

Katarzyna Sznurkowska

**Ocena stopnia angiogenezy
w złośliwych guzach germinalnych u dzieci**

Promotor: Prof. dr hab. med. Maria Korzon

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej

Akademia Medyczna w Gdańsku

Gdańsk 2006

Spis treści

Wprowadzenie	3
Wstęp	6
I. Guzy germinalne	6
1. Definicja, epidemiologia i etiopatogeneza	6
2. Patomorfologia złośliwych guzów germinalnych	8
3. Obraz kliniczny i rozpoznanie złośliwych guzów zarodkowych	10
4. Rozpoznanie złośliwych guzów germinalnych	12
5. Leczenie złośliwych guzów germinalnych	14
6. Rokowanie	17
II. Angiogeneza	18
1. Definicja	18
2. Etapy angiogenezy	19
3. Angiogeneza nowotworowa	21
4. Czynniki stymulujące angiogenezę	25
5. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF	27
6. Zastosowanie terapii antyangiogennej w leczeniu nowotworów	31
7. Metody oceny angiogenezy	32
Cele pracy	34
Pacjenci i metody	35
Metody	36
Dane kliniczne:	36
Badania immunohistochemiczne	37
Obliczenia statystyczne	38
Wyniki:	40
Analiza badanej grupy	40
Średnia gęstość naczyń – (microvessel density) – MVD	42
Ekspresja VEGF	49
Zależność pomiędzy VEGF a MVD	53
Dyskusja	56
Wnioski	78
Streszczenie	79
Piśmiennictwo	81

Wprowadzenie

Choroby nowotworowe są drugą co do częstości, po urazach i zatruciach przyczyną zgonu u dzieci (1).

Na świecie notuje się 105 do 130 nowych zachorowań na 1 milion dzieci (2). Zapadalność na nowotwory w wieku rozwojowym w Polsce kształtuje się na podobnym poziomie i wynosi 12 nowych zachorowań na 100 tysięcy, co oznacza 1200 zachorowań u dzieci w naszym kraju rocznie (3). Częstość zachorowań na nowotwory wieku dziecięcego stopniowo rośnie – przeciętnie o 1% rocznie (4).

Nowotwory wieku dziecięcego charakteryzują się dużym zróżnicowaniem histologicznym i lokalizacją. Częstość występowania oraz typy histologiczne są odmienne niż u dorosłych (5).

U dzieci wyróżnia się 12 grup diagnostycznych nowotworów wg Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób dla Onkologii (ICD-O) (5). Do najczęstszych nowotworów u dzieci zaliczamy białaczkę, a spośród guzów litych nowotwory ośrodkowego układu nerwowego.

Złośliwe guzy germinalne należą do rzadkich nowotworów złośliwych u dzieci, stanowiąc jedynie 3% nowotworów złośliwych wieku rozwojowego (3). Charakteryzują się dużym zróżnicowaniem histologicznym i różnorodną lokalizacją. Rozwijają się one z różnych stadiów rozwojowych gonocyta – pierwotnej komórki płciowej, która w życiu płodowym pokonuje drogę z pęcherzyka żółtkowego do gonad, wzdłuż osi ciała zarodka. Z faktu tego wynika różnorodna lokalizacja guzów germinalnych, które zwykle rozwijają się wzdłuż osi ciała lub w gonadach. Różnorodna budowa histologiczna złośliwych

guzów germinalnych warunkuje ich odmienny obraz kliniczny oraz odmienne rokowanie, co wiąże się także ze zróżnicowaną strategią leczniczą (6).

Mimo ogromnego postępu jaki dokonał się w onkologii dziecięcej – zwłaszcza w ciągu ostatnich 20 lat nadal wiele dzieci z chorobą nowotworową nie udaje się uratować. Wyniki leczenia nowotworów takich jak guzy ośrodkowego układu nerwowego, białaczki szpikowe, neuroblastoma są nadal niezadawalające, a wręcz złe.

Fakt ten skłania wielu badaczy do intensywnego poszukiwania czynników wywołujących onkogenezę i mechanizmów rozwoju nowotworów, co mogłoby w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych skuteczniejszych metod leczenia.

Rozwój naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym, czyli angiogeneza nowotworowa (neoangiogeneza, neowaskularyzacja) stanowi przedmiot szczególnego zainteresowania, ponieważ jest ona nieodzownym warunkiem progresji nowotworu. Od lat wiadomo, że nowotwór o średnicy większej niż 2-3 mm nie może istnieć bez własnego, autonomicznego systemu naczyń krwionośnych (7). Koncepcja oparta na stwierdzeniu, że hamowanie tworzenia naczyń w nowotworze uniemożliwia jego dalszy rozwój stała się podstawą poszukiwania oraz opracowania nowych strategii leczniczych, opartych na lekach o działaniu antyangiogennym.

Do chwili obecnej przeprowadzono liczne badania kliniczne i eksperymentalne nad działaniem substancji hamujących rozwój naczyń nowotworu (8, 9).

Istnieją różne **metody oceny stopnia angiogenezy**. Niektórzy autorzy oznaczają poziom czynników proangiogennych lub inhibitorów angiogenezy w płynach ustrojowych (10). Inni koncentrują się na ekspresji różnorodnych naczyniowych czynników wzrostowych w tkance nowotworowej (11, 12, 13). Prowadzone są także badania molekularne nad genami kodującymi czynniki wzrostowe i cytokiny biorące udział w angiogenezie (14, 15). Wiele uwagi poświęca się zwłaszcza **czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF)**. Badanie **gęstości naczyń w guzach nowotworowych (microvessel density – MVD)** jest najczęstszą metodą oceny angiogenezy – w jej końcowym etapie (16,17, 18).

Badania nad unaczynieniem guzów litych wykazały, że zwiększona gęstość naczyń krwionośnych dodatnio koreluje z tworzeniem przerzutów, nawrotami choroby i pogarsza rokowanie (19).

Większość dotychczas prowadzonych badań nad angiogenezą nowotworową dotyczy nowotworów osób dorosłych- zwłaszcza guzów litych (20, 21). Mniej liczne prace opisują neowaskularyzację w białaczkach ludzi dorosłych (23).

Znacznie mniejsza liczba doniesień dotyczy problemu neoangiogenezy w nowotworach dziecięcych (24, 25). Brak jest doniesień na temat angiogenezy w guzach germinalnych u dzieci.

Wstęp

I. Guzy germinalne

1. Definicja, epidemiologia i etiopatogeneza

W Polsce notuje się około 25 zachorowań rocznie na złośliwe guzy germinalne o lokalizacji pozaczaskowej oraz 5-6 zachorowań na guzy germinalne ośrodkowego układu nerwowego, które są ujmowane w rejestrach łącznie z innymi procesami rozrostowymi wewnątrz jamy czaszkowej (3, 6). Obserwuje się dwa szczyty zachorowań w zależności od wieku i płci. Pierwszy przypada na okres pierwszych 2 lat życia u obu płci, drugi występuje u dziewczynek po 6 roku życia i dotyczy jajników, a u chłopców po 14 roku życia i dotyczy jąder (26).

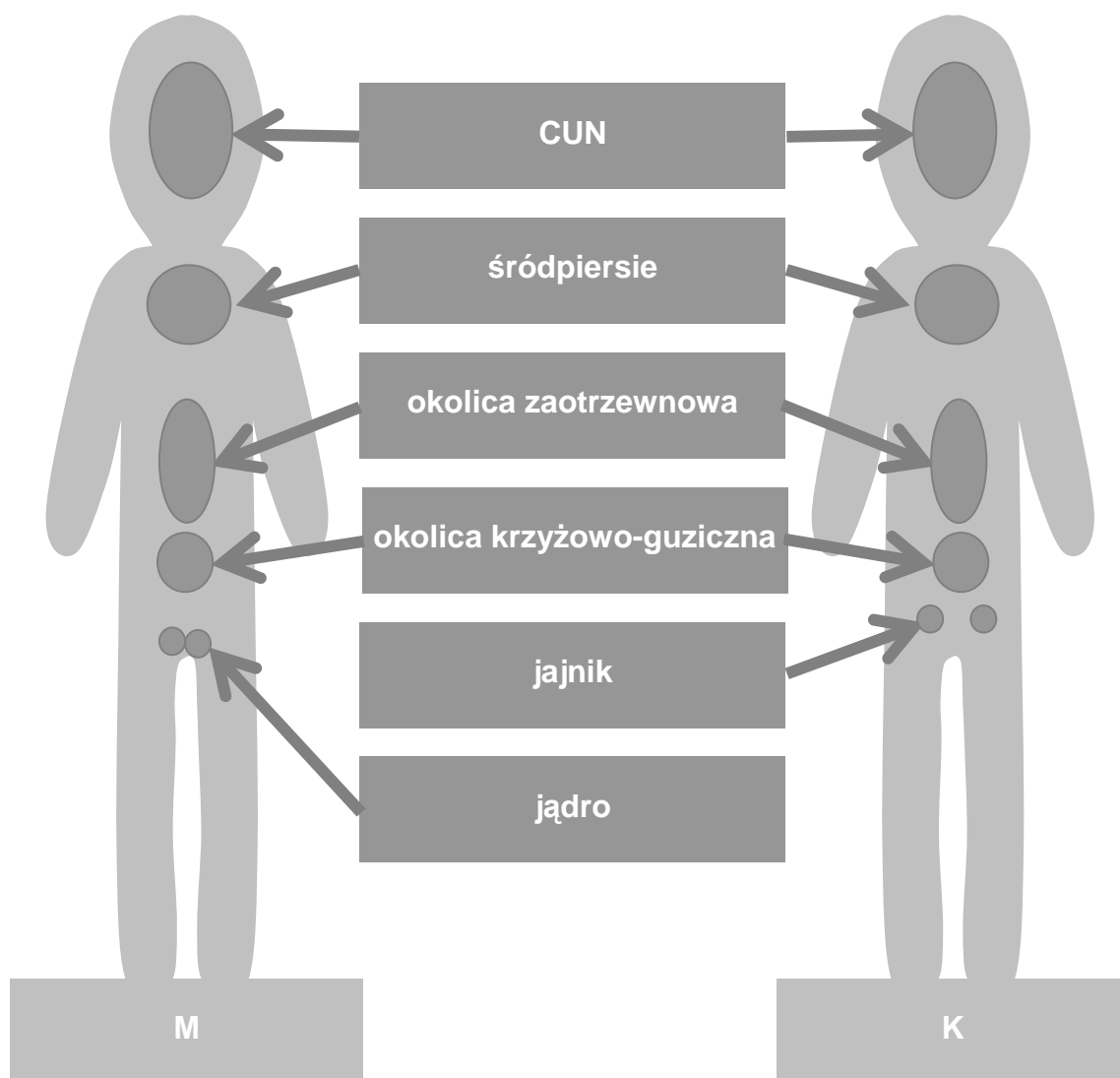
Złośliwe guzy germinalne wywodzą się z różnych – mniej lub bardziej dojrzałych etapów rozwojowych pierwotnej komórki płciowej – gonocyta, który w okresie embriogenezy pokonuje drogę z pęcherzyka żółtkowego do gonad wzdłuż osi ciała zarodka, stąd olbrzymia większość guzów zarodkowych umiejscowiona jest w osi ciała lub w gonadach (6, 26).

Lokalizację guzów geminalnych wraz z częstością występowania przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinie 1(6). Złośliwe guzy germinalne występują dwukrotnie częściej u dziewczynek (27).

Podobnie jak w innych nowotworach etiologia i patogeneza jest niejasna. Nie ustalono wpływu czynników egzogennych takich jak toksyczne substancje chemiczne, infekcje wirusowe i bakteryjne, promieniowanie jonizujące.

Tabela 1. Lokalizacja złośliwych guzów germinalnych

Lokalizacja	Częstość występowania
Okolica krzyżowo-guziczna	19%
Jajnik	30%
Jądro	17%
Centralny układ nerwowy	20%
Śródpiersie	4%
Okolica zaotrzewnowa	3%
Inne	5%



Rycina 1. Lokalizacja złośliwych guzów germinalnych

Choć w wielu z tych nowotworów stwierdza się zaburzenia cytogenetyczne w komórkach dotyczące przede wszystkim liczby chromosomów to znaczenie tego faktu w patogenezie pozostaje nadal niejasne (28, 29). Badania molekularne guzów zarodkowych wykazały, że są one grupą heterogeniczną, o różnych właściwościach biomolekularnych w zależności od wieku, budowy histologicznej i lokalizacji (28).

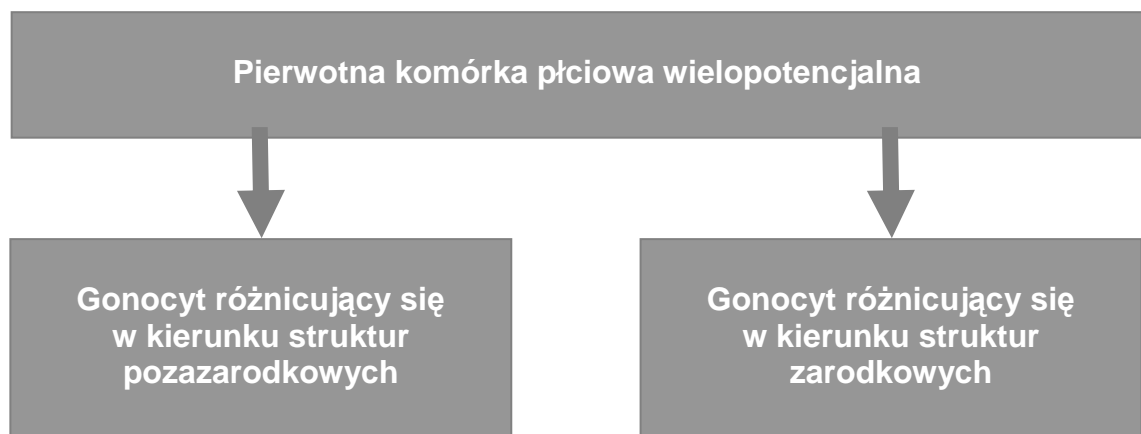
2. Patomorfologia złośliwych guzów germinalnych

Między 4 a 5 tygodniem życia płodowego rozpoczyna się wędrówka gonocytów z woreczka żółtkowego do pierwotnej listewki płciowej znajdującej się na tylnej ścianie części brzusznej zarodka. W jej sąsiedztwie znajdują się zawiązki szyszynki, śródpiersia, przestrzeni zaotrzewnowej. Nieprawidłowa migracja pierwotnych komórek płciowych w życiu płodowym może spowodować ich zasiedlenie w wymienionych narządach i okolicach, a ich mutacja zapoczątkowuje onkogenezę (6).

Podział morfologiczny złośliwych guzów germinalnych u dzieci oparty jest na kierunku różnicowania pierwotnej komórki płciowej (30).

Morfologiczny podział guzów germinalnych

- Grupa I – guzy zbudowane z wczesnych etapów podziałowych gonocyta, nie podlegających dalszemu różnicowaniu
- Grupa II – guzy zbudowane z dalszych etapów podziałowych gonocyta, różnicujących się w kierunku struktur pozazarodkowych
- Grupa III – guzy zbudowane z dalszych etapów podziałowych gonocyta, podlegających różnicowaniu w kierunku struktur zarodkowych
- Grupa IV – guzy mieszane



Rycina 2. Kierunki różnicowania się pierwotnej komórki płciowej

Szczegółowy podział morfologiczny guzów germinalnych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Podział morfologiczny guzów germinalnych w zależności od pochodzenia tkankowego.

Grupa I	Grupa II	Grupa III
<ul style="list-style-type: none"> gonadoblastoma germinoma – rozrodczak: <ul style="list-style-type: none"> dysgerminoma – u dziewcząt seminoma – odpowiednik w gonadzie męskiej (nie występuje u dzieci) 	<ul style="list-style-type: none"> yolk sac tumor – guz pęcherzyka żółtkowego polyembrioma chorioncarcinoma – kosmówczak 	<ul style="list-style-type: none"> carcinoma embryonale – rak zarodkowy) teratoma immaturum – potworniak niedojrzały teratoma semimaturum – potworniak częściowo dojrzały teratoma adultum – potworniak dojrzały (niezłośliwy)

Seminoma należący do grupy I guzów zbudowanych z nie zróżnicowanych komórek płciowych, jest złośliwym guzem germinalnym występującym u młodych mężczyzn – u dzieci praktycznie nie występuje (30, 31).

Do złośliwych guzów germinalnych nie zaliczamy potworniaka dojrzałego, który jest nowotworem łagodnym. Jest to najczęstszy guz zarodkowy

występujący 4-krotnie częściej niż jego złośliwa odmiana – teratoma immaturum.

3. Obraz kliniczny i rozpoznanie złośliwych guzów zarodkowych

Objawy, jakie wywołują złośliwe guzy germinalne zależą przede wszystkim od ich lokalizacji i wielkości. Wynikają one z obecności guza w danym regionie lub narządzie i jego ucisku na struktury sąsiednie. Złośliwe guzy germinalne stosunkowo rzadko wywołują objawy ogólne takie jak gorączka, utrata masy ciała, osłabienie, utrata łaknienia (6,26).

A. Guzy zarodkowe okolicy krzyżowo-guzicznej

Najważniejszym czynnikiem decydującym o symptomatologii guzów tej okolicy jest ich stosunek do kości krzyżowej i guzicznej. Z tego względu Altman i wsp. zaproponowali czterostopniową skalę klasyfikacyjną guzów tej okolicy (32).

- **Typ I** dominuje komponenta zewnętrzna z jedynie minimalną częścią przedkrzyżową.
- **Typ II** przeważa komponenta zewnętrzna, ale istotna część guza zlokalizowana jest również w miednicy małej.
- **Typ III** dominuje część wewnątrzmiędnicza ze znacznym wpuklaniem się do wnętrza jamy brzusznej, część zewnętrzna niewielka.
- **Typ IV** guz umieszczony wyłącznie przedkrzyżowo, bez komponenty zewnętrznej, bez wpuklania się do jamy brzusznej.

Większość guzów okolicy krzyżowo-guzicznej (46%) spełnia kryteria typu I według Altmana (6). Guzy te dotyczą przede wszystkim noworodków i rozpoznawane są od razu po urodzeniu, a nawet wewnątrzłonowo drogą badania ultrasonograficznego. Nie powodują one zaburzeń oddawania moczu i stolca, ponieważ tylko niewielka ich część znajduje się w miednicy małej. Wielkość ich może być bardzo różna od kilku do kilkunastu cm, czasem waga wyciętego guza wynosić może nawet 2 kg. Zwykle pokryte są prawidłową skórą, na guzach o dużych rozmiarach mogą tworzyć się owrzodzenia.

Tylko 8% guzów w tym typie to złośliwe guzy germinalne.

Typ II guzów krzyżowo-guzicznych występuje w 34,7% przypadków. W tym typie częstość występowania nowotworów złośliwych jest większa i wynosi 21%. Mogą występować objawy ucisku na odbytnicę, choć nie są one mocno wyrażone.

Guzy typu III i IV ujawniają się później, w okresie 1-4 roku życia. Występują rzadziej – odpowiednio 8,8% i 9,8%. Dominują objawy ucisku na odbytnicę, drogi moczowe i zwoje nerwowe, objawiające się zaparciami, dysfunkcją pęcherza moczowego, zakażeniami dróg moczowych, objawami dyzurycznymi.

Guzy te znacznie częściej należą do nowotworów złośliwych – w typie III w 34%, w typie IV w 38% przypadków.

Najczęstszym złośliwym guzem zlokalizowanym w okolicy krzyżowo-ogonowej jest yolk sac tumor (6, 27).

B. Złośliwe guzy germinalne jajnika

Objawiają się powiększeniem obwodu brzucha, bólem w podbrzuszu, niekiedy zaburzeniem oddawania moczu i stolca. Czasem, gdy dochodzi do skręcenia

szypuły guza lub jego pęknięcia choroba rozpoczyna gwałtownie silnymi bólami brzucha wymagającymi interwencji chirurgicznej w trybie ostrym (33). Tylko 30% guzów jajnika to nowotwory złośliwe. Wśród nich na pierwszym miejscu spotykane są potworniaki niedojrzałe – 12%, guz pęcherzyka żółtkowego 10%, rozrodczak 5%, rak zarodkowy i kosmówczak 1% (33, 34, 35).

