

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Małgorzata Anna Krawczyk

***Znaczenie ekspresji
wybranych markerów hipoksji
i indeksu proliferacyjnego Ki-67
u dzieci z mięsakami tkanek miękkich
w ocenie aktywności choroby
i prognozowaniu jej przebiegu***

GDAŃSK 2016

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii

Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor
dr hab. n. med. Ewa Bień

Medical University of Gdansk 2016
ISBN 978-83-65098-27-6

Pragnę serdecznie podziękować

Mojemu Promotorowi, Pani dr hab. n. med. Ewie Bień, za merytoryczną opiekę nad moją pracą naukową, za pomoc, a przede wszystkim ogromną wiedzę i pasję do pracy. Dziękuję za inspirację, motywację i nieocenione wskazówki, bez których ta praca nie mogłaby powstać.

Kierownikowi Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed, Pani Prof. dr hab. n. med. Elżbiecie Adamkiewicz-Drożyńskiej i Zespołowi Kliniki, za stworzenie optymalnych warunków do pracy naukowej, okazane wsparcie i słowa zachęty.

Kierownikowi Zakładu Patologii i Neuropatologii GUMed, Pani dr hab. n. med. Ewie Iżyckiej-Świeszewskiej, prof. nadzw. GUMed, za zapoznanie mnie z tajnikami tworzenia mikromacierzy tkankowych oraz cenne uwagi przekazane w trakcie realizacji pracy.

Kierownikom Ośrodków Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych, za udostępnienie materiału klinicznego i tkankowego.

Koleżankom z Fundacji i Hospicjum Pomorze Dzieciom, za przyjaźń, cierpliwość i mobilizację do pracy.

Moim Rodzicom, za Ich bezgraniczną miłość, wsparcie i wiarę w moje możliwości. Bez Nich nie byłoby mnie tutaj.

Moim Przyjaciółom i Bliskim, za pomoc przy powstawaniu pracy.

Pracę dedykuję moim Pacjentom

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	9
1 WSTĘP.....	12
1.1 Mięśniaki tkanek miękkich u dzieci.....	12
1.1.1 Epidemiologia.....	12
1.1.2 Podtypy histologiczne MTM u dzieci i ich charakterystyka kliniczna.....	12
1.1.3 Kliniczne czynniki prognostyczne w MTM u dzieci.....	16
1.2 Hipoksja.....	17
1.2.1 Rodzaje i przyczyny hipoksji.....	17
1.2.2 Hipoksja w tkance nowotworowej.....	19
1.2.3 Metody oceny hipoksji w nowotworach.....	20
1.3 Czynniki indukowane przez hipoksję 1.....	21
1.3.1 Budowa HIF-1. Aktywacja HIF-1 α	22
1.4 Adaptacja komórek nowotworowych do hipoksji.....	24
1.5 Hipoksja a angiogeneza w nowotworze.....	26
1.5.1 VEGF – marker angiogenezy aktywowany przez HIF-1 α	26
1.6 Hipoksja a przemiany beztlenowe w nowotworze.....	28
1.6.1 GLUT-1 – marker przemian beztlenowych aktywowany przez HIF-1 α	28
1.7 Hipoksja a regulacja komórkowego pH w nowotworze.....	29
1.7.1 CA IX – marker regulacji pH aktywowany przez HIF-1 α	30
1.8 Hipoksja a progresja nowotworu.....	31
1.8.1 Antygen Ki-67 – marker aktywności proliferacyjnej nowotworu.....	32
1.9 Endogenne markery hipoksji w praktyce klinicznej.....	33
2 CELE PRACY.....	36
3 MATERIAŁ I METODY.....	37
3.1 Materiał.....	37
3.1.1 Charakterystyka grupy badanej.....	37
3.1.2 Korzystne i niekorzystne prognostycznie czynniki w MTM u dzieci.....	40
3.1.3 Materiał tkankowy.....	41
3.2 Metodyka.....	42
3.2.1 Badania histologiczne.....	42

3.2.2	Mikromacierze tkankowe – TMA	42
3.2.3	Badania IHC ekspresji wybranych markerów hipoksji oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67	43
3.2.4	Ocena stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji w tkance nowotworowej guzów	44
3.2.5	Indeks proliferacyjny Ki-67 w tkance nowotworowej	45
3.3	Analiza statystyczna	45
4	WYNIKI	47
4.1	Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badanej	47
4.2	Wpływ czynników kliniczno-prognostycznych na EFS i OS u dzieci z MTM	49
4.3	Badania IHC HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz Ki-67 w MTM u dzieci	61
4.4	Częstość występowania silnej ekspresji markerów hipoksji i wysokiego indeksu Ki-67 w badanej grupie dzieci z MTM	66
4.5	Wzajemna korelacja pomiędzy badanymi markerami	67
4.6	Związek stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 z kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z MTM	67
4.6.1	Częstość występowania silnej ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz wysokiego indeksu Ki-67, a obecność korzystnych i niekorzystnych czynników prognostycznych u dzieci z MTM	67
4.6.2	Korelacja ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF i Ki-67 z kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z MTM	76
4.6.3	Liczba markerów, ulegających jednocześnie silnej ekspresji w wybranych podgrupach prognostycznych	78
4.7	Związek stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 z odpowiedzią na chemioterapię u dzieci z MTM	79
4.7.1	Częstość występowania słabej i silnej ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz indeksu Ki-67, a odpowiedź na CHT	79
4.7.2	Korelacja, pomiędzy ekspresją HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz indeksem Ki-67, a odpowiedzią na CHT	80

4.7.3	Jednoczesna silna ekspresja kilku markerów, a odpowiedź na CHT	80
4.8	Związek ekspresji badanych markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 z prawdopodobieństwem 5-letniego EFS u dzieci z MTM	83
4.8.1	Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz wartości indeksu Ki-67	83
4.8.2	Endogenne markery hipoksji wpływające niezależnie na EFS u dzieci z MTM	89
4.9	Liczba markerów ulegających jednoczesnej silnej ekspresji, a występowanie wznowy nowotworu i prawdopodobieństwo 5-letniego EFS	90
4.9.1	Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α , VEGF i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej	91
4.10	Związek ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 z prawdopodobieństwem 5-letniego OS u dzieci z MTM	92
4.10.1	Ekspresja HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF i Ki-67, a prawdopodobieństwo 5-letniego OS	92
4.10.2	Endogenne markery hipoksji wpływające niezależnie na OS u dzieci z MTM	98
4.11	Liczba markerów ulegających jednoczesnej silnej ekspresji, a występowanie zgonu z progresji nowotworu i prawdopodobieństwo 5-letniego OS	99
4.11.1	Prawdopodobieństwo 5-letniego OS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej	101
5	DYSKUSJA	102
5.1	Mikromacierze tkankowe w poznawaniu nowych markerów nowotworowych	102
5.2	Ekspresja HIF-1 α , VEGF, GLUT-1 i CA IX w MTM u dzieci – częstość występowania i wzajemna korelacja pomiędzy markerami	104
5.3	Korelacja pomiędzy ekspresją markerów hipoksji w MTM u dzieci, a wartością indeksu Ki-67	108

5.4	Markery hipoksji a kliniczno-patologiczne czynniki prognostyczne w MTM u dzieci	109
5.5	Markery hipoksji i antygen Ki-67 a odpowiedź na CHT	113
5.6	Markery hipoksji i IK67 a przebieg i wynik leczenia MTM u dzieci..	115
5.6.1	Wpływ badanych markerów na EFS.....	116
5.6.2	Wpływ badanych markerów na OS.....	117
5.7	Terapie hamujące ekspresję markerów hipoksji.....	119
6	PODSUMOWANIE	122
7	WNIOSKI	126
8	PIŚMIENNICTWO.....	127
9	STRESZCZENIE	150
10	SUMMARY	154
11	ZAŁĄCZNIKI.....	158

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2-DG	2-deoksy-D-glukoza
AFH	<i>angiomatoid fibrohistiocytoza</i>
ANG 1	<i>angiopoietin 1</i> / angiopoetyna 1
ARNT	<i>aryl hydrocarbon nuclear translocator</i>
Asn	reszta asparaginyłowa
ATP	adenozyno trójfosforan
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> / domena typu helisa-pętla-helisa
CA	<i>carbonic anhydrase</i> / anhydraza węglanowa
CCS	<i>clear cell sarcoma</i> / mięsak jasnokomórkowy
cFS	<i>congenital fibrosarcoma</i> / wrodzona postać włókniakomięsaka
ch	chłopcy
CHT	chemioterapia
CI	<i>confidence interval</i> / przedział ufności
CR	<i>complete response</i> / odpowiedź całkowita
CWS	<i>Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe</i>
DAB	dwuaminobenzodyna
DFSP	<i>dermatofibrosarcoma protuberans</i> / włókniakomięsak guzowaty skóry
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / kwas deoksyrybonukleinowy
DSRCT	<i>desmoplastic small round cell tumor</i> / desmoplastyczny guz drobnookrągłokomórkowy
dz	dziewczynki
ECS	<i>extraskeletal chondrosarcoma</i> / chrząstniakomięsak poza układem szkieletowym
EES	<i>extraskeletal Ewing sarcoma</i> / pozakostny mięsak Ewinga
EFS	<i>event free survival</i> / przeżycie wolne od zdarzenia
EGF	<i>epidermal growth factor</i> / naskórkowy czynnik wzrostu
ES	<i>epitheliod sarcoma</i> / mięsak epitelioidny (nabłonkopodobny)
F	<i>female</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> / czynnik wzrostu fibroblastów
FIH	<i>factor inhibiting HIF-1</i> / czynnik hamujący HIF-1
FS	<i>fibrosarcoma</i> / włókniakomięsak
GA	geldanamycyna
GIST	<i>gastrointestinal stromal tumor</i> / stromalny guz przewodu pokarmowego
GLUT-1	<i>glucose transporter 1</i> / transporter glukozy 1
GPR	<i>good partial response</i> / dobra częściowa odpowiedź
H	<i>high expression</i> / silna ekspresja

H-E	hematoksylina-eozyna
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i> / czynnik indukowany przez hipoksję 1
HR	<i>hazard risk</i> / ryzyko względne
HRE	<i>hypoxia responsive element</i> / element odpowiedzi na hipoksję
Hsp90	<i>heat shock protein</i> / białko szoku cieplnego
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> / insulinopodobny czynnik wzrostu
IHC	metody immunohistochemiczne
IK67	indeks proliferacji Ki-67
IL	interleukina
IMFS	<i>inflammatory myofibroblastic sarcoma</i> / zapalny mięsak miofibroblastyczny
IMFT	<i>inflammatory myofibroblastic tumor</i> / zapalny guz miofibroblastyczny
IRS	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study</i>
L	<i>low expression</i> / słaba ekspresja
LMS	<i>leiomyosarcoma</i> / mięsak gładkokomórkowy
LN	<i>lymph nodes</i> / węzły chłonne
LPS	<i>liposarcoma</i> / tłuszczakomięsak
M	mediana
M.	<i>male</i>
MesCS	<i>mesenchymal chondrosarcoma</i> / chrzęstniakomięsak mezenchymalny
MFH	<i>malignant fibrohistiocyoma</i> / mięsak włóknistohistiocytny
MMM	<i>mesenchymoma malignum</i> / mięsak mezenchymalny
MMP	<i>metalloproteinases</i> / metaloproteinazy
MPNST	<i>malignant peripheral nerve sheath tumor</i> / złośliwy obwodowy guz z osłonek nerwowych
MRT	<i>malignant rhabdoid tumor</i> / złośliwy guz rabdoidalny tkanek miękkich (pozanerkowy)
MTM	mięsak tkanek miękkich
MyxCS	<i>myxoid chondrosarcoma</i> / chrzęstniakomięsak śluzowy
N	liczba przypadków w grupie
n	liczba przypadków w podgrupie
NBL	<i>neuroblastoma</i> / zwojak zarodkowy współczulny
NF1	<i>neurofibromatosis type I</i> / nerwiakowłókniakowatość typu 1
NFS	<i>neurofibrosarcoma</i> / nerwiakowłókniakomięsak
NOS	<i>not otherwise specified sarcomas</i> / mięsaki nie dające się sklasyfikować
NRMS	<i>non-rhabdomyosarcoma-like</i> / mięsak nieprążkowanokomórkowy
ODDD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
OS	<i>overall survival</i> / przeżycie całkowite
OUN	ośrodkowy układ nerwowy

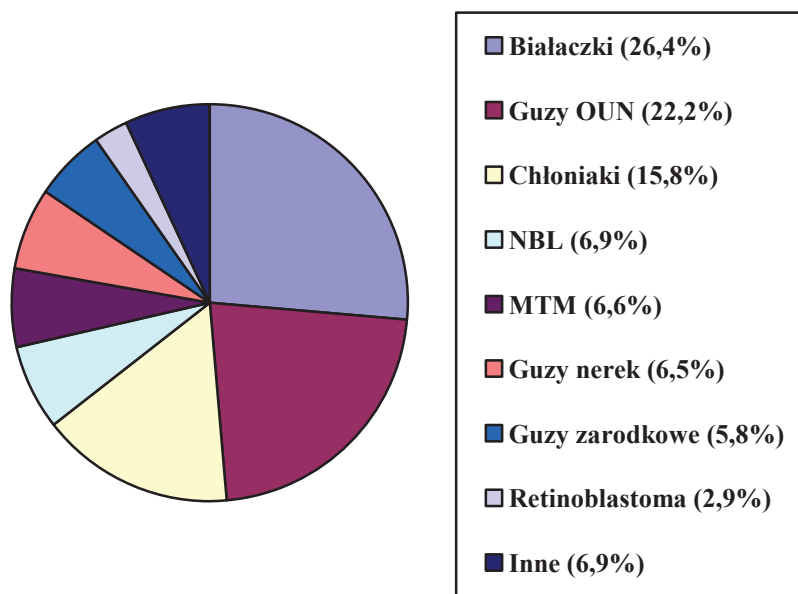
PD	<i>progressive disease</i> / progresja choroby
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> / płytkopochodny czynnik wzrostu
PE	<i>primary excision</i> / pierwotny zabieg operacyjny
PET	<i>positron emission tomography</i> / pozytonowa tomografia emisyjna
PHD	hydroksylaza prolinowa
PMR	płyn mózgowo-rdzeniowy
PNET	<i>primitive neuroectodermal tumor</i> / prymitywny guz neuroektodermalny
PPGLGL	Polska Pediatria Grupa ds. Leczenia Guzów Litych
PR	<i>partial response</i> / częściowa odpowiedź
pVHL	białko von Hippel-Lindau
Q	kwartyl
RAT	<i>retina anlage tumor</i> / barwnikowy guz neuroektodermalny wieku dziecięcego
RMA	<i>alveolar rhabdomyosarcoma</i> / mięsak prążkowanokomórkowy typ pęcherzykowy
RME	<i>embryonal rhabdomyosarcoma</i> / mięsak prążkowanokomórkowy typ zarodkowy
RMS	<i>rhabdomyosarcoma</i> / mięsak prążkowanokomórkowy
RT	radioterapia
SD	<i>stable disease</i> / choroba stabilna
SL	<i>second look surgery</i> / odroczone resekcja guza
SS	<i>synovial sarcoma</i> / mięsak maziówkowy
STS	<i>soft tissue sarcoma</i>
TAD	<i>transactivation domain</i> / domena transaktywacji
TMA	<i>tissue microarray</i> / mikromacierz tkankowa
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i> / czynnik martwicy nowotworów α
TNM	klasyfikacja <i>Tumor-Nodes-Metastases</i>
UDS	<i>undifferentiated sarcoma</i> / mięsak niezróżnicowany
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> / czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VEGFR	receptor VEGF
WS	<i>whole sections</i> / całe skrawki
X	wartość średnia

1 WSTĘP

1.1 Mięśniaki tkanek miękkich u dzieci

1.1.1 Epidemiologia

Mięśniaki tkanek miękkich (MTM) stanowią piątą co do częstości występowania grupę nowotworów złośliwych u dzieci – po białaczkach, guzach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), chłoniakach i zwojaku zarodkowym współczulnym (*neuroblastoma*, NBL) (ryc. 1). W populacji dziecięcej MTM stanowią ok. 7-8% wszystkich nowotworów złośliwych [139]. Szacuje się, iż wskaźnik zachorowalności na MTM wynosi 0,2-1,0/100 000 rocznie, niezależnie od płci [115]. Większość zachorowań dotyczy dzieci w wieku 2-6 lat oraz młodzieży powyżej 12. roku życia; mediana wieku w momencie rozpoznania MTM wynosi ok. 5 lat. Nieznacznie częściej chorują chłopcy (1,1 vs 1,0).



Ryc. 1. Częstość występowania poszczególnych typów nowotworów u dzieci

Fig. 1. The frequency of particular types of neoplasms in children

1.1.2 Podtypy histologiczne MTM u dzieci i ich charakterystyka kliniczna

Budowa histologiczna dziecięcych MTM jest bardzo zróżnicowana, co sprawia, że stanowią one heterogenną grupę guzów o odmiennej symptomatolo-

gii klinicznej, różnym przebiegu i rokowaniu. Mięśaki rozwijają się z embrionalnej tkanki mezenchymalnej i neuroektodermalnej, wykazującej cechy różnicowania w kierunku tkanki mięśniowej prążkowanokomórkowej, gładkokomórkowej, tkanki tłuszczowej, włóknistej, naczyniowej, maziówki, osłonek nerwów obwodowych i wielu innych.

Mięsaki tkanek miękkich dzieli się na trzy główne podgrupy kliniczno-patologiczne: mięsaki prążkowanokomórkowe (*rhabdomyosarcoma*, RMS), guzy *RMS-like* oraz mięsaki nieprążkowanokomórkowe (*non-rhabdomyosarcoma-like*, NRMS) [115].

U dzieci przeważają mięsaki typu RMS, stanowiąc prawie 70% wszystkich MTM. Cechuje je wysoka złośliwość i inwazyjność, skłonność do szybkiego wzrostu, tendencja do tworzenia wznów miejscowych, a także rozszewu do regionalnych węzłów chłonnych i narządów odległych. Wyróżnia się dwa główne podtypy RMS u dzieci: zarodkowy (*embryonal*, RME) oraz pęcherzykowy (*alveolar*, RMA). Podtypy te różnią się znacznie pod względem cech klinicznych i biologicznych, oraz wykazują odmienności genetyczne (tabela 1).

Zarodkowy podtyp RMS występuje częściej u dzieci młodszych, lokalizuje się głównie w obrębie układu moczowo-płciowego, oczodołu i nieokołoponowych struktur głowy i szyi. Zwykle dobrze reaguje na chemioterapię (CHT) i radioterapię (RT), dzięki czemu rokowanie w RME uważa się za korzystne. Z kolei podtyp RMA spotykany jest głównie u dzieci powyżej 10. roku życia, dotyczy przeważnie kończyn, krocza, tułowia, przestrzeni zaotrzewnowej i okołoponowej. Przebiega agresywnie, dając szybko przerzuty odległe drogą chłonną i krwionośną. Podtyp ten cechuje gorsza odpowiedź na CHT i RT, przez co rokowanie w RMA jest często niepomyślne [2].

Tabela 1. Podtypy mięsaków typu RMS u dzieci

Table 1. Subtypes of RMS STS in children

Podtypy mięsaków typu RMS <i>Subtypes of RMS STS</i>	
Korzystne rokowanie <i>Favorable prognosis</i>	Niekorzystne rokowanie <i>Unfavorable prognosis</i>
typ botryoidalny RME	typ pęcherzykowy łącznie z tzw. wariantem litym RMS (RMA)
typ kolczystokomórkowy RME	
tzw. klasyczny typ RME	

Mięsaki *RMS-like* to grupa guzów nie należących do RMS, jednak o podobnej do RMS biologii i zbliżonej wrażliwości na CHT i RT, co implikuje podobną

strategię postępowania. Jak pokazano w tabeli 2, do grupy guzów *RMS-like* należą: pozakostny mięsak Ewinga (*extraskkeletal Ewing sarcoma*, EES), mięsak maziówkowy (*synovial sarcoma*, SS) i prymitywny guz neuroektodermalny (*primitive neuroectodermal tumor*, PNET).

Tabela 2. Podtypy mięsaków typu *RMS-like* u dzieci

Table 2. Subtypes of *RMS-like sarcomas* in children

Mięsaki <i>RMS-like</i> <i>RMS-like sarcomas</i>
Grupa pozakostnego mięsaka Ewinga (<i>extraskkeletal Ewing sarcoma</i> , EES) <ul style="list-style-type: none"> • klasyczna postać mięsaka Ewinga • atypowa postać mięsaka Ewinga
• prymitywny guz neuroektodermalny (<i>primitive neuroectodermal tumor</i> , PNET)
Mięsak maziówkowy (<i>synovial sarcoma</i> , SS)
Mięsaki niezróżnicowane (<i>undifferentiated sarcomas</i> , UDS)
Mięsaki nie dające się sklasyfikować (<i>not otherwise specified sarcomas</i> , NOS)

Mięsaki typu NRMS to heterogenna grupa, do której należą guzy o różnorodnej histologii, przedstawione w tabeli 3. Poszczególne podtypy NRMS cechować może odmienna charakterystyka kliniczna, przebieg choroby, chemio-wrażliwość i rokowanie. Niektóre typy histologiczne mięsaków typu NRMS występują głównie u pacjentów dorosłych, a tylko wyjątkowo rzadko u dzieci. Według wielu badaczy, uzasadnia to objęcie ich nazwą „mięsaków typu dorosłego”. Inni autorzy podkreślają wyraźne różnice, jakie cechują guzy NRMS, które rozwijają się u niemowląt i dzieci poniżej 4. roku życia, w porównaniu do guzów stwierdzanych u dzieci starszych. Jednym z najczęściej spotykanych u dzieci podtypów NRMS jest złośliwy obwodowy guz z osłonek nerwowych (*malignant peripheral nerve sheath tumor*, MPNST). Jest to nowotwór o agresywnym przebiegu i trudnej do przewidzenia odpowiedzi na CHT. Połowa przypadków MPNST współistnieje z nerwiakowłókniakowatością typu 1 (*neurofibromatosis type I*, NF1) [213].

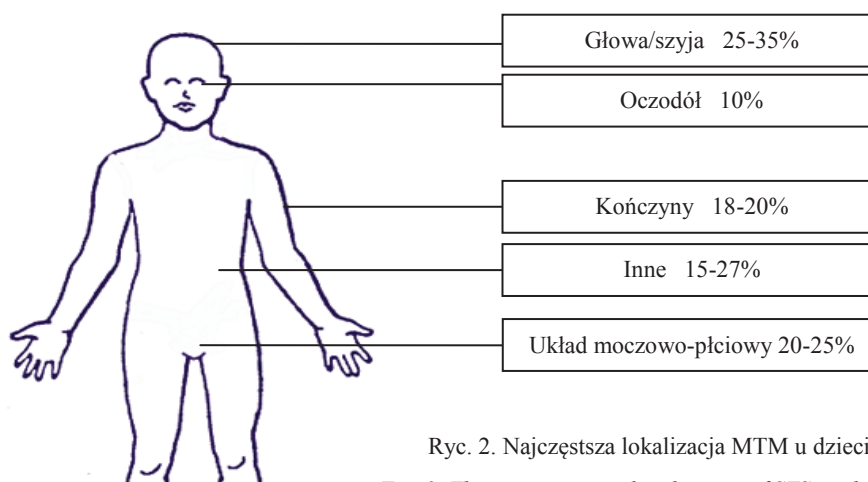
Tabela 3. Wybrane podtypy mięsaków tkanek miękkich typu NRMS u dzieci

Table 3. Selected subtypes of *NRMS STS* in children

Mięsaki typu NRMS <i>NRMS sarcomas</i>
Mięsaki nie dające się sklasyfikować (<i>not otherwise specified sarcomas</i> , NOS)
Mięsak jasnokomórkowy (<i>clear cell sarcoma</i> , CCS)
Chrzęstniakomięsak poza układem szkieletowym (<i>extraskkeletal chondrosarcoma</i> , ECS) <ul style="list-style-type: none"> • chrzęstniakomięsak śluzowaty (<i>myxoid chondrosarcoma</i>, MyxCS) • chrzęstniakomięsak mezenchymalny (<i>mesenchymal chondrosarcoma</i>, MesCS)
Włókniakomięsak (<i>fibrosarcoma</i> , FS) <ul style="list-style-type: none"> • wrodzona postać włókniakomięsaka (<i>congenital fibrosarcoma</i>, cFS)

Włókniakomięsak guzowaty skóry (<i>dermatofibrosarcoma protuberans</i> , DFSP)
Desmoplastyczny guz drobnookragłokomórkowy (<i>desmoplastic small round cell tumor</i> , DSRCT)
Mięsak epitelioidny (nabłonkopodobny) (<i>epithelioid sarcoma</i> , ES)
Zapalny guz miofibroblastyczny (<i>inflammatory myofibroblastic tumor</i> , IMFT) <ul style="list-style-type: none"> • zapalny mięsak miofibroblastyczny (<i>inflammatory myofibroblastic sarcoma</i>, IMFS)
Mięsak gładkokomórkowy (<i>leiomyosarcoma</i> , LMS)
Tłuszczakomięsak (<i>liposarcoma</i> , LPS)
Mięsak włóknistohistiocytny (<i>malignant fibrohistiocytoma</i> , MFH) <ul style="list-style-type: none"> • <i>angiomatoid fibrohistiocytoma</i> (AFH)
Mięsak mezenchymalny (<i>mesenchymoma malignum</i> , MMM)
Złośliwy guz rabdoidalny tkanek miękkich (pozanerkowy) (<i>malignant rhabdoid tumor</i> , MRT)
Złośliwy obwodowy guz z osłonek nerwowych (<i>malignant peripheral nerve sheath tumor</i> , MPNST); [synonimy: schwannoma malignum / neurofibrosarcoma (NFS)]
Barwnikowy guz neuroektodermalny wieku dziecięcego (<i>retina anlage tumor</i> , RAT)

Mięsaki tkanek miękkich mogą lokalizować się niemal wszędzie. Najczęściej spotykane umiejscowienia MTM u dzieci przedstawiono na ryc. 2. Rozwijają się najczęściej głęboko w obrębie masy mięśniowej, objawiając jako niebolesne uwypuklenie lub guz o pozornie wyraźnych granicach. Mają pseudorozprężający sposób wzrostu i rosną naciekająco wzdłuż przestrzeni i otworów naturalnych. Objawy kliniczne MTM u dzieci związane są zwykle z lokalizacją ogniska pierwotnego i/lub przerzutów odległych, dlatego są różnorodne i przypominają często objawy innych schorzeń o podobnym umiejscowieniu. Podstępny przebieg i niecharakterystyczne wstępne objawy MTM u dzieci stwarzają duże trudności diagnostyczne. Z tego powodu u większości pacjentów rozpoznanie stawiane jest późno, w zaawansowanych stadiach choroby. Aż u ok. 20% chorych w momencie diagnozy obecne są przerzuty odległe, najczęściej w obrębie płuc, kości, szpiku kostnego oraz OUN. Uogólnienie choroby w sposób znaczący pogarsza rokowanie [2, 115].



Ryc. 2. Najczęstsza lokalizacja MTM u dzieci

Fig. 2. The most common localisation of STS in children

1.1.3 Kliniczne czynniki prognostyczne w MTM u dzieci

W zdecydowanej większości ośrodków onkologii dziecięcej, zrzeszonych w ramach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych (PPGLGL), diagnostyka i leczenie MTM u dzieci prowadzone są wg międzynarodowego protokołu *Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe* (CWS). Dzięki wciąż udoskonalanym metodom terapeutycznym (chirurgii, CHT i RT), na przestrzeni kilku ostatnich dekad wyniki leczenia MTM u dzieci uległy znaczącej poprawie. Wg *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS) – IV prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia całkowitego (*overall survival*, OS) dla całej grupy MTM wzrosło z 25% w roku 1970 do 73% w roku 2001 [117]. Dla lokalnych stadiów zaawansowania 5-letnie OS przekracza obecnie 90%, natomiast nadal pozostaje niezadowolające w stadiach zaawansowanych, a zwłaszcza rozsianych (10-20%) [115].

Kolejne protokoły CWS (CWS-91, -96, -2002, -2006, -2007 oraz CWS-*Guidance*) zakładają coraz bardziej precyzyjne dostosowanie terapii do stopnia zaawansowania i agresywności nowotworu u danego pacjenta. O kwalifikacji do poszczególnych grup ryzyka decyduje typ i podtyp histologiczny mięsaka oraz liczne czynniki kliniczne, takie jak: wiek dziecka w momencie rozpoznania, lokalizacja guza pierwotnego, stadium zaawansowania choroby zgodnie z klasyfikacją *Tumor-Nodes-Metastases* (TNM) oraz ocena pooperacyjna wg klasyfikacji IRS. Według TNM szczegółowo oceniane są: wyjściowa wielkość i inwazyjność guza pierwotnego (cecha T), ewentualne zajęcie regionalnych węzłów chłonnych (cecha N) oraz obecność przerzutów odległych (cecha M). Klasyfikacja IRS obejmuje ocenę stadium zaawansowania choroby po przeprowadzonym pierwotnym zabiegu operacyjnym (*primary excision*, PE), uwzględnia więc bardzo ważny czynnik prognostyczny, jakim jest doszczętność PE. Szczegółowe zasady klasyfikacji pacjentów wg klasyfikacji TNM i IRS zamieszczono w załącznikach 1 i 2. W przypadku mięsaków nieoperacyjnych w momencie postawienia rozpoznania, ważnym czynnikiem prognostycznym jest odpowiedź na neo-adjuwantową CHT, której oceny dokonuje się po trzech pierwszych jej kursach (między 9 a 12 tygodniem terapii). Kryteria odpowiedzi całkowitej (*complete response*, CR), dobrej częściowej (*good partial response*, GPR), częściowej (*partial response*, PR), choroby stabilnej (*stable disease*, SD) i progresji choroby (*progressive disease*, PD) przedstawiono szczegółowo w rozdziale 3. „Materiał i metody”. Uzyskana dobra odpowiedź na CHT umożliwia w wielu przypadkach przeprowadzenie odroczonej doszczętniej resekcji guza (*second look surgery*, SL), co w sposób istotny poprawia rokowanie. Dobra reakcja na wstępną CHT identyfikuje również chorych, którzy nie wymagają stosowania bardziej intensywnej CHT w dalszym leczeniu [50].

Obecnie stosowany system patologiczno-klinicznej kwalifikacji chorych z RMS oraz NRMS do poszczególnych grup ryzyka przedstawiono w załączniku 3. Z praktyki onkologicznej wiadomo, że nie zawsze analiza wymienionych

czynników rokowniczych jest wystarczająca dla prognozowania przebiegu i wyniku leczenia MTM u dzieci. Mimo agresywnej wielomodalnej terapii, nadal istnieją chorzy, u których dochodzi do nawrotu lub progresji nowotworu – a co za tym idzie – zgonu chorego dziecka.

Badania genetyczne, ukierunkowane na wykrycie translokacji typowych dla poszczególnych rodzajów MTM, odgrywają istotną rolę w diagnostyce mięsaków [170]. Nie są to jednak badania wykonywane rutynowo, a jedynie w przypadkach trudnych i niejednoznacznych. Również prognostyczne znaczenie wykrytych translokacji i innych aberracji chromosomowych nie zostało jednoznacznie ustalone. Tym samym w obowiązujących obecnie wytycznych, kwalifikacja dzieci z MTM do poszczególnych grup ryzyka, nie opiera się na wynikach badań genetycznych.

W MTM u dzieci nie znaleziono również „idealnych” prognostycznych biomarkerów, wykrywanych w płynach ustrojowych. W przeciwieństwie bowiem do kilku innych nowotworów dziecięcych, MTM nie wydzielają swoistych biomarkerów, możliwych do oznaczania w surowicy, moczu lub płynie mózgoworodzeniowym (PMR), które korelowałyby z zaawansowaniem i aktywnością proliferacyjną nowotworu. Podjęte dotąd prace badawcze nad znaczeniem rokowniczym różnych markerów obecnych w surowicy pacjentów z MTM poszerzyły wiedzę na temat biologii tego nowotworu, jednak analizowane biomarkery nie zyskały statusu czynników przydatnych w praktyce klinicznej [15, 16].

Dlatego nie ustają próby poznania nowych czynników rokowniczych, lepiej odzwierciedlających biologiczną aktywność MTM u dzieci, które pozwoliłyby na bardziej precyzyjne dopasowanie strategii leczenia do poszczególnych chorych. W ostatnich latach zainteresowania naukowców skierowały się ku procesowi hipoksji w guzach nowotworowych, jego znaczeniu w promowaniu proliferacji komórek nowotworowych, związku z procesem nowotworzenia naczyń (angiogenezy), przerzutowania i oporności na CHT i RT [89]. Markery hipoksji stały się obiecującym obszarem badań, zarówno w aspekcie diagnostycznym i prognostycznym, jak i terapeutycznym – jako potencjalne punkty uchwytu terapii celowanych [53, 171, 178]. Bardzo liczne badania nad ich znaczeniem dotyczą jednak przede wszystkim dorosłych chorych z różnymi typami nowotworów złośliwych [19, 122, 161, 182, 194, 222, 224, 248]. Stopień ekspresji i potencjalne znaczenie prognostyczne markerów hipoksji w MTM u dzieci nie były dotąd przedmiotem opublikowanych badań naukowych.

1.2 Hipoksja

1.2.1 Rodzaje i przyczyny hipoksji

W toku ewolucji organizmy wielokomórkowe uzależniły się od tlenu (O_2) i ich prawidłowe funkcjonowanie zależne jest od jego niezaburzonej dostawy i właściwego stężenia. W warunkach fizjologicznych ciśnienie parcjalne O_2 w

poszczególnych rodzajach komórek organizmu jest różne. W komórkach górnej części układu oddechowego wynosi ono 110-150 mmHg (co odpowiada stężeniu O_2 15-20%), zaś w komórkach siatkówki czy nerki – 5 mmHg (stężenie O_2 1%) [36, 149, 203].

Stan kliniczny, w którym dochodzi do zmniejszenia ciśnienia parcjalnego O_2 na poziomie tkankowym nazywany jest hipoksją. Dla większości komórek za hipoksję uznawany jest spadek stężenia O_2 poniżej 2%, przy czym wartości 1,2% uważa się za stan umiarkowanej hipoksji, zaś stężenie poniżej 0,2% to stan hipoksji głębokiej i anoksji [149].

W zależności od mechanizmu powstawania wyróżnia się sześć rodzajów hipoksji:

- Hipoksja hipoksyczna – powstaje w wyniku zmniejszonej dyfuzji O_2 związanej z niskim ciśnieniem parcjalnym O_2 w powietrzu atmosferycznym, chorobami serca i płuc oraz obturacją lub niedrożnością dróg oddechowych.
- Hipoksja histotoksyczna – powstaje w mechanizmie blokady enzymów, biorących udział w procesach wykorzystujących O_2 na poziomie komórkowym. Najczęstszą przyczyną są zatrucia (np. tlenkiem węgla i cyjankiem potasu), prowadzące do nieodwracalnego zahamowania funkcji oksydazy cytochromowej, która jest podstawowym enzymem łańcucha oddechowego.
- Hipoksja krążeniowa (zastoinowa) – powstaje w wyniku spowolnionego przepływu krwi przez tkanki i narządy np. w niewydolności mięśnia sercowego, wstrząsie, zakażeniu.
- Hipoksja wysokościowa – powstaje podczas pobytu na dużych wysokościach nad poziomem morza.
- Hipoksja anemiczna – do niedotlenienia tkanek dochodzi w wyniku krwawienia i zmniejszenia zawartości hemoglobiny w krwinkach czerwonych, dysfunkcji w magazynowaniu O_2 w erytrocytach lub na skutek zmniejszonej objętości tkankowej krwi.
- Hipoksja metaboliczna – powstaje w wyniku zwiększonego zapotrzebowania na O_2 w przebiegu różnych zaburzeń metabolicznych, występujących np. w posocznicy.

Hipoksja może być stanem fizjologicznym, bądź patologicznym, występującym czasowo (hipoksja ostra) lub przewlekłe (hipoksja chroniczna). Hipoksja może być ograniczona do danej tkanki lub narządu, albo może obejmować cały organizm. Hipoksja chroniczna może występować w postaci ciągłej, w której niedotlenienie występuje stale w jednostce czasu (np. w przebiegu niedokrwistości) lub w postaci przerywanej, gdy u chorego w pewnym okresie czasu występują powtarzające się epizody niedotlenienia przerywane epizodami prawidłowego utlenowania komórek (np. zespół bezdechu sennego) [174].

Niezależnie od przyczyny i postaci, tkankowy niedobór O_2 stanowi jeden z najgroźniejszych czynników, zaburzających funkcje komórek. Aby przeżyć, muszą one dostosować się do nowych warunków, przestawiając się na metabo-

lizm beztlenowy i uruchamiając liczne mechanizmy i procesy przeciwdziałające hipoksji, albo przywrócić odpowiednie utlenowanie tkanek. Badania ostatnich lat wykazują, że hipoksja stanowi powszechne zjawisko warunkujące wzrost nowotworu w organizmie [89].

1.2.2 Hipoksja w tkance nowotworowej

Hipoksja stanowi jedną z cech charakterystycznych niemal wszystkich nowotworów litych, przy czym wielkość regionów hipoksji i frakcja niedotlenionych komórek może różnić się znacząco nawet w guzach o tym samym typie histologicznym. Hipoksja wewnątrz guza nowotworowego wywołana jest głównie przez niedostateczny dowóz O_2 i substancji odżywczych przez nieprawidłowe naczynia krwionośne powstałe na drodze neoangiogenezy w szybko proliferującej tkance. Dodatkowo, w tkance nowotworowej wzrasta aktywność metaboliczna, zwiększa się zużycie O_2 przez szybko dzielące się komórki, a w otaczającym komórki nowotworowe środowisku spada pH [167]. W efekcie wszystkie te procesy prowadzą do niskiego stężenia O_2 wewnątrz guza i niedotlenienia komórek. Pomiar utlenowania przy użyciu mikroelektrod wykazały, że ciśnienie parcjalne O_2 w prawidłowej tkance waha się od 40 do 50 mmHg, zaś w tkance nowotworowej – od 5 do 10 mmHg, zwykle poniżej 7 mmHg [73].

Prace nad niedotlenianiem tkanek prowadzone były od początku XX wieku. Schwarz [196] jako pierwszy zauważył, iż prawidłowo utlenowane komórki skóry są bardziej wrażliwe na promieniowanie, w porównaniu do komórek hipoksycznych. Kolejne ważne prace opublikowali w 1955 roku Thomlinson i Gray, udowadniając w badaniach na komórkach raka płuca, iż hipoksja jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych i przyczynia się do powstawania oporności na promieniowanie [225]. Wprawdzie stworzony przez nich model, tłumaczący rozwój i lokalizację regionów hipoksji w guzie nowotworowym, okazał się później nieprawidłowy, ale w swoich doświadczeniach Thomlinson i Gray dowiedli ważnego faktu, że komórki częściowo niedotlenowane (hipoksyczne), obecne w strefie przejściowej pomiędzy komórkami martwiczymi, a komórkami w pełni zaopatrzonymi w O_2 , były zdolne do życia [225].

W roku 1968 brytyjski naukowiec Tannock, na podstawie przeprowadzonych badań, przedstawił model powstawania hipoksji, akceptowany i aktualny do dnia dzisiejszego. Wg Tannocka w tkance nowotworowej istnieją prawidłowo utlenowane (normoksyczne) komórki zlokalizowane wokół naczynia krwionośnego, zaopatrującego je w O_2 i środki odżywcze. Następnie, w odległości 100-180 μm od naczynia znajduje się strefa komórek hipoksycznych, a jeszcze dalej – w odległości $>180 \mu\text{m}$ od naczynia krwionośnego panuje strefa anoksji, czyli obszar martwicy [223].

W latach 70. XX wieku w tkance nowotworowej wyróżniono hipoksję chroniczną oraz ostrą przejściową. Znaczna odległość komórki nowotworowej od naczynia krwionośnego, uniemożliwiająca pozyskiwanie O_2 i środków odżyw-

czych, prowadzi do hipoksji chronicznej. Natomiast hipoksja ostra przejściowa powstaje w wyniku zaburzonej perfuzji krwi niezależnie od odległości od naczynia krwionośnego w guzie. Wynika to z nieprawidłowej budowy sieci naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu, powstających na drodze angiogenezy. Efektem jest niedotlenienie nawet tych komórek, które znajdują się w pobliżu naczyń nowotworowych [29].

1.2.3 Metody oceny hipoksji w nowotworach

Opracowano szereg metod diagnostycznych, dzięki którym możliwe jest zidentyfikowanie regionów, a nawet komórek hipoksycznych, w ludzkich nowotworach. Metody te można podzielić na bezpośrednie i pośrednie, inwazyjne i nieinwazyjne [73].

Do metod bezpośrednich należą metody z użyciem mikroelektrod, metody wykorzystujące zjawisko wygaszania fluorescencji przez tlen oraz obrazowanie obszarów hipoksji w badaniach radiologicznych.

- Mikroelektroda Eppendorfa jest urządzeniem stosowanym w praktyce klinicznej od ponad 30. lat. Umożliwia ona pomiar stężenia O_2 w objętości guza, a nie w poszczególnych komórkach, dostarcza zatem informacji o średnim stężeniu O_2 w guzie nowotworowym [24]. Wprowadzenie mikroelektrody do guza jest zabiegiem inwazyjnym i możliwym tylko w przypadku guzów łatwo dostępnych [239].
- Zjawisko wygaszania fluorescencji przez O_2 jest nowoczesną metodą pomiaru stężenia O_2 , wykorzystującą umieszczone w sondzie fluoryzujące kompleksy rutenu. Podobnie, jak mikroelektroda Eppendorfa, wprowadzenie sondy jest procedurą inwazyjną, możliwą do zastosowania jedynie w guzach położonych powierzchownie. Konieczna jest również korekcja temperatury pomiaru, a najważniejszym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości scharakteryzowania natężenia hipoksji.
- Obrazowanie obszarów hipoksji związane jest z szybko rozwijającą się dziedziną radiologii i wykorzystuje najnowsze metody obrazowania tkanek i narządów w organizmie chorego. Do najbardziej obiecujących metod obecnie zalicza się:
 - pozytonową tomografię emisyjną (*positron emission tomography*, PET);
 - spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance*, NMR);
 - oraz spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electron paramagnetic resonance*, EPR).

Badaniem stosowanym coraz częściej do oceny obszarów hipoksji jest badanie PET. Dzięki zastosowaniu specyficznych dla obszarów hipoksji radioizotopów (fluorowanych pochodnych nitroimidazolu), PET pozwala oceniać *in vivo* procesy biochemiczne, nie zmieniając ich przebiegu. Ocena obszarów hipoksji jest bardzo precyzyjna [65], a charakterystykę niedotlenienia tkanki nowotworowej

można przedstawić w obrazie trójwymiarowym. Niestety badanie PET pozwala na ocenę obszarów hipoksji położonych powierzchownie (na głębokości 5-8 mm badanej tkanki) [31], a koszty badania są wysokie.

Pośrednie metody oceny hipoksji obejmują obrazowanie utlenowania hemoglobiny oraz immunohistochemiczne (IHC) wykrywanie egzo- i endogennych markerów hipoksji.

Obrazowanie utlenowania hemoglobiny wykorzystuje obrazowanie rezonansem magnetycznym zależnym od poziomu utlenowania krwi (*blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging*, BOLD-MRI) lub spektroskopię w podczerwieni (*near infrared spectroscopy*, NIR).

Najczęściej stosowanymi egzogennymi markerami hipoksji są pimonidazol, NITP (2-nitroimidazol związany z teofiliną) oraz EF5 (fluoropochodna etanidazolu). Ich zastosowanie w celu oceny stężenia O₂ jest metodą inwazyjną, gdyż są to substancje podawane dożylnie. W przypadku obniżonego ciśnienia parcjalnego O₂ dochodzi do ich degradacji jedynie w komórkach niedotlenionych, co wykrywane jest metodami IHC [67].

Najczęściej stosowaną w praktyce klinicznej metodą oceniającą komórki hipoksyjne jest oznaczanie endogennych markerów hipoksji w tkance guza metodami IHC. Są one proste w wykonaniu, nie wymagają dożylnego podania środków kontrastowych, ani radioizotopów, i mogłyby być rutynowo stosowane w trakcie histopatologicznej oceny tkanki nowotworowej pobranej przed leczeniem. Dokładna ocena IHC endogennych markerów hipoksji umożliwi zobrazowanie przestrzenne niedotlenionych komórek. Jediną trudnością jest właściwa interpretacja barwień przez doświadczonego patomorfologa.

Do endogennych markerów hipoksji zaliczamy:

- czynnik indukowany przez hipoksję 1 (*hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1);
- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*, VEGF);
- anhidrazę węglanową IX (*carbonic anhydrase IX*, CA IX);
- czynnik transportujący glukozę 1 (*glucose transporter 1*, GLUT-1).

1.3 Czynniki indukowane przez hipoksję 1

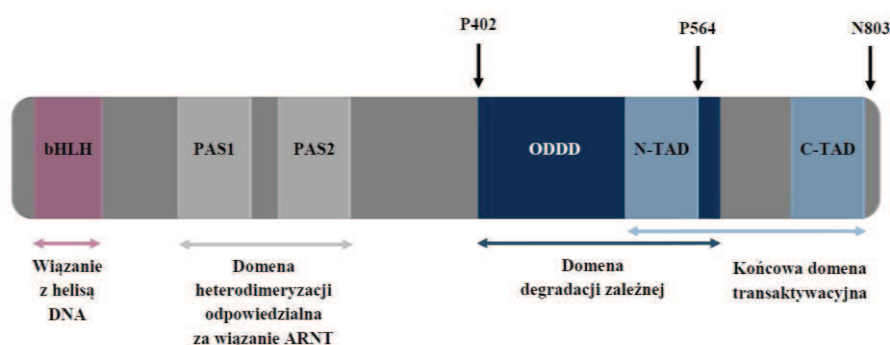
Przełomem badań nad hipoksją było wykrycie czynnika, odpowiedzialnego za utrzymywanie homeostazy tlenowej w komórce poprzez udział w adaptacji do zredukowanego poziomu O₂ [104]. Jest nim HIF-1, wykryty w roku 1992 dzięki badaniom Semenzy i Wanga nad elementem odpowiedzi na hipoksję (*hypoxia responsive element*, HRE) w genie erytropoetyny (EPO) [204]. Obecnie wiadomo, iż w warunkach hipoksji dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności HIF-1. Powoduje to z kolei aktywację licznych genów, regulowanych przez HIF-1, odpowiedzialnych za fizjologiczną reakcję komórki na niedotlenienie [237]. W efekcie uruchomione zostają procesy przeciwdziałające skutkom niedoboru O₂, aktywne zarówno w stanach fizjologicznych, jak i chorobowych, w

tym – w nowotworach. Obecnie HIF-1 uważany jest za najważniejszy czynnik regulujący odpowiedź komórki nowotworowej na zmniejszony dostęp O_2 , kontrolujący procesy i mechanizmy adaptacji do hipoksji oraz promujący jej prze-trwanie, a nawet progresję [237].

1.3.1 Budowa HIF-1. Aktywacja HIF-1 α

HIF-1 jest heterodimerem, złożonym z trzech podjednostek alfa (HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α) oraz podjednostki beta (HIF-1 β), nazywanej wcześniej ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*) [201, 230]. Ekspresję HIF-1 α wykaza-no we wszystkich ludzkich tkankach, podczas gdy HIF-2 α występuje głównie w komórkach śródbłonna, komórkach wydzielających katecholaminy, komórkach płuc, serca i makrofagach obecnych w obrębie nowotworu [222]. HIF-3 α jest najmniej poznaną podjednostką, obecną w komórkach grasicy, płuc, mózgu, serca i nerki [84]. Jej rola nie jest jasna, potwierdzono, iż jeden z wariantów splicingowych HIF-3 negatywnie reguluje ekspresję HIF-1 i HIF-2.

Strukturę HIF-1 tworzą dwie główne podjednostki peptydowe: HIF-1 α (o masie 120 kDa) i HIF-1 β (o masie 91, 93 lub 94 kDa). Obie podjednostki zbudowane są z domeny typu helisa-pętla-helisa (*basic helix-loop-helix*, bHLH) oraz domeny PAS (PER-ARNT-SIM) [230]. Zarówno domena bHLH, jak i PAS, biorą udział w procesie dimeryzacji i wiązaniu HIF-1 z kwasem deoksyry-bonukleinowym (*deoxyribonucleic acid*, DNA). Obie podjednostki HIF-1, oprócz domen bHLH i PAS, posiadają domeny transaktywacji (*transactivation domains*, TAD), przy czym HIF-1 α posiada dwie domeny TAD (N-TAD oraz C-TAD), a HIF-1 β – jedną domenę TAD [187]. Budowę HIF-1 α przedstawiono na ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat budowy podjednostki HIF-1 α

Fig. 3. The scheme of the HIF-1 α subunit construction

Zasadniczą rolę w regulacji stabilności HIF-1 α odgrywa domena ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*), która w pozycji 402 oraz 564 zawiera reszty prolinowe. Jej ubikwitynacja w warunkach tlenowych kieruje HIF-1 α na drogę degradacji w proteasomie [96].

