03 | Hs.421391 | NM_007015 | LECT1 | Leukocyte cell derived chemotaxin 1 | BRICD3, CHM-1, CHM1 |
| E04 | Hs.194236 | NM_000230 | LEP | Leptin | FLJ94114, OB, OBS |
| E05 | Hs.82045 | NM_002391 | MDK | Midkine (neurite growth-promoting factor 2) | FLJ27379, MK, NEGF2 |
| E06 | Hs.513617 | NM_004530 | MMP2 | Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) | CLG4, CLG4A, MMP-II, MONA, TBE-1 |
| E07 | Hs.297413 | NM_004994 | MMP9 | Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) | CLG4B, GELB, MMP-9 |
| E08 | Hs.436100 | NM_004557 | NOTCH4 | Notch homolog 4 (Drosophila) | FLJ16302, INT3, MGC74442, NOTCH3 |
| E09 | Hs.131704 | NM_003873 | NRP1 | Neuropilin 1 | BDC4, CD304, DKFZp686A03134, DKFZp781F1414, NP1, NRP, VEGF165R |
| E10 | Hs.471200 | NM_003872 | NRP2 | Neuropilin 2 | MGC126574, NP2, NPN2, PRO2714, VEGF165R2 |
| E11 | Hs.535898 | NM_002607 | PDGFA | Platelet-derived growth factor alpha polypeptide | PDGF-A, PDGF1 |
| E12 | Hs.514412 | NM_000442 | PECAM1 | Platelet/endothelial cell adhesion molecule | CD31, FLJ58394, PECAM-1 |
| F01 | Hs.81564 | NM_002619 | PF4 | Platelet factor 4 | CXCL4, MGC138298, SCYB4 |
| F02 | Hs.252820 | NM_002632 | PGF | Placental growth factor | D1281900, PGFL, PLGF, PIGF-2, SHGC-10780 |
| F03 | Hs.77274 | NM_002658 | PLAU | Plasminogen activator, urokinase | ATF, UPA, URK, u-PA |
| F04 | Hs.143436 | NM_000301 | PLG | Plasminogen | DKFZp779M0222 |
| F05 | Hs.125036 | NM_020405 | PLXDC1 | Plexin domain containing 1 | DKFZp686F0937, FLJ36270, FLJ45632, TEM3, TEM7 |
| F06 | Hs.528665 | NM_021935 | PROK2 | Prokineticin 2 | BV8, KAL4, MIT1, PK2 |

| | | | | | |
|-----|-----------|-----------|----------|--|--|
| F07 | Hs.201978 | NM_000962 | PTGS1 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | COX1, COX3, PCOX1, PGG, HS, PGHS-1, PGHS1, PHS1, PTGHS |
| F08 | Hs.532768 | NM_002615 | SERPINF1 | Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1 | EPC-1, PEDF, FIG35 |
| F09 | Hs.68061 | NM_021972 | SPHK1 | Sphingosine kinase 1 | SPHK |
| F10 | Hs.301989 | NM_015136 | STAB1 | Stabilin 1 | CLEVER-1, FEEL-1, FELE-1, FEX1, KIAA0246, STAB-1 |
| F11 | Hs.89640 | NM_000459 | TEK | TEK tyrosine kinase, endothelial | CD202B, TIE-2, TIE2, VMCM, VMCM1 |
| F12 | Hs.170009 | NM_003236 | TGFA | Transforming growth factor, alpha | TFGA |
| G01 | Hs.645227 | NM_000660 | TGFB1 | Transforming growth factor, beta 1 | CED, DPD1, TGFB, TGFbeta |
| G02 | Hs.133379 | NM_003238 | TGFB2 | Transforming growth factor, beta 2 | MGC116892, TGF-beta2 |
| G03 | Hs.494622 | NM_004612 | TGFB1 | Transforming growth factor, beta receptor 1 | AAT5, ACVRLK4, ALK-5, ALK5, LDS1A, LDS2A, SKR4, TGFR-1 |
| G04 | Hs.164226 | NM_003246 | THBS1 | Thrombospondin 1 | THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1 |
| G05 | Hs.371147 | NM_003247 | THBS2 | Thrombospondin 2 | TSP2 |
| G06 | Hs.522632 | NM_003254 | TIMP1 | TIMP metalloproteinase inhibitor 1 | CLGI, EPA, EPO, FLJ90373, HCI, TIMP |
| G07 | Hs.633514 | NM_003255 | TIMP2 | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | CSC-21K |
| G08 | Hs.644633 | NM_000362 | TIMP3 | TIMP metalloproteinase inhibitor 3 | HSMRK222, K222, K222TA2, SFD |
| G09 | Hs.241570 | NM_000594 | TNF | Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2 |
| G10 | Hs.525607 | NM_006291 | TNFAIP2 | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 | B94 |
| G11 | Hs.73793 | NM_003376 | VEGFA | Vascular endothelial growth factor A | MGC70609, MVCD1, VEGF, VEGF-A, VPF |
| G12 | Hs.435215 | NM_005429 | VEGFC | Vascular endothelial growth factor C | Flt4-L, VRP |
| H01 | Hs.534255 | NM_004048 | B2M | Beta-2-microglobulin | - |
| H02 | Hs.412707 | NM_000194 | HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | HGPR1, HPRT |
| H03 | Hs.523185 | NM_012423 | RPL13A | Ribosomal protein L13a | - |
| H04 | Hs.592355 | NM_002046 | GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | G3PD, GAPD, MGC88685 |
| H05 | Hs.520640 | NM_001101 | ACTB | Actin, beta | PS1TP5BP1 |
| H06 | N/A | SA_00105 | HGDC | Human Genomic DNA Contamination | HIGX1A |
| H07 | N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | RTC |
| H08 | N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | RTC |
| H09 | N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | RTC |
| H10 | N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | PPC |
| H11 | N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | PPC |
| H12 | N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | PPC |

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR, QPCR) przeprowadzano na urządzeniu Mastercycler ep realplex² firmy Eppendorf. Założenie tej metody opiera się na analizie kinetyki reakcji PCR w trakcie jej trwania. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych wiążących się do DNA lub znakowanych fluoroforem sond oligonukleotydowych. Ocena poziomu fluorescencji emitowanej przez barwniki lub sondy, który zależy od stężenia amplikonu, umożliwia monitorowanie przyrostu produktu reakcji. Pomiaru dokonuje się w fazie wykładniczej reakcji, gdzie każda cząsteczka matrycy daje w wyniku amplifikacji dwie cząsteczki potomne. Zastosowano wariant QPCR, w którym jako detektora użyto barwnik SYBR Green interkalujący pomiędzy zasady DNA. Ze względu na to, że barwnik ten może się także wiązać z niespecyficznymi produktami PCR, dokonano analizy krzywej topnienia otrzymanych produktów.

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 25 μl na pojedynczą reakcję wchodził 1 μl cDNA, 12,5 μl 2XMasterMix (Maxima™ SYBR Greek/Rox qPCR Master Mix 2X) i 11,5 μl wody dejonizowanej. Dla każdej próby przygotowywano co najmniej 96-krotnie większą objętość. Pierwszym etapem QPCR była 10-minutowa denaturacja w temperaturze 95°C, podczas którego termostabilna polimeraza Maxima™ Hot Start *Taq* DNA ulega aktywacji. Bezpośrednio po niej, przeprowadzano właściwą reakcję PCR, na którą składało się 40 cykli. Każdy cykl rozpoczynał się od 15-sekundowej denaturacji w 95°C, po której następowało przyłączenie starterów (30 sekund, 60°C) i wydłużanie (30 sekund, 72°C). Następnie dokonywano oceny temperatury topnienia otrzymanych produktów z dokładnością do 0,1°C/s.

3.3 Ekspresja białek

3.3.1 Badania immunocytochemiczne

Zastosowano enzymatyczną metodę immunocytochemiczną ABC (awidyna-biotynyłowana peroksydaza) z termicznym odsłanianiem antygenów (mikrofałe). Postępowano zgodnie z poniższymi etapami:

- 1) Płukanie rozmazów szpiku kostnego w PBS – 3 min.
- 2) Gotowanie w kuchence mikrofalowej w PBS – 17 min.
- 3) Płukanie w PBS – 3 min.
- 4) Hamowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H_2O_2 w wodzie destylowanej – 30 min.
- 5) Płukanie w PBS – 3 min.
- 6) Inkubacja z normalną surowicą kozią (1:20, Dako) – 30 min.
- 7) Inkubacja ze specyficznymi przeciwciałami – 18 h w 4°C, a następnie 1 h w temperaturze pokojowej.
- 8) Płukanie w PBS – 3x3 min.
- 9) Inkubacja w roztworze zawierającym dekstran skoniugowany z peroksydazą i przeciwciała II rzędu skierowane przeciw antygenom mysim i króliczym (Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse, Dako) – 30 min.
- 10) Płukanie w PBS -3x3 min.
- 11) Inkubacja z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB), stanowiącą substrat dla peroksydazy – 5-7 min.

- 12) Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
- 13) Barwienie hematoksyliną – 2 min.
- 14) Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
- 15) Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 85%, 90%, 2x100%) oraz ksylenie (2x).
- 16) Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu (Marienfeld) i szkiełek nakrywkowych.

Zastosowano następujące specyficzne przeciwciała (I rzędu):

- anti-endogлина/CD105 (Dako), rozcieńczenie 1:25, 1:50
- anti-endogлина/CD105 (Sanat Cruz), rozcieńczenie 1:100
- anti-CD10/CALLA (Abcam), rozcieńczenie 1:25, 1:50
- anti-CD10/CALLA (Santa Cruz), rozcieńczenie 1:100
- anti-PIGF/PGF (Novus Biologicals), rozcieńczenie 1 µg/ml, 2 µg/ml
- anti-PIGF/PGF (Santa Cruz), rozcieńczenie 1:100
- anti-COX-1/PTGS1 (Abcam), rozcieńczenie 1:25, 1:50
- anti-COX-1/PTGS1 (Santa Cruz), rozcieńczenie 1:100

3.3.2 Badania immunofluorescencyjne

W przypadku antygeny CD105/endogлина dodatkowo zastosowano pośrednią reakcję immunofluorescencyjną z zastosowaniem przeciwciał znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Postępowano wg poniższej procedury:

- 1) Płukanie preparatów biopsji szpiku kostnego w PBS – 3x1 min.
- 2) Inkubacja z 1% albuminą bydlęcą – 45 min. w temperaturze pokojowej.
- 3) Inkubacja ze specyficznym przeciwciałem anti-CD105 w rozcieńczeniu 1:10 (Santa Cruz) - 18 h w 4°C.
- 4) Płukanie w PBS – 5x1 min.
- 5) Inkubacja z przeciwciałami II rzędu sprzężonymi z barwnikiem fluorescencyjnym kozim anti-mysim Alexa Flour 555 w stężeniu 1:200 (MoBiTec) – 1 h w 37°C.
- 6) Płukanie w PBS – 3x1 min.
- 7) Zamknięcie preparatów w medium (DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium, Dako).

3.3.3 Ocena reakcji immunocytochemicznych i immunofluorescencyjnych

Reakcje immunocytochemiczne oceniano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse E600. Preparaty obserwowano przy powiększeniu 400x. Jednocześnie sporządzano dokumentację fotograficzną w celu archiwizacji danych. Wykonano ją w oparciu o mikroskop Axio Imager Z1 przy powiększeniu 200x i oraz Nikon Eclipse przy powiększeniu 400x.

W obrazie cytologicznym dokonywano identyfikacji komórek jądrzastych. Następnie oceniano obecność bądź brak pozytywnego odczynu reakcji immunocytochemicznej. Rozmazy, w których stwierdzono ekspresję badanych antygenów, oznaczano znakiem „+”, natomiast te, które były negatywne – znakiem „-”.

Reakcje immunofluorescencyjne obserwowano w mikroskopie BX60 firmy Olympus przy powiększeniu 600x. Mikroskop ten wyposażony jest w kamerę CCD, za pomocą której dokonano rejestracji uzyskanych obrazów. Analogicznie do oceny reakcji ICC, preparaty z pozytywnym odczynem oznaczono „+” a negatywne „-”.

3.4 Analiza kliniczna

U dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej, od których pobrano krew obwodową w celu analizy profilu ekspresji genów, nie dokonano obserwacji klinicznej.

Czas obserwacji dla pacjentów, u których wykonano biopsje szpiku kostnego, wynosił co najmniej 5 lat. Tak długi okres umożliwił ocenę przebiegu choroby, jej leczenia oraz stwierdzenie wystąpienia potencjalnych niekorzystnych zdarzeń. Biorąc pod uwagę te wytyczne oraz etap choroby, w którym dokonano pobrania szpiku kostnego, pacjentów zakwalifikowano do następujących, przyjętych dla potrzeb tego opracowania, grup:

1. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w momencie rozpoznania, przed rozpoczęciem leczenia.
 - 1a. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w momencie rozpoznania, korzystny przebieg.
 - 1b. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w momencie rozpoznania, niekorzystny przebieg.
2. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w okresie remisji choroby

2a. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w okresie remisji choroby, korzystny przebieg.

2b. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w okresie remisji choroby, niekorzystny przebieg.

3. Pacjenci z ostrą białaczką limfoblastyczną w czasie nawrotu choroby

Poprzez termin „remisja” rozumiano okres ALL, który charakteryzował się brakiem objawów chorobowych. Jako „wznowę” (równoznaczne z „nawrót”) określano stadium choroby, w którym pojawiły się oznaki nowotworu po okresie remisji. Za korzystny przebieg choroby uważano uzyskanie przez pacjenta trwałej remisji. Niekorzystny przebieg choroby definiowano poprzez brak odpowiedzi na wstępne leczenie, opóźnione wejście w remisję bądź pojawienie się wznowy.

3.5 Analiza statystyczna

3.5.1 Analiza profilu ekspresji genów

Do oceny profilu ekspresji genów zastosowano program RT² Profiler PCR Array Data Analysis udostępniany przez firmę SABiosciences. Korzystanie z programu możliwe jest w trybie online po uprzednim zarejestrowaniu się i zalogowaniu na stronie internetowej firmy (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Program wykorzystuje dane uzyskane podczas reakcji PCR – wartości Ct, oznaczające numer cyklu reakcji, w którym produkt zaczyna wzrastać w sposób wykładniczy. Program bazuje na analizie porównawczej $\Delta\Delta Ct$, która uwzględnia normalizację względem kontroli endogennej (Ct dla genów metabolizmu podstawowego) oraz względem kalibratora (Ct dla grupy kontrolnej). Otrzymany wynik pozwala na określenie różnicy poziomu ekspresji genów między próbkami nieznanymi a referencyjnymi, stwarzając jednocześnie możliwość prześledzenia zmian ekspresji genów w procesach fizjologicznych, patofizjologicznych czy rozwojowych. Program dokonuje także za pomocą testu T-studenta oceny istotności statystycznej wykazanych różnic w ekspresji genów pomiędzy grupami. Otrzymane wyniki przedstawiane są w formie tabel oraz wykresów.

3.5.2 Analiza ekspresji białka

Do porównania wskaźników struktury (procentów) pomiędzy grupami zdefiniowanymi na podstawie etapu ALL (przed rozpoczęciem leczenia, w okresie remisji i w okresie wznowy) oraz jej przebiegu (korzystny i niekorzystny) zastosowano test Gaussa. W celu weryfikacji zależności pomiędzy ekspresją antygenów a etapem choroby i jej przebiegiem wykorzystano test dokładny Fishera.

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o program Statistica PL v. 9.0.

3.5.3 Zagadnienia etyczne

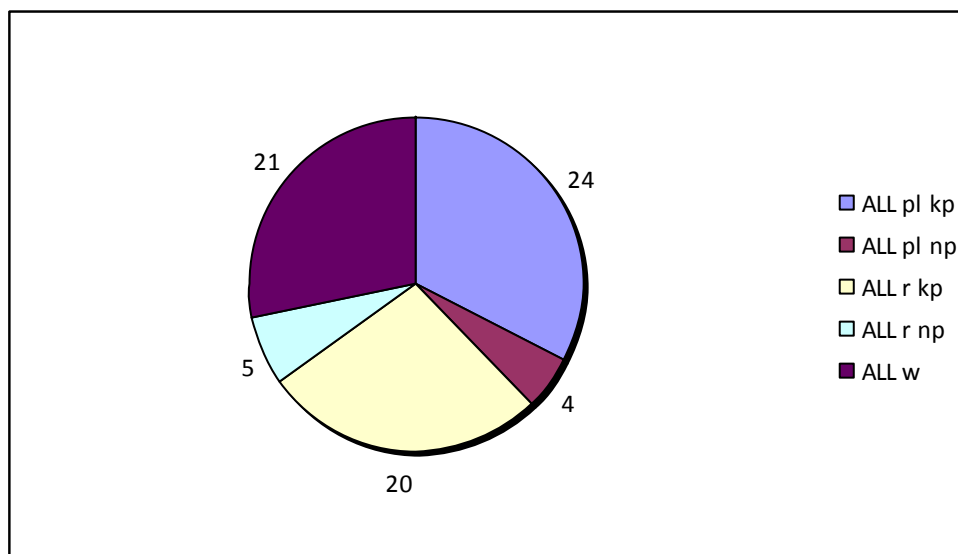
Na przeprowadzenie niniejszych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym (nr 500/10) w Poznaniu w dniu 17 czerwca 2010 roku.

4. WYNIKI

4.1 Obserwacja kliniczna

Analizę profilu ekspresji genów regulujących angiogenezę przeprowadzono u 8 chorych z ALL, u których nie wdrożono jeszcze leczenia. Na podstawie kryteriów wyszczególnionych w Tabeli 3 (Rozdział 1.2.2) pacjentów zakwalifikowano do grupy ryzyka wysokiego HR – 5 osób oraz pośredniego IR – 3 osoby.

Na 74 rozmazach biopsji szpiku kostnego przeprowadzono reakcje immunocytochemiczne oraz immunofluorescencyjne. 28 z nich stanowiły rozmazy pobrane od pacjentów z ALL przed rozpoczęciem leczenia, 25 – biopsje wykonane w okresie remisji choroby, a 21 – w okresie wznowy ALL. Rycina 7 przedstawia liczbę preparatów w każdej grupie chorych (przed leczeniem, remisja, wznowa) z uwzględnieniem przebiegu choroby (korzystny, niekorzystny).



Rycina 7. Rozkład liczby pacjentów w grupach zdefiniowanych na podstawie etapu choroby (pl – przed leczeniem, r – remisja, w – wznowa, K – kontrola) oraz jej przebiegu (kp – korzystny przebieg, np – niekorzystny przebieg)

U 17 dzieci (8 dziewczynek, 9 chłopców) wykonano więcej niż jedną biopsję szpiku kostnego. Od 10 pacjentów uzyskano rozmazy szpiku kostnego dwukrotnie (przed leczeniem i w okresie remisji lub wznowy, tylko w okresie remisji lub tylko w okresie wznowy), od 6 – trzykrotnie (przed leczeniem, w remisji i w czasie nawrotu), a od jednego pacjenta pobrano szpik 4-krotnie (w okresie remisji i wznowy).

4.2 Profil ekspresji genów

4.2.1 Izolacja RNA

Zabezpieczono materiał w postaci krwi obwodowej pobrany od 23 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną. Od wszystkich pacjentów dokonano próby izolacji RNA, natomiast od 8 dzieci uzyskano materiał dobrej jakości ($A_{260/280} \geq 1,6$ i $\leq 2,10$) i w ilości wystarczającej do oznaczenia profilu ekspresji genów na macierzy PCR (co najmniej 1200 ng). Pobrano także krew obwodową i wyizolowano RNA od 4 osób zdrowych, stanowiących kontrole.

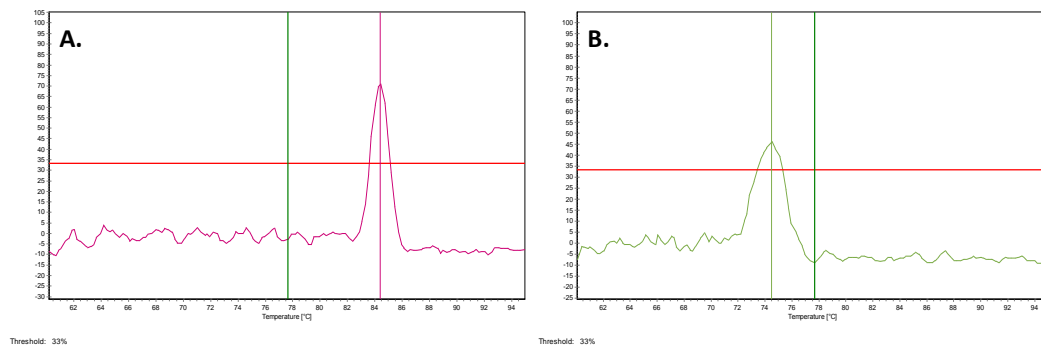
Tabela 4. Ilość i jakość wyizolowanego RNA (dzieci z ALL:1-23, kontrole: K1-K4)

| Lp. | RNA [ng] | $A_{260/280}$ |
|-----|----------------------------------|---------------|
| 1 | 2820 | 1,60 |
| 2 | 46 | 1,41 |
| 3 | 298 | 1,57 |
| 4 | 6121 | 1,77 |
| 5 | 13446 | 1,83 |
| 6 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 7 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 8 | 450 | 1,81 |
| 9 | 10440 | 1,89 |
| 10 | 3952 | 2,00 |
| 11 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 12 | 10050 | 2,04 |
| 13 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 14 | 2240 | 2,00 |
| 15 | 587 | 1,99 |
| 16 | 980 | 1,89 |
| 17 | 3680 | 1,97 |
| 18 | 238 | 1,76 |
| 19 | 88 | 1,45 |
| 20 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 21 | 123 | 1,65 |
| 22 | Skrzep – izolacja nie powiła się | - |
| 23 | 870 | 1,98 |
| K1 | 8935 | 1,85 |
| K2 | 13568 | 1,92 |
| K3 | 11270 | 1,91 |
| K4 | 10619 | 1,91 |

4.2.2 Ocena jakości uzyskanych w wyniku reakcji PCR danych

W celu oceny jakości uzyskanych produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym na macierzach dokonano oceny temperatury topnienia tychże. Odrzucono te wyniki, dla których krzywa topnienia miała przebieg nieprawidłowy. Podwójny pik

oraz temperatura topnienia poniżej 78°C świadczą o powstawaniu niespecyficznych produktów (Rycina 8).



Rycina 8. Przykładowe krzywe topnienia. A – krzywa prawidłowa (gen błonowa aminopeptydaza alanylowa, ALL), B – krzywa nieprawidłowa (gen trombospondyna 1, ALL)

Dla grupy badanej oraz grupy kontrolnej dokonano również oceny uzyskanych wartości Ct dla każdego genu w każdej próbce. W sytuacji, w której wartości ta była większa niż 35, uznawano, że dany gen nie ulega ekspresji.

Stwierdzono, że 18 spośród 84 badanych genów wykazuje ekspresję na nieoznaczalnym poziomie (wartość Ct >35) lub powstający produkt jest niespecyficzny, w związku z czym wykluczono je z analizy profilu ekspresji (Tabela 5).

Tabela 5. Geny wykluczone z analizy profilu ekspresji

| Nazwa genu | Symbol | Opis |
|---|---------|---|
| ANGPTL2, ARP4, FIAF, HFARP, NL2, PGAR, pp1158 | ANGPTL4 | Angiopoetynopodobny czynnik 4 |
| C7, IFI10, INP10, IP-10, SCYB10, crg-2, gIP-10, mob-1 | CXCL10 | Ligand 10 chemokiny CXC |
| CINC-2b, GRO3, GROg, MIP-2b, MIP2B, SCYB3 | CXCL3 | Ligand 3 chemokiny CXC |
| CMK, Humig, MIG, SCYB9, crg-10 | CXCL9 | Ligand 9 chemokiny CXC |
| ER | EREG | Epiregulina |
| BFGF, FGFB, HBGF-2 | FGF2 | Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów 2 |
| ACH, CD333, CEK2, HSFGR3EX, JTK4 | FGFR3 | Receptor 3 FGF |
| VEGF-D, VEGFD | FIGF | Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu |
| FLT, VEGFR1 | FLT1 | Receptor 1 VEGF |
| DHAND2, FLJ16260, Hed, MGC125303, MGC125304, Thing2, bHLHa26, dHand | HAND2 | Białko 2 rozwoju serca i cewy nerwowej |
| IFB, IFF, IFNB, MGC96956 | IFNB1 | Interferon β |
| KIAA1907 | LAMA5 | Laminina α 5 |
| CLG4, CLG4A, MMP-II, MONA, TBE-1v | MMP2 | Metaloproteinaza 2 |
| CLG4B, GELB, MMP-9 | MMP9 | Metaloproteinaza 9 |
| ATF, UPA, URK, u-PA | PLAU | Aktywator plazminogenu |
| DKFZp779M0222 | PLG | Plasminogen |
| THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1 | THBS1 | Trombospondyna 1 |
| DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2 | TNF | Czynnik martwicy guza |

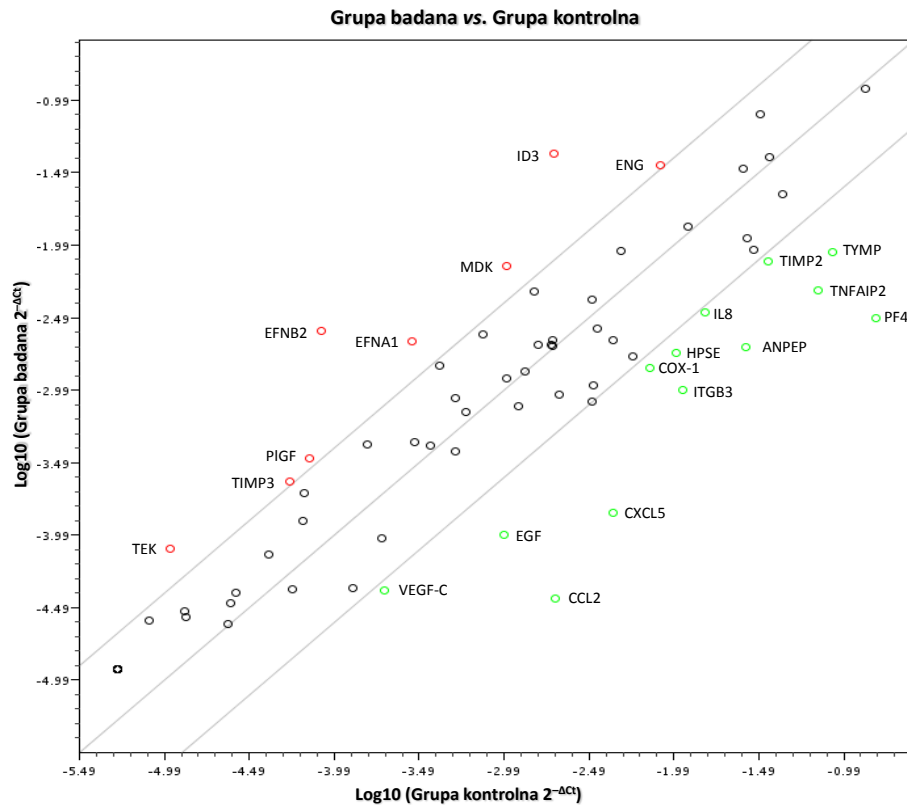
Podobnej oceny dokonano dla wartości Ct genów metabolizmu podstawowego. Jako że gen wykorzystywany do normalizacji musi charakteryzować się m.in. stałą ekspresją w danym typie tkanki (niezależnie od warunków doświadczalnych i stanu chorobowego) stwierdzono, że gen fosforybozylotransferazy hipoksantynowej HPRT1 nie może pełnić funkcji endogennej kontroli. Otrzymane wartości Ct wykazywały duże zróżnicowanie, zarówno w obrębie grupy badanej, jak i kontrolnej. Uzyskane wyniki normalizowano zatem względem średniej wartości Ct dla 4 genów referencyjnych: mikroglobuliny β -2 (B2M), białka rybosomalnego L13a (RPL13a), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) oraz β -aktyny (ACTB).