C. Złośliwe guzy germinalne jądra

Ze względu na szczególną lokalizację ujawniają się bardzo szybko niebolesnym powiększeniem jądra. W 20% towarzyszy im wodniak jądra i w 20% przepuklina pachwinowa (6).

Najczęstszym złośliwym guzem zarodkowym jest yolk sac tumor – stanowiący 67% wszystkich guzów spotykanych w gonadach męskich. Rzadziej występujące to potworniaki i guzy mieszane (36, 37).

4. Rozpoznanie złośliwych guzów germinalnych

Opiera się na wywiadzie, dokładnym badaniu fizykalnym, badaniach laboratoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem oznaczenia poziomu alfafetoproteiny i betagonadotropiny kosmówkowej oraz badaniach obrazowych. Ostatnim etapem w ustaleniu rozpoznania jest badanie histopatologiczne. Należy jednak podkreślić, że w przypadku tzw. guzów wydzielających możliwe jest rozpoczęcie leczenia bez badania histopatologicznego, co jest swoistym ewenementem w onkologii dziecięcej (6, 27).

Badania laboratoryjne w złośliwych guzach germinalnych są zwykle niespecyficzne. Może występować niedokrwistość, podwyższony OB, białka

ostrej fazy (CRP), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych (w przypadku zajęcia wątroby), czy zmiany w badaniu ogólnym moczu o charakterze proteinurii (w przypadku ucisku na drogi moczowe przez guz). Nierzadko jednak nie stwierdza się żadnych odchyłeń w podstawowych badaniach laboratoryjnych u dzieci z zaawansowaną chorobą (6).

Bardzo istotne znaczenie mają badania obrazowe, które pozwalają na dokładne określenie wielkości, położenia, stosunku do sąsiadujących struktur anatomicznych guza. Wśród badań obrazowych na szczególną uwagę zasługuje badanie usg jako tanie, szybkie, łatwo dostępne, nieinwazyjne. Jednocześnie pozwala ono na dość precyzyjne uwidocznienie większości złośliwych guzów zarodkowych o lokalizacji dostępnej dla badania ultrasonograficznego.

Wynik badania USG powinien być jednak poparty innym badaniem obrazowym – najczęściej tomografią komputerową. Dla ustalenia stanu zaawansowania klinicznego konieczne jest także wykonanie badań obrazowych płuc, jamy brzusznej, a w wybranych przypadkach także CUN i kości.

W diagnostyce złośliwych guzów zarodkowych kapitalne znaczenie ma oznaczenie poziomu alfafetoproteiny (AFP) i betagonadotropiny kosmówkowej (beta HCG), które są swoistym markerem dla niektórych guzów germinalnych. Podwyższony poziom AFP jest charakterystyczny dla yolk sac tumor, lub guzów mieszanych zawierających komponentę guza pęcherzyka żółtkowego(38). Wysoka aktywność beta HCG jest typowa dla guzów zawierających komponentę chorioncarcinoma (39). Guzy w którym stwierdza się podwyższenie jednego lub obu markerów w surowicy określa się jako guzy wydzielające. W przypadku

guzów wydzielających oznaczenie AFP lub HCG jest pomocne nie tylko dla ustalenia rozpoznania, ale także dla monitorowania leczenia (6). Należy podkreślić, że w przypadku podwyższonego poziomu markerów nowotworowych przy ewidentnych objawach klinicznych można odstąpić od biopsji operacyjnej guza i rozpocząć leczenie bez badania histopatologicznego (6, 26, 27).

5. Leczenie złośliwych guzów germinalnych

Leczenie złośliwych guzów germinalnych jest skojarzone i obejmuje zabieg chirurgiczny oraz wielolekową chemioterapię.

Pierwotny zabieg operacyjny ma za zadanie usunięcie guza oraz ustalenie rozpoznania histopatologicznego. Jeżeli radykalne usunięcie nowotworu jest zbyt okaleczające lub niemożliwe chirurg ogranicza się do biopsji operacyjnej (27). Celem wtórnego lub odroczonego zabiegu operacyjnego jest usunięcie masy resztkowej po chemioterapii. W pewnych przypadkach guzów o niskim stopniu zaawansowania klinicznego radykalny pierwotny zabieg operacyjny stanowi ostateczne leczenie. W większości przypadków stosowana jest pooperacyjna chemioterapia.

Wprowadzenie wielolekowej chemioterapii w latach 60 ubiegłego stulecia znacznie poprawiło rokowanie w złośliwych guzach germinalnych. Wysoki, przekraczający 40% odsetek wznów w tych nowotworach, przesądzający o złym rokowaniu utrzymywał się do lat 80, kiedy to do leczenia wprowadzono bleomycynę, a przede wszystkim cisplatynę (40, 41).

Dotychczas stosowano w leczeniu różnorodne protokoły lecznicze takie jak TGM 90, Makei 89, VACA, BEP (42, 43, 44, 45). Od 95 roku wiele krajów europejskich przyjęło program leczenia zaproponowany przez Francuskie Towarzystwo Onkologii Dziecięcej (SFOP) – TGM 95. Polska Pediatryczna Grupa Leczenia Guzów Litych wprowadziła protokół TGM 95 w 98 roku.

Główne założenia strategii leczniczej tego programu oparte są na stratyfikacji leczenia w zależności od rozpoznania histopatologicznego oraz grupy ryzyka (46, 47) Rozrodczaki i tzw. czyste nasieniaki oraz pozostałe nienasieniakowate złośliwe guzy germinalne mają różne schematy terapeutyczne (6).

Podział na grupy HR (ryzyko wysokie) i SR (ryzyko standardowe) ustalany jest w zależności od wyjściowego poziomu AFP (w przypadku guzów wydzielających) oraz stopnia zaawansowania klinicznego wyjściowego (Tabela 3.) i pooperacyjnego (Tabela 4.).

Chemioterapię stosuje się po pierwotnym radykalnym, bądź nieradykalnym zabiegu chirurgicznym. Jest ona uzależniona od stopnia zaawansowania klinicznego. W stanach zaawansowanych w przypadku, gdy pierwotny zabieg operacyjny jest niemożliwy stosowana jest chemioterapia wstępna, a następnie wykonuje się zabieg chirurgiczny odroczone. Takie postępowanie doprowadziło do znacznej poprawy wyników leczenia w stadiach zaawansowanych (46).

Radioterapia ma niewielkie znaczenie w leczeniu złośliwych guzów germinalnych. Znajduje ona zastosowanie w pewnych przypadkach tzw. guzów nasieniakowatych (6)

Tabela 3. Zaawansowanie kliniczne złośliwych guzów germinalnych przed zabiegiem

Stadium I	<ul style="list-style-type: none"> • Guz < 5 cm ograniczony do narządu wyjściowego • Bez zajęcia węzłów chłonnych • Bez przerzutów
Stadium II	<ul style="list-style-type: none"> • Guz > 5cm • Bez zajęcia węzłów chłonnych • Bez przerzutów
Stadium III A	<ul style="list-style-type: none"> • Guz niezależnie od rozmiarów zlokalizowany w narządzie wyjściowym • Z zajęciem regionalnych węzłów chłonnych • Bez przerzutów
Stadium III B	<ul style="list-style-type: none"> • Guz niezależnie od rozmiarów • Progresja miejscowa (zajęcie otrzewnej, wysięk nowotworowy) • Obecność / brak zajęcia węzłów chłonnych • Bez przerzutów
Stadium IV	<ul style="list-style-type: none"> • Guz niezależnie od rozmiarów • Obecność lub brak progresji miejscowej • Obecność lub brak zajęcia węzłów chłonnych • Obecność przerzutów

Tabela 4. Zaawansowanie kliniczne złośliwych guzów germinalnych po zabiegu operacyjnym (stadium pS)

Stadium pS I	<ul style="list-style-type: none"> • Guz bez progresji regionalnej, usunięty w całości, bez przerzutów odległych
Stadium pS II	<ul style="list-style-type: none"> • Guz z progresją regionalną, obecność lub brak zajęcia węzłów chłonnych, • Zmiana usunięta w całości, bez odległych przerzutów
Stadium pS III	<ul style="list-style-type: none"> • Guz z progresją regionalną nie usunięty w całości, bez odległych przerzutów
Stadium pS III A	<ul style="list-style-type: none"> • Z pozostałością mikroskopową po zabiegu
Stadium pS III B	<ul style="list-style-type: none"> • Z pozostałością makroskopową po zabiegu
Stadium pS IV	<ul style="list-style-type: none"> • Przerzuty odległe

6. Rokowanie

Obecnie wyniki leczenia guzów zarodkowych są dobre zwłaszcza w niezaawansowanych stadiach klinicznych (I i II) – chorzy mają ponad 90% szansę wyleczenia. Gorsze rokowanie dotyczy pacjentów z III i IV stopniem zaawansowania klinicznego i wynosi 60% całkowitych wyleczeń. Ze względu na wysoką skuteczność chemioterapii nie obserwuje się znamienych różnic w wynikach leczenia i rokowaniu między grupą III i IV (46).

Czynniki rokownicze

Na podstawie licznych badań wieloośrodkowych wyodrębniono następujące czynniki rokownicze w złośliwych guzach germinalnych u dzieci (48):

- stadium zaawansowania – regionalne lub uogólnione
- pierwotna chemooporność nowotworu
- nieradykalność zabiegu operacyjnego
- budowę histologiczną – obecność struktur raka zarodkowego lub guza pęcherzyka żółtkowego
- lokalizacja pozagonadalna

W badaniach wcześniejszych jako czynnik prognostyczny podawano także wysoki $> 15\ 000$ ng/l poziom alfa fetoproteiny. Ze względu na odpowiednio dobrany, agresywniejszy schemat leczenia w tej grupie chorych uzyskano wyniki porównywalne do uzyskiwanych w grupie z niższym poziomem AFP (47).

II. Angiogeneza

1. Definicja

Powstawanie nowych naczyń krwionośnych zachodzi w organizmie na drodze dwóch procesów: waskulogenezy i angiogenezy.

Waskulogenezą określamy proces powstawania naczyń krwionośnych z wyspecjalizowanych komórek pochodzenia mezenchymalnego – angioblastów w okresie embrionalnym (49).

Angioblasty są komórkami bipotencjalnymi – są prekursorami zarówno dla komórek linii hematopoetycznej jak i endotelialnej.

Angiogeneza to proces tworzenia nowych naczyń z komórek śródbłonna już istniejących kapilarów zachodzący w dojrzałych tkankach. Angiogeneza zachodzić może w procesach fizjologicznych takich jak: wzrost organizmu, odkładanie tkanki tłuszczowej, przerost mięśni pod wpływem wysiłku fizycznego, rozwój ciała żółtego, laktacja, rozwój łożyska (50, 51, 52).

Znacznie częściej do angiogenezy dochodzi w stanach chorobowych.

W tabeli 5 wyszczególniono choroby, w których dochodzi do aktywacji angiogenezy. Należy podkreślić, że w niektórych stanach angiogeneza jest zjawiskiem korzystnym. Przykładem może być tworzenie nowych naczyń – tzw. krążenia obocznego w mięśniu sercowym po zawale, umożliwiające dalsze funkcjonowanie narządu, mimo zamknięcia naczynia wieńcowego (51).

Tabela 5. Najważniejsze stany chorobowe, w których dochodzi do aktywacji angiogenezy (53).

Grupa chorób	Przykłady
<ul style="list-style-type: none">• Choroby, w których dochodzi do niedotlenienia tkanek	<ul style="list-style-type: none">• Zawał mięśnia sercowego, cukrzyca i retinopatia cukrzycowa
<ul style="list-style-type: none">• Choroby przebiegające z gojeniem, regeneracją lub przerostem tkanek	<ul style="list-style-type: none">• Oparzenia, opóźnione gojenie ran, przerost bliznowaty, przerost mięśnia sercowego, marskość wątroby
<ul style="list-style-type: none">• Choroby zapalne naczyń	<ul style="list-style-type: none">• Choroby autoimmunologiczne: zapalenie stawów, zapalenia jelit, autoagresywne zapalenie wątroby, choroby zapalne tkanki łącznej
<ul style="list-style-type: none">• Choroby rozrostowe	<ul style="list-style-type: none">• Nowotwory łagodne i złośliwe, naczylniaki, zespół Kasabacha-Merrita

2. Etapy angiogenezy

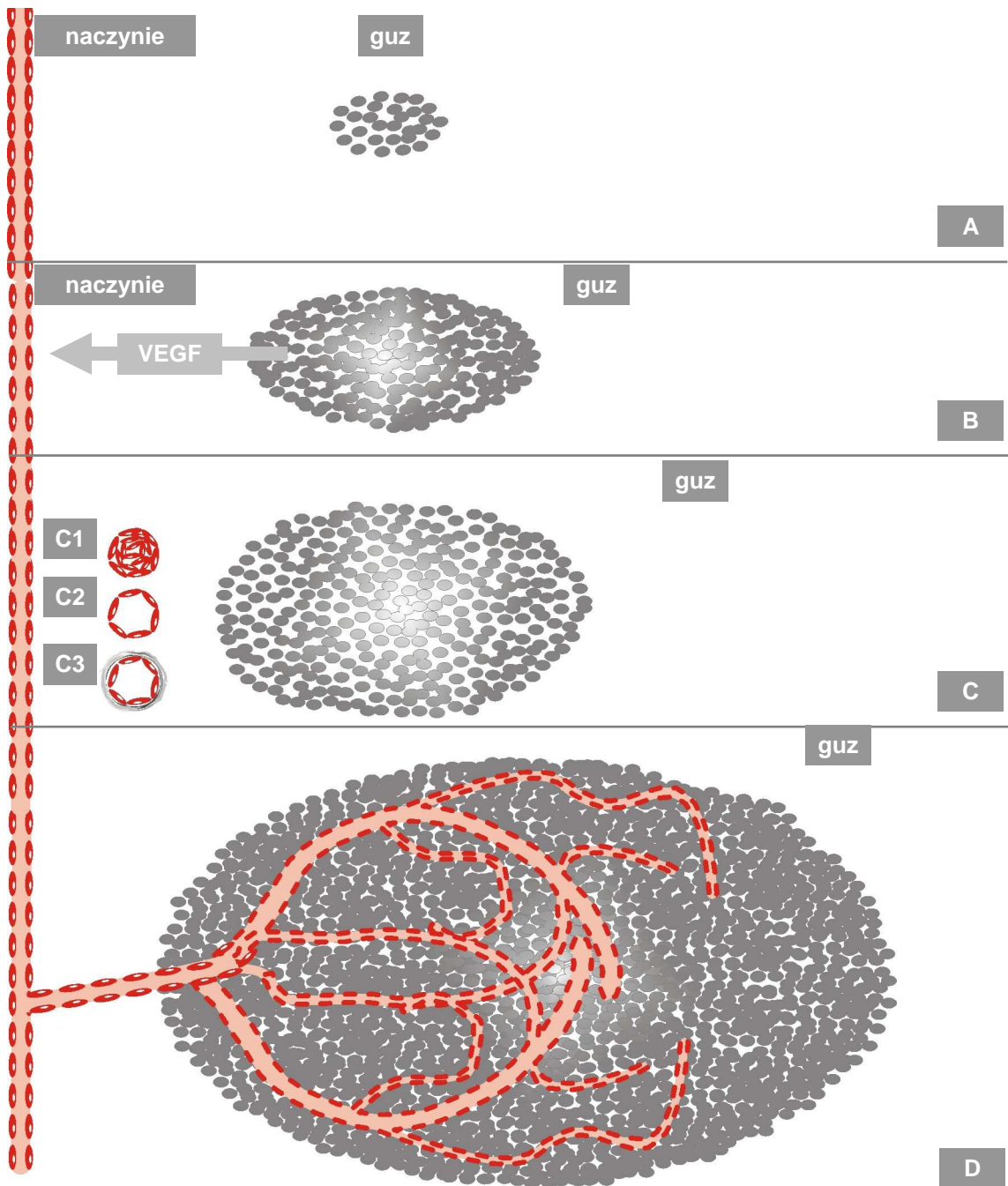
Dla lepszego zrozumienia angiogenezy wyszczególniono następujące etapy tworzenia naczyń z już istniejących kapilarów:

- przerwanie ciągłości błony podstawnej istniejących naczyń włosowatych
- migracja komórek śródbłonna
- proliferacja komórek śródbłonna
- tworzenie błony podstawnej nowego naczynia

Poszczególne etapy procesu tworzenia naczyń przedstawiono na rycinie 3.

Angiogeneza jest złożonym wieloetapowym procesem, w którym biorą udział liczne cytokiny i enzymy. Pierwszym etapem inicjującym angiogenezę jest przerwanie ciągłości błony podstawnej istniejących naczyń włosowatych (54). Dochodzi do tego pod wpływem metaloproteinaz: kolagenazy, żelatynazy i stromielizyny, które znajdują się w formie nieaktywnej w macierzy międzykomórkowej, a także metaloproteinaz błonowych (55).

Rycina 3. Etapy angiogenezy



A. Faza beznacyniowa – przedinwazyjna nowotworu: Guz o średnicy poniżej 2 mm odżywiany na drodze dyfuzji substancji z sąsiadującego naczynia. Komórki śródbłonna naczyń pozostają w spoczynku

B. Zapoczątkowanie angiogenezy: Niedotlenione komórki guza wytwarzają VEGF pod wpływem którego dochodzi wzrostu przepuszczalności naczyń oraz do pobudzenia komórek śródbłonna naczyń.

C. Migracja i proliferacja komórek śródbłonna naczyń. Wytwarzanie skupisk komórek śródbłonna naczyń (C1), powstawanie światła w ich obrębie – kanalizacja (C2). Wytwarzanie błony podstawnej nowych naczyń (C3)

D. Wytworzenie sieci naczyń zaopatrujących guz. Nowotwór uzyskał warunki dla dalszego wzrostu i tworzenia przerzutów

Metaloproteinazy należą do endopeptydaz związanych z atomami cynku, który pełni rolę katalizatora (56). Innym enzymem biorącym udział w rozluźnieniu struktury błony podstawnej jest heparynaza. Do aktywacji nieczynnych proenzymów dochodzi pod wpływem różnych sygnałów. Najczęściej są to cytokiny lub czynniki wzrostowe powodujące aktywację plazminogenu, który z kolei aktywuje metaloproteinazy i heparynazę (56, 57).

Zmniejszenie szczelności błony podstawnej naczyń umożliwia zajście kolejnego etapu angiogenezy – migracji i proliferacji komórek śródbłonka, które w warunkach prawidłowych pozostają w stanie spoczynku. W etap ten zaangażowane są również liczne cytokiny i czynniki wzrostowe. Do najważniejszych z nich należy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF).

Migrujące w kierunku nowotworu komórki śródbłonka, dzięki przyleganiu do siebie, a także adhezji do białek macierzy pozakomórkowej tworzą struktury przestrzenne, które ulegają rekanalizacji. Ostatnim etapem angiogenezy jest tworzenie błony podstawnej naczynia z fibronektyny, lamininy, kolagenu IV typu i proteoglikanów (58, 59).

3. Angiogeneza nowotworowa

Początki badań nad angiogenezą nowotworową sięgają pierwszych lat dwudziestego wieku, kiedy to Goldman stwierdził oczywisty obecnie fakt, że guzy nowotworowe mają własne unaczynienie (60). Po raz pierwszy terminu angiogeneza użyto w latach sześćdziesiątych (61). Jednak epokowym momentem

w badaniach nad rozwojem naczyń nowotworowych była praca Folkmana z 1971 roku, w której stwierdził on, że nowotwór nie może rozwijać się bez własnego unaczynienia (tumor is angiogenesis dependent) (7). Wykazał także, że faza beznacyniowa rozwoju nowotworu jest możliwa, gdy jego rozmiary nie przekraczają średnicy 2 mm. Judah Folkman uważany jest za pioniera i mistrza badań nad angiogenezą, a wspomniana praca z 1971 roku cytowana jest przez wszystkich badaczy zajmujących się tym zagadnieniem.

Początkowo zakładano, że komórki nowotworu wydzielają substancje, stymulujące rozwój naczyń, które określano jako „tumor angiogenesis factor” (TAF) (62, 63). Dopiero lata dziewięćdziesiąte ubiegłego stulecia przyniosły znaczny postęp wiedzy zarówno na temat czynników wzrostowych i cytokin proangiogennych, ich wzajemnych powiązań jak i molekularnego podłoża angiogenezy nowotworowej. Powstało też coraz więcej badań dotyczących terapii antyangiogennej.