Podjednostka HIF-1 β ulega stałej ekspresji w komórce, niezależnie od stężenia O₂, natomiast aktywność HIF-1 α regulowana jest przez dostęp do O₂ [92, 96]. W warunkach prawidłowego utlenowania tkanek poziom HIF-1 α jest praktycznie niewykrywalny wskutek jego bardzo szybkiej ubikwitynozależnej degradacji w proteasomach. Jest to proces regulowany przez białko supresorowe von Hippel-Lindau (pVHL) [106]. Reszty prolinowe 402 i 564 w domenie ODDD podjednostki HIF-1 α , dzięki hydroksylazom prolinowym 1-3 (PHD 1-3), w obecności koaktywatorów (jonów żelaza i 2-oksylglutaranu) ulegają trans-4-hydroksylacji, co umożliwia połączenie podjednostki HIF-1 α z pVHL [164, 195]. Powstały kompleks jest rozpoznawany przez ligazę ubikwitynową E3, co jest sygnałem do rozpoczęcia degradacji podjednostki HIF-1 α w proteasomach [104; 106]. Natężenie procesu hydroksylacji reszt prolinowych domeny ODDD i uruchomienie procesu degradacji HIF-1 α jest ściśle zależne od stężenia O₂ w komórce [118, 184].

Drugim procesem wpływającym na aktywność podjednostki HIF-1 α jest hydroksylacja reszty asparaginylowej (Asn803) w domenie C-TAD. Za hydroksylację odpowiada czynnik hamujący HIF-1 (*factor inhibiting HIF-1*, FIH), który jest aktywny w warunkach normoksji [147]. Po hydroksylacji niemożliwe jest połączenie transaktywacyjnego koaktywatora CBP/p300 z domeną C-TAD [134], co prowadzi do niestabilności podjednostki HIF-1 α i jej degradacji [118, 184].

Aktywacja HIF-1 wymaga najpierw stabilizacji HIF-1 α , poprzez zahamowanie jego proteolizy. W warunkach obniżonego stężenia O₂ w komórce dochodzi do zmniejszenia aktywności enzymów PHDs oraz unieczynnienia czynnika FIH, co prowadzi do stabilizacji podjednostki HIF-1 α i jej kumulacji. W komórce nowotworowej opisano również inne mechanizmy, prowadzące do zwiększenia stężenia HIF-1 α . Jednym z nich jest zahamowanie degradacji tej podjednostki w przypadku utraty lub mutacji genu supresorowego *TP53*. W warunkach normoksji poziom HIF-1 α wzrastać może także pod wpływem wielu czynników i cytokin, takich jak: insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 i 2 (*insulin-like growth factor*, IGF-1, IGF-2), naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF), czynnik wzrostu fibroblastów 2 (*fibroblast growth factor* 2, FGF 2), czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor* α , TNF α) i płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor*, PDGF). Prawdopodobnie białka te stabilizują poziom HIF-1 α przez aktywację kinaz na drodze wiązania specyficznych receptorów. Ważnym czynnikiem stabilizującym HIF-1 α , zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, jest białko szoku ciepł-

nego (*heat shock protein*, Hsp90). Inhibitor tego białka, geldanamycyna (GA), hamuje stabilizujące działanie Hsp90 i sprzyja degradacji HIF-1 α w proteasomie, niezależnej od pVHL [100].

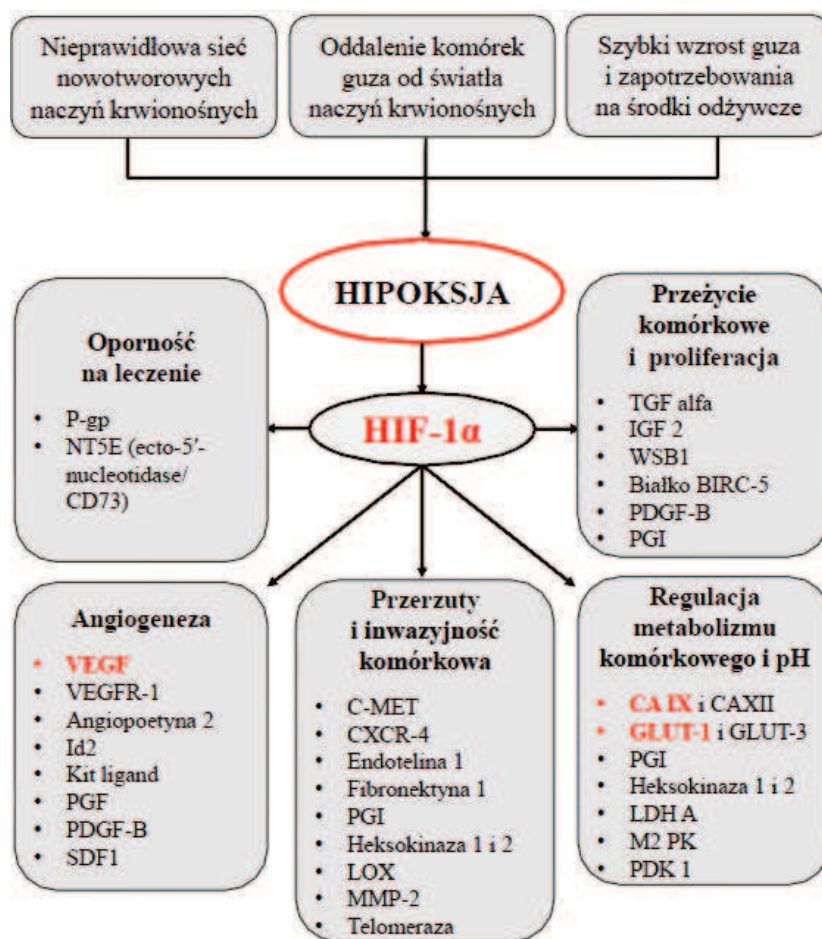
Po stabilizacji podjednostki HIF-1 α jej ilość gwałtownie wzrasta i białko ulega translokacji do jądra komórkowego. Tam dochodzi do połączenia HIF-1 α z podjednostką HIF-1 β , na skutek czego powstaje czynnik transkrypcyjny HIF-1. Powstały aktywny kompleks łączy się z charakterystyczną sekwencją HRE 5'-A/GCGTG-3' w genach docelowych HIF-1 [14, 39, 200]. W efekcie w ekspresji tych genów zachodzą zmiany, które uruchamiają procesy przeciwdziałające niekorzystnym efektom hipoksji i zapewniające przetrwanie niedotlenionych komórek. Wykazano, że większość typów nowotworów złośliwych wykazuje silną ekspresję HIF-1 α , co sugeruje istotną rolę tego markera w powstawaniu i progresji guzów. Silna tkankowa ekspresja HIF-1 α u chorych z rakiem piersi, jajnika, szyjki macicy, przełyku, gardła, płuc oraz u pacjentów z guzami mózgu i MTM, wiązała się z wysoce agresywnym przebiegiem choroby, złą odpowiedzią na leczenie i niekorzystnym rokowaniem [202]. Szczególnie wysoką śmiertelność stwierdzono u pacjentek z rakiem jajnika, u których jednocześnie wykryto mutację genu *TP53* i silną ekspresję HIF-1 α [19]. U chorych z rakiem żołądka i piersi potwierdzono związek, pomiędzy silną ekspresją HIF-1 α , a dużą masą guza nowotworowego, zajęciem węzłów chłonnych i obecnością przerzutów odległych w momencie diagnozy [41, 231]. Silna i rozlana tkankowa ekspresja HIF-1 α może pomóc identyfikować podgrupy chorych o szczególnie złym rokowaniu, nawet pomimo braku innych niekorzystnych czynników prognostycznych, np. wobec niskiego stadium zaawansowania choroby (u chorych z rakiem szyjki macicy), braku zajęcia węzłów chłonnych (w raku piersi) oraz niskiego stopnia histologicznej złośliwości guza (u pacjentów ze skąpodrzewiakiem) [18, 20, 22]. Podkreśla to istotną rolę procesu hipoksji i adaptacji do hipoksji w rozwoju nowotworu i jego biologicznej agresywności.

1.4 Adaptacja komórek nowotworowych do hipoksji

Obecnie uważa się, że HIF-1 α stanowi główny czynnik transkrypcyjny kaskady hipoksji, regulujący ekspresję ponad 100 genów, których produkty białkowe biorą udział w utrzymaniu homeostazy środowiska tlenowego i sprzyjają przystosowaniu komórek do niedotlenienia [141, 154, 237]. Uruchamiane procesy adaptacyjne mogą mieć zasięg ogólnoustrojowy (jak np. zwiększenie erytropoezy, częstości oddechów i wydolności pracy serca), lokalny (stymulacja angiogenezy) lub komórkowy (aktywacja procesów metabolicznych i energetycznych komórki, promowanie jej przeżycia, a nawet proliferacji).

Aktywacja HIF-1 α w obrębie tkanki nowotworowej w wyniku panującej tam hipoksji uruchamia szereg procesów „korzystnych” dla nowotworu, umożliwiających komórkom guza przetrwanie. Do procesów tych należą: neoangio-

geneza, uruchomienie beztlenowych przemian metabolicznych i utrzymanie wewnątrzkomórkowego pH [154]. Ważnym odkryciem było powiązanie aktywacji HIF-1 α z hamowaniem apoptozy komórek nowotworu i aktywacją procesów oporności wielolekowej oraz proliferacji, inwazyjności i przerzutowania nowotworu.



Ryc. 4. Znaczenie HIF-1 α w regulacji procesów adaptacji do niedotlenienia w chorobie nowotworowej

Fig. 4. The role of HIF-1 α in the regulation of the adaptation to hypoxia in cancer

Na ryc. 4 przedstawiłam schemat regulowanych przez HIF-1 α procesów adaptacji do niedotlenienia w chorobie nowotworowej. Wyróżnione w nim zostały czynniki, uważane obecnie za najważniejsze wewnątrzkomórkowe markery

hipoksji. Jak już wspomniałam, należą do nich: HIF-1 α , VEGF, odpowiedzialny za indukcję procesu neoangiogenezy, CA IX, regulująca pH komórki i GLUT-1, odpowiadający za zmianę metabolizmu komórki na beztlenowy [171, 222].

1.5 Hipoksja a angiogeneza w nowotworze

W tkance nowotworowej procesy hipoksji i angiogenezy są nierozdzielnie powiązane i wzajemnie się nasilają. Szybko mnożące się komórki guza mają duże wymagania co do zaopatrzenia w O₂ i środki odżywcze. Łatwo więc ulegają hipoksji, przez co dochodzi w nich do stałej ekspresji HIF-1 α . Czynniki te przyczynia się do indukcji procesu neoangiogenezy, która ma na celu zapewnić dostawę O₂ i składników odżywczych dla przetrwania niedotlenienia. Jednak powstająca sieć naczyń nowotworowych nie jest prawidłowa, może więc pogłębiać stan hipoksji, co nakręca błędne koło i prowadzi do aktywacji kolejnych procesów sprzyjających przeżyciu komórek nowotworowych. W efekcie przeżywają komórki najlepiej zaadaptowane, czyli najbardziej złośliwe [128].

Zgodnie z obowiązującą obecnie definicją, angiogeneza (neowaskularyzacja) to wieloetapowy proces powstawania nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących i prekursorów komórek endotelialnych (śródbłonkowych). Proces wytwarzania nowych naczyń w środowisku guza nowotworowego nazywany jest również neoangiogenezą. Jest on niezbędny dla dalszego rozwoju nowotworu po osiągnięciu przez guz średnicy 2 mm [149].

Czynniki regulujące neoangiogenezę pochodzą zarówno z komórek nowotworowych, jak i komórek prawidłowych. Wzmożona synteza i aktywacja czynników proangiogennych zachodzi w tkance nowotworowej poprzez HIF-1 α -zależną indukcję transkrypcji genów kodujących te czynniki. Do najważniejszych czynników proangiogennych należą: VEGF, białko bogate w cysteinę (*cysteine rich protein-61*, Cyr61) [132], angiopoetyna 1 (*angiopoietin 1*, ANG 1) i wiele innych. Spośród nich najlepiej poznanym czynnikiem regulującym powstawanie nowych naczyń w guzie jest VEGF [71].

1.5.1 VEGF – marker angiogenezy aktywowany przez HIF-1 α

Rodzina białek VEGF obejmuje pięć czynników wzrostu: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz łożyskowy czynnik wzrostu (*placenta growth factor*, PlGF) [57]. Spośród nich VEGF-A odgrywa kluczową rolę w angiogenezie, łącząc się i aktywując receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 [57]. Na skutek alternatywnego splicingu powstaje co najmniej 9 izoform VEGF-A, z których izoforma VEGF-A165 jest najczęstsza i najbardziej aktywna biologicznie. Jej nadekspresję stwierdza się w wielu nowotworach złośliwych u ludzi [58].

VEGF-A pierwotnie został odkryty i opisany jako tzw. czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (*vascular permeability factor*, VPF) wydzielany przez komórki nowotworowe [205]. Poprzednia nazwa opisuje jedną z ważnych funkcji VEGF, czyli zwiększanie przepuszczalności naczyń. W efekcie dochodzi

do obrzęku tkanki guza i wzrostu ciśnienia śródtkankowego w nowotworze [57, 105]. Obrzęk ten z jednej strony nasila hipoksję, z drugiej zaś zmniejsza dopływ i przenikanie chemioterapeutyków do komórek nowotworowych [220].

Na skutek aktywacji ścieżki VEGF-A/VEGFR-2 dochodzi do zwiększonej ekspresji wielu białek, takich jak: białka układu fibrylizy, metaloproteinazy (*metalloproteinases*, MMP), GLUT-1, syntaza tlenku azotu (*nitric oxide synthase*, NOS), integryny oraz mitogeny. Białka te uczestniczą w procesie degradacji błony podstawnej i składników macierzy międzykomórkowej, co jest niezbędne do odłączenia się komórek śródbłonna od pericytów i błony podstawnej oraz ich migracji w kierunku stymulatorów angiogenezy [44, 69].

VEGF zwiększa przeżywalność komórek śródbłonna poprzez aktywację antyapoptotycznego szlaku sygnałowego PI3K-Akt i białka Bcl-2 [77, 78]. W rezultacie dochodzi do ich proliferacji i formowania światła i pętli nowych naczyń, które zaopatrują rosnący guz w O₂ i składniki odżywcze, niezbędne do ciągłego wzrostu i ekspansji [88]. Powstaje również błona podstawna i następuje rekrutacja pericytów. Dzięki złożonym procesom krzepnięcia i fibrylizy następuje przebudowa nowo powstałych sznurów naczyńniowych z wytworzeniem światła. Poszczególne kapilary łączą się tworząc liczne anastomozy. Jednak powstające w guzie nowotworowym naczynia krwionośne zdecydowanie różnią się od naczyń prawidłowych. Są nieregularne, niedojrzałe, kręte i chaotycznie ułożone. Wykazują niepełne zróżnicowanie tętniczo-żylnie, a ich ściana jest cienka i pozbawiona mięśni gładkich [149]. Przepływ krwi w naczyniach jest turbulentny, często zwolniony, co powoduje wykrzepianie. Wykazano również, że angiogeneza nowotworowa sprzyja przedostawaniu się komórek nowotworowych do krwiobiegu, co w konsekwencji może doprowadzić do tworzenia przerzutów. Dodatkowo VEGF hamuje przekształcanie się makrofagów w komórki dendrytyczne, co uniemożliwia prezentowanie antygenów specyficznych dla guza nowotworowego i obniża odpowiedź układu immunologicznego [51].

Nie dziwi więc fakt, że zaobserwowano związek, pomiędzy silną ekspresją VEGF, a progresją nowotworu i złą prognozą w przypadku wielu nowotworów. Należą do nich między innymi: rak jelita grubego [136], żołądka [146], trzustki [99], piersi [13], gruczołu krokowego [76] i płuc [70]. Unaczynienie nowotworu mierzone gęstością mikronaczyń i zwiększoną ekspresją VEGF w wielu nowotworach korelowało z większym ryzykiem powstawania przerzutów odległych i zmniejszoną przeżywalnością pacjentów [72]. Od czasu odkrycia VEGF w 1989 roku prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem nowych metod diagnostycznych, jak również terapeutycznych, opartych na blokowaniu angiogenezy i progresji nowotworów za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-VEGF. W wielu typach nowotworów wyniki są obiecujące.

1.6 Hipoksja a przemiany beztlenowe w nowotworze

Szybko mnożące się i migrujące komórki nowotworowe potrzebują stałego źródła energii dla podtrzymania swego potencjału proliferacyjnego. W warunkach hipoksji, przemiany metaboliczne komórek nowotworowych przełączane są na szlaki niezależne od O₂, którego brakuje. Uruchamiany jest przyspieszony proces glikolizy (oddychania beztlenowego), czyli proces, w wyniku którego glukoza jest metabolizowana do pirogronianu, a następnie do kwasu mlekowego. Proces ten dostarcza znacznie mniej energii, niż spalanie glukozy w warunkach tlenowych (dwie cząsteczki adenozylo trójfosforanu, ATP, vs 36 cząsteczek ATP), ale jest pewnym i dostępnym źródłem energii w warunkach hipoksji. Ekspresja wszystkich enzymów szlaku glikolitycznego, a także ekspresja transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-3, regulowana jest przez HIF-1 α . Wykazano, iż w wielu nowotworach wysoki poziom GLUT-1 koreluje z krótszym czasem wolnym od przerzutów i gorszym całkowitym przeżyciem chorych [35, 131].

1.6.1 GLUT-1 – marker przemian beztlenowych aktywowany przez HIF-1 α

Wśród białek, które transportują glukozę przez błony komórkowe najlepiej poznanym jest białko GLUT-1. Transporter ten znajduje się jedynie w erytrocytach, komórkach śródbłonna naczyń mózgu, komórkach oka, łożyska i mięśni [246]. W stanach przewlekłego niedotlenienia komórek i tkanek, podczas utrudnionego dostępu do glukozy, stwierdza się statystycznie istotnie wyższą ekspresję białka GLUT-1, dlatego często jego obecność stwierdza się w komórkach guzów nowotworowych [145, 156].

Transporter GLUT-1 zlokalizowany w ludzkich komórkach ma masę cząsteczkową ok. 54 kDa i składa się z 492 aminokwasów. Gen *SLC2A1*, kodujący białko GLUT-1, znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p35-31.3) i złożony jest z 10 eksonów. Transportery GLUT, niezależnie od podtypu, posiadają 12 hydrofobowych domen α -heliksowych. Uważa się, że przechodzą one przez błonę plazmatyczną 12 razy, a duża pętla znajdująca się pomiędzy 6 i 7 segmentem zlokalizowana jest wewnątrz komórki, po stronie cytoplazmatycznej. Podobnie, wewnątrzkomórkowo, zlokalizowane są regiony N- oraz C-końcowe GLUT-1.

Sugeruje się, iż stopień złośliwości komórek nowotworowych koreluje ze stopniem glikozylacji GLUT-1. Białko GLUT-1 posiada pętlę z miejscem glikozylacji znajdującą się zewnątrzkomórkowo, pomiędzy domeną transmembranową 1 i 2 [246]. GLUT-1 podlega zarówno N-, jak i O-glikozylacji, co zapewnia pełną aktywność transportową i wpływa na masę molekularną białka [190]. Transporter GLUT-1 ulega wewnątrzkomórkowej degradacji w lizosomach.

Współdziałanie GLUT-1 z białkami GIPC sprzyja translokacji GLUT-1 do błony komórkowej, przez co zapobiega jego degradacji [236].

Doniesienia naukowe przekonują, że białka GLUT-1 występują jako dimery. Następnie dimery łączą się w tetramer, w którym istnieje kompleks stale prezentujący miejsca wiązania glukozy (dwa zewnętrzne i dwa wewnętrzne) [249]. Nie zostało jednoznacznie określone, w jaki sposób transporter GLUT-1 przeprowadza translokację substratu przez błonę komórkową. Jednak fakt, że komórki nowotworowe prezentują zwiększone pobieranie glukozy został wykorzystany w badaniu PET w diagnostyce różnych nowotworów złośliwych.

W wielu typach nowotworów stwierdzono wysoki poziom ekspresji GLUT-1 [8, 46, 131]. W rakach żołądka ekspresja GLUT-1 ściśle korelowała z typem nowotworu, jego potencjałem przerzutowym i nasileniem angiogenezy [112]. W rakach piersi, jelita grubego i nowotworach gruczołów ślinowych stwierdzono związek, pomiędzy stadium zaawansowania choroby, a ekspresją GLUT-1. Większą ekspresję stwierdzano u chorych w zaawansowanym stadium, co przekładało się na gorsze rokowanie [8, 46, 162, 183]. Minami i wsp. [158] dowiedli, iż silna tkankowa ekspresja GLUT-1 w raku płuca wiąże się z agresywnym przebiegiem choroby, pomimo niskiego stadium zaawansowania nowotworu. Natomiast w raku szyjki macicy brak ekspresji GLUT-1 w komórkach nowotworowych wpływał korzystnie na przeżycie wolne od przerzutów [1]. Chan i wsp. [38] w swoich badaniach prowadzonych na komórkach białaczkowych człowieka HL-60 wykazali, że zmniejszenie ekspresji genu GLUT-1 hamowało proliferację komórek o ponad 50%. Na podstawie dostępnych badań naukowych można zakładać, iż GLUT-1 może mieć zastosowanie w prognozowaniu stopnia złośliwości nowotworu, co pozwoliłoby wyróżnić grupę chorych wymagającą bardziej agresywnego leczenia.

1.7 Hipoksja a regulacja komórkowego pH w nowotworze

Jak już wspomniałam, w komórce nowotworowej dochodzi do nasilenia procesów glikolizy. W efekcie wzrasta stężenie kwasu mlekowego, co prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowego pH. HIF-1 α przywraca prawidłową wartość pH poprzez aktywację usuwania cząsteczki kwasu mlekowego na zewnątrz komórki oraz indukcję ekspresji anhidraz węglanowych. Wyróżnia się co najmniej 15 izoform anhidraz węglanowych, które wykazują różnorodne spektrum działania [172]. Anhidrazy CA IX i CA XII katalizują odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego (HCO₃⁻) z wody (H₂O) i dwutlenku węgla (CO₂) wg wzoru: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

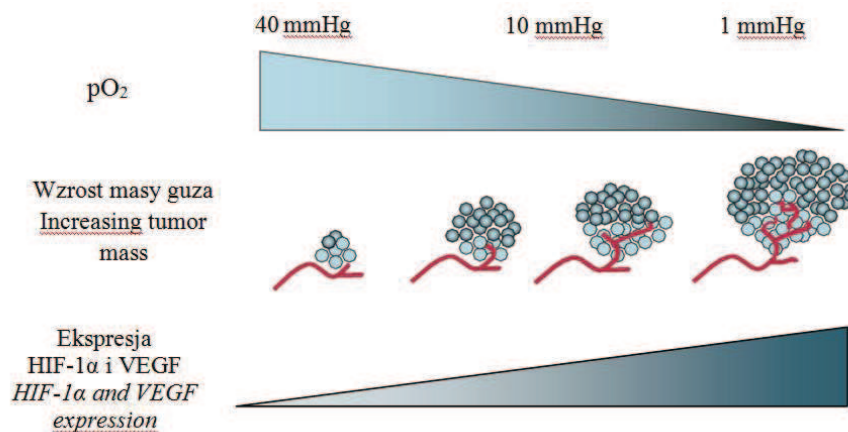
W ten sposób CA IX i CA XII regulują wewnątrz- i pozakomórkowe pH. Opisana reakcja katalizowana przez CA IX zachodzi 10⁷ razy szybciej, niż bez tego enzymu. Zatem działanie CA IX jest jedną z najszybciej przebiegających poznanych dotychczas reakcji enzymatycznych [214].

1.7.1 CA IX – marker regulacji pH aktywowany przez HIF-1 α

Anhydraza węglanowa IX jest uznanym i często oznaczanym endogennym markerem poziomu niedotlenowania komórek. Gen kodujący CA IX znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 9 (9p12-13) i złożony jest z 11 eksonów [165]. CA IX jest białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 58/54 kDa, złożonym z 459 aminokwasów, zaliczanym do rodziny metaloenzymów z aktywnym centrum – kofaktorem w postaci atomu cynku [171].

Ekspresja CA IX przez tkanki prawidłowe ograniczona jest do komórek przewodu pokarmowego (śluzówka żołądka i jelit), pęcherzyka żółciowego, przewodów trzustkowych oraz erytrocytów. Wykryta po raz pierwszy przez Pastorekovą i wsp. [173], CA IX uznana została za obiecujący marker nowotworowy u chorych z rakiem szyjki macicy i jasnokomórkowym rakiem nerki. Wykazano, że odgrywa ona istotną rolę w proliferacji i transformacji nowotworowej. W badaniach ostatnich lat wykazano znamienny związek, pomiędzy ekspresją CA IX i obecnością obszarów niedotlenionych lub martwiczych w tkance nowotworowej. Wykazano, że CA IX stanowi faktyczny endogenne marker hipoksji nowotworowej, korelujący z innymi jej znacznikami, takimi jak: ekspresja HIF-1 α , odległość od naczyń krwionośnych i ekspresja VEGF [97]. Badania sugerują, iż CA IX pozwala komórkom nowotworowym przystosować się do środowiska o obniżonym ciśnieniu parcjalnym O₂ oraz podwyższonej kwasności. Wyniki badań eksperymentalnych pokazały, że poziom CA IX wzrasta w pierwszej dobie niedotlenienia komórek nowotworowych, umożliwiając adaptację do przewlekłej hipoksji. Sprzyja to ich proliferacji i przerzutowaniu do odległych tkanek i narządów [171].

Doniesienia na temat prognostycznego znaczenia CA IX w nowotworach są rozbieżne. Silną ekspresję CA IX uznano za niezależny czynnik złego rokowania w takich nowotworach, jak: rak szyjki macicy, jelita grubego, niedrobnokomórkowy rak płuca, rak głowy i szyi oraz nosogardła [28, 97, 107, 113, 120, 123, 125]. W raku piersi kilka zespołów badawczych udowodniło, iż silna ekspresja CA IX wiąże się ze złym rokowaniem [43, 212, 234] i krótszym przeżyciem chorych [75]. Natomiast w różnych typach raka nerki oraz w raku jajnika nie potwierdzono, by ekspresja CA IX była niezależnym czynnikiem prognostycznym [240]. Co więcej, silna ekspresja CA IX u pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki korelowała z dobrą odpowiedzią na immunoterapię i korzystnym rokowaniem [37]. Współzależności pomiędzy nasleniem hipoksji tkanki nowotworowej, a wzrostem masy guza oraz ekspresją markerów hipoksji w komórkach nowotworowych przedstawiono schematycznie na ryc. 5.



Ryc. 5. Współzależności pomiędzy nasileniem niedotlenienia w tkance guza, wzrostem masy nowotworu i ekspresją HIF-1 α i VEGF w komórkach nowotworowych. Za Brahimi-Horn 2006 [25], w modyfikacji własnej

Fig. 5. Relationship between tumor hypoxia, tumor mass and expression of HIF-1 α and VEGF in tumor cells. Citing: Brahimi-Horn 2006 [25], in own modification

1.8 Hipoksja a progresja nowotworu

W ostatnich latach zmieniło się spojrzenie na problem hipoksji w nowotworze. Poza dobrze udokumentowanym negatywnym wpływem na skuteczność radioterapii, niedotlenienie tkanki nowotworowej uznawane jest obecnie za główny czynnik przyczynowy proliferacji, inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych. Wykazano, że w wyniku hipoksji, część niedotlenionych komórek obumiera, jednak inne podlegają wielu genetycznym i molekularnym zmianom adaptacyjnym, mającym na celu ich przetrwanie w niesprzyjających warunkach [26, 227]. Za pośrednictwem aktywacji HIF-1 α i kolejnych procesów regulowanych przez ten czynnik, komórki nowotworowe stają się zdolne do unikania apoptozy i przeżycia, a nawet intensywnej proliferacji [178]. Eliminowane są komórki prawidłowe, a promowane komórki z mutacją genów supresorowych nowotworów, a wśród nich: *PTEN* [250], *VHL* [238] i *TP53* [193] oraz aktywacją onkogenów, m.in. Ras [42], HER2/neu [135] i Src [110].

Hipoksja pobudza nowotworowe komórki do ekspresji różnych czynników wzrostu, między innymi: EGF, insuliny, IGF-1, IGF-2 i PDGF, które promują proliferację komórkową [154]. Aktywowany przez hipoksję HIF-1 α wywołuje zmiany w matrix międzykomórkowym, ułatwiając inwazję i migrację komórek nowotworu [66]. To zwiększa potencjał przerzutowy komórek. Szybka i niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych prowadzi do zwiększenia „wymagań” co do zaopatrzenia w O₂ i środki odżywcze, co pogłębia hipoksję i

stymuluje powstawanie kolejnych mutacji. W efekcie powstaje klon komórkowy doskonale przystosowany do przetrwania w organizmie w stanie niedotlenienia. Cechuje go bardziej złośliwy fenotyp, oporność na CHT i RT, co w efekcie pogarsza wyniki leczenia, a nawet promuje progresję guza.

Stwierdzono również, że wznowy nowotworu są bardziej odporne na niedotlenienie, niż komórki guza pierwotnego, co przejawia się zwykle mniejszą wrażliwością nawrotów nowotworu na leczenie onkologiczne. Mniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na RT wynika między innymi z faktu, iż w napromienianej tkance dochodzi do obniżenia powstawania reaktywnych form O_2 . Natomiast zmniejszona wrażliwość na CHT wiąże się ograniczoną penetracją leku do regionów słabo unaczynionych, powstawaniem oporności wielolekowej w warunkach hipoksji i potrzebą dostępu do O_2 do pełni działania wybranych leków cytostatycznych [30, 47]. W efekcie hipoksja – zamiast uszkadzać komórki nowotworowe – powoduje ich przeżycie i aktywną proliferację.

1.8.1 Antygen Ki-67 – marker aktywności proliferacyjnej nowotworu

Jednym z parametrów, określających aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych, jest stopień ekspresji antygeny Ki-67. Jest to niehistonowe białko, wchodzące w skład macierzy jądrowej, zakodowane na chromosomie 10 (10q25) [80]. Wyróżnia się dwie izoformy tej proteiny: o masie cząsteczkowej 320 i 359 kD. Po raz pierwszy antygen Ki-67 został opisany w roku 1983, lecz jego funkcja nie została dotąd w pełni wyjaśniona.

Antygen Ki-67 występuje w komórkach proliferujących (zarówno prawidłowych jak i patologicznych), będących w fazie G1, S, G2 lub M cyklu komórkowego. Jest natomiast nieobecny w komórkach, które pozostają poza cyklem komórkowym, czyli w fazie G0 [80]. Stwierdzenie obecności Ki-67 w danej komórce nie pozwala określić, w jakiej fazie cyklu komórkowego się ona znajduje, jednak świadczy, iż jest ona w fazie wzrostowej. A zatem określenie liczby komórek w guzie z dodatnią ekspresją Ki-67 dostarcza informacji o potencjale proliferacyjnym nowotworu [64]. Ocena jest szybka, powtarzalna, a miernikiem ilościowym ekspresji Ki-67 jest indeks (IK67) – pozytywna reakcja na 1000 komórek [79].

Do tej pory, nie ustalono wartości IK67, która w sposób jednoznaczny różnicowałaby nowotwory o wysokim i niskim współczynniku proliferacji (w większości prac do analizy przyjęto wartości od 10 do 40%) [68, 158, 159]. Niezależnie od przyjętej granicy, odsetek komórek Ki-67-pozytywnych korelował dodatnio ze stopniem histologicznej złośliwości MTM, guzów kości, glejaków OUN, raka jajnika, nowotworów piersi i nowotworów trzustki [5, 7, 108, 197, 219, 221]. W MTM u pacjentów dorosłych wartość IK67 korelowała dodatnio z wielkością nowotworu, stopniem martwicy i inwazji naczyniowej w guzie oraz obecnością przerzutów odległych [44]. Wysoki IK67 korelował także z gorszym EFS w MTM [34] i był niezależnym czynnikiem prognozującym prawdopodo-

bieństwo przeżycia wolnego od zdarzeń (*event free survival*, EFS) i OS w mięsaku Ewinga, niezależnie od typu zastosowanego leczenia [144]. U dzieci z MTM badania nad znaczeniem wartości IK67 prowadzili Kazanowska i wsp. [116]. Najwyższy odsetek komórek z pozytywnym barwieniem na obecność antygenu Ki-67 występował w niekorzystnym prognostycznie podtypie histologicznym, RMA, i w grupie chorych ze złą odpowiedzią na CHT. Wyższy indeks proliferacyjny występował również w grupie dzieci, które następnie w przebiegu choroby rozwinęły wznowę oraz u tych, które zmarły z progresji nowotworu. Sugeruje to obecność związku, pomiędzy wysoką wartością IK67 i obecnością czynników niekorzystnego rokowania w MTM u dzieci. Pomimo tych danych, w protokołach diagnostycznych stosowanych obecnie u dzieci z MTM, marker ten nie jest ujmowany wśród obowiązujących kryteriów kwalifikacji chorych do grup ryzyka. Jego znaczenie prognostyczne u dzieci z MTM wymaga więc dalszych badań.

1.9 Endogenne markery hipoksji w praktyce klinicznej

Na przestrzeni ostatnich kilku lat opublikowano wyniki wielu badań, oceniających znaczenie endogennych markerów hipoksji u pacjentów z chorobą nowotworową. W znakomitej większości prace te dotyczyły chorych dorosłych z rozpoznaniem różnych typów nowotworów litych, takich jak: guzy mózgu, rak nerki, płuc, jelita grubego, piersi, szyjki macicy, prostaty, pęcherza moczowego, nowotwory głowy i szyi i innych [19, 93, 103, 107, 122, 126, 182, 194, 210, 222, 224, 248]. W nowotworach tych stwierdzono, że poszczególne endogenne markery hipoksji wykazują silną ekspresję w różnym stopniu, jednak w większości badań odsetek immunopozytywnych komórek był znaczny. Co więcej, dowiedziono, że poszczególne markery dodatnio korelowały ze sobą wzajemnie. Wykazano, że silna ekspresja HIF-1 α w niektórych nowotworach (m. in. glejakach złośliwych i rakach jajnika) korelowała z gęstością nowotworowych naczyń krwionośnych oraz stężeniem czynników proangiogennych (m.in. VEGF). Manipulacje genetyczne przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że zwiększenie lub zmniejszenie aktywności HIF-1 α jest związane z nasileniem lub zahamowaniem procesów angiogenezy oraz wzrostu guza, odpowiednio [122].

W wielu typach nowotworów złośliwych wykazano istotny statystycznie związek, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w tkance nowotworowej, a obecnością czynników negatywnej prognozy u poszczególnych pacjentów. Stwierdzono, że silniejsza ekspresja markerów hipoksji korelowała z namiennie z bardziej złośliwym podtypem histologicznym guza [55, 56, 119, 244], dużą masą nowotworu, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i narządach odległych [21, 55, 56, 112, 119, 159, 175, 188, 244], wyższym ryzykiem wystąpienia wznowy i krótszym przeżyciem całkowitym [62, 123, 125, 138, 151, 198, 207]. Spośród markerów związanych z adaptacją

do hipoksji, najwięcej badań i publikacji poświęcono znaczeniu VEGF, wykazując, że odgrywa on bezdyskusyjną rolę w promocji neowaskularyzacji guzów nowotworowych, inwazyjności oraz przerzutowania drogą krwi i chłonki [53, 169, 241, 242].

Poza istotnym związkiem tkankowej ekspresji markerów hipoksji z tworzeniem odległych przerzutów oraz krótszym EFS i OS, opublikowano również dane, dotyczące negatywnego związku ekspresji tych markerów z odpowiedzią na stosowane leczenie onkologiczne, a zwłaszcza skutecznością CHT i RT. Istotnie słabszą odpowiedź na CHT stwierdzono m.in. u pacjentek z rakiem piersi z silną tkankową ekspresją HIF-1 α [75]. Z kolei Koukourakis i wsp. [127] potwierdzili złą odpowiedź na RT w nowotworach głowy i szyi w przypadku silnej tkankowej ekspresji CA IX. W badaniach u pacjentów dorosłych z MTM stwierdzono, iż nadekspresja HIF-1 α jest niezależnym czynnikiem, przewidującym słabą odpowiedź na CHT w tej grupie chorych [119].

Badań oceniających znaczenie prognostyczne HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w MTM jest niewiele, ich wyniki dotyczą wyłącznie pacjentów dorosłych i nie są jednoznaczne. Shintani i wsp. [207] dowiedli, iż silna ekspresja HIF-1 α stwierdzona w tkance guza nowotworowego przed leczeniem MTM wiąże się z istotnie krótszym czasem przeżycia całkowitego chorych. Z kolei Smeland i wsp. [209] nie wykazali takiej zależności w grupie pacjentów z MTM o budowie innej niż stromalny guz przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumor*, GIST). Ostatnie badanie opublikowane przez Kim i wsp. [119] wykazało, że silna ekspresja HIF-1 α jest niezależnym czynnikiem niekorzystnie związanym z przeżyciem wolnym od progresji choroby.

Znaczenie VEGF w MTM zostało potwierdzono w wielu badaniach. Wykazano w nich, iż silna ekspresja VEGF w guzie nowotworowym wiązała się z gorszym rokowaniem, co przekładało się na krótsze przeżycie całkowite chorych [101, 245]. Prace nad znaczeniem VEGF w nowotworach u ludzi zaowocowały stworzeniem inhibitorów tego proangiogenego czynnika, które z powodzeniem stosowane są już w wielu nowotworach u pacjentów dorosłych, w tym w leczeniu MTM. Związek ekspresji GLUT-1 z rokowaniem u chorych dorosłych z MTM i mięsakami kości badali Endo i wsp. [63] i Smeland i wsp. [209]. Badania tych ostatnich autorów wykazały, iż GLUT-1 może być niezależnym czynnikiem prognostycznym co do przeżycia u chorych z rozpoznaniem MTM. Jedynie pojedyncze doniesienia dotyczyły znaczenia ekspresji CA IX u pacjentów dorosłych z MTM. Wykazano w nich, iż obecność CA IX w komórkach nowotworowych wiązała się z gorszym rokowaniem i krótszym okresem wolnym od przerzutów [21, 151, 209]. W przypadku dorosłych pacjentów z nieresekcyjnymi MTM o wysokim stopniu histologicznej złośliwości, ekspresja CA IX w tkance guza wiązała się z niższym prawdopodobieństwem przeżycia całkowitego i wolnego od choroby oraz krótszym czasem do wystąpienia przerzutów odległych [151].

W literaturze dostępne są tylko nieliczne prace, oceniające kliniczną przydatność poszczególnych markerów indukowanych przez hipoksję w nowotworach typu dziecięcego. Badania obejmowały pacjentów z rozpoznaniem nerczaka zarodkowego, NBL, guzów kości i *retinoblastoma* [54, 55, 56, 159, 180, 215]. W żadnym z tych nowotworów nie badano ekspresji wszystkich czterech głównych endogennych markerów hipoksji. Uzyskane wyniki były zróżnicowane i zależały od typu badanego nowotworu. Poza NBL, w nowotworach dziecięcych nie wykazano istotnej prognostycznej roli markerów hipoksji [55, 56].

Do chwili obecnej w literaturze światowej nie opublikowano wyników badań nad znaczeniem ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w MTM u dzieci.

Z danych uzyskanych z badań nad wieloma typami nowotworów, w tym nad MTM u pacjentów dorosłych wynika, że markery hipoksji mogą stanowić obiecujące czynniki prognostyczne, zaangażowane w regulację najistotniejszych procesów biologicznych w rozwoju nowotworów, takich jak: proliferacja, apoptoza, zdolność migracji komórek guza i przerzutowania, angiogeneza, procesy glikolizy tkankowej i inne. W wielu nowotworach stwierdzono korelację markerów hipoksji z wyznacznikami histologicznej złośliwości guzów, ocenianymi rutynowo w trakcie badania histopatologicznego. W przypadku MTM u dzieci za taki czynnik uważa się indeks Ki-67, jednak związek markerów hipoksji z wartością IK67 nie został dotąd ustalony.

Wysunęłam hipotezę, iż stopień nasilenia ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w tkance nowotworowej MTM u dzieci przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego może korelować z aktywnością proliferacyjną guzów, mierzoną wartością indeksu Ki-67 oraz że badane markery hipoksji i IK67 mogą prognozować odpowiedź na CHT, przebieg choroby i wynik leczenia.

Uznałam, że poznanie nowych markerów MTM u dzieci może stanowić istotny wkład w wyjaśnienie mechanizmów progresji w tym nowotworze i dać podstawę do rozwoju i zastosowania w przyszłości nowych celowanych metod terapeutycznych.

2 CELE PRACY

Celem pracy było określenie znaczenia ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67 u dzieci z mięsakami tkanek miękkich w ocenie aktywności choroby i prognozowaniu jej przebiegu.

Cel główny pracy realizowano poprzez:

1. Określenie częstości występowania i wzajemnej korelacji, pomiędzy badanymi endogennymi markerami hipoksji (HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF) w tkance nowotworowej MTM u dzieci.
2. Poszukiwanie związku, pomiędzy stopniem ekspresji badanych markerów hipoksji, a aktywnością proliferacyjną MTM, mierzoną wartością indeksu proliferacyjnego Ki-67.
3. Poszukiwanie współzależności, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz wartością IK67, a obecnością kliniczno-patologicznych czynników, uznawanych za istotne prognostycznie w MTM u dzieci.
4. Poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy na podstawie stopnia ekspresji poszczególnych markerów hipoksji i/lub wartości indeksu Ki-67 w tkance nowotworowej pobranej przed leczeniem u dzieci z MTM, można przewidzieć odpowiedź na chemioterapię.
5. Analizę zależności, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz wartością IK67, a prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od zdarzeń i przeżycia całkowitego u dzieci z MTM.

3 MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał

3.1.1 Charakterystyka grupy badanej

Wstępnej analizie poddano 110 dzieci z rozpoznaniem MTM, leczonych w ośrodkach onkologii dziecięcej PPGLGL w latach 1992-2013. Po wstępnej ocenie z badania wykluczono 19 pacjentów: 12 z powodu niewystarczającej jakości technicznej materiału tkankowego oraz siedmiu chorych z powodu braku danych klinicznych, co do ich dalszych losów. Ostatecznie badaniami objęto 91 dzieci z MTM. U wszystkich tych pacjentów dostępny był archiwalny histologiczny materiał tkankowy, pochodzący z pierwotnego guza nowotworowego, oraz pełne dane kliniczne, obejmujące szczegółową charakterystykę, przebieg oraz ostateczny wynik leczenia. Ich dane kliniczne pozyskane zostały z Krajowego Rejestru MTM u dzieci. Diagnostyka i leczenie wszystkich badanych prowadzone były zgodnie z protokołami CWS, obowiązującymi w okresie terapii (CWS-91, -96, -2002 i -2006). We wszystkich przypadkach rozpoznania histologiczne MTM zostały potwierdzone przez drugiego niezależnego patologa z doświadczeniem w dziedzinie diagnostyki mięsaków u dzieci.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKBBN/449/2013).

Wiek pacjentów w momencie diagnozy wahał się od 1 dnia (guz wrodzony) do 227 miesięcy (18 lat 11 miesięcy), ze średnią 101,1 miesiąca i medianą 105,7 miesiąca. Wśród badanych było 38 dziewcząt i 53 chłopców. W badanej grupie chorych analizowano następujące zmienne: wiek w momencie rozpoznania MTM, typ histologiczny MTM, podtyp RMS, cechy guza pierwotnego (lokalizację, wielkość i inwazyjność), stadium choroby wg TNM i IRS, doszczętność pierwotnego i odroczonego zabiegu resekcji guza, zastosowane leczenie miejscowe i systemowe, odpowiedź na CHT indukcyjną, wystąpienie wznowy i/lub progresji nowotworu oraz ostateczny wynik leczenia.

Cechy guza pierwotnego u dzieci z MTM:

Lokalizacja guza pierwotnego określana była zgodnie z obowiązującą klasyfikacją i wyróżniała guzy położone w obrębie następujących struktur:

- oczodół;
- głowa/szyja:
 - nieokołooponowo (czepiec ścięgnisty, szyja, ślinianki, jama ustna, krtań, górna i dolna część gardła, tarczyca, policzki);

- okołooponowo (jama nosowo-gardłowa, zatoki, jama nosowa, ucho środkowe, dół podskroniowy, dół skrzydłowo-podniebienny, oczodoł z erozją kości podstawy czaszki oraz strop oczodołu, stok, przestrzeń zaszczękowa, kość klinowa, kość sitowa, podstawa nosa, erozja kości podstawy czaszki, porażenie nerwów czaszkowych, obecność komórek nowotworowych w PMR);
- układ moczowo-płciowy:
 - pęcherz moczowy i prostata;
 - bez pęcherza moczowego i prostaty (jądra, najądrze, okolica okołojądrowa, prącie, srom, pochwa, jajnik, macica);
- kończyny i obręcz (w tym mięśnie pośladkowe);
- inne (miednica mniejsza, jama brzuszna, tułów, ściana klatki piersiowej, śródpiersie, skóra, grasicca).

Wielkość guza pierwotnego:

- <5 cm i \geq 5 cm.

Inwazyjność guza pierwotnego:

- T1 – guz ograniczony do narządu lub tkanki, z których się wywodzi;
- T2 – guz wykraczający poza narząd lub tkankę, z których się wywodzi.

Stadium zaawansowania MTM u dzieci oceniano wg klasyfikacji TNM. Przedstawiono ją w załączniku 1.

Pierwotną resekcję guza pierwotnego (*primary excision, PE*) zdefiniowano jako resekcję guza przeprowadzoną przed jakimkolwiek innym leczeniem.

Doszczędność PE oceniano wg następujących kryteriów:

- R0 – zabieg mikroskopowo doszczętny;
- R1 – zabieg makroskopowo doszczętny, ale mikroskopowo niedoszczętny;
- R2 – zabieg makroskopowo niedoszczętny lub tylko biopsja guza nieoperacyjnego.

Na podstawie doszczędności PE, u wszystkich pacjentów określano **pooperacyjne stadium zaawansowania nowotworu** zgodnie z klasyfikacją IRS, przedstawioną w załączniku 2.

Odroczoną resekcją guza (*second look surgery, SL*) nazywano chirurgiczne wycięcie guza wykonane po neo-adjuwantowej CHT lub RT.

Doszczędność SL klasyfikowano na podstawie oceny chirurgicznej i patomorfologicznej jako:

- Ips – brak komórek nowotworowych w tkance uzyskanej podczas operacji SL;

- I_lps – obecność komórek nowotworowych w tkance uzyskanej podczas operacji SL;
- III_lps – obecność makroskopowych pozostałości guza.

Radioterapię stosowano po mikro- i makroskopowo niekompletnym wycięciu guza lub w sytuacji, gdy operacja nowotworu była niemożliwa do przeprowadzenia. W badanej grupie stosowano napromienianie wiązką zewnętrzną, z konwencjonalnym frakcjonowaniem w dawce całkowitej od 45 do 76 Gy, zależnej od typu MTM. Ze względu na znaczną ilość niekompletnych lub niedostępnych danych na temat RT, w pracy nie analizowano wpływu samej RT na wynik leczenia chorych.

Chemioterapię stosowano jako neo-adjuwantową (po niedoszczętej makroskopowo PE lub jedynie po diagnostycznej biopsji guza) lub/i adjuwantową (uzupełniającą zabieg operacyjny). Intensywność CHT zależała od grupy ryzyka, do której zaliczony został pacjent na podstawie oceny czynników prognostycznych zalecanych przez protokół CWS. Wśród stosowanych cytostatyków były: winkrystyna, doksorubicyna, epirubicyna, daktynomycyna, ifosfamid, etopozyd oraz karboplatyna.

Zasady kwalifikacji chorych do grup ryzyka w obowiązującym do chwili obecnej protokole CWS-2006 i CWS-*Guidance* przedstawiono w załączniku 3.

Ze względu na to, że w analizowanym okresie czasu zmieniły się kryteria i zasady kwalifikacji chorych do grup ryzyka, nie analizowano związku badanych markerów z grupami ryzyka, a jedynie z poszczególnymi czynnikami prognostycznymi, wyznaczającymi kwalifikację do tych grup.

Odpowiedź na CHT oceniano u dzieci, u których po PE stwierdzano mieralne zmiany nowotworowe (pooperacyjne stadia III i IV wg IRS). Oceny odpowiedzi na CHT dokonywano po pierwszym cyklu CHT (między 9 a 12 tygodniem leczenia chemicznego), definiując ją następująco:

- całkowita odpowiedź (*complete response*, CR) – całkowite zniknięcie zmian nowotworowych;
- dobra częściowa odpowiedź (*good partial response*, GPR) – zmniejszenie objętości guza o co najmniej 67% objętości (ale mniej niż 100%);
- częściowa odpowiedź (*partial response*, PR) – zmniejszenie objętości guza o co najmniej 33% jego objętości, lecz o mniej niż 67%;
- stabilizacja choroby (*stable disease*, SD) – zmniejszenie objętości guza o mniej niż 33% wyjściowej objętości;
- progresja choroby (*progressive disease*, PD) – zwiększenie wielkości guza lub wykrycie nowych zmian nowotworowych.

Zgodnie z protokołem, odpowiedź na CHT powodująca zmniejszenie objętości guza o co najmniej 33% jego wyjściowej objętości (obejmująca odpowiedź

CR, GPR i PR) umożliwia kontynuację terapii I linii bez konieczności zmiany schematu leczenia na bardziej agresywny. Dlatego **odpowiedzi CR, GPR i PR w tej pracy określane były jako "dobra odpowiedź na CHT", zaś odpowiedzi SD i PD – jako „zła odpowiedź na CHT”**.

Wznową nazywano nawrót choroby po osiągnięciu wcześniej przez chorego klinicznej remisji. Za **progresję** uznawano powiększanie się wymiarów guza lub wystąpienie nowych ognisk choroby u pacjenta, który wcześniej nie osiągnął klinicznej remisji.