4.2.3 Analiza profilu ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w grupie pacjentów z ALL w porównaniu do grupy kontrolnej bez rozpoznania choroby nowotworowej

Surowe dane (wartości Ct) otrzymane w wyniku reakcji PCR zaimportowano do programu RT² Profiler PCR Array Data Analysis, za pomocą którego dokonano oceny profilu ekspresji genów regulujących angiogenezę w grupie badanej (pacjenci ze zdiagnozowaną ALL) i grupie kontrolnej (osoby bez rozpoznania choroby nowotworowej). Program umożliwia wykonanie kilku typów analiz, m.in. analizy scatter plot, volcano plot czy multigroup plot. Pierwsza z nich przedstawia różnice we względnej ekspresji genów z dwóch grup (badana i kontrolna) po normalizacji względem genów referencyjnych. Analiza typu volcano plot daje możliwość oceny zmiany względnej ekspresji genów pomiędzy grupami z uwzględnieniem istotności statystycznej różnicy. Z kolei badanie multigroup plot wykazuje zmiany w ekspresji, uwzględniając odchylenie standardowe.

Stosując w/w narzędzia określono zmianę we względnej ekspresji genów w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Jako granicę istotności zmian w ekspresji (tj. obniżenie lub podwyższenie jej poziomu względem grupy kontrolnej) przyjęto wartość 4. Oznacza to, że ekspresja genu musi różnić co najmniej 4-krotnie, aby uznać, iż odbiega ona od ekspresji w grupie kontrolnej. Bazując na analizie scatter plot, stwierdzono podwyższoną ekspresję 8 genów w grupie pacjentów z ALL w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano także, że poziom ekspresji 13 genów jest niższy. Logarytm dziesiętny wartości $2^{-\Delta Ct}$ dla grupy badanej reprezentowany jest na osi Y, podczas gdy logarytm dziesiętny wartości $2^{-\Delta Ct}$ dla grupy kontrolnej na osi X.

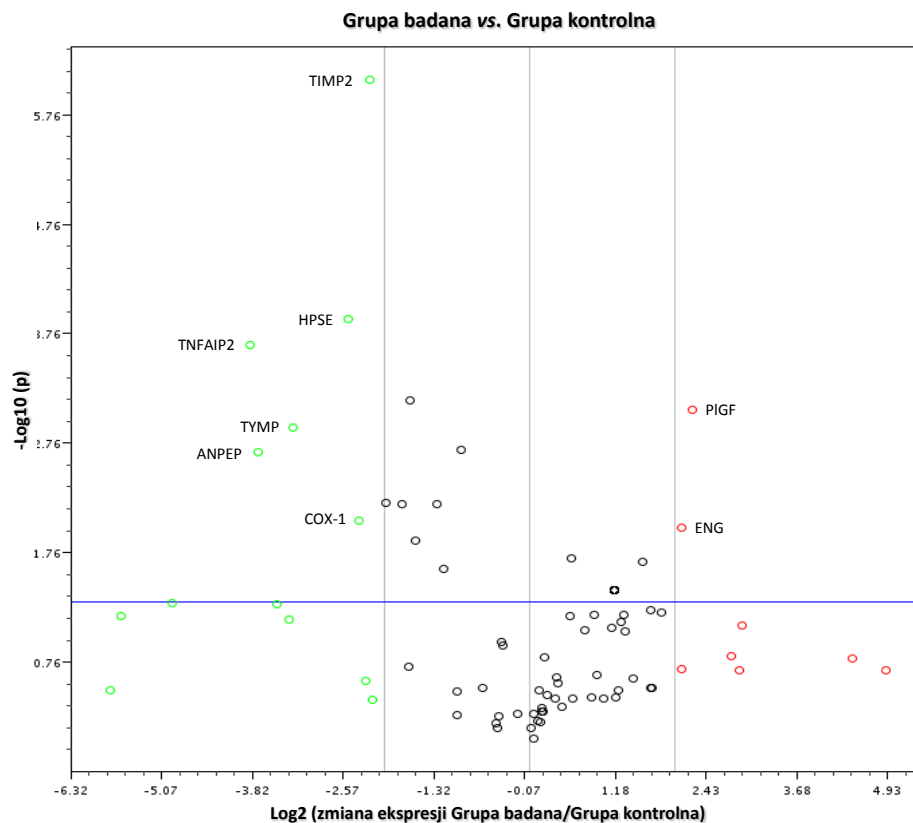
Na otrzymanym wykresie nie wskazano punktów reprezentujących wartości ekspresji dla genów referencyjnych i kontroli (Rycina 9).



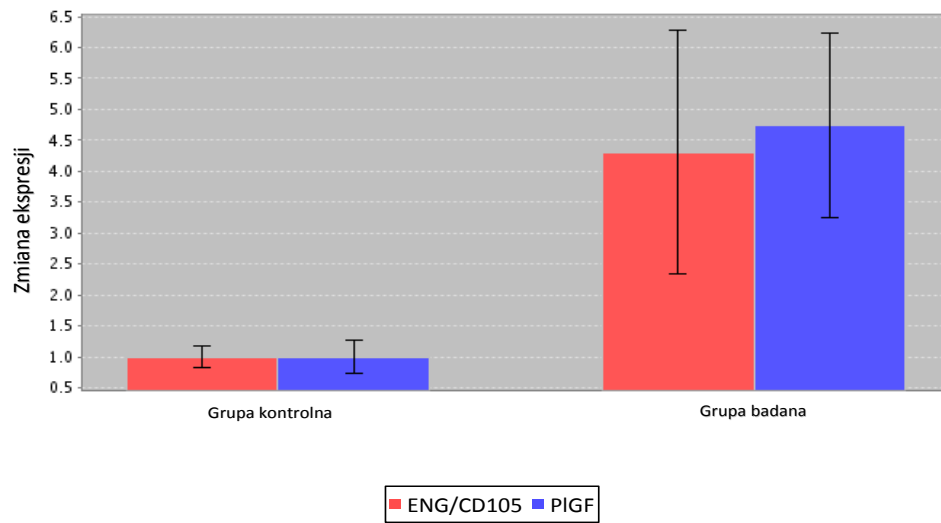
Rycina 9. Analiza scatter plot ekspresji genów w grupie pacjentów z ALL względem grupy kontrolnej. Linia środkowa – ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne – granica istotności zmian w ekspresji (4x), \circ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie badanej (ALL), \circ - geny o obniżonej ekspresji w grupie badanej (ALL)

Otrzymane po zastosowaniu badania scatter plot wyniki poddano analizie volcano plot oraz multigroup plot. Pozwoliło to na porównanie względnej ekspresji genów w obydwu grupach z uwzględnieniem odchylen standardowych oraz weryfikację otrzymanych danych poprzez określenie istotności statystycznej (test t-Studenta) różnicy w ekspresji genów pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. W wyniku tego postępowania liczba genów, których ekspresja uległa zmianie w grupie ALL, zmniejszyła się. Stwierdzono, że istotnie wyższą ekspresją ($p < 0,05$) wśród pacjentów z rozpoznaniem ALL charakteryzują się dwa geny, a istotnie niższą – 6 genów. Wykresy analizy multigroup plot reprezentują zmianę poziomu ekspresji (oś Y) po normalizacji względem genów referencyjnych w grupie kontrolnej oraz badanej wraz z odchyleniami standardowymi (SE), wynikającymi z różnic w poziomie ekspresji danego genu będących efektem zmienności osobniczej (wykresy sporządzono dla

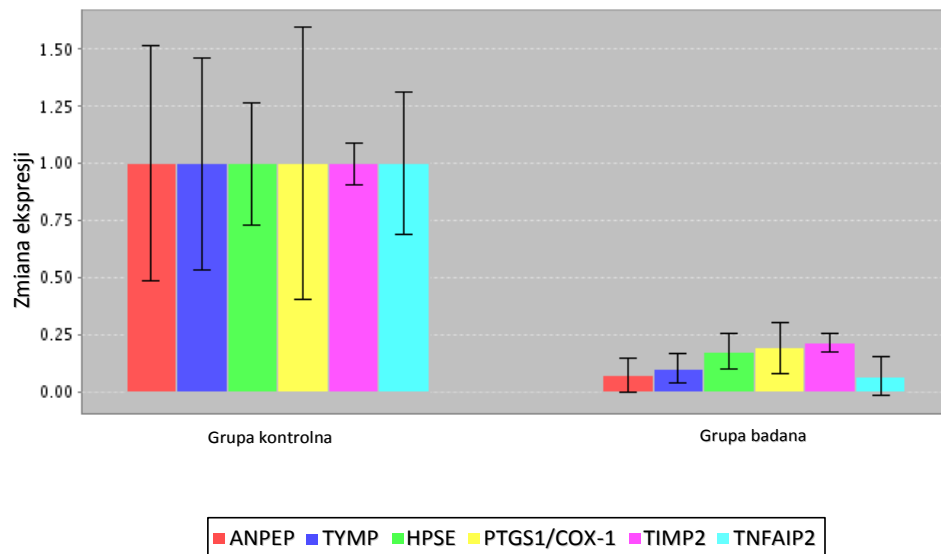
genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji). Na wykresie wskazano geny, dla których różnica w ekspresji była istotna statystycznie. Z kolei wykres badania volcano plot uwzględnia ujemny logarytm dziesiętny z wartości p (oś Y) oraz logarytm o podstawie 2 ze zmiany ekspresji genów w grupie badanej względem grupy kontrolnej (oś X). Na otrzymanym wykresie nie wskazano punktów reprezentujących wartości ekspresji dla genów referencyjnych i kontroli (Rycina 10, 11, 12). Charakterystykę genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji przedstawiono w Tabeli 6.



Rycina 10. Analiza typu volcano plot ekspresji genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów ze zdiagnozowaną ALL względem grupy kontrolnej z uwzględnieniem istotności statystycznej różnicy w ekspresji ($p < 0,05$). Linia środkowa – ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne – granica istotności zmian w ekspresji (4x), linia pozioma – granica istotności statystycznej, \circ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie badanej (ALL), \circ - geny o obniżonej ekspresji w grupie badanej



Rycina 11. Analiza typu multigroup plot ekspresji genów na podwyższonym poziomie u pacjentów ze zdiagnozowaną ALL względem grupy kontrolnej. Słupki prezentują średnią zmian ekspresji \pm SE z 4. niezależnych oznaczeń dla grupy kontrolnej i 8. dla grupy badanej



Rycina 12. Analiza typu multigroup plot ekspresji genów na obniżonym poziomie u pacjentów ze zdiagnozowaną ALL względem grupy kontrolnej. Słupki prezentują średnią zmian ekspresji \pm SE z 4. niezależnych oznaczeń dla grupy kontrolnej i 8. dla grupy badanej

Tabela 6. Charakterystyka genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji w grupie badanej względem grupy kontrolnej

| Nazwa genu | Symbol | Opis | Numer dostępu GenBank | Pozycja na macierzy | Zmiana ekspresji | p (test t-Studenta) |
|--|---------|---|-----------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| CD105, END, FLJ41744, HHT1, ORW, ORW1 | ENG | Endogлина | NM_000118 | C01 | 4,31 | 0,010392 |
| D12S1900, PGFL, PLGF, PIGF-2, SHGC-10760 | PIGF | Łożyskowy czynnik wzrostu | NM_002632 | F02 | 4,74 | 0,000860 |
| APN, CD13, GP150, LAP1, P150, PEPN | ANPEP | Błonowa aminopeptydaza alanylowa | NM_001150 | A06 | -13,28 | 0,002137 |
| ECGF1, MNGIE, PDECGF, TP, hPD-ECGF | TYMP | Fosforylaza tymidyny | NM_001953 | B07 | -9,52 | 0,001265 |
| HPA, HPR1, HPSE1, HSE1 | HPSE | Heparanaza | NM_006665 | C12 | -5,66 | 0,000129 |
| COX1, COX3, PCOX1, PGG, HS, PGHS-1, PGHS1, PHS1, PTGHS | COX-1 | Syntaza prostaglandin G/H I cyklooksygenaza | NM_000962 | F07 | -5,09 | 0,008871 |
| CSC-21K | TIMP2 | Inhibitor 2 metaloproteinaz | NM_003255 | G07 | -4,62 | 0,000001 |
| B94 | TNFAIP2 | Białko 2 indukujące TNF α | NM_006291 | G10 | -14,48 | 0,000224 |

Ekspresję białka postanowiono scharakteryzować dla genów o podwyższonej ekspresji (endogliny, łożyskowego czynnika wzrostu) oraz jednego genu o obniżonej ekspresji – cyklooksygenazy 1.

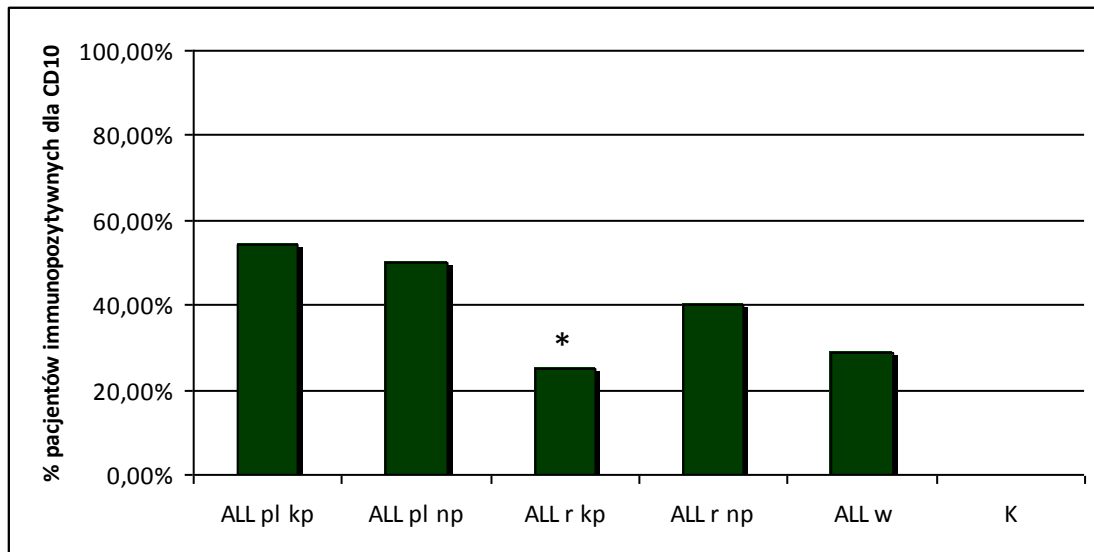
4.3 Ekspresja białka

4.3.1 Ekspresja antygeny CD10

Obecność antygeny CD10 stwierdzano w populacji komórek blastycznych szpiku kostnego (ALL przed rozpoczęciem leczenia, wznowa) oraz w prawidłowych limfocytach (remisja) (Fot. 14-18, dokumentacja fotograficzna wyników reakcji ICC i IMF znajduje się w rozdziale 10). Liczba komórek CD10 pozytywnych była różna w obrębie tej samej grupy pacjentów, jak i między grupami – od pojedynczych do wszystkich blastów.

Spośród 74 przebadanych rozmazów biopsji szpiku kostnego, w 28 (37,84%) obserwowano pozytywny wynik reakcji wykrywającej antygen CD10. W grupie z rozpoznaniem ALL przed rozpoczęciem leczenia, ekspresję białka stwierdzono u 54,17% pacjentów z korzystnym przebiegiem choroby (13/24) (Fot. 16) i u 50%

pacjentów (2/4), u których przebieg choroby był niekorzystny (Fot. 14, 15). W ALL w okresie remisji o korzystnym przebiegu 5 spośród 20 przypadków wykazywało pozytywny wynik reakcji (25%), a w ALL w remisji o niekorzystnym przebiegu – 20% pacjentów (2/5) (Fot. 17). U 6 z 21 (28,57%) pacjentów w okresie wznowy choroby stwierdzono ekspresję antygenu CD10 (Fot. 18). W żadnym przypadku z grupy kontrolnej nie obserwowano pozytywnego wyniku reakcji (Rycina 13).



Rycina 13. Odsetek pacjentów wykazujących obecność komórek pozytywnych dla CD10 w zależności od etapu ALL (pl – przed leczeniem, r – remisja, w – wznowa, K – kontrola) oraz jej przebiegu (kp – korzystny przebieg, np – niekorzystny przebieg).

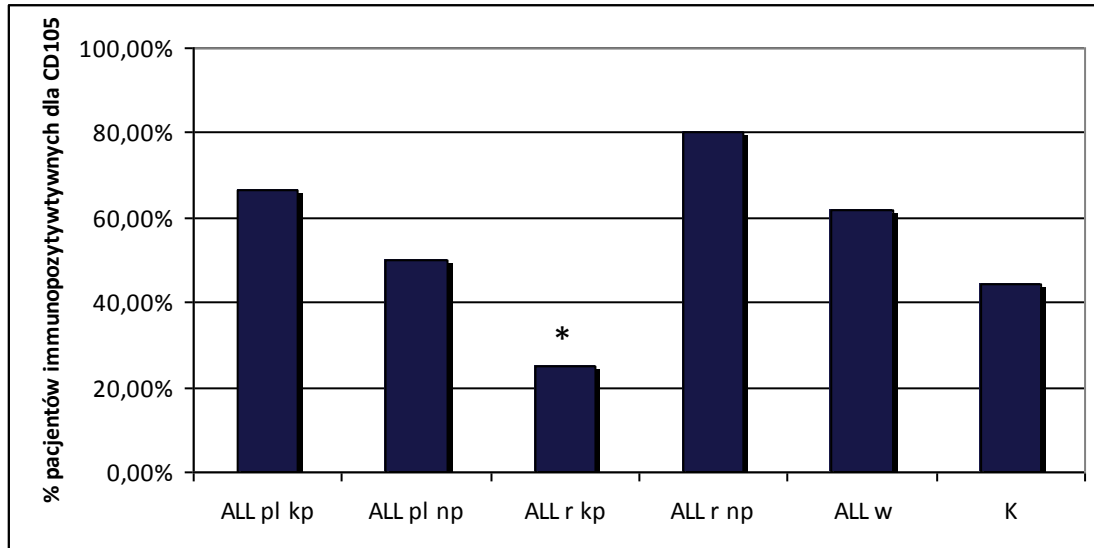
* $p=0,051$, ALL pl kp vs. ALL r kp

4.3.2 Ekspresja endogliny/CD105

Ekspresja antygenu CD105 (stwierdzona badaniem immunocytochemicznych oraz immunofluorescencyjnym) ograniczała się do komórek blastycznych szpiku oraz prawidłowych limfocytów. Pozytywny odczyn reakcji dotyczył różnego odsetka komórek w szpiku.

Największy odsetek pacjentów, u których obserwowano obecność komórek immunopozytywnych dla endogliny, stwierdzono w grupie w okresie remisji o niekorzystnym przebiegu (80%) (Fot. 4, 5, 20). Istotnie najmniejszą liczbą pacjentów CD105-pozytywnych charakteryzowała się grupa w okresie remisji o korzystnym przebiegu (5/20) (Fot. 3). W grupach pacjentów przed leczeniem (o korzystnym i niekorzystnym przebiegu) i w okresie nawrotu pacjenci z pozytywnym odczynem reakcji stanowili od 50% do 66,67% wszystkich pacjentów w grupie (Fot. 1, 2, 6, 7, 19).

Stwierdzono ponadto obecność komórek CD105-pozytywnych w biopsjach grupy kontrolnej. Odsetek pacjentów, u których obserwowano ekspresję antygeny wynosił 44,44% (4/9) (Rycina 14).



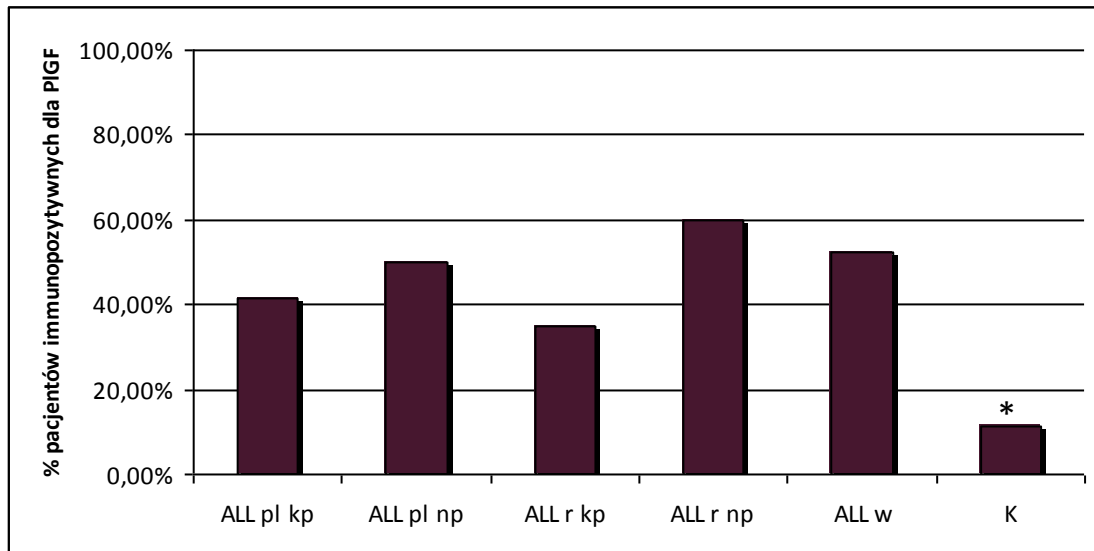
Rycina 14. Odsetek pacjentów wykazujących obecność komórek pozytywnych dla endogliny/CD105 w zależności od etapu ALL (pl – przed leczeniem, r – remisja, w – wznowa, K – kontrola) oraz jej przebiegu (kp – korzystny przebieg, np – niekorzystny przebieg).

* $p=0,006$, ALL pl kp vs. ALL r kp,
 $p=0,022$, ALL r np vs. ALL r kp

4.3.3 Ekspresja łożyskowego czynnika wzrostu PIGF

Obecność PIGF stwierdzano w blastach we wszystkich grupach pacjentów. Ekspresja ta dotyczyła z reguły pojedynczych komórek jądrzastych szpiku.

Odsetek pacjentów immunopozytywnych wahał się od 35% (7/20) w grupie pacjentów z remisją o korzystnym przebiegu do 60% (3/5) w grupie z remisją o niekorzystnym przebiegu (Fot. 8). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w odsetku pacjentów immunopozytywnych pomiędzy grupami (Fot. 9-11). W przypadku grupy kontrolnej tylko u jednego pacjenta obserwowano pozytywny odczyn reakcji (Rycina 15).



Rycina 15. Odsetek pacjentów wykazujących obecność komórek pozytywnych dla PIGF w zależności od etapu ALL (pl – przed leczeniem, r – remisja, w – wznowa, K – kontrola) oraz jej przebiegu (kp – korzystny przebieg, np – niekorzystny przebieg).

$p < 0,05$, ALL pl np vs. K,

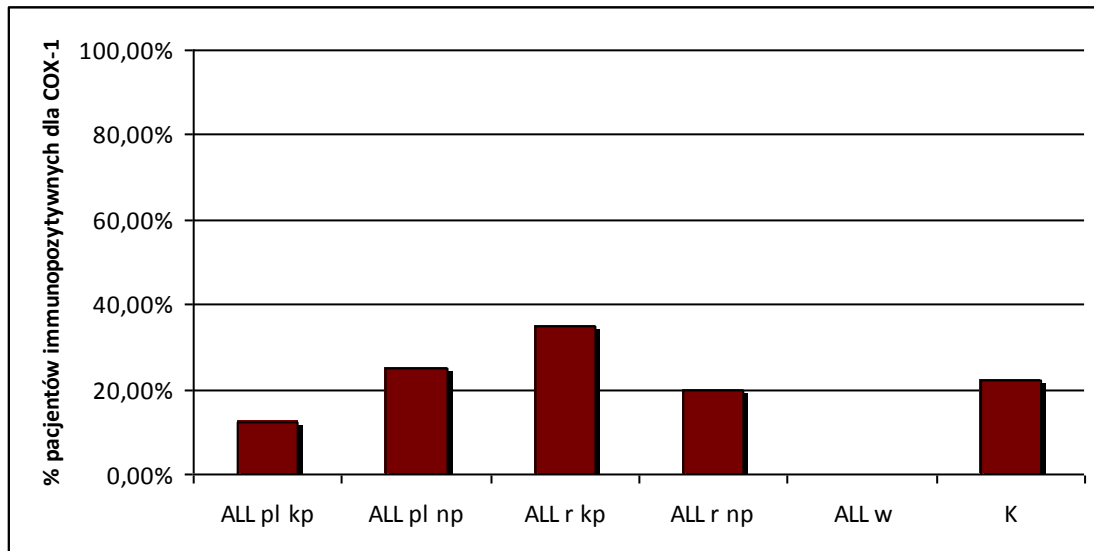
$p < 0,05$, ALL r np vs. K,

$p < 0,05$, ALL w vs. K

4.3.4 Ekspresja cyklooksygenazy 1 COX-1

Podobnie do w/w antygenów, tak i w przypadku antygeny COX-1 obserwowano różnice w ekspresji białka pomiędzy komórkami szpiku kostnego w obrębie danej grupy, jak i pomiędzy grupami. Natomiast nie stwierdzono obecności COX-1 w całej populacji komórek jądrzastych szpiku u żadnego pacjenta ze wznową ALL.

Największy odsetek pacjentów immunopozytywnych stwierdzono w grupie w okresie remisji z korzystnym przebiegiem (35%), a najniższy – w grupie przed leczeniem o korzystnym przebiegu (12,5%) (Fot. 12, 13). Nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy pozostałymi grupami, za wyjątkiem wznowy ALL, w której u żadnego z przebadanych pacjentów reakcja nie dała pozytywnego wyniku. 22,22% pacjentów (2/9) z grupy kontrolnej wykazało ekspresję antygeny COX-1 (Rycina 16).



Rycina 16. Odsetek pacjentów wykazujących obecność komórek pozytywnych dla COX-1 w zależności od etapu ALL (pl – przed leczeniem, r – remisja, w – wznowa, K – kontrola) oraz jej przebiegu (kp – korzystny przebieg, np – niekorzystny przebieg).