Angiogeneza jest nierozzerwalnie związana z procesem nowotworowym. Jest warunkiem koniecznym, choć niewystarczającym dla rozwoju nowotworu. Wymieniana jest jako jedna z sześciu cech fenotypu nowotworu złośliwego (64).

W angiogenezie nowotworowej wyróżniamy analogiczne etapy i mechanizmy jak w innych stanach patologicznych przebiegających ze wzmożoną waskularyzacją. Wspólny jest też główny czynnik indukujący, którym jest niedotlenienie (65, 66). Intensywnie namnażające się komórki nowotworu tworzą guzek, który od obwodu odżywiany jest drogą naczyń istniejących w zdrowej tkance. Gdy jego średnica przekracza 1-2 mm, co odpowiada liczbie około

miliona komórek, odżywienie tą drogą jest niewystarczające i dochodzi do niedotlenienia, zwłaszcza centralnej części nowotworu.

Hypoksja tkanki nowotworowej prowadzi do zwiększonej produkcji VEGF, który jest najsilniejszym stymulatorem angiogenezy (67). Mechanizm powstawania nowych naczyń pod wpływem niedotlenienia ma miejsce zarówno w stanach fizjologicznych i patologicznych. Przykładem może być fizjologiczny przerost mięśni pod wpływem treningu fizycznego (51). Najbardziej spektakularnym przykładem patologii, w której dochodzi do indukcji angiogenezy pod wpływem niedotlenienia jest zawał mięśnia sercowego. W obu tych przypadkach powstanie nowych naczyń jest zjawiskiem korzystnym, bo zapewnia właściwe lub lepsze utlenowanie tkanek.

Inaczej przedstawia się sprawa w przypadku angiogenezy nowotworowej, która wprawdzie korzystna dla nowotworu, dla organizmu gospodarza ma skutki negatywne. Aktywacja VEGF pod wpływem hypoksji wynika z powinowactwa substancji, które powstają w tkance niedotlenionej – tzw. HIF (hypoxia induced factors) do regionu promotora genu VEGF, co powoduje transkrypcję i syntezę produktu białkowego genu (67).

Drugim bardzo istotnym mechanizmem indukcji neoangiogenezy jest aktywacja czynników proangiogennych i hamowanie czynników antyangiogennych pod wpływem zmian jakie dochodzą w genach supresorowych i onkogenach doprowadzając do powstania tzw. fenotypu angiogennego (68, 69, 70).

Dotychczas udowodniono wiele powiązań między genami odpowiedzialnymi za onkogenezę i ich produktami białkowymi a genami kodującymi czynniki

proangiogenne i inhibitory angiogenezy. Najlepiej poznanym przykładem takich zależności jest mutacja genu supresorowego p-53, odpowiedzialna za rozwój wielu nowotworów.

Obecność produktu zmutowanego genu p-53 powoduje aktywację genu VEGF oraz zahamowanie genu trombospondyny-1, która jest silnym inhibitorem angiogenezy (68, 69).

Podobne zależności udowodniono pomiędzy innymi genami proliferacyjnymi (onkogenami) a cytokinami i czynnikami wzrostowymi biorącymi udział w angiogenezie – najważniejsze z nich przedstawiono w tabeli 6 i 7 (70, 71).

Tabela 6. Najważniejsze onkogeny aktywujące angiogenezę poprzez zwiększenie ekspresji cytokin proangiogennych

Nazwa onkogenu	Działanie jakie wywołuje jego aktywacja
Onkogeny grupy raf	Stymuluje VEGF
Onkogeny grupy ras: K-ras, H- ras	Stymulują VEGF, TGF alfa, TGF beta
HER 2	Stymuluje VEGF
EGFR	Stymuluje VEGF, b FGF, IL-8
PTTG1	Stymuluje VEGF i b FGF
HPV-16	Stymuluje VEGF i IFN-alfa
v-src	Stymuluje VEGF

Tabela 7. Najważniejsze onkogeny aktywujące angiogenezę poprzez zmniejszenie ekspresji inhibitorów angiogenezy

Nazwa onkogenu	Wpływ na inhibitory angiogenezy
Onkogeny grupy ras	Hamują trombospondynę –1
c-myc	Hamuje trombospondynę -2
v-src	Hamuje trombospondynę- 1
Py MT	Hamuje trombospondynę- 1

Naczynia powstałe na drodze angiogenezy nowotworowej różnią się zarówno pod względem morfologicznym jak i biochemicznym. Mają one wiele nietypowych połączeń, rozgałęzień, odstępy między komórkami śródbłonka są większe niż w prawidłowych naczyniach (71). W błonie podstawnej tych naczyń występuje więcej kwasu hialuronowego, a mniej proteoglikanu heparano-siarczanowego.

Komórki śródbłonka naczyń nowotworowych zawierają ponadto niespotykane gdzie indziej białko endoglinę, która ułatwia wiązanie TGF beta (71). Ponadto w wzrasta w nich ilość perlekanu – proteoglikanu ułatwiającego wiązanie z innym stymulatorem angiogenezy – zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (72).

Na powierzchni śródbłonka kapilarów nowotworowych znajdują się w dużych ilościach receptory dla VEGF: flt1, KDR-flk-1 umożliwiające jego wiązanie i aktywność biologiczną (71).

4. Czynniki stymulujące angiogenezę

Dotychczas poznano około 20 cytokin o działaniu stymulującym angiogenezę. Najważniejsze z nich wymieniono w tabeli 8 (71, 73, 74)

Poza bezpośrednim wpływem cytokin na poszczególne etapy angiogenezy mogą one pobudzać ekspresję innych czynników proangiogennych lub dzięki aktywności proteolitycznej aktywować je.

Tabela 8. Czynniki stymulujące proces powstawania naczyń i mechanizm ich działania

Cytokiny proangiogenne	Wpływ na poszczególne etapy angiogenezy			Źródło cytokin proangiogennych
	Indukcja enzymów proteolitycznych	Migracja komórek	Proliferacja	
VEGF	+	+	+	Komórki nowotworu, śródbłonek, fibroblasty, makrofagi
.b FGF	+	+	+	Komórki nowotworu, śródbłonek, fibroblasty, macierz pozakomórkowa
TGF alfa	+		+	Komórki nowotworu, fibroblasty, makrofagi macierz pozakomórkowa
TGF beta			+	Komórki nowotworu, fibroblasty, makrofagi macierz pozakomórkowa
PD- ECGF		+	+	Płytki
TNF alfa	+	+	-	Komórki nowotworu, fibroblasty, makrofagi
a FGF	+	+	+	Komórki nowotworu, śródbłonek, fibroblasty, macierz pozakomórkowa
EGF	+		+	Macierz pozakomórkowa (?)
IL 8		+	+	Komórki nowotworu, śródbłonek, fibroblasty, makrofagi

VEGF: czynnik wzrostu śródbłonna naczyni, vascular endothelial growth factor

b FGF: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

a FGF: kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów

TGF: transformujący czynnik wzrostu

PD-ECGF: śródbłonkowy czynnik wzrostu pochodzący z płytek

TNF: czynnik nekrozy nowotworów

EGF: naskórkowy czynnik wzrostu

IL- 8: interleukina 8

5. Czynniki wzrostu śródbłonnka naczyń – VEGF

Najsilniejszą cytokiną proangiogenną, jedyną spośród wielu stymulatorów angiogenezy, który spełnia kryteria swoistego czynnika proangiogenego jest czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń – VEGF (75).

Działa on bowiem swoiście na komórki śródbłonnka, na śródbłonku znajdują się receptory dla VEGF, zanik VEGF hamuje angiogenezę. VEGF został odkryty w 1983 roku, początkowo określany jako VPF (vascular permeability factor)-czynnik przepuszczalności naczyń (76). Wcześniej zakładano istnienie bliżej nieokreślonej substancji, pobudzającej waskularyzację, które określano jako TAF- tumor angiogenesis factor (62, 63). W 1989 określono dokładnie budowę VEGF (77). Czynniki wzrostu śródbłonnka naczyń jest białkiem z rodziny czynników wzrostowych pochodzących z płytek. Jest najbardziej zbliżony budową do łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF) (78).

Aktywność VEGF ujawnia się po połączeniu z receptorami, zlokalizowanymi na śródbłonku naczyń. Dotychczas dobrze poznane są 2 typy receptorów wiążących VEGF. Zawierają one domenę z kinazą tyrozynową (KDR- kinase domain receptors) KDR/flk-1 i flt-1 (79). Związanie VEGF z receptorami KDR/ flk- 1 i flt-1 rozpoczyna przekazanie sygnału mitogennego i w rezultacie prowadzi do podziałów i proliferacji komórek śródbłonnka. Połączenie z receptorem KDR- flk-1 powoduje dodatkowo zmianę morfologii komórek śródbłonnka oraz ich migrację (80). Istnieje 6 izoform białka VEGF, którym przypisywane są różne funkcje biologiczne (81).

Gen czynnika VEGF zlokalizowany jest w chromosomie 6 (82).

Najważniejsze mechanizmy pobudzające wytwarzanie VEGF przez komórki nowotworowe to:

- niedotlenienie
- mutacje genów proliferacyjnych (onkogenów).
- wpływ innych cytokin proangiogennych

Pod wpływem niedotlenienia dochodzi do powstania czynników HIF (hypoxia induced factors), które wiążą się z rejonem promotora genu VEGF, powodując jego transkrypcję (83). Wykazano, że ekspresja VEGF zwiększa się nawet 50-krotnie w hodowlach tkankowych w atmosferze 0-3% tlenu w stosunku do hodowli w atmosferze 21% tlenu (84).

Ekspresja VEGF zwiększa się także pod wpływem mutacji onkogenów. Najbardziej znanym przykładem takiej zależności jest związek pomiędzy mutacją genu p-53 a wytwarzaniem VEGF. Wykazano, że prawidłowe białko p-53 hamuje ekspresję VEGF w hodowli komórek nerki płodu ludzkiego transformowanych adenowirusem (69). Znane są też interakcje między czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyń a innymi onkogenami – grupy ras, raf, src oraz molekularne mechanizmy tych zależności (78).

Do cytokin proangiogennych, które indukuje VEGF należą PDGF (platelet derived growth factor), TGF (tumor growth factor) alfa i beta, bFGF (basic fibroblast growth factor) (71).

Fizjologicznie prawidłowa synteza VEGF ma miejsce w trakcie embriogenezy. Występowanie VEGF zaobserwowano także w dojrzałym organizmie – przede wszystkim w gruczołach wydzielania wewnętrznego, a także w kłębuszkach nerkowych, pęcherzykach płucnych oraz endometrium i ciałku żółtym (81). W większości nowotworów litych stwierdza się silną ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (11, 12, 13). Podobne zjawisko obserwowane jest także w liniach nowotworowych komórek krwiotwórczych (85).

Funkcje biologiczne VEGF są bardzo różnorodne. Jedną z ważniejszych jest wzrost przepuszczalności naczyń. Z tego względu czynnik wzrostu śródbłonka naczyń był początkowo określany jako czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń VPF (vascular permeability factor). VEGF zwiększa przepuszczalność naczyń 50 000 razy silniej niż histamina (76). Umożliwia to przenikanie białek krwi m.in. fibrynogenu oraz plazminogenu do przestrzeni pozanaczyniowej. Fibrynogen ulega przekształceniu w fibrynę, która stanowi rodzaj siateczki ułatwiającej osadzanie migrujących komórek śródbłonka (86). Plazminogen ulega aktywacji do plazminy, która poprzez swoje działanie proteolityczne aktywuje z kolei metaloproteinazy niszczące błony podstawne istniejących naczyń. Zwiększenie przepuszczalności naczyń umożliwia także przechodzenie komórek przede wszystkim makrofagów i płytek krwi, które poprzez wydzielane cytokiny proangiogenne stymulują angiogenezę (71). Ważną konsekwencją zwiększonej przepuszczalności naczyń jest zdolność komórek nowotworowych do przechodzenia do krwiobiegu i tworzenia odległych przerzutów (66).

Istotnym działaniem VEGF jest wybiórcze działanie mitogenne i chemotaktyczne w stosunku do komórek śródbłonna (81). Funkcje VEGF przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Wpływ czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) na poszczególne etapy angiogenezy

Mechanizm działania VEGF	Wpływ na angiogenezę
Zwiększenie przepuszczalności naczyń	Przenikanie fibrynogenu-tworzenia w przestrzeni pozanaczyniowej rusztowania dla komórek biorących udział w tworzeniu nowego naczynia
Zwiększenie przepuszczalności naczyń	Przenikanie plazminogenu- aktywacja metaloproteinaz – niszczenie błony podstawnej naczyń istniejących
Zwiększenie przepuszczalności naczyń	Przechodzenie makrofagów i płytek krwi- wydzielanie przez nie cytokin proangiogennych
Działanie chemotaktyczne	Migracja komórek śródbłonna w kierunku niedotlenionych, centralnych części nowotworu
Działanie mitogenne w stosunku do komórek śródbłonna	Tworzenie nowych pierwotnych kapilarów
Indukcja genów aktywatora plazminogenu	Aktywacja plazminogenu powoduje aktywację metaloproteinaz i niszczenie błony podstawnej naczyń na obwodzie guza
Indukcja ekspresji IL-6	Stymulacja makrofagów
Indukcja genów kodujących integryny	Tworzenie błony podstawnej nowych naczyń

Wykazano, że podanie przeciwciał przeciwko VEGF hamuje angiogenezę i rozwój nowotworu *in vivo*, co potwierdza ogromne znaczenie tej cytokiny w onkogenezie (87). Poza działaniem proangiogennym VEGF wywołuje dodatkowe działania promujące rozwój nowotworu. Przykładem jest aktywacja genów rodziny *bcl-2*, których produkty białkowe są inhibitorami apoptozy (88).

6. Zastosowanie terapii antyangiogennej w leczeniu nowotworów

Równocześnie z odkryciem znaczenia angiogenezy dla rozwoju nowotworów ponad 30 lat temu, Judah Folkman – pionier badań nad angiogenezą stawia następującą hipotezę: „Być może uda się nam powstrzymać rozrost guzów, gdy nie pozwolimy im na tworzenie własnych naczyń”

Badania nad odkryciem substancji angiogennych postępowały równolegle z badaniami nad samą angiogenezą. Znaczny postęp w opracowaniu strategii antyangiogennych osiągnięto dopiero w latach 90 tych, kiedy poznano dokładnie mediatory neowaskularyzacji i mechanizm ich działania.

Umożliwiło to opracowanie terapii celowanych, hamujących powstanie nowych naczyń w guzie nowotworowym. Przykładem może być przeciwciała monoklonalne przeciw najsilniejszemu stymulatorowi angiogenezy VEGF. Obecnie znanych jest ponad 20 substancji o działaniu antyangiogenym, które przechodzą kolejne fazy badań klinicznych.

Dotychczas wykorzystano następujące mechanizmy działania substancji anty-angiogennych:

Działanie bezpośrednie

I hamowanie proliferacji śródbłonek (taxol, herbimycyna, TNP-470, talidomid)

II hamowanie migracji komórek śródbłonek (linomid, genistenina)

Działanie pośrednie

(za pośrednictwem cytokin proangiogennych, inhibitorów angiogenezy oraz substancji współdziałających: enzymów proteolitycznych i cząsteczek adhezyjnych)

I hamowanie cytokin proangiogennych

A. wpływ hamujący na VEGF (przeciwciała monoklonalne przeciw VEGF

– bevacizumab, antagoniści receptorów dla VEGF np CP-574)

B. wpływ hamujący na bFGF (przeciwciała przeciw b- FGF)

II wpływ na inhibitory angiogenezy (wykorzystywanie rekombinowanych inhibitorów angiogenezy: angiostatyna i endostatyny, retinoidy)

III wpływ na cząsteczki adhezyjne, biorące udział w tworzeniu błony podstawnej (antagoniści integrin: cilengit, przeciwciała monoklonalne przeciw integrynom np. LM-609)

IV hamowanie enzymów proteolitycznych (inhibitory metaloproteinaz np. marimastat, prinomastat) (88, 89, 90)

7. Metody oceny angiogenezy

Wyróżniamy bezpośrednie i pośrednie metody oceny angiogenezy.

Metody bezpośrednie polegają na określeniu liczby naczyń w guzie nowotworowym (MVD – microvessel density). Dokonuje się tego za pomocą

badań immunohistochemicznych, przy użyciu przeciwciał przeciw antygenom specyficznym dla śródbłonków naczyń, do których należy antygen CD 34, CD 31 oraz czynnik von Willebrandta. Największą wadą tej metody jest jej bardzo duża subiektywność.

Do metod pośrednich oceny angiogenezy należy oznaczenie ekspresji cytokin angiogennych – przede wszystkim VEGF oraz b FGF w tkance nowotworowej oraz ich stężenia w płynach ustrojowych. Do nowszych metod, opartych na molekularnych podstawach tworzenia naczyń w nowotworach należy ocena stopnia ekspresji różnych receptorów – najczęściej flt-1 i flk-1.

Mimo rozwoju wiedzy na temat angiogenezy i opracowania coraz liczniejszych sposobów jej oceny nadal pozostają nierozstrzygnięte liczne kwestie – między innymi znaczenie stopnia angiogenezy jako cechy biologicznej złośliwości nowotworów.

Wobec niezbyt licznych publikacji na temat angiogenezy w nowotworach wieku rozwojowego oraz braku doniesień na temat angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci podjęto temat niniejszej pracy.

Cele pracy

Celem niniejszej pracy była:

- ocena gęstości naczyń mikrokrążenia w złośliwych guzach germinalnych u dzieci.
- ocena ekspresji VEGF w złośliwych guzach germinalnych u dzieci.
- ocena związku pomiędzy wynikami badanych parametrów a podstawowymi cechami klinicznymi, epidemiologicznymi i patomorfologicznymi złośliwych guzów germinalnych u dzieci.
- poszukiwanie korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

Pacjenci i metody

Badaną grupę stanowiło 47 pacjentów z rozpoznaniem złośliwych guzów germinalnych, leczonych w latach 1994-2004 w 9 ośrodkach klinicznych, współpracujących w ramach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych. Wykorzystano archiwalny materiał histopatologiczny pochodzący z pierwotnych zabiegów operacyjnych resekcji guza oraz z diagnostycznych biopsji operacyjnych. Dane kliniczne pochodziły z ankiet przesłanych z poszczególnych Ośrodków Klinicznych w ramach wieloośrodkowego badania kierowanego przez Klinikę Pediatrii Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Uzyskano pisemną zgodę Kierowników tych Ośrodków na wykorzystanie danych klinicznych pacjentów oraz preparatów histopatologicznych.

U pacjentów leczonych przed 98 rokiem stosowano różnorodne programy terapeutyczne. Pacjenci leczeni po roku 1998 leczeni byli zgodnie z programem diagnostyczno- terapeutycznym przyjętym przez Polską Pediatriczną Grupę ds. Leczenia Guzów Litych, opartym na francuskim programie TGM 95.

Wśród badanych pacjentów było 29 dziewczynek i 18 chłopców.

Wiek chorych zawierał się w przedziale od 1 miesiąca do 204 miesięcy. (mediana - 116 miesięcy). Czas obserwacji wynosił 2- 130 miesięcy (mediana- 72 miesiące).

Metody

Dane kliniczne:

Rozpoznanie złośliwego guza germinalnego ustalano na podstawie obrazu klinicznego, badań obrazowych, oznaczenia markerów nowotworowych (alfafetoproteiny, betagonadotropiny kosmówkowej) oraz badania histopatologicznego wycinka guza pobieranego w czasie diagnostycznej biopsji operacyjnej. Rozpoznanie stawiano zgodnie z obowiązującą klasyfikacją przyjętą przez Polską Grupę Pediatriczną ds. Leczenia Guzów Litych (Tabela 2)

Dane uzyskane z ankiet obejmowały:

- dane pacjenta (wiek w momencie zachorowania, płeć)
- rozpoznanie histopatologiczne,
- lokalizację guza
- obecność przerzutów i ich lokalizację
- stadium zaawansowania
- poziom markerów nowotworowych, w przypadku guzów wydzielających
- stosowane leczenie i jego przebieg

Z badanej grupy pacjentów wyłączono chorych, u których materiał histopatologiczny był niemiernodajny dla oceny angiogenezy – tzn. był zbyt skąpy lub zawierał zbyt dużą ilość martwicy.