W zależności od lokalizacji i zasięgu, wyróżniano wznowę/progresję lokalną (w miejscu guza pierwotnego), regionalną (w regionie guza pierwotnego z lub bez zajęcia regionalnych węzłów chłonnych i sąsiadujących narządów i tkanek), przerzutową (z zajęciem narządów odległych i/lub pozaregionalnych węzłów chłonnych) oraz mieszaną.

Wynik leczenia oceniono w oparciu o dwie zmienne zależne:

Przeżycie wolne od zdarzeń (*event free survival, EFS*), które definiowano jako czas (w miesiącach) liczony od dnia rozpoczęcia leczenia onkologicznego do dnia rozpoznania miejscowego, regionalnego lub odległego nawrotu choroby lub progresji nowotworu.

Przeżycie całkowite (*overall survival, OS*), które zdefiniowano jako czas (w miesiącach) liczony od rozpoznania nowotworu do zgonu chorego, bez względu na jego przyczynę.

3.1.2 Korzystne i niekorzystne prognostycznie czynniki w MTM u dzieci

W grupie badanej wyróżniono podgrupy chorych, w oparciu o obecność korzystnych i niekorzystnych czynników prognostycznych. Czynniki te zostały wymienione i scharakteryzowane w tabeli 4. W każdej z tych podgrup o korzystnym i niekorzystnym rokowaniu analizowano ekspresję IHC badanych markerów hipoksji i wartość indeksu proliferacyjnego IK-67.

Tabela 4. Charakterystyka korzystnych i niekorzystnych prognostycznie czynników u dzieci z MTM

Table 4. Characteristics of favorable and unfavorable prognostic factors in children with STS

	Czynnik korzystny prognostycznie <i>Favorable prognostic factor</i>	Czynnik niekorzystny prognostycznie <i>Unfavorable prognostic factor</i>
Wiek w momencie diagnozy <i>Age at diagnosis</i>	<10 lat	≥10 lat
Lokalizacja guza pierwotnego	głowa/szyja nieokołooponowo	głowa/szyja okołooponowo

<i>Primary tumor site</i>	układ moczowo-płciowy nie pęcherz moczowy/prostata oczodół	układ moczowo-płciowy pę- cherz moczowy/prostata kończyny i obręcze inne
Wielkość guza pierwot- nego <i>Primary tumor size</i>	<5 cm	≥5 cm
Inwazyjność guza <i>Primary tumor invasive- ness</i>	T1	T2
Zajęcie węzłów chłon- nych <i>Lymph nodes involvement</i>	N0	N1
Przerzuty odległe <i>Distant metastases</i>	M0	M1
Stadium zaawansowania wg IRS <i>IRS stage</i>	I i II	III i IV
Histologia <i>Histology</i>	RME	RMA i MPNST
Podtyp RMS <i>RMS subtype</i>	RME	RMA
Doszczętność PE <i>Completeness of PE</i>	R0	R1 i R2
Odpowiedź na CHT <i>Response to CHT</i>	dobra	zła

3.1.3 Materiał tkankowy

Materiał tkankowy do badań stanowiły wycinki z pierwotnych guzów dzieci z MTM, archiwizowane w Zakładach Patomorfologii jednostek współpracujących w ramach PPGLGL: COPERNICUS Podmiotu Leczniczego w Gdańsku oraz Uniwersyteckich Szpitali Klinicznych z Gdańska, Wrocławia, Łodzi, Poznania i Warszawy. Wycinki z guzów były utrwalone w buforowanej 10% formalinie, następnie rutynowo przeprowadzone histotechnologicznie i zatopione w blokach parafinowych.

Grupę badaną wyłoniono spośród 103 zgromadzonych przypadków, na podstawie reprezentatywności materiału tkankowego, a ilość i jakość dostępnej tkanki nowotworowej oceniona została we wstępnej selekcji histopatologicznej preparatów. Z powodu niewystarczającej jakości materiału odrzucono 12 przypadków. Ostatecznie do badań zakwalifikowano 91 guzów MTM, które zostały skatalogowane, oznaczone numerami i opisane w podwójnie kodowanej bazie utworzonej w programie Excel. Całkowicie zanonimizowane zostały dane kli-

niczne pacjentów, których materiał tkankowy podlegał analizie. Były one umieszczone w osobnej bazie danych i nieznane wykonawcom analiz.

3.2 Metodyka

3.2.1 Badania histologiczne

Badania wykonywane były w Zakładzie Patologii i Neuropatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: dr hab. n. med. Ewa Iżycka-Świeszewska, prof. nadzw.). **Jako autorka niniejszej pracy aktywnie uczestniczyłam we wszystkich etapach pozyskiwania i przygotowywania materiału do badań, w tym w tworzeniu mikromacierzy tkankowych i ocenie odczynów immunohistochemicznych.**

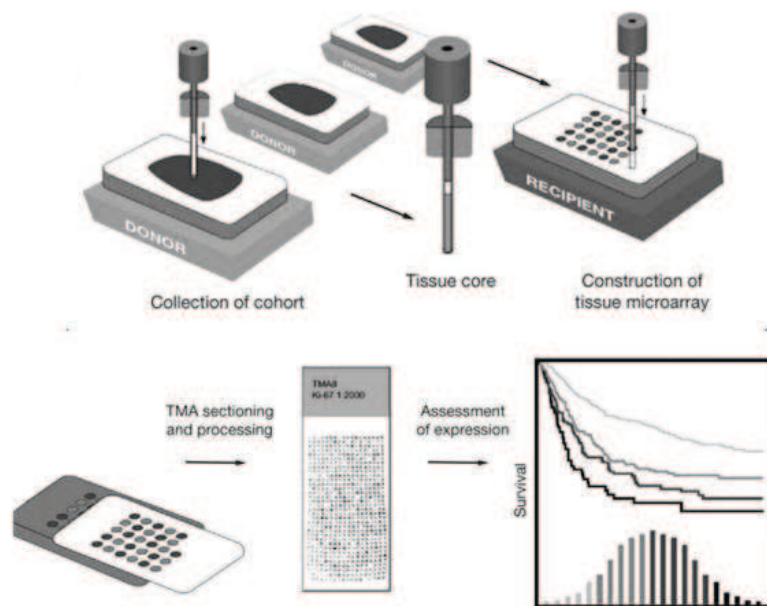
W pierwszym etapie, na podstawie oceny preparatów wybarwionych hematoxyliną-eozyną (H-E), dokonano weryfikacji histopatologicznej przypadków i wyboru reprezentatywnych wycinków z guzów. Następnie wyselekcjonowane wycinki poddano szczegółowej analizie w kontekście reprezentatywności pól tkankowych do planowanych mikromacierzy tkankowych (*tissue microarray*, TMA). Preferowano żywą tkankę nowotworową bez zmian martwiczych, uszkodzeń mechanicznych i termicznych. Wybrane miejsce oznaczano na szkiełku podstawowym markerem i dopasowywano komplementarny obszar w bloku parafinowym.

3.2.2 Mikromacierze tkankowe – TMA

Do utworzenia macierzy tkankowych użyty został komercyjny zestaw Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray System, firmy Sakura Finetek USA, Inc.

Z wyznakowanych obszarów w blokach parafinowych za pomocą specjalnej igły wycinającej (*punch tip*) pobierany był fragment tkanki w postaci cylindrycznego rdzenia tkankowego (*tissue core*). Z każdego guza wycinano 1-2 rdzenie tkankowe o średnicy 5 mm.

Pobrane fragmenty tkankowe guzów przenoszono na parafinowo-polimerową płytkę mikromacierzy (*recipient block*), zawierającą 20 dołków o średnicy 5 mm. Równolegle oznaczano na papierowym schemacie lokalizację konkretnych przypadków w tworzonej macierzy, celem ich identyfikacji i późniejszej analizy. Kolejny etap stanowiło scalenie bloku w cieplarni o temperaturze 60°C w czasie 30 min. Następnie przy pomocy mikrotomu bloki tkankowe mikromacierzy krojono na skrawki tkankowe grubości 4 µm. Umieszczano je na silanizowanych szkiełkach adhezyjnych (*Microscope Slides FLEX*, firmy Dako). Na ryc. 6 przedstawiłam schemat przygotowywania macierzy tkankowych, zaczerpnięty z publikacji Giltane i wsp. [82], w modyfikacji własnej.



Ryc. 6. Schemat przygotowywania mikromacierzy tkankowych

Fig. 6. The scheme of tissue microarrays preparation

3.2.3 Badania IHC ekspresji wybranych markerów hipoksji oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67

W tkankach z TMA wykonano odczyny IHC na obecność badanych markerów hipoksji: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF. Ponadto wykonano odczyny z przeciwciałem anti-Ki-67. Immunofenotypizacja przeprowadzona została przez doświadczony zespół laboratoryjny Zakładu Patologii i Neuropatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przy użyciu Systemu detekcji *EnVision Flex*, Firmy Dako.

Kontrolę pozytywną w badaniu, zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał, stanowiły wycinki z nienowotworowej tkanki nerki, łożyska i wątroby. Kontrolę negatywną metody stanowiły skrawki, w których zastępowano pierwotne przeciwciała buforem TRIS.

Procedurę IHC przeprowadzano w następujących etapach:

1. Odparafinowanie, nawadnianie i ciepłne odmaskowanie epitopu (*heat-induced epitope retrieval*, HIER) przeprowadzono w module Pt-link przy udziale buforu *Target Retrieval Solution* (nr S3308) (50 \times) Tris/EDTA o pH=9, w temperaturze 97 $^{\circ}$ C w czasie 20 min.
2. Blokowanie endogennej peroksydazy odczynnikiem *Peroxidase-Blocking Reagent* (nr SM 801).

3. Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym przez 30 min w temperaturze pokojowej. Do rozcieńczenia przeciwciał użyto *Diluent*, firmy Dako (nr kat. K8006).
Używano następujących przeciwciał w podanych niżej rozcieńczeniach:
 - HIF-1 α (1:500, Abcam, kod ab463);
 - GLUT-1 (1: 200, DAKO, kod A3536);
 - CA IX (1:1000, Abcam, kod ab15086);
 - VEGF (1: 250, Abcam, kod m68334);
 - Ki-67 (1:100, DAKO, kod M7240).
4. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anty – mysim, skoniugowanym z polimerem znakowanym peroksydazą chrzanową (*horseradish peroxidase*, HRP, nr SM 802). Inkubację prowadzono przez 20 min w temperaturze pokojowej.
5. Reakcja barwna. Skrawki inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej z dwuaminobenzydyną (DAB) jako chromogenem (nr DM 827). DAB-chromogen rozcieńczano w roztworze buforującym (*Substrate Buffer*), zawierającym nadtlenek wodoru (nr SM 803).
6. Podbarwienie jąder komórkowych hematoksyliną Mayera – 5 min.
7. Przemycanie skrawków przy użyciu roztworu soli fizjologicznej z buforem TRIS o pH=7,6 oraz wody dejonizowanej (20 \times) (*Wash Buffer*, nr DM 831).
8. Wizualizacja reakcji immunohistochemicznej przy zastosowaniu systemu detekcji *EnVision Flex*, firmy Dako (nr kat. K8002).

3.2.4 Ocena stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji w tkance nowotworowej guzów

Ekspresję wybranych markerów hipoksji: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF w tkance nowotworowej oceniano za pomocą metody półilościowej.

1. Określano lokalizację odczynu – komórki nowotworowe lub podścielisko; lokalizacja w komórkach: jądrowa, cytoplazmatyczna, błonowa, mieszana.
2. Określano siłę reakcji barwnej w skali od + do +++, zależnie od stosowanego przeciwciała, przyjmując indywidualne kryteria.
3. Szacowano ilość immunopozytywnych komórek w przedziałach procentowych (0-5%, 6-25%, 26-50%, powyżej 50%).

W oparciu o punkty 2 i 3 wyznaczano współczynnik ekspresji poszczególnych markerów, posługując się własną skalą, którą przedstawiono w tabeli 5.

Stan, gdy w tkance nowotworowej nie stwierdzano obecności barwnej reakcji IHC z zastosowanym przeciwciałem, określano jako „brak reakcji” i przypisywano mu współczynnik ekspresji o wartości 0. Odczynu IHC, którym przypisano współczynniki ekspresji 1-4 uznawano za słabe, 5-7 – za umiarkowane, 8-12 – za silne.

Tabela 5. Wartości współczynników ekspresji badanych markerów w komórkach nowotworowych w oparciu o siłę reakcji barwnej i odsetek immunopozytywnych komórek

Table 5. The assessment of the expression index of analyzed markers in neoplastic cells based on the intensity of the immunohistochemical staining and percentage of immunopositive cells

		Odsetek komórek z dodatnim odczynem IHC Percentage of immunopositive cells			
		>50%	26-50%	6-25%	0-5%
Siła reakcji barwnej	Silna +++ Strong +++	12	9	6	3
	Umiarkowana ++ Intermediate ++	11	8	5	2
Intensity of the IHC staining	Słaba + Weak +	10	7	4	1
	Brak reakcji No staining	0			

Do celów statystycznych w badanej grupie wyróżniono ostatecznie dwa poziomy ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF w tkance nowotworowej:

- ekspresja słaba – obejmująca przypadki guzów z odczynem słabym i umiarkowanym (współczynniki ekspresji od 0 do 7);
- ekspresja silna – obejmująca odczyny silne (współczynniki ekspresji od 8 do 12).

W tłumaczeniu na język angielski uwzględniono nazewnictwo, używane w literaturze anglojęzycznej, dotyczącej tej tematyki. I tak:

- ekspresję słabą tłumaczono jako *low expression* (L);
- ekspresję silną – jako *high expression* (H).

3.2.5 Indeks proliferacyjny Ki-67 w tkance nowotworowej

Do oceny ekspresji antygenu Ki-67 analizowano 100-500 jąder komórek nowotworowych z 1-3 wybranych pól o zagęszczeniu komórek immunopozytywnych (*hot spot*). Wskaźnik IK67 określono jako procent dodatnich jąder.

Do celów analiz statystycznych indeks Ki-67 $\leq 30\%$ komórek opisano jako niski, a indeks $>30\%$ – jako wysoki. Wartość odcięcia ustalono w oparciu o medianę wartości indeksu Ki-67 dla grupy badanej. W sposób skrótowy wysoki indeks Ki-67 oznaczano symbolem H (*high*), a słaby symbolem L (*low*).

3.3 Analiza statystyczna

Wyniki uzyskanych badań poddano opracowaniu statystycznemu. Dla parametrów ciągłych: wieku i wartości IK-67 zostały wyliczone: liczba przypadków

(n), wartości średnie (X), mediany (M), zakres (min-max), dolny i górny kwartył (25Q-75Q) i odchylenia standardowe (SD.). Weryfikację hipotezy o równości średnich poszczególnych prób przeprowadzono metodą analizy wariancji ANOVA lub dla grup o niejednorodnej wariancji lub o małej liczbie przypadków testem nieparametrycznym sumy rang Kruskala-Wallisa (jednorodność wariancji sprawdzano testem Bartlett'a).

Dla parametrów dyskretnych częstość występowania cechy w grupach analizowano testem χ^2_{df} z poprawką Yates'a z odpowiednią liczbą stopni swobody df ($df=(m-1)*(n-1)$, gdzie m – liczba wierszy, n – liczba kolumn) lub dla tablic 2x2, gdy wartość oczekiwana w komórce była mniejsza od 5, testem Fishera. Dla tablic 2x2 w przypadku wystąpienia istotności statystycznej obliczono względne ryzyko (*relative risk*, rr) oraz 95% przedział ufności dla rr (*confidence interval*, CI).

Dla wybranych parametrów przeprowadzono analizę korelacji, wyliczając współczynnik korelacji Spearmana r.

Krzywe przeżycia wykreślano stosując metodę Kaplana-Meiera i porównywano je używając testu log-rank. Przeżycie przedstawiono jako wartość skumulowaną +/- błąd standardowy. Analizę wieloczynnikową wykonano wykorzystując model proporcjonalnego hazardu Coxa.

$P < 0,05$ uznawano za znaczące statystycznie. Wartości p spełniające kryteria istotności statystycznej przedstawiono w tabelach i na rycinach kolorem czerwonym.

Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując komputerowy pakiet programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.1.1.14 (02-07-2013).

4 WYNIKI

4.1 Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badanej

Grupa badana obejmowała 91 dzieci z rozpoznaniem MTM. U 66 dzieci stwierdzono utkanie RMS (w tym u 46 – RME i u 20 – RMA), zaś u 25 chorych rozpoznano guzy o histologii MPNST, zaliczane do NRMS. Grupa obejmowała 38 dziewcząt i 53 chłopców. Wiek pacjentów w momencie diagnozy wahał się od 1 dnia (guz wrodzony) do 227 miesięcy (18 lat 11 miesięcy), ze średnią 101,1 miesiąca i medianą 105,7 miesiąca (25Q=35,2 oraz 75Q=168,5 miesiąca). Mediana wieku dzieci z rozpoznaniem MPNST wynosiła 132 miesiące, a dzieci z RMS – 67 miesięcy. W grupie pacjentów z RMS mediana wieku dzieci z RMA była wyższa, niż dzieci z RME (114 miesięcy vs 51 miesięcy). W tabeli 6 przedstawiono rozkład płci i wieku pacjentów w obrębie całej grupy badanej i w poszczególnych podtypach histologicznych MTM.

Tabela 6. Płeć i wiek dzieci w grupie badanej i poszczególnych podtypach histologicznych MTM

Table 6. Sex and age of children in the study group and in particular histological subtypes of STS

N (%) dz/ chl F / M.	Wiek (mies.) Age (months)	Typ MTM STS type n (%)	Wiek (mies.) Age (months)	Typ MTM STS type n (%)	Wiek (mies.) Age (months)
	min-max X / M	dz/ chl F / M.	min-max X / M	dz/ chl F / M.	min-max X / M
Grupa badana <i>Study group</i> 91 (100%) 38 / 53	0-227 101,1 / 105,7	RMS 66 (72,5%)	0-227 89 / 67	RME 46 (50,5%)	0-227 76 / 51
		28 / 38		RMA 20 (22%)	10-226 118 / 114
		NRMS 25 (27,5%)	2-214 121 / 132	MPNST 25 (27,5%)	2-214 121 / 132
		10 / 15		10 / 15	

W tabeli 7 zamieszczono charakterystykę grupy badanej z wyodrębnieniem klinicznych i patologicznych czynników prognostycznych u dzieci z MTM.

Tabela 7. Charakterystyka grupy badanej z wyodrębnieniem klinicznych i patologicznych czynników prognostycznych

Table 7. Characteristics of the study group with clinical and pathological prognostic factors

Czynniki prognostyczne w MTM <i>Prognostic factors in STS</i>		Liczba pacjentów (%grupy badanej) <i>Number of patients (% of the group)</i>
		91 (100%)
Wiek <i>Age</i>	<10 lat	53 (58,2%)
	≥10 lat	38 (41,8%)
Lokalizacja guza <i>Tumor site</i>	korzystna	20 (22%)
	niekorzystna	71 (78%)
Wielkość guza <i>Tumor size</i>	≤5 cm	29 (32%)
	>5 cm	61 (67%)
Inwazyjność guza <i>Tumor invasiveness</i>	T1	14 (15,4%)
	T2	77 (84,6%)
Zajęcie węzłów chłonnych <i>Lymph nodes involvement</i>	N0	68 (74,7%)
	N1	23 (25,3%)
Stadium IRS <i>IRS stage</i>	I	4 (4,4%)
	II	11 (12,1%)
	III	45 (49,5%)
	IV	31 (34%)
Histologia <i>Histology</i>	korzystna	46 (50,5%)
	niekorzystna	45 (49,5%)
Typ MTM <i>STS type</i>	RMS	66 (72,5%)
	NRMS	25 (27,5%)
Podtyp RMS <i>RMS subtype</i>	RME	46 (50,5%)
	RMA	20 (22%)
Doszczętność PE <i>Completeness of PE</i>	R0	6 (6,6%)
	R1	15 (16,5%)
	R2	14 (15,4%)
	biopsja	56 (61,5%)
Doszczętność SL <i>Completeness of SL</i>	R0	20 (22%)
	R1	13 (14,3%)
	R2	6 (6,6%)
Odpowiedź na CHT <i>Response to CHT</i>	dobra	52 (57,1%)
	zła	20 (22%)
Wznowa <i>Relapse</i>	nie	40 (44%)
	tak	51 (56%)
Zgon z PD <i>Death of PD</i>	nie	50 (54,9%)
	tak	41 (45,1%)

W badanej grupie dominowali chorzy w zaawansowanych stadiach choroby. Stadium III stwierdzono u 45 dzieci (49,5%), a stadium IV – u 31 (34%), podczas gdy stadia I i II – jedynie u 15 (16,5%) dzieci. U zdecydowanej większości chorych zabieg pierwotny obejmował jedynie biopsję diagnostyczną (56;

61,5%). Makroskopowe pozostałości nowotworu po PE stwierdzono u 70 dzieci (76,9%), u 15 (16,5%) zabieg pierwotny był mikroskopowo niedoszczętny i jedynie u sześciorga (6,6%) – doszczętny mikroskopowo.

U większości pacjentów największa średnica guza pierwotnego przekraczała 5 cm (61 chorych; 67%). U 77 (84,6%) badanych guz wykroczył poza narząd, z którego się wywodził (cecha T2).

W badanej grupie guzy pierwotne lokalizowały się w obrębie:

- narządów wewnętrznych (lokalizacja tzw. inna – u 25 chorych; 27,5%);
- kończyn – u 22 dzieci (24,2%);
- głowy i szyi – u 19 dzieci (20,9%);
 - w okolicy okołooponowej u 11 (12,1%);
 - w okolicy nieokołooponowej u 8 (8,8%);
- układu moczowo-płciowego – u 18 dzieci (19,8%);
 - z zajęciem pęcherza moczowego/prostaty u 5 (5,5%);
 - bez zajęcia pęcherza moczowego/prostaty u 13 (14,3%);
- u jednego chorego nie wykazano ogniska pierwotnego nowotworu.

U większości chorych (71 dzieci, 78%) lokalizacja guza zakwalifikowana została jako niekorzystna rokowniczo.

Odpowiedź na CHT można było ocenić u 72 chorych. Dobrą odpowiedź na CHT odnotowano u 52 z nich (72,2%), zaś złą – u 20 (27,8%).

Odroczoną resekcję guza przeprowadzono u 39 chorych (42,9% grupy badanej). U 20 z nich (51,3% dzieci poddanych operacji SL) doszczętność zabiegu oceniono jako R0, u 13 (33,3%) – jako R1, zaś u sześciu (15,4%) – jako R2.

Wznowa choroby wystąpiła u 51 chorych (56%). U 27 pacjentów (52,9% dzieci ze wznową) była to wznowa lokalna, u sześciu (11,8%) – regionalna, u 13 (25,5%) – przerzutowa i u pięciu (9,8%) – mieszana. W badanej grupie żyje 50 (54,9%) chorych z okresem obserwacji od 2,4 do 239 miesięcy, średnia 74,7 miesiąca, mediana 59 miesięcy. Zmarło 41 dzieci (45,1% grupy badanej) – wszystkie w wyniku progresji choroby nowotworowej. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w grupie badanej wynosiło $37,4 \pm 5,6\%$, zaś prawdopodobieństwo 5-letniego OS – $48,8 \pm 5,9\%$.

4.2 Wpływ czynników kliniczno-prognostycznych na EFS i OS u dzieci z MTM

W badanej grupie dzieci z MTM przeanalizowano, które z uznanych prognostycznych czynników kliniczno-patologicznych w sposób statystycznie istotny wpływają na EFS i OS.

W analizie jednoczynnikowej wykazano, iż w badanej grupie na EFS wpływały znamienne: wiek, stadium zaawansowania i odpowiedź na CHT. **W analizie wieloczynnikowej stwierdzono, że odpowiedź na CHT i stadium choroby były niezależnymi czynnikami prognostycznymi dla EFS u dzieci z MTM (tabela 8).**

Tabela 8. Wyniki analizy wieloczynnikowej potwierdzające niezależny wpływ stadium zaawansowania i odpowiedzi na CHT na EFS u pacjentów z MTM

Table 8. Results of multivariate analysis showing the independent influence of stage and response to CHT on EFS in patients with STS

	Beta	Ryzyko względne (HR) <i>Hazard Risk (HR)</i>	p
Stadium zaawansowania MTM <i>STS stage</i>	0,661728	1,938139	0,004165
Odpowiedź na CHT <i>Response to CHT</i>	0,812169	2,252789	0,000261

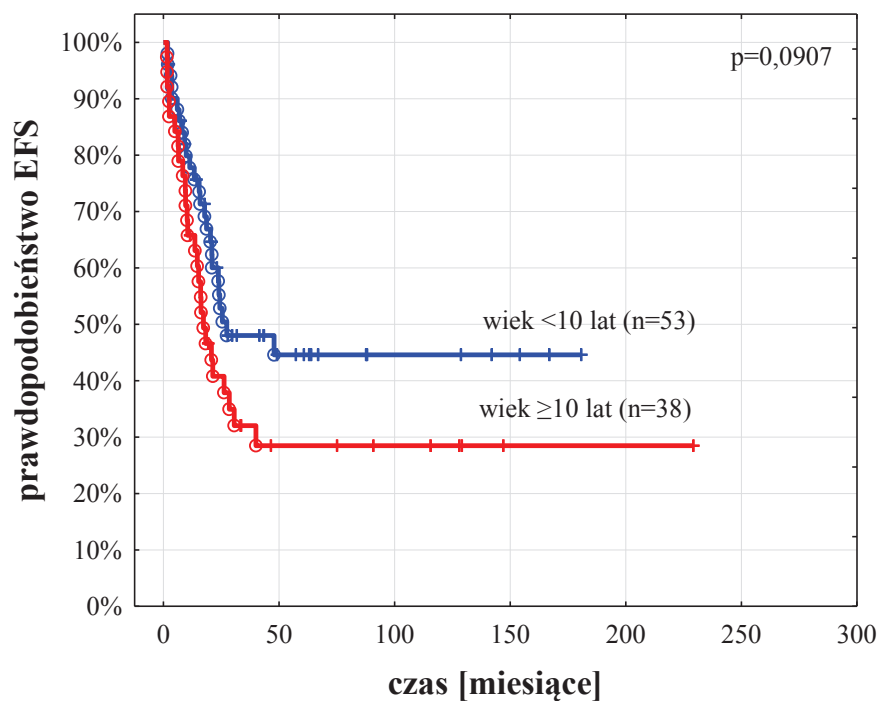
Z kolei do czynników kliniczno-patologicznych, wpływających statystycznie istotnie na OS zaliczono: wiek, histologię guza, zajęcie węzłów chłonnych, stadium zaawansowania i odpowiedź na CHT. Spośród tych czynników tylko **zajęcie węzłów chłonnych i odpowiedź na CHT okazały się niezależnymi czynnikami prognostycznymi dla OS w analizie wieloczynnikowej Coxa**, co przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 9. Wyniki analizy wieloczynnikowej potwierdzające niezależny wpływ zajęcia węzłów chłonnych i odpowiedzi na CHT na OS u pacjentów z MTM

Table 9. Results of multivariate analysis showing the independent influence of lymph nodes involvement and response to CHT in patients with STS

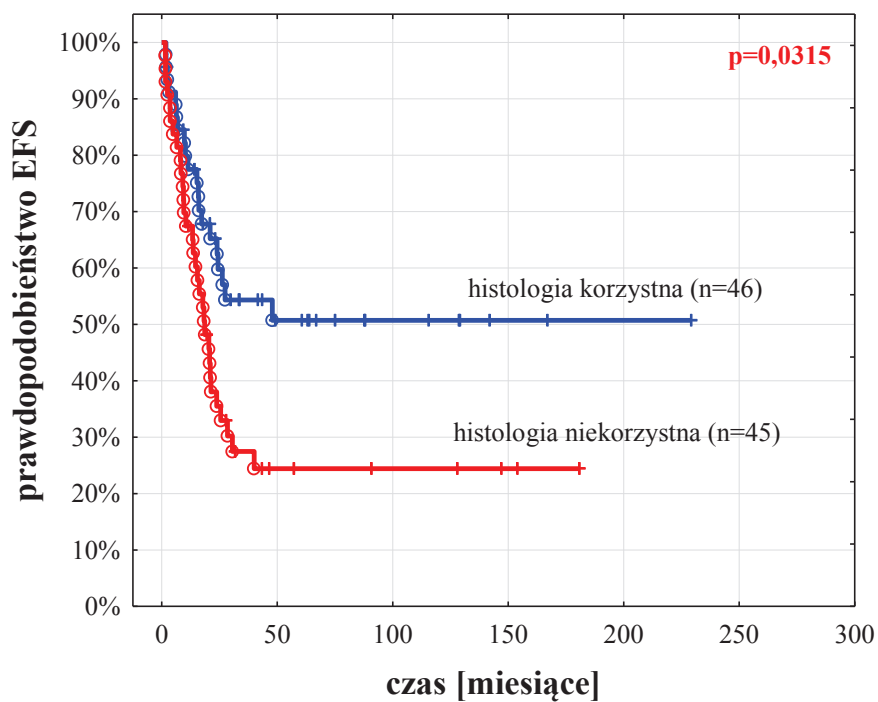
	Beta	Ryzyko względne (HR) <i>Hazard Risk (HR)</i>	p
Zajęcie węzłów chłonnych <i>Lymph nodes involvement</i>	1,17	3,23	0,00035
Odpowiedź na CHT <i>Response to CHT</i>	1,08	2,94	0,00279

Na ryc. 7-16 przedstawiono krzywe EFS i OS dla podgrup chorych z korzystnymi i niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi.



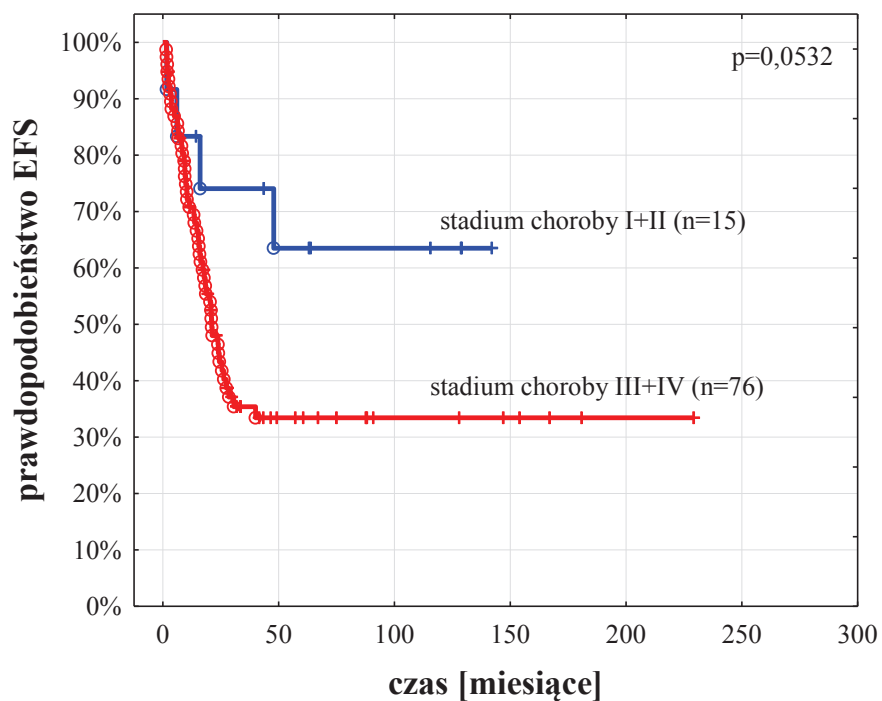
Ryc. 7. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od wieku chorych
(grupa badana N=91; $p=0,0907$)
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów <10 lat ($n=53$) = $44,6\pm 7,7\%$;
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ≥ 10 lat ($n=38$) = $28,5\pm 7,7\%$

*Fig. 7. EFS curves in children with STS in relation to the age of patients
(study group N=91; $p=0,0907$)
the probability of the 5-year EFS in patients <10 years ($n=53$) = $44,6\pm 7,7\%$;
the probability of the 5-year EFS in patients ≥ 10 years ($n=38$) = $28,5\pm 7,7\%$*



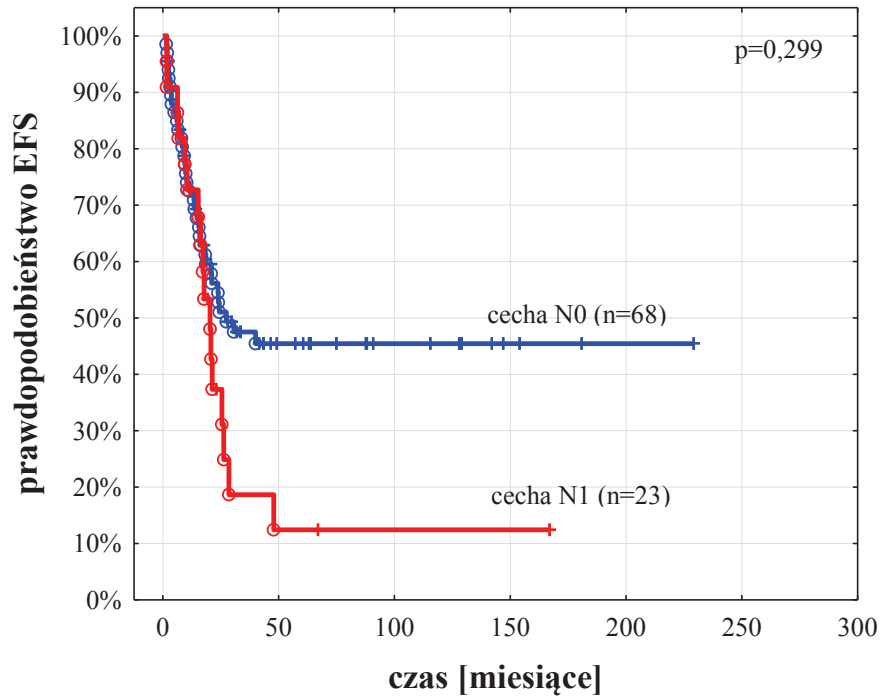
Ryc. 8. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od histologii guza
 (grupa badana N=91, $p=0,0315$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z histologią korzystną (n=46) = $50,7 \pm 8,1\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z histologią niekorzystną (n=45)
 = $24,4 \pm 6,9\%$

*Fig. 8. EFS curves in children with STS in relation to the tumor histology
 (study group N=91; $p=0,0315$)
 the probability of the 5-year EFS in patients with favorable histology (n=46) = $50,7 \pm 8,1\%$
 the probability of the 5-year EFS in patients with unfavorable histology (n=45) = $24,4 \pm 6,9\%$*



Ryc. 9. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od stadium choroby (grupa badana N=91, $p=0,0532$)
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów w stadium I+II ($n=15$) = $63,4 \pm 14,8\%$
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów w stadium III+IV ($n=76$) = $33,4 \pm 5,8\%$

*Fig. 9. EFS curves in children with STS in relation to the disease stage (study group N=91, $p=0,0532$)
the probability of the 5-year EFS in patients in stage I+II ($n=15$) = $63,4 \pm 14,8\%$
the probability of the 5-year EFS in patients in stage III+IV ($n=76$) = $33,4 \pm 5,8\%$*

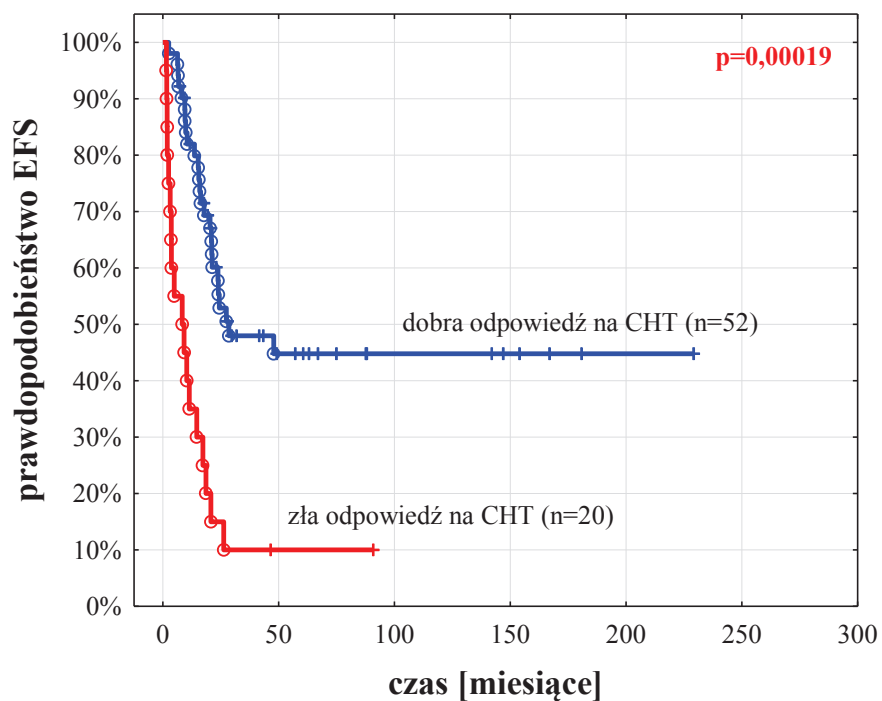


Ryc. 10. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od zajęcia węzłów chłonnych
(grupa badana N=91; p=0,299)

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z cechą N0 (n=68) = 45,5±6,4%
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z cechą N1 (n=23) = 12,4±8,0%

Fig. 10. EFS curves in children with STS in relation to the lymph nodes involvement
(study group N=91; p=0,299)

the probability of the 5-year EFS in patients with N0 (n=68) = 45,5±6,4%
the probability of the 5-year EFS in patients with N1 (n=23) = 12,4±8,0%



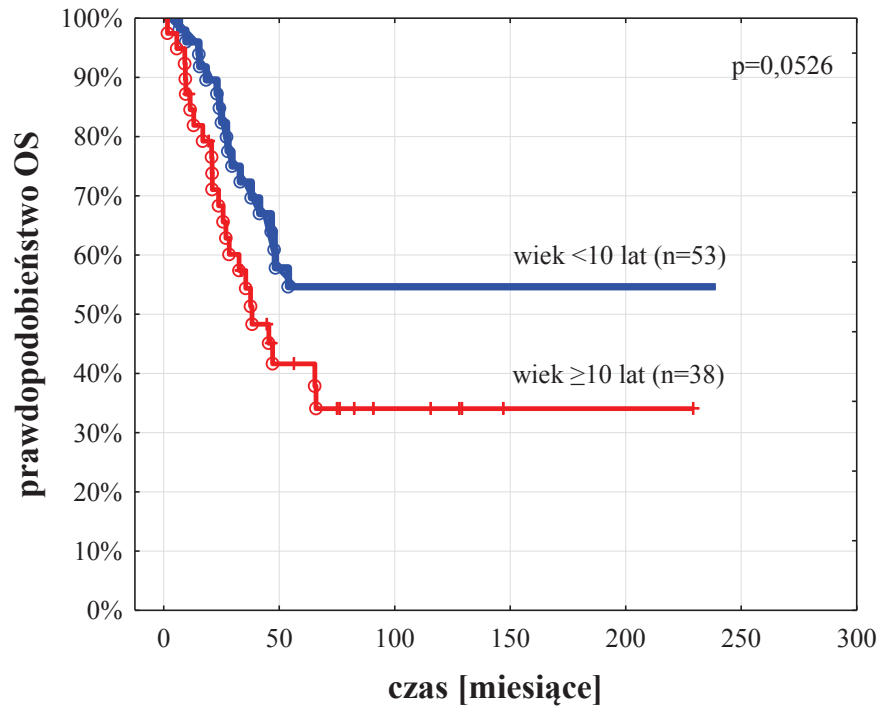
Ryc. 11. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od odpowiedzi na CHT
(grupa badana N=72; $p=0,00019$)

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z dobrą odpowiedzią na CHT (n=52)
= 44,8±7,7%

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ze złą odpowiedzią na CHT (n=20)
= 10,0±6,7%

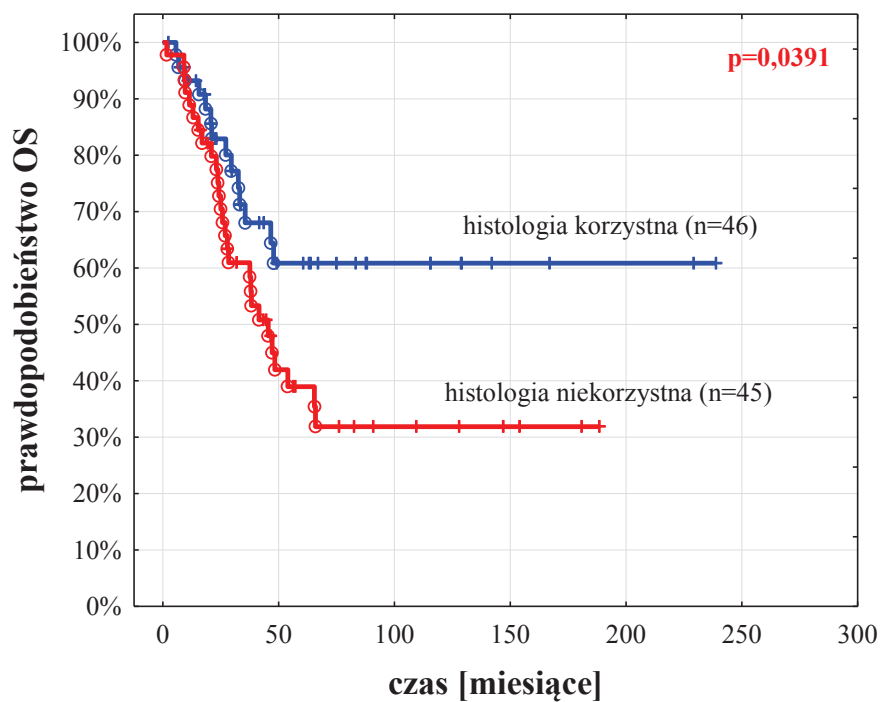
Fig. 11. EFS curves in children with STS in relation to the response to CHT
(study group N=72; $p=0,00019$)

the probability of the 5-year EFS in patients with good response to CHT (n=52) = 44,8±7,7%
the probability of the 5-year EFS in patients with poor response to CHT (n=20) = 10,0±6,7%



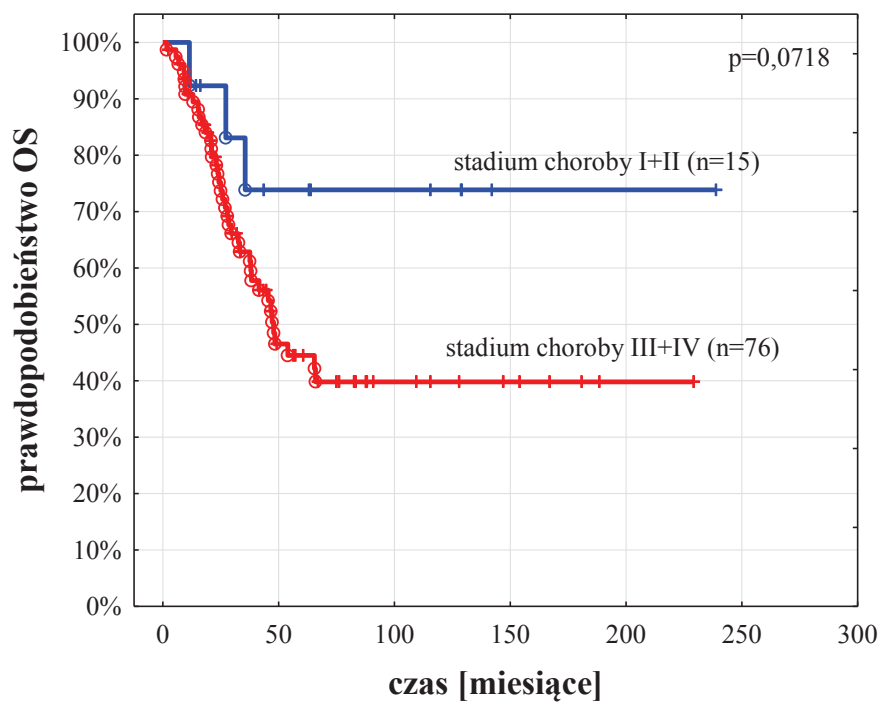
Ryc. 12. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od wieku chorych
 (grupa badana N=91; $p=0,0526$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów <10 lat ($n=53$) = $54,6\pm 8,2\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ≥ 10 lat ($n=38$) = $41,6\pm 8,4\%$

*Fig. 12. OS curves in children with STS in relation to the age of patients
 (study group N=91; $p=0,0526$)
 the probability of the 5-year OS in patients <10 years ($n=53$) = $54,6\pm 8,2\%$
 the probability of the 5-year OS in patients ≥ 10 years ($n=38$) = $41,6\pm 8,4\%$*



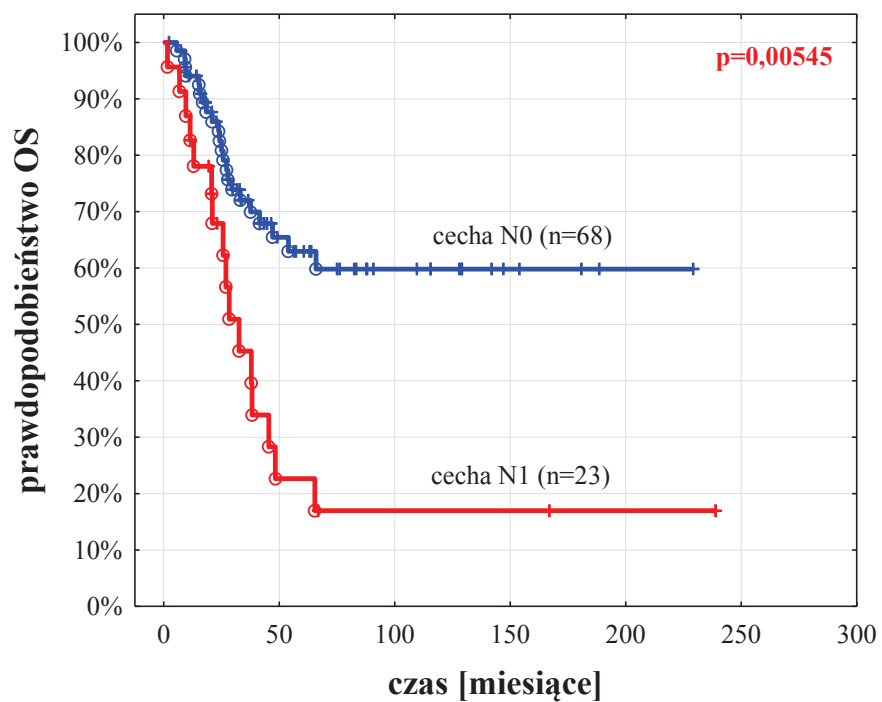
Ryc. 13. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od histologii guza pierwotnego (grupa badana N=91; $p=0,0391$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z histologią korzystną (n=46) = $60,9 \pm 8,4\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z histologią niekorzystną (n=45) = $39,0 \pm 7,9\%$

*Fig. 13. OS curves in children with STS in relation to the tumor histology (study group N=91; $p=0,0391$)
 the probability of the 5-year OS in patients with favorable histology (n=46) = $60,9 \pm 8,4\%$
 the probability of the 5-year OS in patients with unfavorable histology (n=45) = $39,0 \pm 7,9\%$*



Ryc. 14. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od stadium choroby
 (grupa badana N=91; p=0,0718)
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów w stadium I+II (n=15) = 73,8±13,1%
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów w stadium III+IV (n=76) = 44,5±6,4%

*Fig. 14. OS curves in children with STS in relation to the disease stage
 (study group N=91; p=0,0718)
 the probability of the 5-year OS in patients in stage I+II (n=15) = 73,8±13,1%
 the probability of the 5-year OS in patients in stage III+IV (n=76) = 44,5±6,4%*

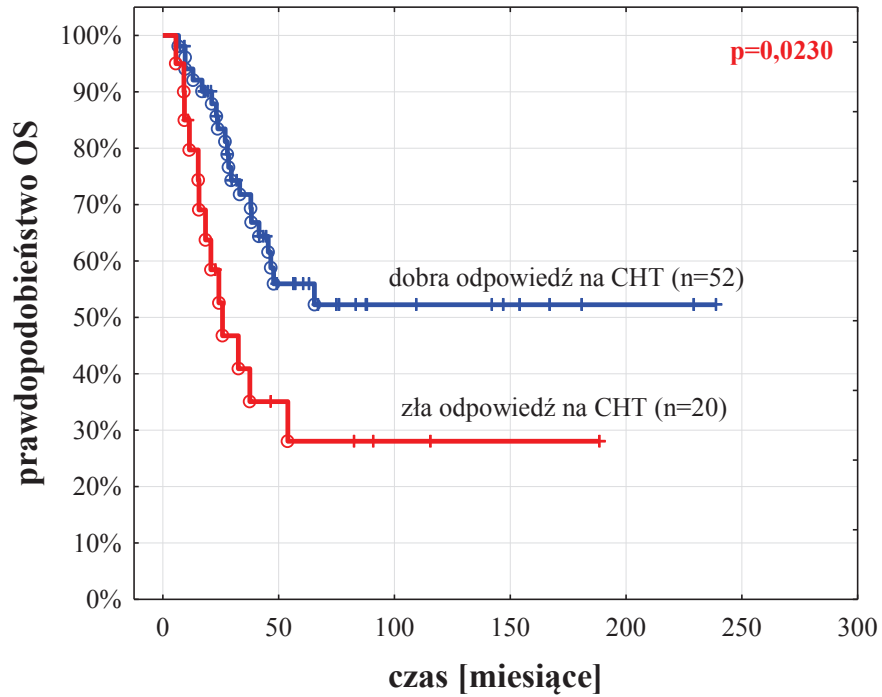


Ryc. 15. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od zajęcia węzłów chłonnych (grupa badana N=91; $p=0,00545$)

prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z cechą N0 (n=68) = 58,4±6,8%
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z cechą N1 (n=23) = 23,1±9,6%

Fig. 15. OS curves in children with STS in relation to the lymph nodes involvement (study group N=91; $p=0,00545$)

the probability of the 5-year OS in patients with N0 (n=68) = 58,4±6,8%
 the probability of the 5-year OS in patients with N1 (n=23) = 23,1±9,6%



Ryc. 16. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od odpowiedzi na CHT
 (grupa badana $N=72$; $p=0,0230$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z dobrą odpowiedzią na CHT ($n=52$)
 = $56,0 \pm 7,8\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ze złą odpowiedzią na CHT ($n=20$)
 = $28,1 \pm 11,0\%$

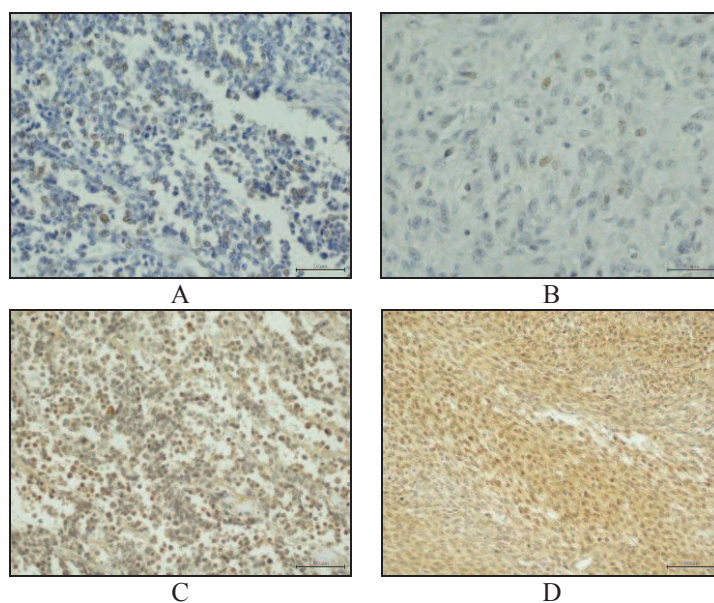
*Fig. 16. OS curves in children with STS in relation to the response to CHT
 (study group $N=72$; $p=0,0230$)
 the probability of the 5-year OS in patients with good response to CHT ($n=52$) = $56,0 \pm 7,8\%$
 the probability of the 5-year OS in patients with poor response to CHT ($n=20$) = $28,1 \pm 11,0\%$*

4.3 Badania IHC HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz Ki-67 w MTM u dzieci

W przypadku ekspresji HIF-1 α oceniano odczyn jądrowy, w przypadku GLUT-1 – reaktywność błonową i cytoplazmatyczną, CA IX – reaktywność cytoplazmatyczną i błonową oraz VEGF – odczyn cytoplazmatyczny. W przypadku antygenu Ki-67 oceniano odczyn jądrowy.