4.3.5 Porównanie ekspresji antygenów CD105, PIGF, COX-1 i CD10 z obrazem klinicznym choroby

W celu określenia przydatności wybranych antygenów do oceny prognozy u pacjenta zweryfikowano zależność między odsetkiem pacjentów immunopozytywnych a etapem choroby (przed rozpoczęciem leczenia, remisja, wznowa) i jej przebiegiem (korzystny, niekorzystny). W pierwszej kolejności przeprowadzono porównanie ekspresji białek w grupach: przed leczeniem, w okresie remisji i wznowy w obrębie pacjentów, u których choroba miała korzystny przebieg oraz wśród pacjentów z chorobą o niekorzystnym przebiegu. W ramach tej analizy stwierdzono, że ekspresja antygeny CD105 przed rozpoczęciem leczenia sugeruje wystąpienie remisji choroby ($p = 0.008$). Podobną zależność zaobserwowano również dla antygeny CD10 ($p = 0,051$) (Tabela 7).

Tabela 7. Zależność pomiędzy odsetkiem przypadków immunopozytywnych dla danego antygenu a przebiegiem ALL w zależności od jej etapu

| Przebieg ALL | | CD105 | PIGF | COX-1 | CD10 |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------|---------|---------|----------------|
| ALL korzystny przebieg | przed leczeniem vs. remisja | p=0,008 | p=0,760 | p=0,147 | p=0,051 |
| ALL niekorzystny przebieg | przed leczeniem vs. Remisja/wznowa | p=0,611 | p=1,000 | p=0,301 | p=1,000 |
| | remisja vs. wznowa | p=0,628 | p=1,000 | p=0,192 | p=0,628 |

Następnie dokonano zestawienia odsetka przypadków immunopozytywnych pomiędzy grupami (przed leczeniem, remisja, wznowa) o korzystnym i niekorzystnym przebiegu a grupą kontrolną. Stwierdzono, że ekspresja antygenu PIGF związana jest z wystąpieniem wznowy ($p = 0,049$). Ustalono również, że brak ekspresji COX-1 jest charakterystyczny dla okresu wznowy, a zatem sugeruje niekorzystny przebieg choroby ($p = 0,026$) (Tabela 8).

Tabela 8. Zależność pomiędzy odsetkiem przypadków immunopozytywnych dla danego antygenu a etapem ALL w zależności od jej przebiegu

| Etap ALL | | CD105 | PIGF | COX-1 | CD10 |
|----------------------------|------------------------------------|---------|----------------|----------------|---------|
| ALL przed leczeniem | korzystny przebieg vs. kontrola | p=0,425 | p=0,212 | p=0,597 | p=0,192 |
| | niekorzystny przebieg vs. kontrola | p=1,000 | p=0,203 | p=1,000 | p=0,192 |
| ALL remisja | korzystny przebieg vs. kontrola | p=0,396 | p=0,212 | p=0,675 | p=0,153 |
| | niekorzystny przebieg vs. kontrola | p=0,301 | p=0,203 | p=1,000 | p=0,110 |
| ALL wznowa | wznowa vs. kontrola | p=0,443 | p=0,049 | p=0,026 | p=0,141 |

Szczegółowe zestawienie wyników reakcji immunocytochemicznych znajduje się w Tabeli 9 i Tabeli 10 w Załączniku 1.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w przeciągu ostatnich 25 lat w dziedzinie diagnozowania, sposobów monitorowania oraz leczenia ostrych białaczek u dzieci, nadal około 10 – 15% pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej umiera z powodu progresji choroby lub powikłań będących efektem zastosowanej kompleksowej terapii. Na uwagę zasługuje fakt, że o ile w pierwszej połowie lat 90-tych ubiegłego wieku podstawową przyczyną zgonów dzieci z rozpoznaniem ALL było zaostrzenie choroby prowadzące do wielonarządowej niewydolności wynikającej z obecności nacieków limfoblastycznych, o tyle w ostatnim dziesięcioleciu pierwszą przyczyną zejść śmiertelnych pacjentów z rozpoznaniem ALL stały się powikłania (najczęściej o charakterze ciężkich infekcji) będące konsekwencją wyniszczenia organizmu stosowaną chemioterapią.

Podstawowym dylematem towarzyszącym lekarzom prowadzącym pacjenta z ALL staje się w ostatnich latach pytanie: w jaki sposób kwalifikować pacjentów do grup ryzyka i w jaki sposób prowadzić leczenie tych osób, u których zauważono niekorzystny przebieg choroby (np. zjawisko oporności na leki steroidowe, opóźnione uzyskanie remisji czy też pojawienie się nawrotu choroby). W wielu sytuacjach leczenie jest oparte na fundamencie różnych, zaakceptowanych przez określone środowisko lekarskie, protokołów terapeutycznych. Jednakże w pewnej grupie pacjentów (obejmujących wspomniane wyżej 10 – 15% wszystkich chorych z rozpoznaniem ALL) postępowanie wg sprawdzonych protokołów leczniczych okazuje się niewystarczające. Chorzy ci wymagają bowiem znacznie bardziej rozwiniętej indywidualizacji leczenia oraz monitorowania jego skutków. Obecny stan rzeczy sprowadza się do sytuacji, w której pacjent z nawrotem ALL jest poddawany coraz to nowym schematom chemioterapii (łącznie z przeprowadzeniem transplantacji komórek hemopoetycznych), co nieuchronnie prowadzi do postępującego wyniszczenia i istotnie większego narażenia na potencjalnie śmiertelne czynniki zakaźne.

Czy nakreślony stan rzeczy można byłoby zmienić? Wydaje się, że najbardziej pożądanym elementem indywidualizacji leczenia w takich przypadkach nie jest zaostrzenie stosowanych protokołów terapeutycznych, ale próba zastosowania celowanej chemioterapii, opartej przede wszystkim na znajomości biologii nowotworu. Taki rodzaj leczenia jest obecnie wykorzystywany w ograniczonym zakresie. Polega on przede wszystkim na ocenie wrażliwości komórek nowotworowych na różne

chemioterapeutyki oraz próbach stosowania terapii wykorzystujących podawanie przeciwciał, w sposób wybiórczy niszczących określoną populację komórek nowotworowych. Chlubnym, choć odosobnionym, wyjątkiem w tego rodzaju działaniu jest stosowanie leków uniemożliwiających proces translacji u pacjentów z obecnością translokacji t(9:22) (chromosom Philadelphia).

Niewiele można również powiedzieć na temat praktycznych aspektów stosowania leków hamujących proces nowotworowej angiogenezy w chorobach limfoproliferacyjnych. Choć zagadnienie i poruszana w ramach niego problematyka nie jest nowa, trudno znaleźć przykłady powszechnie akceptowanych protokołów terapeutycznych pozwalających na stosowanie leków antyangiogennych u pacjentów z niepowodzeniami leczenia. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy nie jest obawa przed niepożądanymi skutkami ubocznymi leków hamujących proces angiogenezy, ale brak wystarczających liczby dowodów wskazujących na udział czynników proangiogennych w patogenezie ALL oraz innych chorób limfoproliferacyjnych.

Na tym tle, uzyskane wyniki należałoby omówić w dwóch płaszczyznach. Pierwsza z nich dotyczy zamiaru scharakteryzowania pewnych aspektów biologii (patomechanizmu) ostrej białaczki limfoblastycznej zależnej od rozwoju nowych (patologicznych) naczyń krwionośnych. Drugi aspekt winien dotyczyć próby oceny wartości prognostycznej badanych w niniejszej rozprawie białek, które mogłyby posłużyć jako nowe czynniki wskazujące określony przebieg choroby i, być może, wpływać na bardziej adekwatną kwalifikację pacjentów do określonych grup ryzyka.

Biologia ostrej białaczki limfoblastycznej pozostaje nadal zagadką. W przeciwieństwie do guzów litych, gdzie proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych jest całkowicie logiczny i zrozumiały, zagadnienie neowaskularyzacji w nowotworach hematologicznych pozostaje w kręgach domysłów i przypuszczeń. Pojawia się pytanie, w jaki sposób wytłumaczyć konieczność powstawania tychże naczyń w nowotworach układu krwiotwórczego, skoro sam nowotwór rozwija się w środowisku szpiku kostnego, czyli miejscu powstawania krwi. Z pewnością proces powstawania nowych naczyń nie ma zabezpieczać proliferującym komórkom nowotworowym dopływu składników odżywczych, tlenu czy też czynników stymulujących ich wzrost. O fakcie tym przesądza również kliniczny przebieg tej grupy nowotworów: nie stwierdza się guza pierwotnego, a choroba ma charakter pierwotnie uogólniony. Co więcej, komórki nowotworowe obecne w szpiku kostnym mają stały i łatwy dostęp do już istniejących naczyń obecnych w przedziale zatokowym szpiku.

A jednak, co zauważono ze zdziwieniem już w latach 90-tych ubiegłego wieku, również nowotwory hematologiczne, w tym ostra białaczka limfoblastyczna charakteryzują się większą liczbą naczyń krwionośnych obecnych w szpiku kostnym, jak i większym stężeniem szeregu czynników proangiogennych w surowicy krwi. Pytanie, jakie można w tym miejscu postawić brzmi: czy jest to celowe działanie w przebiegu ALL? A może komórki nowotworowe, powielając schemat „zachowania” innych komórek nowotworowych w guzach litych, zaczynają wytwarzać naczynia krwionośne bez zamiaru ich wykorzystania? Odpowiedź na to pytanie jest złożona. Po pierwsze, w żadnym rodzaju nowotworu nie ma działań celowych, wynikających z optymalnego sposobu zarządzania energią oraz dostępnymi składnikami, jak ma to miejsce w prawidłowej tkance. Nowotwór to chaos, którego zasadniczym efektem jest destabilizacja istniejących struktur i układów zależności. Na tym tle, tworzenie nowych naczyń krwionośnych w nowotworze hematologicznym może być traktowane jako czysty przypadek. Przypadek, który jednak nie pozostaje bez zgubnych konsekwencji. Okazuje się bowiem, że nowo wytworzone naczynia krwionośne, być może również z samych komórek nowotworowych, nie ulegają destrukcji w czasie podczas terapii farmakologicznej. Nasuwa to przypuszczenie, że stają się one swoistego rodzaju niszą, rezerwuarem dla blastów, które umiejscawiają się poza zasięgiem stosowanych chemioterapeutyków (Ratajczak i wsp., 1998). Jednocześnie, oprócz niewątpliwej korzyści w postaci „schronienia”, komórki nowotworowe zyskują dodatkowe źródło czynników wzrostu – komórki endotelialne naczyń zaczynają produkować substancje stymulujące ich wzrost, różnicowanie i proliferację. Należy tu zaznaczyć, że naczynia syntetyzują także regulatory angiogenezy – czynniki o charakterze stymulatorów i inhibitorów, co jest *de facto* ich naturalną funkcją, ulegającą intensyfikacji w chorobach nowotworowych. Jednocześnie zgodnie z teorią dotyczącą angiogenezy związanej z kancerogenezą za produkcję czynników proangiogennych odpowiedzialne są także komórki nowotworowe. W przypadku rozrostów limfoproliferacyjnych zalicza się do nich również komórki podścieliska szpiku kostnego. Znajomość tych faktów pozwoliła na stworzenie modelu wykazującego układ zależności pomiędzy różnymi populacjami komórek w nowotworach hematologicznych w aspekcie angiogenezy. Postuluje się istnienie szeregu pętli o charakterze auto- i parakrynnym, wytwarzanych przez w/w typy komórek i oddziałujących na nie. W efekcie wystąpienia tych zdarzeń dochodzi do ukształtowania się mikrośrodowiska w szpiku kostnym bogatego w nowo powstające naczynia krwionośne sprzyjające rozwojowi nowotworu (Keyhani i wsp.,

2001). Jak już wspomniano, neoangiogeneza w rozrostach limfoproliferacyjnych przejawia się nie tylko zwiększoną liczbą naczyń w szpiku, ale także podwyższonym stężeniem czynników stymulujących angiogenezę w płynach ustrojowych (Perez-Atayde i wsp. 1997, Faderl i wsp., 2005, Avramis i wsp., 2006). Aguayo i wsp. (2000) stwierdzili m.in., że stężenie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w szpiku kostnym i krwi obwodowej stanowi niezależny czynnik rokowniczy u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Podobne rezultaty uzyskał Avramis i wsp., wykazując że oprócz tego, że wysoki poziom VEGF w surowicy krwi dotyczył dzieci z ALL, u których nastąpiła wznowa choroby, to dodatkowo ujemnie korelował on z czasem pojawienia się nawrotu. Potwierdziła to grupa Lyu (2007), która obserwowała istotnie wyższy poziom VEGF oraz czynnika wzrostu fibroblastów u dzieci z ostrą białaczką. Badania określające stężenie regulatorów angiogenezy dotyczą także poziomu molekularnego. Koomagi i wsp. (2001) stwierdzili podwyższony poziom mRNA kodującego naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu w ALL w okresie wznowy, co potwierdził później Stachel i wsp. (2007). Ponadto czas przeżycia bez nawrotu oraz całkowity czas przeżycia ujemnie korelował ze stężeniem VEGF. Oczywiście najbardziej miarodajną metodą określającą intensywność angiogenezy jest bezpośrednia ocena mikrounaczynienia w szpiku kostnym. Już koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku przyniósł informacje dotyczące zwiększonej gęstości naczyń krwionośnych w szpiku (*microvessel density*, MVD) pacjentów z ostrą białaczką (Perez-Atayde i wsp., 1997, Hussong i wsp., 2000). Wykazano także, że podwyższony MVD rokuje wystąpienie niekorzystnych zdarzeń w trakcie rozwoju ALL, takich jak nawrót czy zgon (Norén-Nyström i wsp., 2009). Korkolopoulou i wsp. (2001) stwierdzili ujemną korelację między całkowitym obszarem naczyniowym (*total vascular area*, TVA) w szpiku a czasem całkowitego przeżycia oraz między gęstością mikronaczyń szpiku kostnego a czasem wolnym od choroby u chorych na zespoły mielodysplastyczne. Na tym tle, wydaje się być uzasadnionym monitorowanie pośrednich (ekspresja czynników pro- i antyangiogennych) jak i bezpośrednich (ocena stopnia mikrounaczynienia w szpiku kostnym) parametrów neowaskularyzacji, zmierzających do próby modyfikowania postępowania terapeutycznego u pacjentów z nowotworami hematologicznymi.

Wyniki prezentowanych badań uzyskano opierając się na materiale, który stanowiła krew obwodowa będąca źródłem komórek blastycznych – powstających w szpiku, a następnie transportowanych do krwiobiegu. Jest to w związku z tym

materiał wystarczająco reprezentatywny, a jednocześnie pozyskiwany w sposób prosty i mało inwazyjny. Badania przeprowadzono również bazując na rozmazach biopsji szpiku kostnego, rutynowo wykonywanych w diagnostyce ostrej białaczki limfoblastycznej. W badaniach nie zastosowano bezpośredniej analizy gęstości i jakości naczyń krwionośnych w szpiku kostnym. Istotnym utrudnieniem redukującym możliwość wykonania tego typu oceny jest fakt bardzo zawężonych wskazań wykonywania trepanobiopsji u dzieci. Do najważniejszych z nich należą nieuzyskanie materiału z biopsji aspiracyjnej, podejrzenie włóknienia szpiku, podejrzenie choroby spichrzeniowej lub ustalenie stopnia aplazji lub hipoplazji szpiku. Oznacza to zatem, że w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej jak i, generalnie, ostrych białaczek u dzieci jedyną możliwością oceny angiogenezy w szpiku kostnym jest metoda pośrednia, która opiera się na określeniu poziomu ekspresji czynników regulujących angiogenezę w danym układzie biologicznym

Pierwszy etap badań polegał na określeniu ekspresji panelu 84 genów, o których wiadomo, że są – w różny sposób i w różnym stopniu – zaangażowane w regulację neowaskularyzacji. W zdecydowanej większości badań związanych z angiogenezą w nowotworach hematologicznych, analiza ekspresji ogranicza się do wybranych, pojedynczych czynników i są to z reguły cząsteczki uznane za najistotniejsze dla tego procesu (VEGF, FGF). Postępowanie takie z reguły nie uwzględnia możliwości zaangażowania innych regulatorów w zachodzenie angiogenezy w tym typie nowotworów. Należy pamiętać, że biologia każdego rodzaju nowotworu jest inna, co wiąże się z odmiennym podłożem molekularnym, a zatem zestawem genów zaangażowanych w nowotworzenie. W związku z tym wydaje się być istotne wykonanie przesiewu, mającego na celu stworzenie profilu ekspresji grupy genów, co w efekcie umożliwi wskazanie tych o potencjalnie istotnym znaczeniu. Kierując się tymi przesłankami, za pomocą reakcji PCR określono różnice w ekspresji wybranych genów (Tabela 5) w grupie pacjentów ze zdiagnozowaną ALL i grupie kontrolnej (osoby zdrowe). Biorąc pod uwagę parametry techniczno-metodologiczne (niespecyficzne produkty, bardzo niski poziom ekspresji) z badania wykluczono 19 genów. Spośród pozostałych 65 wyłoniono te, których ekspresja znacząco różniła się pomiędzy grupami (zmiana była co najmniej 4-krotna, przy $p < 0,05$). Stwierdzono, że podwyższoną ekspresję w grupie badanej wykazują endogлина/CD105 oraz łożyskowy czynnik wzrostu. Ponadto zaobserwowano obniżenie ekspresji w przypadku 6 genów: błonowej aminopeptydazy alanylowej (ANPEP), fosforylasy tymidyny (TYMP),

heparanazy (HPSE), syntazy prostaglandyn G/H i cyklooksygenazy (COX-1/PTGS1), inhibitora 2 metaloproteinaz (TIMP2) oraz białka 2 indukowanego przez TNF α (TNFAIP2).

Podwyższony poziom transkryptu sugeruje także zwiększoną ilość białka w komórce, nie jest to jednak jednoznaczne. W związku z tym w kolejnym etapie badań postanowiono dokonać oceny ekspresji endogliny i PlGF polegającej na immunocytochemicznej detekcji białka na rozmazach biopsji szpiku kostnego pochodzących od dzieci z ALL. Endoglina jest przezbłonową glikoproteiną, której obecność charakterystyczna jest przede wszystkim dla aktywowanych komórek śródbłonna (Letamendia i wsp., 1998). Pełni funkcję receptora pomocniczego systemu receptorów dla transformującego czynnika wzrostu β (TGF β). Sądzi się, CD105 moduluje odpowiedź komórek na działanie TGF β poprzez uruchamianie (TGF β /ALK1) bądź hamowanie (TGF β /ALK5) szlaków sygnalizacyjnych, co inicjuje proliferację, migrację i adhezję komórek śródbłonna oraz blokuje apoptozę (Rius i wsp., 1998). Udział endogliny w angiogenezie przypisuje się temu działaniu. Obserwuje się obecność antygeny w naczyniach około- i śródnowotworowych i dotyczy to m.in. raka piersi, jelita grubego czy jajnika (Dallas i wsp., 2008). Ekspresja endogliny koreluje z reguły z niepomyślną prognozą (Ding i wsp., 2006, Akagi i wsp., 2002, Li i wsp., 2000a). Stwierdza się podwyższony poziom CD105 w surowicy pacjentów z nowotworami mieloidalnymi (Calabrò i wsp., 2002), jak również w przypadku przewlekłej białaczki typu B (Kay i wsp., 2002). Łożyskowy czynnik wzrostu należy do dużej rodziny stymulatorów angiogenezy VEGF. Inicjacja tworzenia naczyń z jego udziałem zachodzi na kilku drogach: poprzez wiązanie się ze swoim receptorem VEGFR-1, stymulację wiązania VEGF do VEGFR-2 czy rekrutację hemopoetycznych komórek progenitorowych ze szpiku (Maglione i wsp., 1991, Luttun i wsp., 2002b, Carmeliet i wsp., 2001). Poziom PlGF koreluje ze stadium nowotworu, jego unaczynieniem, potencjałem tworzenia przerzutów oraz czasem przeżycia (Ribatti, 2008). Obserwuje się podwyższoną ekspresję tego czynnika w białaczkach szpikowych (Lee i wsp., 2007).

O ile podwyższenie ekspresji genów było zjawiskiem oczekiwanym, o tyle nie spodziewano się uzyskania danych sugerujących niższą ekspresję regulatorów angiogenezy. Zaskakującym był również fakt, iż sytuacja ta dotyczyła aż 6 genów, które w większości charakteryzuje się jako stymulatory neowaskularyzacji. Gen ANPEP,

zwany także antygenem CD13, jest proteazą zaangażowaną w proteolizę zewnątrzkomórkową i sugeruje się jej udział w angiogenezie (Hashida i wsp. 2002). CD13 jest uznanym antygenem mieloidalnym (Radwańska (red.), 1998, Czyż i wsp., 2008), co być może jest wytłumaczeniem dla jego obniżonej ekspresji w prezentowanym badaniu, które dotyczy białaczek linii limfoidalnej. Białko TYMP jest enzymem katalizującym konwersję tymidyny do tyminy (Bronckaers i wsp., 2009). Nazywane jest też PD-ECGF (*platelet derived-endothelial cell growth factor*), co wynika z jego udziału w angiogenezie (poprzez stymulację migracji komórek śródbłonna). Co ciekawe, obserwuje się ekspresję TYMP w prawidłowych limfocytach, natomiast stwierdza się znacznie obniżony poziom białka w komórkach blastycznych (Shiotani i wsp., 1989). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach. Heparanaza posiada funkcję endoglikozydazy odcinającej siarczany heparanu z białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co przejawia się m.in. uwalnianiem FGF podczas angiogenezy. Uważa się, że aktywność tego białka koreluje z potencjałem tworzenia przerzutów w guzach litych. W przypadku białaczek stwierdza się, że jego ekspresja jest charakterystyczna przede wszystkim dla typu szpikowego (Bitan i wsp., 2002). Stąd też uzyskany wynik może być pośrednim potwierdzeniem tej hipotezy. TIMP2 jest inhibitorem metaloproteinaz (MMP). Z funkcją tą wiąże się m.in. hamowanie podziałów komórkowych śródbłonna naczyń, co kwalifikuje to białko do inhibitorów angiogenezy. Jako że funkcja tego czynnika ściśle związana jest z MMP, jego ekspresję charakteryzuje się, również w przypadku białaczek, wspólnie z metaloproteinazami. W ALL stwierdza się, że odpowiednia proporcja pomiędzy MMP a TIMP2 (na korzyść MMP) związana jest z pozaszpikowym umiejscowieniem choroby, co jednocześnie jest przejawem niepomyślnej prognozy (Suminoe i wsp., 2007). W tej sytuacji obniżenie ekspresji TIMP2 wydaje się świadczyć o potencjale angiogennym blastów. TNFAIP2 zidentyfikowano jako czynnik aktywowany przez TNF α w komórkach endotelialnych, stąd też postuluje się jego zaangażowanie w angiogenezę (Rusiniak i wsp., 2000). Doniesienia literaturowe sugerują udział białka w patogenezie białaczek szpikowych, natomiast nie stwierdza się jego obecności w innych typach nowotworów hematologicznych (Rusiniak i wsp., 2000). Zatem obniżona ekspresja tego czynnika może wiązać się z limfoblastycznym typem białaczki. Wśród białek, których ekspresja była niższa u pacjentów z ALL, ciekawym wydaje się być cyklooksygenaza 1. Enzym ten zaangażowany jest w przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn. Jako że prostaglandyny mają duży wpływ na nowotworzenie naczyń, tą funkcją uzasadnia się

udział COX-1 w angiogenezie. Ponadto sugeruje się, że enzym aktywuje geny odpowiedzialne za formowanie światła naczyń (Tsujii i wsp., 1998). Izoforma 1 cyklooksygenazy ulega konstytutywnej ekspresji w większości tkanek ludzkich. W związku z tym fakt zaangażowania PTGS1 w angiogenezę rozpatruje się na poziomie fizjologicznych zdarzeń zachodzących w organizmie. W obliczu tej hipotezy, obniżona ekspresja genu znajduje swoje uzasadnienie, sugerując brak jego udziału w patogenezie ALL. Doniesienia literaturowe dotyczą w głównej mierze izoformy 2 cyklooksygenazy, niewiele jest tych określających potencjalną rolę COX-1 w kancerogenezie i brakuje wśród nich powiązań z nowotworami limfoproliferacyjnymi. Na tym tle niezwykle interesująca wydaje się być dokładna ocena ekspresji COX-1 w ostrej białaczce limfoblastycznej. Postanowiono zatem włączyć czynnik PTGS1 do drugiej fazy badań. W przypadku pozostałych genów z tej grupy odstępiono od oceny ekspresji białka, uznając, iż obniżona ekspresja sugeruje także niski poziom/brak białka. W związku z tym ocena COX-1 w komórkach blastycznych szpiku kostnego była też swego rodzaju kontrolą, mającą na celu porównanie poziomu mRNA i białka.

Antygen CD10, zwany również CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*) był pierwszym markerem umożliwiającym identyfikację komórek blastycznych w ALL. Jest to glikozylowane białko, wykazujące aktywność endopeptydazową. Jego fizjologiczną ekspresję wykazują m.in. enterocyty, kanaliki nerkowe i komórki nerwowe w mózgu. Pełni on w organizmie szereg funkcji zależnych od substratów w poszczególnych narządach i typach komórek (Béné i Faure, 1997, Kubiak-Wlekły i Niemir, 2009). CD10 zaangażowane jest w dojrzewanie limfocytów B. Ekspresję antygeny stwierdza się w białaczkach o fenotypie wczesne pre-B oraz pre-B (Radwańska (red.), 1998). Odsetek komórek CD10-pozytywnych zmniejsza się w bardziej dojrzałych formach ALL typu B (Béné i Faure, 1997). Jako że wczesne pre-B ALL (III i IV grupa) oraz pre-B ALL stanowią aż 85% wszystkich ALL, antygen CALLA może być uznany jako marker komórek ostrej białaczki limfoblastycznej. Z tego też względu w ramach wewnętrznej kontroli pozytywnej postanowiono dodatkowo wykonać analizę immunocytochemiczną dla CD10.

Jak już wspomniano, druga część prezentowanych badań polegała na określeniu ekspresji wybranych czynników regulujących angiogenezę (endogлина, łożyskowy czynnik wzrostu, cyklooksygenaza 1) oraz antygeny CD10 na poziomie białka. Etap ten przeprowadzono wykorzystując narzędzia immunocytochemiczne – klasyczną technikę ABC oraz, w przypadku CD105, również immunofluorescencję. Zastosowanie

dotatkowej techniki w przypadku analizy ekspresji endogliny wiązało się z weryfikacją specyficzności uzyskanego odczynu w metodzie ABC. Działanie takie było niezbędne, gdyż stosowane przeciwciało anti-CD105 przeznaczone do detekcji białek metodami immunocytochemicznymi wykazywało swoistość wielogatunkową (ludzką, mysią oraz szczurzą).