Badaną grupę podzielono na podgrupy w zależności od:

- płci
- wieku
- rozpoznania histopatologicznego
- stadium zaawansowania klinicznego
- lokalizacji guza

Badania immunohistochemiczne

Uzyskane bloki parafinowe opracowane były uprzednio rutynowo poprzez utrwalenie materiału tkankowego w 4% formalinie przez 24-72 godziny, odwodnienie przy użyciu alkoholu etylowego, a następnie zatopienie w parafinie. Po skrojeniu bloków na skrawki grubości 4 μm poddano materiał rutynowemu barwieniu hematoksyliną i eozyną. Następnie dokonywano selekcji skrawków – wybierano zawierające żywe utkanie nowotworowe, bez martwicy.

Dla oceny ekspresji VEGF zastosowano poliklonalne przeciwciała królicze przeciw VEGF firmy Santa – Cruz (klon-A) reagujące z N końcowym fragmentem peptydowym ludzkiego śródbłonkowego czynnika wzrostu.

Do wyznakowania naczyń przy obliczaniu średniej gęstości naczyń w skrawkach (MVD) użyto monoklonalne przeciwciała mysie przeciw antygenowi CD34 firmy DAKO (klon QB End 10)

W obu badaniach antygeny odkrywano poprzez inkubację skrawków w buforze cytrynianowym w temperaturze 95 stopni. Następnie użyto przeciwciał wtórnych oraz kompleksu streptawidyna-peroksydaza (system LSAB, K 675, DAKO) dla wykrycia

kompleksów antygen-przeciwciała, a dla ich uwidocznienia zastosowano reakcję barwną wykorzystującą jako chromogen diaminobenzzydę (DAB).

Kontrola negatywna polegała na wykonaniu tej samej procedury z użyciem surowicy nieimmunizowanej myszy w miejsce przeciwciała pierwotnego.

Badania immunohistochemiczne wykonywano w Zakładzie Patomorfologii Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik Kliniki prof. dr hab. K.Jaśkiewicz)

Dla oznaczenia średniej gęstości naczyń w tkance nowotworowej wybierano miejsca o subiektywnie największej liczbie naczyń (tzw. „hot spots”) przy powiększeniu 40x, a następnie 100x zgodnie z procedurą opisywaną przez Weidnera (91) Następnie przy powiększeniu 200x, naczynia liczone „ręcznie” w 3 polach widzenia. Ocenę przeprowadziło 2 niezależnych badaczy, a z otrzymanych wyników wyliczano średnią arytmetyczną.

Stopień ekspresji VEGF oceniano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x na podstawie odsetka komórek immunoreaktywnych.

Dla oznaczenia obu parametrów użyto mikroskopu Olympus BX 50.

Różnice w badanych parametrach w poszczególnych grupach zbadano przy użyciu metod statystycznych.

Obliczenia statystyczne

Zgodność rozkładów badanych parametrów z rozkładem normalnym weryfikowano testem Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilieforsa.

Dla oceny różnicy rozkładów gęstości naczyniowej w poszczególnych grupach posłużono się testem U-Manna Whitneya w przypadku podziału na 2

grupy. W przypadku podziału na 3 i 5 grup posłużono się testem Kruskala-Wallisa. Ekspresję VEGF wyrażono w skali porządkowej, w związku z czym w testach statystycznych dokonano porównania mediany w poszczególnych grupach (92)

Zależności pomiędzy gęstością naczyniową a ekspresją VEGF weryfikowano przy użyciu współczynnika R Spearmana. Do analizy wykorzystywano program komputerowy Statistica 7.1. We wszystkich testach przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki:

Analiza badanej grupy

Badaną grupę 47 pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi stanowiło 29 dziewczynek (61,7%) i 18 chłopców (38,3%).

Badanie histopatologiczne 16 pacjentów wykazało guz pęcherzyka żółtkowego (yolk sac tumor), u 13 stwierdzano mieszany guz germinalny (tumor mixtus), u 5 rozpoznano raka embrionalnego (carcinoma embryonale), u 8 potworniaka niedojrzałego i złośliwego (teratoma immaturum et malignum), a u 5 rozrodzaka (dysgerminoma).

Cechy kliniczne oraz morfologiczne pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi w badanej grupie przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Podsumowanie danych klinicznych, epidemiologicznych i histopatologicznych badanej grupy.

Cecha	Podgrupy	n	%
Płeć	Dziewczynki	29	61,7
	Chłopcy	18	38,3
Rozpoznanie histopatologiczne	Yolk sac tumor	16	34,1
	Tumor mixtus	13	27,6
	Carcinoma embryonale	5	10,6
	Teratoma immaturum et malignum	8	17,1
	Dysgerminoma	5	10,6
Stadium zaawansowania	I	10	21,3
	II	17	36,2
	III	11	23,4
	IV	9	19,1
Obecność przerzutów	M1	9	19,1
	Mo	38	80,9
Lokalizacja	Jajnik	21	44,7
	Jądro	16	34,0
	Okolica krzyżowo-ogonowa i miednica mniejsza	10	21,3

Rodzaje zastosowanego leczenia podano w tabeli 11.

Tabela 11. Rodzaje terapii zastosowane u pacjentów z ZGG w badanej grupie

Rodzaj leczenia	Liczba pacjentów (%)
Pierwotny zabieg operacyjny	39 (82,9)
Biopsja operacyjna	8 (17,1)
Chemioterapia TGM95	29 (61,7)
Chemioterapia TGM90	4 (8,5)
Chemioterapia VAC	2 (4,2)
Chemioterapia – Makei	3 (6,4)
Inne rodzaje chemioterapii	4 (8,5)
Bez chemioterapii	5 (10,6)

TGM 95 – VBP: winblastyna 2 mg/m²/dobę – 2 dni, bleomycyna 15 mg/ m²/dobę – 2 dni, cisplatyna 100mg/ m²/dobę – 1 dzień, cykle co 21 dni
VIP: vepesid 75mg/ m²/dobę 5dni, ifosfamid 3g/ m²/dobę – 2 dni, cisplatyna 20mg/ m²/dobę – 5 dni, cykle co 21 dni

TGM 90 – winblastyna 3 mg/m²/dobę – 2 dni, bleomycyna 15 mg/ m²/dobę – 2 dni, naprzemiennie z: aktynomycyna D 15µg/ m²/dobę – 3 dni, Endoxan 500 mg/ m²/dobę – 3 dni, cykle co 21 dni

VAC – winkrystyna 3 mg/m²/dobę – 1 dzień, aktynomycyna D 14µg/ m²/dobę – 1 dzień, Endoxan 1000 mg/ m²/dobę – 1 dzień, cykle co 7 dni

MAKEI 89 – vepesid 100mg/ m²/dobę – 3 dni, cisplatyna 20mg/ m²/dobę – 5 dni, ifosfamid 1,5g/ m²/dobę – 5 dni, winblastyna 3 mg/m²/dobę – 2dni, bleomycyna 15 mg/ m²/dobę – 3 dni, cykle co 21 dni

W badanej grupie 5 pacjentów zmarło, w tym 4 pacjentów z powodu progresji choroby nowotworowej, a 1 z powodu posocznicy. Czas przeżycia wynosił 2-9 miesięcy od chwili rozpoznania. 3 pacjentów było leczonych przed 98 rokiem, 2 pacjentów leczonych zgodnie obowiązującym protokołem TGM95. Cechy kliniczne i histopatologiczne pacjentów, którzy zmarli przedstawiono w tabeli 12.

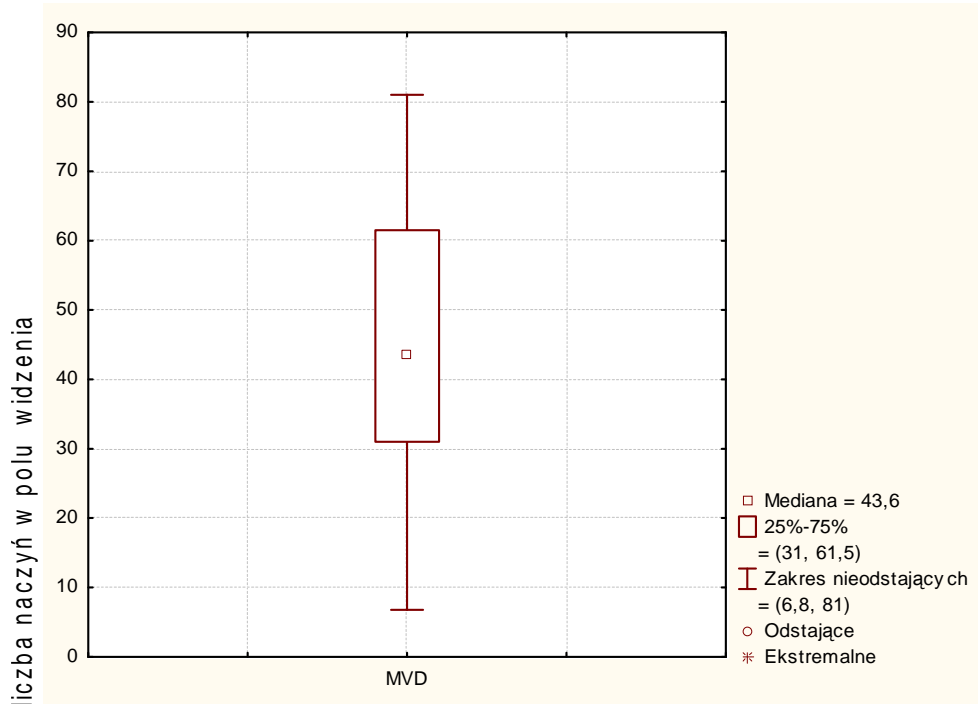
Tabela 12. Dane kliniczne, epidemiologiczne i histopatologiczne pacjentów, którzy zmarli

płeć	wiek (m-ce)	lokalizacja guza	stadium za-awansowania	rozpoznanie hist-pat
dziewczynka	1	krzyżowo-guziczna	2	TM
chłopiec	24	jądro	3b	YST
dziewczynka	34	krzyżowo-guziczna	2	GCTM
dziewczynka	159	krzyżowo-guziczna	3b	GCTM
chłopiec	13	krzyżowo-guziczna	3b	CA

Średnia gęstość naczyń – (microvessel density) – MVD

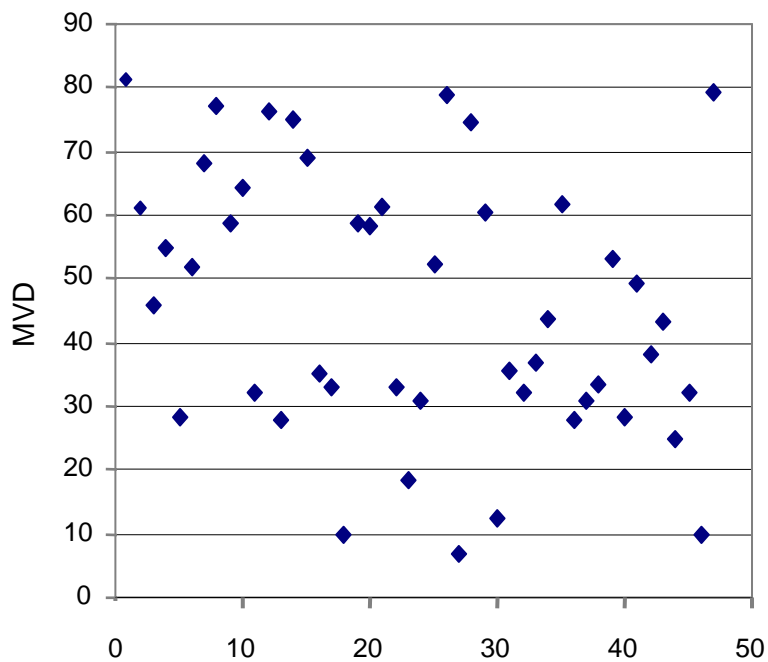
Na wstępie dokonano oceny średniej gęstości naczyń – MVD w preparatach histopatologicznych guzów germinalnych u wszystkich pacjentów w badanej grupie. Średnia gęstość naczyniowa wynosiła $45,9 \pm 20,6$ naczyń w polu widzenia (powierzchnia pola widzenia wynosiła $0,78 \text{ mm}^2$). Zakres wartości MVD mieścił się w przedziale 6,8-81,0 (mediana-43,6). Powyższe wartości przedstawiono na rycinie 4. Wartości średniej gęstości naczyń uzyskane u wszystkich pacjentów badanej grupy przedstawiono na rycinie 5.

Następnie porównano gęstość naczyń w preparatach histopatologicznych u pacjentów, u których stwierdzano przerzuty z pacjentami bez rozsianej postaci choroby. W grupie pacjentów bez przerzutów ($n=38$) MVD wyniosła $43,6 \pm 20,4$ (mediana 37,7). W grupie pacjentów, u których stwierdzano przerzuty ($n=9$) wartość ta była wyższa i wynosiła odpowiednio $55,8 + 19,6$ (mediana 53,3). Różnica nie była znamienna statystycznie ($p=0,10$). Rozkład gęstości naczyń w grupie z przerzutami (M1) i bez przerzutów (Mo) przedstawiono na rycinie 6.

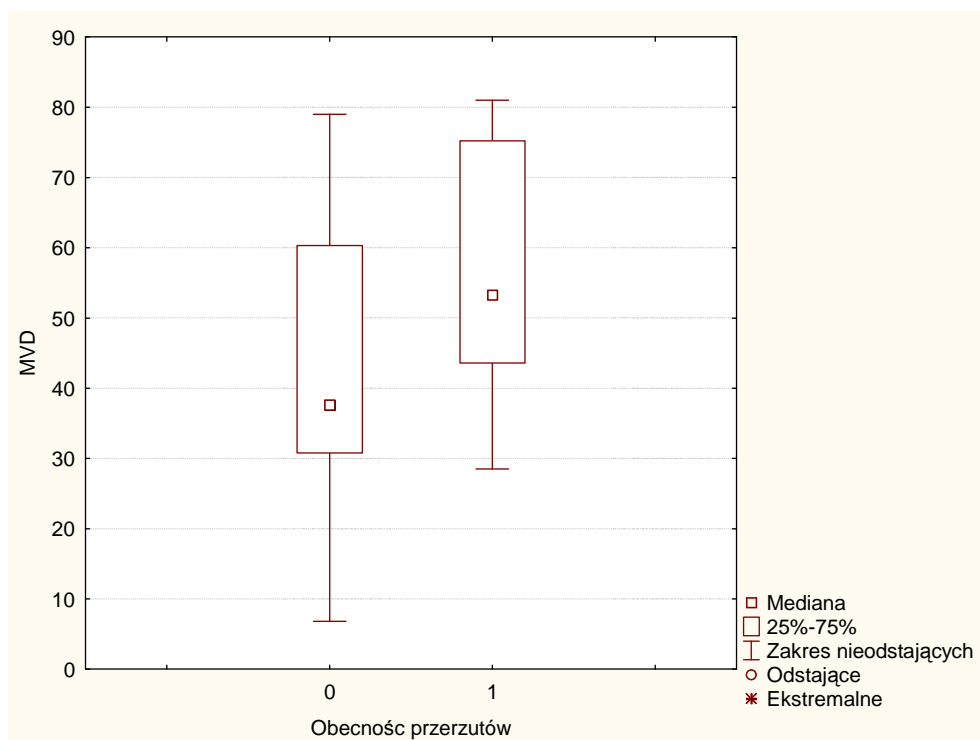


Rycina 4. Rozkład wartości gęstości naczyń MVD w całej badanej grupie

Wyniki średniej gęstości naczyń u wszystkich 47 pacjentów badanej grupy przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 5. Wartości gęstości naczyń u poszczególnych pacjentów w badanej grupie



Rycina 6. Rozkład gęstości naczyniowej – MVD w grupach pacjentów bez przerzutów M0 i z przerzutami M1,

Nie stwierdzono także znamiennej statystycznie różnicy gęstości naczyniowej w poszczególnych grupach różniących się płcią, stadium zaawansowania i budową histologiczną.

Uzyskane wartości średniej gęstości naczyniowej w tych grupach wraz z wartościami p przedstawiono w tabeli 13.

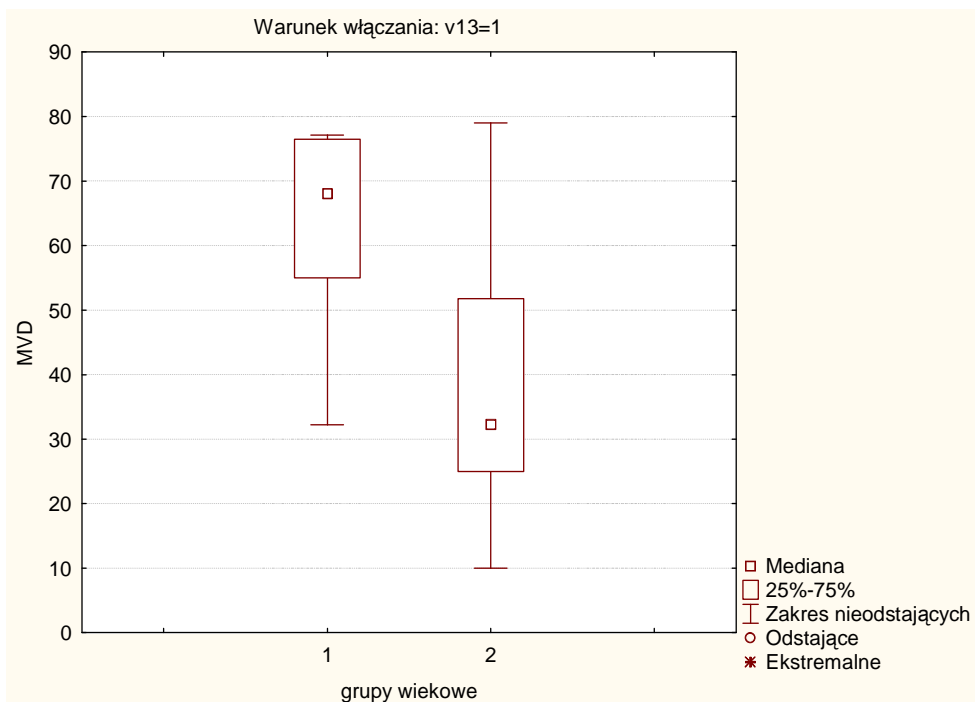
Znamienną statystycznie różnicę gęstości naczyniowej znaleziono natomiast pomiędzy grupami wiekowymi pacjentów. W grupie dzieci poniżej 3 lat parametr ten wynosił średnio 55,78 w porównaniu do 41,31 u dzieci starszych ($p=0,02$) Rozkład MVD w grupach wiekowych dzieci ze złośliwymi guzami germinalnymi poniżej i powyżej 36 miesięcy życia przedstawiono na rycinie 7.

Porównując średnią gęstość naczyń w złośliwych guzach germinalnych o różnych lokalizacjach znamioną statystycznie różnicę stwierdzono pomiędzy guzami jąder w porównaniu do guzów jajnika ($p=0,02$). Różnica pomiędzy guzami o lokalizacji jądrowej i krzyżowo-guzicznej podobnie jak pomiędzy guzami jajników i guzami okolicy krzyżowo-guzicznej nie była znamioną statystycznie. Rozkład gęstości naczyń w grupach pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi w poszczególnych lokalizacjach przedstawiono na rycinie 8.