Poszczególne poziomy ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF przedstawiono na ryc. 17-20.

Przykładowe indeksy proliferacyjne Ki-67 przedstawiono na ryc. 21.

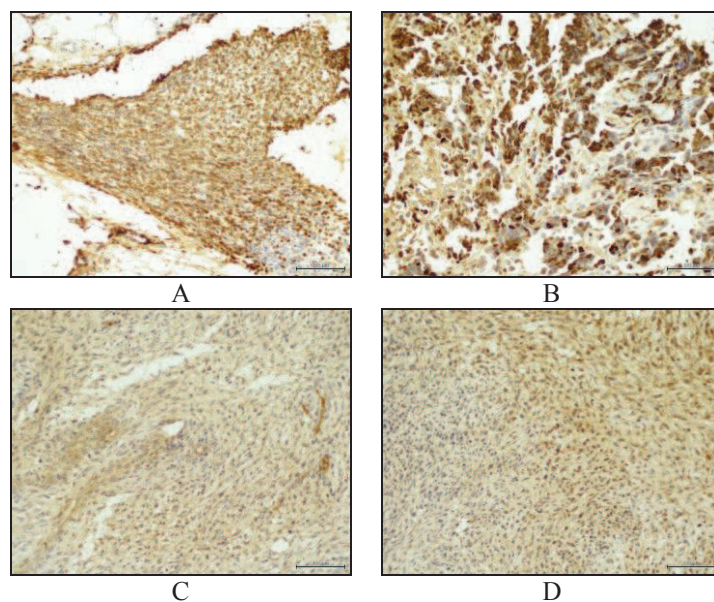


Ryc. 17. Jądrowa immunoreaktywność HIF-1 α w różnych typach MTM u dzieci

- A. RME (200x) – słaba immunoreaktywność;
- B. RME (400x) – słaba immunoreaktywność;
- C. RMA (200x) – silna immunoreaktywność;
- D. MPNST (100x) – silna immunoreaktywność

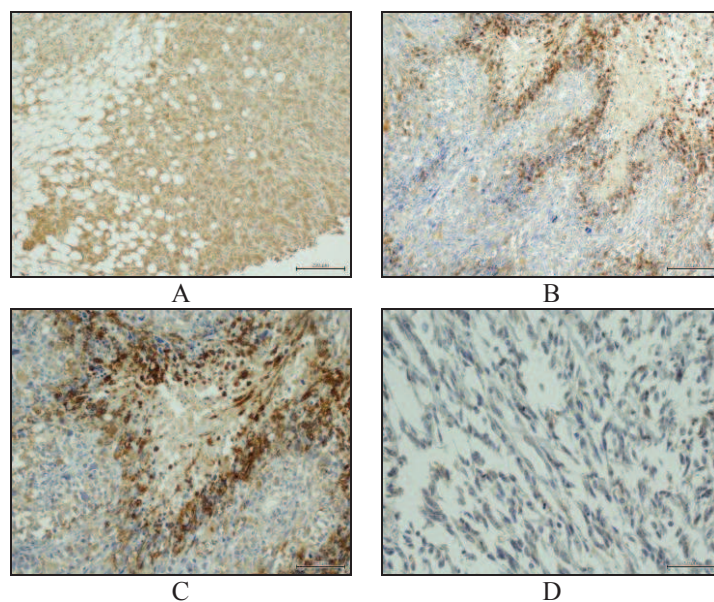
Fig. 17. The nuclear immunoreactivity of HIF-1 α in various types of pediatric STS

- A. RME (200x) – low immunoreactivity;*
- B. RME (400x) – low immunoreactivity;*
- C. RMA (200x) – high immunoreactivity;*
- D. MPNST (100x) – high immunoreactivity*



Ryc. 18. Silna błonowo-cytoplazmatyczna ekspresja GLUT-1
A. RME (100x) – odczynowość (+++) w większości komórek;
B. RME (400x) – odczynowość (+++) w większości komórek;
C. MPNST (100x) – odczynowość (++) w >90% komórek;
D. MPNST (200x) – odczynowość (++) w >90% komórek

*Fig. 18. The membrane-cytoplasmic expression of the GLUT-1
A. RME (100x) – reactivity (+++) in the majority of the cells;
B. RME (400x) reactivity (+++) in the majority of the cells
C. MPNST (100x) – reactivity (++) in >90% of the cells
D. MPNST (200x) – reactivity (++) in >90% of the cells*

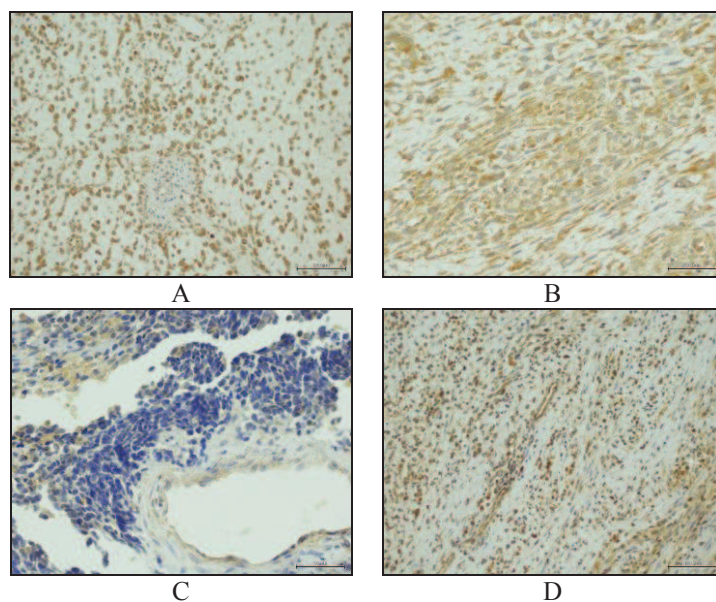


Ryc. 19. Immunobarwienie w kierunku CA IX

- A. RME (100x) – rozlana średnionasilona reakcja cytoplazmatyczna – ekspresja silna;
 B. RME (100x) – nasilona reakcja barwna w komórkach strefy okołomartwicznej – ekspresja silna;
 C. RME (200x) – nasilona reakcja barwna w komórkach strefy okołomartwicznej – ekspresja silna;
 D. MPNST (200x) – słaba reakcja barwna w < 50% komórek – ekspresja słaba

Fig. 19. The immunostaining towards CA IX

- A. RME (100x) – diffuse intermediate cytoplasmic reaction – high expression;
 B. RME (100x) – strong intensity of cytoplasmic immunostaining in the cells of perinecrotic area – high expression;
 C. RME (200x) – strong intensity of cytoplasmic immunostaining in the cells of perinecrotic area – high expression;
 D. MPNST (200x) – weak cytoplasmic immunostaining in < 50% of cells – low expression*

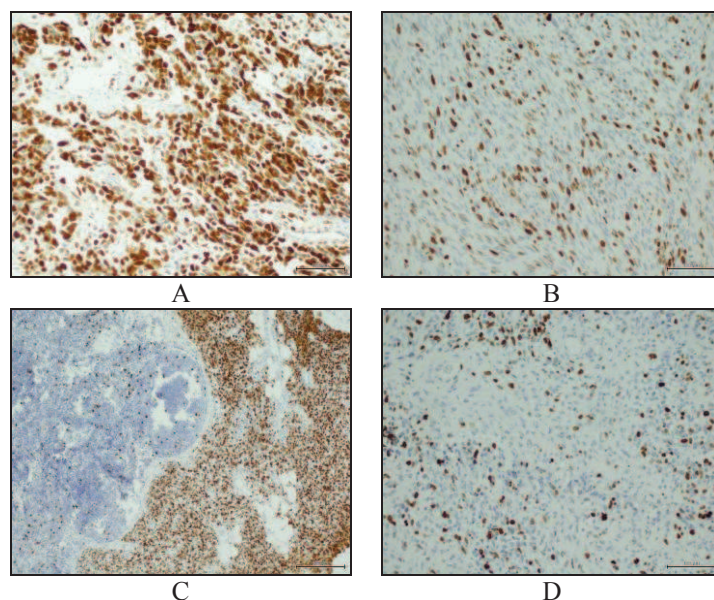


Ryc. 20. Cytoplazmatyczna ekspresja VEGF

- A. RME (100x) – silna ekspresja;
- B. MPNST (200x) – silna immunoreaktywność;
- C. RME (200x) – większość komórek immunonegatywnych;
- D. RMA (100x) – silna ekspresja w ok. 80% komórek

Fig. 20. The cytoplasmic expression of VEGF

- A. RME (100x) – high expression;*
- B. MPNST (200x) – high immunoreactivity;*
- C. RME (200x) – most of the cells immunonegative;*
- D. RMA (100x) – high expression in approximately 80% of cells*



Ryc. 21. Indeks proliferacyjny Ki-67 (IK67)

- A. RME (400x) – pozytywne barwienie na obecność antygenu jądrowego Ki-67 w ok. 90% komórek – wysoki IK67;
- B. MPNST (200x) – pozytywne barwienie na obecność antygenu jądrowego Ki-67 w ok. 25% komórek – niski IK67;
- C. RME (100x) – indeks Ki-67 ok. 90% w tkance nowotworowej (wysoki IK67) oraz węzeł chłonny jako tkanka kontrolna z IK67 ok. 10% (niski IK67);
- D. RMS (200x) – pozytywne barwienie na obecność antygenu jądrowego Ki-67 w ok. 12% komórek – niski IK67

Fig. 21. The proliferative index Ki-67 (IK67)

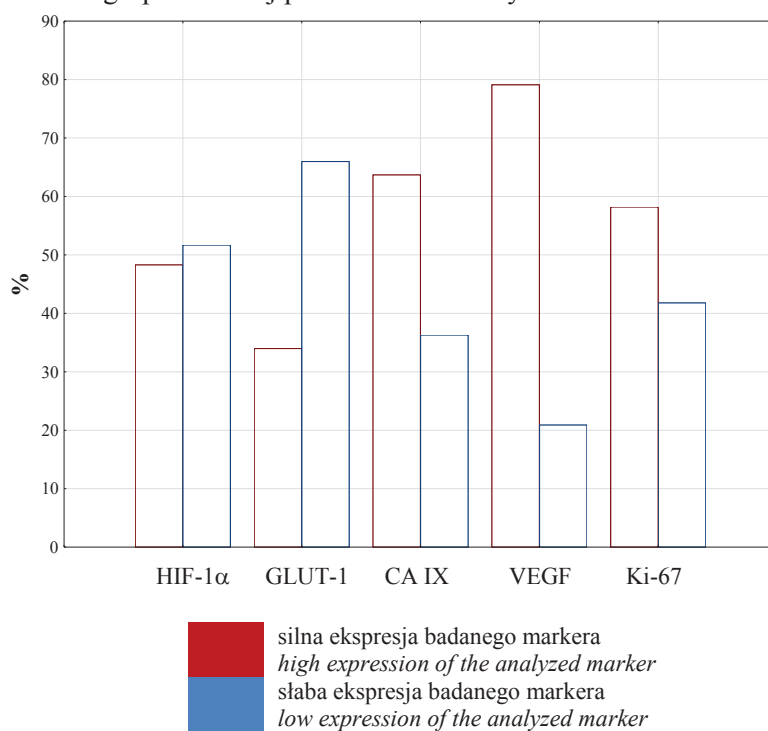
- RME (400x) – positive immunostaining for the presence of nuclear antigen Ki-67 in approximately 90% of cells – high IK67;*
- B. MPNST (200x) – positive immunostaining for the presence of nuclear antigen Ki-67 in approximately 25% of cells – low IK67;*
- C. RME (100x) – index Ki-67 of approximately 90% in sarcoma tissue (high IK67) and lymph node as a control tissue with IK67 about 10% (low IK67);*
- D. RMS (200x) – positive immunostaining for the presence of nuclear antigen Ki-67 in approximately 12% of cells – low IK67*

4.4 Częstość występowania silnej ekspresji markerów hipoksji i wysokiego indeksu Ki-67 w badanej grupie dzieci z MTM

Prawie 80% pacjentów z grupy badanej wykazało silną ekspresję VEGF (72 chorych, 79%). Silną ekspresję CA IX stwierdzono u 63,7% (58 chorych), HIF-1 α u 48,3% (44 chorych), zaś GLUT-1 – u 34% (31 chorych). Wartość indeksu proliferacyjnego Ki-67 wahała się od 3% do 80%, ze średnią wartością 34,8% i medianą 33%. Odsetek chorych z indeksem Ki-67 $\geq 30\%$ wyniósł 58,2% (53 chorych).

U sześciu chorych (6,6%) nie stwierdzono silnej ekspresji żadnego z analizowanych markerów. Silną ekspresję jednego markera stwierdzono u 16 dzieci (17,6%), dwóch markerów u 17 (18,7%), a trzech u 14 (15,4%) pacjentów. Silną ekspresję czterech lub wszystkich pięciu markerów wykazano u 24 (26,3%) i 14 (15,4%) dzieci, odpowiednio.

Częstość występowania silnej i słabej ekspresji markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 w grupie badanej przedstawiono na ryc. 22.



Ryc. 22 Częstość występowania silnej i słabej ekspresji markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 w grupie badanej

Fig. 22. The incidence of the high and low expression of the markers of hypoxia and Ki-67 index in the study group

4.5 Wzajemna korelacja pomiędzy badanymi markerami

Wyniki wzajemnej korelacji pomiędzy ekspresją badanych endogennych markerów hipoksji oraz wartością indeksu Ki-67, badane metodą korelacji Spearmana, przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Wzajemna korelacja pomiędzy ekspresją badanych markerów hipoksji oraz indeksem proliferacyjnym Ki-67, badana metodą Spearmana

Table 10. Correlation between the expression of analyzed markers of hypoxia and the Ki-67 proliferative index, according to the Spearman method

	GLUT-1		HIF-1 α		CA IX		VEGF	
	r	p	r	p	r	p	r	p
HIF-1α	0,33	0,00165						
CA IX	0,45	0,00001	0,18	0,0861				
VEGF	0,26	0,0147	0,33	0,00118	0,40	0,00009		
Ki-67	0,29	0,00572	0,27	0,00882	0,16	0,123	0,22	0,0371

Wykazano wzajemną dodatnią korelację pomiędzy prawie wszystkimi analizowanymi markerami hipoksji. Oznacza to, że silna ekspresja jednego z badanych markerów związana była z silną ekspresją innego markera, a słaba ekspresja danego markera korelowała ze słabą ekspresją innego markera. Pomędzy ekspresją CA IX i HIF-1 α zauważono dodatnią korelację, jednak nie była ona istotna statystycznie (p=0,0861).

Za wyjątkiem CA IX, wszystkie pozostałe markery hipoksji (HIF-1 α , GLUT-1 i VEGF) w sposób statystycznie znamieny korelowały dodatnio z wartością indeksu Ki-67.

4.6 Związek stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 z kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z MTM

4.6.1 Częstość występowania silnej ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz wysokiego indeksu Ki-67, a obecność korzystnych i niekorzystnych czynników prognostycznych u dzieci z MTM

W tabeli 11. przedstawiono częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów w zależności od obecności poszczególnych czynników prognostycznych u dzieci z MTM.

Tabela 11. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów w zależności od obecności czynników prognostycznych u dzieci z MTM
 Table 11. The incidence of low and high expression of analyzed markers in relation to the presence of prognostic factors in children with STS

	Cala grupa whole group	H-HIF1 α	L-HIF1 α	p	H-GLUT-1	L-GLUT-1	p	H-CA IX	L-CA IX	p	H-VEGF	L-VEGF	p	H-Ki-67	L-Ki-67	p
Liczba pacjentów (%) Number of patients (%)	91	44 (48,3)	47 (51,7)		31 (34)	60 (66)		58 (63,7)	33 (36,3)		72 (79,1)	19 (20,9)		53 (58,2)	8 (41,8)	
Wiek <10 lat Age <10 years	55	24 (43,6)	31 (56,4)	0,369	18 (32,7)	37 (67,3)	0,843	35 (63,6)	20 (36,4)	0,843	44 (80)	11 (20)	0,993	33 (60)	22 (40)	0,839
Wiek ≥10 lat Age ≥10 years	36	20 (55,6)	16 (44,4)	0,369	13 (36,1)	23 (63,9)	0,915	23 (63,9)	13 (36,1)	0,843	28 (77,8)	8 (22,2)	0,993	20 (55,6)	16 (44,4)	0,839
Lokalizacja guza korzystna Favorable tumor site	20	6 (30)	14 (70)	0,108	3 (15)	17 (85)	0,0768	11 (55)	9 (45)	0,0389	13 (65)	7 (35)	0,148	11 (55)	9 (45)	0,939
Lokalizacja guza niekorzystna Unfavorable tumor site	71	38 (53,5)	33 (46,5)	0,108	28 (39,4)	43 (60,6)	0,0768	47 (66,2)	24 (33,8)	0,0389	59 (83,1)	12 (16,9)	0,148	42 (59,2)	29 (40,8)	0,939
Wielkość guza ≤5 cm Tumor size ≤5 cm	29	14 (48,3)	15 (51,7)	0,872	8 (27,6)	21 (72,4)	0,480	15 (51,7)	14 (48,3)	0,180	23 (79,3)	6 (20,7)	0,835	17 (58,6)	12 (41,4)	0,847
Wielkość guza >5 cm Tumor size >5 cm	61	29 (47,5)	32 (52,5)	0,872	23 (37,7)	38 (62,3)	0,480	42 (68,9)	19 (31,1)	0,180	48 (78,7)	13 (21,3)	0,835	36 (59)	25 (41)	0,847
Inwazyjność guza T1 Tumor invasiveness T1	14	8 (57,1)	6 (42,9)	0,671	5 (35,7)	9 (64,3)	0,869	6 (42,9)	8 (57,1)	0,143	11 (78,6)	3 (21,4)	0,762	9 (64,3)	5 (35,7)	0,838
Inwazyjność guza T2 Tumor invasiveness T2	77	36 (46,8)	41 (53,2)	0,671	26 (33,8)	51 (66,2)	0,869	52 (67,5)	25 (32,5)	0,143	61 (79,2)	16 (20,8)	0,762	44 (57,1)	33 (42,9)	0,838
N0	68	27 (39,7)	41 (60,3)	0,0094	20 (29,4)	48 (70,6)	0,175	43 (63,2)	25 (36,8)	0,936	52 (76,5)	16 (23,5)	0,440	36 (52,9)	32 (47,1)	0,129
N1	23	17 (73,9)	6 (26,1)	0,0094	11 (47,8)	12 (52,2)	0,175	15 (65,2)	8 (34,8)	0,936	20 (87)	3 (13)	0,440	17 (73,9)	6 (26,1)	0,129
Stadium IRS I IRS stage I	4	1 (25)	3 (75)	0,1	1 (25)	3 (75)	0,8	2 (50)	2 (50)	0,0	2 (50)	2 (50)	10	3 (75)	1 (25)	0,17

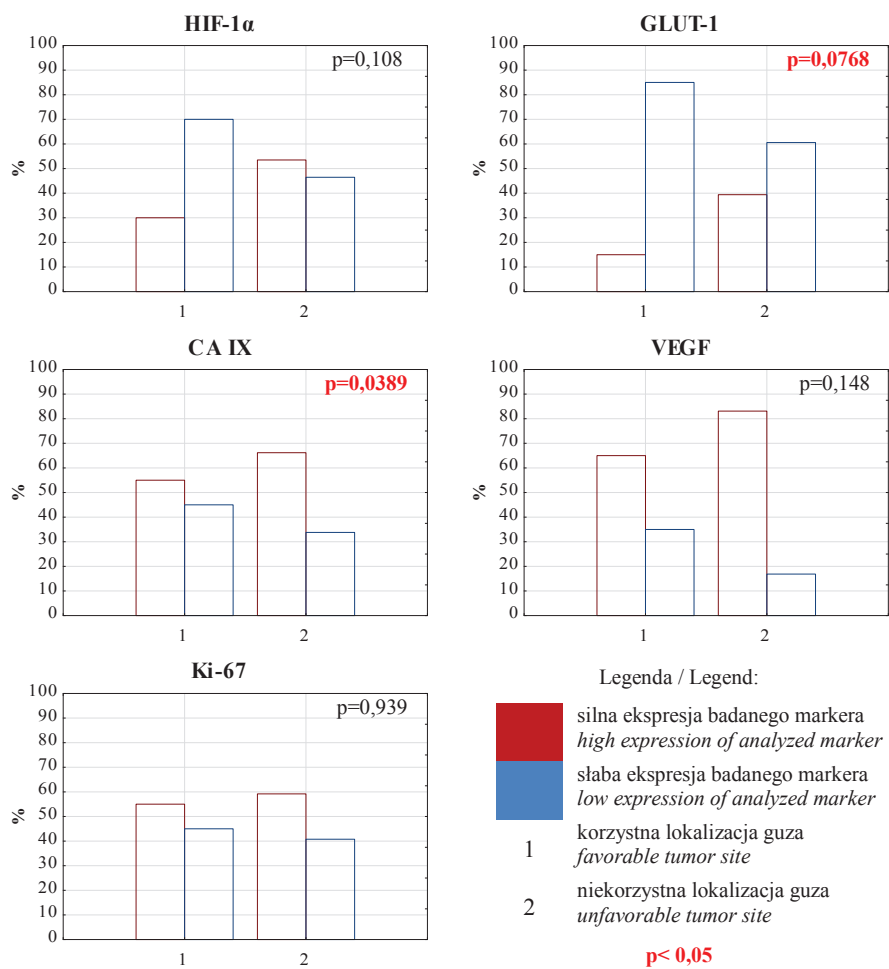
W badanej grupie wykazano statystycznie częstsze występowanie silnej ekspresji HIF-1 α u chorych w wyższych stadiach zaawansowania MTM ($p=0,0152$), u dzieci z zajęciem węzłów chłonnych ($p=0,0094$), u pacjentów z niekorzystną rokowniczo histologią ($p=0,00467$) i podtypem RMA ($p=0,00362$).

Silną ekspresję GLUT-1 istotnie częściej stwierdzano w guzach z podtypem histologicznym RMA ($p=0,0109$). Marker ten występował również częściej u pacjentów z guzem pierwotnym o niekorzystnej lokalizacji w wysokich stadiach zaawansowania i z niekorzystną histologią, jednak nie wykazano istotności statystycznej ($p=0,0768$, $p=0,0811$ i $p=0,0650$, odpowiednio).

Z kolei silna ekspresja CA IX zamiennie częściej towarzyszyła histologii RMA ($p=0,0179$), niekorzystnej lokalizacji guza ($p=0,0389$) i wysokiemu stadium zaawansowania ($p=0,00581$). Silna ekspresja VEGF występowała statystycznie istotnie częściej u pacjentów z niekorzystną histologią i podtypem RMA ($p=0,0116$ i $p=0,0260$, odpowiednio).

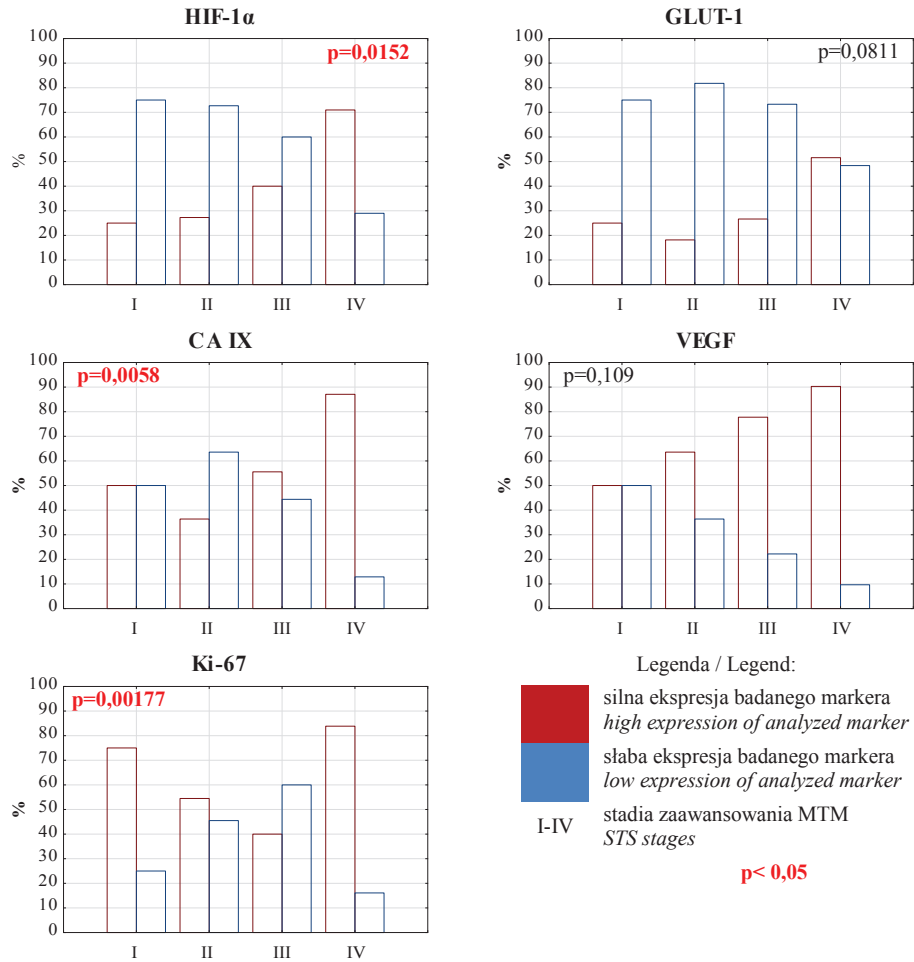
Wysoką wartość indeksu Ki-67 stwierdzano statystycznie częściej jedynie u chorych z wysokimi stadiami zaawansowania choroby ($p=0,00177$). W pozostałych podgrupach prognostycznych wartość IK67 nie różniła się istotnie statystycznie.

Na ryc. 23-27. przedstawiono odsetek pacjentów z silną i słabą ekspresją badanych markerów hipoksji oraz odsetek chorych z wysokim i niskim indeksem Ki-67 w zależności od lokalizacji guza pierwotnego, stadium zaawansowania nowotworu, histologii MTM, podtypu RMS i zajęcia węzłów chłonnych.



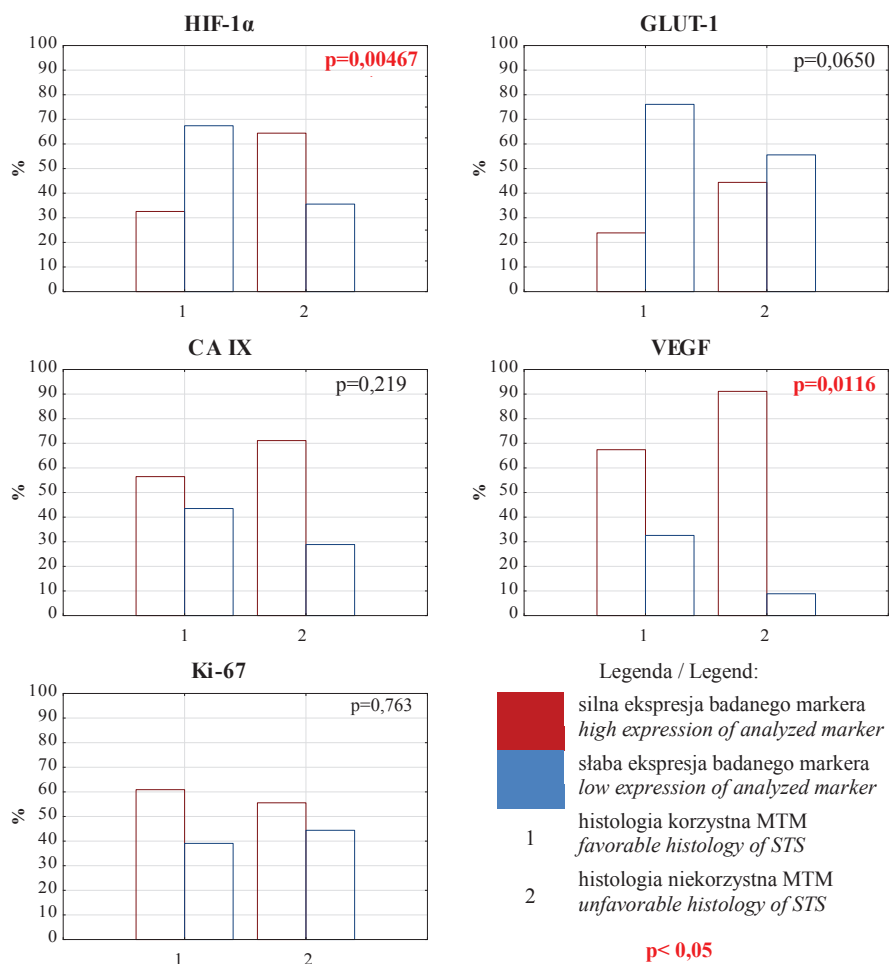
Ryc. 23. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 w zależności od lokalizacji guza pierwotnego (korzystna vs niekorzystna)

Fig. 23. The incidence of high and low expression of analyzed markers of hypoxia and Ki-67 index in relation to the primary tumor localization (favorable vs unfavorable)



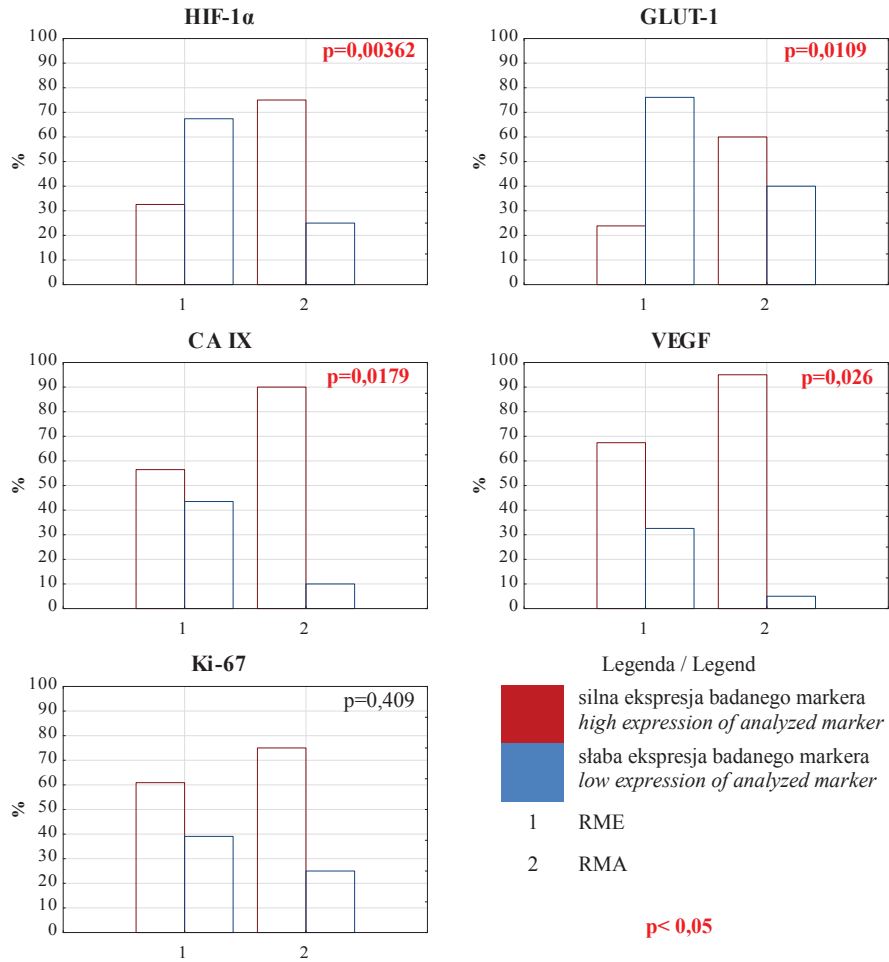
Ryc. 24. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 w zależności od stadium zaawansowania nowotworu

Fig. 24. The incidence of high and low expression of analyzed markers of hypoxia and Ki-67 index in relation to the cancer stage



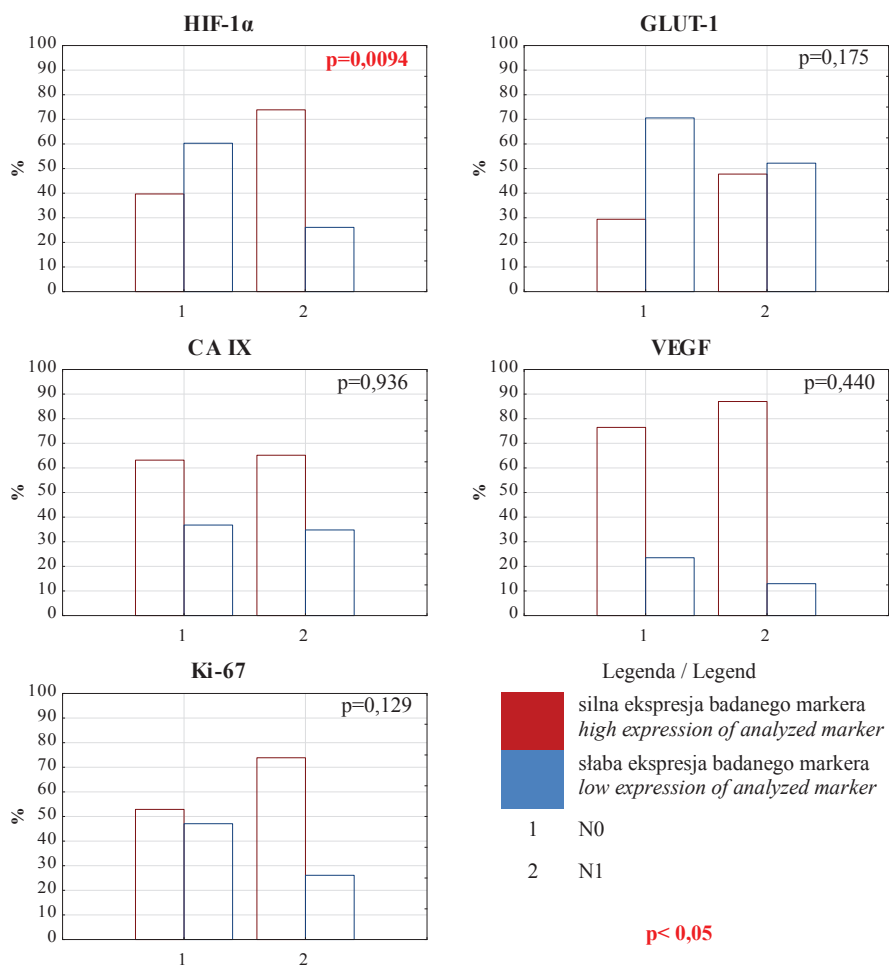
Ryc. 25. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 w zależności od histologii MTM (korzystna vs niekorzystna)

Fig. 25. The incidence of high and low expression of analyzed markers of hypoxia and Ki-67 index in relation to the histology of STS (favorable vs unfavorable)



Ryc. 26. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 w zależności od podtypu RMS (RME vs RMA)

Fig. 26. The incidence of high and low expression of analyzed markers of hypoxia and Ki-67 index in relation to the RMS subtype (RME vs RMA)



Ryc. 27. Częstość występowania silnej i słabej ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 w zależności od zajęcia węzłów chłonnych (N0 vs N1)

Fig. 27. The incidence of high and low expression of analyzed markers of hypoxia and Ki-67 index in relation to the lymph nodes involvement (N0 vs N1)

Wykazano, że pacjenci z bardziej zaawansowaną chorobą, a zwłaszcza w stadium przerzutowym, statystycznie istotnie częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α , CA IX i wyższą wartość indeksu Ki-67. U pacjentów z przerzutami odległymi markery te wykryto w guzie nowotworowym odpowiednio w: 71%, 87,1% i 83,9% przypadków, w porównaniu do 36,7%, 51,7% i 45% w grupie dzieci z MTM bez przerzutów odległych ($p=0,0152$, $p=0,0058$ i $p=0,00177$, odpowiednio).

Pacjenci z MTM o niekorzystnej histologii znamiennie częściej charakteryzowali się silną ekspresją HIF-1 α i VEGF, niż pacjenci z histologią korzystną (64,4% i 91,1% vs 32,6% i 67,4%, $p=0,00467$ i $p=0,0116$, odpowiednio). Również silna ekspresja GLUT-1 występowała częściej w grupie chorych z niekorzystną histologią, w porównaniu do chorych z histologią korzystną, a różnice między grupami były bliskie istotności statystycznej (44,4% vs 23,9%, $p=0,0650$).

Jeszcze wyraźniej zaznaczały się różnice częstości występowania silnej ekspresji badanych markerów pomiędzy dziećmi z różnymi histologicznymi podtypami RMS. Pacjenci z RMA statystycznie istotnie częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF, niż pacjenci z RME (75%, 60%, 90% i 95% vs 32,6%, 23,9%, 56,5% i 67,4%; $p=0,00362$, $p=0,0109$, $p=0,0179$ i $0,0260$; odpowiednio).

Chorzy, u których guz pierwotny stwierdzano w niekorzystnych prognostycznie lokalizacjach, istotnie częściej wykazywali tkankową ekspresję CA IX ($p=0,0389$), zaś u pacjentów z zajęciem węzłów chłonnych znamiennie częściej stwierdzano silną ekspresję HIF-1 α ($p=0,0094$).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic, pomiędzy stopniem ekspresji badanych markerów stwierdzanym u chorych różniących się pod względem wieku (<10 lat i ≥ 10 lat), wielkości guza pierwotnego (<5 cm vs ≥ 5 cm) i jego inwazyjności (T1 vs T2). Odsetek pacjentów z silną ekspresją badanych markerów nie różnił się istotnie pomiędzy grupami chorych, u których pierwotne i odroczone zabiegi operacyjne różniły się doszczętnością. Stopień ekspresji badanych markerów nie zależał od płci pacjentów.

4.6.2 Korelacja ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF i Ki-67 z kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z MTM

W tabeli 12 przedstawiono wyniki korelacji, pomiędzy ekspresją badanych markerów, a poszczególnymi czynnikami prognostycznymi MTM u dzieci.

Wykazano statystycznie znamienne dodatnią korelację, pomiędzy stadiami zaawansowania MTM u dzieci, a ekspresją HIF-1 α ($p=0,00336$), GLUT-1 ($p=0,0326$), CA IX ($p=0,0002$) i wartością indeksu Ki-67 ($p=0,00704$). W wyższych stadiach zaawansowania (III i IV wg IRS) stwierdzano statystycznie istotnie silniejszą ekspresję tych markerów, natomiast w stadiach niskich (I i II wg IRS) ekspresja HIF-1 α , GLUT-1 i CA IX była statystycznie istotnie słabsza, a wartość indeksu Ki-67 – znamienne niższa. W przypadku VEGF dodatnia korelacja ekspresji tego markera ze stadiem choroby była bliska statystycznej istotności ($p=0,0744$).

Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy typem histologicznym MTM u dzieci, a ekspresją HIF-1 α , GLUT-1 i VEGF. U pacjentów z guzami o histologii niekorzystnej stwierdzano silniejszą ekspresję tych markerów ($p=0,0147$, $p=0,0399$ i $p=0,0016$; odpowiednio).

Silna ekspresja HIF-1 α w sposób istotny statystycznie korelowała z wyższym stadiem choroby ($p=0,00336$), niekorzystną histologią MTM ($p=0,0147$) i zajęciem regionalnych węzłów chłonnych ($p=0,00419$). W przypadku chorych z niekorzystną lokalizacją guza korelacja z silną ekspresją HIF-1 α była bliska statystycznej istotności ($p=0,0641$). Silna tkankowa ekspresja GLUT-1 wykazywała korelację z wyższym stadiem zaawansowania MTM i niekorzystną histologią oraz niekorzystną lokalizacją guza pierwotnego ($p=0,0326$, $p=0,0399$ i $p=0,0421$, odpowiednio).

Stwierdzono, że silna ekspresja VEGF statystycznie znamienne korelowała dodatkowo z obecnością niekorzystnej histologii ($p=0,0016$) i podtypem NRMS u dzieci z MTM ($p=0,0038$). Korelacja pomiędzy silną ekspresją VEGF, a niekorzystną lokalizacją guza i wysokim stadiem zaawansowania choroby były bliskie statystycznej istotności ($p=0,080$ i $p=0,0744$, odpowiednio). Silna tkankowa ekspresja CA IX i wysoka wartość indeksu Ki-67 korelowały dodatkowo jedynie z wyższym stadiem zaawansowania choroby nowotworowej ($p=0,0002$ i $p=0,00704$; odpowiednio).

Żaden z analizowanych markerów nie korelował w sposób istotny statystycznie z wiekiem chorych, wielkością i inwazyjnością guza oraz doszczętnością PE.

4.6.3 Liczba markerów, ulegających jednocześnie silnej ekspresji w wybranych podgrupach prognostycznych

Przeanalizowano częstość występowania silnej jednoczesnej ekspresji kilku markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 w wybranych podgrupach prognostycznych.

Wykazano, że u pacjentów z histologią korzystną statystycznie istotnie częściej stwierdzano silną ekspresję maksymalnie trzech markerów w porównaniu do pacjentów z histologią niekorzystną (69,8% vs 45,8%; $p=0,0365$). Z kolei u pacjentów z histologią niekorzystną istotnie częściej, niż u pacjentów z hi-

stologią korzystną, występowała silna ekspresja czterech lub pięciu markerów (54,2% vs 27,9%; $p=0,0202$).

U chorych w stadium I i II MTM częściej obserwowano ekspresję maksymalnie jednego markera (46,7% vs 19,7%; $p=0,0579$). U pacjentów w stadiach III i IV z kolei stwierdzono częstsze występowanie silnej ekspresji co najmniej trzech markerów jednocześnie (61,8% vs 33,3%; $p=0,0795$).

Nie stwierdzono różnic w liczbie markerów ulegających silnej ekspresji u pacjentów różniących się wiekiem w momencie zachorowania.

4.7 Związek stopnia ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 z odpowiedzią na chemioterapię u dzieci z MTM

4.7.1 Częstość występowania słabej i silnej ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz indeksu Ki-67, a odpowiedź na CHT

W tabeli 13 przedstawiono częstość występowania słabej i silnej ekspresji badanych markerów u dzieci z dobrą i złą odpowiedzią na CHT oraz wyniki porównania pomiędzy podgrupami.

Tabela 13. Częstość występowania słabej i silnej ekspresji badanych markerów u pacjentów z dobrą i złą odpowiedzią na CHT

Table 13. The frequency of low and high expression of the analyzed markers in patients with good and poor response to CHT

	Dobra odpowiedź na CHT Good response to CHT n=52		Zła odpowiedź na CHT Poor response to CHT n=20		p
	Słaba ekspresja Low expression	Silna ekspresja High expression	Słaba ekspresja Low expression	Silna ekspresja High expression	
HIF-1α	27 (51,9%)	25 (48,1%)	7 (35%)	13 (65%)	0,242
GLUT-1	36 (69,2%)	16 (30,8%)	9 (45%)	11 (55%)	0,103
CA IX	20 (38,5%)	32 (61,5%)	3 (15%)	17 (85%)	0,0772
VEGF	10 (19,2%)	42 (80,8%)	1 (5%)	19 (95%)	0,159
Ki-67	21 (40,4%)	31 (59,6%)	11 (55%)	9 (45%)	0,394

Wśród pacjentów z MTM nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania słabej i silnej ekspresji badanych markerów, pomiędzy podgrupą chorych z dobrą i złą odpowiedzią na CHT. Podgrupy badane najwyraźniej różniły się pod względem ekspresji CA IX, jednak przy ich porównaniu nie stwierdzono statystycznej znamienności ($p=0,0772$). U prawie wszystkich dzieci ze złą odpowiedzią na CHT stwierdzano silną ekspresję VEGF, jednak u

chorych wykazujących dobrą odpowiedź na CHT również przeważała silna ekspresja VEGF.

4.7.2 Korelacja, pomiędzy ekspresją HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz indeksem Ki-67, a odpowiedzią na CHT

Wyniki korelacji pomiędzy ekspresją badanych markerów hipoksji oraz indeksem Ki-67, a odpowiedzią na CHT u dzieci z MTM przedstawiono w tabeli 14.

Wykazano, że spośród analizowanych markerów jedynie tkankowa ekspresja VEGF w sposób statystycznie znamieny korelowała dodatnio z odpowiedzią na CHT ($r=0,26$, $p=0,0301$). **Im silniejsza była ekspresja VEGF w tkance guza, tym stwierdzano gorszą odpowiedź na CHT i odwrotnie – im słabsza ekspresja VEGF – tym lepsza była reakcja na CHT.** W przypadku CA IX oraz GLUT-1 również obserwowano bliską statystycznej istotności dodatnią korelację, pomiędzy ekspresją markerów, a uzyskiwaną reakcją na CHT ($p=0,0749$ i $p=0,0924$, odpowiednio).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją HIF-1 α i wartością indeksu Ki-67, a odpowiedzią na CHT.

Tabela 14. Korelacja pomiędzy ekspresją markerów hipoksji i indeksu Ki-67, a odpowiedzią na CHT u dzieci z MTM

Table 14. Correlation between the expression of hypoxia markers and Ki-67 index and the response to CHT in children with STS

Badane markery <i>Analyzed markers</i>	Odpowiedź na CHT (n=72) <i>Response to CHT (n=72)</i>	
	r	p
HIF-1 α	0,18	0,132
GLUT-1	0,20	0,0924
CA IX	0,21	0,0749
VEGF	0,26	0,0301
Ki-67	-0,07	0,559

4.7.3 Jednoczesna silna ekspresja kilku markerów, a odpowiedź na CHT

Przeanalizowano, czy podgrupy chorych z dobrą i złą odpowiedzią na CHT różnią się pod względem liczby markerów, ulegających jednocześnie silnej ekspresji w tkance nowotworowej. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 15.

Wykazano, że u dzieci dobrze reagujących na CHT częściej występowała jednoczesna silna ekspresja maksymalnie trzech markerów (63,5% vs 35%, $p=0,0559$). Z kolei **w podgrupie chorych ze złą reakcją na CHT przeważali chorzy z silną tkankową ekspresją co najmniej czterech badanych marke-**

rów (65% vs 36,5%, p=0,0559). W obu analizach stwierdzono graniczną istotność statystyczną.