Ocenę ekspresji białek przeprowadzono na 74 archiwalnych rozmazach biopsji szpiku kostnego, które pobrano od dzieci ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną, hospitalizowanych w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 1997-2005. Warto tutaj zwrócić uwagę na sposób utrwalania preparatów. Rozmazy w ciągu 24 godzin od pobrania poddawano działaniu 96% etanolu (30 min, temperatura pokojowa) i zamrażano w temperaturze -20°C . W czasie co najmniej 5 lat (w przypadku biopsji wykonanych najpóźniej) preparaty wielokrotnie rozmrażano i zamrażano. Zaobserwowano, że działanie takie było korzystne z punktu widzenia badań immunocytochemicznych, ponieważ prowadziło do permeabilizacji błon komórkowych, ułatwiając tym samym cząsteczkom przeciwciał penetrację obszaru cytoplazmatycznego komórki. Biopsje szpiku kostnego pobrano od 49 pacjentów. Różnica w ilości preparatów i liczbie pacjentów wynika z faktu, iż u niektórych z nich aspiracje wykonano kilkakrotnie w różnych okresach rozwoju ALL (co szczegółowo przedstawiono w Rozdziale 3.4). Dało to możliwość śledzenia przebiegu choroby u jednego pacjenta z jednoczesną obserwacją ekspresji badanych antygenów. Należy tu również nadmienić, że okres obserwacji pacjentów od momentu pobrania materiału był stosunkowo długi, bo co najmniej 5-letni, co z kolei stworzyło szansę na określenie charakteru przebiegu choroby (wejście w trwałą remisję bądź nawrót i/lub zgon).

Po przeprowadzeniu reakcji immunocytochemicznych dokonano oceny poddanych analizie preparatów. Ocena jakościowa wyników reakcji ICC w rozmazach komórkowych jest problematyczna. Należy pamiętać, że w takich przypadkach, odmiennie niż w skrawkach, dokonuje się obserwacji całych komórek, co stwarza trudności w ocenie umiejscowienia odczynu (jądro komórkowe, cytoplazma, błona komórkowa). Szczególnie skomplikowane jest to, gdy sytuacja dotyczy komórek limfoblastycznych szpiku kostnego, w których obszar cytoplazmy niemalże pokrywa się z obszarem błony komórkowej. Nie podejmowano w związku z tym próby identyfikacji lokalizacji odczynu. Nie wykonywano także oceny ilościowej. Wdrożenie tego typu postępowania spowodowałoby zmniejszenie liczebności grup pacjentów, co z kolei

uniemożliwiłoby przeprowadzenie analizy statystycznej. Przyjęto natomiast, że każdy pacjent, u którego stwierdzano $> 5\%$ immunopozytywnych, wykazywał ekspresję danego antygeny.

Wykorzystując test Gaussa, porównano odsetek pacjentów wykazujących ekspresję danego antygeny pomiędzy grupami zdefiniowanymi na podstawie etapu choroby i jej przebiegu oraz w kontroli. Pozwoliło to na określenie, która z badanych grup, a zatem stadium choroby zależnie od sekwencji zdarzeń występujących w trakcie jej rozwoju, charakteryzowała się największym odsetkiem pacjentów immunopozytywnych, a która najmniejszym.

Podczas oceny reakcji ICC dla antygeny CD10 stwierdzono jego ekspresję we wszystkich grupach pacjentów. Nie zaobserwowano natomiast obecności białka u żadnego pacjenta z grupy kontrolnej. Wynik ten był spodziewany, jako że wśród tych pacjentów nie było żadnego z rozrostem limfoproliferacyjnym, dla którego charakterystyczny jest ten antygen. W obrębie grupy badanej odsetek pacjentów z pozytywnym odczynem wahał się od 28,57% we wznowie do 54,17% w ALL przed leczeniem o korzystnym przebiegu. Zatem poziom ekspresji w tych grupach niewiele się różnił. Natomiast istotnie najniższy odsetek pacjentów immunopozytywnych ($p = 0,051$) wykazano w grupie z remisją, u której nie obserwowano później wystąpienia niekorzystnych zdarzeń (25% pacjentów). Z racji braku CD10 w prawidłowych limfocytach fakt obecności antygeny w remisji był nieco zaskakujący. Natomiast dane literaturowe wskazują na ekspresję CD10 w tym okresie choroby, co może wiązać się z istnieniem choroby resztkowej (*minimal residual disease*, MDR). Na tym tle uzyskane wyniki (niewielki odsetek pacjentów immunopozytywnych w remisji) zdają się świadczyć o korzystnym przebiegu choroby.

Ekspresję antygeny CD105 oceniano dwiema metodami – immunocytochemiczną oraz immunofluorescencyjną. Nie zaobserwowano różnicy w specyficzności uzyskanych odczynów, uznano zatem, że przeciwciała o wielogatunkowej swoistości dedykowane do ICC może być stosowane do wykrywania CD105 w ludzkich komórkach szpiku kostnego. Obecność endogliny stwierdzono w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej. Należy tutaj zwrócić uwagę na fakt, że większość badań dotyczących endogliny koncentruje się na ocenie użyteczności białka jako markera gęstości unaczynienia w nowotworach, co jest wynikiem tego, że komórki śródbłonna są głównym źródłem tego czynnika (Wang i wsp., 1994, Wikström i wsp., 2002, Yu i wsp., 2003, , Fonsatti i wsp., 2001, Bernabeu i wsp., 2009). Co

ciekawe, oznaczenia CD105 w nowotworach, poza wizualizacją naczyń krwionośnych, dotyczą głównie rozpuszczalnej formy białka. Stwierdza się jej podwyższony poziom w surowicy w raku piersi, szczególnie u tych pacjentów, u których wystąpiły przerzuty (Li i wsp., 2000a). Podobnych obserwacji dokonał Takahashi i wsp., (2001) który obserwował znacznie wyższe stężenie tego czynnika w przerzutach w raku jelita grubego. Badania te nie identyfikują jednak źródła, z którego może pochodzić rozpuszczalna forma endogliny – może być uwalniana zarówno przez komórki endotelium, jak i komórki nowotworowe. Doniesienia literaturowe potwierdzają natomiast ekspresję CD105 także w samych komórkach nowotworowych, co może mieć nie tylko znaczenie dla powstawania nowych naczyń, ale także wpływać na ich proliferację i migrację (Fonsatti i wsp., 2001, Pérez-Gómez i wsp., 2010). Dlatego też fakt wykrywania endogliny w limfoblastach nie jest zaskakujący. Odsetek pacjentów immunopozytywnych dla CD105 w grupie kontrolnej wynosił aż 44,44%. Znajduje to jednak potwierdzenie w danych literaturowych. Styczyński i wsp. (2007), którzy oceniali ekspresję CD105 w komórkach szpiku kostnego u dzieci chorych na nowotwory, w tym także w ALL, stwierdzili obecność antygenu także wśród zdrowych dawców szpiku. Wśród pacjentów z grupy badanej w ALL przed leczeniem o korzystnym i niekorzystnym przebiegu oraz we wznowie odsetek pacjentów z pozytywnym wynikiem reakcji był na tym samym poziomie (50% - 66,67%). Istotnie najniższą liczbę pacjentów z ekspresją CD105 obserwowano w remisji o korzystnym przebiegu (25%), co można interpretować jako zmniejszenie się produkcji endogliny na tym etapie ALL. Pośrednio może to sugerować zaangażowanie białka w progresję choroby. Dodatkowo zdaje się to potwierdzać fakt, że najwyższy odsetek pacjentów z ekspresją endogliny (80%) obserwowano w grupie remisji, w której wystąpiły niekorzystne zdarzenia, co może świadczyć o obecności MDR. Podobne obserwacje poczynił Styczyński i wsp. (2007).

W przypadku łożyskowego czynnika wzrostu nie obserwowano istotnych różnic w odsetku pacjentów z jego ekspresją pomiędzy grupami ALL. Procent pacjentów immunopozytywnych wahał się od 35 w remisji o korzystnym przebiegu do 60 w remisji o niekorzystnym przebiegu. Zbliżony do ostatniego wynik uzyskano także dla wznowy (52,38% pacjentów). Taki rozkład ekspresji może być związany z niekorzystnym przebiegiem ALL. Podobnych obserwacji dokonał zespół Cheng i wsp. (2010) w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, stwierdzając, że PlGF jest związany przede wszystkim z zaawansowanym stadium choroby oraz wystąpieniem przerzutów. Co

interesujące, tylko u jednego pacjenta z grupy kontrolnej stwierdzono obecność łożyskowego czynnika wzrostu. Zbliżone wyniki uzyskał Takahashi i wsp. (1994) w nowotworach nerki. Brak ekspresji PIGF w kontroli zdaje się sugerować związek pomiędzy ekspresją tego czynnika a patogenezą ALL.

Bazując na danych uzyskanych z analizy mRNA w ALL, w analizie immunocytochemicznej spodziewano się uzyskać wyniki świadczące o braku bądź niskiej ekspresji COX-1. W porównaniu do pozostałych antygenów obserwowano obniżony odsetek pacjentów immunopozytywnych w każdej z grup pacjentów z ALL. Najniższy stwierdzono w ALL przed leczeniem o korzystnym przebiegu (12,5%), a najwyższy w grupie remisji z korzystnym przebiegiem (35%). Nie stwierdzono obecności COX-1 u żadnego pacjenta ze wznową choroby. Wynik ten jest interesujący w porównaniu do danych literaturowych. Athavale i wsp. (2006) obserwowali ekspresję COX-1 w raku szyjki macicy u pacjentek z nawrotem choroby. Natomiast brak enzymu u pacjentów z ALL w okresie wznowy może sugerować, że jego ekspresja nie jest związana z tym etapem choroby. W przypadku kontroli 22,22% pacjentów wykazało obecność białka. Niska wykrywalność COX-1 w grupie badanej i kontrolnej zdaje się potwierdzać teorię o jej fizjologicznej, konstytutywnej, słabej ekspresji w większości tkanek. Wskazuje również na brak zaangażowania enzymu w potencjalną patologiczną angiogenezę związaną z ALL oraz sam rozwój choroby.

Określenie różnic w ekspresji antygenów pomiędzy grupami ALL nie pozwoliło na ocenę przydatności ich jako markerów prognozy u dzieci z ALL. W tym celu zweryfikowano zależność pomiędzy odsetkiem przypadków immunopozytywnych dla danego antygeny a etapem choroby (przed rozpoczęciem leczenia, remisja, wznowa) i jej przebiegiem (korzystny, niekorzystny) stosując test dokładny Fishera. Wśród pacjentów z korzystnym przebiegiem dokonano zestawienia ekspresji białek pomiędzy grupą przed leczeniem i grupą w remisji. W wyniku tego działania stwierdzono silnie istotną zależność pomiędzy wyjściową ekspresją antygeny CD105 a wystąpieniem remisji choroby ($p = 0,008$). Wynik ten sugeruje, że CD105 oznaczany w ALL przed leczeniem jest korzystnym czynnikiem rokowniczym. Biorąc pod uwagę funkcję endogliny – stymulację tworzenia naczyń oraz związek angiogenezy z rozwojem nowotworów fakt ten wydaje się być nieco zaskakujący. Ponadto duża część danych literaturowych wskazuje na korelację pomiędzy ekspresją CD105 a niepomyślną prognozą dla pacjenta. Wskazali na to m.in. Pardali i wsp. (2011) w mięsaku Ewinga, gdzie ekspresja receptora TGF β wiązała się ze znacznym skróceniem czasu przeżycia

pacjentów. Ta sama grupa zasugerowała, że fakt ten świadczy o potencjale proinwazyjnym endogliny. Obserwuje się także związek pomiędzy ekspresją tego czynnika a tworzeniem przerzutów w raku piersi i jelita grubego (Li i wsp., 2000a, Tkahashi i wsp., 2001). Ponadto podwyższony poziom endogliny w surowicy pacjentek z przerzutami raka piersi zmniejsza odpowiedź na leczenie hormonalne oraz czas przeżycia (Vo i wsp., 2010). Podobnie sytuacja wygląda w raku gruczołu krokowego – podwyższony poziom rozpuszczalnej formy endogliny koreluje z zaawansowanym stadium choroby, a oznaczanie poziomu białka w moczu wydaje się być wiarygodnym narzędziem diagnostycznym (Fujita i wsp., 2009). Ostatnie doniesienia zaś sugerują, że obecność endogliny w surowicy krwi tych pacjentów może wiązać się z tworzeniem przerzutów do lokalnych węzłów chłonnych (Karam i wsp., 2008). Istnieją jednak doniesienia wskazujące na endoglinę jako czynnik pomyślnej prognozy. Sandlund i wsp. (2006) stwierdzili, że pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki z wysoką ekspresją CD105 charakteryzuje lepsze rokowanie. Wiązało się to z faktem, że poziom czynnika korelował odwrotnie z stadium wg klasyfikacji TNM (*Tumor-Node-Metastasis*). W raku płaskonabłonkowym przelyku obserwuje się obniżoną ekspresję endogliny w guzach pierwotnych, co jest związane ze złą prognozą, natomiast jej nadekspresja prowadzi do zmniejszenia inwazyjności i obniżenia potencjału tworzenia przerzutów (Wong i wsp. 2008). Niewiele jest natomiast doniesień dotyczących ekspresji CD105 w białaczkach. Ocena poziomu rozpuszczalnej formy endogliny w ostrej białaczce szpikowej oraz w przewlekłych zespołach dysplastycznych sugeruje jej podwyższoną ekspresję. Ponadto sądzi się, że CD105 może wpływać na bioaktywność i biodostępność swojego liganda – TGFβ – i poprzez to wpływać na progresję choroby (Calabrò i wsp., 2003). Moos i wsp. (2002) zaobserwowali z kolei, że ekspresja endogliny jest wyższa w ostrej białaczce limfoblastycznej wywodzącej z linii komórek B w porównaniu do T-ALL, w związku z tym może służyć do diagnostyki różnicowej tych dwóch typów ALL. Natomiast Catchpoole i wsp. (2007) przeprowadzili test analizujący profil ekspresji genów. W wyniku tego działania stwierdzili, że spośród wielu zbadanych genów endoglina jest jedynym, którego ekspresja wiąże się z niekorzystną prognozą dla dzieci z ALL. Brak danych dotyczących potencjalnej funkcji prognostycznej endogliny w ALL uniemożliwia dokonanie porównania z uzyskanymi wynikami. Wydaje się jednak, że CD105 może wpływać na przebieg ALL.

Ta sama analiza (porównanie grupy ALL przed leczeniem z grupą ALL w remisji) potwierdziła znany już wcześniej fakt, że ekspresja antygenu CD10 w momencie rozpoznania świadczy o uzyskaniu przez pacjenta remisji. Wynik ten potwierdza wcześniejsze doniesienia, mówiące o korzystnym rokowaniu dla pacjentów z ALL, u których stwierdzono obecność CALLA. CD10 świadczy o białaczce typu *common*, która charakteryzuje się ogólnie pomyślnym przebiegiem. Zdaje się to świadczyć o doborze odpowiedniej grupy pacjentów do badań, jak i prawidłowym wykonaniu reakcji ICC.

Analizując ekspresję antygenów wśród pacjentów, u których choroba miała niepomyślny przebieg, dokonano porównania grupy przed leczeniem z grupą pacjentów po leczeniu (łącznie remisję i wznowę) oraz grupy pacjentów z remisją z grupą pacjentów ze wznową. W wyniku tego postępowania nie stwierdzono wartości prognostycznej dla żadnego z badanych antygenów.

W kolejnej analizie wykorzystano odmienne podejście – porównano mianowicie odsetek pacjentów immunopozytywnych w każdej grupie zdefiniowanej na podstawie etapu choroby (przed leczeniem, w remisji i we wznowie) z odsetkiem pacjentów w grupie kontrolnej. W działaniu tym uwzględniono również przebieg choroby.

Nie stwierdzono znaczenia rokowniczego dla żadnego z antygenów dokonując porównania ekspresji czynników pomiędzy grupą pacjentów ALL przed rozpoczęciem leczenia z grupą kontrolną. Podobny wynik uzyskano dla analizy pomiędzy remisją choroby a grupą kontrolną. Natomiast stwierdzono, że ekspresja antygenu PIGF jest charakterystyczna dla wystąpienia wznowy choroby ($p = 0,049$). Ponadto wykazano istotną zależność pomiędzy brakiem ekspresji cyklooksygenazy 1 a pojawieniem się nawrotu choroby ($p = 0,026$).

Jak już wspomniano, podwyższony poziom PIGF obserwuje się w wielu nowotworach. Sugeruje się także, że może on być czynnikiem związanym z niepomyślnym przebiegiem choroby. Takie wnioski sformułowano w badaniach Xu i wsp. (2011), w których przeprowadzono immunohistochemiczną ocenę ekspresji PIGF w raku wątroby. Stwierdzono, że okołonowotworowa ekspresja łożyskowego czynnika wzrostu koreluje z wielkością guza, obecnością przerzutów i stadium wg klasyfikacji TNM. Ponadto stwierdzono, że wysoki poziom białka wiąże się z pojawieniem się wznowy choroby. Podobnie w przytaczanej już pracy Cheng i wsp. (2010) zaobserwowano, że posługując się technikami immunocytochemicznymi wykrywającymi PIGF można określić rokowanie dla pacjenta, wskazując na PIGF jako

czynnik niepomyślnej prognozy. W badaniach, w których określano ekspresję izoform 1 i 2 łożyskowego czynnika wzrostu oraz ich receptorów w raku piersi stwierdzono podwyższony poziom transkryptu i białka obydwu wariantów PlGF. Ponadto zaobserwowano, że wysoka ekspresja PLGF-1 świadczy o niepomyślnej prognozie dla pacjentów (Escudero-Esparza i wsp., 2010). W przypadku nowotworów hematologicznych literatura dotycząca łożyskowego czynnika wzrostu jest uboga, natomiast wydaje się ona być zgodna z danymi uzyskanymi w prezentowanych badaniach. Lee i wsp. (2007) zaobserwował znacznie podwyższony poziom PlGF w szpiku kostnym u pacjentów z ostrą białaczką nieлимfoblastyczną w stosunku do grupy kontrolnej. Grupa ta ponadto stworzyła pewien parametr, „angio-indeks”, za pomocą którego określała rokowanie dla pacjentów. Indeks ten był wypadkową poziomu PlGF, VEGF, VEGF-D, angiopoetyny 2 oraz receptora Tie-2. Wysoka wartość tego parametru korelowała z niepomyślną prognozą dla pacjentów z AML. Z kolei w 2005 roku grupa Ikai i wsp. dokonała porównania ekspresji PlGF w ALL o fenotypie Ph+ (chromosom Philadelphia) i ALL Ph-. Zaobserwowano istotnie wyższy poziom czynnika u pacjentów z translokacją. Jako że fenotyp Ph+ jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym uznano, że PlGF wiąże się z gorszym prognozą. Obserwowano także wpływ łożyskowego czynnika wzrostu na wzrost komórek w hodowli ALL, jak również ich migrację. W komórkach tych stwierdzono także nadekspresję receptora 1 VEGF, będącego receptorem specyficznym dla PlGF, co wiązało się z bardziej inwazyjnym charakterem komórek (Fragoso i wsp., 2006). Uzyskane wyniki, jak i dane literaturowe, wydają się świadczyć o zaangażowaniu PlGF w patogenezę nowotworów, w tym również ALL.

Znaczenie prognostyczne braku obecności COX-1 w komórkach ALL wydaje się być zgodne z założeniem, że enzym ten pełni w organizmie fizjologiczne funkcje. Pozostaje to jednak w sprzeczności z wieloma danymi literaturowymi, sugerującymi zaangażowanie PTGS1 w funkcjonowanie wielu nowotworów: raka piersi, gruczolakoraka przełyku czy szyjki macicy (Sales i wsp., 2002, Li i wsp., 2009, Murphy i wsp., 2001). Stwierdzono także podwyższony poziom ekspresji białka w kocim raku płaskonabłonkowym jamy ustnej (Hayes i wsp. 2006). Grupa Athavale i wsp. (2006) wykazała niekorzystne znaczenie rokownicze dla ekspresji COX-1 w I i II stadium raka szyjki macicy. Natomiast grupa Khunnarong i wsp. (2008) zaobserwowała ekspresję COX-1 u 83,2% pacjentów z nabłonkowym rakiem jajnika. Nie stwierdziła jednak zależności pomiędzy ekspresją enzymu a rokowaniem dla pacjenta. Podobne konkluzje

poczyniła grupa Jung i wsp. (2010) w gruczolakoraku szyjki macicy. Stwierdziła immunohistochemicznie ekspresję PTGS1 u prawie połowy badanych osób, natomiast nie wykazała znaczenia prognostycznego. Zatem obecność enzymu mogła być w dwóch ostatnich przypadkach zjawiskiem nie związanym z patogenezą tych chorób. Brak jest doniesień literaturowych dotyczących ekspresji COX-1 w nowotworach wywodzących się z komórek układu krwiotwórczego. Jedynie grupa Truffinet i wsp. (2007) dokonała pomiaru ekspresji PTGS1 na poziomie mRNA i białka u 18 pacjentów z AML i 4 z ALL. Stwierdzono obecność transkryptu w blastach oraz funkcjonalnego białka AML i ALL. W 2002 roku grupa Secchiero i wsp. stwierdziła podwyższoną ekspresję w komórkach linii HL-60 (linia ostrej białaczki nieлимfoblastycznej). Z kolei grupa Rocca i wsp. (2004) obserwowała ekspresję COX-1 w ludzkiej linii NB4, wywodzącej się z ostrej białaczki promielocytowej (APL) oraz w blastach pacjentów z APL. Grupa ta zasugerowała, że COX-1 może uczestniczyć w różnicowaniu komórek ludzkiej APL. Według posiadanej przez autora wiedzy, nie określano dotychczas znaczenia prognostycznego cyklooksyzgenazy 1 w żadnym typie białaczki, w tym również w ALL, co uniemożliwia konfrontację uzyskanych wyników z danymi literaturowymi.

Głównym problemem w prawidłowej interpretacji wyników dotyczących ekspresji czynników proangiogennych w nowotworach hematologicznych jest uboga literatura przedmiotu. Wynika to z faktu, że zagadnienie angiogenezy w rozrostach układu krwiotwórczego jest stosunkowo nowe – pierwsze doniesienia pochodzą z połowy lat 90-tych ubiegłego wieku. Ponadto badania koncentrują się w głównej mierze na ocenie ekspresji sztanarowych regulatorów angiogenezy – rodzinie VEGF, rzadko uwzględniając ocenę innych czynników, których rola w tym typie nowotworów może być nieporównywalnie większa. Również samo pojęcie „nowotwory hematologiczne” jest niezwykle szerokie, uwzględnia bowiem nowotwory wywodzące się z różnych typów komórek, o przebiegu ostrym bądź przewlekłym. Należy pamiętać także, że biologia tego typu chorób znacząco różni się u osób dorosłych i dzieci. Ponadto trudności sprawia także sprzeczność doniesień i brak wiedzy dotyczącej funkcjonowania niektórych czynników.

Uzyskane wyniki wskazują na związek pomiędzy zróżnicowaną ekspresją czynników proangiogennych – endogliny, łożyskowego czynnika wzrostu i cyklooksyzgenazy 1 – a ostrą białaczką limfoblastyczną. Wydaje się jednak, że obecny stan wiedzy nie jest wystarczający, aby móc w pełni jednoznacznie określić rolę tych

czynników w patogenezie ALL, jak również ich wpływu na proces potencjalnej angiogenezy w szpiku kostnym. Należy pamiętać, że wykonana analiza była analizą pośrednią, w związku z tym zasugerowała jedynie istnienie zjawiska tworzenia nowych naczyń w ALL. A zatem zasadnym i ciekawym wydaje się być w przyszłości skupienie się nad zagadnieniem angiogenezy w nowotworach hematologicznych.

6. WNIOSKI

1. Podwyższona ekspresja genów endogliny i łożyskowego czynnika wzrostu na poziomie mRNA u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną sugerują udział tych czynników w patologicznej angiogenezie zachodzącej w tej grupie wiekowej, natomiast obniżona ekspresja cyklooksygenazy 1 może wskazywać na brak zaangażowania tego czynnika w procesie naczyniotworzenia u dzieci z rozpoznaniem ALL.
2. Endoglina, łożyskowy czynnik wzrostu oraz cyklooksygenaza 1 ulegają w różnym stopniu ekspresji na poziomie białka na wszystkich etapach leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej, z wyjątkiem COX-1, którego ekspresji nie stwierdzono u żadnego pacjenta w okresie wznowy ALL. Rozkład ekspresji CD105 wskazuje na zwiększoną produkcję antygeny u pacjentów w okresie remisji ALL o niekorzystnym przebiegu. Istotnie obniżony odsetek pacjentów immunopozytywnych dla PIGF w grupie kontrolnej sugeruje związek czynnika z rozwojem choroby. Podobny poziom COX-1 w badanych grupach i w grupie kontrolnej oraz brak antygeny we wznowie ALL oznacza prawdopodobnie konstytutywną ekspresją tego czynnika, niezwiązaną z patogenezą ALL.
3. Wyjściowa ekspresja antygenów CD105 oraz CD10 u pacjentów z rozpoznaniem ALL (przed rozpoczęciem leczenia) związana jest z wystąpieniem remisji choroby osiągniętej w czasie przewidzianym protokołem leczenia, może zatem wskazywać na powodzenie terapii. Natomiast ekspresja antygeny PIGF oraz brak ekspresji COX-1 u pacjentów z nawrotem choroby są charakterystyczne dla tego etapu ALL i sugerują wystąpienie niekorzystnych zdarzeń. Endoglina, łożyskowy czynnik wzrostu oraz cyklooksygenaza 1 mogą być w przyszłości wykorzystywane jako czynniki prognozy w przebiegu ALL, a oznaczanie ich ekspresji wydaje się być najbardziej uzasadnione w chwili rozpoznania ALL oraz w momencie nawrotu choroby.