Porównano także gęstość naczyń w grupach różniących się stopniem ekspresji VEGF. Podzielono pacjentów na grupy: z wysokim ($\geq 70\%$ komórek immunoreaktywnych) stopniem ekspresji czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF) i średnim stopniem ekspresji VEGF ($< 70\%$ komórek immunoreaktywnych)

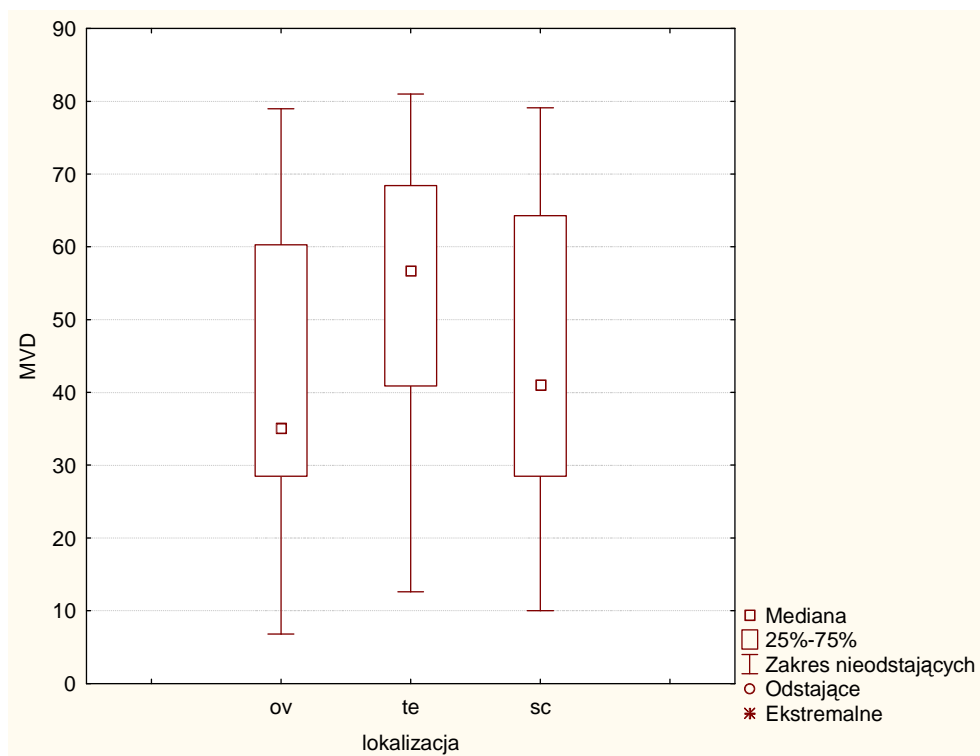
W grupie pacjentów z wysokim stopniem ekspresji czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF) MVD wynosiła $52,4 \pm 17,4$ (mediana 52,7). W grupie pacjentów ze średnim stopniem ekspresji VEGF średnia gęstość naczyń była niższa i wynosiła $37,9 \pm 21,7$ (mediana 32,8).

Stwierdzona różnica była statystycznie znamioną ($p=0,02$). Rozkład średniej gęstości naczyń w grupach różniących się stopniem ekspresji VEGF przedstawiono na rycinie 9.



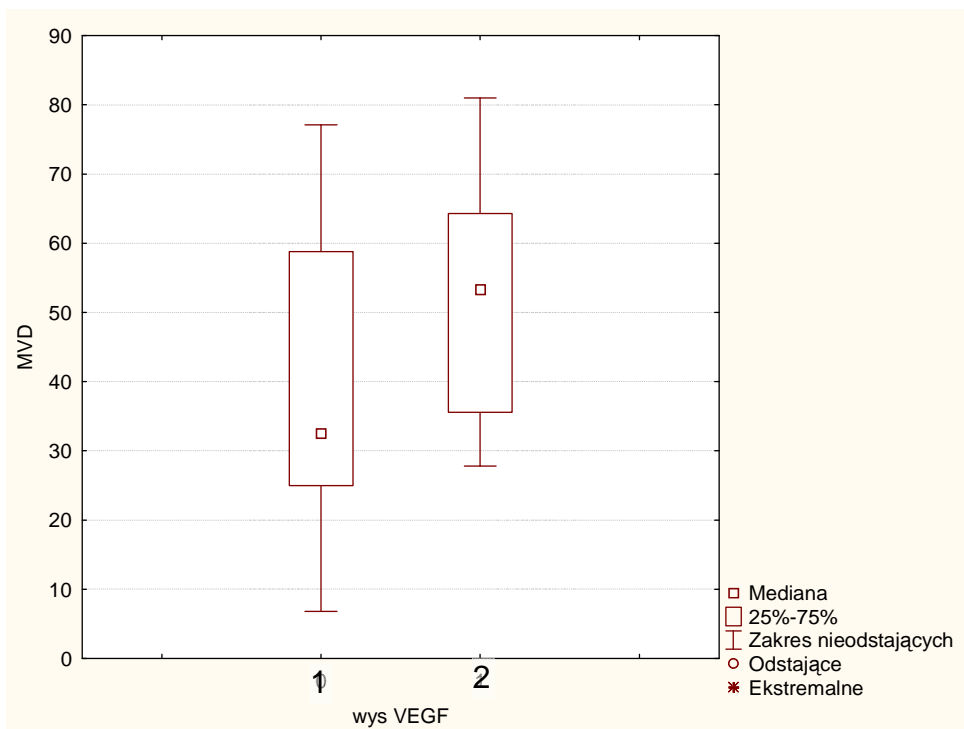
Rycina 7. Rozkład gęstości naczyniowej – MVD w grupach wiekowych pacjentów

Grupa 1 – dzieci młodsze – ≤ 3 lat, Grupa 2 – dzieci starsze – > 3 lat



Rycina 8. Rozkład gęstości naczyniowej – MVD w zależności od lokalizacji złośliwych

guzów germinalnych. Ov – jajnik, Te – jądro, Sc – okolica krzyżowo-guziczna



Rycina 9. Rozkład gęstości naczyniowej – MVD w grupach różniących się stopniem ekspresji VEGF;

1 – grupa pacjentów, u których stwierdzano stopień ekspresji < 70%

2 – grupa pacjentów, u których stwierdzano stopień ekspresji ≥ 70%

Tabela 13. Rozkład gęstości naczyniowej w poszczególnych podgrupach badanych dzieci ze złośliwymi guzami germinalnymi

Cecha	n	średnia	odch. standardowe	mediana	wartość p
Płeć					
Dziewczynki	29	42,00	21,29	35,10	0,07
Chłopcy	18	52,25	18,28	54,15	
Rozpoznanie histopatologiczne					
Yolk sac tumor	16	48,33	22,94	51,95	0,62
Tumor mixtus	13	38,66	16,86	43,50	
Carcinoma embryonale	5	46,26	31,62	30,80	
Teratoma immaturum et malignum	4	54,08	16,29	59,40	
Dysgerminoma	5	43,78	16,15	35,60	
Stadium zaawansowania					
I	10	50,62	19,27	56,75	0,15
II	17	38,09	20,45	32,30	
III	11	45,73	20,74	49,33	
IV	9	55,76	19,60	53,30	
Obecność przerzutów					
M1	9	55,76	19,61	53,30	0,10
Mo	38	43,60	20,40	37,65	
Lokalizacja					
Jajnik	21	40,41	19,93	35,10	0,13
Jądro	16	53,65	18,73	56,75	
Okolica krzyżowo-ogonowa i miednica mniejsza	10	45,14	22,93	41,07	
Lokalizacja					
Jajnik	21	40,41	19,93	35,10	0,04
Jądro	16	53,65	18,73	56,75	
Ekspresja VEGF					
Średni stopień ekspresji	22	37,43	21,28	32,55	0,02
Wysoki stopień ekspresji	25	53,40	17,13	53,30	
Wiek					
poniżej 36 m-cy	15+	55,78	58,80	19,54	0,02
Powyżej 36m-cy	32	41,31	35,35	19,71	

Przeanalizowano także wyniki średniej gęstości naczyniowej w grupie pacjentów, którzy zmarli. Wysokie wartości MVD (powyżej 43,6 naczyń w polu widzenia) stwierdzono u 3 pacjentów, w tym u 1, który zmarł z powodu posocznicy. Wyniki uzyskane u pacjentów tej grupy przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Wyniki średniej gęstości naczyń oraz cechy kliniczno-patologiczne w grupie pacjentów, którzy zmarli

płeć	wiek m-ce	lokalizacja guza	stadium zaawansowania	rozpoznanie histopat	przyczyna zgonu	MVD liczba naczyń na 0,78 mm ²
K	1	Sc	2	TM	posocznica	64,3
M	24	Te	3b	YST	progresja	32,25
K	34	Sc	2	GCTM	progresja	76,5
K	159	Sc	3b	GCTM	progresja	27,8
M	13	Sc	3b	CA	progresja	49,3

Na rycinie 12 i 13 przedstawiono mikroskopowy obraz wybranych wycinków złośliwych guzów germinalnych u pacjentów z badanej grupy, w których uwidoczniono naczynia przy użyciu opisanej metody.

Ekspresja VEGF

U wszystkich badanych pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi stwierdzono nasiloną ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń w tkance guza. Obecność VEGF uwidoczniono w cytoplazmie i/lub błonach komórek nowotworu. Ekspresja VEGF wyrażona została w skali porządkowej, z dokładnością 10%, na podstawie odsetka komórek immunoreaktywnych. Uzyskane wyniki zawierały się w przedziale 40-90%. Mediana wynosiła 70%.

U 10 pacjentów (21,2%) ekspresja VEGF wynosiła 40%, u 2 pacjentów (4,2%) – 50%, u 9 pacjentów (19,2%) – 60%, u 4 pacjentów (8,5%) – 70 %, u 13 pacjentów (27,7%) – 80%, a u 9 pacjentów (19,2%) – 90%.

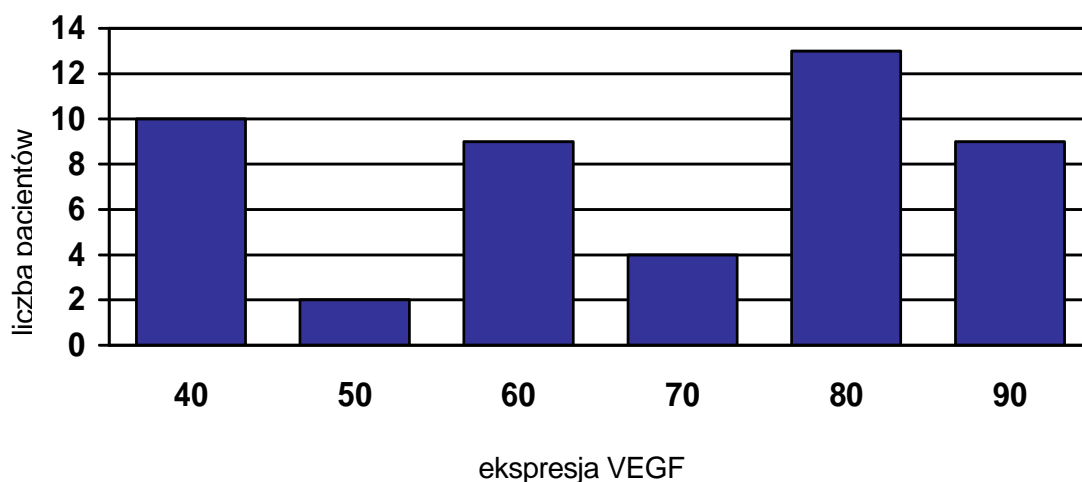
Wyniki ekspresji VEGF oraz liczby pacjentów (liczności) u których uzyskano poszczególne wartości przedstawiono w tabeli 15 oraz na rycinie 10.

Tabela 15. Wyniki stopnia ekspresji VEGF w tkance nowotworowej w badanej grupie dzieci z ZGG

stopień ekspresji VEGF (% komórek immunoreaktywnych)	liczność	liczność skumulowana	procent	procent skumulowany
40	10	10	21,2	21,2
50	2	12	4,2	25,4
60	9	21	19,2	44,6
70	4	25	8,5	53,1
80	13	38	27,7	80,8
90	9	47	19,2	100

Liczność – liczba pacjentów u których uzyskano poszczególne wyniki VEGF

Liczność skumulowana oznacza liczbę pacjentów, u których stwierdzono wyniki \leq od danej wartości VEGF.



Rycina 10. Rozkład licznosci poszczególnych stopni ekspresji VEGF w badanej grupie

Analogicznie jak przy ocenie gęstości naczyniowej podzielono pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi na grupy w zależności od płci, wieku, lokalizacji, stadium zaawansowania, typu histologicznego oraz obecności przerzutów i porównano ekspresję VEGF w tych grupach. Dla stwierdzenia różnic pomiędzy badanymi grupami porównano mediany stopnia ekspresji VEGF, ponieważ wyniki wyrażono w skali porządkowej.

Znamienną statystycznie różnicę stopnia ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń stwierdzono pomiędzy grupą pacjentów, u której stwierdzono przerzuty i grupą pacjentów bez przerzutów. Mediany stopnia ekspresji VEGF wynosiły odpowiednio w tych grupach 80% i 60%, wartość $p=0,02$.

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic pomiędzy grupami różniącymi się wiekiem, płcią, lokalizacją, stadium zaawansowania.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 16.

Poddano też szczegółowej analizie ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń w grupie pacjentów, którzy zmarli ($n=5$). Ekspresja VEGF w tej grupie pacjentów zawierała się w przedziale 60-90%, mediana wynosiła 80%. U 4 spośród 5 pacjentów stwierdzano wysoki ($\geq 70\%$) stopień ekspresji VEGF. Wartości ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń w tej grupie chorych przedstawiono w tabeli 17.

Na rycinach 14 i 15 przedstawiono obrazy mikroskopowe wybranych wycinków złośliwych guzów germinalnych u dzieci badanej grupy, w których dokonano oceny ekspresji białka VEGF przy użyciu opisanej metody.

Tabela 16. Rozkład ekspresji VEGF w poszczególnych podgrupach badanych dzieci ze złośliwymi guzami germinalnymi.

Cecha	N	mediana	wartość p
Płeć			
Dziewczynki	29	60	0,40
Chłopcy	18	80	
Rozpoznanie histopatologiczne			
Yolk sac tumor	16	80	0,22
Tumor mixtus	13	60	
Carcinoma embryonale	5	80	
Teratoma immaturum et malignum	4	60	
Dysgerminoma	5	60	
Stadium zaawansowania			
I	10	70	0,06
II	17	60	
III	11	70	
IV	9	80	
Obecność przerzutów			
M1	9	80	0,03
Mo	38	60	
Lokalizacja			
Jajnik	21	60	0,25
Jądro	16	80	
Okolica krzyżowo-ogonowa i miednica mniejsza	10	70	
Lokalizacja			
Jajnik	21	60	0,23
Jądro	16	80	
Wysokość MVD			
≥ 43,6	24	80	0,01
< 43,6	23	60	
Wiek			
poniżej 36m-cy	15	80	0,37
powyżej 36m-cy	32	60	

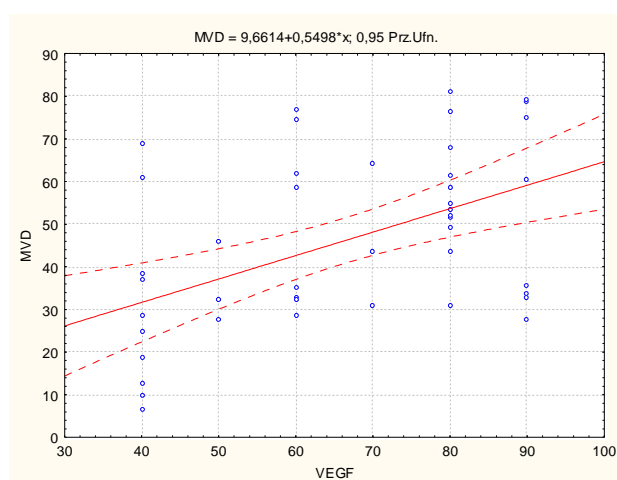
Tabela 17. Wyniki ekspresji VEGF oraz cechy kliniczno-patologiczne w grupie pacjentów, którzy zmarli

Płeć	Wiek m-ce	Lokalizacja Guza	Stadium zaawansowania	Rozpoznanie histopatologiczne	Przyczyna Zgonu	VEGF%
K	1	Sc	2	TM	posocznica	70
M	24	Te	3b	YST	progresja	60
K	34	Sc	2	GCTM	progresja	80
K	159	Sc	3b	GCTM	progresja	90
M	13	Sc	3b	CA	progresja	80

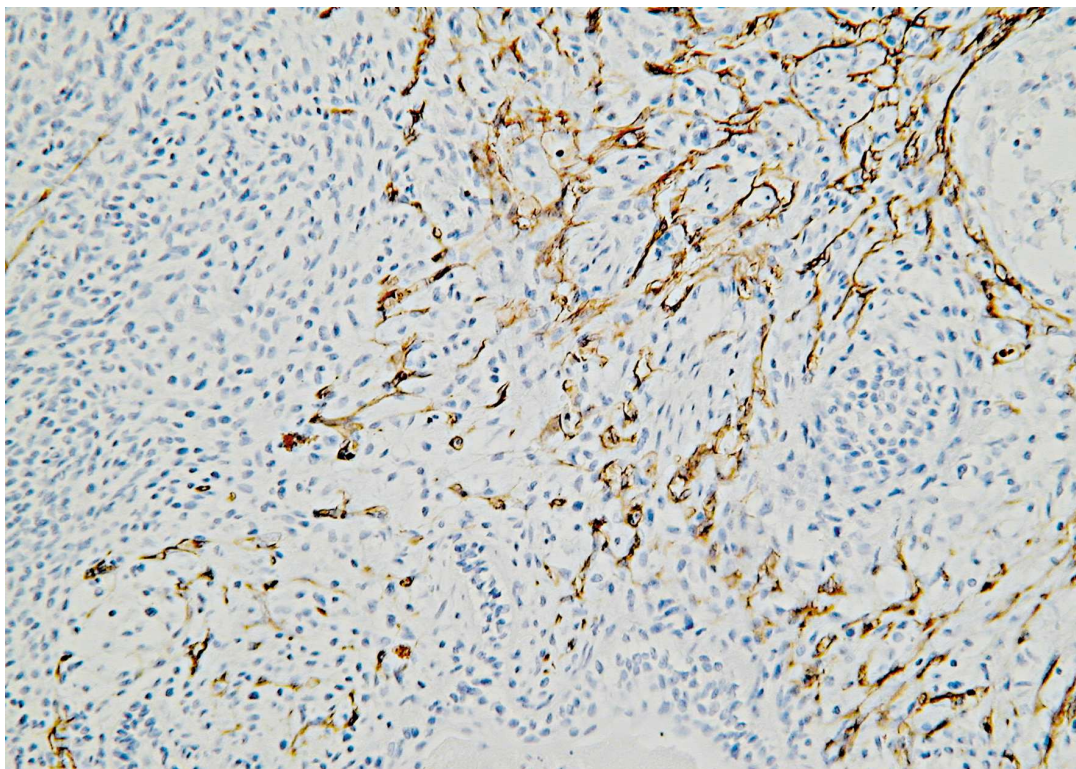
Zależność pomiędzy VEGF a MVD

Przeanalizowano związek pomiędzy badanymi parametrami.

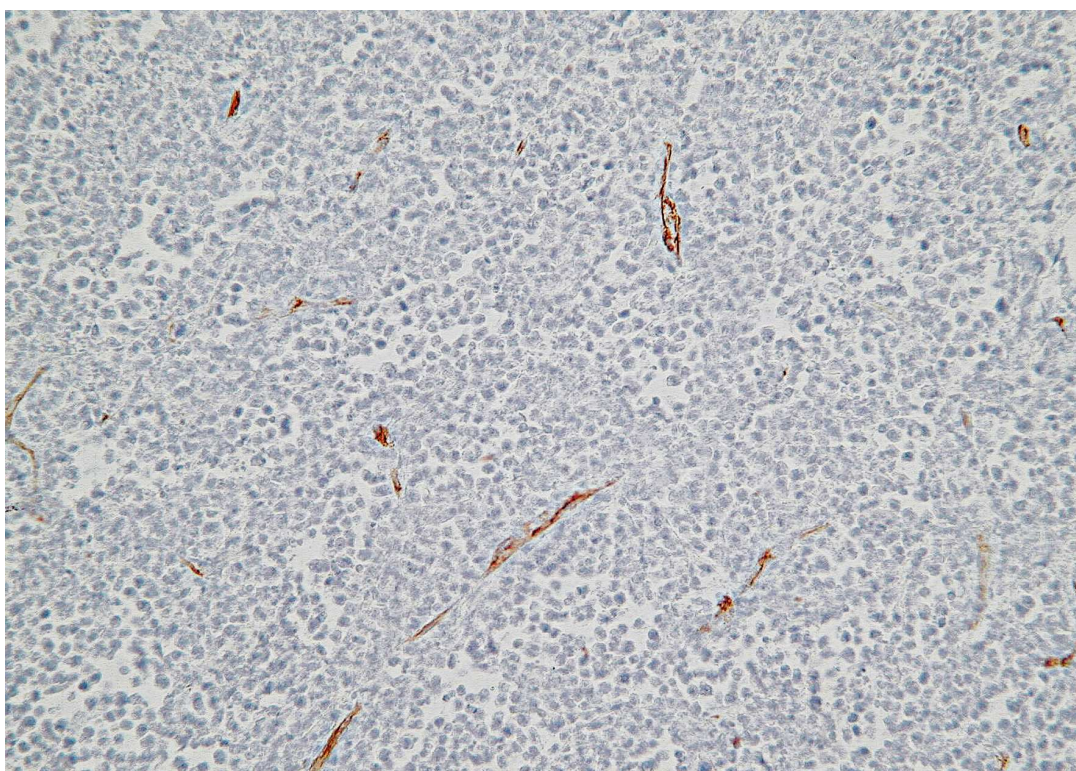
Stwierdzono średnio silną dodatnią zależność pomiędzy średnią gęstością naczyń a ekspresją czynnika wzrostu śródbłonka naczyń przy zastosowaniu analizy korelacji rang Spearmana. Współczynnik R Spearmana wynosił 0,45. Zależność średniej gęstości naczyń od ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń przedstawiono na rycinie 11.