Tabela 15. Odsetek chorych z silną ekspresją kilku markerów jednocześnie w podgrupach z dobrą i złą odpowiedzią na CHT oraz porównanie pomiędzy podgrupami

Table 15. The percentage of children with simultaneous high expression of several markers in subgroups with good and poor response to CHT, and the comparison between the subgroups

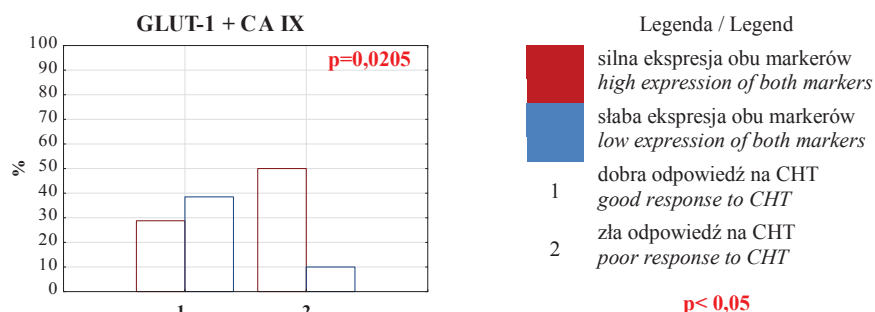
Liczba markerów ulegających jednoczesnej silnej ekspresji <i>Number of markers with simultaneous high expression</i>	Dobra odpowiedź na CHT <i>Good response to CHT</i> (n=52)	Zła odpowiedź na CHT <i>Poor response to CHT</i> (n=20)	p
maksymalnie 1 marker <i>maximum of 1 marker</i>	12 (23,1%)	2 (10%)	0,332
maksymalnie 2 markery <i>maximum of 2 markers</i>	24 (46,2%)	5 (25%)	0,170
maksymalnie 3 markery <i>maximum of 3 markers</i>	33 (63,5%)	7 (35%)	0,0559
co najmniej 4 markery <i>at least 4 markers</i>	19 (36,5%)	13 (65%)	0,0559

Przeanalizowano, z jaką częstością w podgrupach z dobrą i złą odpowiedzią na CHT występuje jednoczesna silna ekspresja VEGF, CA IX i GLUT-1, czyli markerów, które korelują z reakcją na CHT (omówionych w podpunkcie 4.7.2.).

Stwierdzono, iż **u chorych źle reagujących na CHT istotnie częściej występowała jednoczesna silna ekspresja VEGF, CA IX i GLUT-1, w porównaniu do chorych reagujących dobrze na CHT (55% vs 25%).** Z kolei brak silnej ekspresji lub silną ekspresję tylko jednego z tych trzech markerów stwierdzano znacząco częściej u dzieci z dobrą odpowiedzią na CHT, w porównaniu do dzieci ze złą odpowiedzią na CHT (42,3% vs 10%, p=0,00937).

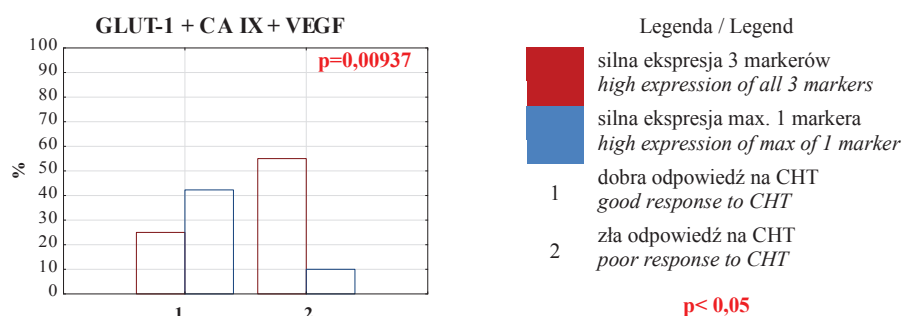
Silna jednoczesna ekspresja GLUT-1 i CA IX występowała istotnie częściej u dzieci ze złą, niż u dzieci z dobrą odpowiedzią na CHT (50% vs 28,8%). Z kolei słaba ekspresja i GLUT-1 i CA IX stwierdzana była częściej u pacjentów dobrze reagujących na CHT, niż u pacjentów reagujących źle (38,5% vs 10%, p=0,0205).

Wyniki omówionych analiz przedstawiono graficznie na ryc. 28 i 29.



Ryc. 28. Częstość występowania jednoczesnej silnej ekspresji GLUT-1 i CA IX oraz słabej ekspresji GLUT-1 i CA IX u pacjentów z dobrą i złą odpowiedzią na CHT

Fig. 28. The incidence of simultaneous high expression of GLUT-1 and CA IX and of low expression of GLUT-1 and CA IX in patients with good and poor response to CHT



Ryc. 29. Częstość występowania jednoczesnej silnej ekspresji GLUT-1, CA IX i VEGF oraz silnej ekspresji maksymalnie jednego z tych markerów u pacjentów z dobrą i złą odpowiedzią na CHT

Fig. 29. The incidence of the simultaneous high expression of GLUT-1, CA IX and VEGF and high expression of maximum of one of these markers in patients with good and poor response to CHT

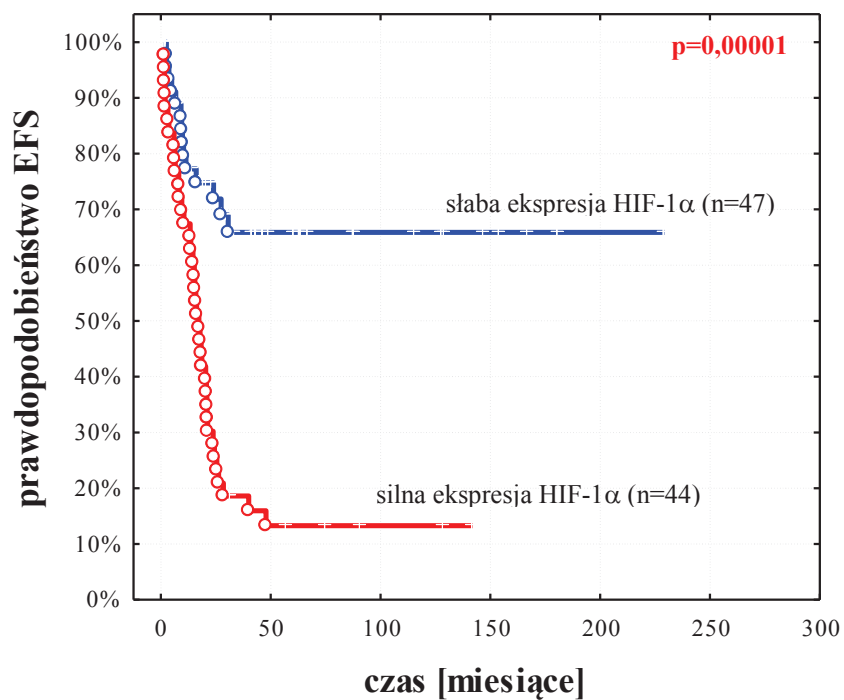
4.8 Związek ekspresji badanych markerów hipoksji oraz indeksu Ki-67 z prawdopodobieństwem 5-letniego EFS u dzieci z MTM

4.8.1 Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz wartości indeksu Ki-67

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że wszystkie badane markery hipoksji w sposób statystycznie znamienne wpływają na prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z MTM ($p < 0,001$). Pacjenci, u których wykazano silną ekspresję markerów hipoksji w guzie pierwotnym, mieli znamienne niższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w porównaniu do chorych wykazujących jedynie słabą ekspresję poszczególnych markerów. Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS stwierdzono u dzieci, u których w tkance guza wykryto silną ekspresję GLUT-1 (5-letni EFS = $7,4 \pm 5,0\%$) i HIF-1 α ($13,3 \pm 5,3\%$). Z kolei obecność jedynie słabej ekspresji VEGF wiązała się z najwyższym prawdopodobieństwem 5-letniego EFS ($92,3 \pm 7,4\%$).

W badanej grupie nie wykazano związku pomiędzy wartością indeksu Ki-67, a prawdopodobieństwem 5-letniego EFS ($p = 0,634$).

Na ryc. 30-34 przedstawiono krzywe EFS i podano prawdopodobieństwa 5-letnich EFS w zależności od stopnia ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz indeksu Ki-67.



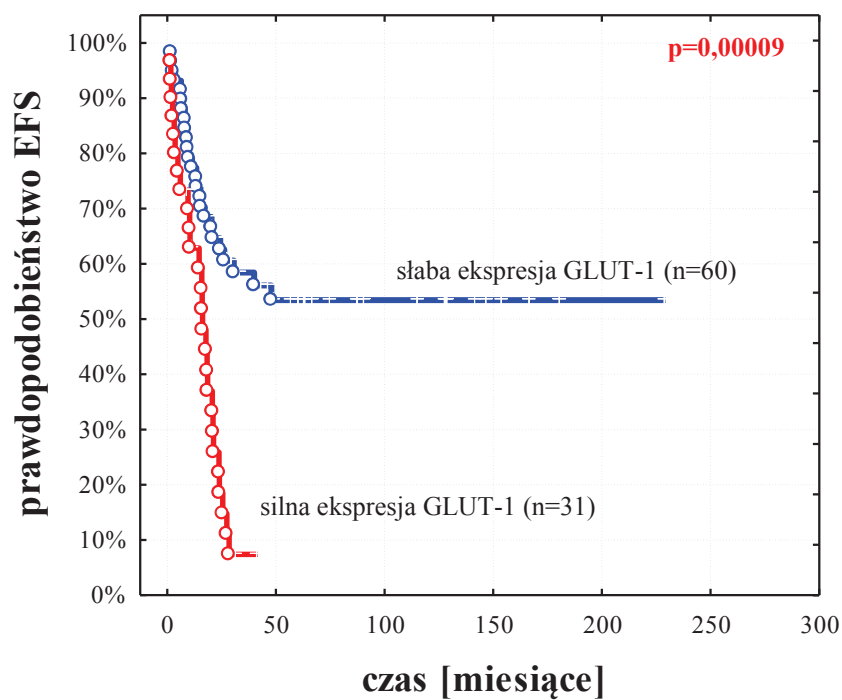
Ryc. 30. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji HIF-1α (grupa badana N=91; $p=0,00001$)

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ze słabą ekspresją HIF-1α (n=47) = $65,9 \pm 7,6\%$

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z silną ekspresją HIF-1α (n=44) = $13,3 \pm 5,3\%$

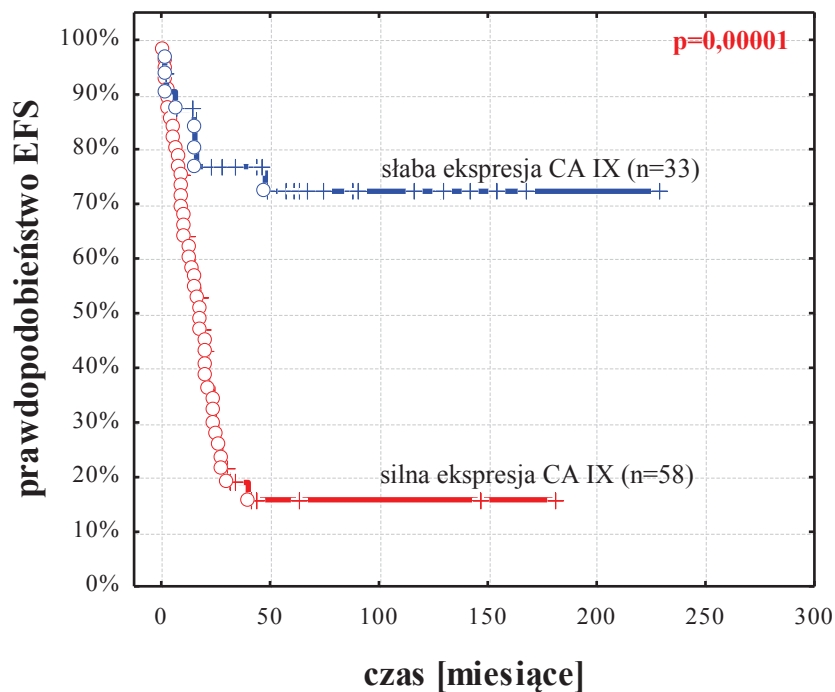
Fig. 30. EFS curves in children STS in relation to the HIF-1α tumor expression (study group N=91; $p=0,00001$)

the probability of the 5-year EFS in patients with low expression of HIF-1α (n=47) = $65,9 \pm 7,6\%$
the probability of the 5-year EFS in patients with high expression of HIF-1α (n=44) = $13,3 \pm 5,3\%$



Ryc. 31. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji GLUT-1
(grupa badana N=91; $p=0,00009$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ze słabą ekspresją GLUT-1 (n=60) = $53,4 \pm 7,0\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z silną ekspresją GLUT-1 (n=31) = $7,4 \pm 5,0\%$

Fig. 31. EFS curves in children with STS in relation to the GLUT-1 tumor expression
(study group N=91; $p=0,00009$)
 the probability of the 5-year EFS in patients with low expression of GLUT-1 (n=60) = $53,4 \pm 7,0\%$
 the probability of the 5-year EFS in patients with high expression of GLUT-1 (n=31) = $7,4 \pm 5,0\%$

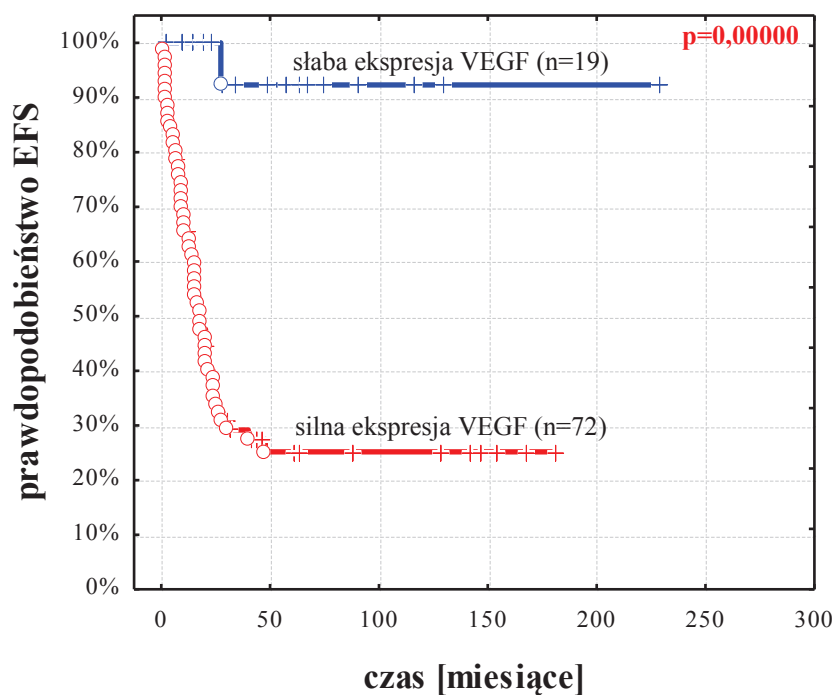


Ryc. 32. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji CA IX
(grupa badana N=91; $p=0,00001$)

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ze słabą ekspresją CA IX (n=33) = 72,3±8,5%
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z silną ekspresją CA IX (n=58) = 15,8±5,5%

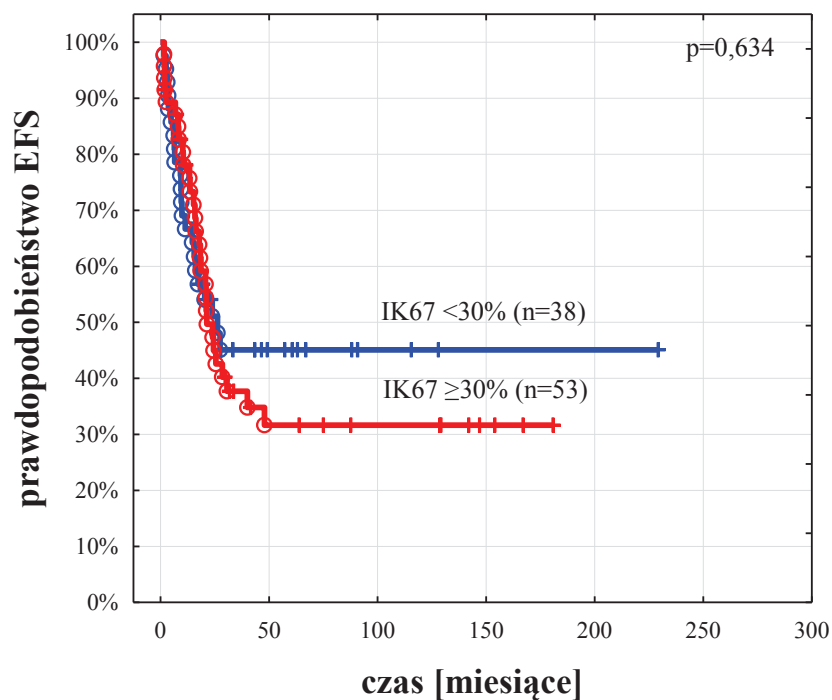
Fig. 32. EFS curves in children with STS in relation to the CA IX tumor expression
(study group N=91; $p=0,00001$)

the probability of the 5-year EFS in patients with low expression of CA IX (n=33) = 72,3±8,5%
the probability of the 5-year EFS in patients with high expression of CA IX (n=58) = 15,8±5,5%



Ryc. 33. Krzywe EFS u dzieci z MTM - zależności od stopnia ekspresji VEGF
 (grupa badana N=91; $p=0,00000$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów ze słabą ekspresją VEGF (n=19)
 = $92,3 \pm 7,4\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z silną ekspresją VEGF (n=72)
 = $25,2 \pm 5,5\%$

Fig. 33. EFS curves in children with STS in relation to the VEGF tumor expression
 (study group N=91; $p=0,00000$)
 the probability of the 5-year EFS in patients with low expression of VEGF (n=19) = $92,3 \pm 7,4\%$
 the probability of the 5-year EFS in patients with high expression of VEGF (n=72) = $25,2 \pm 5,5\%$



Ryc. 34. Krzywe EFS u dzieci z MTM w zależności od wartości indeksu Ki-67 (IK67)
(grupa badana N=91; p=0,634)

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z IK67 <30% (n=38) = 45,1±8,0%
prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów z IK67 ≥30% (n=53) = 31,6±7,4%

*Fig. 34. EFS curves in patients with STS in relation to the IK67 value
(study group N=91; p=0,634)*

*the probability of the 5-year EFS in patients with IK67 <30% (n=38) = 45,1±8,0%
the probability of the 5-year EFS in patients with IK67 ≥30% (n=53) = 31,6±7,4%*

4.8.2 Endogenne markery hipoksji wpływające niezależnie na EFS u dzieci z MTM

W tabeli 16 przedstawiono wyniki analizy wieloczynnikowej, oceniającej wpływ ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF na EFS u dzieci z MTM.

Wykazano, że **spośród badanych markerów hipoksji na EFS niezależnie wpływają: HIF-1 α , CA IX i VEGF.**

Tabela 16. Wpływ ekspresji HIF-1 α , CA IX i VEGF na EFS u dzieci z MTM - wyniki analizy wieloczynnikowej

Table 16. The influence of HIF-1 α , CA IX and VEGF expression on EFS of children with STS – results of multivariate analysis

	Beta	Ryzyko względne HR <i>Hazard risk (HR)</i>	P
HIF-1α	1,001061	2,721169	0,001963
CA IX	0,945535	2,574190	0,020128
VEGF	2,207054	9,088900	0,033867

W kolejnym etapie wieloczynnikowej analizy Coxa, poza HIF-1 α , CA IX i VEGF, uwzględniono również wpływ wcześniej zidentyfikowanych niezależnych czynników klinicznych, czyli: stadium zaawansowania MTM i odpowiedź na CHT.

Wykazano, że spośród wszystkich analizowanych parametrów (klinicznych oraz immunohistochemicznych), **niezależny wpływ na EFS u dzieci z MTM mają: ekspresja HIF-1 α , odpowiedź na CHT, ekspresja VEGF i CA IX** (tabela 17).

Tabela 17. Markery hipoksji i czynniki kliniczne wpływające niezależnie na EFS u dzieci z MTM – wyniki analizy wieloczynnikowej

Table 17. Markers of hypoxia and clinical factors influencing independently the EFS of children with STS – results of multivariate analysis

	Beta	Ryzyko względne HR <i>Hazard Risk (HR)</i>	P
HIF-1α	0,866138	2,377710	0,008522
Odpowiedź na CHT <i>Response to CHT</i>	0,556368	1,744326	0,016915
VEGF	2,203525	9,056880	0,033948
CA IX	0,857919	2,358249	0,037818

4.9 Liczba markerów ulegających jednoczesnej silnej ekspresji, a występowanie wznowy nowotworu i prawdopodobieństwo 5-letniego EFS

W tabeli 18 przedstawiono odsetek chorych z silną tkankową ekspresją kilku markerów jednocześnie w podgrupach bez wznowy i ze wznową MTM oraz porównanie pomiędzy podgrupami.

Tabela 18. Odsetek chorych z silną ekspresją kilku markerów jednocześnie w podgrupach bez wznowy i ze wznową MTM oraz porównanie pomiędzy podgrupami

Table 18. The percentage of children with simultaneous high expression of several markers in subgroups without relapse and with relapse and the comparison between the subgroups

Silna ekspresja markerów <i>High expression of markers</i>	Bez wznowy <i>Without relapse</i> n=40	Ze wznową <i>With relapse</i> n=51	p
maksymalnie 1 <i>maximum of 1</i>	22 (55%)	0 (0%)	0,00000
maksymalnie 2 <i>maximum of 2</i>	31 (77,5%)	8 (15,7%)	0,00000
co najmniej 3 <i>at least 3</i>	9 (23%)	43 (84%)	0,00000
co najmniej 4 <i>at least 4</i>	2 (5%)	36 (70,6%)	0,00000

Wykazano, że podgrupy chorych bez wznowy i ze wznową MTM różniły się w sposób istotny statystycznie pod względem liczby markerów ulegających silnej ekspresji w guzie przed leczeniem.

U ponad połowy chorych, którzy nie rozwinęli wznowy choroby, stwierdzono brak (u 15%) lub ekspresję tylko jednego badanego markera (40%). Natomiast w podgrupie chorych, u których wystąpiła wznowa choroby, u wszystkich pacjentów stwierdzono silną tkankową ekspresję co najmniej dwóch spośród pięciu badanych markerów. **W grupie ze wznową statystycznie istotnie częściej stwierdzano silną ekspresję co najmniej czterech badanych markerów, w porównaniu do grupy dzieci bez wznowy MTM (70,6% vs 5%, p=0,00000).** Z kolei w podgrupie chorych bez wznowy statystycznie znamienne częściej stwierdzano silną ekspresję maksymalnie dwóch spośród badanych markerów (77,5% vs 15,7%, p=0,00000).

W tabeli 19 przedstawiono prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w zależności od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej.

Tabala 19. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w zależności od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

Table 19. The probability of the 5-year EFS in relation to the number of analyzed markers with high expression in the tumor tissue

Liczba markerów ulegających silnej ekspresji <i>The number of markers with high tumor expression</i>	n	Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS <i>Probability of the 5-year EFS</i>
maksymalnie 1 <i>maximum of 1</i>	22	95,0±4,9%
maksymalnie 2 <i>maximum of 2</i>	39	74,4±7,4%
co najmniej 3 <i>at least 3</i>	52	12,7±5,2%
co najmniej 4 <i>at least 4</i>	38	4,6±4,1%

Na podstawie uzyskanych wyników badań IHC i analiz statystycznych stwierdzono, iż **prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z MTM zależało w sposób istotny od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance guza. Im więcej markerów wykazywało jednocześnie silną ekspresję, tym prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów było niższe.**

Stwierdzono, iż prawdopodobieństwo 5-letniego EFS było bardzo wysokie u chorych, u których przeprowadzone badania IHC wykazały silną ekspresję maksymalnie jednego spośród badanych markerów (95,0±4,9%). Silna tkankowa ekspresja maksymalnie dwóch spośród badanych markerów wiązała się z prawdopodobieństwem 5-letniego EFS wynoszącym 74,4±7,4%. Stwierdzenie silnej ekspresji trzech i więcej markerów (u 52 dzieci) oraz czterech i więcej markerów (u 38 chorych) w sposób znaczący zwiększało ryzyko wystąpienia wznowy nowotworu. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u tych pacjentów wynosiło jedynie 12,7±5,2% oraz 4,6±4,1%, odpowiednio.

4.9.1 Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α , VEGF i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

Przeprowadzone i przedstawione wcześniej wyniki analizy wieloczynnikowej Coxa wykazały, że spośród markerów IHC niezależny wpływ na EFS u dzieci z MTM mają: ekspresja HIF-1 α , VEGF i CA IX. Dlatego przeanalizowałam dodatkowo, czy prawdopodobieństwo 5-letniego EFS zależy od tego, ile spośród tych trzech markerów hipoksji ulega jednocześnie silnej ekspresji w tkance guza nowotworowego.

Stwierdzenie jednoczesnej silnej ekspresji HIF-1 α , VEGF i CA IX w tkance nowotworowej wiązało się z prawdopodobieństwem 5-letniego EFS wynoszącym 0%, czyli ze 100% ryzykiem wystąpienia wznowy w ciągu 5 lat od rozpo-

znania MTM. Przeciwnie, 11 dzieci, u których nie wykryto silnej ekspresji żadnego z trzech wymienionych markerów, miało prawdopodobieństwo 5-letniego EFS = 100%. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u 17 pacjentów z silną ekspresją jednego markera spośród HIF-1 α , CA IX i VEGF było nadal wysokie i wynosiło 86,3 \pm 9,2%. Natomiast prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z silną ekspresją dwóch markerów wynosiło jedynie 32,4 \pm 9,3%.

Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α , VEGF i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

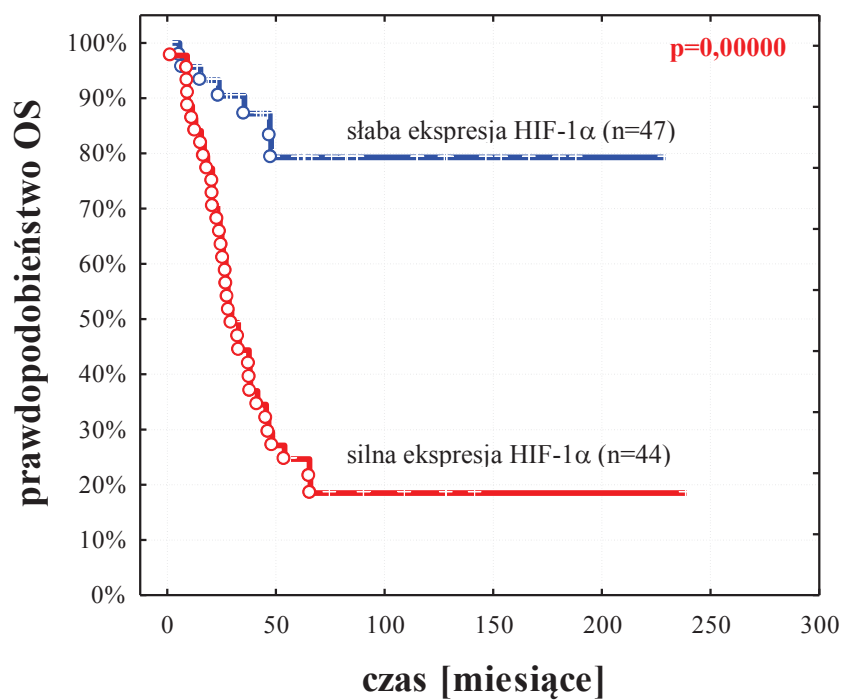
Table 20. The probabilities of 5-year EFS in relation to the number of markers from among HIF-1 α , VEGF i CA IX with high tumor expression

Badane markery <i>Analyzed markers</i>	Liczba markerów ulegających silnej ekspresji <i>Number of markers with high tumor expression</i>	n	Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS <i>Probability of the 5-year EFS</i>
HIF-1α, CA IX, VEGF	brak silnej ekspresji markerów <i>no high expression of any markers</i>	11	100%
	1 marker <i>1 marker</i>	18	86,3 \pm 9,2%
	2 markery <i>2 markers</i>	30	32,4 \pm 9,3%
	wszystkie 3 markery <i>all 3 markers</i>	32	0,0 \pm 0,0%

4.10 Związek ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67 z prawdopodobieństwem 5-letniego OS u dzieci z MTM

4.10.1 Ekspresja HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF i Ki-67, a prawdopodobieństwo 5-letniego OS

Na ryc. 35-39 przedstawiono krzywe OS i podano prawdopodobieństwa 5-letnich OS dla podgrup chorych różniących się stopniem ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF oraz wartością indeksu Ki-67.

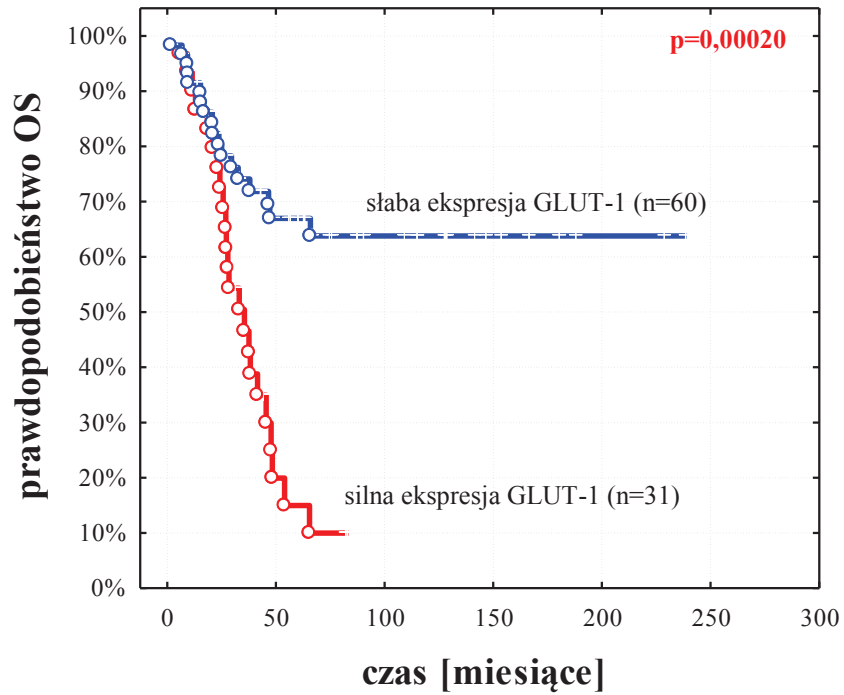


Ryc. 35. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji HIF-1 α
(grupa badana N=91; $p=0,00000$)

prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ze słabą ekspresją HIF-1 α (n=47) = 79,3 \pm 7,3%
prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z silną ekspresją HIF-1 α (n=44) = 24,7 \pm 6,7%

Fig. 35. OS curves in children with STS in relation to the HIF-1 α tumor expression
(study group N=91; $p=0,00000$)

the probability of the 5-year OS in patients with low expression of HIF-1 α (n=47) = 79,3 \pm 7,3%
the probability of the 5-year OS in patients with high expression of HIF-1 α (n=44) = 24,7 \pm 6,7%

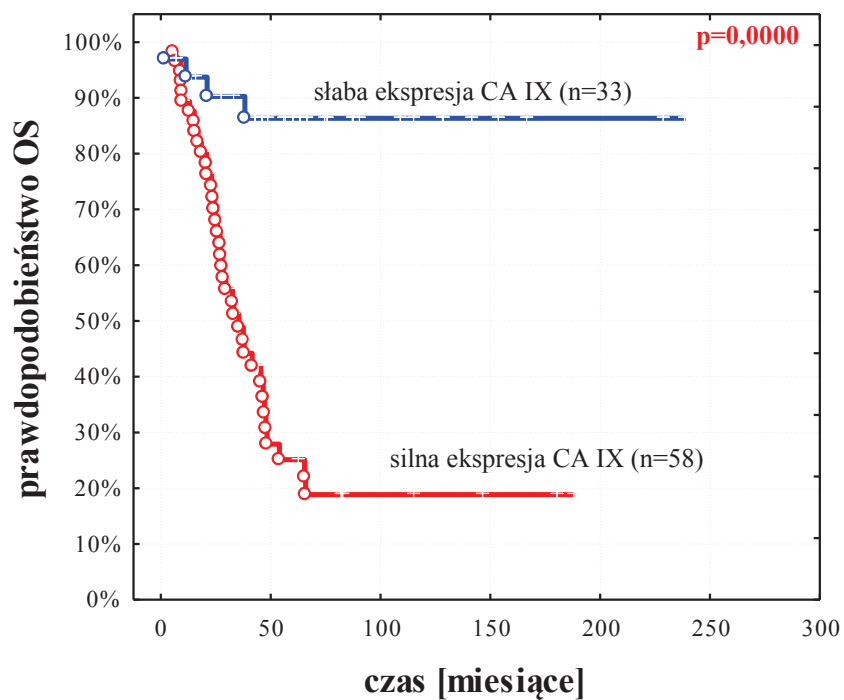


Ryc. 36. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji GLUT-1
(grupa badana N=91; $p=0,00020$)

prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ze słabą ekspresją GLUT-1 (n=60) = $67,0 \pm 6,7\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z silną ekspresją GLUT-1 = $15,0 \pm 7,6\%$

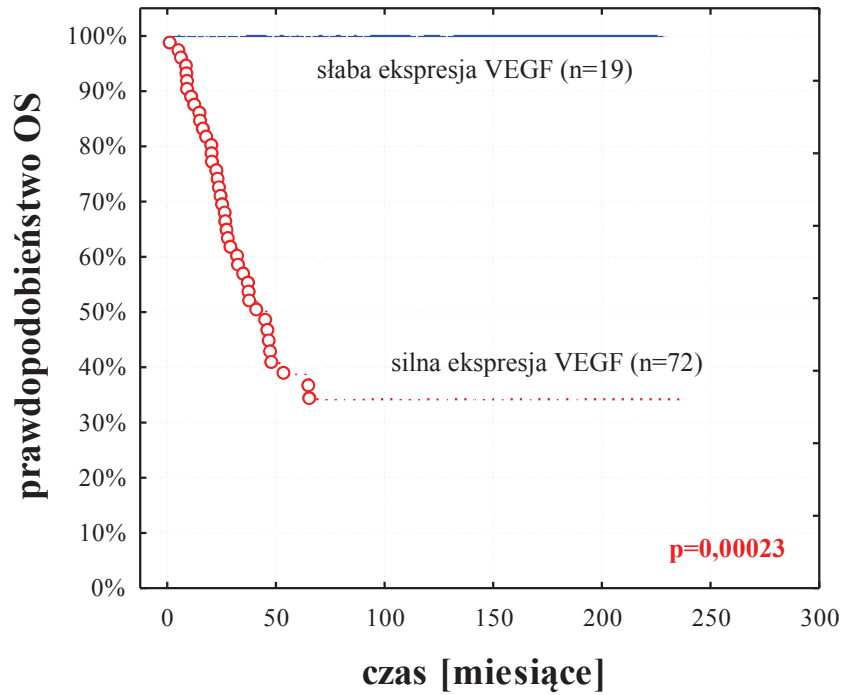
Fig. 36. OS curves in children with STS in relation to the GLUT-1 tumor expression
(study group N=91; $p=0,00020$)

the probability of the 5-year OS in patients with low expression of GLUT-1 (n=60) = $67,0 \pm 6,7\%$
 the probability of the 5-year OS in patients with high expression of GLUT-1 (n=31) = $15,0 \pm 7,6\%$



Ryc. 37. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji CA IX
 (grupa badana N=91; $p=0,0000$)
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ze słabą ekspresją CA IX (n=33)
 = $86,3\pm 6,4\%$
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z silną ekspresją CA IX (n=58) = $25,1\pm 6,8\%$

*Fig. 37. OS curves in patients with STS in relation to the CA IX tumor expression
 (study group N=91; $p=0,0000$)
 the probability of the 5-year OS in patients with low expression of CA IX (n=33) = $86,3\pm 6,4\%$
 the probability of the 5-year OS in patients with high expression of CA IX (n=58) = $25,1\pm 6,8\%$*

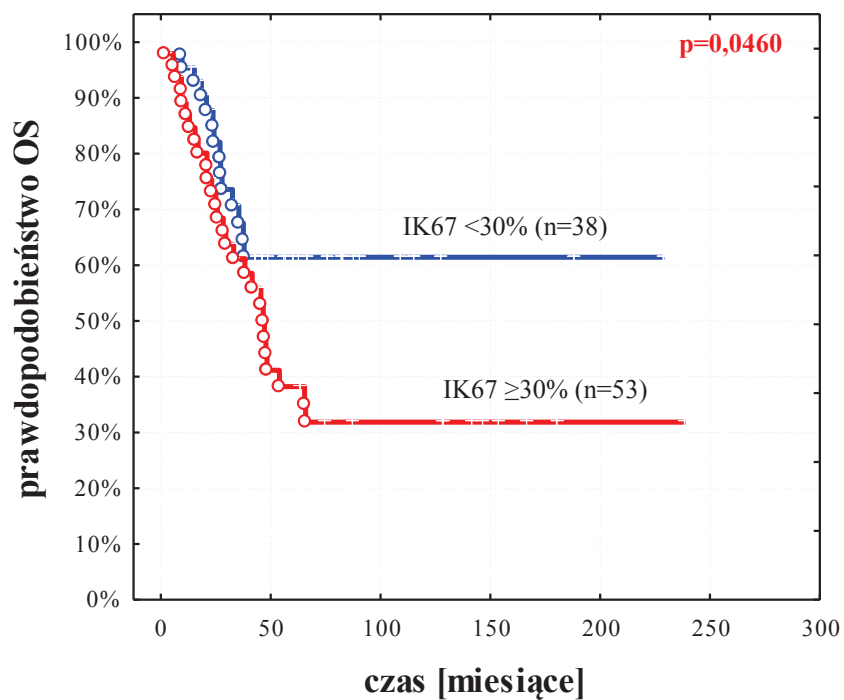


Ryc. 38. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od stopnia ekspresji VEGF
(grupa badana N=91; $p=0,00023$)

prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów ze słabą ekspresją VEGF (n=19) = 100%
 prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z silną ekspresją VEGF (n=72) = 38,8±6,3%

Fig. 38. OS curves in children with STS in relation to the VEGF tumor expression
(study group N=91; $p=0,00023$)

the probability of the 5-year OS in patients with low expression of VEGF (n=19) = 100%
 the probability of the 5-year OS in patients with high expression of VEGF (n=72) = 38,8±6,3%



Ryc. 39. Krzywe OS u dzieci z MTM w zależności od wartości indeksu Ki-67 (IK67)
(grupa badana N=91; **p=0,0460**)

prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z wartością IK67 <30% (n=38) = 61,4±8,2%
prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów z wartością IK67 ≥30% (n=53) = 38,2±7,9%

*Fig. 39. OS curves in children with STS in relation to the IK67 value
(study group N=91; **p=0,0460**)*

*the probability of the 5-year OS in patients with IK67 <30% (n=38) = 61,4±8,2%
the probability of the 5-year OS in patients with IK67 ≥30% (n=53) = 38,2±7,9%*

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że wszystkie badane markery hipoksji oraz indeks Ki-67 wpływają na OS u dzieci z rozpoznaniem MTM. Różnice pomiędzy podgrupami chorych, różniących się stopniem ekspresji badanych markerów hipoksji i indeksu Ki-67, były statystycznie istotne w analizie jednoczynnikowej ($p < 0,001$ dla markerów hipoksji i $p < 0,05$ dla Ki-67). Najbardziej wyraźne różnice w OS stwierdzono pomiędzy podgrupami chorych różniących się stopniem ekspresji HIF-1 α i CA IX, zaś najmniej wyraźne – w przypadku różnej wartości indeksu Ki-67.

Pacjenci, u których wykazano silną ekspresję badanych markerów w guzie pierwotnym, mieli statystycznie znamienne niższe prawdopodobieństwo 5-letniego OS w porównaniu do chorych, nie wykazujących silnej ekspresji poszczególnych markerów. Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego OS stwierdzono u chorych z silną ekspresją GLUT-1 (jedynie 15,0 \pm 7,6%), HIF-1 α (24,7 \pm 6,7%) i CA IX (25,1 \pm 6,8%). Z kolei dzieci z MTM, u których stwierdzono jedynie słabą ekspresję VEGF, miały 100% prawdopodobieństwo 5-letniego OS. W przypadku braku ekspresji CA IX i HIF-1 α , prawdopodobieństwo 5-letniego OS było nieco niższe, ale nadal wysokie (86,3 \pm 6,4% i 79,3 \pm 7,3%; odpowiednio).

4.10.2 Endogenne markery hipoksji wpływające niezależnie na OS u dzieci z MTM

W analizie wieloczynnikowej wykazano, że **spośród badanych markerów hipoksji na OS u dzieci z MTM niezależnie wpływają: HIF-1 α i CA IX.** Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Wpływ ekspresji HIF-1 α i CA IX na OS u dzieci z MTM – wyniki analizy wieloczynnikowej

Table 21. The influence of HIF-1 α and CA IX expression on OS of children with STS – results of multivariate analysis

	Beta	Ryzyko względne (HR) <i>Hazard Risk (HR)</i>	p
HIF-1α	2,134675	8,454302	0,000003
CA IX	1,039139	2,826782	0,000087

W kolejnym etapie wieloczynnikowej analizy Coxa, poza HIF-1 α i CA IX, uwzględniono również wpływ wcześniej zidentyfikowanych niezależnych czynników klinicznych, czyli: zajęcie węzłów chłonnych i odpowiedź na CHT.

Stwierdzono, że wszystkie badane parametry (kliniczne i IHC) wpływają na OS, przy czym HIF-1 α i CA IX niezależnie (tabela 21). Oznacza to, że stwierdzenie silnej ekspresji HIF-1 α i/lub CA IX w tkance guza u pacjenta z MTM przed leczeniem może stanowić silniejszy negatywny czynnik progno-

styczny co do przeżycia chorego, niż dotychczas stosowane czynniki kliniczne, na których opiera się stratyfikacja do grup ryzyka.

4.11 Liczba markerów ulegających jednoczesnej silnej ekspresji, a występowanie zgonu z progresji nowotworu i prawdopodobieństwo 5-letniego OS

Tabela 22 przedstawia odsetek chorych z silną tkankową ekspresją kilku markerów jednocześnie u pacjentów, którzy żyją choroby momencie analizy i tych, którzy zmarli w wyniku progresji nowotworu oraz porównanie pomiędzy podgrupami.

Tabela 22. Częstość występowania silnej jednoczesnej ekspresji kilku badanych markerów w podgrupach chorych, którzy żyją w momencie analizy oraz tych, którzy zmarli w wyniku progresji nowotworu, oraz porównanie pomiędzy podgrupami

Table 22. The frequency of the high simultaneous expression of several markers in subgroups of children who are alive at the time of analysis and those who died of MTM progression, and the comparison between the subgroups

Silna ekspresja markerów <i>High expression of markers</i>	Żyje <i>Alive</i> n=50	Zgon z progresji <i>Died of PD</i> n= 41	p
maksymalnie 1 <i>maximum of 1</i>	22 (44%)	0 (0%)	0,00000
maksymalnie 2 <i>maximum of 2</i>	37 (74%)	2 (4,9%)	0,00000
co najmniej 3 <i>at least 3</i>	13 (26%)	39 (95,1%)	0,00000
co najmniej 4 <i>at least 4</i>	5 (10%)	33 (80,5%)	0,00000

Wykazano, że analizowane podgrupy chorych różniły się w sposób istotny statystycznie pod względem liczby markerów ulegających silnej ekspresji w guzie przed leczeniem.

Wykazano, że u wszystkich 41 pacjentów, którzy zmarli w wyniku progresji choroby nowotworowej, stwierdzono silną tkankową ekspresję co najmniej dwóch spośród pięciu badanych markerów. U żadnego z pacjentów z tej podgrupy nie stwierdzono w momencie diagnozy słabej ekspresji wszystkich pięciu lub czterech z pięciu badanych markerów. **U ponad 95% chorych, którzy zmarli z PD, stwierdzono silną ekspresję trzech i więcej spośród badanych markerów, zaś u ponad 80% pacjentów – ekspresję czterech i pięciu badanych czynników.** Odsetki te były statystycznie istotnie wyższe, w porównaniu do grupy dzieci, które pomyślnie zakończyły leczenie onkologiczne (p=0,00000).

Z kolei w podgrupie chorych, którzy żyją bez oznak choroby statystycznie znamiennej częściej stwierdzano silną ekspresję maksymalnie jednego (44%) lub maksymalnie dwóch (74%) spośród pięciu badanych markerów. U 12% dzieci, które żyją w momencie analizy, stwierdzono niewystępowanie silnej ekspresji żadnego markera. Takiej sytuacji nie stwierdzono u żadnego spośród chorych, którzy zmarli z progresji nowotworu.

W tabeli 23 przedstawiono prawdopodobieństwo 5-letniego OS w zależności od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej.

Tabela 23. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS w zależności od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

Table 23. The probabilities of 5-year OS in relation to the number of markers, expressed highly in the tumor

Liczba markerów ulegających silnej ekspresji <i>The number of markers with high tumor expression</i>	n	Prawdopodobieństwo 5-letniego OS <i>Probability of the 5-year OS</i>
maksymalnie 1 <i>maximum of 1</i>	22	100%
maksymalnie 2 <i>maximum of 2</i>	39	93,9±4,2%
co najmniej 3 <i>at least 3</i>	52	20,6±6,2%
co najmniej 4 <i>at least 4</i>	38	8,5±5,6%

Na podstawie uzyskanych wyników badań IHC i analiz statystycznych stwierdzono, iż **prawdopodobieństwo 5-letniego OS u dzieci z MTM zależało w sposób istotny od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance guza. Im więcej markerów wykazywało jednocześnie silną ekspresję, tym prawdopodobieństwo 5-letniego OS u pacjentów było niższe.**

Stwierdzono, iż w analizowanej grupie chorych z MTM 100% prawdopodobieństwo 5-letniego OS mieli wszyscy, u których wykryto silną ekspresję nie więcej niż jednego markera. Takich pacjentów było 22:16 z silną ekspresją tylko jednego markera i sześćo bez silnej ekspresji któregośkolwiek z markerów. Bardzo dobre rokowanie i prawdopodobieństwo 5-letniego OS przekraczające 90% stwierdzono również u dzieci, u których wykazano silną ekspresję maksymalnie dwóch badanych markerów. Natomiast u chorych, u których stwierdzono silną tkankową ekspresję trzech i więcej spośród badanych markerów prawdopodobieństwo 5-letniego OS wynosiło jedynie 20,6±6,2%. Stwierdzenie silnej ekspresji czterech lub pięciu badanych markerów w sposób znaczący zwiększało ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia nowotworu. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS u tych pacjentów wynosiło 8,5±5,6%.

4.11.1 Prawdopodobieństwo 5-letniego OS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

Przeprowadzone i przedstawione wcześniej wyniki analizy wieloczynnikowej wykazały, że HIF-1 α i CA IX mają niezależny wpływ na OS u dzieci z MTM. Dlatego przeanalizowałam dodatkowo, czy prawdopodobieństwo 5-letniego OS zależy od tego, ile spośród tych dwóch markerów hipoksji ulega silnej ekspresji w tkance guza nowotworowego. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS w zależności od liczby markerów spośród HIF-1 α i CA IX, ulegających silnej ekspresji w tkance nowotworowej

Table 24. The probabilities of 5-year OS in relation to the number of markers from among HIF-1 α and CA IX, with high tumor expression

Badane markery <i>Analyzed markers</i>	Liczba markerów ulegających silnej ekspresji <i>Number of markers with high tumor expression</i>	n	Prawdopodobieństwo 5-letniego OS <i>Probability of the 5-year OS</i>
HIF-1α i CA IX	brak silnej ekspresji markerów <i>no high expression of any markers</i>	21	100%
	1 marker <i>1 marker</i>	38	65,0 \pm 8,8%
	2 markery <i>2 markers</i>	33	7,1 \pm 4,8%

Stwierdzenie jednoczesnej silnej ekspresji HIF-1 α i CA IX wiązało się z bardzo niskim prawdopodobieństwem 5-letniego OS (7,1 \pm 4,8%). Z kolei chorzy, u których nie wykazano silnej ekspresji ani HIF-1 α , ani CA IX (n=21), mieli prawdopodobieństwo 5-letniego OS = 100%. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS u 38 dzieci z silną ekspresją albo HIF-1 α , albo CA IX, było pośrednie i wynosiło 65,0 \pm 8,8%.

5 DYSKUSJA

Celem pracy było określenie znaczenia ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji (HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF) oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67 w tkance nowotworowej pobranej od dzieci z MTM przed leczeniem onkologicznym w ocenie aktywności choroby i prognozowaniu jej przebiegu. **Jest to pierwsza na świecie praca, analizująca znaczenie markerów hipoksji u dzieci z rozpoznaniem MTM i jedna z nielicznych, podejmująca ten temat u dzieci z chorobą nowotworową** [54, 55, 56, 215]. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, ale również praktyczne, stanowiąc źródło wiedzy na temat potencjalnych nowych markerów prognostycznych u dzieci z MTM. Stwierdzone w pracy powiązania, pomiędzy stopniem ekspresji endogennych markerów hipoksji, a agresywnością i przebiegiem MTM u dzieci mogą stanowić asumpt do badań nad terapiami celowanymi skierowanymi przeciwko HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w tej grupie nowotworów.

Poza nowatorskim tematem, analizowanym w licznej grupie 91 chorych z MTM, ważnym i interesującym aspektem było wykorzystanie w metodyce badań mikromacierzy tkankowych TMA. To nowoczesne narzędzie, które umożliwia zastąpienie konwencjonalnego układu „jeden skrawek guza – jeden przypadek” przez układ, w którym na jednym skrawku parafinowym analizować można wiele zmian jednocześnie.

5.1 Mikromacierze tkankowe w poznawaniu nowych markerów nowotworowych

W ostatnich latach badania z wykorzystaniem TMA stosowane są coraz powszechniej w diagnostyce molekularnej, umożliwiając poznawanie nowych prognostycznych markerów w chorobach nowotworowych [33]. Technika TMA pozwala na badanie zarówno tkanek, jak i kultur komórkowych. Analizy markerów dokonywać można na poziomie kwasów nukleinowych, bądź – jak w obecnej pracy – na poziomie ekspresji białek [33, 90]. Najczęściej stosowaną metodą diagnostyczną jest barwienie IHC. Inne techniki badawcze, jak fluorescencyjna lub mRNA hybrydyzacja *in situ*, stosowane są rzadziej.