7. STRESZCZENIE

Białaczki są najczęstszym typem nowotworu wieku dziecięcego i stanowią 30% wszystkich nowotworów w tym okresie życia. Wśród nich szczególne miejsce zajmuje ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ponieważ stanowi aż 80% wszystkich przypadków. Ostra białaczka limfoblastyczna charakteryzuje się stosunkowo dobrym rokowaniem, około 85 – 90% pacjentów uzyskuje trwałą remisję. Jednak mimo rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych, odsetek 10 – 15% pacjentów, którzy umierają, nie zmienia się na przestrzeni ostatnich 10 lat. Nie zmieniło tego nawet wprowadzenie transplantacji szpiku kostnego do rutynowego postępowania u pacjentów z nawrotem ALL. Wydaje się zatem, że dalsze zwiększenie odsetka osób, które przeżywają jest możliwe dzięki zmianie kwalifikowania pacjentów do grup ryzyka, co wiąże się z określaniem nowych czynników prognostycznych. Istnieje wiele czynników określanych jako rokownicze dla ALL. Do najważniejszych z nich zaliczmy wiek dziecka poniżej jednego roku, wówczas mówimy o tzw. białaczce niemowlęcej, charakteryzującej się ogólnie gorszym przebiegiem, oraz wiek dziecka powyżej 10 roku życia, i szczególnie dotyczy to chłopców. Niezwykle ważnym czynnikiem jest hiperleukocytoza blastyczna, w której liczba blastów przekracza 50000/mm³ (50x10⁹/l). W przypadku białaczek szczególne miejsce zajmują zmiany genetyczne, a szczególnie translokacje chromosomowe (t(4,11), t(9,22), t(8,14), t(1,19)). Ważnym czynnikiem rokowniczym jest również brak odpowiedzi na wstępne leczenie – podanie kortykosteroidów. Natomiast ze względu na nie zawsze prawidłową klasyfikację pacjentów do określonych grup ryzyka, lista czynników prognostycznych dla białaczki jest ciągle otwarta. Badania nad każdym potencjalnym czynnikiem rokowniczym mogą okazać się niezwykle istotne z punktu widzenia leczenia, jak i prognozy dla pacjenta. Na tym tle niezwykle ciekawe wydają się być badania nad procesem angiogenezy w nowotworach hematologicznych. Ostatnie kilkanaście lat to okres intensywnych badań nad tym zagadnieniem, które potwierdziły zachodzenie tego procesu w tym typie nowotworów. W chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego obserwuje się przede wszystkim zwiększoną liczbę naczyń krwionośnych w szpiku kostnym. Ponadto stwierdza się zwiększoną produkcję czynników proangiogennych, zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki śródbłonna naczyń i pościelisko szpiku. Zjawisko to tłumaczy się w dwojaki sposób: sugeruje się, że pomiędzy komórkami zrębu (w tym również śródbłonna naczyń) istnieje szereg pętli auto- i parakrynych, stymulujących

wzrost i proliferację obydwu typów komórek. Ponadto uważa się że nowo powstałe naczynia są niszą w której komórki nowotworowe znajdują schronienie i są jednocześnie źródłem czynników umożliwiających wzrost tych komórek. Opierając się na tych faktach, postanowiono dokonać oceny angiogenezy w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci, jako że jest to typ białaczki najczęstszy, poprzez określenie ekspresji czynników ją regulujących. Celem tych badań było określenie poziomu ekspresji czynników zaangażowanych w angiogenezę w ALL, co stanowiło w istocie badanie przesiewowe, mające na celu wyłonienie genów kandydatów o potencjalnie istotnym znaczeniu dla patogenezy tej choroby. Skrining ten był punktem wyjścia dla pozostałych założeń: analizy ekspresji wybranych genów na poziomie białka, i wreszcie porównania uzyskanych wyników z obrazem klinicznym, czego efektem była próba wyłonienia tych białek, które mają znaczenie rokownicze.

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej oraz archiwalne rozmazy biopsji szpiku kostnego pobrane od dzieci z ALL. Pierwszym etapem badań było wyselekcjonowanie grupy pewnej grupy genów, tzw. „kandydatów” zaangażowanych w proces angiogenezy, których ekspresja w jakiś sposób odbiega od normy – czyli jest podwyższona lub obniżona, w oparciu o macierze PCR (Sabiosciences RT² Profiler™ Arrays). W kolejnej fazie dokonano oceny ekspresji wybranych czynników na poziomie białka oraz antygenu CD10, stanowiącego wewnętrzną kontrolę pozytywną (badania immunocytochemiczne i immunofluorescencyjne).

Wyselekcjonowano 2 geny o podwyższonej ekspresji – endoglinę (CD105) oraz łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF). Spośród 6 genów o obniżonej ekspresji analizie immunocytochemicznej poddano jeden – cyklooksigenazę 1 (COX-1). Endoglina jest czynnikiem proangiogenym spełniającym swą funkcję poprzez modulację TGFβ. Jej podwyższony poziom obserwuje się w wielu nowotworach, w tym również w ALL. Łożyskowy czynnik wzrostu stymuluje wzrost naczyń krwionośnych, głównie poprzez oddziaływanie ze swoim receptorem. Sugeruje się jego udział w angiogenezie nowotworowej. Cyklooksigenaza 1 jest także cząsteczką proangiogeną, przy czym jej zaangażowanie w powstawanie nowych naczyń na poziomie formowania światła naczynia ma prawdopodobnie charakter fizjologiczny.

Stwierdzono, że podwyższona ekspresja genów CD105 i PIGF oraz obniżona ekspresja COX-1 na poziomie mRNA u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną sugerują udział tych czynników w patologicznej oraz fizjologicznej angiogenezie,

zachodzącej w obrębie szpiku kostnego w tej grupie wiekowej. Ekspresję białka na różnym poziomie endogliny CD105, PlGF oraz COX-1 obserwowano we wszystkich etapach ALL, z wyjątkiem COX-1, którego ekspresji nie stwierdzono u żadnego pacjenta w okresie wznowy ALL. Stwierdzono również, że wyjściowa ekspresja antygenów CD105 oraz CD10 u pacjentów z rozpoznaniem ALL (przed rozpoczęciem leczenia) może wskazywać na powodzenie leczenia, natomiast ekspresja antygeny PlGF oraz brak ekspresji COX-1 u pacjentów z nawrotem choroby sugeruje wystąpienie niekorzystnych zdarzeń.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że CD105, PlGF oraz COX-1 mogą być w przyszłości wykorzystywane jako czynniki prognozy w przebiegu ALL, a oznaczanie ich ekspresji z prognostycznego punktu widzenia wydaje się być najbardziej uzasadnione w chwili rozpoznania ALL (przed rozpoczęciem leczenia) oraz w momencie nawrotu choroby.

8. SUMMARY

In childhood, leukemias represent the most frequent type of tumour comprising in the period 30% of all tumors. Among them, acute lymphoblastic leukaemia (ALL) occupies the most prevalent share of as many as 80% of all cases. ALL manifests a relatively favourable prognosis: around 85-90% patients reach stable remission. However, despite development of diagnostic and therapeutic methods the percentage of 10% to 15% patients who die due to the disease does not change in the recent decade. This fraction has not been altered even by introduction of bone marrow transplantation to routine management of patients with relapse of ALL. Therefore, a subsequent increase in the percentage of surviving patients seem to require a change in qualification of the patients to risk groups, which is linked to definition of novel prognostic factors. Many factors are thought to carry prognostic significance in ALL. The most important of them include infant's age below 1 year. Such cases involve the so called infantile leukaemia, generally less advantageous course. The other prognostic factor involves child's age above 10 years, which pertains in particular to boys. A very important index involves blast hyperleukocytosis, in which blast concentration exceeds $50,000/\text{mm}^3$ ($50 \times 10^9/\text{l}$ blood). In cases of leukemias a specific variable involves genetic lesions and chromosomal translocations in particular (t(4,11), t(9,22), t(8,14), t(1,19)). Also, an important prognostic index involves lack of response to preliminary treatment with corticosteroids. Nevertheless, due to the not always correct classification of patients to specific risk groups the list of prognostic factors in leukaemia remains to be open. Studies on every potential prognostic factor may prove immensely important due to treatment and prognosis of the patient. Against this background, studies on angiogenesis in haematological tumors, conducted in the recent over ten years, seem to provide very interesting data. First of all, in hyperplasia of haematogenic system an augmented number of blood vessels is noted in the bone marrow. Moreover, an increased production is noted of proangiogenic factors, both by tumour cells, vascular endothelial cells and by stroma of bone marrow. The phenomenon is explained in two ways: it is suggested that a number of para- and autocrine loops function between stroma cells (including vascular endothelium), which stimulate growth and proliferation of the two cell types. Moreover, the *de novo* formed blood vessels are thought to provide a *niche* in which tumour cells find a refuge and, additionally, the blood vessels produce factors promoting growth of the cells. Basing on the data, we decided to evaluate angiogenesis

in ALL in children, the most frequent form of leukaemia, by determination of expression of factors which control angiogenesis. The studies aimed at definition of the expression level manifested by factors which control angiogenesis in ALL, representing, in fact, a screening study to identify genes-candidates, carrying potential significance for pathogenesis of the disease. The screening provided a starting point for the additional aims: analysis of the selected gene expression at the level of a protein and, then, for performing a comparison of the obtained results with the clinical pattern, which might identify the proteins of a prognostic significance.

Material for the studies involved peripheral blood of children with diagnosis of ALL and archival bone marrow smears obtained from children suffering from ALL. The first stage of the studies involved selection of a certain gene group, the so called genes candidates, engaged in angiogenesis, the expression of which in a way differed from the normal one, i.e. it was either decreased or increased, taking advantage of RT² *Profiler*TM PCR Arrays (Sabiosciences). At the next stage, expression of selected factors was evaluated at the level of a protein and expression of CD10 antigen was examined, providing an inner positive control (immunocytochemical and immunofluorescence studies).

Two genes with an elevated expression were selected: the endoglin (CD105) and the placental growth factor (PIGF). Among the genes with a decreased expression a single gene, that coding for cyclooxygenase 1 (COX-1) was subjected to immunocytochemical analysis. Endoglin represents a proangiogenic factor, which fulfils its function through modulation of TGF β . Its elevated level can be noted in several tumors, including ALL. Placental growth factor stimulates growth of blood vessels, mainly through interaction with its receptor. It is suggested to be involved in neoplastic angiogenesis. Also cyclooxygenase 1 represents a proangiogenic molecule, while its involvement in development of new blood vessels at the level of vascular lumen formation is probably of a physiological character.

The elevated expression of CD105 and PIGF genes and the decreased expression of COX-1 at the level of mRNA in children with ALL suggest involvement of the factors in pathological and physiological angiogenesis, taking place within bone marrow in patients of this age group. At all stages of ALL, various levels of CD105, PIGF proteins were detected, except of COX-1, the expression of which could not be detected in any patient with relapse of ALL. The starting expression of CD105 and CD10 antigens in patients with ALL (before start of its treatment) may point to success of the

treatment while expression of PIGF antigen and absence of COX-1 antigen in patients with relapse of the disease suggests an unfavourable outcome of the therapy.

Results of the studies indicate that in future CD105, PIGF and COX-1 may be used as prognostic factors in the course of ALL and, from the prognostic point of view, estimation of their expression seems to be most justified at the moment of establishing diagnosis of ALL (before start of its treatment) and at the moment of the disease relapse.

9. PIŚMIENNICTWO

- [brak listy autorów] Adding a humanized antibody to vascular endothelial growth factor (Bevacizumab, Avastin) to chemotherapy improves survival in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 3(2): 85-88.
- Aboudola S., Kini A.R., Angiogenesis in lymphoproliferative disorders: a therapeutic target? *Curr Opin Hematol* 2005; 12(4): 279-283.
- Achen M.G., Gad J.M., Stacker S.A., Wilks A.F., Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors* 1997; 15(1): 69-80.
- Aguayo A., Kantarjian H., Manshouri T., Gidel C., Estey E., Thomas D., Koller C., Estrov Z., O'Brien S., Keating M., Freireich E., Albitar M., Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96(6): 2240-2245.
- Akagi K., Ikeda Y., Sumiyoshi Y., Kimura Y., Kinoshita J., Miyazaki M., Abe T., Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1 Suppl): S109-113.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964-967.
- Athavale R., Clooney K., O'Hagan J., Shawki H., Clark A.H., Green J.A., COX-1 and COX-2 expression in stage I and II invasive cervical carcinoma: relationship to disease relapse and long-term survival. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(3): 1303-1308
- Avramis I.A., Panosyan E.H., Dorey F., Holcenberg J.S., Avramis V.I., Children's Oncology Group., Correlation between high vascular endothelial growth factor-A serum levels and treatment outcome in patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from Children's Oncology Group Study CCG-1962. *Clin Cancer Res* 2006; 12(23): 6978-6984.
- Bachelder R.E., Crago A., Chung J., Wendt M.A., Shaw L.M., Robinson G., Mercurio A.M., Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5736-5740.

- Barbara N.P., Wrana J.L., Letarte M., Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999; 274(2): 584-594.
- Barthlen W., Flaadt D., Girgert R., Conzelmann J., Schweizer P., Zugmaier G., Buck M., Knabbe C., Significance of heparin-binding growth factor expression on cells of solid pediatric tumors. *J Pediatr Surg* 2003; 38(9): 1296-1304.
- Bates D.O., Curry F.E., Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. *Am J Physiol* 1997; 273 (2 Pt 2): H687-694.
- Bates D.O., Hillman N.J., Williams B., Neal C.R., Pocock T.M., Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 2002; 2002; 6: 581-597
- Battegay E.J., Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 73(7): 333-346.
- Bellón T., Corbí A., Lastres P., Calés C., Cebrián M., Vera S., Cheifetz S., Massague J., Letarte M., Bernabéu C., Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 1993; 23(9): 2340-2345.
- Béné M.C., Faure G.C., CD10 in acute leukemias. GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies). *Haematologica* 1997; 82(2): 205-210.
- Benjamin L.E., Keshet E., Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(16): 8761-8766.
- Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Quintanilla M., The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(10): 954-973.
- Bitan M., Polliack A., Zecchina G., Nagler A., Friedmann Y., Nadav L., Deutsch V., Pecker I., Eldor A., Vlodavsky I., Katz B.Z., Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002; 30(1): 34-41
- Bogar L.J., Bartula L.L., Parkman H.P., Myers S.I., Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to

- new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase. *J Surg Res* 1999; 84(1): 71-76.
- Bouloumié A., Drexler H.C., Lafontan M., Busse R., Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998; 83(10): 1059-1066.
- Breier G., Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta* 2000; 21 Suppl A: S11-15.
- Brewer C.A., Setterdahl J.J., Li M.J., Johnston J.M., Mann J.L., McAsey M.E., Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2000; 96(2): 224-228.
- Bronckaers A., Gago F., Balzarini J., Liekens S., The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev* 2009; 29(6): 903-953
- Brooks P.C., Strömblad S., Klemke R., Visscher D., Sarkar F.H., Cheresch D.A., Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; 96(4): 1815-1822.
- Bryant C.E., Appleton I., Mitchell J.A., Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci* 1998; 62(24): 2195-2201.
- Burrows F.J., Derbyshire E.J., Tazzari P.L., Amlot P., Gazdar A.F., King S.W., Letarte M., Vitetta E.S., Thorpe P.E., Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995; 1(12): 1623-1634.
- Calabrò L., Fonsatti E., Bellomo G., Alonci A., Colizzi F., Sigalotti L., Altomonte M., Musolino C., Maio M., Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 2003; 194(2): 171-175
- Cao Y., Chen H., Zhou L., Chiang M.K., Anand-Apte B., Weatherbee J.A., Wang Y., Fang F., Flanagan J.G., Tsang M.L., Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1996; 271(6): 3154-3162.
- Carlevaro M.F., Cermelli S., Cancedda R., Descalzi Cancedda F., Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 1): 59-69.

- Carmeliet P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653-660.
- Carmeliet P., Jain R.K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-257.
- Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., Vandendriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K.H., Foidart J.M., Schaper W., Charnock-Jones D.S., Hicklin D.J., Herbert J.M., Collen D., Persico M.G., Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7(5): 575-583.
- Catchpoole D., Lail A., Guo D., Chen Q.R., Khan J., Gene expression profiles that segregate patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia: an independent validation study identifies that endoglin associates with patient outcome. *Leuk Res* 2007; 31(12): 1741-1747.
- Cavallaro U., Christofori G., Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol* 2000; 50(1-2): 63-70.
- Cheifetz S, Bellón T., Calés C., Vera S., Bernabeu C., Massagué J., Letarte M., Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19027-19030.
- Cheng S.J., Lee J.J., Kok S.H., Chou C.H., Chang H.H., Chiang M.L., Chen H.M., Kuo M.Y., Chiang C.P., Expression of placenta growth factor: an independent factor for prediction of progression and prognosis of oral cancer. *Head Neck* 2010; 32(10): 1363-1369
- Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M., Kaukonen J., Palotie A., Joukov V., Alitalo K., Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997; 272(40): 25176-25183.
- Czyż A., Dworacki G., Komarnicki M., Przydatność badania immunofenotypu komórek szpiku metodą cytometrii przepływowej w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2008; 62: 354-363.
- Dallas N.A., Samuel S., Xia L., Fan F., Gray M.J., Lim S.J., Ellis L.M., Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14(7): 1931-1937.

- Ding S., Li C., Lin S., Yang Y., Liu D., Han Y., Zhang Y., Li L., Zhou L., Kumar S., Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol* 2006; 37(7): 861-866.
- Distler J.H., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R.E., Gay S., Distler O., Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47(3): 149-161.
- Düwel A., Eleno N., Jerkic M., Arevalo M., Bolaños J.P., Bernabeu C., López-Novoa J.M., Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol* 2007; 28(1): 1-8.
- Dvorak H.F., VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 2000; 24(1): 75-78
- Eggert A., Ikegaki N., Kwiatkowski J., Zhao H., Brodeur G.M., Himelstein B.P., High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1900-1908.
- El-Houseini M.E., Abdel-Azim S.A., El-Desouky G.I., Abdel-Hady S., El-Hamad M.F., Kamel A.M., Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. *J Egypt Natl Canc Inst* 2004; 16(1): 57-61.
- Eliceiri B.P., Cheresh D.A., The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103(9): 1227-1230.
- Ellis L.M., Takahashi Y., Fenoglio C.J., Cleary K.R., Bucana C.D., Evans D.B., Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1998; 34(3): 337-340.
- Escudero-Esparza A., Martin T.A., Douglas-Jones A., Mansel R.E., Jiang W.G., PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2 and the PGF receptor, neuropilin, in human breast cancer: prognostic significance. *Oncol Rep* 2010; 23(2): 537-544.
- Etoh T., Shibuta K., Barnard G.F., Kitano S., Mori M., Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9): 3545-3551.
- Faderl S., Do K.A., Johnson M.M., Keating M., O'Brien S., Jilani I., Ferrajoli A., Ravandi-Kashani F., Aguilar C., Dey A., Thomas D.A., Giles F.J., Kantarjian H.M., Albitar M., Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106(13): 4303-4307.

- Fernández-Ruiz E., St-Jacques S., Bellón T., Letarte M., Bernabéu C., Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64(3-4): 204-207.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J., The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-676.
- Ferrara N., Henzel W.J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2): 851-858.
- Ferrara N., Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56(3): 794-814.
- Fidler I.J., Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14): 1040-1041.
- Folkman J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications., *N Engl J Med* 1971; 285(21): 1182-1186.
- Folkman J., Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175(3): 409-416.
- Folkman J., Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43: 175-203.
- Folkman J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995a; 1(1): 27-31.
- Folkman J., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995b; 28;333(26):1757-1763.
- Fonsatti E., Jekunen A.P., Kairemo K.J., Coral S., Snellman M., Nicotra M.R., Natali P.G., Altomonte M., Maio M., Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 2037-2043.
- Fonsatti E., Del Vecchio L., Altomonte M., Sigalotti L., Nicotra M.R., Coral S., Natali P.G., Maio M., Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001; 188(1): 1-7.
- Fonsatti E., Altomonte M., Nicotra M.R., Natali P.G., Maio M., Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 2003; 22(42): 6557-6563.

- Fonsatti E., Nicolay H.J., Altomonte M., Covre A., Maio M., Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumors. *Cardiovasc Res* 2010; 86(1): 12-19.
- Foss H.D., Araujo I., Demel G., Klotzbach H., Hummel M., Stein H., Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol* 1997; 183(1): 44-50.
- Fragoso R., Pereira T., Wu Y., Zhu Z., Cabeçadas J., Dias S., VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood* 2006; 107(4): 1608-1616.
- Fujita K., Ewing C.M., Chan D.Y., Mangold L.A., Partin A.W., Isaacs W.B., Pavlovich C.P., Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int J Cancer* 2009; 124(3): 664-669.
- Gerber H.P., Dixit V., Ferrara N., Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 13313-13316.
- Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M., Kowalski J., Keller G.A., Rangell L., Wright B.D., Radtke F., Aguet M., Ferrara N., VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999a; 126(6): 1149-1159.
- Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N., VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999b; 5(6): 623-628.
- Giordano F.J. Angiogenesis: mechanisms, modulation, and targeted imaging. *J Nucl Cardiol* 1999; 6(6): 664-671.
- Gougos A., Letarte M., Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988a; 141(6): 1925-1933.
- Gougos A., Letarte M., Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988b; 141(6): 1934-1940.
- Goumans M.J., Liu Z., ten Dijke P., TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009; 19(1): 116-127.
- Greaves M.F., Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349(9048): 344-349.

- Guerrero-Esteo M., Sanchez-Elsner T., Letamendia A., Bernabeu C., Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 2002; 277(32): 29197-29209.
- Gurney J.G., Severson R.K., Davis S., Robison L.L., Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 1995; 75(8): 2186-2195.
- Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N., Wagner E.F., Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 2000; 127(7): 1445-1453.
- Hanahan D., Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3): 353-364.
- Harper J., Moses M.A., Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *EXS* 2006; (96): 223-268.
- Harrison C.J., Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(3): 593-607.
- Hashida H., Takabayashi A., Kanai M., Adachi M., Kondo K., Kohno N., Yamaoka Y., Miyake M., Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 2002; 122(2): 376-86
- Hayes A., Scase T., Miller J., Murphy S., Sparkes .A, Adams V., COX-1 and COX-2 expression in feline oral squamous cell carcinoma. *J Comp Pathol.* 2006; 135(2-3): 93-99
- Hazzard T.M., Stouffer R.L., Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14(6): 883-900.
- Ho C.L., Sheu L.F., Li C.Y., Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines and their receptors in reactive benign lymph nodes and non-Hodgkin lymphoma. *Ann Diagn Pathol* 2003; 7(1): 1-8.
- Hood J.D., Meininger .CJ., Ziche M., Granger H.J., VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274(3 Pt 2): H1054-1058.
- Horner A., Bishop N.J., Bord S., Beeton C., Kelsall A.W., Coleman N., Compston J.E., Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat* 1999; 194 (Pt 4): 519-524.

- Houck K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D.W., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5 (12): 1806-1814.
- Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F., Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-2342.
- Hussong J.W., Rodgers G.M., Shami P.J., Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95(1): 309-313.
- Ikai T., Miwa H., Shikami M., Hiramatsu A., Tajima E., Yamamoto H., Imai N., Hattori A., Nishii K., Miura K., Satoh A., Itoh M., Imamura A., Mihara H., Katoh Y., Nitta M., Placenta growth factor stimulates the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways. *Eur J Haematol* 2005; 75(4): 273-279.
- Jerkic M., Rivas-Elena J.V., Prieto M., Carrón R., Sanz-Rodríguez F., Pérez-Barriocanal F., Rodríguez-Barbero A., Bernabéu C., López-Novoa JM., Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 2004; 18(3): 609-611.
- Jovanovic B.D., Huang S., Liu Y., Naguib K.N., Bergan R.C., A simple analysis of gene expression and variability in gene arrays based on repeated observations. *Am J Pharmacogenomics* 2001; 1(2): 145-152.
- Juczevska M., Chyzevska E., Naumnik W., Chyzevski L., Niklińska W, Rogalewska A., Kovalchuk O., Nikliński J., Endothelial cells and angiogenesis intensity in lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39(3): 253-258.
- Jun S.S., Chen Z., Pace M.C., Shaul P.W., Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest* 1998; 102(1): 176-183.
- Jung Y.W., Kim S.W., Kim S., Kim J.H., Cho N.H., Kim J.W., Kim Y.T., Prevalence and clinical relevance of cyclooxygenase-1 and -2 expression in stage IIB cervical adenocarcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 148(1): 62-66.

- Karam J.A., Svatek R.S., Karakiewicz P.I., Gallina A., Roehrborn C.G., Slawin K.M., Shariat S.F., Use of preoperative plasma endoglin for prediction of lymph node metastasis in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1418-1422
- Kay N.E., Bone N.D., Tschumper R.C., Howell K.H., Geyer S.M., Dewald G.W., Hanson C.A., Jelinek D.F., B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 2002; 16(5): 911-919.
- Kerjaschki D., Regele H.M., Moosberger I., Nagy-Bojarski K., Watschinger B., Soleiman A., Birner P., Krieger S., Hovorka A., Silberhumer G., Laakkonen P., Petrova T., Langer B., Raab I., Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3): 603-612.
- Keyhani A., Jendiroba D.B., Freireich E.J., Angiogenesis and leukemia. *Leuk Res* 2001; 25(8): 639-645.
- Khaliq A., Li X.F., Shams M., Sisi P., Acevedo C.A., Whittle M.J., Weich H., Ahmed A., Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* 1996; 13(3-4): 243-250.
- Khnykin D., Troen G., Berner J.M., Delabie J. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 2006; 208(3): 431-438.
- Khunnarong J., Tangjitgamol S., Manusirivithaya S., Suekwattana P., Leelahakorn S., Expression of cyclooxygenase-1 in epithelial ovarian cancer: a clinicopathological study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9(4): 757-762.
- Kirtikara K., Lauderkind S.J., Raghov R., Kanekura T., Ballou L.R., An accessory role for ceramide in interleukin-1beta induced prostaglandin synthesis. *Mol Cell Biochem* 1998; 181(1-2): 41-48.
- Kivivuori S.M., Siitonen S., Porkka K., Vettenranta K., Alitalo R., Saarinen-Pihkala U., Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 and Tie1 tyrosine kinase receptor on acute leukemia cells. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48(4): 387-392.
- Klagsbrun M., Moses M.A., Molecular angiogenesis. *Chem Biol.* 1999; 6(8): R217-24
- Koerselman J., van der Graaf Y., de Jaegere P.P., Grobbee D.E., Coronary collaterals: an important and underexposed aspect of coronary artery disease. *Circulation* 2003; 107(19): 2507-2511.

- Koomagi R., Zintl F., Sauerbrey A., Volm M., Vascular endothelial growth factor in newly diagnosed and recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia as measured by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11): 3381-3384.
- Korkolopoulou P., Apostolidou E., Pavlopoulos P.M., Kavantzias N., Vyniou N., Thymara I., Terpos E., Patsouris E., Yataganas X., Davaris P., Prognostic evaluation of the microvascular network in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2001; 15(9): 1369-1376.
- Kowalczyk J.R., Ostra białaczka limfoblastyczna. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych – 2009 r., www.onkologia.zalecenia.med.pl
- Kroll J., Waltenberger J., A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(3): 636-963.
- Kubiak-Wlekły A., Niemir Z.I., Neprylizyna – budowa genu i produktu białkowego oraz lokalizacja ekspresji. *Pol. Merk. Lek.* 2009; XXVII, 157: 48-50.
- Kukk E., Lymboussaki A., Taira S., Kaipainen A., Jeltsch M., Joukov V., Alitalo K., VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122(12): 3829-3837.
- Kumar S., Ghellal A., Li C., Byrne G., Haboubi N., Wanh J.M., Bundred N., Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999; 59(4): 856-861.
- Lee C.Y., Tien H.F., Hu C.Y., Chou W.C., Lin L.I., Marrow angiogenesis-associated factors as prognostic biomarkers in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Cancer* 2007; 97(7): 877-882.
- Letamendia A., Lastres P., Botella L.M., Raab U., Langa C., Velasco B., Attisano L., Bernabeu C., Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 33011-33019.
- Li C., Guo B., Wilson P.B., Stewart A., Byrne G., Bundred N., Kumar S., Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000a; 89(2): 122-126.