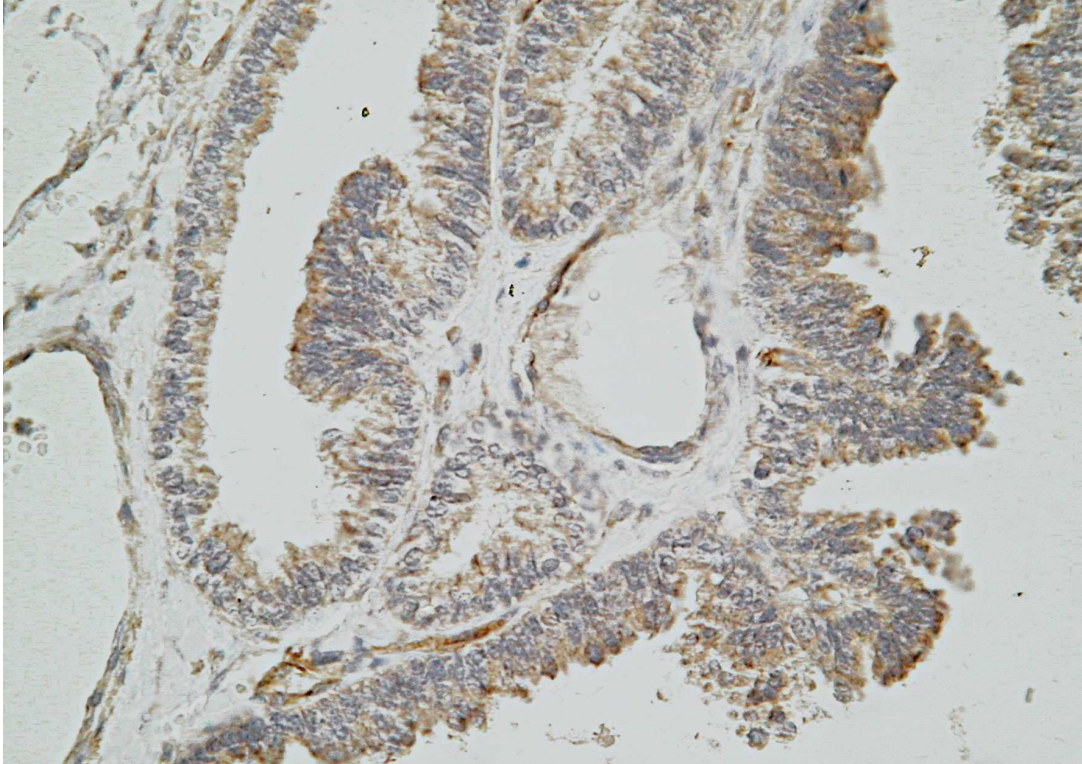
Rycina 11. Zależność pomiędzy VEGF a MVD. Współczynnik R Spearmana= 0,45



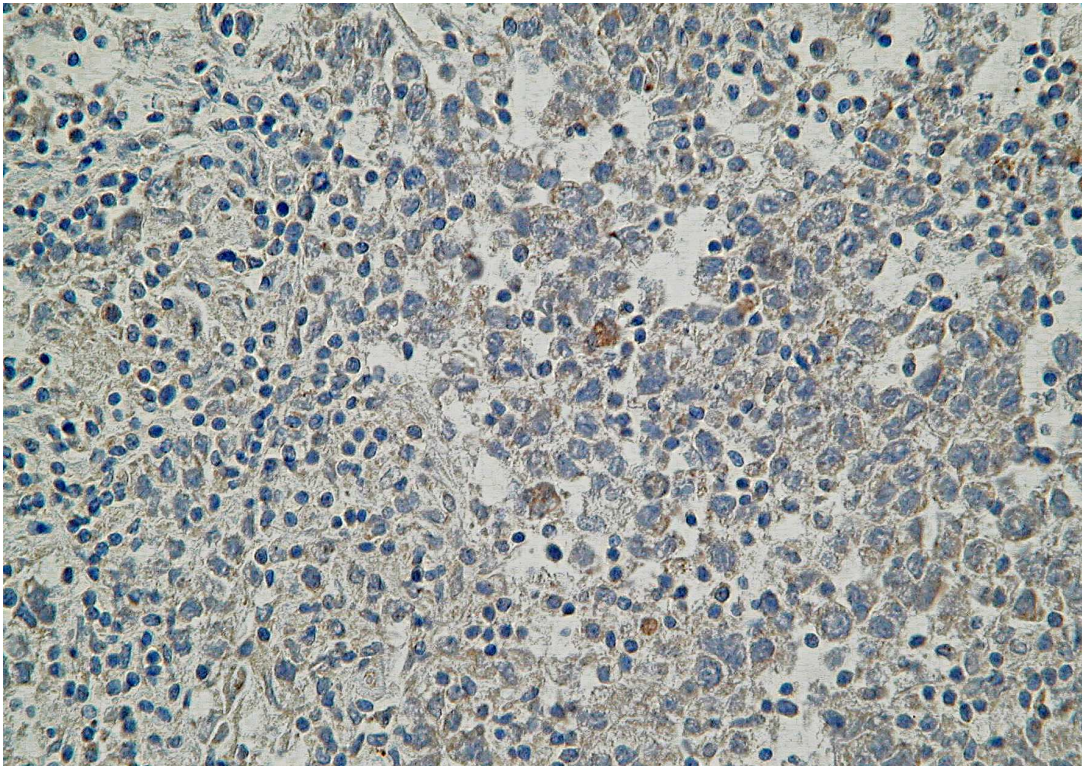
Rycina 12. Potworniak niedojrzały (teratoma immaturum) o dużej gęstości naczyń (CD34, powiększenie 200x)



Rycina 13. Rozrodczak (dysgerminoma) o małej gęstości naczyń (CD34, powiększenie 200x)



Rycina 14. Guz pęcherzyka żółtkowego (yolk sac tumor) o dużej ekspresji VEGF w komórkach nowotworu.



Rycina 15. Rozrodczak (dysgerminoma) o małej ekspresji VEGF w komórkach nowotworu

Dyskusja

Angiogeneza nowotworowa stanowi od wielu lat przedmiot zainteresowania onkologów.

Już na początku ubiegłego stulecia Goldman odkrył, że nowotwory mają własne autonomiczne unaczynienie, a w 1971 Folkman udowodnił w doświadczalnej pracy, że nowotwór bez własnych naczyń krwionośnych nie może osiągać rozmiarów powyżej 1-2 mm średnicy (7, 60). Autor ten jest pionierem badań nad angiogenezą, a wspomniana praca jest cytowana przez niemal wszystkich autorów podejmujących zagadnienie tworzenia naczyń w nowotworach.

Angiogeneza jest uznana za jedną z sześciu cech fenotypu nowotworowego, umożliwiającą autonomiczny, niekontrolowany rozwój guza (64)

Najstarszą i najczęściej stosowaną metodą oceny angiogenezy nowotworowej jest określanie liczby naczyń w tkance nowotworowej (microvessel density – MVD) po ich wyznakowaniu przy użyciu reakcji immunohistochemicznych. Należy ona do metod bezpośrednich, oceniających proces tworzenia naczyń w końcowym etapie.

Od kilkunastu lat podkreśla się znaczenie gęstości naczyniowej w guzie nowotworowym jako czynnika prognostycznego.

Dodatnią korelację pomiędzy MVD a klinicznymi cechami złośliwości wykazano w bardzo wielu nowotworach u ludzi dorosłych, przede wszystkim w raku sutka, jelita grubego, żołądka, gruczołu krokowego, szyjki macicy (20, 21, 91, 93).

Wyniki innych badań nie potwierdzają tych zależności (94, 95).

Trudność w wystandaryzowaniu metody oznaczania MVD, jest jej najpoważniejszą wadą. Może ona odpowiadać za rozbieżność wyników podawanych przez różnych autorów.

W miarę rozwoju wiedzy na temat angiogenezy nowotworowej i poznawania substancji stymulujących i hamujących tworzenie naczyń w tkance guza opracowano tzw. pośrednie metody oceny angiogenezy. Polegają one na określeniu stężenia substancji proangiogennych w płynach ustrojowych lub ich ekspresji w samej tkance nowotworowej (10, 11).

Najczęściej wykorzystuje się w tym celu określenie stężenia lub ekspresji VEGF, który jest najsilniejszą cytokiną proangiogeną i jedynym swoistym stymulatorem angiogenezy (75). Podobnie jak w przypadku oceny gęstości naczyniowej wyniki badań na temat ekspresji VEGF jako wyznacznika biologicznej złośliwości guzów są rozbieżne. Istnieją prace wykazujące dodatnią korelację pomiędzy stopniem ekspresji VEGF a klinicznymi cechami złośliwości nowotworu takimi jak stopień zaawansowania, tworzenie przerzutów i progresja choroby (11, 96, 97). Inne badania nie potwierdzają tych obserwacji (98, 99, 100).

Fakt ten można wytłumaczyć bardzo dużą złożonością procesu angiogenezy, w który zaangażowane są liczne substancje stymulujące i inhibitory, a końcowy efekt jest wypadkową ich wzajemnego oddziaływania.

Istnieje także wiele badań, w których jest podnoszone zagadnienie związku pomiędzy ekspresją różnych cytokin proangiogennych a średnią gęstością naczyń. W bardzo licznych badaniach wykazano dodatni związek pomiędzy

ekspresją czynnika wzrostu śródbłónka naczyń a gęstością naczyńniową (101, 102).

Dało to dużą nadzieję na zastąpienie oceny tego parametru przez bardziej obiektywne metody. W dostępnym piśmiennictwie można jednak znaleźć doniesienia nie potwierdzające związku pomiędzy tymi parametrami (103)

Publikacje dotyczące angiogenezy nowotworowej u ludzi dorosłych są bardzo liczne, dotyczą większości rodzajów nowotworów: raków, mięsaków, czerniaka, a także chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Autorzy posługują się w nich bardzo wieloma metodami oceny angiogenezy od oznaczenia MVD i ekspresji VEGF, poprzez ekspresję innych cytokin proangiogennych i inhibitorów, aż po oznaczanie ekspresji różnych typów receptorów i badania molekularne genów kodujących białka biorące udział w angiogenezie.

Piśmiennictwo dotyczące nowotworów wieku rozwojowego jest znacznie mniej licznie reprezentowane.

W tabeli 16 podano najważniejsze pozycje piśmiennictwa dotyczące oceny angiogenezy w tkance nowotworowej w złośliwych guzach litych u dzieci z uwzględnieniem poszczególnych typów nowotworów oraz metod oceny angiogenezy, którą posłużono się w poszczególnych badaniach.

Tabela 16. Najważniejsze publikacje dotyczącej stopnia angiogenezy w złośliwych guzach litych u dzieci

Autor, rok publikacji, pozycja w piśmiennictwie	Metoda oceny angiogenezy	Rodzaj nowotworu	Uzyskane wyniki
Li 1994 (104)	MVD, stężenie bFGF w płynie mózgowo-rdzeniowym	Guzy mózgu	MVD jest czynnikiem złego rokowania
Meitar 1996 (105)	MVD	Neuroblastoma	Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy MVD a amplifikacją n-myc i stadium zaawansowania choroby
Lee 1999 (106)	Ocena ekspresji poszczególnych izoform VEGF,	Osteosarcoma	Wyższą ekspresję pewnych izoform VEGF u pacjentów o złym rokowaniu
Canete 2000 (107)	MVD	Neuroblastoma	MVD nie ma znaczenia rokowniczego, brak korelacji pomiędzy MVD a czynnikami ryzyka.
Eggert 2000 (108)	Ekspresja VEGF, bFGF	Neuroblastoma	Wyższa ekspresja VEGF i bFGF występuje w zaawansowanych stadiach nowotworu
Kaya M 2000 (109)	Ekspresja VEGF	Osteosarcoma	Zwiększona ekspresja VEGF koreluje z MVD i jest czynnikiem złego rokowania
Ribatti 2001 (110)	MVD	Neuroblastoma	Istnieje dodatnia korelację pomiędzy MVD i stadium zaawansowania choroby
Ghanem 2003 (111)	MVD i ekspresja VEGF	Guz Wimsa	Zwiększona ekspresja VEGF i białka flt-1 koreluje z MVD i jest czynnikiem złego rokowania
Kreuter 2004 (112)	MVD	Osteosarcoma	Wysoka wartość MVD jest korzystnym czynnikiem rokowniczym
Mikulic 2004 (113)	MVD	Osteosarcoma	Wysoka wartość MVD jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym
Ozer E, 2004 (100)	Ekspresja VEGF	Medulloblastoma	Ekspresja VEGF nie ma znaczenia prognostycznego
Sun 2005 (114)	MVD Ekspresja VEGF	Hepatoblastoma Hepatocarcinoma	Wyższe wartości MVD i większą ekspresję VEGF w porównaniu z chorymi dorosłymi

Najwięcej badań dotyczy zwojaka zarodkowego, który cechuje się niezwykle dużą biologiczną złośliwością (105, 107, 108, 110). Mimo ciągłych modyfikacji leczenia, przy zastosowaniu nowoczesnych i bardzo agresywnych metod terapeutycznych rokowanie w tym nowotworze jest wciąż złe. Z tego też względu neuroblastoma pozostaje w centrum zainteresowania nie tylko klinicystów, ale i patologów oraz genetyków, którzy próbują odpowiedzieć na pytanie, co odpowiada za jego agresywność. Intensywna neoangiogeneza może być jednym z czynników determinujących ogromną biologiczną złośliwość tego nowotworu. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy stopniem ekspresji VEGF a niekorzystnym przebiegiem klinicznym, amplifikacją genu *n-myc*, stopniem zaawansowania w przytoczonych badaniach (105, 108, 110). Określono także wysoką ekspresję metaloproteinaz – enzymów niszczących błonę podstawną naczyń i substancje macierzy międzykomórkowej, co może odpowiadać za niezwykle dużą zdolność uogólniania się procesu nowotworowego w neuroblastoma (108). Należy jednak podkreślić, że wyniki nie są jednolite. Canete i wsp. w badaniu dotyczącym 69 przypadków neuroblastoma nie potwierdzili związku angiogenezy z podstawowymi klinicznymi, morfologicznymi i molekularnymi czynnikami ryzyka (107).

Pozostałe nowotwory wieku rozwojowego są znacznie mniej licznie reprezentowane w badaniach nad angiogenezą. Również mało reprezentowane w piśmiennictwie jest zagadnienie stężenia podstawowych cytokin proangiogennych w płynach ustrojowych. Wykazano znamienne wyższe

stężenie VEGF w surowicy pacjentów z różnymi guzami litymi i powrót do poziomów stwierdzanych u dzieci zdrowych po uzyskaniu remisji (115). Spostrzeżenie to zostało potwierdzone u dzieci z nerczakiem płodowym, ponadto wykazano ponowny wzrost poziomu VEGF w surowicy u pacjentów ze wznową (116). Budzi to nadzieję na wykorzystanie surowiczego VEGF jako uniwersalnego markera nowotworowego, znajdującego zastosowanie w monitorowaniu choroby w trakcie leczenia i po jego zakończeniu.

Publikacji na temat angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci praktycznie nie ma. Badanie Fukudo i wsp. dotyczy guzów germinalnych jąder, ale badana grupa obejmuje zarówno dorosłych jak i dzieci (117). Nie ma natomiast doniesień o neoangiogenezie w guzach germinalnych o innych lokalizacjach oraz opracowań dotyczących wyłącznie dzieci.

Dotychczas pozostaje zatem otwarta kwestia „potencjału angiogennego” wielu nowotworów wieku rozwojowego, tak bardzo różniących się pod względem patogenezy od nowotworów występujących u ludzi dorosłych. Brak odpowiedzi na pytanie, czy guzy nowotworowe u dzieci są bogato unaczynione, czy za rozwój naczyń odpowiedzialne są w tym samym stopniu, co u osób dorosłych podstawowe aktywatory angiogenezy. Nie wiadomo także, czy stopień angiogenezy koreluje ze znanymi klinicznymi i morfologicznymi cechami złośliwości nowotworów u dzieci oraz, czy może on mieć znaczenie rokownicze.

Ma to szczególne znaczenie wobec faktu, coraz bliższych perspektyw zastosowania terapii antyangiogennych.

Celem niniejszej pracy była ocena angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci. Złośliwe guzy germinalne (ZGG) stanowią 3% nowotworów wieku rozwojowego. Ze względu na rzadkość występowania badania dotyczące ZGG prowadzone są w poszczególnych krajach przez wielośrodkowe grupy. W 1998 roku w ramach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych wyłoniono zespół koordynujący leczenie złośliwych guzów germinalnych o lokalizacji pozaczaszkowej. Podstawowym celem było wprowadzenie jednolitego programu diagnostyczno-terapeutycznego, który oparto na francuskim protokole TGM 95. Dokonano także retrospektywnej oceny wyników leczenia przed rokiem 1998. Wielośrodkowe badanie prowadzone w latach 1998-2004 wykazało znaczną poprawę wyników leczenia (46, 47). Uzyskano duży odsetek trwałych wyleczeń wynoszący 90%, a wyniki są porównywalne do podawanych przez inne grupy badawcze.

W przedstawianej pracy wykorzystano materiał pochodzący z poszczególnych ośrodków biorących udział w badaniu. Badaną grupę stanowili pacjenci leczenia zarówno przed rokiem 1998 według różnych schematów chemioterapii, oraz po roku 1998 zgodnie z programem TGM95. Materiał histopatologiczny w większości przypadków pochodził z pierwotnych zabiegów operacyjnych resekcji guza, wykonanych na początku leczenia, bez poprzedzającej chemioterapii. U 8 pacjentów materiał pochodził z wstępnej biopsji operacyjnej. Dotyczyło to dzieci z wyższymi stopniami zaawansowania klinicznego, u których pierwotny radykalny zabieg operacyjny nie był możliwy. Ostatecznie spośród 114 pacjentów PPGGL z rozpoznaniem złośliwych guzów germinalnych

do badania zakwalifikowano 47 dzieci. W pozostałych przypadkach materiał histopatologiczny był zbyt skąpy lub mało reprezentatywny, ze względu na niewielką ilość utkania nowotworu lub znaczną martwicę. Z badanej grupy wykluczono przypadki, w których materiał pochodził z zabiegu operacyjnego wtórnego tj. wykonanego po wstępnej chemioterapii (protokół zakłada bowiem możliwość odstąpienia od wstępnej biopsji w przypadku stwierdzenia podwyższonego stężenia AFP lub beta HCG w surowicy). W tych przypadkach w guzie stwierdzano znaczny stopień martwicy, będącej skutkiem wcześniejszego leczenia chemicznego, a także niekiedy obecność jedynie dojrzałych elementów utkania. Uniemożliwiało to nie tylko postawienie rozpoznania histopatologicznego, ale również miarodajną ocenę stopnia angiogenezy.

Wśród badanych pacjentów było 29 dziewczynek (61%) i 18 chłopców (39%), co odpowiada tendencji o przewadze dziewcząt z rozpoznaniem ZGG.

W większości przypadków w badanej grupie nowotwór był zlokalizowany w gonadach: w jajniku w 21 przypadkach (44,7%), w jądrze w 16 (34,0%) przypadkach. U pozostałych 10 pacjentów guz był umiejscowiony w okolicy krzyżowo ogonowej w różnych wariantach wg Altmana (35). Rozkład poszczególnych lokalizacji nie różnił się w stosunku do ogólnej populacji dzieci z ZGG. Najczęstszą lokalizacją według większości autorów jest jajnik, którego zajęcie stwierdza się 33%-45%, co znajduje także odzwierciedlenie w częstszym występowaniu ZGG u dziewczynek. W badanej grupie nie było pacjentów z pierwotną lokalizacją w przestrzeni pozaotrzewnowej i w śródpiersiu, której przypisuje się gorsze rokowanie (118).