Dużą zaletą zastosowania TMA do badań diagnostycznych i naukowych jest możliwość naniesienia wielu próbek tkankowych na jeden blok biorcy. Pozwala to na porównywanie licznych próbek z guzów podczas jednej oceny mikroskopowej, co znacząco ułatwia pracę patologa – oszczędzając czas i zwiększając obiektywizm oceny.

Niektórzy badacze podnosili problem konieczności zakupu drogiego sprzętu do produkcji mikromacierzy, co miało utrudniać powszechne używanie tej techniki badawczej w praktyce klinicznej. Dowiedziono jednak, iż zastosowanie

TMA znacznie skraca czas przygotowania materiału do badań i zmniejsza zużycie odczynników, co w sumie obniża koszty analiz. Również jednoczesne diagnozowanie wielu próbek zmniejsza całokształt kosztów badania, przy zachowaniu rzetelności i wiarygodności wyników. W wielu pracach podkreślano, iż jedną z większych zalet TMA jest możliwość standaryzacji metod barwienia IHC i późniejszej oceny wszystkich próbek naniesionych na dany blok biorcy. Otrzymane w ten sposób wyniki są wiarygodne i powtarzalne, a duża liczba jednocześnie analizowanych przypadków umożliwia rzetelną analizę statystyczną [176, 229].

Mimo wielu zalet, TMA posiada również pewne niedoskonałości. Niektórzy badacze uważają, że mały rozmiar rdzeni tkankowych pobranych z bloków-dawców, może być wadą, gdyż uniemożliwia on zobrazowanie profilu całej tkanki z uwzględnieniem jej heterogennej budowy. Dotyczy to w szczególności sposobu tkanki nowotworowej, zawierającej regiony o różnej aktywności proliferacyjnej, jak również regiony apoptotyczne czy nekrotyczne. W tym aspekcie niektórzy badacze uważają, że należy badać większą liczbę rdzeni pobieranych z różnych miejsc badanego guza (jego obrzeża, centrum i prawidłowej tkanki marginesu). Podniosłoby to wiarygodność uzyskiwanych wyników, szczególnie w przypadku tkanek o wysokim stopniu heterogenności [14, 186, 232]. Dowiedziano jednak, że istnieje duża i bardzo duża zgodność, pomiędzy wynikami ekspresji markerów badanych metodą TMA i uzyskanymi przy zastosowaniu konwencjonalnej metody oceny całych skrawków (*whole sections*, WS) [124, 133, 191]. Dowiedziano, że TMA utworzone przy użyciu igieł o średnicy 0,6 mm są wystarczająco wiarygodne i reprezentatywne [3, 85, 109]. W obecnej pracy zastosowano pojedyncze rdzenie tkankowe o średnicy 5 mm, czyli znacznie większej, niż w większości publikowanych prac badawczych. W sposób istotny może to poprawiać rzetelność prezentowanych wyników, **W obecnej pracy zadbano również o to, by każdy rdzeń pobrany był ze ściśle określonego miejsca guza nowotworowego, wybranego wcześniej przez doświadczonego patologa. Do oceny ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz antygeny proliferacji Ki-67 wybrano obszary zlokalizowane w pobliżu (ale nie w obrębie!) obszarów nekrotycznych, czyli regiony o potencjalnie największej aktywności procesów adaptacji komórek nowotworowych do hipoksji.**

Badania przy użyciu TMA umożliwiają analizę archiwalnych tkanek zatopionych w parafinie. Jest to zaletą tej metody, jednak rodzi się pytanie, czy archiwalny materiał sprzed wielu dekad nadaje się do prowadzenia wiarygodnych badań ekspresji markerów białkowych. W obecnej pracy najstarsze bloki-dawcy pochodziły sprzed 23 lat. Badania Campa i wsp. wykazały, że większość tkanek nawet sprzed 50-70 lat jest odpowiedniej jakości do prowadzenia badań IHC. Oczywiście, zależy to od wielu czynników, jak: sposób utrwalenia materiału, zatopienia w parafinie, przechowywania, a także separacji antygeny [33]. W

przedstawianej pracy, wstępnej analizie poddano materiał uzyskany z pierwotnych guzów od 103 dzieci z rozpoznaniem MTM, leczonych w ośrodkach onkologii dziecięcej PPGLGL w latach 1992-2013. Po wstępnej ocenie histopatologicznej z badania wykluczono 12 przypadków z powodu niewystarczającej jakości technicznej materiału tkankowego. Pozostałe bloki tkankowe w ocenie doświadczonego patologa nadawały się w pełni do badań nad ekspresją HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz indeksu Ki-67, zarówno metodą WS, jak i TMA.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, analizowane w niniejszej pracy barwienia IHC na obecność markerów hipoksji i antygeny proliferacyjnego Ki-67 przeprowadzono przy użyciu techniki TMA. **Poza etapami, wymagającymi specjalistycznej wiedzy histopatologicznej, wszystkie pozostałe etapy pobierania materiału z bloku-dawcy, a następnie tworzenia, krojenia i scalania mikromacierzy (bloków-biorców) przeprowadzone zostały przez doktorantkę we współpracy z doświadczonym patologiem.**

5.2 Ekspresja HIF-1 α , VEGF, GLUT-1 i CA IX w MTM u dzieci – częstość występowania i wzajemna korelacja pomiędzy markerami

Mięsaki tkanek miękkich u dzieci stanowią złożoną i wciąż nie do końca poznaną grupę złośliwych nowotworów litych. Choć wszystkie wywodzą się z pierwotnej komórki mezenchymalnej, jednak ich późniejsze różnicowanie sprawia, że biologiczna aktywność, przebieg kliniczny i rokowanie u poszczególnych pacjentów są odmienne. W ostatnich trzech dekadach, dzięki zastosowaniu nowych metod operacyjnych i nowoczesnych technik RT oraz wielolekowej CHT, odnotowano znaczący postęp w leczeniu MTM u dzieci. Wg danych IRS IV, 5-letnie OS dla całej grupy MTM wzrosło z 25% w roku 1970 r. do 73% w roku 2001 r. [117]. Poprawa wyleczalności MTM u dzieci wynika w znacznej mierze z coraz bardziej precyzyjnego dostosowania intensywności terapii onkologicznej do całego szeregu czynników prognostycznych, stwierdzanych u pacjentów. Takie postępowanie z jednej strony poprawiać ma wyniki leczenia, zaś z drugiej – minimalizować ryzyko wystąpienia poważnych powikłań, które u dzieci w szczególności sposób obniżają jakość życia po chorobie.

Mimo postępu, rokowanie u dzieci z MTM w stadiach zaawansowanych jest nadal niezadowolające [115]. Dlatego od wielu lat nie ustają próby poznania i zastosowania w praktyce klinicznej nowych markerów prognostycznych, których ocena mogłaby pomóc scharakteryzować biologiczną aktywność guza i ułatwić podejmowanie decyzji terapeutycznych [168]. Niestety, w przeciwieństwie do kilku innych nowotworów dziecięcych, MTM nie wydzielają swoistych biomarkerów, których poziomy w płynach ustrojowych korelowałyby z zaawansowaniem, aktywnością proliferacyjną i odpowiedzią na leczenie. Podjęte dotąd prace badawcze, w tym np. badania nad znaczeniem surowiczych poziomów IL-10 i IL-12 u dzieci z MTM, w których uczestniczyłam w latach 2011-2013, z pewnością poszerzyły wiedzę na temat biologii mięsaków, jednak analizowane

interleukiny nie zyskały statusu markerów przydatnych w praktyce klinicznej [15, 16].

Dlatego celem mojej obecnej pracy było poszukiwanie czynników rokowniczych bardziej swoście i bezpośrednio związanych z aktywnością proliferacyjną, odpowiedzią na CHT, przebiegiem i wynikiem leczenia dziecięcych MTM. W pracy podjęłam próbę odpowiedzi na pytanie, czy takimi czynnikami mogłyby być endogenne markery hipoksji: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF, oznaczane metodami IHC w tkance nowotworowej pobranej przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego.

Znaczenie procesów hipoksji i powiązanych z nią procesów adaptacyjnych, takich jak: regulacja procesów zależnych od glukozy, kontrola wewnątrzkomórkowego pH i indukcja angiogenezy, stanowi jeden z wiodących tematów badań naukowych podejmowanych w onkologii w ostatnich latach. Znakomita większość opublikowanych analiz dotyczy pacjentów z nowotworami typowymi dla wieku dorosłego, takimi jak między innymi: rak pęcherza moczowego, piersi, jelita grubego, wątroby, jajnika, trzustki, prostaty, nerki i wiele innych [19, 122, 161, 182, 194, 222, 224, 248]. Część prac dotyczy chorych dorosłych z rozpoznaniem mięsaków tkanek miękkich i kości [117, 157, 295, 207]. Jedyne kilka doniesień poświęconych było roli markerów hipoksji w nowotworach u dzieci. Dotyczyły one pacjentów z rozpoznaniem guza Wilmsa, NBL, *retinoblastoma*, *osteosarcoma* oraz niektórych guzów OUN [54, 55, 56, 111, 159, 180, 215]. **Do chwili obecnej w literaturze nie opublikowano wyników badań, dotyczących znaczenia markerów hipoksji u dzieci z MTM.**

W obecnej pracy badaniami objęłam 91 dzieci (38 dziewcząt i 53 chłopców, mediana wieku 105,7 miesięcy) z rozpoznaniem MTM. Wśród badanych było 66 pacjentów z RMS i 25 z MPNST. **To najliczniejsza grupa badana spośród dotychczas opublikowanych doniesień na temat roli markerów hipoksji w nowotworach u dzieci i jedna z bardziej licznych spośród prac dotyczących znaczenia niedotlenienia w mięsakah.**

Analiza częstości występowania ekspresji HIF-1 α , VEGF, GLUT-1 i CA IX w tkance nowotworowej pobranej przed leczeniem u dzieci z MTM wykazała **silną ekspresję VEGF u prawie 80% pacjentów, CA IX – u 63,7%, HIF-1 α – u 48,3%, a GLUT-1 – u 34% chorych.** Podobny odsetek komórek wykazujących silną immunoreaktywność CA IX stwierdzili w swej pracy Maseide i wsp. [151], którzy badali archiwalne parafinowe skrawki z 47 guzów uzyskanych od chorych dorosłych z rozległymi, głęboko położonymi MTM o wysokim stopniu złośliwości histologicznej. Silną ekspresję HIF-1 α u dzieci z *osteosarcoma* stwierdzono w 35%, a VEGF – w 69% badanych guzów [159]. Kubo i wsp. [130] stwierdzili silną ekspresję HIF-1 α w 40% badanych wycinków *chondrosarcoma* i w żadnym z wycinków pobranych z łagodnych guzów chrząstki.

Najdokładniej zbadanym markerem hipoksji jest VEGF, którego ekspresję stwierdzono w większości złośliwych nowotworów litych. Obecność silnej im-

munoreakcji VEGF w wielu przypadkach korelowała z gęstością naczyń krwionośnych w guzie [72]. Wykazano jednak, że odsetek komórek nowotworowych z pozytywnym barwieniem IHC na obecność VEGF różni się znacznie pomiędzy poszczególnymi typami guzów. Również poszczególne podtypy histologiczne MTM u dorosłych wykazywały różną częstość występowania silnej ekspresji VEGF [177]. Podobne różnice – czasami bardzo znaczne - dotyczyły częstości występowania silnej immunoreaktywności HIF-1 α , GLUT-1 i CA IX w różnych nowotworach. Mogą one wynikać z odmiennej metodyki badań, a zwłaszcza innych kryteriów uznawania przez patologa danego odczynu barwnego IHC za słaby lub silny [155]. Niektórzy autorzy w metodyce badań posługiwali się wyłącznie kryterium odsetka komórek nowotworowych, wykazujących ekspresję badanego markera, niezależnie od jej intensywności [119, 152, 163]. Inni za silną ekspresję markera uznawali wyłącznie odczyn o dużej intensywności barwnej, bez względu na ich rozprzestrzenienie w badanej tkance [159, 209].

W obecnej pracy, dla maksymalnego zobiektywizowania uzyskiwanych danych, posługiwałam się własną skalą, uwzględniającą zarówno siłę reakcji barwnej, jak i odsetek immunopozytywnych komórek. Na podstawie tych dwóch parametrów ustalałam współczynnik ekspresji poszczególnych markerów hipoksji. Jego wartość liczbowa wyznaczała ekspresję markerów jako słabą lub silną.

Nieco podobną półilosciową skalę do oceny HIF-1 α stosowali Shintani i wsp. w MTM u pacjentów dorosłych, Birner i wsp. u pacjentek z rakiem szyjki macicy i Schindl i wsp. w raku piersi [20, 192, 207]. Ocena ekspresji HIF-1 α i VEGF u dzieci z guzem Wilmsa również uwzględniała zarówno intensywność odczynu barwnego, jak i odsetek pozytywnych komórek [111]. Natomiast Kim i wsp. [119], w grupie 55 chorych dorosłych z MTM za silną ekspresję HIF-1 α uznawali jedynie przypadki, w których ekspresję markera stwierdzono w ponad 50% badanych komórek, zaś za silną ekspresję GLUT-1, CA IX i VEGF – już przypadki, w których odsetek immunopozytywnych komórek w guzie przekraczał 10%. Niższa częstość występowania silnej ekspresji HIF-1 α i wyższa częstość CA IX i VEGF w moich badaniach w porównaniu do badań nad MTM u dorosłych może wynikać z różnej budowy histologicznej analizowanych guzów, a tym samym – z innego nasilenia procesów hipoksji i zaburzeń metabolicznych w guzie. W badaniu Kim i wsp. [119] były to głównie mięsaki o budowie *liposarcoma* i *fibrohistiocytoza maligna*, zaś w moim materiale – RMS i MPNST.

W większości zbadanych przeze mnie guzów (93,4%) wykazałam silną ekspresję co najmniej jednego markera hipoksji. **U ponad 40% chorych stwierdziłam silną ekspresję aż czterech lub pięciu markerów jednocześnie. U dzieci z MTM wykazałam, że wszystkie analizowane markery hipoksji wzajemnie ze sobą korelowały dodatnio, co oznacza, że słaba lub silna ekspresja jedne-**

go markera związana była – odpowiednio – ze słabą lub silną ekspresją innego.

W nowotworach u dzieci najczęściej analizowano ekspresję HIF-1 α i CA IX. U pacjentów z *retinoblastoma* i NBL stwierdzono wysoki stopień ekspresji obu markerów w tkance nowotworowej oraz istotną dodatnią korelację pomiędzy nimi [55, 56, 215]. Natomiast analiza ekspresji tych markerów u dzieci z guzem Wilmsa metodą PCR w pracy Dungwa i wsp. nie wykazała ich wzajemnej korelacji [54]. Również u dzieci z *craniopharyngeoma* nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy CA IX, VEGF i HIF-1 α [180]. U dzieci i młodych dorosłych z *osteosarcoma* silną immunoreaktywność HIF-1 α i VEGF stwierdzono u 37,5% i 73% pacjentów, odpowiednio. Markery te korelowały z niektórymi czynnikami prognostycznymi, jednak w pracy nie określono wzajemnej korelacji pomiędzy samymi markerami [159].

W mięsach kości i tkanek miękkich u chorych dorosłych w większości prac analizowano pojedyncze markery hipoksji. Dominowały prace na temat HIF-1 α [95, 207, 243] i VEGF [40]. Dopiero Smeland i wsp. [209] podjęli badania nad znaczeniem ekspresji trzech markerów hipoksji: HIF-1 α , GLUT-1 i CA IX, w wybranych podtypach MTM u dorosłych. Stwierdzili oni, że spośród analizowanych markerów, jedynie GLUT-1 wykazywał niezależny wpływ na przeżycie wolne od choroby. W tym roku opublikowana została praca Kim i wsp. [119], w której po raz pierwszy oceniano jednoczesną ekspresję wszystkich głównych endogennych markerów hipoksji (HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF) w MTM, występujących u dorosłych. Podobnie, jak w mojej pracy, autorzy stwierdzili, że badane markery wykazują wzajemną istotną statystycznie dodatnią korelację.

Wyniki te wskazują na ścisłe wzajemnie powiązania pomiędzy zjawiskiem hipoksji, a procesami adaptacji do niej, zachodzące w obrębie tkanki nowotworowej. Wydają się one odzwierciedlać fakt, że HIF-1 α stanowi główny czynnik transkrypcyjny kaskady hipoksji, regulujący ekspresję ponad 100 genów, których produkty białkowe sprzyjają przystosowaniu komórek do niedotlenienia [141, 154, 237]. W wyniku hipoksji panującej w guzie nowotworowym, dochodzi do stałej przewlekłej aktywacji HIF-1 α , co w efekcie uruchamia szereg procesów „korzystnych” dla nowotworu, umożliwiających komórkom guza przetrwanie. Do najważniejszych z nich należą: neoangiogeneza, promowana głównie przez VEGF, uruchomienie beztlenowych przemian metabolicznych regulowane m. innymi przez GLUT-1 i kontrola wewnątrzkomórkowego pH, za którą odpowiada CA IX [154]. Wymienione czynniki uważane są obecnie za najważniejsze endogenne markery hipoksji, a ich tkankowa ekspresja w obrębie regionów niedotlenionych (lecz nie nekrotycznych) odzwierciedla aktywację złożonych procesów zależnych od hipoksji. **Często występująca silna ekspresja HIF-1 α , VEGF, GLUT-1 i CA IX i wzajemna dodatnia korelacja pomiędzy tymi markerami w MTM u dzieci, potwierdza ścisłe współzależności pomiędzy**

dzy procesami hipoksji, neoangiogenezy, regulacji przemian beztlenowych i kontroli pH w komórkach nowotworowych. Sugeruje też istotną rolę tych procesów w patogenezie mięsaków u dzieci.

5.3 Korelacja pomiędzy ekspresją markerów hipoksji w MTM u dzieci, a wartością indeksu Ki-67

W pracy przeanalizowałam związek stopnia ekspresji endogennych markerów hipoksji z wartością indeksu proliferacyjnego Ki-67. W badanej grupie dzieci z MTM stopień tkankowej ekspresji Ki-67 wahał się od 3% do 80%, z medianą 33%. Odsetek chorych z $IK67 \geq 30\%$ (przyjętym za wysoki) wyniósł 58,2%. **W pracy wykazałam, iż poza CA IX, wszystkie pozostałe markery hipoksji w sposób statystycznie istotny korelowały dodatnio z wartością IK67. Uzyskane wyniki wskazują na związek aktywacji procesów hipoksji i adaptacji do niej z wyższą aktywnością proliferacyjną MTM u dzieci.** Również inni autorzy stwierdzili związek pomiędzy silną ekspresją poszczególnych markerów hipoksji, a wysoką ekspresją Ki-67 u chorych z rakiem trzustki, jasnokomórkowym rakiem nerki, niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz z przerzutami niektórych raków do OUN [9, 10, 11, 218]. W przeciwieństwie do uzyskanych przeze mnie wyników, Kim i wsp. [119] wykazali, że silna ekspresja CA IX i Ki-67 identyfikuje populację komórek najlepiej przystosowanych do niedotlenienia, aktywnie proliferujących i opornych na terapię.

W ostatnich latach wykazano, iż niedotlenienie tkanki nowotworowej stanowi główny czynnik przyczynowy proliferacji, inwazji i przerzutowania guza. W wyniku hipoksji część niedotlenionych komórek nowotworowych obumiera, jednak inne podlegają wielu genetycznym i molekularnym zmianom adaptacyjnym, umożliwiającym ich przetrwanie w niesprzyjających warunkach [26, 227]. Pod wpływem hipoksji w obrębie rosnącego guza nowotworowego promowane są komórki z mutacją nowotworowych genów supresorowych [193, 238, 250], aktywacją licznych onkogenów [42, 110, 135] oraz wykazujące ekspresję czynników wzrostu. Wszystkie te zjawiska promują proliferację komórek guza [89, 154, 178].

Aktywność proliferacyjną nowotworów określa się między innymi przy pomocy stopnia ekspresji antygenu Ki-67, czyli indeksu proliferacyjnego IK67. Wprawdzie nie ustalono dotąd wartości IK67, która w sposób jednoznaczny różnicowałaby rozrosty o wysokiej i niskiej aktywności proliferacyjnej, ale w większości nowotworów (MTM, guzy kości, glejaki OUN, raki jajnika, nowotwory piersi i trzustki) odsetek komórek wykazujących ekspresję antygenu Ki-67 korelował dodatnio ze stopniem histologicznej złośliwości [5, 7, 108, 211, 221].

W MTM u pacjentów dorosłych wartość indeksu Ki-67 korelowała dodatnio z wielkością guza, stopniem martwicy i inwazji naczyniowej w guzie oraz obecnością przerzutów odległych [44], a także z prawdopodobieństwem EFS [32, 211]. U dzieci z MTM najwyższy odsetek komórek z pozytywnym barwieniem

w kierunku Ki-67 występował u dzieci z bardziej agresywnym i opornym na CHT podtypem nowotworu. Wartość indeksu Ki-67 korelowała też z przeżyciem u pacjentów z RMS i MPNST [116, 233]. Hoos i wsp. [94] przeprowadzili interesujące badania w dwóch identycznych pod względem czynników prognostycznych podgrupach chorych z doszczętnie wyciętymi kończynowymi MTM o wysokim stopniu histologicznej złośliwości. Badacze ci wykazali, iż wysoki indeks proliferacyjny Ki-67 (podobnie, jak w mojej pracy za granicę przyjęto wartość 30%) występował znacząco częściej w podgrupie chorych, którzy zmarli z progresji choroby. Tym samym autorzy dowiedli, że wartość IK67 identyfikuje podgrupę chorych z guzami o szczególnie agresywnym i złośliwym fenotypie.

5.4 Markery hipoksji a kliniczno-patologiczne czynniki prognostyczne w MTM u dzieci

U dzieci z MTM dobór optymalnego leczenia i prognozowanie prawdopodobieństwa EFS i OS opiera się na obecności określonych kliniczno-patologicznych czynników. Należą do nich: podtyp histologiczny MTM, wiek chorych, wielkość, inwazyjność i lokalizacja guza pierwotnego, stadium zaawansowania choroby (w tym zajęcie węzłów chłonnych i obecność przerzutów odległych) oraz doszczętność resekcji pierwotnej i/lub wtórnej nowotworu. Również odpowiedź na wstępną CHT stanowi istotny czynnik rokowniczy, decydujący o sposobie dalszego leczenia. Jednak stosowana w MTM u dzieci stratyfikacja do grup ryzyka – choć bardzo szczegółowa – nie jest idealna. W praktyce klinicznej nierzadko zdarzają się trudności z oceną stadium TNM guza, doszczętności PE czy stopnia regresji guza po wstępnej CHT. Niezwykle przydatne byłoby uzupełnienie dotychczas używanych metod diagnostycznych przy pomocy nowych nieinwazyjnych markerów, których oznaczanie w tkance nowotworowej w momencie rozpoznania MTM u dzieci mogłoby pomóc określić aktualną aktywność nowotworu i przybliżyć rokowanie.

Dlatego kolejnym etapem pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy stopień ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz wartość IK67 wykazują związek z używanymi w praktyce kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi w MTM u dzieci.

W badanej grupie dominowali chorzy w zaawansowanych stadiach choroby (III i IV stadium – 83,5% chorych), u których pierwotnie możliwa była jedynie diagnostyczna biopsja guza (61,5%). U 67% chorych średnica guza przekraczała 5 cm, u 84,6% guz był inwazyjny i u 78% zlokalizowany w niekorzystnych rokowniczo regionach. Wykazałam, że u chorych z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi istotnie częściej występowała silna ekspresja markerów hipoksji. Pacjenci z bardziej zaawansowaną chorobą, a zwłaszcza w stadium przerzutowym, znacząco częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α , CA IX i Ki-67, niż chorzy w niskich stadiach nowotworu. Stwierdziłam, że **im wyższe było**

stadium choroby, tym silniejsza była ekspresja HIF-1 α , CA IX i Ki-67, jak również GLUT-1 i w mniejszym stopniu ($p=0,0744$) – VEGF. Chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych znacząco częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α . U chorych w stadiach III i IV częściej występowała silna ekspresja co najmniej trzech markerów hipoksji jednocześnie.

W zdecydowanej większości opublikowanych badań, podobnie, jak w prowadzonych przeze mnie, stwierdzono związek pomiędzy silną ekspresją markerów hipoksji, a obecnością czynników, świadczących o większym zaawansowaniu i agresywności nowotworów. Potwierdza to tezę, iż hipoksja w guzie nowotworowym ma dwa oblicza – z jednej strony powoduje zahamowanie proliferacji, różnicowanie i śmierć komórek nowotworowych, z drugiej zaś – na skutek aktywacji licznych procesów adaptacyjnych, jest podstawowym biologicznym mechanizmem, powodującym wzrost i progresję nowotworu [26, 227].

Indukowane przez HIF-1 α zmiany w matrix międzykomórkowym, ułatwiają inwazję i migrację komórek nowotworu, co zwiększa ich potencjał przerzutowy [66]. Również aktywowanie przez HIF-1 α neoangiogenezy sprzyja przedostawaniu się komórek nowotworowych do krwiobiegu, co w konsekwencji prowadzi do tworzenia przerzutów [51]. Dowiedziono tego zarówno w badaniach doświadczalnych *in vitro*, jak i klinicznych *in vivo* [32, 72, 185]. Jedną z pierwszych hipotez dotyczących roli hipoksji w tworzeniu przerzutów odległych w MTM przedstawił Brizel w 1996 roku. Wykazał on, że u pacjentów dorosłych z rozpoznaniem zlokalizowanych MTM o wysokim stopniu złośliwości, ryzyko rozsiewu guza korelowało ze stopniem niedotlenienia w obrębie ogniska pierwotnego [27]. Silną ekspresję VEGF stwierdzano w wielu typach histologicznych nowotworów i w większości z nich korelowała ona z istotnie większą częstością występowania przerzutów odległych [53, 169]. Yanagawa i wsp. [242] stwierdzili również, że silna ekspresja VEGF-D istotnie nasila migrację komórek włókniamięsaką przez ścianę naczyń limfatycznych, zwiększając ryzyko przerzutów drogą chłonną. Z kolei Liu i wsp. [143] potwierdzili, że mechanizm tworzenia przerzutów w raku płuca związany jest z interakcją pomiędzy VEGF-A i receptorem dla VEGF-1. Potwierdzeniem dla tych zjawisk były wyniki badań eksperymentalnych na modelach zwierzęcych, które pokazały, że blokowanie funkcji VEGF hamuje wzrost i rozsiew mięsaków [4, 119]. Obecnie w praktyce klinicznej stosowana jest już terapia celowana anty-VEGF u pacjentów dorosłych z MTM.

W mojej pracy obecność przerzutów odległych oraz zajęcie węzłów chłonnych w sposób istotny statystycznie korelowały z częstszym występowaniem HIF-1 α . Podobne wyniki uzyskali Mizobuchi i wsp. u pacjentów z *osteosarcoma*. Wykazali oni istotny związek pomiędzy silną ekspresją HIF-1 α i skłonnością do tworzenia odległych przerzutów. Ryzyko wystąpienia przerzutów było ponad 4 x wyższe u chorych z silną ekspresją HIF-1 α , niż u pacjentów ze słabą tkankową ekspresją tego markera [159]. Również Pinato i wsp. [175]

stwierdzili, że ekspresja HIF-1 α , obecność martwicy i inwazji naczyniowej były niezależnymi czynnikami przewidującymi wystąpienie przerzutów pheochromocytoma.

U dzieci z NBL silna ekspresja HIF-1 α korelowała pozytywnie z najważniejszymi klinicznymi czynnikami złej prognozy, takimi jak: wyższe stadia choroby, wiek >18 miesięcy w momencie diagnozy i grupa wysokiego ryzyka [55]. Również silna ekspresja CA IX, choć stwierdzana jedynie u 18% chorych, korelowała znacząco z wyższym stadium nowotworu i grupą wysokiego ryzyka [56]. W przeciwieństwie do badań nad markerami hipoksji w NBL, nie stwierdzono związku pomiędzy silną ekspresją HIF-1 α i CA IX, a którymkolwiek z istotnych klinicznie czynników prognostycznych u dzieci z guzem Wilmsa [54] oraz stopniem inwazji i zróżnicowania *retinoblastoma* u dzieci [215].

W raku jelita grubego, pęcherza moczowego i żołądka wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy tkankową ekspresją GLUT-1, a wyższym stadium zaawansowania nowotworów [112, 188, 244]. U pacjentów z *chondrosarcoma* Boeuf i wsp. wykazali, że ekspresja CA IX jest niezależnym wskaźnikiem przewidującym przeżycie wolne od przerzutów [21]. Analizując ekspresję HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 oraz VEGF w tkance nowotworowej pacjentów dorosłych z MTM, Kim i wsp. [119] stwierdzili, że ekspresja wszystkich badanych markerów hipoksji korelowała z bardziej zaawansowanymi stadiami choroby. Jednocześnie autorzy nie stwierdzili istotnego związku pomiędzy ekspresją ww. markerów, a wielkością i lokalizacją guza. Podobne wyniki uzyskałam w swojej pracy, w której nie wykazałam współzależności pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 i VEGF, a wiekiem, płcią, wielkością i inwazyjnością guza pierwotnego.

Stwierdziłam natomiast istotny statystycznie związek badanych markerów hipoksji z podtypem histologicznym MTM. **Pacjenci z MTM o niekorzystnej histologii znacząco częściej charakteryzowali się silną ekspresją HIF-1 α , VEGF i GLUT-1 w przeciwieństwie do pacjentów z histologią korzystną, u których dominowała jedynie słaba ekspresja tych markerów. Najwyraźniej związek ten widać było u pacjentów z RMA, wykazujących silną ekspresję każdego z analizowanych markerów hipoksji, czyli: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF, istotnie częściej, niż chorzy z RME. U pacjentów z histologią niekorzystną istotnie częściej występowała również silna ekspresja jednocześnie czterech lub pięciu badanych markerów.**

Opisane zjawiska świadczą o tym, że aktywacja procesów hipoksji i adaptacji do niedotlenienia zachodzą szczególnie silnie w bardziej agresywnych fenotypowo i genotypowo podtypach histologicznych MTM. Można wysunąć również inną hipotezę – iż guzy nowotworowe poddane przewlekłej i/lub ostrej przejściowej hipoksji uruchamiają liczne procesy przystosowawcze, które sprzyjają nie tylko przeżyciu komórek nowotworowych, ale również zmianie ich genotypu i fenotypu na bardziej złośliwy, inwazyjny i oporny na leczenie. U dzieci

niekorzystna histologia mięsaka, a zwłaszcza podtyp RMA, związane są z istotnie gorszym rokowaniem. Pacjenci z RMA prezentują często również inne niekorzystne czynniki prognostyczne, takie jak: niekorzystna lokalizacja, duże rozmiary i inwazyjność guza pierwotnego i wczesne przerzuty do węzłów chłonnych i narządów odległych. Z tego powodu wszyscy chorzy z RMA, niezależnie od stadium zaawansowania nowotworu, kwalifikowani są wg CWS-2006 do grupy wysokiego, a w przypadku zajęcia węzłów chłonnych – do grupy bardzo wysokiego ryzyka. Stwierdzenie występowania w tej grupie chorych istotnie częstszej silnej ekspresji wszystkich endogennych markerów hipoksji potwierdza istnienie związku pomiędzy reprezentowanymi przez nie procesami, a nabywaniem przez nowotwór cech biologicznej złośliwości. Co ciekawe, **w pracy nie wykazałam korelacji pomiędzy niekorzystnym typem histologicznym MTM oraz obecnością RMA, a wartością IK67.**

Podobne obserwacje poczynili inni autorzy. Wiele danych wskazuje, że histologiczna złośliwość guzów litych w dużej mierze zależy od procesu nowotworowej angiogenezy, której nasilenie związane jest ściśle, choć nie wyłącznie, z procesami hipoksji i aktywacją HIF-1 α . Wykazano, że gęstość występowania i rozległość regionów niedotlenienia, różni się znacząco nawet w nowotworach o tej samej budowie histologicznej [227]. W opublikowanej niedawno pracy, Kim i wsp. ujawnili istotne różnice w częstości występowania ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF pomiędzy różnymi podtypami MTM u pacjentów dorosłych. Najrzadziej ekspresję markerów hipoksji stwierdzano u chorych z *liposarcoma*, najczęściej – z *fibrohistiocytoma malignum* i *leiomyosarcoma*. Istotne było spostrzeżenie, że ekspresja HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF korelowała dodatkowo ze stopniem zróżnicowania histologicznego MTM, niezależnie od jego podtypu histologicznego [119]. Younes i wsp. stwierdzili, że silna ekspresja GLUT-1 u chorych z rakiem pęcherza świadczy o bardziej agresywnym potencjale biologicznym guza [244]. Nadekspresję HIF-1 α wykazano z kolei w niektórych zmianach przednowotworowych, w tym gruczolaku okrężnicy, raku przewodowym sutka i śródnaślonkowym raku prostaty, lecz nie w łagodnych nowotworach piersi i macicy. W wielu nowotworach, w tym w raku piersi, częstość ekspresji HIF-1 α była istotnie większa w zmianach przerzutowych w stosunku do guza pierwotnego [248]. U dzieci z NBL silna ekspresja HIF-1 α oraz CA IX korelowały znamienne z niekorzystnym prognostycznie podtypem histologicznym i genetycznymi wskaźnikami agresywności nowotworu, takimi jak: amplifikacja onkogenu *MYC-N* i delecja 1p [55, 56].

Stwierdzoną przeze mnie wyraźną różnicę w nasileniu ekspresji markerów hipoksji pomiędzy podtypami RME i RMA uważam za niezwykle interesującą i ważną z klinicznego punktu widzenia. Istotne wydaje mi się odkrycie, że pęcherzykowy podtyp RMS – tak różny od zarodkowego pod względem genetycznym, biologicznym i rokowniczym – charakteryzuje się statystycznie istotnie bardziej nasiloną aktywacją procesów hipoksji i adaptacji do niej. **Z jednej strony po-**

twierdza to związek tych procesów z bardziej agresywnie przebiegającymi nowotworami, z drugiej – daje asumpt do podjęcia prac nad zastosowaniem terapii celowanych w źle rokującym podtypie histologicznym RMA.

5.5 Markery hipoksji i antygen Ki-67 a odpowiedź na CHT

W większości przypadków rozpoznanie MTM stawiane jest późno, w zaawansowanych stadiach, kiedy niemożliwa jest doszczętna nieokaleczająca pierwotna resekcja zmian nowotworowych. U tych chorych leczenie zaczyna się od neo-adjuwantowej CHT i RT, która ma na celu zmniejszenie rozmiarów guza. To z kolei u części pacjentów umożliwia przeprowadzenie radykalnej odroczonej resekcji guza, co znacząco poprawia rokowanie. Rozwój chemiooporności przez komórki nowotworu stanowi jedną z zasadniczych przyczyn niepowodzenia leczenia onkologicznego. W praktyce klinicznej niezwykle przydatna byłaby możliwość przewidywania, którzy chorzy mają szansę odnieść korzyść z agresywnej wielolekowej CHT, a u których wrażliwość na CHT i/lub RT będzie niewielka. Poza wrażliwością na CHT, wynikającą z histologicznego podtypu MTM, nieznane są inne czynniki, umożliwiające indywidualne prognozowanie odpowiedzi na CHT.

Dlatego w swojej pracy postanowiłam odpowiedzieć na pytanie, czy na podstawie ekspresji markerów hipoksji i wartości IK67 można przewidzieć odpowiedź na CHT u dzieci z MTM. W tym celu przeanalizowałam związek, pomiędzy stopniem tkankowej ekspresji badanych markerów, a odpowiedzią na CHT po trzech pierwszych kursach leczenia u 72 chorych z makroskopowymi pozostałościami nowotworu po PE. Dobrą odpowiedź na CHT odnotowałam u 52 z nich (72%), zaś złą – u 20 (28%). Wykazałam, że **im silniejsza była ekspresja VEGF w tkance guza, tym stwierdzano gorszą odpowiedź na CHT i odwrotnie – im słabsza ekspresja VEGF – tym lepsza była reakcja na CHT ($r=0,26$, $p=0,0301$).** W przypadku CA IX oraz GLUT-1 również obserwowano bliską statystycznej istotności dodatnią korelację, pomiędzy ekspresją markerów, a uzyskiwaną reakcją na CHT ($p=0,0749$ i $p=0,0924$, odpowiednio). **Jednocześnie silna ekspresja VEGF, GLUT-1 i CA IX występowała u 55% chorych źle reagujących na CHT i tylko u 25% chorych reagujących dobrze ($p=0,00937$).** Z kolei u dzieci z dobrą odpowiedzią na CHT istotnie częściej stwierdzano brak ekspresji lub silną ekspresję tylko jednego z tych trzech markerów, co w grupie chorych reagujących źle na CHT zaobserwowano tylko u 10% dzieci. **U chorych tych wykazano częstsze występowanie silnej ekspresji czterech lub wszystkich pięciu badanych markerów.**

Schwarz jako pierwszy zauważył, iż prawidłowo utlenowane komórki skóry są bardziej wrażliwe na promieniowanie, niż komórki hipoksyczne [196]. Z kolei Thomlinson i Gray stwierdzili, że hipoksja jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych i przyczynia się do powstawania oporności na promieniowanie [225]. Wyróżniono w nowotworze cztery subpopulacje komórek o

różnym stopniu utlenowania – od prawidłowego (>10% tlenu) po głęboko niedotlenione, o utlenowaniu około 0,1%. Eksperymentalne badania wykazały, że frakcja komórek w stanie pośredniej hipoksji, o parcjalnemu ciśnieniu O_2 w granicach 0,5-20 mmHg, może powodować większą promieniooporność, niż frakcja komórek będących w chronicznej hipoksji [67]. Komórki częściowo niedotlenowane, obecne w strefie przejściowej, pomiędzy komórkami martwiczymi, a komórkami w pełni zaopatrzonymi w tlen, adaptują się do niedoboru O_2 , wskutek czego powstaje wyselekcjonowany klon komórkowy ze zmienionym metabolizmem i utrwalonymi zmianami genetycznymi [228]. W efekcie komórki te nabywają bardziej złośliwego fenotypu i stają się odporne na CHT i RT, co pogarsza wyniki leczenia. Stwierdzono również, że wznowy nowotworu są bardziej odporne na niedotlenienie niż komórki guza pierwotnego, co przejawia się zwykle mniejszą wrażliwością nawrotów nowotworu na leczenie onkologiczne. Mniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na RT wynika między innymi z faktu, iż w napromienianej tkance dochodzi do obniżenia powstawania reaktywnych form tlenu. Natomiast zmniejszona wrażliwość na CHT wiąże się z ograniczoną penetracją leku do regionów słabo unaczynionych, indukowaniem oporności wielolekowej i słabszym działaniem wybranych leków cytostatycznych w warunkach niedotlenienia [30]. W efekcie hipoksja – zamiast uszkadzać komórki nowotworowe – promuje ich przeżycie, aktywną proliferację i oporność na leczenie [48].

Badania Sullivana i wsp. [216] na liniach komórkowych raka piersi i jelita grubego wykazały, że niedotlenienie powoduje oporność na działanie antracyklin, etopozydu i mitoksantronu. Ustalono, iż oporność ta była promowana przez HIF-1 α i wiązała się z hamowaniem wywołanego przez cytostatyki procesu starzenia się komórek. Potwierdzeniem znaczenia HIF-1 α w promowaniu procesów oporności na cytostatyki jest możliwość ich odwrócenia w wyniku zastosowania inhibitorów HIF-1 α [42, 119, 189]. Otwiera to nowe możliwości terapii w szczególnie opornych na CHT guzach, ich wznowach i przerzutach.

Niewiele wiadomo na temat wpływu hipoksji na odpowiedź na CHT w nowotworach u dzieci. Hussein i wsp. [98] stwierdzili, że przedłużona hipoksja prowadzi do zmniejszenia apoptozy wywołanej przez winkrystynę i etopozyd w liniach komórkowych NBL: SH-EP1 i SH-SY5Y. Ani krótkotrwała, ani przedłużona hipoksja nie wpływała na odpowiedź komórek na cisplatinę. Wykazano również, iż zahamowanie HIF-1 α może stanowić obiecującą metodę przełamania oporności na cytostatyki w tym nowotworze. Podobne wyniki prac doświadczalnych nad chemioopornością komórek chłoniaka u dzieci opublikowali Hernandez-Luna i wsp. [91]. Wykazali oni, iż ekspresja białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-xl, regulowana jest poprzez HIF-1 α i jednoczesna nadekspresja obu białek może spowodować oporność na chemioterapię. Zahamowanie aktywności HIF-1 α wywoływało obniżenie ekspresji Bcl-xl, co korelowało z uwrażliwieniem komórek nowotworowych na leki chemioterapeutyczne.

Prac klinicznych, analizujących prognostyczną wartość markerów hipoksji w przewidywaniu odpowiedzi na CHT jest niewiele. Tylko jedna z nich dotyczy pacjentów z MTM. W tym roku Kim i wsp. [119] opublikowali jako pierwsi na świecie badania nad znaczeniem ekspresji markerów hipoksji u pacjentów dorosłych z MTM, otrzymujących CHT. Badacze wykazali, że nadekspresja HIF-1 α jest niezależnym czynnikiem, przewidującym słabą odpowiedź na CHT w tej grupie chorych. W moich badaniach przeprowadzonych u dzieci z MTM nie potwierdziłam niezależnej roli HIF-1 α w prognozowaniu reakcji na CHT, natomiast rolę taką pełnił VEGF i w mniejszym stopniu – CA IX i GLUT-1. Pomimo wielu publikacji na temat roli VEGF w progresji nowotworów, tylko pojedyncze prace oceniają związek VEGF z odpowiedzią na CHT. W metaanalizie wyników dotychczas opublikowanych prac na temat roli VEGF u pacjentów z *osteosarcoma* wykazano, że marker ten nie odgrywa roli w przewidywaniu efektu neo-adjuwantowej CHT w tym nowotworze [87]. Natomiast u chorych z rakiem jajnika VEGF okazał się niezależnym czynnikiem prognostycznym dla odpowiedzi na CHT opartą na związkach platyny [153, 208]. Tsai i wsp. [226] zaobserwowali, że słaba ekspresja VEGF u chorych z przerzutowym rakiem jelita grubego stanowi dobry czynnik prognostyczny dla odpowiedzi na CHT pierwszej linii (FOLFIRI plus bevacizumab). Również u pacjentek z rakiem piersi dowiedziono, iż na podstawie silnej ekspresji VEGF możliwa jest identyfikacja podgrupy chorych o bardzo złym rokowaniu i oporności na konwencjonalną CHT, które mogą odnieść korzyść z terapii antyangiogennej [74]. Z kolei silna ekspresja GLUT-1 była niezależnym czynnikiem prognostycznym odpowiedzi na CHT u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika [35], a silna ekspresja CA IX związana była z niepowodzeniem RT u pacjentów z rakiem głowy i szyi [127]. U chorych z rakiem piersi ekspresja CA IX i HIF-1 α wiązała się z gorszą odpowiedzią na skojarzoną terapię z zastosowaniem cytostatyków i tamoksyfenu [735]. Wykazano, że im ekspresja HIF-1 α była silniejsza, tym gorszą reakcję na leczenie stwierdzano u chorych. Jedyne przypadki całkowitej histopatologicznej odpowiedzi na CHT stwierdzono u pacjentek nie wykazujących ekspresji HIF-1 α w guzie pierwotnym [75].

Wyniki badań uzyskanych przeze mnie w obecnej pracy wskazują, że **stopień ekspresji wybranych markerów hipoksji w guzie nowotworowym przed zastosowaniem CHT może stanowić obiecujący czynnik prognozujący chemiowrażliwość mięsaków**. W przypadku MTM u dzieci, uważam, że istotne byłoby podjęcie badań w bardziej jednorodnej histologicznie grupie – np. w podtypie pęcherzykowym RMS, w którym odpowiedź na leczenie chemiczne jest niepewna. W przyszłości planuję opracowanie tego zagadnienia.

5.6 Markery hipoksji i IK67 a przebieg i wynik leczenia MTM u dzieci

Wystąpienie wznowy lub progresji nowotworu, pomimo aktywnie prowadzonego leczenia onkologicznego, stanowi główną przyczynę niepowodzenia

terapii u dzieci z MTM. W badanej przez mnie grupie wznowa choroby (w większości lokalna) wystąpiła u 51 chorych (56%). W całej grupie badanej żyje 50 chorych (54,9%), podczas gdy 41 zmarło w wyniku progresji MTM. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS w grupie badanej wynosiło $37,4 \pm 5,6\%$, zaś 5-letniego OS – $48,8 \pm 5,9\%$. Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych ustaliłam, że do czynników kliniczno-patologicznych, wpływających niezależnie na EFS należały: stadium zaawansowania i odpowiedź na CHT, zaś na OS – zajęcie węzłów chłonnych i odpowiedź na CHT.

Jednym z celów mojej pracy było zbadanie, czy stopień ekspresji markerów hipoksji oraz antygenu Ki-67 określone metodami IHC w guzie nowotworowym przed leczeniem wykazują związek z EFS i OS uzyskanym przez dzieci z MTM.

5.6.1 Wpływ badanych markerów na EFS

W analizie jednoczynnikowej wykazałam, że ekspresja wszystkich badanych markerów hipoksji (lecz nie IK67), w sposób statystycznie znamienny wpływała na prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci z MTM ($p < 0,001$). Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS stwierdziłam u dzieci, u których w tkance guza wykryto silną ekspresję GLUT-1 ($7,4 \pm 5,0\%$) i HIF-1 α ($13,3 \pm 5,3\%$). Z kolei chorzy, u których nie stwierdzono silnej immunoreaktywności VEGF, mieli najwyższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS, wynoszące $92,3 \pm 7,4\%$. Wyniki analizy wieloczynnikowej wykazały, iż **ekspresja HIF-1 α , VEGF i CA IX, obok odpowiedzi na CHT, miały niezależny wpływ na EFS u dzieci z MTM.**

U wszystkich pacjentów, u których wystąpiła wznowa nowotworu, stwierdziłam silną tkankową ekspresję co najmniej dwóch badanych markerów. Brak ekspresji markerów hipoksji stwierdzano wyłącznie w podgrupie chorych bez wznowy MTM. W grupie ze wznową MTM istotnie częściej obecna była silna ekspresja co najmniej czterech badanych markerów, w porównaniu do dzieci bez wznowy. Okazało się, że **im więcej markerów wykazywało jednocześnie silną ekspresję w tkance MTM przed leczeniem, tym prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u pacjentów było niższe.** U chorych, u których nie wykryto silnej ekspresji żadnego z badanych markerów lub ekspresję maksymalnie jednego markera prawdopodobieństwo 5-letniego EFS wynosiło 100% i $95,0 \pm 4,9\%$, odpowiednio. Stwierdziłam silną ekspresję trzech i więcej markerów (u 52 dzieci) oraz czterech i więcej markerów (u 38 chorych) w sposób znaczący zwiększało ryzyko wystąpienia wznowy nowotworu. Prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u tych pacjentów wynosiło jedynie $12,7 \pm 5,2\%$ oraz $4,6 \pm 4,1\%$, odpowiednio. Stwierdziłam również, iż **jednoczesna silna ekspresja czynników niezależnie wpływających na EFS, czyli: HIF-1 α , VEGF i CA IX, wiązała się z pewnym wystąpieniem wznowy w ciągu 5 lat od rozpoznania.** Przeciwnie,

prawdopodobieństwo 5-letniego EFS u dzieci, u których nie wykryto silnej ekspresji żadnego z trzech wymienionych markerów wyniosło 100%.

5.6.2 Wpływ badanych markerów na OS

Przeprowadzone przeze mnie analizy statystyczne potwierdziły, że **silna ekspresja wszystkich markerów hipoksji oraz wysoki IK67 wpływały negatywnie na OS u dzieci z rozpoznaniem MTM**. Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego OS stwierdzono u chorych z silną ekspresją GLUT-1 (jedynie $15,0 \pm 7,6\%$), HIF-1 α ($24,7 \pm 6,7\%$) i CA IX ($25,1 \pm 6,8\%$). Z kolei dzieci z MTM, u których stwierdzono jedynie słabą ekspresję VEGF, miały 100%-towe prawdopodobieństwo 5-letniego OS.

W analizie wieloczynnikowej wykazałam, że spośród badanych markerów hipoksji na OS u dzieci z MTM niezależnie wpływały: HIF-1 α i CA IX. Markery te pozostały niezależne również po uwzględnieniu wpływu na OS zajęcia węzłów chłonnych i odpowiedzi na CHT. Oznacza to, że stwierdzenie silnej ekspresji HIF-1 α i/lub CA IX w tkance guza u pacjenta z MTM przed leczeniem może być silniejszym negatywnym czynnikiem prognostycznym co do przeżycia, niż dotychczas stosowane kliniczno-patologiczne czynniki, na których opiera się stratyfikacja chorych do wyższych grup ryzyka. **Chorzy z jednoczesną silną ekspresją HIF-1 α i CA IX w guzie mieli bardzo niskie prawdopodobieństwo 5-letniego OS ($7,1 \pm 4,8\%$).** Z kolei chorzy, u których nie wykazano silnej ekspresji ani HIF-1 α , ani CA IX, mieli prawdopodobieństwo 5-letniego OS = 100%. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS u dzieci z silną ekspresją albo HIF-1 α , albo CA IX, było pośrednie i wyniosło $65,0 \pm 8,8\%$.