- Li C., Hampson I.N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C., Kumar S., CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000b; 14(1): 55-64.
- Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I.N., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C., Kumar S., CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 2003; 116 (Pt 13): 2677-2685.
- Li D.Y., Sorensen L.K., Brooke B.S., Urness L.D., Davis E.C., Taylor D.G., Boak B.B., Wendel D.P., Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999; 284(5419): 1534-1537.
- Li W., Xu R.J., Lin Z.Y., Zhuo G.C., Zhang H.H., Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Med Oncol* 2009; 26(2): 170-177.
- Li W., Ji Z.L., Zhuo G.C., Xu R.J., Wang J., Jiang H.R., Effects of a selective cyclooxygenase-1 inhibitor in SKOV-3 ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. *Med Oncol* 2010; 27(1): 98-104.
- Limb G.A., Hickman-Casey J., Hollifield R.D., Chignell A.H., Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(10) :2453-2457.
- Lin R.Y., Argenta P.A., Sullivan K.M., Adzick N.S., Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1(3): 327-331.
- Liu Y., Jovanovic B., Pins M., Lee C., Bergan R.C., Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* 2002; 21(54): 8272-8281.
- Luttun A., Brusselmans K., Fukao H., Tjwa M., Ueshima S., Herbert J.M., Matsuo O., Collen D., Carmeliet P., Moons L., Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002a; 295(2): 428-434.
- Luttun A., Tjwa M., Moons L., Wu Y., Angelillo-Scherrer A., Liao F., Nagy J.A., Hooper A., Priller J., De Klerck B., Compernelle V., Daci E., Bohlen P., Dewerchin M., Herbert J.M., Fava R., Matthys P., Carmeliet G., Collen D., Dvorak H.F., Hicklin D.J., Carmeliet P., Revascularization of ischemic tissues

- by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002b; 8(8): 831-840.
- Lyu C.J., Rha S.Y., Won S.C., Clinical role of bone marrow angiogenesis in childhood acute lymphocytic leukemia. *Yonsei Med J* 2007; 48(2): 171-175.
- Maeda K., Chung Y.S., Ogawa Y., Takatsuka S., Kang S.M., Ogawa M., Sawada T., Sowa M., Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77(5): 858-863.
- Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico MG., Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(20): 9267-9271.
- Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K., Del Vecchio S., Lei K.J., Chou J.Y., Persico M.G., Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; 8(4): 925-931.
- Maisonpierre P.C., Suri C., Jones P.F., Bartunkova S., Wiegand S.J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T.H., Papadopoulos N., Daly T.J., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D., Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277(5322): 55-60.
- Makrilia N., Lappa T., Xyla V., Nikolaidis I., Syrigos K., The role of angiogenesis in solid tumors: an overview. *Eur J Intern Med* 2009; 20(7): 663-671.
- Mandriota S.J., Seghezzi G., Vassalli J.D., Ferrara N., Wasi S., Mazziere R., Mignatti P., Pepper M.S., Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270(17): 9709-9716.
- McCarthy M., Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003; 361(9373): 1959.
- Miller D.W., Graulich W., Karges B., Stahl S., Ernst M., Ramaswamy A., Sedlacek H.H., Müller R., Adamkiewicz J., Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 1999; 81(4): 568-572.
- Mizia-Malarz A., Sobol G., Woś H., Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych. *Pol Merk Lek* 2008; XXIV, 141: 185-189.
- Moos P.J., Raetz E.A., Carlson M.A., Szabo A., Smith F.E., Willman C., Wei Q., Hunger S.P., Carroll W.L., Identification of gene expression profiles that

- segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8(10): 3118-3130.
- Murakami M., Matsumoto R., Urade Y., Austen K.F., Arm J.P., c-kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D2 synthase and increased IgE-dependent prostaglandin D2 generation in immature mouse mast cells. *J Biol Chem* 1995; 270(7): 3239-3246.
- Murphy J.F., Fitzgerald D.J., Vascular endothelial growth factor induces cyclooxygenase-dependent proliferation of endothelial cells via the VEGF-2 receptor. *FASEB J* 2001; 15(9): 1667-1669.
- Murphy J.F., Steele C., Belton O., Fitzgerald D.J., Induction of cyclooxygenase-1 and -2 modulates angiogenic responses to engagement of alphavbeta3. *Br J Haematol* 2003; 121(1): 157-164.
- Nacov E., Tumor angiogenesis formation of vessels de novo at germ cell tumors. *Cancer* 1990; 66(5): 916-922.
- Norén-Nyström U., Heyman M., Frisk P., Golovleva I., Sundström C., Porwit A., Roos G., Bergh A., Forestier E., Vascular density in childhood acute lymphoblastic leukaemia correlates to biological factors and outcome. *Br J Haematol* 2009; 146(5): 521-530.
- Oh S.J., Jeltsch M.M., Birkenhäger R., McCarthy J.E., Weich H.A., Christ B., Alitalo K., Wilting J., VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188(1): 96-109
- Okahara K., Sun B., Kambayashi J., Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(12): 1922-1926.
- Onciu M., Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23(4): 655-674.
- Oxmann D., Held-Feindt J., Stark A.M., Hattermann K., Yoneda T., Mentlein R., Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene* 2008; 27(25): 3567-3575.
- Ozer E., Sarialioglu F., Cetingoz R., Yüceer N., Cakmakci H., Ozkal S., Olgun N., Uysal K., Corapcioglu F., Canda S., Prognostic significance of anaplasia and

- angiogenesis in childhood medulloblastoma: a pediatric oncology group study. *Pathol Res Pract* 2004; 200 (7-8): 501-509.
- Pardali E., van der Schaft D.W., Wiercinska E., Gorter A., Hogendoorn P.C., Griffioen A.W., ten Dijke P., Critical role of endoglin in tumor cell plasticity of Ewing sarcoma and melanoma. *Oncogene* 2011; 30(3): 334-345.
- Pavlakovic H., Von Schütz V., Rössler J., Koscielniak E., Havers W., Schweigerer L., Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. *Int J Cancer* 2001; 92(5): 756-760.
- Pepper M.S., Ferrara N., Orci L., Montesano R., Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Dec 16; 181(2): 902-906.
- Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Tedrow U., Connors S., Allred E., Folkman J., Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150(3): 815-821.
- Pérez-Gómez E., Del Castillo G., Juan Francisco S., López-Novoa J.M., Bernabéu C., Quintanilla M., The role of the TGF- β coreceptor endoglin in cancer. *Scientific World Journal* 2010; 10: 2367-2384.
- Persico M.G., Vincenti V., DiPalma T., Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 31-40.
- Pichuantes S., Vera S., Bourdeau A., Pece N., Kumar S., Wayner E.A., Letarte M., Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* 1997; 50(3): 265-276.
- Poon R.T., Lau C.P., Ho J.W., Yu W.C., Fan S.T., Wong J., Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14): 5339-5345.
- Price D.J., Miralem T., Jiang S., Steinberg R., Avraham H., Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12(3): 129-135.
- Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9(6): 677-684.

- Pulè M.A., Gullmann C., Dennis D., McMahon C., Jeffers M., Smith O.P., Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance. *Br J Haematol* 2002; 118(4): 991-998.
- Qu R., Silver M.M., Letarte M., Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 1998; 292(2): 333-343.
- Quackenbush E.J., Letarte M., Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985; 134(2): 1276-1285.
- Radwańska U. (red.), Białaczki u dzieci. Volumed, Wrocław, 1998; s. 17-89
- Rak J., Filmus J., Kerbel R.S., Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2438-2450.
- Ratajczak M.Z., Ratajczak J., Machalinski B., Majka M., Marlicz W., Carter A., Pietrkowski Z., Gewirtz A.M., Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PlGF) in regulating human haemopoietic cell growth. *Br J Haematol* 1998; 103(4): 969-979.
- Ribatti D., The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis* 2008; 11(3): 215-221.
- Rioux N., Castonguay A., The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis* 2000; 21(9): 1745-1751.
- Risau W., Flamme I., Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
- Ristimäki A., Narko K., Enholm B., Joukov V., Alitalo K., Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998; 273(14): 8413-8418.
- Rius C., Smith J.D., Almendro N., Langa C., Botella L.M., Marchuk D.A., Vary C.P., Bernabéu C., Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998; 92(12): 4677-4690.
- Robinson C.J., Stringer S.E., The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5): 853-865.
- Rocca B., Morosetti R., Habib A., Maggiano N., Zassadowski F., Ciabattoni G., Chomienne C., Papp B., Ranelletti F.O., Cyclooxygenase-1, but not -2, is

- upregulated in NB4 leukemic cells and human primary promyelocytic blasts during differentiation. *Leukemia* 2004; 18(8): 1373-1379.
- Romanowski T., Markiewicz A., Bednarz N., Bielawski K.P., Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2007; 61: 500-510.
- Rouzer C.A., Marnett L.J., Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev* 2003; 103(6): 2239-2304.
- Rouzer C.A., Marnett L.J., Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S29-34
- Rusiniak M.E., Yu M., Ross D.T., Tolhurst E.C., Slack J.L., Identification of B94 (TNFAIP2) as a potential retinoic acid target gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 2000; 60(7): 1824-1829.
- Saad R.S., Jasnosz K.M., Tung M.Y., Silverman J.F., Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(3): 248-253.
- Saharinen P., Tammela T., Karkkainen M.J., Alitalo K., Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004; 25(7): 387-395.
- Saito H., Tsujitani S., Oka S., Kondo A., Ikeguchi M., Maeta M., Kaibara N., The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8): 1455-1462.
- Sales K.J., Katz A.A., Howard B., Soeters R.P., Millar R.P., Jabbour H.N., Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 2002; 62(2): 424-432.
- Salgado R., Benoy I., Bogers J., Weytjens R., Vermeulen P., Dirix L., Van Marck E., Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001; 4(1): 37-43.
- Sandlund J., Hedberg Y., Bergh A., Grankvist K., Ljungberg B., Rasmuson T., Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2006; 97(4): 706-710.

- Sano H., Noguchi T., Miyajima A., Hashimoto Y., Miyachi H., Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(11): 3068-3072.
- Santibanez J.F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C.P., Lopez-Novoa J.M., Attisano L., Bernabeu C., Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 2007; 210(2): 456-468.
- Sato N., Beitz J.G., Kato J., Yamamoto M., Clark J.W., Calabresi P., Raymond A., Frackelton A.R. Jr., Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993; 142(4): 1119-1130.
- Schneider N., Lanz S., Ramer R., Schaefer D., Goppelt-Struebe M., Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *J Neurochem* 2001; 77(2): 416-424.
- Schneider P., Vassel M., Legrand E., Callat M-P., Vannier J-P., Have urinary levels of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, a prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Haematol* 2003, 122: 163-164.
- Schomber T., Kopfstein L., Djonov V., Albrecht I., Baeriswyl V., Strittmatter K., Christofori G., Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10840-10848.
- Secchiero P., Gonelli A., Ciabattini G., Melloni E., Grill V., Rocca B., Delbello G., Zauli G., TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) up-regulates cyclooxygenase (COX)-1 activity and PGE(2) production in cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 2002; 72(5): 986-994.
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-985.
- Senger D.R., Perruzzi C.A., Feder J., Dvorak H.F., A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986; 46(11): 5629-5632.
- Seo Y., Baba H., Fukuda T., Takashima M., Sugimachi K., High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis

- for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88(10): 2239-2245.
- Shariat S.F., Karam J.A., Walz J., Roehrborn C.G., Montorsi F., Margulis V., Saad F., Slawin K.M., Karakiewicz P.I., Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers. *Clin Cancer Res* 2008; 14(12): 3785-3791.
- Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P., Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92(2): 362-367.
- Shiotani T., Hashimoto Y., Tanaka T., Irino S., Behavior of activities of thymidine metabolizing enzymes in human leukemia-lymphoma cells. *Cancer Res* 1989; 49(5): 1090-1094.
- Shivakumar R., Tan W., Wilding G.E., Wang E.S., Wetzler M., Biologic features and treatment outcome of secondary acute lymphoblastic leukemia--a review of 101 cases. *Ann Oncol* 2008; 19(9): 1634-1638.
- Siegfried G., Basak A., Cromlish J.A., Benjannet S., Marcinkiewicz J., Chrétien M., Seidah N.G., Khatib A.M., The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003; 111(11): 1723-1732.
- Skobe M., Rockwell P., Goldstein N., Vosseler S., Fusenig N.E., Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997; 3(11): 1222-1227.
- Sköldenberg E.G., Christiansson J., Sandstedt B., Larsson A., Läckgren G., Christofferson R., Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *J Urol* 2001; 165 (6 Pt 2): 2274-2279.
- Skóra J., Biegus J., Pupka A., Barć P., Sikora J., Szyber P., Molekularne podstawy angiogenezy. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2006; 60: 410-415.
- Słomski R. (red.), *Analiza DNA, teoria i praktyka*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2008; s. 131-144, 169-176.
- Smith S.K., Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 6: 59-66.
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M., Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182.
- Stachel D., Albert M., Meilbeck R., Paulides M., Schmid I., Expression of angiogenic factors in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2007; 17(1): 147-152.

- Stewart M., Turley H., Cook N., Pezzella F., Pillai G., Ogilvie D., Carlidge S., Paterson D., Copley C., Kendrew J., Barnes C., Harris A.L., Gatter K.C., The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumors and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology* 2003; 43(1): 33-39.
- St-Jacques S., Forte M., Lye S.J., Letarte M., Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 1994; 51(3): 405-413.
- Stryer L., *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003; s. 896-963.
- Styczyński J., Piatkowska M., Dębski R., Krenska A., Górnicka H., Hulek E., Kubicka M., Kuryło-Rafińska B., Kołodziej B., Ekspresja CD105 w komórkach szpiku kostnego i krwi obwodowej u dzieci chorych na nowotwory. *Współczesna Onkologia* 2007; 11(3): 107–111.
- Su J.L., Shih J.Y., Yen M.L., Jeng Y.M., Chang C.C., Hsieh C.Y., Wei L.H., Yang P.C., Kuo M.L., Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2004; 64(2): 554-564.
- Suminoe A., Matsuzaki A., Hattori H., Koga Y., Ishii E., Hara T., Expression of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) genes in blasts of infant acute lymphoblastic leukemia with organ involvement. *Leuk Res* 2007; 31(10): 1437-1440.
- Sun X.Y., Wu Z.D., Liao X.F., Yuan J.Y., Tumor angiogenesis and its clinical significance in pediatric malignant liver tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11(5): 741-743.
- Takahashi A., Sasaki H., Kim S.J., Tobisu K., Kakizoe T., Tsukamoto T., Kumamoto Y., Sugimura T., Terada M., Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(15): 4233-4237.
- Takahashi N., Kawanishi-Tabata R., Haba A., Tabata M., Haruta Y., Tsai H., Seon B.K., Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3): 524-532.
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T., Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-

- derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5(4): 434-438.
- Takebayashi Y., Aklyama S., Yamada K., Akiba S., Aikou T., Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 78(2): 226-231.
- Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K., The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3): 550-563.
- Tanabe T., Tohnai N., Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 95-114.
- Tanaka F., Otake Y., Yanagihara K., Kawano Y., Miyahara R., Li M., Ishikawa S., Wada H., Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. *Lung Cancer* 2003; 39(3): 289-296.
- Terai M., Honda T., Yasukawa K., Higashi K., Hamada H., Kohno Y., Prognostic impact of vascular leakage in acute Kawasaki disease. *Circulation* 2003; 108(3): 325-330.
- Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C., Abraham J.A., The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266(18): 11947-11954.
- Toporsian M., Gros R., Kabir M.G., Vera S., Govindaraju K., Eidelman D.H., Husain M., Letarte M., A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 2005; 96(6): 684-692.
- Truffinet V., Donnard M., Vincent C., Faucher J.L., Bordessoule D., Turlure P., Trimoreau F., Denizot Y., Cyclooxygenase-1, but not -2, in blast cells of patients with acute leukemia. *Int J Cancer* 2007; 121(4): 924-927.
- Tsuji M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N., Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93(5): 705-716.
- Unemori E.N., Ferrara N., Bauer E.A., Amento E.P., Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153(3): 557-562.
- Vacca A., Ribatti D., Iurlaro M., Albini A., Minischetti M., Bussolino F., Pellegrino A., Ria R., Rusnati M., Presta M., Vincenti V., Persico M.G., Dammacco F., Human

- lymphoblastoid cells produce extracellular matrix-degrading enzymes and induce endothelial cell proliferation, migration, morphogenesis, and angiogenesis. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28(1): 55-68.
- Vacca A., Ribatti D., Roncali L., Dammacco F., Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases. Biological and clinical studies. *Leuk Lymphoma* 1995; 20(1-2): 27-38.
- Vacca A., Ribatti D., Roncali L., Ranieri G., Serio G., Silvestris F., Dammacco F., Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994; 87(3): 503-508.
- van Royen N., Piek J.J., Schaper W., Bode C., Buschmann I., Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol* 2001; 8(6): 687-693.
- Viita H., Markkanen J., Eriksson E., Nurminen M., Kinnunen K., Babu M., Heikura T., Turpeinen S., Laidinen S., Takalo T., Ylä-Herttuala S., 15-lipoxygenase-1 prevents vascular endothelial growth factor A- and placental growth factor-induced angiogenic effects in rabbit skeletal muscles via reduction in growth factor mRNA levels, NO bioactivity, and downregulation of VEGF receptor 2 expression. *Circ Res* 2008; 102(2): 177-184.
- Vo M.N., Evans M., Leitzel K., Ali S.M., Wilson M., Demers L., Evans D.B., Lipton A., Elevated plasma endoglin (CD105) predicts decreased response and survival in a metastatic breast cancer trial of hormone therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(3): 767-771.
- von Rahden B.H., Stein H.J., Pühringer F., Koch I., Langer R., Piontek G., Siewert J.R., Höfler H., Sarbia M., Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(12): 5038-5044.
- Voros G., Maquoi E., Demeulemeester D., Clerx N., Collen D., Lijnen H.R., Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* 2005 ; 146(10): 4545-4554.
- Wang J.M., Kumar S., Pye D., Haboubi N., al-Nakib L., Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(5): 386-388.

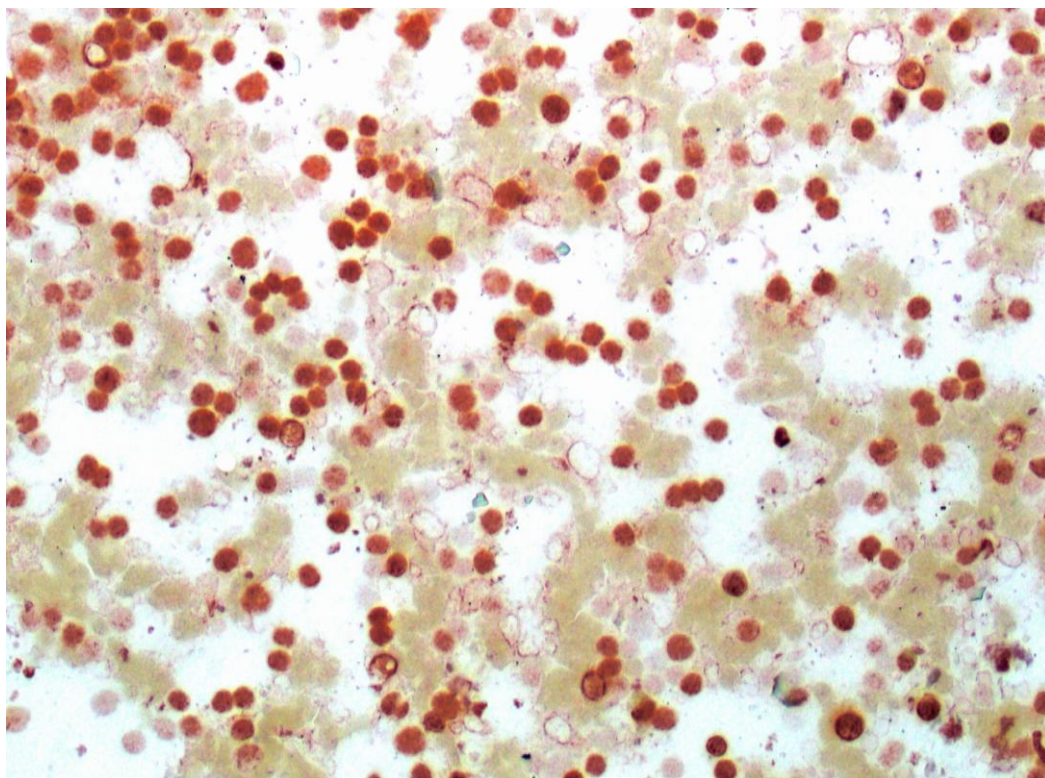
- Wang J.M., Kumar S., Pye D., van Agthoven A.J., Krupinski J., Hunter R.D., A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues. *Int J Cancer* 1993; 54(3): 363-370.
- Wikström P., Lissbrant I.F., Stattin P., Egevad L., Bergh A., Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51(4): 268-275.
- Witte M.B., Barbul A., General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77(3): 509-528.
- Wong V.C., Chan P.L., Bernabeu C., Law S., Wang L.D., Li J.L., Tsao S.W., Srivastava G., Lung M.L., Identification of an invasion and tumor-suppressing gene, Endoglin (ENG), silenced by both epigenetic inactivation and allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123(12): 2816-2823.
- Wróbel T., Angiogeneza w nowotworach hematologicznych. *Acta Haematologica Polonica* 2004; 35(4): 493-504.
- Xu H.X., Zhu X.D., Zhuang P.Y., Zhang J.B., Zhang W., Kong L.Q., Wang W.Q., Liang Y., Wu W.Z., Wang L., Fan J., Tang Z.Y., Sun H.C., Expression and prognostic significance of placental growth factor in hepatocellular carcinoma and peritumoral liver tissue. *Int J Cancer* 2011; 128(7): 1559-1569.
- Xu L., Cochran D.M., Tong R.T., Winkler F., Kashiwagi S., Jain R.K., Fukumura D., Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* 2006; 66(8): 3971-3977.
- Yamanaka Y., Friess H., Buchler M., Beger H.G., Uchida E., Onda M., Kobrin M.S., Korc M., Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993; 53(21): 5289-5296.
- Yetgin S., Yenicesu I., Cetin M., Tuncer M., Clinical importance of serum vascular endothelial and basic fibroblast growth factors in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; 42(1-2): 83-88.
- Yokoyama C., Tanabe T., Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165(2): 888-894.
- Yu J.X., Zhang X.T., Liao Y.Q., Zhang Q.Y., Chen H., Lin M., Kumar S., Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of

gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2866-2869.

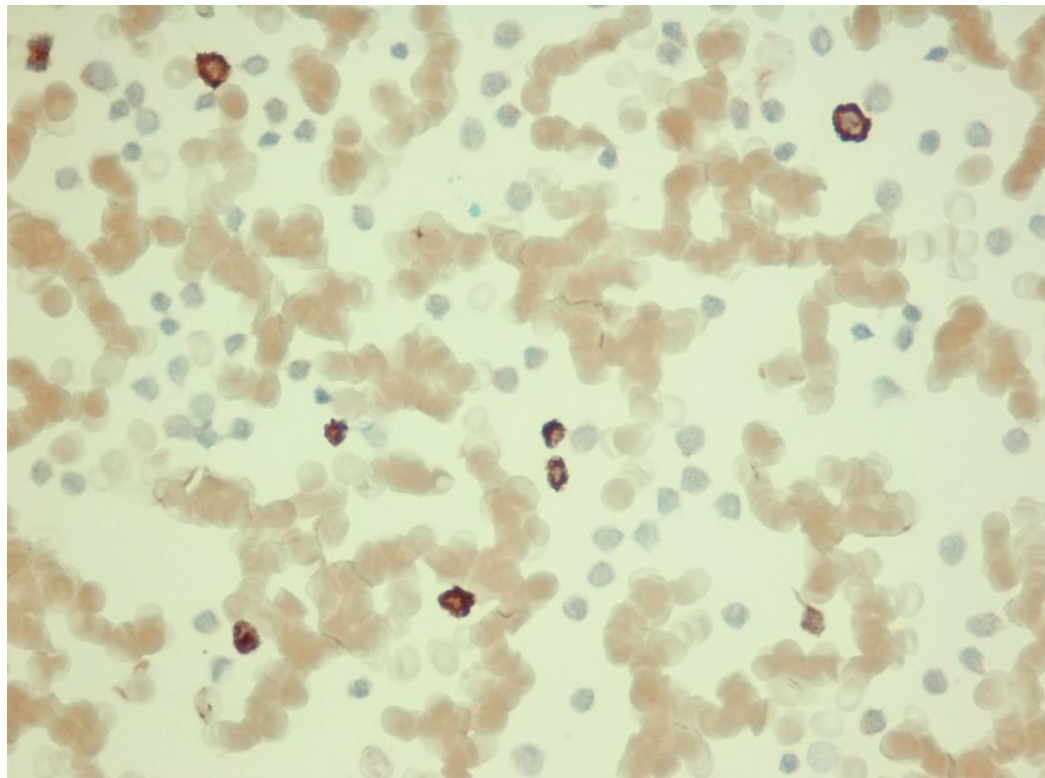
Zabel M. (red.), *Immunocytochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999; s. 55-113, 198-218.

Zidar N., Odar K., Glavac D., Jerse M., Zupanc T., Stajer D., Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med* 2009; 13(9B): 3753-3763.