Nieco inaczej niż wśród populacji dzieci chorych na złośliwe guzy germinalne kształtowała się częstość poszczególnych typów histopatologicznych w badanej grupie. Najczęstszym rozpoznaniem był yolk sac tumor – 16 pacjentów (34%), guz mieszany stwierdzano jedynie w 28% przypadków.

Przerzuty stwierdzono u 9 spośród 47 pacjentów (20%), co odpowiada wynikom podawanym przez polską grupę badawczą (47). Na uwagę zasługuje fakt, że wszyscy pacjenci z przerzutami żyją, co jest miarą skuteczności zastosowanej chemioterapii, dostosowanej do stadium zaawansowania. Obecnie stwierdzenie przerzutów nie przesądza o złym rokowaniu, pod warunkiem chemiowrażliwości nowotworu i możliwości wykonania radykalnego zabiegu operacyjnego, a wyniki uzyskiwane w grupie III i IV nie różnią się istotnie. (47)

Spośród 47 dzieci z ZGG 5 (10,6%) zmarło, w tym 4 z powodu progresji nowotworowej. Czas przeżycia wynosił 2-9 miesięcy od chwili rozpoznania.

2 pacjentów było leczonych wg programu TGM95. U 2 pacjentów leczonych przed 1998 rokiem zastosowano chemioterapię VAC (winkrystyna, aktynomycyna D, cyclofosfamid) i EPO (etopozyd, cisplatyna, winkrystyna). Grupa pacjentów, którzy zmarli jest nieco mniej liczna niż wynikałoby to z wyników leczenia ZGG podawanych przez polską grupę badawczą. Wyniki PPGGL wskazują 10% odsetek zgonów w grupie pacjentów chorych na złośliwe guzy germinalne po 1998 roku. Przed rokiem 1998 wyniki leczenia były gorsze – zgony z powodu ZGG notowano w 26% przypadków (6).

W badanej grupie 18 pacjentów leczonych przed rokiem 98 odsetek zgonów wynosił 11 %, a w grupie 29 pacjentów leczonych według jednolitego programu

TGM95 zaledwie 7 %. U wszystkich pacjentów, którzy zmarli stwierdzono, co najmniej 1 z czynników ryzyka, przesądzającym o gorszym rokowaniu. Do czynników takich zaliczamy w ZGG: stadium kliniczne uogólnione lub regionalne (stadium III i IV), pozagonadalną lokalizację nowotworu, obecność struktur raka zarodkowego i guza pęcherzyka żółtkowego, brak możliwości wykonania radykalnego zabiegu operacyjnego, pierwotną chemiooporność nowotworu (6).

W niniejszym badaniu zastosowano dwie najczęściej wykonywane metody badania angiogenezy: metodę bezpośrednią polegającą na oznaczeniu gęstości naczyń w tkance guza oraz pośrednią polegającą na oznaczeniu ekspresji VEGF.

Dla oceny MVD zastosowano metodę opracowaną przez Weidnera w 1991, która została zaakceptowana przez większość autorów określających gęstość naczyń w nowotworach (91, 119).

W metodzie tej szczególny nacisk kładzie się na wybór fragmentu tkanki, w którym naczynia są liczone. Przy powiększeniu 100x wybiera się pola, gdzie znajdują się największe skupiska wybarwionych komórek śródbłonna tzw „hot spots” odpowiadające mikronaczyniom guza. Ponieważ angiogeneza jest najbardziej intensywna na obwodzie guza fragmenty te muszą zawierać dużą ilość żywych komórek nowotworowych, a obecność martwicy lub włóknienia wyklucza przydatność danego fragmentu tkanki dla oceny.

W opisanej metodzie zaleca się liczenie naczyń przy 200-krotnym powiększeniu (91). Część autorów stosuje powiększenie 400-krotne, uważając, że wykrywa się wtedy więcej naczyń. Stosowane są również inne powiększenia dla oceny MVD. Niezależnie

od stosowanego powiększenia, uzyskane dane można porównać po przeliczeniu liczby naczyń na mm² wówczas, gdy podana jest powierzchnia pola widzenia.

Do wyznakowania naczyń stosuje się przeciwciała przeciw różnym antygenom obecnym w śródbłonku naczyń. Najczęściej wykorzystywane to: przeciwciało przeciw czynnikowi von Willebrandta, przeciwciało anty CD31 oraz użyte w przedstawianej pracy przeciwciało anty CD34 (119). Charakteryzuje się ono wysoką czułością, a wyniki uzyskiwane przy jego zastosowaniu są wysoce powtarzalne. Antygen związany z czynnikiem von Willebrandta (vWF) nie jest obecny we wszystkich komórkach śródbłonka, a obecny jest w płytkach krwi. Antygen CD-31 jest obecny wprawdzie we wszystkich komórkach śródbłonka, ale zawierają go także pewne populacje leukocytów (120). Wyższość przeciwciała anty CD34 wykazano w badaniu dotyczących angiogenezy w raku żołądka i raka sutka przy użyciu 3 wspomnianych rodzajów przeciwciał (120, 121).

W badanej grupie dzieci z ZGG średnia gęstość naczyń wynosiła 6,8-81,0 (wartość średnia 45,9) w polu widzenia (powierzchnia pola widzenia – 0,78mm²) po przeliczeniu na 1 mm² wartości te wynoszą odpowiednio 8,7-103,8/mm² – średnia 58,8/mm².

Porównanie uzyskanego wyniku średniej gęstości naczyń w złośliwych guzach germinalnych z gęstością naczyń stwierdzaną w innych nowotworach u dzieci napotyka na szereg trudności, wynikających przede wszystkim z niejednolitej metodyki. Wprawdzie większość autorów badający angiogenezę dla określenia średniej gęstości naczyń stosują metodę opracowaną przez Weidnera, ale liczenie

naczyń dokonywane jest przy powiększeniach innych niż 200x (111). Wykorzystywane są też różne typy przeciwciał dla wyznakowania naczyń (112, 113). Najważniejszą jednak przeszkodą niekiedy uniemożliwiającą porównanie wyników jest brak danych co do wielkości pola widzenia w niektórych pracach. z tego też względu niemożliwe jest porównanie uzyskanych danych z wynikami podanymi przez Fukudę i wsp. w pracy dotyczącej guzów germinalnych jąder (117).

Średnia gęstość naczyniowa w ZGG u dzieci jest wyższa niż w pewnych nowotworach wieku rozwojowego takich jak guz Wilmsa (nerczak płodowy), należący podobnie jak złośliwe guzy germinalne do nowotworów o dość dobrym rokowaniu (111). Inne takie jak mięsak kościopochodny (osteosarcoma) cechują się bardziej obfitym unaczynieniem, które wynosi średnio 156 naczyń na mm² (113). Znacznie wyższą gęstość naczyniową stwierdza się w zwojaku zarodkowym, średnia liczba naczyń przypadająca na mm² wynosi 450, a więc niemal 9-krotnie więcej niż w złośliwych guzach germinalnych (107). Biorąc pod uwagę niezwykle dużą biologiczną złośliwość tego nowotworu, wyrażającą się bardzo szybkim wzrostem i jeszcze większą zdolnością do rozsiewu drogą krwiopochodną, fakt bardzo obfitego unaczynienia jest zrozumiały.

Rozpatrując podane przykłady nowotworów dziecięcych odnosi się wrażenie, że nowotwory o większej biologicznej i klinicznej złośliwości są bardziej unaczynione niż nowotwory charakteryzujące się łagodniejszym przebiegiem klinicznym. Potwierdzenie tego przypuszczenia wymagałoby badań

obejmujących bardziej liczne grupy pacjentów z poszczególnymi nowotworami dziecięcymi.

Różnice w unaczynieniu pomiędzy różnymi rodzajami nowotworów można także wyjaśnić różnym pochodzeniem tkankowym oraz różnym unaczynieniem narządów, z których się one wywodzą. Za taką koncepcją wydają się przemawiać badania opublikowane przez Eberharda i wsp., którzy porównali gęstość naczyń w różnych nowotworach z gęstością naczyń narządów z których się one wywodzą. Wyniki tych badań są zaskakujące. Okazało się, że większość z badanych nowotworów miało unaczynienie niższe niż tkanki otaczające (122).

Istnieją badania wykazujące, że pochodzenie narządowe jest czynnikiem determinującym gęstość naczyń w guzach w większym stopniu niż stopień złośliwości histologicznej i klinicznej. W badaniach dotyczących nowotworów złośliwych i łagodnych jajnika nie stwierdzono różnic w stopniu unaczynienia zmian łagodnych i raków, w tym raka surowiczego cechującego się dużą złośliwością (123)

Zagadnienie związku pomiędzy stopniem unaczynienia nowotworów a tworzeniem przerzutów jest jednym z ważniejszych problemów poruszanych przez autorów zajmujących się angiogenezą.

W prezentowanym badaniu stwierdzono wprowadzić większą gęstość naczyń w grupie pacjentów z przerzutami niż w grupie pacjentów bez przerzutów, ale różnica nie była statystycznie znamienna. Brak znamiennej statystycznie różnicy może jednak wynikać ze stosunkowo małej liczebności badanej grupy.

Większość badań dotyczących gęstości naczyń nowotworowych potwierdza dodatnią korelację pomiędzy tym parametrem a występowaniem przerzutów. Dotyczy to wielu nowotworów u ludzi dorosłych przede wszystkim najczęstszych raków: żołądka, jelita grubego, płuc (21, 22, 91, 93). Podobne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących złośliwych guzów litych u dzieci takich jak osteosarcoma, neuroblastoma (105, 108, 113). W dostępnym piśmiennictwie obecne są jednak prace podające wyniki odmienne (94, 95, 107, 112). Należy podkreślić, że o ile prace dotyczące angiogenezy w nowotworach dziecięcych dotyczą małych grup pacjentów, o tyle badane grupy chorych dorosłych są bardzo liczne, co sprawia, że uzyskiwane wyniki są bardziej wiarygodne.

Rozbieżności najprawdopodobniej mogą wynikać z braku obiektywnej metody liczenia naczyń. Badacz posługujący się najczęściej stosowaną metodą Weidnera poszukuje pod mikroskopem miejsc o największej ilości naczyń – tzw. „hot spots”, ale nie ma pewności, że w innym fragmencie guza liczba naczyń nie byłaby większa. Wydaje się, że powtórzenie procedury w większej liczbie fragmentów tkanki mogłoby umożliwić wybór miejsca, w którym ma miejsce najintensywniejsze tworzenie naczyń. Bardziej obiektywne wyniki można by także uzyskać przy większej liczbie pól widzenia. Kolejną przyczyną trudności w uzyskaniu obiektywnych wyników jest subiektywna ocena liczby naczyń przez badającego patologa. Wymaga to doświadczenia i znajomości metody.

Dla częściowego uniknięcia wymienionych trudności, uniemożliwiających uzyskanie obiektywnych wyników niektórzy autorzy posługują się przy zliczaniu naczyń metodą komputerową, przy czym komputer zlicza pola o określonej barwie w bardzo wielu miejscach tkanki. Metodą taką posłużył się Canette i wsp,

który określił stopień angiogenezy w neuroblastoma (107). Określał on również inne parametry jak obwód naczyń, średnicę i wyraził liczbowo w stosunku do masy guza. Bardzo interesujący jest fakt, że autor ten przedstawił inne wyniki niż podane w pozostałych badaniach na temat angiogenezy w zwojaku współczulnym. Nie wykazał on mianowicie związku z żadnym klinicznym i morfologicznym parametrem złośliwości nowotworu, ani też z amplifikacją genu *n-myc* uznanego za pewny czynnik złego rokowania w tym nowotworze.

W wielu badaniach określających gęstość naczyń w guzie podnoszone jest zagadnienie różnic w stopniu unaczynienia pomiędzy różnymi podtypami histologicznymi nowotworów zarówno u dorosłych jak i dzieci (19, 21, 26). Wiadomo bowiem, że podtypy histologiczne poszczególnych nowotworów różnią się kliniczną złośliwością, a angiogeneza jako potencjalny czynnik odpowiadający za agresywny przebieg mogłaby ten stan wyjaśniać. Większość dostępnych badań nie potwierdza wpływu budowy histologicznej na stopień unaczynienia, choć istnieją doniesienia podające wyniki odmienne (124).

W przytaczanych pracach dotyczących guzów germinalnych jąder nie stwierdzono różnic gęstości naczyniowej pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi, ale należy podkreślić, że przy podziale na 5 podgrup, poszczególne z nich obejmowały bardzo niewielką liczbę pacjentów (117, 125).

W związku z faktem, że obecność utkania *yolk sac tumor* lub *carcinoma embryonale* w złośliwych guzach germinalnych wiąże się z gorszym rokowaniem przeanalizowano w niniejszym badaniu stopień unaczynienia guzów posiadających komponentę *yolk sac tumor* i *carcinoma embryonale* lub obu tych składowych

histologicznych równocześnie z pozostałymi guzami – potworniakami i rozrodczakami. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy tymi dwiema grupami ZGG, co mogłoby sugerować, że większa biologiczna złośliwość tych guzów nie ma związku z angiogenezą nowotworową.

Kolejnym uznanym czynnikiem w większości nowotworów, decydującym o rokowaniu jest stopień zaawansowania. Badaną grupę podzielono ze względu na stadium zaawansowania klinicznego zgodnie z obowiązującą klasyfikacją TNM na 4 podgrupy. Gęstość naczyń nie różniła się istotnie w poszczególnych grupach. Należy jednak podkreślić, że mała liczebność grup w tym przypadku może odpowiadać za brak statystycznie istotnych różnic. Wiele badań potwierdza związek średniej gęstości naczyń ze stadium zaawansowania klinicznego nowotworu (126).

Bardzo istotny znaczenie wydaje się mieć także stopień angiogenezy w zależności od lokalizacji złośliwych guzów germinalnych. Istnieje koncepcja, że gęstość naczyniowa poszczególnych nowotworów jest zależna od ich umiejscowienia (122). Uzyskane wyniki wykazały znamienne wyższą gęstość naczyniową ZGG jąder w porównaniu do ZGG zlokalizowanych w gonadzie żeńskiej. Nie wykazano natomiast istotnej różnicy pomiędzy guzami zlokalizowanymi w jądrach a guzami o lokalizacji krzyżowo-guzicznej, ani pomiędzy guzami jajnika a guzami o lokalizacji krzyżowo-guzicznej

Badaną grupę pacjentów podzielono także ze względu na wiek. Porównano gęstość naczyniową w ZGG u dzieci 0-3 lat i u dzieci starszych. Fakt odmiennego obrazu klinicznego złośliwych guzów germinalnych w grupie dzieci młodszych i starszych znany jest od dawna (6, 27). Wiadomo, że u dzieci

młodszych częściej guz zlokalizowany jest w okolicy krzyżowo-ogonowej, częściej występują potworniaki i guzy pęcherza żółtkowego oraz, że rokowanie w tej grupie jest gorsze, co wynika z większych trudności w wykonaniu radykalnego zabiegu chirurgicznego (6, 28). W badaniu Schneidera i wsp. przeanalizowano największą dotychczas, bo liczącą 1442 dzieci grupę pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi, zarejestrowanych przez niemiecką grupę badawczą (127). Autorzy poddali analizie dane epidemiologiczne, kliniczne i histopatologiczne badanej grupy potwierdzając dotychczasowe spostrzeżenia o odmiennym obrazie klinicznym tej grupy nowotworów u dzieci młodszych i starszych. Na uwagę zasługuje też fakt odmiennych aberracji chromosomalnych stwierdzanych w badaniach cytogenetycznych w obu grupach pacjentów (127)

Porównanie średniej gęstości naczyń w obu grupach wiekowych pozwoliło na stwierdzenie znamienne wyższego stopnia unaczynienia guzów germinalnych u dzieci młodszych, co może stanowić kolejny argument przemawiający za odmiennymi właściwościami biologicznymi guzów w tej grupie chorych.

Znamiennie wyższą gęstość naczyń stwierdzono w grupie pacjentów z wysokim VEGF, co znalazło także potwierdzenie w dalszej części badania, oceniającej korelację między badanymi parametrami.

Drugim parametrem ocenianym w niniejszej pracy jest ekspresja śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF). VEGF jest najczęściej badaną cytokiną proangiogenną. Istnieją bardzo liczne prace dotyczące zarówno jego ekspresji w tkance nowotworowej jak i w surowicy pacjentów z chorobą nowotworową.

Analogicznie jak w większości badań zastosowano metodę immunohistochemiczną przy użyciu króliczego przeciwciała poliklonalnego, jako znacznika reagującego swoiście z VEGF, a wynik wyrażono na podstawie odsetka komórek immunoreaktywnych.

Niektórzy autorzy podają wprawdzie wartości liczbowe uzależnione od natężenia reakcji barwnej jednak taka ocena jest uważana za niemiarodajną ze względu na możliwość intensywniejszego zabarwienia tkanek uszkodzonych (128). Najbardziej dokładne jest oznaczenie stężenia VEGF w ng/mg białka, ale jest to możliwe przy użyciu metody radioimmunologicznej w tkankach mrożonych (129).

Mimo, że większość autorów opiera ocenę ekspresji VEGF na odsetku komórek immunoreaktywnych to odmiennie przedstawia się w poszczególnych badaniach interpretacja uzyskanych wyników. Kryteria podziału na poszczególne stopnie ekspresji od niskiego po wysoki zależą najprawdopodobniej od wyników uzyskiwanych w danym typie nowotworu. W większości raków stosuje trójstopniową skalę oceny stopnia ekspresji VEGF (96,128). Za stopień niski (1+) uznaje się sytuację, gdy odsetek komórek immunoreaktywnych wynosi 5-20, 20-50% określa się jako stopień średni, większy niż 50% odsetek komórek immunoreaktywnych to stopień wysoki. W niektórych badaniach autorzy rezygnują z podziału na stopnie ekspresji, a podają jedynie wartość, którą przyjmują za graniczną. I tak w badaniu dotyczącym ekspresji VEGF w osteosarcoma autorzy przyjmują za wynik dodatni obecność powyżej 30% komórek immunoreaktywnych w preparacie (109). W badaniu dotyczących złośliwych guzów germinalnych jąder, za wartość graniczną przyjęto 5% (117).

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wskazują na bardzo wysoką ekspresję VEGF w badanej grupie. Odsetek komórek immunoreaktywnych zawiera się w przedziale 40-90%. Przyjmując przytaczaną skalę trójstopniową, aż 78% pacjentów miało wysoki stopień ekspresji, a pozostałe 22% stopień średni.

U żadnego pacjenta nie stwierdzano niskiej ani ujemnej ekspresji VEGF. Uzyskane wyniki różnią się diametralnie od wyników podanych przez Fukudę i wsp, którzy stwierdził ujemną ekspresję VEGF aż u niemal 60% pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi jąder, przy czym jako ujemną ekspresję VEGF autor ten uznał guzy o mniejszym niż 5% odsetku komórek immunoreaktywnych. Należy jednak pokreślić, że w grupie VEGF ujemnej ponad 50% stanowili pacjenci z nasieniakiem, czyli guzem praktycznie nie spotykanym u dzieci. Nie wiadomo też jaki odsetek w tej grupie stanowiły dzieci. Badanie to obejmowało bowiem pacjentów w wieku 0-62 lat, a mediana wynosiła 27 lat. Zdecydowanie inne wyniki podaje Vigletto i wsp, który stwierdza dodatnią ekspresję VEGF u 81% pacjentów z germinalnymi guzami jąder (125).

Dla przedstawienia różnorodności ekspresji VEGF w niniejszym badaniu zrezygnowano z najczęściej wprowadzanej skali trójstopniowej, a wyniki wyrażano przez odsetek komórek immunoreaktywnych, z dokładnością do 10%, w skali porządkowej. Analogicznie jak przy ocenie MVD pacjentów podzielono na grupy ze względu na wiek, płeć, obecność przerzutów, lokalizację, rozpoznanie histopatologiczne, stadium zaawansowania. W związku z zastosowaniem skali porządkowej porównywano mediany, a nie średnie

arytmetyczne w poszczególnych grupach. Znamienne statystyczne różnice stwierdzono w grupie pacjentów z przerzutami i bez przerzutów, w których mediany wynosiły odpowiednio 80% i 60%.