Na podstawie uzyskanych wyników badań IHC i analiz statystycznych stwierdziłam również, iż prawdopodobieństwo 5-letniego OS u dzieci z MTM zależało w sposób istotny od liczby markerów, ulegających silnej ekspresji w tkance guza. **W analizowanej grupie żyją wszyscy chorzy, u których wykryto silną ekspresję nie więcej niż jednego markera.** Bardzo dobre rokowanie i prawdopodobieństwo 5-letniego OS przekraczające 90% stwierdziłam również u dzieci, u których występowała silna ekspresja maksymalnie dwóch markerów. **Natomiast stwierdzenie silnej ekspresji czterech lub pięciu badanych markerów w sposób znaczący zwiększało ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia nowotworu. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS u tych pacjentów wyniosło jedynie $8,5 \pm 5,6\%$.**

Wyniki moich badań są zbieżne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, badających znaczenie ekspresji markerów hipoksji w przewidywaniu ryzyka wystąpienia wznowy oraz zgonu z progresji nowotworu. W różnych typach nowotworów złośliwych potwierdzono niezależny wpływ silnej tkankowej ekspresji poszczególnych markerów hipoksji na gorszy EFS i OS chorych. Kilka interesujących badań dotyczyło pacjentów dorosłych z MTM. Badania przeprowadzone w dużej grupie MTM o wysokim stopniu złośliwości wykazały, iż

przeżycie całkowite było znacząco krótsze w przypadku obecnej ekspresji CA IX w tkance nowotworowej [151]. Shintani i wsp., analizując 49 guzów z grupy MTM dowiedli, że silna i umiarkowana ekspresja HIF-1 α związane były niezależnie z krótszym przeżyciem chorych [207]. Podobne wyniki, dokumentujące związek silnej ekspresji HIF-1 α oraz CA IX z krótszym OS i przeżyciem wolnym od progresji u chorych z MTM, przedstawili ostatnio Kim i wsp. [119]. Wykazali oni, iż HIF-1 α jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia u pacjentów z MTM. Silna ekspresja HIF-1 α korelowała też z gorszym całkowitym przeżyciem chorych z rakiem szyjki macicy, płuc, jelita grubego i endometrium [62, 123, 138, 198]. W zaawansowanych nowotworach głowy i szyi ekspresja HIF-1 α i CA IX nie miała istotnego wpływu na przeżycie chorych, zarówno w analizie jedno-, jak i wieloczynnikowej. Jednak OS pacjentów z silną ekspresją jednego lub obu markerów było o ok. 2 lata krótsze, niż OS pacjentów ze słabą ekspresją HIF-1 α i/lub CA IX [107].

W wielu nowotworach dowiedziono, że silna ekspresja VEGF wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia odległych przerzutów oraz istotnie gorszym przeżyciem całkowitym [53, 169]. U chorych z rakiem piersi osiem z dziewięciu retrospektywnych badań podsumowanych przez Gaspariniego i wsp. [74] wykazały, że silna ekspresja VEGF związana była istotnie statystycznie z gorszym EFS, OS lub oboma parametrami. Pacjentki z rakiem piersi we wczesnych stadiach zaawansowania, wykazujące silną ekspresję VEGF, miały istotnie wyższe ryzyko wznowy i/lub zgonu, niż chore z guzami o słabym nasileniu angiogenezy. U pacjentów z *osteosarcoma* z silną ekspresją VEGF stwierdzono korelację z gorszym EFS i OS [114, 217]. Prognostyczne znaczenie silnej ekspresji GLUT-1 wykazano w wielu typach nowotworów złośliwych, takich jak: *osteosarcoma*, rak przewodów żółciowych, rak żołądka, jamy ustnej i jajnika [12, 60, 102, 129, 199]. Minami i wsp. [158] przeprowadzili badania nad znaczeniem prognostycznym p53, Ki-67, VEGF oraz GLUT-1 u chorych z doszczętnie usuniętym rakiem płuc. Na podstawie analizy jednoczynnikowej wpływ na przeżycie miały: ekspresja GLUT-1 oraz VEGF. Natomiast w analizie wieloczynnikowej czynnikiem prognostycznym dla przeżycia pozostał GLUT-1 [158]. Znaczenie prognostyczne GLUT-1 zostało udokumentowane również u chorych z mięsakami kości oraz tkanek miękkich. U pacjentów z nadekspresją GLUT-1 prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia było znacznie mniejsze, niż u chorych ze słabą ekspresją tego markera [63]. Smeland i wsp. przeanalizowali ekspresję HIF-1 α , HIF-2 α , GLUT-1 i CA IX w 206 mięsakach o budowie nie-GIST. W analizie wieloczynnikowej silna ekspresja GLUT-1 okazała się niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia [209].

U dzieci z chorobą nowotworową wpływ markerów hipoksji na EFS i OS wykazano w przypadku NBL. Silna ekspresja HIF-1 α i CA IX wiązała się z gorszym EFS i OS chorych, co wykazano w sposób istotny w analizie jednoczynnikowej, jednak po uwzględnieniu grupy wysokiego ryzyka, znaczenie

markerów hipoksji traciło istotność statystyczną [55, 56]. U dzieci z MTM przedstawione przez mnie wyniki analizy wieloczynnikowej Coxa wykazały, że silna ekspresja HIF-1 α , VEGF i CA IX, obok złej odpowiedzi na CHT, wiązała się niezależnie z większym ryzykiem wystąpienia wznowy choroby. Z kolei silna ekspresja HIF-1 α i CA IX okazała się być niezależnym czynnikiem negatywnej prognozy co do OS u dzieci z MTM.

Uzyskane wyniki potwierdzają istotną rolę procesów niedotlenienia i uruchamianych przez HIF-1 α procesów przystosowania do hipoksji w mięsakach u dzieci. Stwierdzenie metodami IHC silnej ekspresji markerów hipoksji w tkance nowotworowej może wskazywać na agresywny fenotyp guza, wiązać się z jego opornością na CHT, ale również – w sposób niezależny od innych czynników prognostycznych – przewidywać przebieg choroby i ostateczny wynik leczenia. Markery hipoksji u dzieci z MTM mogą stać się również obiecującymi celami dla nowych metod terapeutycznych.

5.7 Terapie hamujące ekspresję markerów hipoksji

Dążeniem współczesnej onkologii jest zastosowanie jak najbardziej zindywidualizowanej terapii przeciwnowotworowej – skutecznej i jednocześnie obciążonej jak najmniejszym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Taka strategia postępowania ma szczególne znaczenie w przypadku dzieci, u których wszystkie typy nowotworów przebiegają agresywnie i wymagają intensywnej wielomodalnej terapii, mogącej powodować liczne powikłania i skutki uboczne.

Wyniki przeprowadzonych przez mnie badań wykazały po raz pierwszy, iż w znacznym odsetku MTM u dzieci stwierdza się silną ekspresję HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF. Co więcej, częstość silnej ekspresji markerów hipoksji jest większa u chorych z bardziej zaawansowanymi i gorzej rokującymi guzami. **Uzyskane dane mogą stanowić uzasadnienie podjęcia badań nad zastosowaniem leków i substancji blokujących poszczególne markery hipoksji u dzieci z MTM.** W przyszłości zastąpienie i/lub skojarzenie klasycznych schematów leczniczych stosowanych w praktyce klinicznej z terapią celowaną, hamującą poszczególne markery hipoksji na różnych etapach ich działania, mogłoby przynieść obiecujące efekty.

W praktyce klinicznej od kilku lat stosowana jest antyangiogenna terapia celowana, która opiera się głównie na inhibitorach czynników proangiogennych i ich receptorów, zlokalizowanych w komórkach nowotworowych i nowopowstałych naczyniach guza. Przykładem jest bevacizumab, monoklonalne przeciwciało przeciw VEGF, używane w skojarzeniu z klasyczną CHT u chorych dorosłych z rozsianymi postaciami m.in. raka jelita grubego, raka nerki, piersi czy szyjki macicy [23]. U dzieci bevacizumab i inne przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko czynnikom proangiogennym nie są jeszcze stosowane w ramach standardowych protokołów terapeutycznych. Ich użycie w wybranych

sytuacjach klinicznych u dzieci wymaga zgody Komisji Bioetycznej, gdyż lek ten dotychczas nie został zarejestrowany do stosowania poniżej 18 roku życia.

Efekty prowadzonych badań eksperymentalnych nad znaczeniem hipoksji w rozwoju, progresji i oporności nowotworów na CHT i RT zachęcają do poszukiwania nowych cząstek molekularnych, które mogłyby modulować stan hipoksji w tkance nowotworowej. Uważa się, że zahamowanie markerów hipoksji może przyczynić się do poprawy chemio- i promieniowrażliwości guzów, a jednoczesne stosowanie inhibitorów markerów hipoksji wraz z RT i/lub CHT może przynieść poprawę wyników leczenia przeciwnowotworowego [17]. HIF-1 α jako nadrzędny czynnik kaskady hipoksji wydaje się być szczególnie obiecującym markerem dla terapii celowanej. Wykazano w badaniach eksperymentalnych, że HIF-1 α można hamować poprzez wpływ na jego syntezę, wiązanie z DNA i aktywność translacyjną, ubikwitylizację i proteasomalny rozpad zależny od pVHL oraz dimeryzację podjednostek α i β [157, 235].

Okazuje się, że wśród związków, hamujących HIF-1 α są znane i stosowane już w terapii onkologicznej leki, takie jak: antracykliny (doksorubicyna, daunorubicyna), blokujące wiązanie HIF-1 α z DNA [137] oraz winkrystyna i topotecan, hamujące syntezę HIF-1 α [47]. Coraz powszechniej stosowane są również w onkologii rapamycyna i everolimus, które hamują syntezę HIF-1 α [148].

Obecnie w fazie badań przedklinicznych jest wiele innych związków, mających hamować ekspresję HIF-1 α w komórkach nowotworowych. Należą do nich m. innymi inhibitory Hsp90, np. antybiotyk geldanamycyna (GA) i jej analogi (17-AAG, 17-DMAG), które zwiększają degradację białka HIF-1 α . Badania nad zastosowaniem GA w raku nerki [100], a jej analogów w raku prostaty i raku piersi, wydawały się obiecujące, jednak leczenie obarczone było dużą toksycznością [160, 166]. Innym związkiem, który wpływa na degradację HIF-1 α jest EZN-2968. Badania na modelach zwierzęcych i I faza badań klinicznych u chorych z zaawansowanymi guzami litymi wykazały, że jest on bezpieczny, jednak potrzebne jest więcej danych potwierdzających skuteczność leku [81]. Kolejnym punktem uchwytu funkcji HIF-1 α jest jego aktywność transkrypcyjna, na którą wpływają: bortezomib, vorinostat, LAQ824 i FK228 [61, 106, 206]. Do substancji hamujących ekspresję HIF-1 α oraz VEGF zalicza się wortmanninę (inhibitor kinazy 3-fosfatydyloinozytolu), związek PD098059 (inhibitor kinazy MEK 1 – aktywowanej mitogenami) oraz wspomnianą wcześniej rapamycynę [247]. Problemem klinicznym jest konieczność zastosowania bardzo wysokich stężeń omówionych inhibitorów, co stawia pod znakiem zapytania ich przydatność kliniczną, ze względu na możliwe poważne efekty uboczne takiego leczenia.

Oprócz badań nad inhibitorami HIF-1 α , prowadzone są również prace nad skutecznością inhibitorów pozostałych markerów hipoksji, w tym CA IX. Dostępne są wyniki zaawansowanych badań klinicznych, dotyczących zastosowania przeciwciał monoklonalnych, które w różnym mechanizmie miałyby rozpo-

znawać i niszczyć komórki nowotworowe z ekspresją CA IX [6, 181]. Poza badaniami nad immunoterapią, trwają obecnie przedkliniczne doświadczenia nad metodami zahamowania aktywności enzymatycznej CA IX [52, 81].

W ostatnich latach również GLUT-1 stał się celem terapii przeciwnowotworowej, choć liczba doniesień na ten temat jest jeszcze niewielka. Pojedyncze badania nad analogiem glukozy – 2-deoksy-D-glukozą (2-DG) – prowadzone na liniach komórkowych *osteosarcoma* i raka płuca wykazały, iż równoczesne zastosowanie 2-DG z adriamycyną lub paklitakselem skuteczniej redukuje masę guza, niż każdy z cytostatyków osobno [150]. Atutem 2-DG może być doustna droga podania oraz dobra jego tolerancja. W badaniach I i II fazy u chorych z glejakami złośliwymi zastosowano 2-DG oraz RT nie obserwując zwiększonej toksyczności [59, 86, 179].

Dostępne obecnie dane na temat potencjalnego zastosowania terapii celowanej, skierowanej przeciwko markerom hipoksji dowodzą, iż ma ona większą skuteczność na wczesnych etapach leczenia, w mniej zaawansowanych stadiach choroby [138]. Wyniki mojej pracy wykazały, iż silna ekspresja HIF-1 α , GLUT-1, VEGF i CA IX częściej spotykana jest w guzach o większym zaawansowaniu, czyli w fazie nieoperacyjnej i/lub rozsianej. Zatem wykrycie silnej ekspresji markerów hipoksji w tkance nowotworowej u chorych w stadium zlokalizowanym, może świadczyć o bardziej złośliwym potencjale guza. Mogłoby to stanowić podstawę do zastosowania wybranej terapii celowanej. Natomiast u pacjentów z przerzutami odległymi zastosowanie terapii celowanej w skojarzeniu z klasycznymi metodami terapeutycznymi mogłoby spowolnić przebieg choroby i wydłużyć okres przeżycia chorych.

6 PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat wykazują, że hipoksja stanowi jedną z cech charakterystycznych niemal wszystkich nowotworów litych. W jej wyniku dochodzi do aktywacji HIF-1 α i uruchomienia szeregu procesów adaptacyjnych, umożliwiających komórkom guza przetrwanie niesprzyjających warunków. Do najważniejszych z tych procesów należą: neoangiogeneza, beztlenowe przemiany metaboliczne i utrzymanie wewnątrzkomórkowego pH. Za ich regulację odpowiedzialne są głównie: VEGF, GLUT-1 i CA IX, uważane obecnie wraz z HIF-1 α za najważniejsze endogenne markery hipoksji. Ważnym odkryciem było powiązanie aktywacji tych markerów z hamowaniem apoptozy i aktywacją procesów oporności wielolekowej oraz proliferacji, inwazyjności i przerzutowania nowotworu.

Znaczenie procesów hipoksji i powiązanych z nią procesów adaptacyjnych, stanowiło jeden z wiodących tematów badań naukowych podejmowanych w onkologii w ostatnich latach. W wielu typach nowotworów złośliwych stwierdzono istotny statystycznie związek tkankowej ekspresji markerów hipoksji z obecnością niekorzystnych rokowniczo czynników kliniczno-patologicznych, opornością na CHT, większym ryzykiem wystąpienia wznowy i krótszym OS.

W obecnej pracy po raz pierwszy na świecie podjęto problem znaczenia ekspresji endogennych markerów hipoksji u dzieci z MTM. Wysłunięto hipotezę, iż stopień nasilenia ekspresji HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF w tkance nowotworowej MTM u dzieci przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego może korelować z aktywnością proliferacyjną MTM, mierzoną wartością indeksu Ki-67, odpowiedzią na CHT, przebiegiem choroby i wynikiem leczenia.

Badania immunoreaktywności HIF-1 α , GLUT-1, CA IX i VEGF oraz Ki-67 przeprowadzono w archiwalnej tkance nowotworowej, pobranej od 91 dzieci z MTM przed leczeniem onkologicznym. To najliczniejsza grupa badana spośród dotychczas opublikowanych doniesień na temat roli markerów hipoksji w nowotworach u dzieci i jedna z bardziej licznych spośród prac dotyczących znaczenia niedotlenienia w mięsakiach.

Ważnym i interesującym aspektem było wykorzystanie w metodyce badań mikromacierzy tkankowych. To nowoczesne narzędzie, które umożliwia zastąpienie konwencjonalnego układu „jeden skrawek guza – jeden przypadek” przez układ, w którym na jednym skrawku parafinowym analizować można wiele zmian jednocześnie. Jako autorka niniejszej pracy aktywnie uczestniczyłam we wszystkich etapach pozyskiwania i przygotowywania materiału do badań, w tym w tworzeniu mikromacierzy tkankowych i ocenie odczynów IHC. Dla maksymalnego zobiektywizowania uzyskiwanych danych IHC, w badaniu posługiwałam się własną skalą, uwzględniającą zarówno siłę reakcji barwnej, jak i odsetek

immunopozytywnych komórek. Na podstawie tych dwóch parametrów ustalano współczynnik ekspresji poszczególnych markerów hipoksji. Jego wartość liczbową wyznaczała ekspresję markerów jako słabą lub silną, co poddawane było analizom statystycznym.

Uzyskane w pracy wyniki umożliwiły potwierdzenie wysuniętej hipotezy badawczej.

W tkance nowotworowej MTM silną ekspresję HIF-1 α stwierdzono w 48,3% guzów, GLUT-1 – w 34%, CA IX – w 63,7% i VEGF – w 79%. W ponad 90% guzów wykazano silną ekspresję co najmniej jednego markera hipoksji, a w ponad 40% – co najmniej czterech jednocześnie. Wszystkie analizowane markery hipoksji wzajemnie ze sobą korelowały dodatnio w sposób statystycznie istotny. Wyniki te wskazują na ścisłe wzajemne powiązania pomiędzy zjawiskiem hipoksji, a procesami adaptacji do niej, zachodzące w obrębie tkanki nowotworowej. Może to wskazywać na istotną rolę tych procesów w patogenezie mięsaków u dzieci.

W pracy wykazano również, że poza CA IX, wszystkie badane markery hipoksji w sposób statystycznie istotny korelowały dodatnio z wartością indeksu proliferacyjnego Ki-67 (IK67). Indeks ten uważany jest za wyznacznik aktywności proliferacyjnej różnych nowotworów, w tym MTM u dorosłych i dzieci. W badanej grupie stopień tkankowej ekspresji Ki-67 $\geq 30\%$ (przyjęty za wysoki) obecny był u 58,2% chorych. Uzyskane wyniki wskazują na związek aktywacji procesów hipoksji i adaptacji do niej z wyższą aktywnością proliferacyjną dziecięcych MTM.

Przeprowadzone w pracy analizy dowiodły, że u chorych z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi istotnie częściej występowała silna ekspresja endogennych markerów hipoksji. Im wyższe było stadium choroby, tym silniejsza ekspresja HIF-1 α , CA IX i Ki-67, jak również GLUT-1 i w mniejszym stopniu VEGF. Chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych i narządów odległych znacząco częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α . U chorych w stadiach III i IV dominowała silna ekspresja co najmniej trzech markerów hipoksji jednocześnie. Nie wykazano współzależności, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 i VEGF, a wiekiem, płcią, wielkością i inwazyjnością guza pierwotnego. Statystycznie istotny był natomiast związek badanych markerów hipoksji z podtypem histologicznym MTM. Pacjenci z MTM o niekorzystnej histologii znacząco częściej charakteryzowali się silną ekspresją HIF-1 α , VEGF i GLUT-1, w przeciwieństwie do pacjentów z histologią korzystną, u których dominowała jedynie słaba ekspresja tych markerów. Pacjenci z RMA istotnie częściej, niż chorzy z RME, wykazywali silną ekspresję wszystkich analizowanych markerów hipoksji. U pacjentów z histologią niekorzystną istotnie częściej występowała również silna ekspresja jednocześnie czterech lub pięciu badanych markerów. Opisane zjawiska świadczą o tym, że aktywacja procesów hipoksji i procesów adaptacji do niedotlenienia zachodzi szczególnie silnie w

bardziej agresywnych fenotypowo i genotypowo podtypach histologicznych MTM. W pracy nie wykazano jednak korelacji, pomiędzy niekorzystnym typem histologicznym MTM oraz podtypem RMA, a wyższą wartością IK67. Nie wykazano również współzależności, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 i VEGF, a wiekiem, płcią, wielkością i inwazyjnością guza pierwotnego. Stwierdzona wyraźna różnica w nasileniu ekspresji markerów hipoksji pomiędzy podtypami RME i RMA jest niezwykle interesująca z klinicznego punktu widzenia. Istotne wydaje się odkrycie, że niekorzystnie rokujący pęcherzykowy podtyp RMS charakteryzuje się statystycznie istotnie bardziej nasiloną aktywnością procesów hipoksji i adaptacji do niej.

W praktyce klinicznej niezwykle przydatna byłaby możliwość przewidywania, którzy chorzy mają szansę odnieść korzyść z agresywnej wielolekowej CHT, a u których wrażliwość na CHT będzie niewielka. Uzyskane wyniki dowiodły, że stopień ekspresji markerów hipoksji w guzie nowotworowym przed zastosowaniem CHT może stanowić obiecujący czynnik prognozujący chemio-wrażliwość mięsaków. Im silniejsza była ekspresja VEGF, a także CA IX oraz GLUT-1 w tkance guza, tym gorszą stwierdzano odpowiedź na CHT. Jednocześnie silna ekspresja VEGF, CA IX i GLUT-1 występowała dwukrotnie częściej u chorych źle reagujących na CHT w porównaniu do chorych reagujących dobrze. U chorych ze złą reakcją na CHT istotnie częściej stwierdzano silną ekspresję czterech lub wszystkich pięciu badanych markerów. Biorąc pod uwagę różnice w ekspresji endogennych markerów hipoksji w różnych podtypach MTM u dzieci, a zwłaszcza w RME i RMA, istotne byłoby podjęcie badań w bardziej jednorodnej histologicznie grupie, np. w podtypie pęcherzykowym RMS, w którym odpowiedź na leczenie chemiczne jest trudna do przewidzenia.

Przeprowadzone badania wykazały również, że na podstawie stopnia immunoreaktywności markerów hipoksji w guzie nowotworowym przed leczeniem przewidzieć można EFS i OS u dzieci z MTM. Wyniki analizy wieloczynnikowej wykazały, iż ekspresja HIF-1 α , VEGF i CA IX, obok odpowiedzi na CHT, miały niezależny wpływ na EFS, zaś ekspresja HIF-1 α i CA IX – niezależny wpływ na OS. Oznacza to, że stwierdzenie silnej ekspresji HIF-1 α i/lub CA IX w tkance guza u pacjenta z MTM przed leczeniem może być silniejszym negatywnym czynnikiem prognostycznym co do przeżycia całkowitego, niż dotychczas stosowane kliniczno-patologiczne czynniki, na których opiera się stratyfikacja chorych do wyższych grup ryzyka.

Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS stwierdzono u dzieci z silną ekspresją GLUT-1 i HIF-1 α , zaś najwyższe – u chorych, u których nie stwierdzono silnej immunoreaktywności VEGF. Im więcej markerów wykazywało jednocześnie silną ekspresję w tkance MTM przed leczeniem, tym prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS u pacjentów było niższe. Brak ekspresji markerów hipoksji stwierdzano wyłącznie w podgrupie chorych bez wznowy MTM oraz w podgrupie pacjentów, którzy żyją w momen-

cie analizy. U tych chorych prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS wynosiło 100%. U dzieci ze wznową oraz chorych, którzy zmarli z progresji choroby istotnie częściej obecna była silna ekspresja czterech i więcej badanych markerów, a prawdopodobieństwo 5-letniego EFS i OS wynosiło: $4,6\pm 4,1\%$ oraz $8,5\pm 5,6\%$, odpowiednio.

Wyniki przedstawionych w pracy badań potwierdzają istotną rolę procesów niedotlenienia i uruchamianych przez HIF-1 α procesów przystosowania do hipoksji w mięsakach u dzieci. Stwierdzenie metodami IHC silnej ekspresji endogennych markerów hipoksji w tkance nowotworowej może wskazywać na agresywny fenotyp guza, wiązać się z jego opornością na CHT, ale również – w sposób niezależny od innych czynników prognostycznych – przewidywać niekorzystny przebieg choroby i niepowodzenie leczenia. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, ale również praktyczne, stanowiąc źródło wiedzy na temat potencjalnych nowych markerów prognostycznych oraz potencjalnych celów dla nowych terapii u dzieci z MTM. Ze względu na stwierdzone różnice w ekspresji endogennych markerów hipoksji u dzieci z RME i RMA, zasadne byłoby przeprowadzenie poszerzonych badań porównawczych w wymienionych podtypach RMS u dzieci.

7 WNIOSKI

1. Częstość występowania silnej ekspresji poszczególnych markerów hipoksji w MTM u dzieci była różna (HIF-1 α – 48,3%, GLUT-1 – 34%, CA IX – 63,7% i VEGF – 79%), jednak wszystkie badane markery korelowały ze sobą dodatnio w sposób statystycznie znamienne.
2. Poza CA IX, tkankowa ekspresja wszystkich badanych markerów hipoksji wykazywała istotną statystycznie dodatnią korelację z wartością indeksu Ki-67.
3. U chorych z niekorzystną histologią MTM i podtypem pęcherzykowym RMS istotnie częściej stwierdzano silną ekspresję endogennych markerów hipoksji, zaś u pacjentów w wysokich stadiach zaawansowania choroby – silną ekspresję markerów hipoksji i wysoki IK67.
4. Silna tkankowa ekspresja VEGF, CA IX i GLUT-1, szczególnie jeśli występowała jednocześnie, stanowiła czynnik przewidujący złą odpowiedź na CHT u dzieci z MTM.
5. W badanej grupie dzieci z MTM niezależny wpływ na EFS miały: ekspresja HIF-1 α , odpowiedź na CHT, ekspresja VEGF i CA IX, natomiast niezależny wpływ na OS – ekspresja HIF-1 α i CA IX.
6. Jednoczesna silna ekspresja co najmniej czterech spośród pięciu badanych markerów charakteryzowała guzy o niekorzystnej histologii i wyższym zaawansowaniu klinicznym oraz stanowiła czynnik prognostyczny wystąpienia złej odpowiedzi na CHT, wznowy i zgonu z progresji choroby nowotworowej.

8 PIŚMIENICTWO

1. Airley R., Loncaster J., Davidson S., Bromley M., Roberts S., Patterson A., Hunter R., Stratford I., West C.: Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2001, 7, 4, 928-934.
2. Alaggio R., Coffin C.M.: Pediatric Soft Tissue Sarcomas: The Past 50 Years and Future Challenges. *Pediatr Dev Pathol.* 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.2350/15-07-1666-MISC.1>
3. Anagnostou V.K., Lowery F.J., Syrigos K.N., Cagle P.T., Rimm D.L.: Quantitative evaluation of protein expression as a function of tissue microarray core diameter: is a large (1.5 mm) core better than a small (0.6 mm) core? *Arch Pathol Lab Med.* 2010, 134, 4, 613-619.
4. Angelov L., Salhia B., Roncari L., McMahon G., Guha A.: Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Res.* 1999, 59, 21, 5536–5541.
5. Arshad H., Ahmad Z., Hasan S.H.: Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010, 11, 6, 1637-1640.
6. Askoxylakis V., Garcia-Boy R., Rana S., Krämer S., Hebling U., Mier W., Altmann A., Markert A., Debus J., Haberkorn U.: A new peptide ligand for targeting human carbonic anhydrase IX, identified through the phage display technology. *PLoS One.* 2010, 5, 12, e15962. doi: 10.1371/journal.pone.0015962.
7. Aune G., Stunes A.K., Tingulstad S., Salvesen O., Syversen U., Torp S.H.: The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011, 4, 5, 444-453.
8. Ayala F.R.R., Rocha R.M., Carvalho K.C., Carvalho A.L., Da Cunha I.W., Lourenço S.V., Soares F.A.: Glut1 and Glut3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules.* 2010, 15, 4, 2374–2387.
9. Baldewijns M.M., Thijssen V.L., Van den Eynden G.G., Van Laere S.J., Bluekens A.M., Roskams T., van Poppel H., De Bruïne A.P., Griffioen A.W., Vermeulen P.B.: High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. *Br J Cancer.* 2007, 96, 12, 1888-1895.

10. Berghoff A.S., Ilhan-Mutlu A., Dinhof C., Magerle M., Hackl M., Widhalm G., Hainfellner J.A., Dieckmann K., Pichler J., Hutterer M., Melchardt T., Bartsch R., Zielinski C.C., Birner P., Preusser M.: Differential role of angiogenesis and tumour cell proliferation in brain metastases according to primary tumour type: analysis of 639 cases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015, 41, 2, e41-55.
11. Berghoff A.S., Ilhan-Mutlu A., Wöhrer A., Hackl M., Widhalm G., Hainfellner J.A., Dieckmann K., Melchardt T., Dome B., Heinzl H., Birner P., Preusser M.: Prognostic significance of Ki67 proliferation index, HIF1 alpha index and microvascular density in patients with non-small cell lung cancer brain metastases. *Strahlenther Onkol.* 2014, 190, 7, 676-685.
12. Berlth F., Mönig S., Pinther B., Grimminger P., Maus M., Schlösser H., Plum P., Warnecke-Eberz U., Harismendy O., Drebber U., Bollschweiler E., Hölscher A., Alakus H.: Both GLUT-1 and GLUT-14 are Independent Prognostic Factors in Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2015, 22, 3, 822-831.
13. Berns E.M., Klijn J.G., Look M.P., Grebenchtchikov N., Vossen R., Peters H., Geurts-Moespot A., Portengen H., van Staveren I.L., Meijer-van Gelder M.E., Bakker B.: Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 4, 1253-1258.
14. Bertout J.A., Patel S.A., Simon M.C.: The impact of O2 availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008, 8, 12, 967-975.
15. Bien E., Balcerska A., Adamkiewicz-Drozynska E., Rapala M., Krawczyk M., Stepinski J.: Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. *Clin Biochem.* 2009, 42, 10-11, 1144-1157.
16. Bien E., Krawczyk M., Izycka-Swieszewska E., Trzonkowski P., Kazanowska B., Adamkiewicz-Drozynska E., Balcerska A.: Serum IL-10 and IL-12 levels reflect the response to chemotherapy but are influenced by G-CSF therapy and sepsis in children with soft tissue sarcomas. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013, 31, 67, 517-528.
17. Biesaga B., Adamczyk A.: Znaczenie cech biologicznych guza dla jednoczesnej chemio radioterapii nowotworów złośliwych. *Nowotwory Journal of Oncology.* 2004, 54, 2, 135-142.
18. Birner P., Gatterbauer B., Oberhuber G., Schindl M., Rössler K., Prodinger A., Budka H., Hainfellner J.A. : Expression of hypoxia-

- inducible factor-1 α in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*. 2001, 92, 1, 165-171.
19. Birner P., Schindl M., Obermair A., Breitenecker G., Oberhuber G.: Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2001, 7, 6, 1661-1668.
 20. Birner P., Schindl M., Obermair A., Plank C., Breitenecker G., Oberhuber G.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*. 2000, 60, 17, 4693-4696.
 21. Boeuf S., Bovée J.V.M., Lehner B., Hogendoorn P.C.W., Richter W.: Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology*. 2010, 56, 5, 641-651.
 22. Bos R., van der Groep P., Greijer A.E., Shvarts A., Meijer S., Pinedo H.M., Semenza G.L., van Diest P.J., van der Wall E.: Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*. 2003, 97, 6, 1573-1581.
 23. Braghiroli M.I., Sabbaga J., Hoff P.M.: Bevacizumab: overview of the literature. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012, 12, 5, 567-580.
 24. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J.: Hypoxia and cancer. *J Mol Med*. 2007, 85, 12, 1301-1307.
 25. Brahimi-Horn C¹, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006, 93, 8, E73-80.
 26. Bristow R.G., Hill R.P.: Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008, 8, 3, 180-192.
 27. Brizel D.M., Scully S.P., Harrelson J.M., Layfield L.J., Bean J.M., Prosnitz L.R., Dewhirst M.W.: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*. 1996, 56, 5, 941-943.
 28. Brockton N., Dort J., Lau H., Hao D., Brar S., Klimowicz A., Petrillo S., Diaz R., Doll C., Magliocco A.: High stromal carbonic anhydrase IX expression is associated with decreased survival in P16-negative head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011, 80, 1, 249-257.
 29. Brown J.M.: Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol*. 1979, 52, 620, 650-656.
 30. Brown J.M., Wilson W.R.: Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004, 4, 6, 437-447.
 31. Busk M., Horsman M.R., Overgaard J.: Resolution in PET hypoxia imaging: Voxel size matters. *Acta Oncol*. 2008, 47, 7, 1201-1210.

32. Cairns R.A., Kalliomaki T., Hill R.P.: Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res.* 2001, 61, 8903–8908.
33. Camp R.L., Neumeister V., Rimm D.L.: A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol.* 2008, 26, 34, 5630-5637.
34. Campos M., DE Campos S.G., Ribeiro G.G., Eguchi F.C., Silva S.R., DE Oliveira C.Z., Da Costa A.M., Curcelli E.C., Nunes M.C., Penna V., Longatto-Filho A.: Ki-67 and CD100 immunohistochemical expression is associated with local recurrence and poor prognosis in soft tissue sarcomas, respectively. *Oncol Lett.* 2013, 5, 5, 1527-1535.
35. Cantuaria G., Fagotti A., Ferrandina G., Magalhaes A., Nadji M., Angioli R., Penalver M., Mancuso S., Scambia G.: GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer.* 2001, 92, 5, 1144-1150.
36. Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., Grillon C., Kieda C.: Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011, 15, 6, 1239-1253.
37. Chamie K., Klöpfer P., Bevan P., Störkel S., Said J., Fall B., Beldegrun A.S., Pantuck A.J.: Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. *Urol Oncol.* 2015, 33, 5, 204.e25-33.
38. Chan J.Y., Kong S.K., Choy Y.M., Lee C.Y., Fung K.P.: Inhibition of glucose transporter gene expression by antisense nucleic acids in HL-60 leukemia cells. *Life Sci.* 1999, 65, 1, 63-70.
39. Chandel N.S., Simon M.C.: Hypoxia-inducible factor: roles in development, physiology, and disease. *Cell Death Differ.* 2008, 15, 4, 619-620.
40. Chao C., Al-Saleem T., Brooks J.J., Rogatko A., Kraybill W.G., Eisenberg B.: Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann Surg Oncol.* 2001, 8, 3, 260-267.
41. Chaudary N., Hill R.P.: Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis.* 2007, 26, 1, 55-64.
42. Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., Maity A.: Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001, 276, 12, 9519-9525.
43. Chia S.K., Wykoff C.C., Watson P.H., Han C., Leek R.D., Pastorek J., Gatter K.C., Ratcliffe P., Harris A.L.: Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 2001, 19, 16, 3660-3668.

44. Choong P.F.M., Åkerman M., Willén H., Andersson C., Gustafson P., Baldetorp B., Fernö M., Alvegård T., Rydholm A.: Prognostic value of Ki-67 expression in 182 soft tissue sarcomas. Proliferation- a marker of metastasis?. *APMIS*. 1994, 102, 7-12, 915-924.
45. Choong P.F.M., Nadesapillai A.P.W.: Urokinase plasminogen activator system: A multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop*. 2003, 415, 46-58.
46. Chung F.Y., Huang M.Y., Yeh C.S., Chang H.J., Cheng T.L., Yen L.C., Wang J.Y., Lin S.R.: GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2009, 9, 1, 241.
47. Comerford K.M., Wallace T.J., Karhausen J., Louis N.A., Montalto M.C., Colgan S.P.: Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*. 2002, 62,12, 3387-3394.
48. Cosse J.P., Michiels C.: Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-cancer Agents Med Chem*. 2008, 8, 7, 790-797.
49. Creighton-Gutteridge M., Cardellina J.H. 2nd, Stephen A.G., Rapisarda A., Uranchimeg B., Hite K., Denny W.A., Shoemaker R.H., Melillo G.: Cell type-specific, topoisomerase II-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation by NSC 644221. *Clin Cancer Res*. 2007, 13, 3, 1010-1018.
50. Dantonello T.M., Int-Veen C., Harms D., Leuschner I., Schmidt B.F., Herbst M., Juergens H., Scheel-Walter H.G., Bielack S.S., Klingebiel T., Dickerhoff R., Kirsch S., Brecht I., Schmelzle R., Greulich M., Gadner H., Greiner J., Marky I., Treuner J., Koscielniak E.: Cooperative trial CWS-91 for localized soft tissue sarcoma in children, adolescents, and young adults. *J Clin Oncol*. 2009, 27, 9:1446-1455.
51. Doedens A.L., Stockmann C., Rubinstein M.P., Liao D., Zhang N., DeNardo D.G., Coussens L.M., Karin M., Goldrath A.W., Johnson R.S.: Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res*. 2010, 70, 19, 7465-7475.
52. Dogné J.M., Thiry A., Pratico D., Masereel B., Supuran C.T.: Dual carbonic anhydrase-cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2007, 7, 9, 885-891.
53. Duncan T.J., Al Attar A., Rolland P., Scott I.V., Deen S., Liu D.T.Y., Spendlove I., Durrant L.G.: Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies?. *Clin Cancer Res*. 2008, 14, 10, 3030-3035.
54. Dungwa J.V., Hunt L.P., Ramani P.: Overexpression of carbonic anhydrase and HIF-1 α in Wilms tumours. *BMC Cancer*. 2011, 11, 390. doi: 10.1186/1471-2407-11-390.

55. Dungwa J.V., Hunt L.P., Ramani P.: HIF-1 α up-regulation is associated with adverse clinicopathological and biological factors in neuroblastomas. *Histopathology*. 2012, 61, 3, 417-427.
56. Dungwa J.V., Hunt L.P., Ramani P.: Carbonic anhydrase IX up-regulation is associated with adverse clinicopathologic and biologic factors in neuroblastomas. *Hum Pathol*. 2012, 43, 10, 1651-1660.
57. Dvorak H.F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002, 20, 21, 4368-4380.
58. Dvorak H.F.: Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*. 2005, 3, 8, 1835-1842.
59. Dwarakanath B., Jain V.: Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol*. 2009, 5, 5, 581-585.
60. Eckert A.W., Lautner M.H., Schütze A., Taubert H., Schubert J., Bilkenroth U.: Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*. 2011, 58, 7, 1136-1147.
61. Ellis L., Hammers H., Pili R.: Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett*. 2009, 280, 2, 145-153.
62. Enatsu S., Iwasaki A., Shirakusa T., Hamasaki M., Nabeshima K., Iwasaki H., Kuroki M., Kuroki M.: Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and its prognostic significance in small-sized adenocarcinomas of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006, 29, 6, 891-895.
63. Endo M., Tateishi U., Seki K., Yamaguchi U., Nakatani F., Kawai A., Chuman H., Beppu Y.: Prognostic implications of glucose transporter protein-1 (glut-1) overexpression in bone and soft-tissue sarcomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2007, 37, 12, 955-960.
64. Engelsen I.B., Akssen L.A., Salvesen H.B.: Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS*. 2009, 117, 10, 693-707.
65. Eschmann S.M., Paulsen F., Bedeshem C., Machulla H.J., Hehr T., Bamberg M., Bares R.: Hypoxia-imaging with (18) F-misonidazole and PET: changes of kinetics during radiotherapy of head-and-neck cancer. *Radiother Oncol*. 2007, 83, 3, 406-410.
66. Esteban M.A., Tran M.G., Harten S.K., Hill P., Castellanos M.C., Chandra A., Raval R., O'Brien T.S., Maxwell P.H.: Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res*. 2006, 66, 7, 3567-3575.
67. Evans S.M., Koch C.J.: Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett*. 2003, 195, 1, 1-16.
68. Falco M.: Indeks proliferacyjny – wartość prognostyczna w rakach przewodowych sutka u kobiet. *Ann Acad Med Stetin*. 2009, 55, 1, 22-30.

69. Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999, 237, 1-30.
70. Fontanini G., Vignati S., Basolo F., Bevilacqua G., Lucchi M., Mussi A., Angeletti C.A., Ciardiello F., De Laurentiis M., De Placido S.: Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *JNCI.* 1997, 89, 12, 881-886.
71. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung SW., Koos RD., Semenza G.L.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996, 16, 9, 4604-4613.
72. Garcea G., Lloyd T.D., Gescher A., Dennison A.R., Steward W.P., Berry D.P.: Angiogenesis of gastrointestinal tumours and their metastases—a target for intervention?. *Eur J Cancer.* 2004, 40, 9, 1302-1313.
73. Gasińska A., Biesaga B.: Dwa oblicza hipoksji nowotworów. *Nowotwory J Oncol.* 2010, 60, 4, 332-340.
74. Gasparini G.: Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000, 5, 1, 37-44.
75. Generali D., Berruti A., Brizzi M.P., Campo L., Bonardi S., Wigfield S., Bersiga A., Allevi G., Milani M., Aguggini S., Gandolfi V., Dogliotti L., Bottini A., Harris A.L., Fox S.B.: Hypoxia-inducible factor-1 α expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006, 12, 15, 4562-4568.
76. George D.J., Halabi S., Shepard T.F., Vogelzang N.J., Hayes D.F., Small E.J., Kantoff P.W.: Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res.* 2001, 7, 7, 1932-1936.
77. 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.
78. Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998, 273, 46, 30336- 30343.
79. Gerdes J., Lelle R.J., Pickartz H., Heidenreich W., Schwarting R., Kurtsiefer L., Stauch G., Stein H.: Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol.* 1986, 39, 9, 977-980.
80. Gerdes J., Lemke H., Baisch H.E., Wacker H.H., Schwab U., Stein H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear anti-

- gen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984, 133, 4, 1710-1715.
81. Gieling R.G., Williams K.J.: Carbonic anhydrase IX as a target for metastatic disease. *Bioorg Med Chem.* 2013, 21, 6, 1470-1476.
 82. Giltmane J.M., Rimm D.L.: Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Clin Pract Oncol.* 2004, 1, 2, 104-111.
 83. Greenberger L.M., Horak I.D., Filpula D., Sapra P., Westergaard M., Frydenlund H.F., Albaek C., Schröder H., Ørum H.: A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther.* 2008, 7, 11, 3598-3608.
 84. Gu Y.Z., Moran S.M., Hogenesch J.B., Wartman L., Bradfield C.A.: Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 1998, 7, 3, 205-213.
 85. Gulbahce H.E., Gamez R., Dvorak L., Forster C., varghese L.: Concordance between tissue microarray and whole-section estrogen receptor expression and intratumoral heterogeneity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012, 20, 4, 340-343.
 86. Gupta S., Farooque A., Adhikari J.S., Singh S., Dwarakanath B.S.: Enhancement of radiation and chemotherapeutic drug responses by 2-deoxy-D-glucose in animal tumors. *J Cancer Res Ther.* 2009, 5, 1, 16-20.
 87. Han G., Wang Y., Bi W., Jia J., Wang W., Xu M.: Effects of vascular endothelial growth factor expression on pathological characteristics and prognosis of osteosarcoma. *Clin Exp Med.* 2015, doi 10.1007/s10238-015-0382-1
 88. Hanahan D., Folkman J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996, 86, 3, 353-364.
 89. Harris A.L.: Hypoxia- a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 1, 38-47.
 90. Henshall S.: Tissue microarrays. *J Mammary Gland Biol Neopl.* 2003, 8, 3, 347-358.
 91. Hernandez-Luna M.A., Rocha-Zavaleta L., Vega M.I., Huerta-Yeppez S.: Hypoxia inducible factor-1 α induces chemoresistance phenotype in non-Hodgkin lymphoma cell line via up-regulation of Bcl-xL. *Leuk Lymphoma.* 2013, 54, 5, 1048-1055.
 92. Hewitson K.S., Mcneill L.A., Schofield C.J.: Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer. *Curr Pharm Des.* 2004, 10, 8, 821-833.
 93. Hockel M., Schlenger K., Höckel S., Aral B., Schäffer U., Vaupel P.: Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer.* 1998, 79, 4, 365-369.

94. Hoos A., Stojadinovic A., Mastorides S., Urist M.J., Polsky D., Di Como C.J., Brennan M.F., Cordon-Cardo C.: High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer*. 2001, 92, 4, 869-874.
95. Huang J.H., Lee F.S., Pasha T.L., Sammel M.D., Karakousis G., Xu G., Fraker D., Zhang P.J.: Analysis of HIF-1 α and its regulator, PHD2, in retroperitoneal sarcomas: clinico-pathologic implications. *Cancer Biol Ther*. 2010, 9, 4, 303-311.
96. Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F.: Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *JBC*. 1996, 271, 50, 32253-32259.
97. Hui E.P., Chan A.T., Pezzella F., Turley H., To K.F., Poon T.C., Zee B., Mo F., Teo P.M., Huang D.P., Gatter K.C., Johnson P.J., Harris A.L.: Coexpression of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α , carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res*. 2002, 8, 8, 2595-2604.
98. Hussein D, Estlin E.J., Dive C., Makin G.W.: Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1 α -dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006, 5, 9, 2241-2250.
99. Ikeda N., Adachi M., Taki T., Huang C., Hashida H., Takabayashi A., Sho M., Nakajima Y., Kanehiro H., Hisanaga M., Nakano H., Miyake M.: Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 1999, 79, 9-10, 1553-1563.
100. Isaacs J.S., Jung Y.J., Mimnaugh E.G., Martinez A., Cuttitta F., Neckers L.M.: Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem*. 2002, 277, 33, 29936-29944.
101. Iyoda A., Hiroshima K., Baba M., Fujisawa T., Yusa T., Ohwada H.: Expression of vascular endothelial growth factor in thoracic sarcomas. *Ann Thorac Surg*. 2001, 71, 5, 1635-1639.
102. Jones R.P., Bird N.T., Smith R.A., Palmer D.H., Fenwick S.W., Poston G.J., Malik H.Z.: Prognostic molecular markers in resected extrahepatic biliary tract cancers; a systematic review and meta-analysis of immunohistochemically detected biomarkers. *Biomark Med*. 2015, 9, 8, 763-775
103. Kaanders J.H., Wijffels K.I., Marres H.A., Ljungkvist A.S., Pop L.A., van den Hoogen F.J., de Wilde P.C., Bussink J., Raleigh J.A., van der Kogel A.J.: Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2002, 62, 23, 7066-7074.

104. Kaelin W.G. Jr., Ratcliffe P.J.: Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008, 30, 4, 393-402.
105. Kakolyris S., Fox S.B., Koukourakis M., Giatromanolaki A., Brown N., Leek R.D., Taylor M., Leigh I.M., Gatter K.C., Harris A.L.: Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br J Cancer*. 2000, 82, 4, 844-851.
106. Kaluz S., Kaluzová M., Stanbridge E.J.: Does inhibition of degradation of hypoxia-inducible factor (HIF) alpha always lead to activation of HIF? Lessons learnt from the effect of proteosomal inhibition on HIF activity. *J Cell Biochem*. 2008, 104, 2, 536-544.
107. Kappler M., Taubert H., Holzhausen H.J., Reddemann R., Rot S., Becker A., Kuhnt T., Dellas K., Dunst J., Vordermark D., Hänsgen G., Bache M.: Immunohistochemical detection of HIF-1alpha and CAIX in advanced head-and-neck cancer. Prognostic role and correlation with tumor markers and tumor oxygenation parameters. *Strahlenther Onkol*. 2008, 184, 8, 393-399.
108. Karim R.Z., Gerega S.K., Yang Y.H., Spillane A., Carmalt H., Scolyer R.A., Lee C.S.: p16 and pRb immunohistochemical expression increases with increasing tumour grade in mammary phyllodes tumours. *Histopathology*. 2010, 56, 7, 868-875.
109. Karlsson C., Bodin L., Piehl-Aulin K., Karlsson M.G.: Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009, 18, 7, 2014-2021.
110. Karni R., Dor Y., Keshet E., Meyuhas O., Levitzki A.: Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia. *J Biol Chem*. 2002, 277, 45, 42919-42925.
111. Karth J., Ferrer F.A., Perlman E., Hanrahan C., Simons J.W., Gearhart J.P., Rodriguez R.: Coexpression of hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*. 2000, 35, 12, 1749-1753.
112. Kawamura T., Kusakabe T., Sugino T., Watanabe K., Fukuda T., Nashimoto A., Honma K., Suzuki T.: Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer*. 2001, 92, 3, 634-641.
113. Kaya A.O., Gunel N., Benekli M., Akyurek N., Buyukberber S., Tatli H., Coskun U., Yildiz R., Yaman E., Ozturk B.: Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J BUON*. 2012, 17, 4, 663-668.
114. Kaya M., Wada T., Akatsuka T., Kawaguchi S., Nagoya S., Shindoh M., Higashino F., Mezawa F., Okada F., Ishii S.: Vascular endothelial growth

- factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 2, 572-577.
115. Kazanowska B., Chybicka A.: Nowotwory tkanek miękkich. W: Krzakowski M., Warzocha K. (red.): Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych – 2013 r. T. 3. Gdańsk: Grupa Via Medica, 2014, s. 1124-1149.
 116. Kazanowska B., Reich A., Jeleń M., Szkudlarek T., Chybicka A.: Ki 67 expression in soft tissue sarcoms in children. *Nowotwory Journal of Oncology.* 2004, 54, 4, 347-353.
 117. Kazanowska B., Reich A., Reich M., Balcerska A., Balwierz W., Bodalski J., Dłużniewska A., Drożyńska E., Kątski K., Kijowski J., Kowalczyk J., Kurylak A., Matysiak M., Mikołajewska A., Peregut-Pogorzelski K., Sopyło B., Stencel D., Szewczyk B., Wachowiak J., Wieczorek M., Wysocki M., Chybicka A.: Remaining problems and controversies in the management of childhood head and neck soft tissue sarcomas: Retrospective (national) Multicenter Study of the Polish Pediatric Solid Tumors Group. *Pediatr Hematol Oncol.* 2004, 21, 4, 349-362.
 118. Ke Q., Costa M.: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006, 70, 5, 1469-1480.
 119. Kim J.I., Choi K.U., Lee I.S., Choi Y.J., Kim W.T., Shin D.H., Kim K., Lee J.H., Kim J.Y., Sol M.Y.: Expression of hypoxic markers and their prognostic significance in soft tissue sarcoma. *Oncol Lett.* 2015, 9, 4, 1699-1706.
 120. Kim S.J., Rabbani Z.N., Dewhirst M.W., Vujaskovic Z., Vollmer R.T., Schreiber E.G., Oosterwijk E., Kelley M.J.: Expression of HIF-1 α , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2005, 49, 3, 325-335.
 121. Kim S.J., Shin H.J., Jung K.Y., Baek S.K., Shin B.K., Choi J., Kim B.S., Shin S.W., Kim Y.H., Kim J.S., Oosterwijk E.: Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Jpn J Clin Oncol.* 2007, 37, 11, 812-819.
 122. Kimbro K.S., Simons J.W.: Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006, 13, 3, 739-749.
 123. Kirkpatrick J.P., Rabbani Z.N., Bentley R.C., Hardee M.E., Karol S., Meyer J., Oosterwijk E., Havrilesky L., Secord A.A., Vujaskovic Z., Dewhirst M.W., Jones E.L.: Elevated CAIX expression is associated with an increased risk of distant failure in early-stage cervical cancer. *Biomark Insights.* 2008, 3, 45-55.
 124. Kobierzycki C., Puła B., Wojnar A., Podhorska-Okolów M., Dziągiel P.: Tissue microarray technique in evaluation of proliferative activity in invasive ductal breast cancer. *Anticancer Res.* 2012, 32, 3, 773-777.