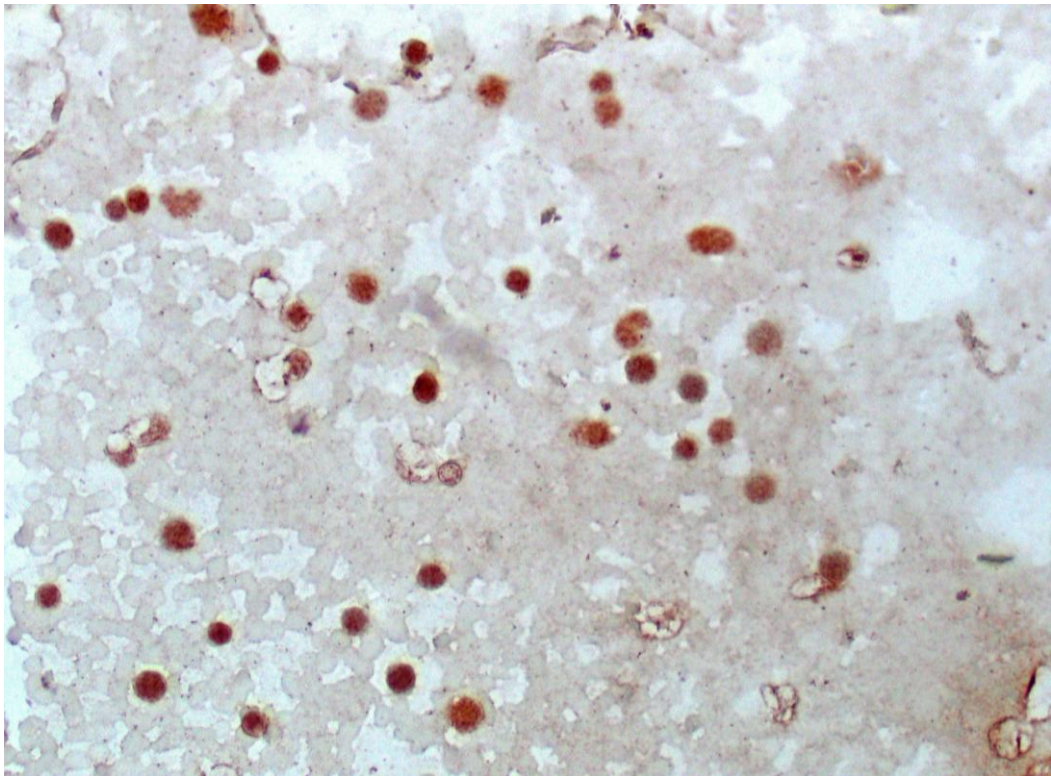
10. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA



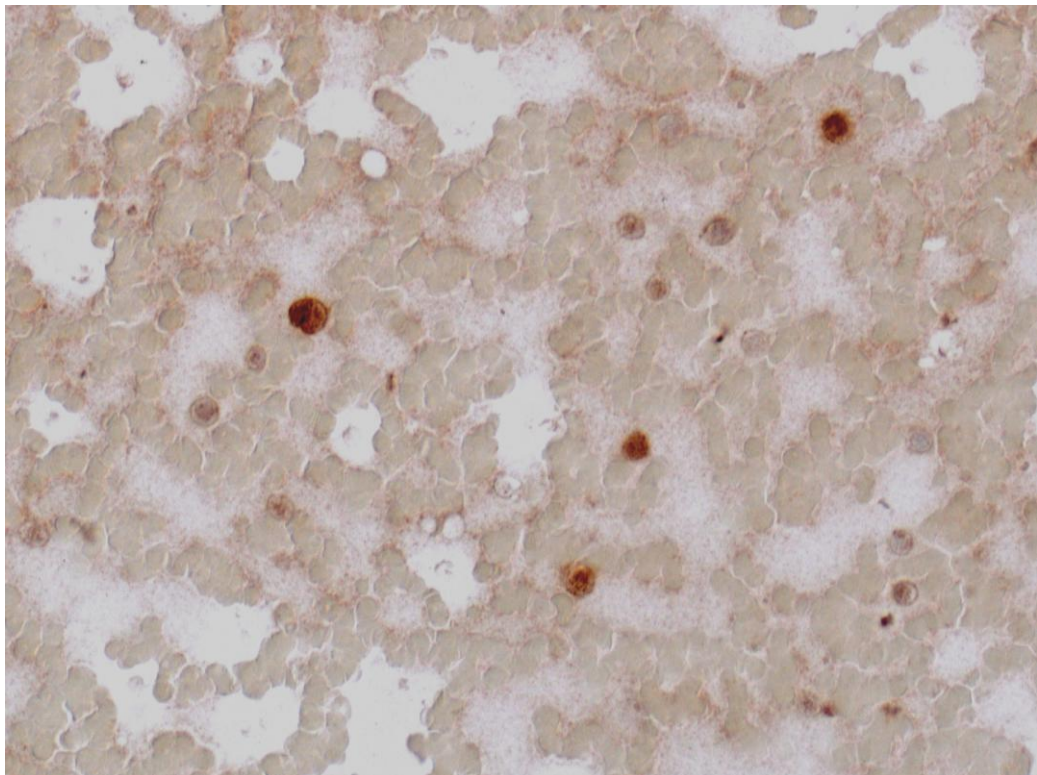
Fot. 1. Pacjent z ALL przed rozpoczęciem leczenia (korzystny przebieg choroby). Reakcja immunocytochemiczna dokumentująca obecność antygenu CD105. Odczyn stwierdzony we wszystkich komórkach blastycznych szpiku kostnego. Oryginalne powiększenie 200x.



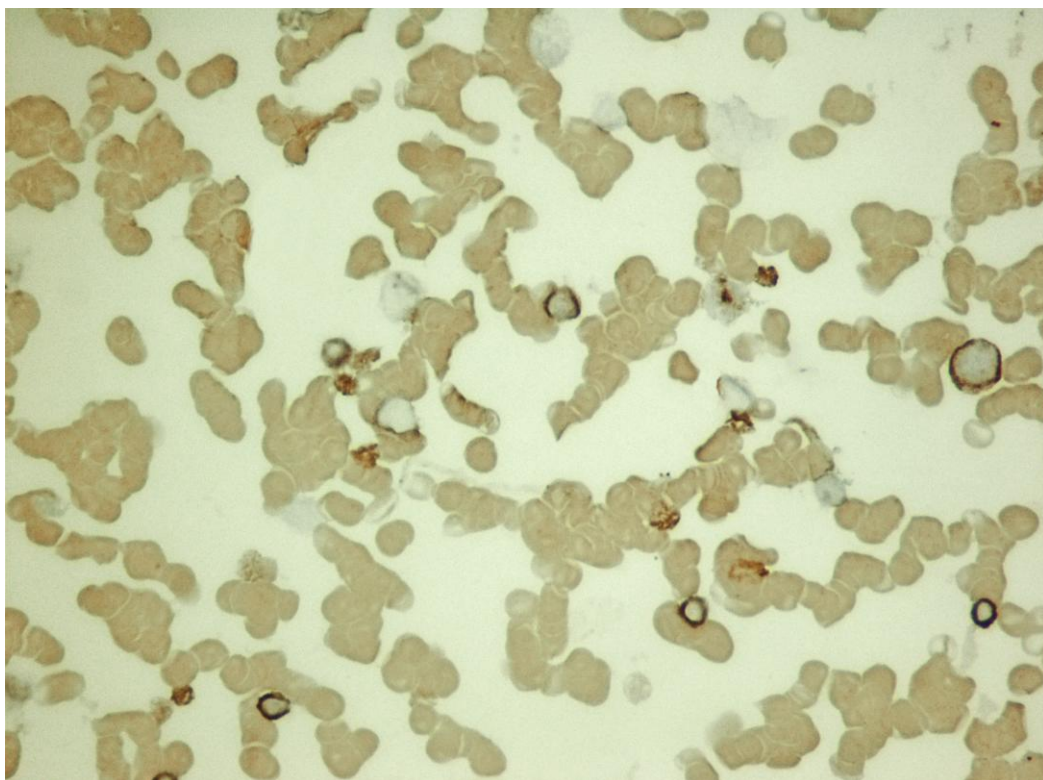
Fot. 2. Immunocytochemiczna ekspresja antygenu CD105 u pacjenta z ALL przed rozpoczęciem leczenia (niekorzystny przebieg choroby). Odczyn obecny w pojedynczych blastach. Oryginalne powiększenie 400x.



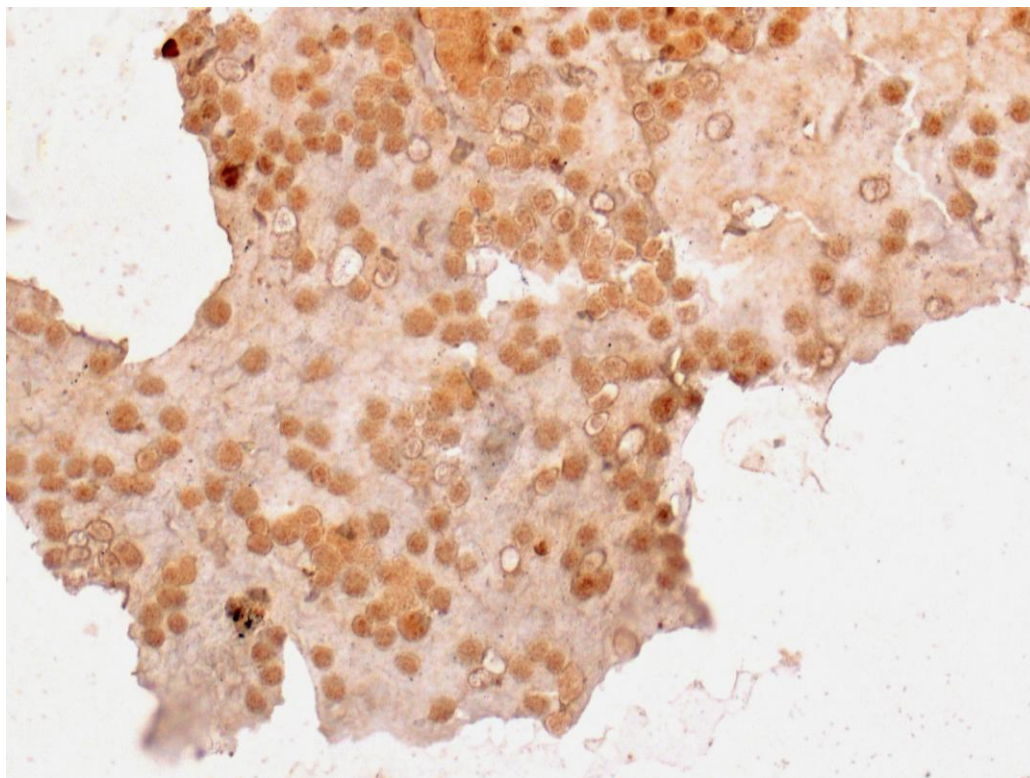
Fot. 3. Pacjent z ALL w okresie remisji choroby (korzystny przebieg). Immunocytochemiczny odczyn na CD105 obecny we wszystkich komórkach jądrazstych szpiku kostnego. Oryginalne powiększenie 200x.



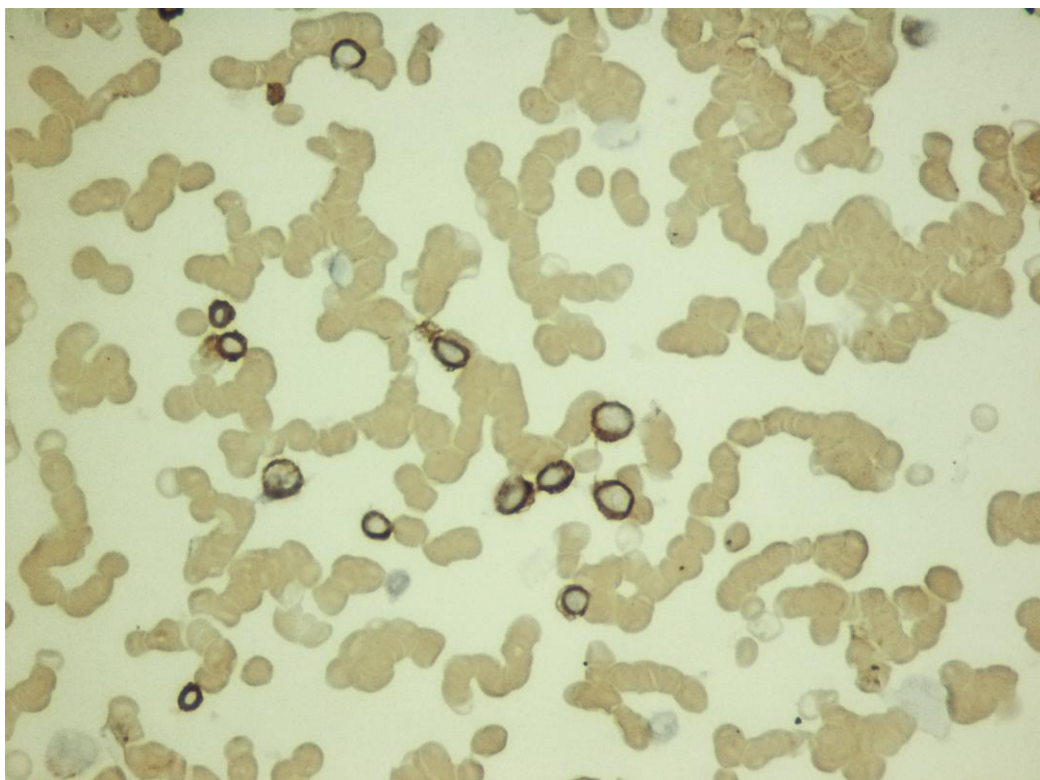
Fot. 4. Reakcja immunocytochemiczna wykrywająca obecność antygeny CD105. Ekspresja obserwowana we wszystkich limfoblastach. Pacjent z ALL w okresie remisji choroby (niekorzystny przebieg). Oryginalne powiększenie 200x.



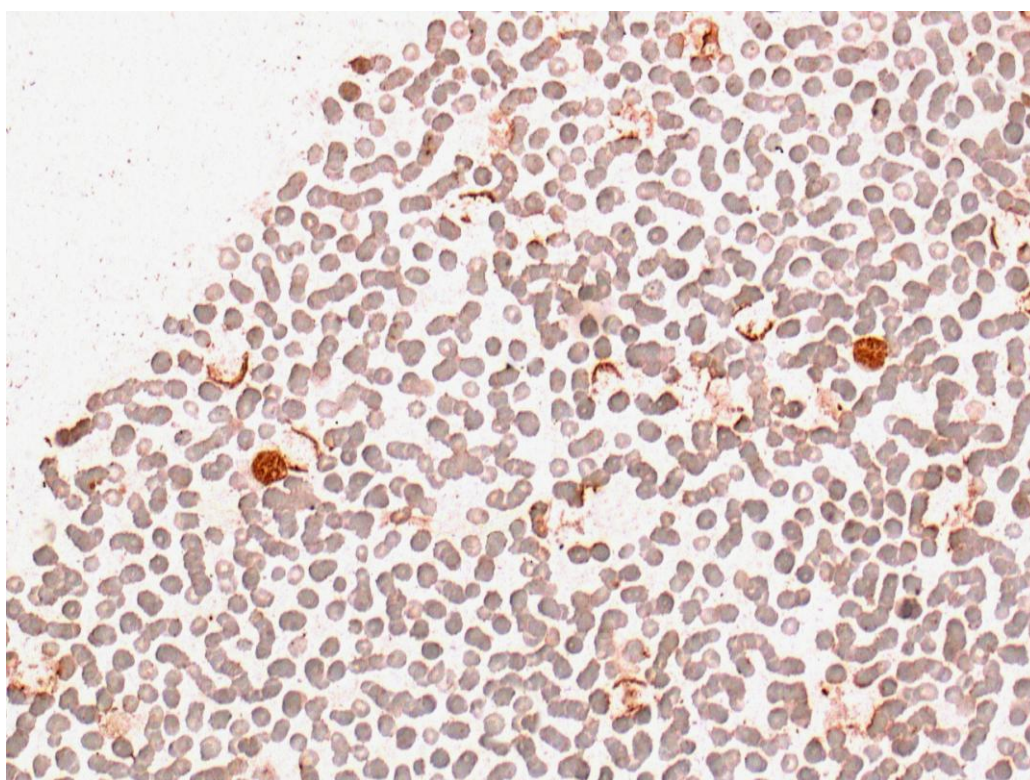
Fot. 5. Ekspresja CD105 w komórkach blastycznych szpiku kostnego, wykrywana za pomocą reakcji immunocytochemicznych, u pacjenta z ALL w okresie remisji z późniejszym niekorzystnym przebiegiem choroby. Odczyn dotyczy ok. 50% komórek. Oryginalne powiększenie 400x.



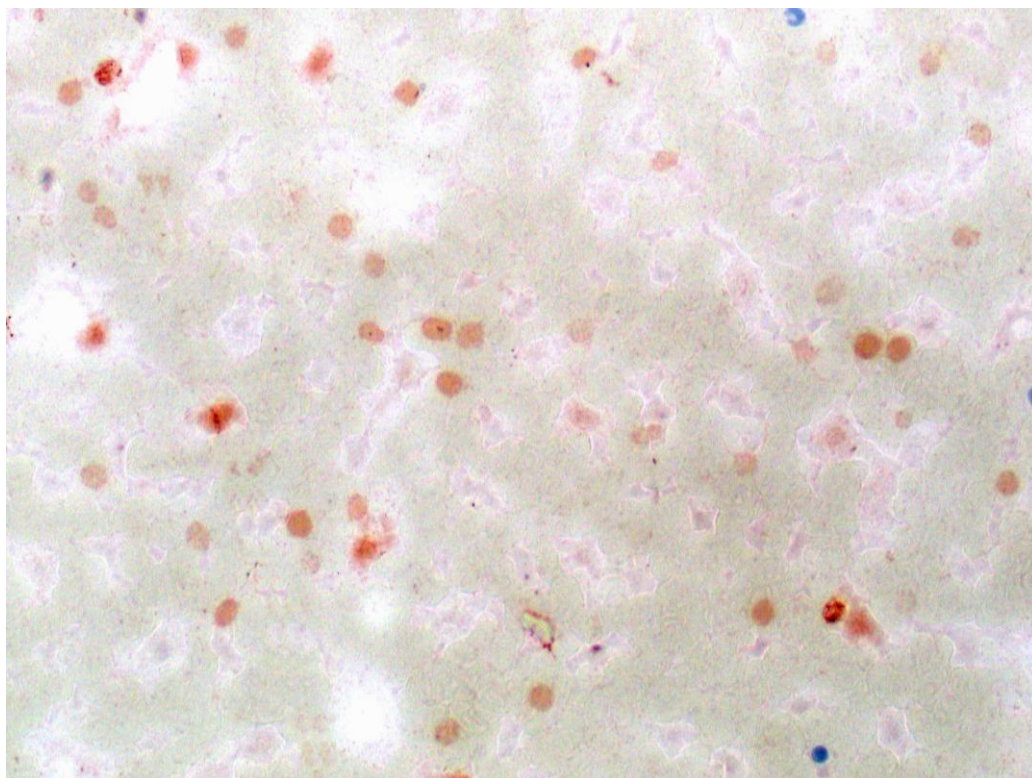
Fot. 6. Pacjent z ALL w okresie wznowy choroby. Odczyn na CD105 obecny we wszystkich komórkach jądrzastych szpiku kostnego. Oryginalne powiększeni 200x.



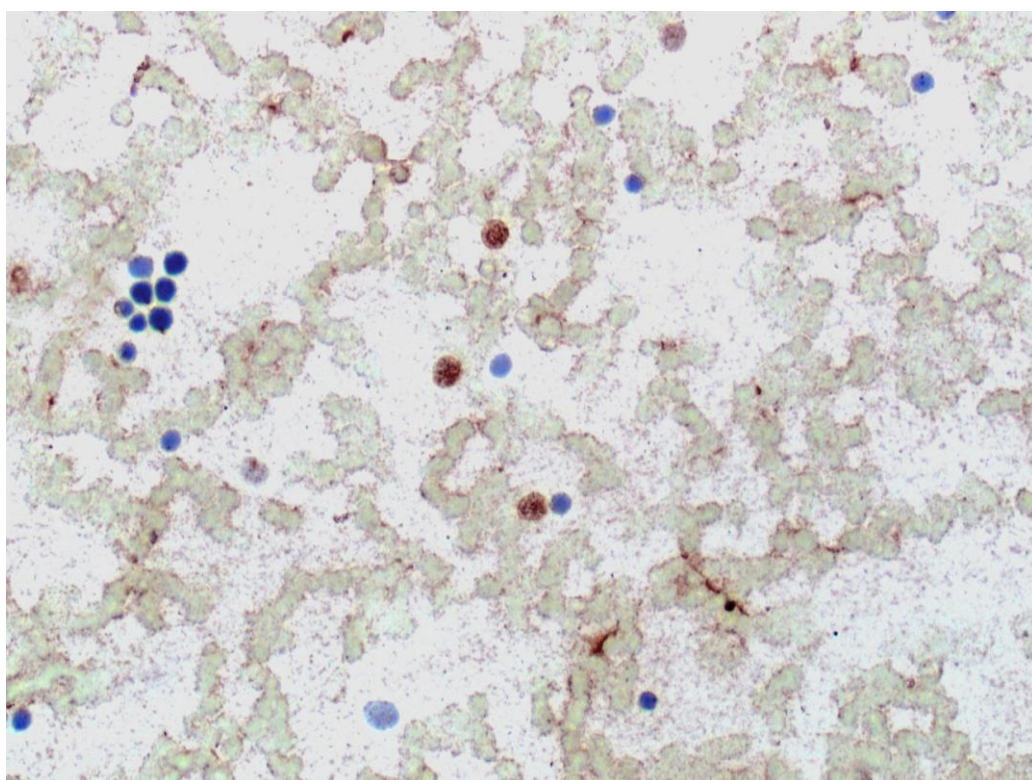
Fot. 7. Wynik reakcji immunocytochemicznej wykrywającej CD105 u pacjenta z ALL w okresie wznowy. Odczyn obserwowany w ok. 70% blastów. Oryginalne powiększenia 400x.



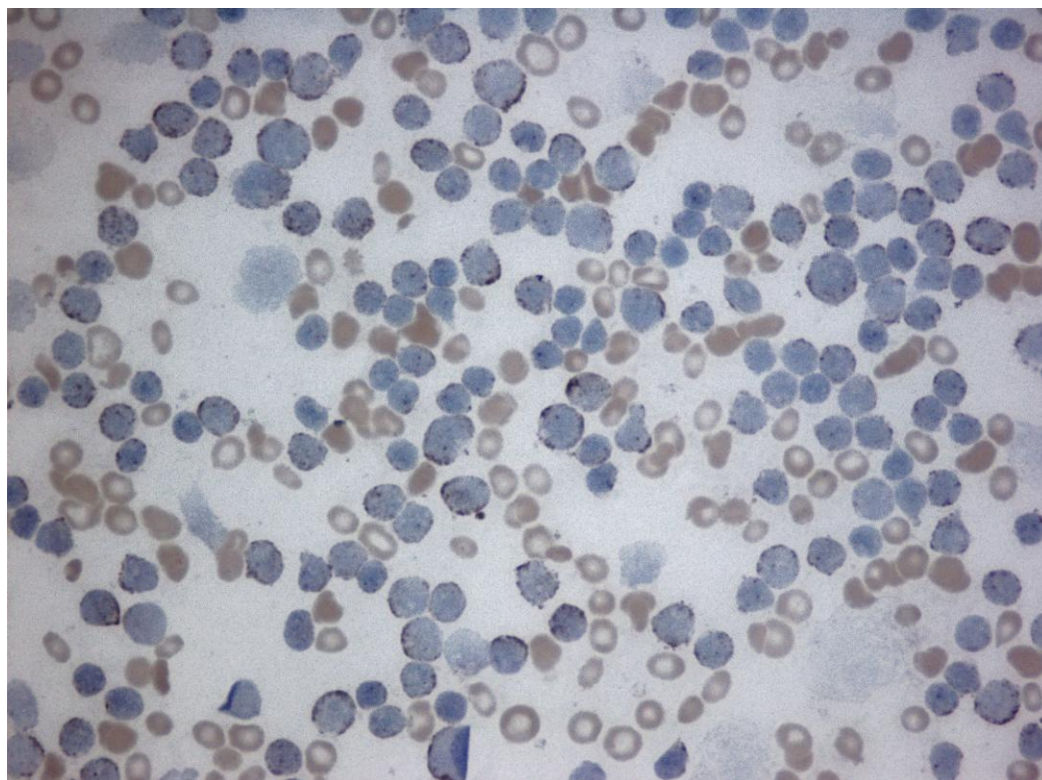
Fot. 8. Pacjent z ALL w okresie remisji z korzystnym późniejszym przebiegiem choroby. Odczyn na PIGF stwierdzony we wszystkich limfocytach szpiku kostnego. Oryginalne powiększenie 200x.



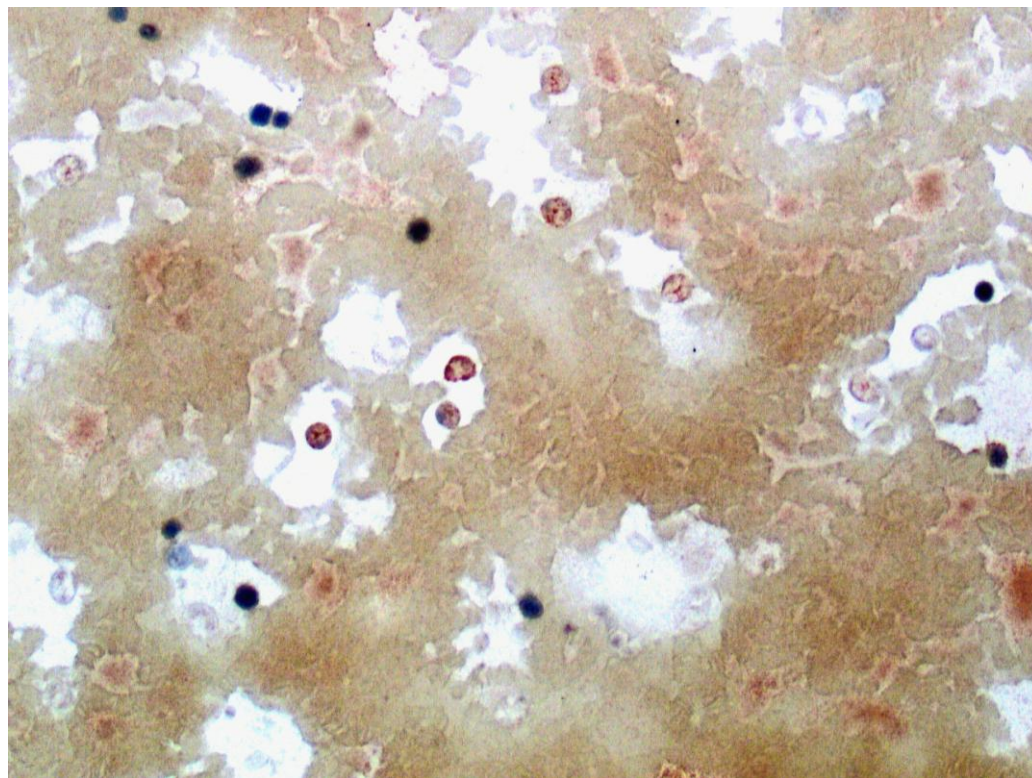
Fot. 9. Ekspresja antygenu PIGF wykrywana immunocytochemicznie w większości komórek jądrzastych szpiku kostnego. Pacjent z ALL w okresie wznowy choroby. Oryginalne powiększenie 200x.



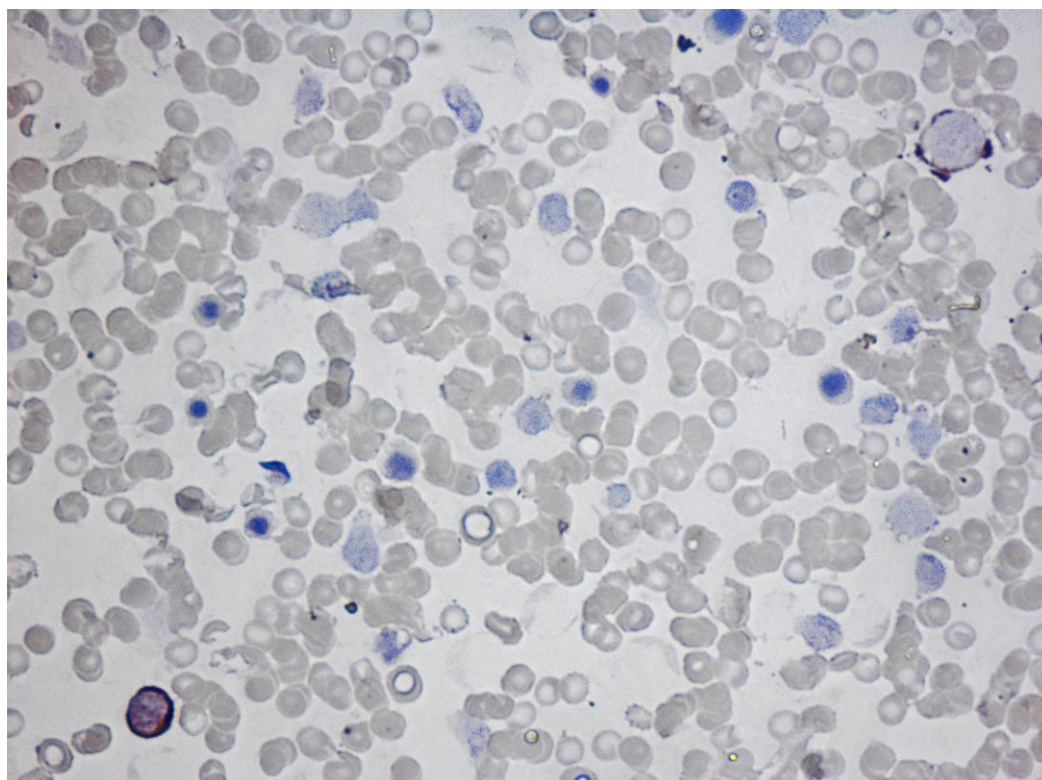
Fot. 10. Pacjent z ALL z okresie nawrotu choroby. Immunocytochemiczny odczyn na PIGF obecny w pojedynczych blastach. Oryginalne powiększenie 200x.



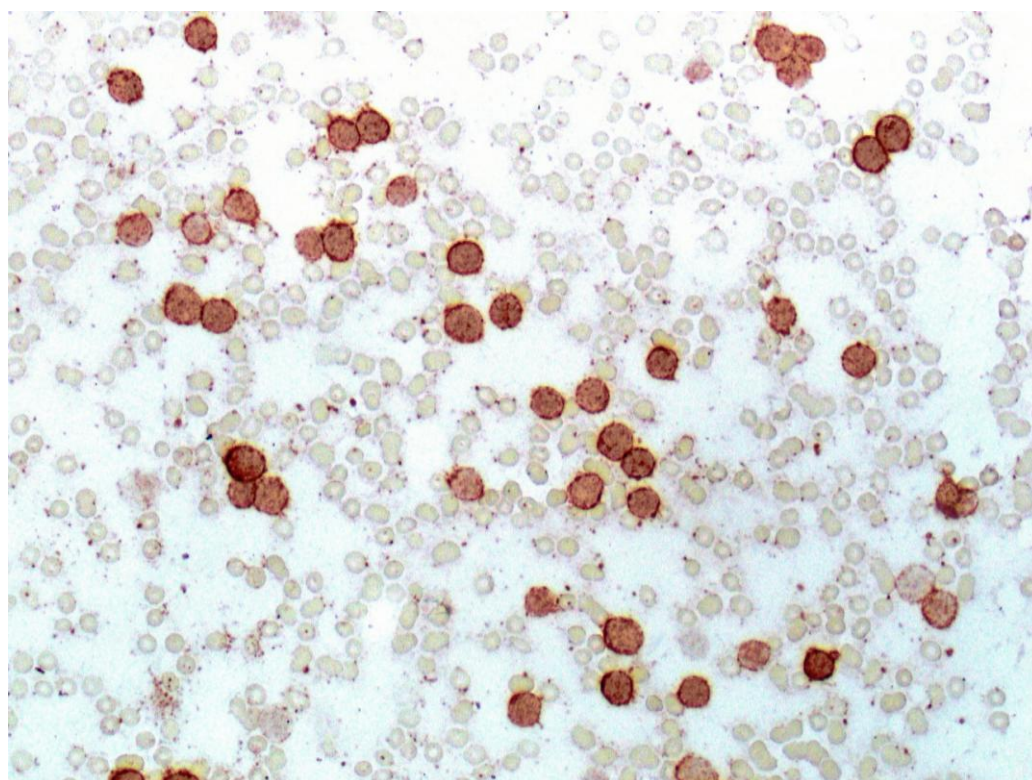
Fot. 11. Wynik reakcji immunocytochemicznej dokumentującej obecność antygenu PIGF u pacjenta z ALL w okresie wznowy choroby. Ekspresja stwierdzona w części komórek blastycznych. Oryginalne powiększeni 400x.



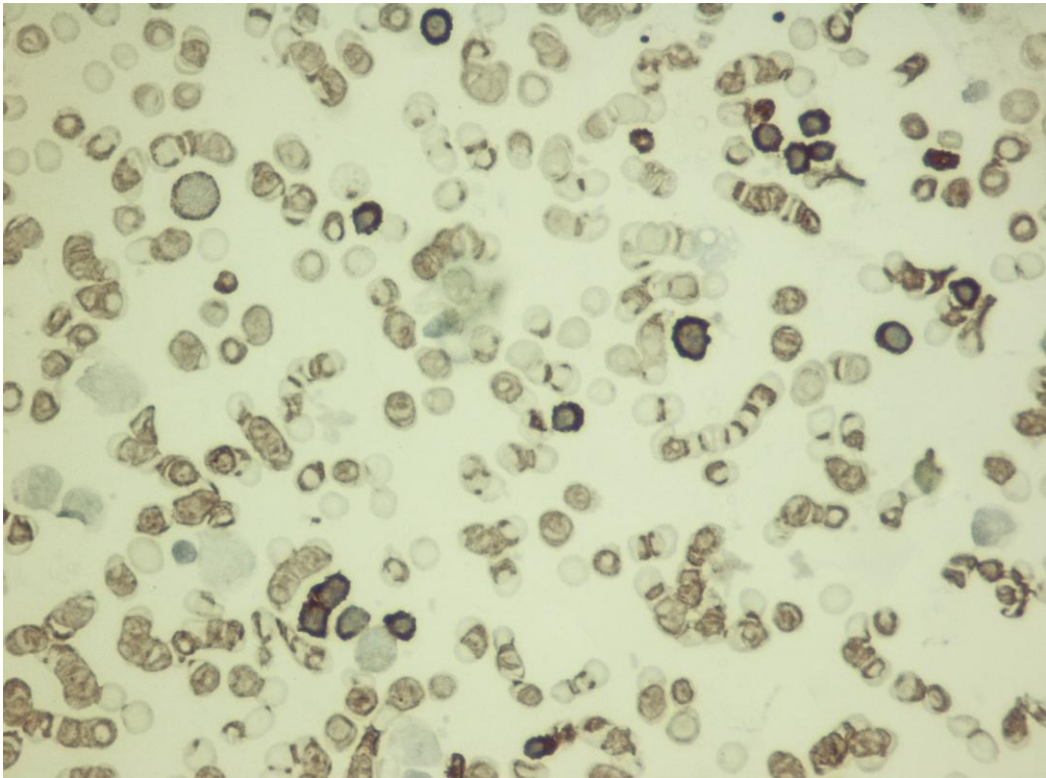
Fot. 12. Pacjent z ALL w okresie remisji o niekorzystnym późniejszym przebiegu choroby. Immunocytychemiczny odczyn na COX-1 obecny w części komórek limfoblastycznych. Oryginalne powiększenie 200x.



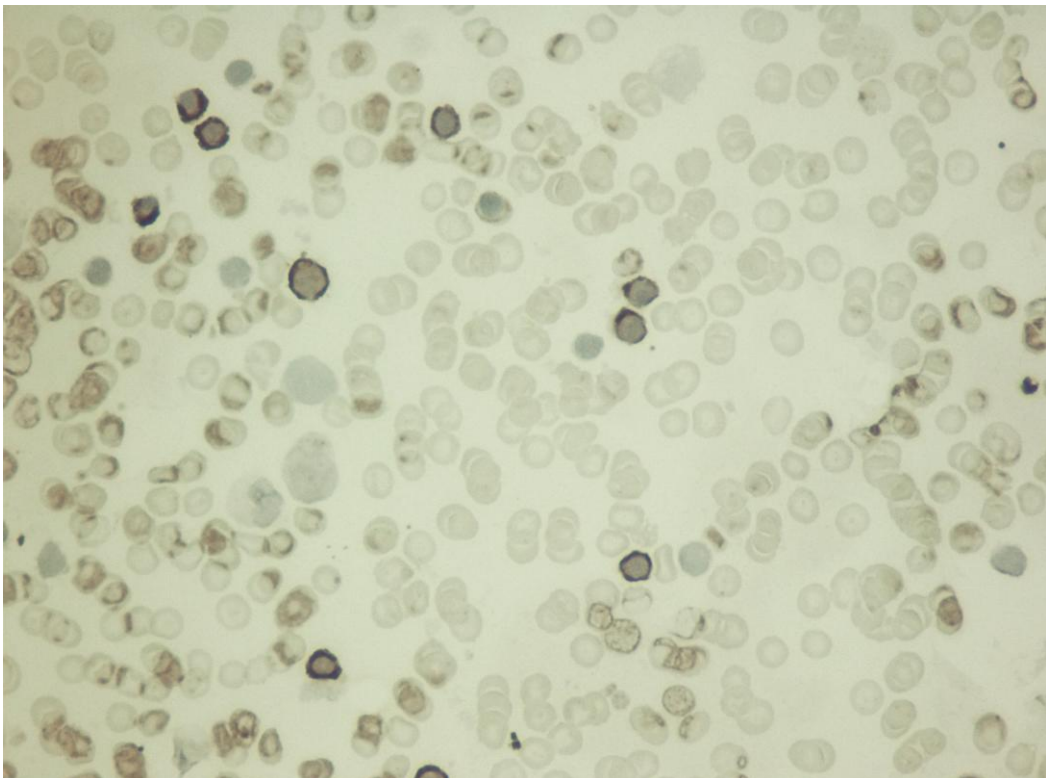
Fot. 13. Ekspresja COX-1 wykrywana za pomocą reakcji immunocytochemicznej. Odczyn obecny w pojedynczych komórkach. Pacjent z ALL w okresie remisji o korzystnym późniejszym przebiegu choroby. Oryginalne powiększenie 400x.



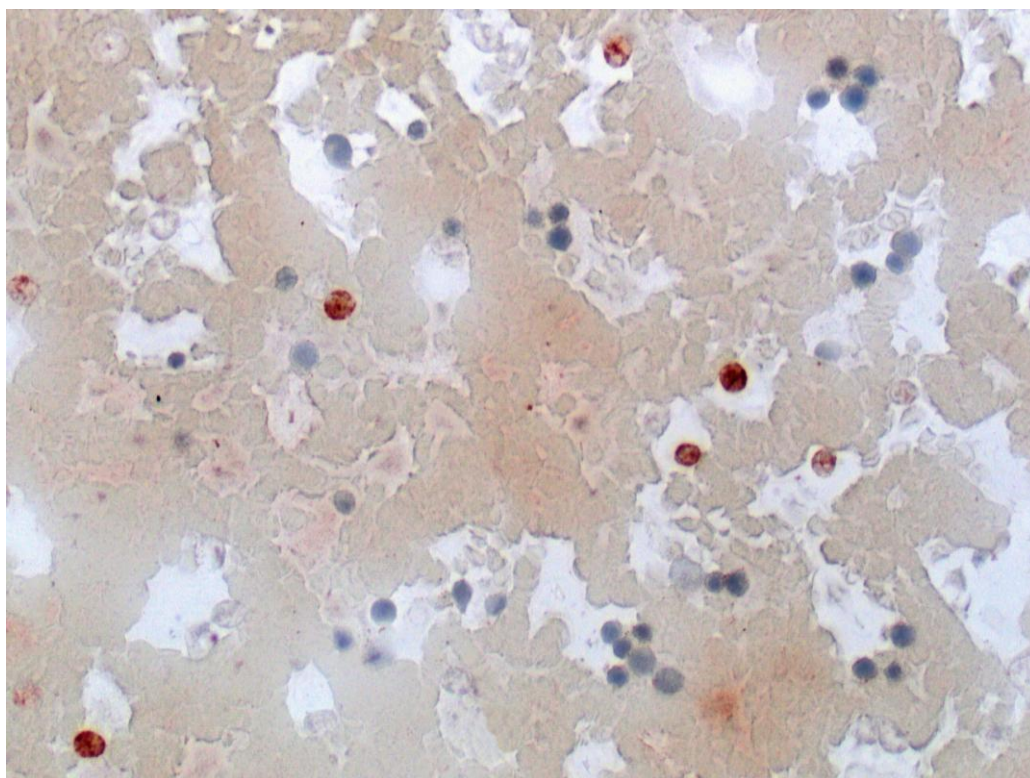
Fot. 14. Pacjent z ALL przed rozpoczęciem leczenia o niekorzystnym późniejszym przebiegu. Ekspresja CD10 wykrywana immunocytochemicznie w całej populacji komórek blastycznych. Powiększenie 200x.



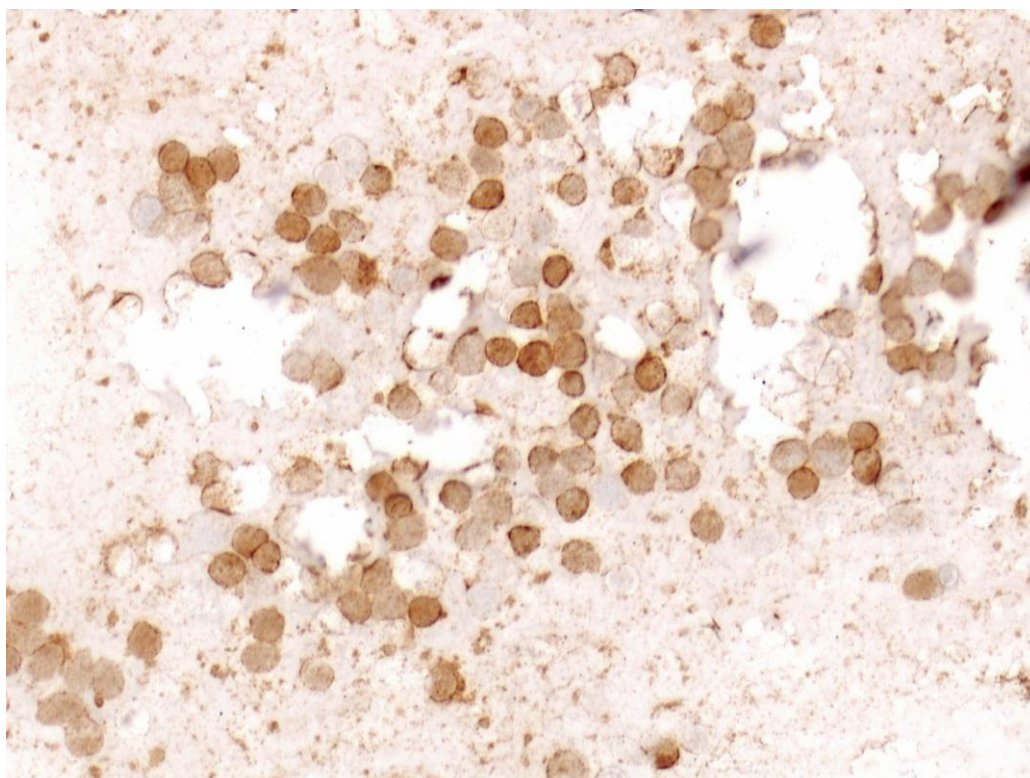
Fot. 15. Immunocytochemiczna ekspresja antygenu CD10 w większości blastów szpiku kostnego. Pacjent z ALL przed rozpoczęciem leczenia o niekorzystnym przebiegu choroby. Oryginalne powiększenie 400x.



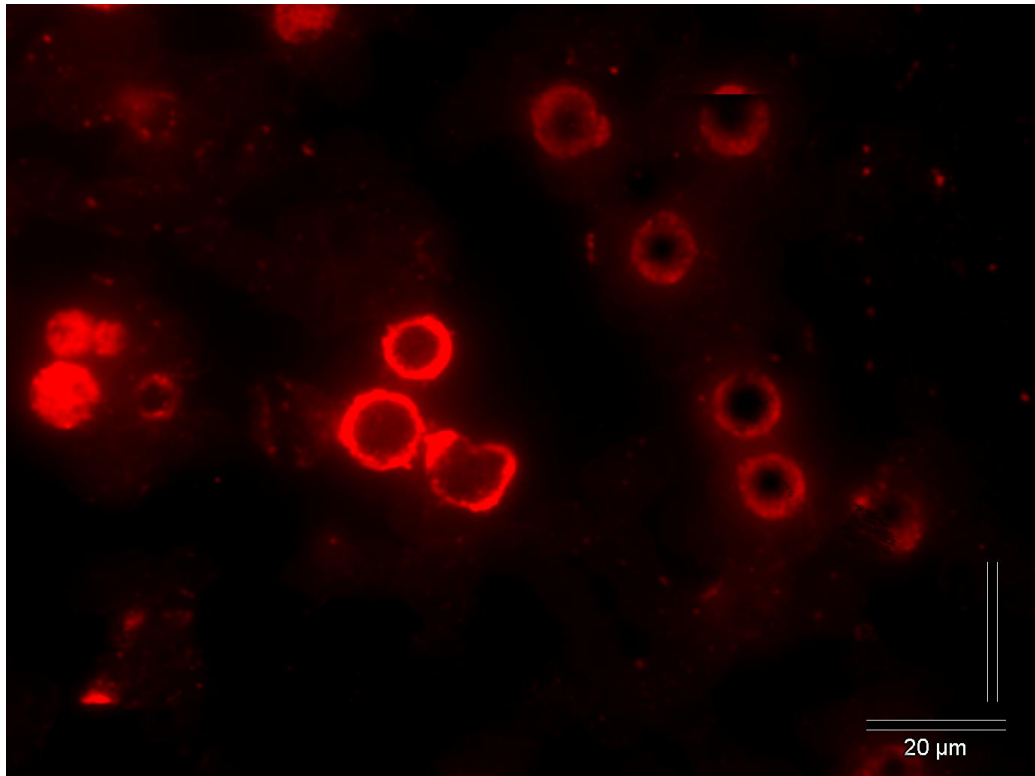
Fot. 16. Ekspresja antygenu CD10 u pacjenta z ALL przed rozpoczęciem leczenia o korzystnym przebiegu (reakcja immunocytochemiczna). Odczyn stwierdzony w większości blastów. Oryginalne powiększenie 400x.



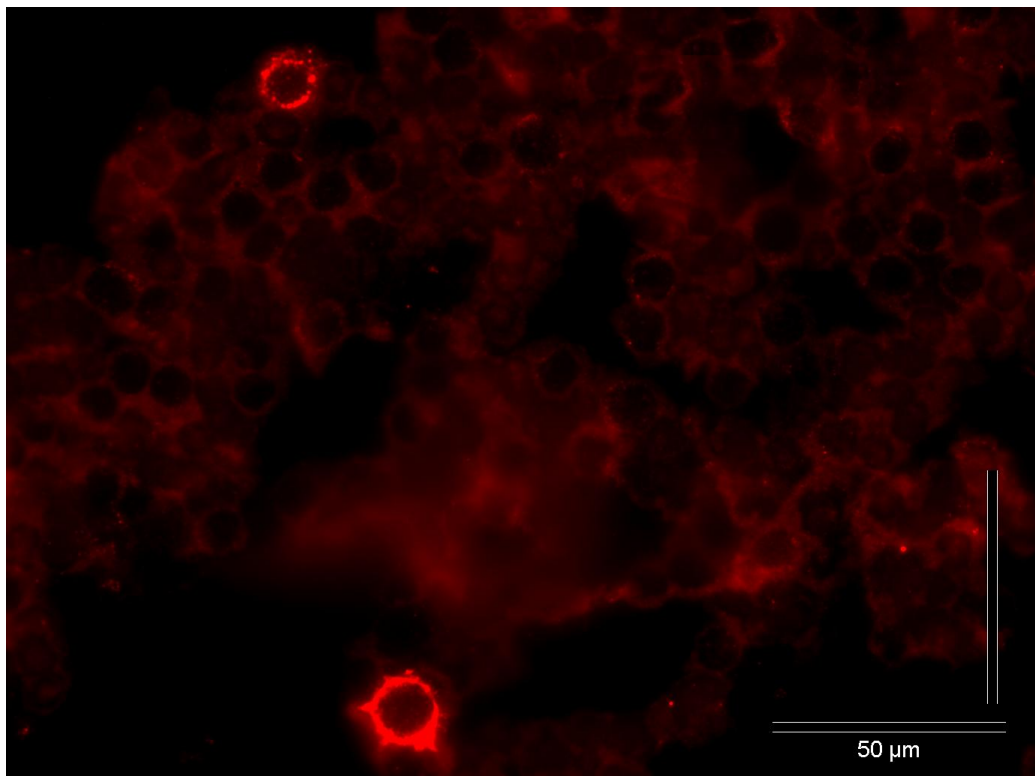
Fot. 17. Pacjent z ALL w remisji (niekorzystny przebieg). Odczyn na CD10 obecny w pojedynczych komórkach jądrzastych. Oryginalne powiększenie 200x.



Fot. 18. Pacjent z ALL w okresie nawrotu choroby. Immunocytochemiczny odczyn na CD10 wykrywany we wszystkich komórkach blastycznych. Oryginalne powiększenie 200x.



Fot. 19. Reakcja immunofluorescencyjna wykrywająca ekspresję CD105. Pacjent z ALL przed rozpoczęciem leczeniem o niekorzystnym późniejszym przebiegu choroby. Sygnał fluorescencyjny obserwowany we wszystkich blastach. Oryginalne powiększenie 600x.



Fot. 20. Pacjent z ALL w okresie remisji o niekorzystnym późniejszym przebiegu choroby. Ekspresja CD105 wykrywana immunofluorescencyjnie dotyczy wszystkich limfocytów. Oryginalne powiększenie 600x.

11. ZAŁĄCZNIK 1

Tabela 9. Szczegółowe zestawienie wyników reakcji immunocytochemicznych wykrywających antygeny: CD105, CD10, COX-1 oraz PIGF u pacjentów z rozpoznaniem ALL

| Lp. | Płeć | Etap ALL | Przebieg choroby | CD105 | CD10 | COX-1 | PIGF |
|-----|------|-----------------|------------------|-------|------|-------|------|
| 1 | M | remisja | n | + | + | + | - |
| 2 | M | wznowa | n | + | - | - | - |
| 3 | K | przed leczeniem | k | + | - | - | - |
| 4 | K | wznowa | n | + | - | - | - |
| 5 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 6 | K | przed leczeniem | k | + | - | + | - |
| 7 | M | remisja | k | + | - | + | + |
| 8 | M | remisja | n | + | - | - | + |
| 9 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 10 | K | przed leczeniem | k | - | - | - | + |
| 11 | K | wznowa | n | - | - | - | - |
| 12 | M | remisja | k | - | - | - | - |
| 13 | K | remisja | k | - | + | - | + |
| 14 | M | przed leczeniem | n | + | - | - | - |
| 15 | M | remisja | k | - | - | + | + |
| 16 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 17 | M | przed leczeniem | k | + | + | + | + |
| 18 | M | wznowa | n | + | - | - | - |
| 19 | K | remisja | k | - | - | + | - |
| 20 | M | wznowa | n | + | + | - | + |
| 21 | K | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 22 | M | wznowa | n | + | + | - | + |
| 23 | M | remisja | k | + | + | - | - |
| 24 | K | przed leczeniem | k | - | - | - | + |
| 25 | M | wznowa | n | - | - | - | + |
| 26 | M | przed leczeniem | k | - | - | - | - |
| 27 | M | remisja | k | - | - | - | + |
| 28 | K | remisja | k | - | - | - | + |
| 29 | M | przed leczeniem | n | + | + | - | - |
| 30 | M | wznowa | n | + | - | - | + |
| 31 | M | przed leczeniem | k | - | - | - | + |
| 32 | M | remisja | k | + | + | + | + |
| 33 | K | wznowa | n | - | - | - | - |
| 34 | K | przed leczeniem | k | - | + | - | + |
| 35 | M | przed leczeniem | k | + | - | - | - |
| 36 | M | wznowa | n | - | - | - | - |
| 37 | M | remisja | n | + | - | - | - |
| 38 | K | wznowa | n | - | - | - | + |
| 39 | K | przed leczeniem | k | + | - | - | + |
| 40 | K | przed leczeniem | k | - | - | - | - |
| 41 | M | przed leczeniem | k | + | - | - | - |
| 42 | M | przed leczeniem | k | + | + | - | + |
| 43 | M | wznowa | n | - | - | - | + |
| 44 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 45 | K | przed leczeniem | k | + | - | - | - |
| 46 | M | przed leczeniem | n | - | + | + | + |
| 47 | M | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 48 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 49 | K | ALL remisja | k | - | - | - | - |
| 50 | K | ALL remisja | k | - | - | + | + |
| 51 | M | wznowa | n | + | + | - | + |
| 52 | M | wznowa | n | + | - | - | + |
| 53 | M | wznowa | n | + | - | - | + |

| | | | | | | | |
|----|---|-----------------|---|---|---|---|---|
| 54 | K | przed leczeniem | k | - | + | - | + |
| 55 | M | przed leczeniem | k | - | - | - | - |
| 56 | M | wznowa | n | - | - | - | - |
| 57 | K | remisja | k | - | - | - | - |
| 58 | M | przed leczeniem | n | - | - | - | - |
| 59 | K | wznowa | n | - | - | - | - |
| 60 | M | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 61 | M | przed leczeniem | n | + | + | - | + |
| 62 | M | remisja | n | - | - | - | + |
| 63 | M | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 64 | M | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 65 | M | remisja | k | - | - | + | - |
| 66 | K | przed leczeniem | k | + | + | - | + |
| 67 | M | remisja | n | + | + | - | + |
| 68 | K | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 69 | M | wznowa | n | + | - | - | + |
| 70 | M | wznowa | k | + | + | - | + |
| 71 | K | przed leczeniem | k | + | + | - | - |
| 72 | K | remisja | k | + | + | - | - |
| 73 | K | remisja | k | + | + | + | - |
| 74 | K | wznowa | n | + | + | - | + |

K – kobieta

M – mężczyzna

k – korzystny przebieg choroby

n – niekorzystny przebieg choroby

Tabela 10. Szczegółowe zestawienie wyników reakcji immunocytochemicznych wykrywających antygeny: CD105, CD10, COX-1 oraz PIGF u pacjentów bez rozpoznania ALL

| Lp. | Płeć | Rozpoznanie | CD105 | CD10 | COX-1 | PIGF |
|-----|------|------------------------------|-------|------|-------|------|
| 1 | M | Bez choroby nowotworowej | - | + | - | + |
| 2 | M | mononukleozą zakaźną | - | + | - | - |
| 3 | K | ziarnicy złośliwa | - | - | - | - |
| 4 | K | CMML | - | - | - | - |
| 5 | K | RMS uda | - | + | - | + |
| 6 | K | pakiet węzłów chłonnych szyi | - | - | - | - |
| 7 | M | CML | - | - | - | - |
| 8 | M | ziarnica | - | + | - | - |
| 9 | K | <i>neuroblastoma</i> | | - | - | - |

K – kobieta

M – mężczyzna