125. Korkeila E., Talvinen K., Jaakkola P.M., Minn H., Syrjänen K, Sundström J, Pyrhönen S.: Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *Br J Cancer*. 2009, 100, 6, 874-880.
126. Korkolopoulou P., Patsouris E., Konstantinidou A.E., Pavlopoulos P.M., Kavantzas N., Boviatsis E., Thymara I., Perdiki M., Thomas-Tsagli E., Angelidakis D., Rologis D., Sakkas D.: Hypoxia-inducible factor 1 α /vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis. *Neuropathol App Neurobiol*. 2004, 30, 3, 267-278.
127. Koukourakis M.I., Bentzen S.M., Giatromanolaki A., Wilson G.D., Daley F.M., Saunders M.I., Dische S., Sivridis E., Harris A.L.: Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J Clin Oncol*. 2006, 24, 5, 727-735.
128. Krszyna K., Stokłosa T.: Czynniki indukowane przez hipoksję-1 (HIF-1): budowa, regulacja ekspresji, funkcja oraz rola w progresji nowotworów. *Postępy Biologii Komórki*. 2005, 32, 4, 707-728.
129. Kubo T., Shimose S., Fujimori J., Furuta T., Arihiro K., Ochi M.: Does expression of glucose transporter protein-1 relate to prognosis and angiogenesis in osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res*. 2015, 473, 1, 305-310.
130. Kubo T., Sugita T., Shimose S., Matsuo T., Arihiro K., Ochi M.: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*. 2008, 90, 3, 364-370.
131. Kunkel M., Reichert T.E., Benz P., Lehr H.A., Jeong J.H., Wieand S., Bartenstein P., Wagner W., Whiteside T.L.: Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003, 97, 4, 1015-1024.
132. Kunz M., Moeller S., Koczan D., Lorenz P., Wenger R.H., Glocker M.O., Thiesen H.J., Gross G., Ibrahim S.M.: Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *JBC*. 2003, 278, 46, 45651-45660.
133. Kyndi M., Sørensen F.B., Knudsen H., Overgaard M., Nielsen H.M., Andersen J., Overgaard J.: Tissue microarrays compared with whole sections and biochemical analyses. A subgroup analysis of DBCG 82. *Acta Oncol*. 2008, 47, 4, 591-599.
134. Lando D., Peet D.J., Gorman J.J., Whelan D.A., Whitelaw M.L., Bruick R.K.: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002, 16, 12, 1466-1471.

135. Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., Semenza G.L.: HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001, 21, 12, 3995-4004.
136. Lee J.C., Chow N.H., Wang S.T., Huang S.M.: Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer.* 2000, 36, 6, 748-753.
137. Lee K., Qian D.Z., Rey S., Wei H., Liu J.O., Semenza G.L.: Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106, 7, 2353-2358.
138. Lee W.Y., Huang S.C., Hsu K.F., Tzeng C.C., Shen W.L.: Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol.* 2008, 108, 2, 377-384.
139. Li J., Thompson T.D., Miller J.W., Pollack L.A., Stewart S.L.: Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. *Pediatrics.* 2008, 121, 6, 1470-1477.
140. Li L., Lin X., Staver M., Shoemaker A., Semizarov D., Fesik S.W., Shen Y.: Evaluating hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapeutic target via inducible RNA interference in vivo. *Cancer Res.* 2005, 65, 16, 7249-7258.
141. Liao D., Johnson R.S.: Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26, 2, 281-290.
142. Lin Y., Hatem J., Wang J., Quinn A., Hicks D., Tang P.: Tissue microarray-based immunohistochemical study can significantly underestimate the expression of HER2 and progesterone receptor in ductal carcinoma in situ of the breast. *Biotech Histochem.* 2011, 86, 5, 345-350.
143. Liu W., Xu J., Wang M., Wang Q., Bi Y., Han M.: Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int J Oncol.* 2011, 39, 5, 1213-1220.
144. López-Guerrero J.A., Machado I., Scotlandi K., Noguera R., Pellin A., Navarro S., Serra M., Calabuig-Fariñas S., Picci P., Llombart-Bosch A.: Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's sarcoma family of tumors. *Int J Cancer.* 2011, 128, 5, 1139-1150.
145. Macheda M.L., Rogers S., Best J.D.: Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Phys.* 2005, 202, 3, 654-662.

146. Maeda K., Chung Y.S., Ogawa Y., 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.
147. Mahon P.C., Hirota K., Semenza G.L.: FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001, 15, 20, 2675-2686.
148. Majumder P.K., Febbo P.G., Bikoff R., Berger R., Xue Q., McMahon L.M., Manola J., Brugarolas J., McDonnell T.J., Golub T.R., Loda M., Lane H.A., Sellers W.R.: mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med*. 2004, 10, 6, 594-601.
149. Marme D., Fusenig N.: *Tumor Angiogenesis Basic Mechanism and cancer therapy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. ISBN 978-3-540-33176-6.
150. Maschek G., Savaraj N., Priebe W., Braunschweiger P., Hamilton K., Tidmarsh G.F., De Young L.R., Lampidis T.J.: 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*. 2004, 64, 1, 31-34.
151. Maseide K., Kandel R.A., Bell R.S., Catton C.N., O'Sullivan B., Wunder J.S., Pintilie M., Hedley D., Hill R.P.: Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2004, 10, 13, 4464-4471.
152. Mashiko R., Takano S., Ishikawa E., Yamamoto T., Nakai K., Matsumura A.: Hypoxia-inducible factor 1 α expression is a prognostic biomarker in patients with astrocytic tumors associated with necrosis on MR image. *J Neurooncol*. 2011, 102, 1, 43-50.
153. Masoumi-Moghaddam S., Amini A., Wei A.Q., Robertson G., Morris D.L.: Vascular endothelial growth factor expression correlates with serum CA125 and represents a useful tool in prediction of refractoriness to platinum-based chemotherapy and ascites formation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015, 6, 29, 28491-2501.
154. Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J.: Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2001, 11, 3, 293-299.
155. Mayer A., Schneider F., Vaupel P., Sommer C., Schmidberger H.: Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Oncol*. 2012, 41, 4, 1260-1270.
156. Medina R.A., Owen G.I.: Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res*. 2002, 35, 1, 9-26.
157. Melillo G.: Hypoxia-inducible factor 1 inhibitors. *Methods Enzymol*. 2007, 435, 385-402.

158. Minami K.I., Saito Y., Imamura H., Okamura A.: Prognostic significance of p53, Ki-67, VEGF and Glut-1 in resected stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2002, 38, 1, 51-57.
159. Mizobuchi H., García-Castellano J.M., Philip S., Healey J.H., Gorlick R.: Hypoxia markers in human osteosarcoma: an exploratory study. *Clin Orthop Relat Res*. 2008, 466, 9, 2052-2059.
160. Modi S., Stopeck A.T., Gordon M.S., Mendelson D., Solit D.B., Bagatell R., Ma W., Wheler J., Rosen N., Norton L., Cropp G.F., Johnson R.G., Hannah A.L., Hudis C.A.: Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol*. 2007, 25, 34, 5410-5417.
161. Moon E.J., Brizel D.M., Chi J.T., Dewhirst M.W.: The potential role of intrinsic hypoxia markers as prognostic variables in cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2007, 9, 8, 1237-1294.
162. Mori Y., Tsukinoki K., Yasuda M., Miyazawa M., Kaneko A., Watanabe Y.: Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors. *Oral Oncol*. 2007, 43, 6, 563-569.
163. Mouriaux F., Sanschagrin F., Diorio C., Landreville S., Comoz F., Petit E., Bernaudin M., Rousseau A.P., Bergeron D., Morcos M.: Increased HIF-1 α expression correlates with cell proliferation and vascular markers CD31 and VEGF-A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014, 55, 3, 1277-1283.
164. Nagel S., Talbot N.P., Mecinović J., Smith T.G., Buchan A.M., Schofield C.J.: Therapeutic manipulation of the HIF hydroxylases. *Antioxid Redox Signal*. 2010, 12, 4, 481-501.
165. Nakagawa Y., Uemura H., Hirao Y., Yoshida K., Saga S., Yoshikawa K.: Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p12-p13. *Genomics*. 1998, 53, 1, 118-119.
166. Neckers L.: Heat shock protein 90 inhibition by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a novel therapeutic approach for treating hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2002, 8, 5, 962-966.
167. North S., Meonner M., Bikfalvi A.: Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett*. 2005, 218, 1, 1-14.
168. Ottaviano A., Mollo E., Di Lorenzo G., Pisano C., Di Maio M., Barletta E., Pensabene M., Segati R., Bullian P., Nasti G., Bryce J., Scala S., Castello G., Ascierto P.A.: Prospective clinical trials of biotherapies in solid tumors: a 5-year survey. *Cancer Immunol Immunother*. 2005, 54, 1, 44-50.
169. Ozbudak I.H., Karaveli S., Simsek T., Erdogan G., Pestereli E.: Neoangiogenesis and expression of hypoxia-inducible factor 1 α , vas-

- cular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 in endometrioid type endometrium adenocarcinomas. *Gynecol Oncol.* 2008, 108, 3, 603-608.
170. Parham_DM.: Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol.* 2001, 14, 5, 506-514.
 171. Pastorek J., Pastoreková S.: Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol.* 2015, 31, 52-64.
 172. Pastorek J., Pastoreková S., Callebaut I., Mornon J.P., Zelník V., Opavský R., Zatořicová M., Liao S., Portetelle D., Stanbridge E.J.: Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994, 9, 10, 2877-2888.
 173. Pastoreková S., Parkkila S., Parkkila A.K., Opavský R., Zelník V., Saarnio J., Pastorek J.: Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology.* 1997, 112, 2, 398-408.
 174. Peng Y.J., Yuan G., Ramakrishnan D., Sharma S.D., Bosch-Marce M., Kumar G.K., Semenza G.L., Prabhakar N.R.: Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol.* 2006, 577, Pt 2, 705-716.
 175. Pinato D.J., Ramachandran R., Toussi S.T., Vergine M., Ngo N., Sharma R., Lloyd T., Meeran K., Palazzo F., Martin N., Khoo B., Dina R., Tan T.M.: Immunohistochemical markers of the hypoxic response can identify malignancy in pheochromocytomas and paragangliomas and optimize the detection of tumours with VHL germline mutations. *Br J Cancer.* 2013, 108, 2, 429-437.
 176. Pires A.R., Andreiuolo Fda M., de Souza S.R.: TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol.* 2006, 1, 14.
 177. Potti A., Ganti A.K., Foster H., Knox S., Hebert B.J., Tendulkar K., Sholes K., Koch M., Kargas S.: Immunohistochemical detection of HER-2/neu, c-kit (CD117) and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in soft tissue sarcomas. *Anticancer Res.* 2004, 24, 1, 333-337.
 178. Powis G., Kirkpatrick L.: Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther.* 2004, 3, 5, 647-654.
 179. Prasanna V.K., Venkataramana N.K., Dwarakanath B.S., Santhosh V.: Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma. *J Cancer Res Ther.* 2009, 5, 1, 44-47.

180. Proescholdt M., Merrill M., Stoerr E.M., Lohmeier A., Dietmaier W., Brawanski A.: Expression of carbonic anhydrase IX in craniopharyngiomas. *J Neurosurg.* 2011, 115, 4, 796-801.
181. Rana S., Nissen F., Lindner T., Altmann A., Mier W., Debus J., Haberkorn U., Askoxylakis V.: Screening of a novel peptide targeting the proteoglycan-like region of human carbonic anhydrase IX. *Mol Imaging.* 2013, 12, 8, doi: 10.2310/7290.2013.00066.
182. Raval R.R., Lau K.W., Tran M.G.B., Sowter H.M., Mandriota S.J., Li J.L., Pugh C.W., Maxwell P.H., Harris A.L., Ratcliffe P.J.: Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.* 2005, 25, 13, 5675-5686.
183. Ravazoula P., Batistatou A., Aletra C., Ladopoulos J., Kourounis G., Tzigounis B.: Immunohistochemical expression of glucose transporter Glut1 and cyclin D1 in breast carcinomas with negative lymph nodes. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003, 24, 6, 544-546.
184. Rezvani H.R., Ali N., Nissen L.J., Harfouche G., de Verneuil H., Taïeb A., Mazurier F.: HIF-1 α in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *J Invest Dermatol.* 2011, 131, 9, 1793-1805.
185. Rofstad E.K., Galappathi K., Mathiesen B., Ruud E.B.: Fluctuating and diffusion-limited hypoxia in hypoxia-induced metastasis. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 7, 1971-1978.
186. Rosen D.G., Huang X., Deavers M.T., Malpica A., Silva E.G., Liu J.: Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* 2004, 17, 7, 790-797.
187. Ruas J.L., Poellinger L., Pereira T.: Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2002, 277, 41, 38723-38730.
188. Sakashita M., Aoyama N., Minami R., Maekawa S., Kuroda K., Shirasaka D., Ichihara T., Kuroda Y., Maeda S., Kasuga M.: Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer.* 2001, 37, 2, 204-209.
189. Samanta D., Gilkes D.M., Chaturvedi P., Xiang L., Semenza G.L.: Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111, 50, E5429-5438.
190. Samih N., Hovsepian S., Notel F., Prorok M., Zattara-Cannoni H., Mathieu S., Lombardo D., Fayet G., El-Battari A.: The impact of N- and O-glycosylation on the functions of Glut-1 transporter in human thyroid anaplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1621, 1, 92-101.

191. Sapino A., Marchiò C., Senetta R., Castellano I., Macrì L., Cassoni P., Ghisolfi G., Cerrato M., D'Ambrosio E., Bussolati G.: Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch.* 2006, 449, 3, 288-296.
192. Schindl M., Schoppmann S.F., Samonigg H., Hausmaninger H., Kwasny W., Gnant M., Jakesz R., Kubista E., Birner P., Oberhuber G., Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002, 8, 6, 1831-1837.
193. Schmid T., Zhou J., Brune B.: HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2004, 8, 4, 423-431.
194. Schmitz K.J., Müller C.I., Reis H., Alakus H., Winde G., Baba H.A., Wohlschlaeger J., Jasani B., Fandrey J., Schmid K.W.: Combined analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2009, 24, 11, 1287-1296.
195. Schofield C.J., Ratcliffe P.J.: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5, 5, 343-354.
196. Schwarz G.: Ueber desensibilisierung gegen Rontgen - und radiumstrahlen. *Munch Med Wochenschrift.* 1909, 56, 1217-1218.
197. Scotlandi K., Serra M., Manara M.C., Maurici D., Benini S., Nini G., Campanacci M., Baldini N.: Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumors. *Cancer.* 1995, 75, 3, 806-814.
198. Seeber L.M., Zweemer R.P., Verheijen R.H., van Diest P.J.: Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in endometrial cancer management. *Obstet Gynecol Int.* 2010, 2010:580971. doi: 10.1155/2010/580971
199. Semaan A., Munkarah A.R., Arabi H., Bandyopadhyay S., Seward S., Kumar S., Qazi A., Hussein Y., Morris R.T., Ali-Fehmi R.: Expression of GLUT-1 in epithelial ovarian carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, angiogenesis, survival and ability to predict optimal cytoreduction. *Gynecol Oncol.* 2011, 121, 1, 181-186.
200. Semenza G.L.: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999, 15, 1551-1578.
201. Semenza G.L.: HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13, 2, 167-171.
202. Semenza G.L.: Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010, 29, 5, 625-634.
203. Semenza G.L.: Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010, 2, 3, 336-361.
204. Semenza G.L., Wang G.L.: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at

- a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992, 12, 12, 5447-5454.
205. 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.
206. Shin D.H., Chun Y.S., Lee D.S., Huang L.E., Park J.W.: Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 2008, 111, 6, 3131-3136.
207. Shintani K., Matsumine A., Kusuzaki K., Matsubara T., Satonaka H., Wakabayashi T., Hoki Y., Uchida A.: Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α as a biomarker of outcome in soft-tissue sarcomas. *Virchows Arch.* 2006, 449, 6, 673-681.
208. Siddiqui G.K., Maclean A.B., Elmasry K., Wong te Fong A., Morris R.W., Rashid M., Begent R.H., Boxer G.M.: Immunohistochemical expression of VEGF predicts response to platinum based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Angiogenesis.* 2011, 14, 2, 155-161.
209. Smeland E., Kilvaer T.K., Sorbye S., Valkov A., Andersen S., Bremnes R.M., Busund L.T., Donnem T.: Prognostic impacts of hypoxic markers in soft tissue sarcoma. *Sarcoma.* 2012, 2012, 541650. doi: 10.1155/2012/541650.
210. Song X., Liu X., Chi W., Liu Y., Wei L., Wang X., Yu J.: Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer.* 2006, 58, 6, 776-784.
211. Sorbye S.W., Kilvaer T.K., Valkov A., Donnem T., Smeland E., Al-Shibli K., Bremnes R.M., Busund L.T.: Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One.* 2012, 7, 10, e47068. doi: 10.1371/journal.pone.0047068.
212. Span P.N., Bussink J., Manders P., Beex L.V.A.M., Sweep C.G.J.: Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer.* 2003, 89, 2, 271-276.
213. Spunt S.L., Skapek S.X., Coffin C.M.: Pediatric nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas. *Oncologist.* 2008, 13, 6, 668-678.
214. Stryer L.: *Biochemia.* Warszawa: PWN Wyd. 6., 2009. ISBN 978-83-01-15811-8.
215. Sudhakar J., Venkatesan N., Lakshmanan S., Khetan V., Krishnakumar S., Biswas J.: Hypoxic tumor microenvironment in advanced retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2013, 60, 10, 1598-1601.
216. Sullivan R., Paré G.C., Frederiksen L.J., Semenza G.L., Graham C.H.: Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with de-

- creased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther.* 2008, 7, 7, 1961-1973
217. Sulzbacher I., Birner P., Trieb K., Lang S., Chott A.: Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch.* 2002, 441, 4, 345-349.
 218. Sun H.C., Qiu Z.J., Liu J., Sun J., Jiang T., Huang K.J., Yao M., Huang C.: Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis. *Int J Oncol.* 2007, 30, 6, 1359-1367.
 219. Swanson S.A., Brooks J.J.: Proliferation markers Ki-67 and p105 in soft-tissue lesions. Correlation with DNA flow cytometric characteristics. *Am J Pathol.* 1990, 137, 6, 1491-1500.
 220. Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K., Shibuya M.: A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001, 20, 11, 2768-2778.
 221. Takeshita A., Kimura W., Hirai I., Takasu N., Moriya T., Tezuka K., Watanabe T.: Clinicopathologic study of the MIB-1 labeling index (Ki67) and postoperative prognosis for intraductal papillary mucinous neoplasms and ordinary ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* 2012, 41, 1, 114-120.
 222. Talks K.L., Turley H., Gatter K.C., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Harris A.L.: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000, 157, 2, 411-421.
 223. Tannock I.F.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer.* 1968, 22, 2, 258-273.
 224. Theodoropoulos V.E., Lazaris A.C., Kastriotis I., Spiliadi C., Theodoropoulos G.E., Tsoukala V., Patsouris E., Sofras F.: Evaluation of hypoxia-inducible factor 1 α overexpression as a predictor of tumor recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJUI.* 2005, 95, 3, 425-431.
 225. Thomlinson R.H., Gray L.H.: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* 1955, 9, 4, 539-549.
 226. Tsai H.L., Lin C.H., Huang C.W., Yang I.P., Yeh Y.S., Hsu W.H., Wu J.Y., Kuo C.H., Tseng F.Y., Wang J.Y.: Decreased peritherapeutic VEGF expression could be a predictor of responsiveness to first-line FOLFIRI plus bevacizumab in mCRC patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015, 8, 2, 1900-1910.
 227. Vaupel P.: Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist.* 2008, 13, 3, 21-26.

228. Vaupel P., Harrison L.: Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*. 2004, 9, 5, 4-9.
229. Vogel U.F., Bültmann B.: Application of a novel and low cost technique to construct paraffin tissue microarrays out of paraffinised needle biopsy specimens from patients with breast cancer. *J Clin Pathol*. 2010, 63, 7, 640-643.
230. Wang G.L., Semenza G.L.: Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995, 270, 3, 1320-1327.
231. Wang Y., Li Z., Zhang H., Jin H., Sun L., Dong H., Xu M., Zhao P., Zhang B., Wang J., Pan Y., Liu L.: HIF-1 α and HIF-2 α correlate with migration and invasion in gastric cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010, 10, 4, 376-382.
232. Warnberg F., Amini R.M., Goldman M., Jirtström K.: Quality aspects of the tissue microarray technique in a population-based cohort with ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology*. 2008, 53, 6, 642-649.
233. Watanabe T., Oda Y., Tamiya S., Kinukawa N., Masuda K., Tsuneyoshi M.: Malignant peripheral nerve sheath tumours: high Ki67 labelling index is the significant prognostic indicator. *Histopathology*. 2001, 39, 2, 187-197.
234. Watson P.H., Chia S.K., Wykoff C.C., Han C., Leek R.D., Sly W.S., Gatter K.C., Ratcliffe P., Harris A.L.: Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2003, 88, 7, 1065-1070.
235. Welsh S.J., Koh M.Y., Powis G.: The hypoxic inducible stress response as a target for cancer drug discovery. *Semin Oncol*. 2006, 33, 4, 486-497.
236. Wieman H.L., Horn S.R., Jacobs S.R., Altman B.J., Kornbluth S., Rathmell J.C.: An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif in growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *Biochem J*. 2009, 418, 2, 345-367.
237. Wiesener M.S., Maxwell P.H.: HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe? *Ann Med*. 2003, 35, 3, 183-190.
238. Wiesener M.S., Munchenhagen P.M., Berger I., Morgan N.V., Roigas J., Schwiertz A., Jurgensen J.S., Gruber G., Maxwell P.H., Loning S.A., Frei U., Maher E.R., Grone H.J., Eckardt K.U.: Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res*. 2001, 61, 13, 5215-5222.
239. Wilson G.D.: Hypoxia and prognosis: the oxygen tension mounts. *Front Biosci*. 2007, 12, 3502-3518.
240. Woelber L., Mueller V., Eulenburg C., Schwarz J., Carney W., Jaenicke F., Milde-Langosch K., Mahner S.: Serum carbonic anhydrase IX during

- first-line therapy of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2010, 117, 2, 183-188.
241. Wyrobiec G., Rokicki W., Stęplewska K., Kasperczyk J., Głowacka M., Chodorowska G., Dąbrowska-Członka M., Bartosińska J., Wawrzycki B., Jazienicka I., Maciejewski P.: Komórki tuczne i angiogeneza w niedrobnokomórkowych rakach płuc. *Kardiochir Torakochirurgia Pol.* 2007, 4, 2, 155-161.
242. Yanagawa T., Shinozaki T., Watanabe H., Saito K., Raz A., Takagishi K.: Vascular endothelial growth factor-D is a key molecule that enhances lymphatic metastasis of soft tissue sarcomas. *Exp Cell Res.* 2012, 318, 7, 800-808
243. Yang Q.C., Zeng B.F., Dong Y., Shi Z.M., Jiang Z.M., Huang J.: Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome. *Jpn J Clin Oncol.* 2007, 37, 2, 127-134.
244. Younes M., Juarez D., Lechago L.V., Lerner S.P.: Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res.* 2001, 21, 1B, 575-578.
245. Yudoh K., Kanamori M., Ohmori K., Yasuda T., Aoki M, Kimura Y.: Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas. *Br J Cancer.* 2001, 84, 12, 1610-1615.
246. Zhao F.Q., Keating A.F.: Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* 2007, 8, 2, 113-128.
247. Zhong H., Chiles K., Feldser D., Laughner E., Hanrahan C., Georgescu M.M., Simons J.W., Semenza G.L.: Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000, 60, 6, 1541-1545
248. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L., Simons J.W.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999, 59, 22, 5830-5835.
249. Zottola R.J., Cloherty E.K., Coderre P.E., Hansen A., Hebert D.N., Carruthers A.: Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry.* 1995, 34, 30, 9734-9747.
250. Zundel W., Schindler C., Haas-Kogan D., Koong A., Kaper F., Chen E., Gottschalk A.R., Ryan H.E., Johnson R.S., Jefferson A.B., Stokoe D., Giaccia A.J.: Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000, 14, 4, 391-396.

9 STRESZCZENIE

W toku ewolucji organizmy wielokomórkowe uzależniły się od O_2 i ich prawidłowe funkcjonowanie zależne jest od jego niezaburzonej dostawy i właściwego stężenia. Niezależnie od przyczyny i postaci, tkankowy niedobór O_2 , zwany hipoksją, stanowi jeden z najgroźniejszych czynników, zaburzających funkcje komórek.

Badania ostatnich lat wykazują, że hipoksja stanowi jedną z cech charakterystycznych niemal wszystkich nowotworów litych. Wywołana jest ona głównie przez niedostateczny dowóz O_2 i substancji odżywczych przez nieprawidłowe naczynia krwionośne powstałe na drodze neoangiogenezy w szybko proliferującej tkance. Dodatkowo, w rosnącym guzie wzrasta aktywność metaboliczna, zwiększa się zużycie O_2 przez szybko dzielące się komórki, a w otaczającym środowisku spada pH.

W warunkach hipoksji dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności czynnika indukowanego przez hipoksję (HIF-1 α), najważniejszego endogennego czynnika regulującego odpowiedź komórki nowotworowej na zmniejszony dostęp O_2 . Uruchamia on szereg procesów „korzystnych” dla nowotworu, umożliwiających komórkom guza przetrwanie. Do procesów tych należą m. in.: neoangiogeneza, uruchomienie beztlenowych przemian metabolicznych i utrzymanie wewnątrzkomórkowego pH, za które odpowiedzialne są, odpowiednio: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), transporter glukozy 1 (GLUT-1) i anhidroza węglanowa IX (CA IX). Białka te uważane są wraz z HIF-1 α , za najważniejsze endogenne markery hipoksji. Ważnym odkryciem było powiązanie aktywacji tych markerów z procesami promującymi progresję nowotworu, takimi jak: hamowanie apoptozy komórek nowotworowych, aktywacja procesów oporności wielolekowej oraz proliferacji, inwazyjności i przerzutowania nowotworu.

Znaczenie hipoksji i endogennych jej markerów stanowi jeden z wiodących tematów badań naukowych ostatnich lat. W wielu typach nowotworów złośliwych stwierdzono istotny statystycznie związek tkankowej ekspresji markerów hipoksji z obecnością niekorzystnych rokowniczo czynników kliniczno-patologicznych, opornością na chemioterapię (CHT), większym ryzykiem wystąpienia wznowy i krótszym przeżyciem całkowitym (OS). W mięsakach tkanek miękkich (MTM) u dorosłych potwierdzono znaczenie prognostyczne wybranych markerów hipoksji. Dotąd nie opublikowano wyników badań, dotyczących dzieci z MTM.

MTM u dzieci to złożona grupa złośliwych guzów pochodzenia mezenchymalnego, o zróżnicowanej aktywności biologicznej, przebiegu klinicznym i rokowaniu. Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w leczeniu dziecięcych

MTM w ostatnich dekadach, rokowanie w stadiach zaawansowanych jest nadal niezadowolające. W pracy wysunięto hipotezę, że procesy hipoksji i adaptacji do niedotlenienia odgrywają rolę w rozwoju, progresji i oporności na CHT MTM u dzieci.

Celem pracy było określenie znaczenia ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji oraz indeksu proliferacyjnego Ki-67 u dzieci z mięsakami tkanek miękkich w ocenie aktywności choroby i prognozowaniu jej przebiegu.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKBBN/449/2013).

Badaniami objęto 91 dzieci (38 dziewcząt i 53 chłopców, mediana wieku 105,7 miesięcy) z MTM, leczonych wg protokołów CWS w ośrodkach onkologii dziecięcej Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych (PPGLGL) w latach 1992-2013. Grupę badaną stanowiło 66 pacjentów z mięsakiem prążkowanokomórkowym (RMS) i 25 ze złośliwym obwodowym guzem z osłonek nerwowych (MPNST). U wszystkich tych pacjentów dostępny był archiwalny histologiczny materiał tkankowy, pochodzący z pierwotnego guza nowotworowego, oraz pełne dane kliniczne, obejmujące szczegółową charakterystykę, przebieg oraz ostateczny wynik leczenia. We wszystkich przypadkach rozpoznania histologiczne MTM zostały potwierdzone przez drugiego niezależnego patologa z doświadczeniem w dziedzinie diagnostyki mięsaków u dzieci.

Do utworzenia macierzy tkankowych użyty został komercyjny zestaw Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray System, firmy Sakura Finetek USA, Inc. W tkankach z TMA wykonano odczyny immunohistochemiczne (IHC) na obecność badanych markerów hipoksji: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF. Ponadto wykonano odczyny z przeciwciałem anti-Ki-67. Immunofenotypizacja przeprowadzona została przez doświadczony zespół laboratoryjny Zakładu Patologii i Neuropatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: dr hab. n. med. Ewa Iżycka-Świeszewska, prof. nadzw.) przy użyciu Systemu detekcji *EnVision Flex*, Firmy Dako.

Ekspresję HIF-1 α , GLUT-1, CA IX oraz VEGF w tkance nowotworowej oceniano za pomocą metody półilościowej, określając siłę reakcji barwnej (w skali od + do +++) oraz szacując ilość immunopozytywnych komórek (0-5%, 6-25%, 26-50%, powyżej 50%). W oparciu o te dwie zmienne ustalano liczbowy współczynnik ekspresji poszczególnych markerów, którego wartość określała ekspresję markerów jako słabą lub silną. Do oceny ekspresji antygenu Ki-67 analizowano 100-500 jąder komórek nowotworowych z 1-3 wybranych pól o zagęszczeniu komórek immunopozytywnych (*hot spot*). Wskaźnik IK67 określono jako procent dodatnich jąder i oceniano jako niski ($\leq 30\%$) lub wysoki ($> 30\%$).

Wyniki uzyskanych badań poddano opracowaniu statystycznemu, wykorzystując komputerowy pakiet programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.1.1.14 (02-07-2013). $P < 0,05$ uznawano za znaczące statystycznie.

W grupie badanej dominowali chorzy w zaawansowanych stadiach choroby, u których guz pierwotny był duży, inwazyjny i położony w niekorzystnych regionach, przez co nieoperacyjny. Odpowiedź na CHT oceniono jako dobrą u 72,2% i złą – u 27,8% chorych. Wznowa choroby, głównie lokalna, wystąpiła u 56% badanych. W badanej grupie żyje 54,9% chorych z medianą okresu obserwacji 59 miesięcy. Zmarło 45,1% dzieci – wszystkie w wyniku progresji choroby nowotworowej. Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia wolnego od zdarzenia (EFS) w grupie badanej wynosiło $37,4 \pm 5,6\%$, zaś prawdopodobieństwo 5-letniego OS – $48,8 \pm 5,9\%$.

W tkance nowotworowej MTM silną ekspresję HIF-1 α stwierdzono w 48,3% guzów, GLUT-1 – w 34%, CA IX – w 63,7% i VEGF – w 79%. W ponad 90% guzów wykazano silną ekspresję co najmniej jednego markera hipoksji, a w ponad 40% – co najmniej czterech jednocześnie. Wszystkie analizowane markery hipoksji wzajemnie ze sobą korelowały dodatnio w sposób statystycznie istotny.

Poza CA IX, tkankowa ekspresja wszystkich badanych markerów hipoksji wykazywała istotną statystycznie dodatnią korelację z wartością IK67.

Wykazano związek silnej ekspresji endogennych markerów hipoksji w tkance nowotworowej przed leczeniem z niekorzystnymi kliniczno-patologicznymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak: wyższe stadia zaawansowania choroby, niekorzystna histologia MTM i podtyp pęcherzykowy RMS (RMA). Chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych i narządów odległych znacząco częściej wykazywali silną ekspresję HIF-1 α . U chorych w stadiach III i IV dominowała silna ekspresja co najmniej trzech markerów hipoksji jednocześnie. Pacjenci z RMA istotnie częściej, niż chorzy z RME, wykazywali silną ekspresję wszystkich analizowanych markerów hipoksji. U pacjentów z histologią niekorzystną istotnie częściej występowała silna ekspresja jednocześnie czterech lub pięciu badanych markerów. Nie wykazano współzależności, pomiędzy stopniem ekspresji HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 i VEGF, a wiekiem, płcią, wielkością i inwazyjnością guza pierwotnego.

Wykazano, że stopień ekspresji markerów hipoksji w guzie nowotworowym przed zastosowaniem CHT może stanowić obiecujący czynnik prognozujący chemiowrażliwość mięsaków. Im silniejsza była ekspresja VEGF, a także CA IX oraz GLUT-1 w tkance guza, tym gorszą stwierdzano odpowiedź na CHT. Jednoczesna silna ekspresja VEGF, CA IX i GLUT-1 występowała dwukrotnie częściej u chorych źle reagujących na CHT w porównaniu do chorych reagujących dobrze. U chorych ze złą reakcją na CHT istotnie częściej stwierdzano silną ekspresję czterech lub wszystkich pięciu badanych markerów.

Stwierdzono również, iż na podstawie stopnia immunoreaktywności markerów hipoksji w guzie przed leczeniem przewidzieć można EFS i OS u dzieci z MTM. Wyniki analizy wieloczynnikowej wykazały, iż ekspresja HIF-1 α , VEGF i CA IX, obok odpowiedzi na CHT, miały niezależny wpływ na EFS, zaś ekspresja HIF-1 α i CA IX – niezależny wpływ na OS.

Najniższe prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS stwierdzono u dzieci z silną ekspresją GLUT-1 i HIF-1 α , zaś najwyższe – u chorych, u których nie stwierdzono silnej immunoreaktywności VEGF. Im więcej markerów wykazywało jednocześnie silną ekspresję w tkance MTM przed leczeniem, tym prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS u pacjentów było niższe. Brak ekspresji markerów hipoksji stwierdzano wyłącznie w podgrupie chorych bez wznowy MTM oraz w podgrupie pacjentów, którzy żyją w momencie analizy. U tych chorych prawdopodobieństwo 5-letniego EFS oraz 5-letniego OS wynosiło 100%. U dzieci ze wznową oraz chorych, którzy zmarli z progresji choroby istotnie częściej obecna była silna ekspresja czterech i więcej badanych markerów.

Wyniki przedstawionych w pracy badań potwierdzają istotną rolę procesów niedotlenienia i uruchamianych przez HIF-1 α procesów przystosowania do hipoksji w mięsakach u dzieci. Stwierdzenie metodami IHC silnej ekspresji endogennych markerów hipoksji w tkance nowotworowej może wskazywać na agresywny fenotyp guza, wiązać się z jego opornością na CHT, ale również – w sposób niezależny od innych czynników prognostycznych – przewidywać niekorzystny przebieg choroby i niepowodzenie leczenia. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, ale również praktyczne, stanowiąc źródło wiedzy na temat potencjalnych nowych markerów prognostycznych oraz potencjalnych celów dla nowych terapii u dzieci z MTM. Ze względu na stwierdzone różnice w ekspresji endogennych markerów hipoksji u dzieci z RME i RMA, zasadne byłoby przeprowadzenie poszerzonych badań porównawczych u dzieci z wymienionymi podtypami RMS.

10 SUMMARY

In the course of evolution, the multicellular organisms have become dependent on oxygen and their proper functioning depends on the undisturbed O₂ supply and its proper concentration. Regardless of the cause and form, the tissue O₂ deficiency, called hypoxia, is one of the most dangerous factors disrupting cell functioning.

Recent studies have shown that hypoxia is one of the features of almost all solid tumors. It is caused mainly by insufficient supply of O₂ and nutrients by abnormal blood vessels formed through the process of angiogenesis in rapidly proliferating tumor tissue. In addition, growing of the tumor is associated with increased metabolic activity, increased O₂ consumption by rapidly proliferating cells and the pH of the surrounding environment decreases.

Under hypoxic conditions, a significant increase in the activity of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) occurs, which is regarded as the most important endogenous factor regulating tumor cell response to the reduced access of O₂. A series of processes "favorable" for the tumor, allowing tumor cells to survive, are initiated. These processes include: neoangiogenesis, anaerobic metabolism and the maintenance of intracellular pH and are regulated by: vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT-1) and carbonic anhydrase IX (CA IX), respectively. These proteins, together with HIF-1 α , are considered the most important endogenous markers of hypoxia. Importantly, the activation of hypoxia markers has been found associated with several processes promoting tumor progression, such as: the inhibition of tumor cell apoptosis, activation multi-drug cell resistance and processes of tumor proliferation, invasiveness and metastasis.

The importance of hypoxia and of endogenous markers of hypoxia have been the leading research topics in recent years. In many types of malignant tumors a significant relationship between tissue hypoxia marker(s) expression and the presence of unfavorable prognostic clinico-pathological factors, resistance to chemotherapy (CHT), higher risk of recurrence and a shorter overall survival (OS) was found. The prognostic significance of markers of hypoxia was confirmed in adult soft tissue sarcomas (STS). So far, there were no published studies concerning the role of hypoxia markers in children with STS.

Childhood STS are a heterogeneous group of malignant tumors of mesenchymal origin, displaying different biological activities, various clinical course and prognosis. Despite the enormous progress that has been made in the treatment of childhood STS in recent decades, the prognosis in advanced stages is still unsatisfactory. In the study it was hypothesized that the hypoxia and processes of adaptation to hypoxia play roles in the development, progression and

resistance to CHT in childhood STS. The aim of the study was to investigate the role of expression of selected endogenous markers of hypoxia and IK67 in tumor tissue of children with STS in assessment of cancer activity and predicting of its course. The study was approved by the Independent Commission for Bioethics Research, Gdansk Medical University (No. NKBBN / 449/2013).

The study included 91 children (38 girls and 53 boys, median age 105.7 months) diagnosed with STS, treated according to CWS protocol in pediatric oncology centers of the Polish Pediatric Solid Tumors Study Group (PPGLGL) in the years 1992-2013. The study included 66 patients with rhabdomyosarcoma (RMS) and 25 with malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST). In all patients the archival histological tissue material from the primary tumor, and full clinical data, including detailed characteristics, the course and the final outcome, were available. In all cases, histological diagnosis of STS were confirmed by a second independent pathologist with expertise in the field of diagnostics of childhood sarcomas. To create tissue microarray (TMA) a commercial Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray System, of the Sakura Finetek USA, Inc company, was used. In the tumor TMA the immunohistochemistry (IHC) reactions were performed for the presence of analyzed hypoxia markers: HIF-1 α , GLUT-1, CA IX and VEGF. In addition, the immunostaining with anti-Ki-67 antibody was performed. The immunophenotyping was carried out by an experienced laboratory team of the Department of Pathology and Neuropathology, Medical University of Gdansk (Head: dr hab. med. Ewa Izycka-Świeszewska, Assoc Professor), using the Flex EnVision detection system (DAKO).

The tumor expression of HIF-1 α , GLUT-1, CA IX and VEGF were evaluated by semiquantitative method, evaluating the intensity of the staining (with the scale of + to +++) and estimating the percentage of immunopositive cells (0-5%, 6-25%, 26-50%, more than 50%). Based on these two variables, a numerical coefficient of the particular hypoxia markers' expression was created. Its value determined the expression of markers as low or high. To evaluate the expression of Ki-67 antigen 100-500 tumor cells nuclei from 1-3 selected fields of cell hot spot were analyzed. The IK67 was defined as the percentage of positive nuclei and was rated as low ($\leq 30\%$) or high ($> 30\%$).

The results were subjected to statistical study, using computer statistical software package EPIINFO Ver. 7.1.1.14 (02-07-2013). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The majority of the study group were the patients in highly advanced stages of the disease, with large, invasive and unfavorably located and thus inoperable primary tumors. The response to CHT was good in 72.2% and bad – in 27.8% of patients. The relapses, mostly local, occurred in 56% of patients. In the study group 54.9% of patients are alive with the median follow-up of 59 months. 45.1% of children died of cancer progression. The probability of 5-year event

free survival (EFS) in the study group was $37.4 \pm 5.6\%$, while the probability of a 5-year OS – $48.8 \pm 5.9\%$.

The high expression of HIF-1 α was detected in 48.3% of the tumors, GLUT-1 – in 34%, CA IX – 63.7% and VEGF – 79%. Over 90% of STS tumors showed high expression of at least one marker of hypoxia, and 40% of the tumors – more than four markers. All analyzed markers of hypoxia statistically significantly correlated positively with each other.

Besides CA IX, the tissue expression of all the other markers of hypoxia showed a statistically significant positive correlation with the value of IK67.

It has been found that the high expression of endogenous markers of hypoxia in tumor tissue prior to treatment correlated with adverse clinicopathological prognostic factors, such as higher stages of disease, unfavorable histology of STS and alveolar subtype of RMS (RMA). Patients with lymph nodes and distant organs metastases significantly more often showed high expression of HIF-1 α . Patients in stages III and IV more commonly demonstrated simultaneous high expression of at least three markers of hypoxia. Patients with RMA significantly more often, than patients with RME, showed high expression of all analyzed markers of hypoxia. Patients with unfavorable histology were significantly more likely to highly express four or five analyzed markers. There was no evidence of relationship between the expression of HIF-1 α , CA IX, GLUT-1 and VEGF, and age, gender, size and invasiveness of the primary tumor.

It has been shown that the intensity of expression of hypoxia markers in the tumor prior to CHT introduction may be a promising factor able to predict chemosensitivity of sarcomas. The higher was the expression of VEGF, CA IX and GLUT-1 in tumor tissue, the worse response to CHT was observed. Simultaneous high expression of VEGF, CA IX and GLUT-1 occurred twice as frequently in patients responding poor to CHT, compared to patients responding well. Patients with a poor response to CHT were significantly more likely to have a high tumor expression of four or all five analyzed markers.

It was also found that the EFS and OS in children with STS can be predicted based on the immunoreactivity of markers of hypoxia within the tumor before treatment. The results of multivariate Cox analysis showed that the expression of HIF-1 α , VEGF and CA IX, along with the response to CHT, were independent predictors of EFS, while the expression of HIF-1 α and CA IX – independent predictors of OS.

The lowest probabilities of the 5-year EFS and the 5-year OS were observed in children with high expression of GLUT-1 and HIF-1 α , and the highest – in patients with no evidence of a high immunoreactivity of VEGF. The more markers showed high expression in tumor tissue prior to treatment, the lower was the likelihood of the 5-year EFS and the 5-year OS. No expression of markers was observed only in patients without STS recurrence and in those who are alive at the time of analysis. In these patients, the probabilities of the 5-year EFS and the

5-year OS were 100%. In children with relapse and patients who died from disease progression, a high expression of four or more markers was significantly more often.

The results of the presented study confirm the essential role of the hypoxia and HIF-1 α -related processes of adaptation to hypoxia in childhood STS. Detection of the high immunoreactivity of the endogenous markers of hypoxia in the tumor may indicate its aggressive phenotype, resistance to CHT, as well as – independently of other prognostic factors – may predict unfavorable course of disease and treatment failure. The results are important from both cognitive and practical points of view, since they provide a source of knowledge about potential new prognostic markers and potential targets for new therapies in children with STS. However, due to the significant differences in the expression of endogenous marker of hypoxia in children with RME and RMA, it would be appropriate to conduct further studies in children with these subtypes of RMS.

11 ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK 1

Klasyfikacja Tumor-Nodes-Metastases (TNM) według Union for International Cancer Control (UICC)

GUZ (T)

- T0: nie stwierdza się obecności guza pierwotnego
T1: guz ograniczony wyjściowo do 1 narządu lub tkanki:
T1a: największa średnica guza ≤ 5 cm
T1b: największa średnica guza > 5 cm
T2: guz wyjściowo wychodzący poza narząd lub tkankę:
T2a: największa średnica guza ≤ 5 cm
T2b: największa średnica guza > 5 cm
Tx: brak adekwatnych danych o wyjściowych rozmiarach guza (oceniać jak T2)

WĘZŁY CHŁONNE (N)

- N0: nie stwierdza się zajęcia regionalnych węzłów chłonnych
N1: zajęcie regionalnych węzłów chłonnych
Nx: brak adekwatnych danych o stanie węzłów chłonnych (oceniać jak N0)

Regionalne węzły chłonne należą do okolicy lokalizacyjnie związanej z guzem pierwotnym:

- głowa/szyja – węzły chłonne szyjne i nadobojczykowe;
- brzuch/miednica – węzły chłonne podprzeponowe i biodrowo-pachwinowe;
- kończyna górna – węzły chłonne pachowe i łokciowe;
- kończyna dolna – węzły chłonne podkolanowe i pachwinowe.

PRZERZUTY ODLEGŁE (M)

- M0: nie stwierdza się przerzutów odległych ani zajęcia pozaregionalnych węzłów chłonnych
M1: przerzuty odległe lub zajęcie pozaregionalnych węzłów chłonnych
Mx: brak adekwatnych danych o obecności przerzutów (oceniać jak M0)

Przerzuty odległe są rozpoznawane w przypadku zajęcia węzłów chłonnych pozaregionalnych, czyli II piętra po stronie guza, lub zajęcia węzłów chłonnych po stronie przeciwnej, nawet jeśli odpowiadały węzłom regionalnym.

ZAŁĄCZNIK 2**Stadia zaawansowania klinicznego MTM według *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)*, zgodnie z Programem Leczenia Mięsaków Tkanek Miękkich CWS**

Stadium I	Guz usunięty całkowicie makroskopowo i mikroskopowo, bez zajęcia regionalnych węzłów chłonnych	
IA	<ul style="list-style-type: none"> • guz ograniczony do narządu 	pT1
IB	<ul style="list-style-type: none"> • guz wychodzący poza narząd 	pT2
Stadium II	Guz makroskopowo usunięty, mikroskopowe pozostałości guza oraz:	pT3a
IIA	<ul style="list-style-type: none"> • regionalne węzły chłonne niezajęte 	
IIB	<ul style="list-style-type: none"> • regionalne węzły chłonne zajęte, ale usunięte 	
IIC	<ul style="list-style-type: none"> • regionalne węzły chłonne zajęte i nieusunięte 	
Stadium III	Niekompletna resekcja z pozostawieniem makroskopowych resztek guza lub stan po wykonaniu tylko biopsji guza nieoperacyjnego	pT3b
	Okoliczne węzły chłonne niezajęte lub zajęte. Wysiłek nowotworowy w jamach ciała przylegających bezpośrednio do guza	pT3c
Stadium IV	Choroba nowotworowa uogólniona. Odległe przerzuty do płuc, wątroby, kości, szpiku i/lub zajęcie odległych węzłów chłonnych oraz węzłów przeciwnej strony ciała	pT4

ZAŁĄCZNIK 3

Stratyfikacja chorych z RMS do poszczególnych grup ryzyka

Grupa Ryzyka <i>Risk group</i>	Podgrupa <i>Subgroup</i>	Histologia <i>Histology</i>	Stadium IRS <i>IRS stage</i>	Lokalizacja guza pierwotnego <i>Primary tumor site</i>	LN	Wielkość guza i wiek <i>Tumor size and age</i>
Niskiego ryzyka <i>Low risk</i>	A	Korzystna	I	Wszystkie	N0	≤5 cm i ≤10 lat
Standardowego ryzyka <i>Standard risk</i>	B	Korzystna	I	Wszystkie	N0	>5 cm lub >10 lat
	C	Korzystna	II, III	Korzystna	N0	Wszystkie
	D	Korzystna	II, III	Niekorzystna	N0	≤5 cm i ≤10 lat
Wysokiego ryzyka <i>High risk</i>	E	Korzystna	II, III	Niekorzystna	N0	>5 cm lub >10 lat
	F	Korzystna	II, III	Wszystkie	N1	Wszystkie
	G	Niekorzystna	I, II, III	Wszystkie	N0	Wszystkie
Bardzo wysokiego ryzyka <i>Very high risk</i>	H	Niekorzystna	II, III	Wszystkie	N1	Wszystkie

Stratyfikacja chorych z NRMS do poszczególnych grup ryzyka

Grupa ryzyka	Histologia	Stadium IRS	Zajęcie LN	Wielkość guza
Niskiego ryzyka <i>Low risk</i>	Wszystkie z wyjątkiem MRT i DSRCT	I	N0	≤5 cm
Standardowego ryzyka <i>Standard risk</i>	Wszystkie z wyjątkiem MRT i DSRCT	II	N0	Każda wielkość
		III	N0	≤5 cm
Wysokiego ryzyka <i>High risk</i>	MRT / DSRCT	I, II, III	N0 / N1	Każda wielkość
	Każda	III	N0	>5 cm
	Każda	II, III	N1	Każda wielkość
Bardzo wysokiego ryzyka <i>Very high risk</i>	Każda	IV	N0 / N1	Każda wielkość