Wyższy stopień ekspresji VEGF występował także w grupie pacjentów z wysoką gęstością naczyniową. Za wartość graniczną przyjęto medianę MVD wynoszącą 46,5 naczyń/0,78 mm².

Analogicznie przy porównaniu gęstości naczyniowej w grupach o wysokim i średnim stopniu ekspresji VEGF za wartość graniczną przyjęto medianę VEGF wynoszącą 70% komórek immunoreaktywnych.

Brak znamienych różnic w pozostałych porównywanych grupach może wynikać z małej liczebności wyników. Mediana VEGF w grupie dzieci młodszych wynosiła 80% w stosunku do mediany 60% uzyskanej u dzieci starszych, ale wynik ten przy danej liczebności grup nie był znamieny statystycznie.

Jednym z ważniejszych zagadnień poruszanych przez badaczy zajmujących się angiogenezą nowotworową jest jej znaczenie rokownicze. W większości przypadków wyniki badań wskazują, że nasilona angiogeneza jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (104, 109, 111, 113). Autorzy tych badań porównują parametry określające przeżycie w grupach różniących się stopniem angiogenezy, wyrażanym najczęściej przez średnią gęstość naczyniową lub ekspresję VEGF. Fakt gorszego rokowania w grupie o wyższym stopniu angiogenezy jest zrozumiały, biorąc pod uwagę, że jest ona jedną z cech fenotypu nowotworu złośliwego. Wyniki badań nie są jednak jednoznaczne. Liczne prace nie

potwierdzają bowiem znaczenia prognostycznego angiogenezy, a niektóre wykazują wręcz, że ma ona korzystne znaczenie rokownicze (107, 112). Przykładem może być badanie opublikowane przez Kreutera i wsp, który wykazał w prospektywnym badaniu u 60 pacjentów z mięsakiem kościopochodnym większy odsetek 3 i 5- letniego przeżycia w grupie chorych z wyższą gęstością naczyń w tkance guza (112).

W przypadku przedstawianego badania, niewielka liczba pacjentów, którzy zmarli (n=5) nie pozwala na ocenę znaczenia rokowniczego stopnia angiogenezy w ZGG. Wynika ona po części z dobrych wyników leczenia złośliwych guzów germinalnych oraz trudności w uzyskaniu miarodajnego materiału histopatologicznego u znacznej części pacjentów zarejestrowanych przez PPGGL, co doprowadziło do ograniczenia liczebności badanej grupy. Należy jednak podkreślić, że również w całej grupie 96 pacjentów, którzy zakończyli leczenie od 1998 roku zgony zanotowano w 9 przypadkach, a więc grupa pacjentów, którzy zmarli jest również nieliczna. Oceny znaczenia rokowniczego angiogenezy w ZGG byłaby możliwa jedynie przy podjęciu wielośrodkowych badań prospektywnych najlepiej przy współpracy między grupami badawczymi w różnych krajach, co gwarantowałoby uzyskanie odpowiednio licznych grup pacjentów.

Na uwagę zasługuje fakt, że 3 spośród pacjentów, którzy zmarli miało wysoką – wynoszącą powyżej 46,5 naczyń/0,78 mm² gęstość naczyń a 4 wysoki – wynoszący co najmniej 70% komórek immunoreaktywnych stopień ekspresji VEGF.

W badanej grupie pacjentów stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy badanymi parametrami: gęstością naczyń i stopniem ekspresji VEGF. Współczynnik R Spearmana wynoszący 0,45 wskazuje na średnio silny dodatni związek między badanymi parametrami. Wyniki takie podawane również przez innych autorów mogą potwierdzać istotną rolę, jaką odgrywa, śródbłonkowy czynnik wzrostu w tworzeniu naczyń (101, 102, 111) Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań, ponieważ wiele publikacji przedstawia dane odmienne (103).

Wyniki przedstawianego badania oraz przytaczane piśmiennictwo wskazują na bardzo duże rozbieżności opinii na temat znaczenia angiogenezy nowotworów. Niezależnie jednak od tego, czy przyszłość przyniesie konkretne rozstrzygnięcia przedstawianych problemów, angiogeneza nowotworowa jest nieodzownym warunkiem rozwoju nowotworów, a terapia antyangiogenna stwarza nadzieję na poprawę wyników leczenia nowotworów.

Wnioski

- Złośliwe guzy germinalne u dzieci należą do nowotworów o umiarkowanie wysokiej gęstości naczyniowej.
- U wszystkich badanych chorych stwierdzono dodatnią ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF.
- Stwierdzono statystycznie istotne różnice rozkładu gęstości naczyniowej pomiędzy grupą dzieci do 3 lat i grupą dzieci starszych ze złośliwymi guzami germinalnymi – wartości wyższe obserwowano w grupie dzieci młodszych.
- Stwierdzono statystycznie istotne różnice rozkładu gęstości naczyniowej pomiędzy grupą ze złośliwymi guzami germinalnymi zlokalizowanymi w jądrze i w jajniku – wartości wyższe obserwowano w jądrze.
- Stwierdzono znamienne wyższy stopień ekspresji VEGF u pacjentów z przerzutami w porównaniu do grupy dzieci z ZGG bez przerzutów.
- Wykazano dodatnią zależność pomiędzy badanymi parametrami: gęstością naczyniową i ekspresją VEGF.

Streszczenie

Angiogeneza nowotworowa stanowi przedmiot zainteresowania onkologów, ponieważ jest ona jedną z cech biologicznej złośliwości nowotworów i stanowi nieodzowny warunek ich progresji. Liczne badania dotyczące nowotworów u dorosłych i dzieci wykazują związek angiogenezy z klinicznymi i patologicznymi cechami złośliwości nowotworów, a także znaczenie stopnia angiogenezy jako czynnika rokowniczego

Złośliwe guzy germinalne stanowią rzadko spotykaną grupę nowotworów złośliwych u dzieci, charakteryzującą się dużym zróżnicowaniem histologicznym i różnorodnym obrazem klinicznym. W dostępnym piśmiennictwie brak doniesień na temat angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci.

Celem pracy była ocena stopnia angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci na podstawie średniej gęstości naczyniowej i ekspresji VEGF oraz poszukiwanie związków pomiędzy badanymi parametrami a podstawowymi cechami klinicznymi i morfologicznymi.

Do badania zakwalifikowano 47 pacjentów (29 dziewczynek i 18 chłopców) leczonych w latach 1994-2004 w 9 ośrodkach klinicznych, współpracujących w ramach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Guzów Litych.

Badane parametry oznaczano w materiale tkankowym guza przy użyciu metod immunohistochemicznych. Dla oceny ekspresji VEGF zastosowano poliklonalne przeciwciało przeciw VEGF, do wyznakowania naczyń użyto monoklonalne przeciwciało przeciw antygenowi CD34. Przy obliczaniu średniej gęstości

naczyń w skrawkach (MVD) posłużono się metodą opracowaną przez Weidnera. Ekspresję VEGF wyrażano za pomocą odsetka komórek immunoreaktywnych w badanych skrawkach.

Średnia gęstość naczyniowa wynosiła $45,9 \pm 20,6$ naczyń w polu widzenia ($0,78 \text{ mm}^2$). Zakres wartości MVD mieścił się w przedziale 6,8-81,0. Statystycznie znamienne różnice wykazano w grupach różniących się wiekiem- wartości wyższe obserwowano w grupie dzieci młodszych (poniżej 3 lat). Znamienne wyższą gęstość naczyń stwierdzano w guzach zlokalizowanych w jądrze w porównaniu do guzów jajnika.

U wszystkich chorych badanej grupy stwierdzano dodatnią ekspresję VEGF wynoszącą 40-90 % komórek immunoreaktywnych.

Stwierdzono znamienne wyższy stopień ekspresji VEGF u pacjentów z przerzutami w porównaniu do grupy dzieci z ZGG bez przerzutów.

Wykazano dodatnią zależność pomiędzy badanymi parametrami: gęstością naczyniową i ekspresją VEGF.

Piśmiennictwo:

1. Feudtner C., Christakis D. A., Zimmerman F. J. et al. Characteristics of deaths occurring in children's hospitals: Implications for supportive care services. *Pediatrics* 2002; 5: 887-893.
2. Benedetti M., Lavarone I., Comba P, Cancer risk associated with residential proximity to industrial sites: a review. *Arch Environ Health* 2001; 56: 342-349
3. Kowalczyk J. R., Dudkiewicz E. Częstość występowania nowotworów złośliwych u dzieci w Polsce i możliwości wczesnego wykrywania. *Przegl Pediatr* 1999; 29: 199-202
4. Miller W., Young J. L. L., Novacovic B. Childhood Cancer. *Cancer* 1995; 75: 395-405
5. Percy C., Van Holten V., Muir C. (red) International Classification of Diseases for Oncology. World Health Organization, Geneva, 1990
6. Korzon M. Złośliwe guzy zarodkowe u dzieci – Monografia. Akwilon 2002.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186
8. Kerbel R. S. Clinical trials of antiangiogenic drugs: opportunities, problems, and assessment of initial results. *J Clin Oncol* 2001, 19: 45-51
9. Puduvalli V. K., Sawaya R. Antiangiogenesis – therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neurooncol* 2000; 50: 189-200
10. Takano S., Yoshi Y., Kondo S. et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor brain tissue of brain tumor patients. *Cancer Res* 1996; 56: 2185-2190
11. Maeda K., Chung Y., Ogawa Y. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863
12. Toi M., Inada K., Hoshina S. et al. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 961-964
13. Samoto K., Ikezaki K., Ono M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1189-1193

-
14. Berkman R. A., Merrill M. J., Reinhold W. C. et al. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993; 91: 153-159
 15. Tischer E., Mitchell R., Hartman T. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991, 266, 194-197
 16. Wesseling P., van der Laak J., de Leeuw H. et al. Quantitative immunohistological analysis of microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1994; 81: 902-909
 17. Takahashi Y., Bucana C. D., Cleary K. R. et al. P53, vessel count and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 34-38
 18. Kruszewski W. J., Rzepko R., Wojtacki J. et al. Czynniki von Willebrandta i CD 31 w badaniu angiogenezy w raku jelita grubego *Pol Przegl Chir* 2001; 73: 509-520
 19. Leon S. P., Folkerth R. D., Black P. M. et al. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 1996; 77: 362-372
 20. Frangou E. M., Lawson J., Kanthan R. et al. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005;3: 3-16
 21. Tomoda M., Maehara Y., Kakeji Y. et al. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 11: 2340-2346
 22. Padro T., Ruiz S., Bieker R. et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-2644
 23. Lundberg L. G., Lerner R., Sundelin P. et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 2000; 157: 15-19
 24. Perez-Atayde A. R., Sallan S. E., Tedrow U. et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821
 25. Gesundheit B, Klement G, Senger C. et al. Differences in vasculature between pilocytic and anaplastic astrocytomas of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41: 516-526
 26. Castleberry R „Germ cell tumors” w: Principles and practice of pediatric oncology (red. Pizzo P. A., Poplack D. G.) Lippincot-Raven Publ., Philadelphia, New York 1997

-
27. Rescorla S. J., Breitfeld P. P. Pediatric germ cell tumors. *Current Probl Cancer* 1999, 23, 257-303
 28. Hoffner L., Deka R., Chakravarti A. et al. Cytogenetics and origins of pediatric germ cell tumors. *Cancer Gen Cytogen* 1994; 74: 54-58
 29. Silver S. A., Wiley J. M., Perlman E. J. DNA ploidy analysis of pediatric germ cell tumors. *Mod Pathol* 1994; 7: 951-956
 30. Liebhhart M. „Patomorfologia złośliwych guzów zarodkowych u dzieci” w: *Złośliwe guzy zarodkowe u dzieci* (red Korzon M.) Akwilon 2002.
 31. Hawkins E. P. Pathology of germ cell tumors in children. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990, 10, 165-179
 32. Altman R. P., Randolph J. G., Lilly J. R. Sacrococcygeal teratoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey – 1973. *J Pediatr Surg* 1974; 9: 389-398
 33. Gribbon M., Ein S. H., Mancer K. Pediatric malignant ovarian tumors a 43- year review. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 480-484
 34. Wollner N., Ghavimi F., Wachtel A. et al. Germ cell tumors in children gonadal and extragonadal. *Med Pediatr Oncol* 1991; 19: 228-239
 35. Brown M.F., Hebra A., Mc Geehin K. et al. Ovarian masses in children – a review of 991 cases of malignant and benign masses. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 930-933
 36. Rescorla F., Billmire D., Vinocur C. et al. The effect of neoadjuvant chemotherapy and surgery in children with malignant germ cell tumors of the genital region: a pediatric intergroup trial. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 910-912
 37. Haas R. J., Schmidt P., Göbel U. et al. Testicular germ cell tumors. Results of the GPO MAHO studies 82, -88, -92. *Klin Padiatr* 1995; 207: 145-150
 38. Tsuchida Y., Terada M., Honna T. et al. The role of subfractionation of alpha-fetoprotein in the treatment of pediatric surgical patients. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 514-517
 39. Schneider D. T., Calaminus G., Göbel U. Diagnostic value of alpha1-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin in infancy and childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2001;16:11-26
 40. Pinkerton C. R., Pritchard J., Spitz L. High complete response rate in children with advanced germ cell tumors using cisplatin – containing combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 1986; 4: 194-199

-
41. Mann J. R., Pearson D., Barrett A. et al. Results of the United Kingdom Children's Cancer Study Group's malignant germ cell tumor studies. *Cancer*. 1989; 63:1657-67
 42. Mann J. R., Raafat F., Robinson K. et al. The United Kingdom Children's Cancer Study Group's second germ cell tumor study: carboplatin, etoposide and bleomycin are effective treatment for children with malignant extracranial germ cell tumors, with acceptable toxicity. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3809-3818
 43. Martelli H, Patte C. Gonadal tumors in children. *Arch Fr Pediatr* 2003,10, 246-250.
 44. Calaminus G., Schneider D. T., Bokkerink J. P. et al. Prognostic value of tumor size, metastases, extension into bone, and increased tumor marker in children with malignant sacrococcygeal germ cell tumors: a prospective evaluation of 71 patients treated in the German cooperative protocols Maligne Keimzelltumoren (MAKEI) 83/86 and MAKEI 89. *J Clin Oncol* 2003;21: 781-6.
 45. Lo Curto M., Lumia F., Alaggio R. et al: Malignant germ cell tumors in childhood: results of the first Italian cooperative study „TCG 91”. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41: 417-425
 46. Popadiuk S., Korzon M., Szumera M. et al. Złośliwe guzy germinalne u dzieci: wieloośrodkowe badania prospektywne Polskiej Pediatrycznej Grupy Guzów Litych w latach 1998-2002. *Przegl Lek* 2004; 61: 29-32
 47. Popadiuk S., Korzon M., Czauderna P. et al. Preliminary treatment results of children with malignant germ cell tumors in Poland from 1998-2000. *Med Sci Mon* 2002; 8: 52-55
 48. Baranzelli M. C., Kramar A., Bouffet E. et al: Prognostic factors in children with malignant germ cell tumors *J Clin Oncol* 1999;17: 1212- 1218
 49. Risau W., Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1995,11, 73-91
 50. Grażul-Bilska A. T. Proces angiogenezy w żeńskim układzie rozrodczym. *Post. Biol. Kom.* 1990, 40, 81-89
 51. Hudlicka O., Brown M. D. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* 1992; 72: 369-417
 52. Burgos H. Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization. *Eur J Clin Invest* 1986; 16: 486-493
 53. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995;1: 27-31

-
54. Blood C. H., Zetter B. R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 89-118
 55. Pepper M. S., Montesano R., Mandriota S. J. et al. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 2: 209-215
 56. Arribas J. Matrix metalloproteinases and tumor invasion. *N Engl J Med* 2005;353:2020-2021
 57. Bicknell R., Harris A. L. Novel growth regulatory factors and tumor angiogenesis. *Eur J Cancer* 1991; 27: 781-785
 58. Beckner M. E. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest* 1999; 17: 594-623
 59. Ellis R., Fidler I. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32 A: 2451- 2460
 60. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907; 2: 1236-1239
 61. Greenblatt M., Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 11-124
 62. Folkman J., Merler E., Abernathy C. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133: 275-288
 63. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974; 34: 2109-2113
 64. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
 65. Choi K. S., Bae M. K., Jeong J. W. et al. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:120-127
 66. Claffey K. P., Robinson G. S. Regulation of VEGF/ VPF expression in tumor cells. Consequences for tumor growth and metastasis? *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 165-176
 67. Mazure N. M., Chen E. Y., Yeh P. et al. Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 1996; 56: 3436-3440
 68. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA. et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584

-
69. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6161-6165
 70. Rak J., Filmus J., Finkenzeller G. et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 263-277
 71. Szala S., Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19
 72. Aviezer D., Hecht D., Safran M. et al. Perlecan, basal lamina proteoglycan promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis and angiogenesis *Cell* 1994; 79: 1005-1013
 73. Bouck N., Stellmach V., Hsu S. C. How tumors become angiogenic? *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-174
 74. Chechlińska M. Rola cytokin w procesie nowotworzenia. *Nowotwory* 2003; 53: 648-659
 75. Risau W. What, if anything is angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 149-151
 76. Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor, that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985
 77. Connolly D. T., Olander J. V., Heuvelman D. et al. Human vascular permeability factor isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 20017-20024
 78. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor in angiogenesis; a historical review. *Br J Hematol* 2004; 128: 303-309
 79. Mustonen T., Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 1995; 129: 895-898
 80. Terman B. I., Dougher-Vermazen M. Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15: 159-163
 81. Loch T., Michalski B., Mazurek U, et al. Naczyniowo- śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i jego rola w procesie nowotworowym. *Post Hig Med Dośw* 2001; 55: 257-274
 82. Vincenti V., Cassano C., Rocchi M. et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21. *Circulation* 1996; 93: 1493-1495

-
83. Liu Y., Cox S., Morita T. et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of 5' enhancer. *Circ Res* 1995; 77: 638-643
 84. Thomas K. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606
 85. Bellamy W. T., Richter L., Frutiger Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 728-733
 86. Dvorak H. F., Harvey V.S., Estrella P. et al. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implication for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686
 87. Kim K. J., Li B., Winer J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362:841-844
 88. Alon T., Hemo I., Itin A. et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med* 1995; 1:1024-1028
 89. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the nearest future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515
 90. Schriener M. Antiangiogenic chemotherapeutic agents. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 67-73
 91. Weidner N, Semple J. P., Welch W. R et al. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 340, 1-8
 92. Tadeusiewicz R. *Statystyka w badaniach medycznych*. PWN. Warszawa 1998
 93. Weidner N., Carroll P. R., Flax J. et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409
 94. Banner B. F., Whitehouse R., Baker S. P et al. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma: association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998;109: 733-737
 95. Frangou E. M., Lawson J., Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 16-19
 96. Takahashi Y., Kitadai Y., Bucana C. D. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*; 55: 3964-3968

-
97. Linderholm B. K, Lindh B., Beckman L, et al. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin Breast Cancer* 2003; 4: 340-347
 98. Gadolucci A, Viacava P., Cosio S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in primary tumors and peritoneal metastases from patients with advanced ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 3001-8
 99. Leung W. K., To K. F., Go M. Y. et al. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1317-1322
 100. Ozer E., Sarialioglu E., Centigoz R. et al. Prognostic significance of anaplasia and angiogenesis in child medulloblastoma: a pediatric oncology group study. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 501-509
 101. Gasparini G., Toi M., Gion M. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node negative breast carcinoma. *J. Natl Cancer Inst* 1997; 89: 139-147
 102. Crew J. P., O'Brien T., Brandburn M. et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997, 57,5281-5285
 103. Karavasilis V., Malamou-Mitsi V., Briasoulis E. et al. Clinicopathologic study of vascular endothelial growth factor, trombospondin-1 and microvessel density assessed by CD34 in patients with stage III ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 241-246
 104. Li V. D., Folkerth R. D., Watanabe H. et al. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 1994; 334: 82-86
 105. Meitar D., Crawford S. E., Rademaker A. W. et al. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification and poor outcome in human neuroblastoma. *J. Clin Oncol* 1996; 14: 405-414
 106. Lee Y. H., Tokunaga T., Oshika Y. et al. Cell retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1089-1093
 107. Canette A., Navarro S., Bermudez J. et al. Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 27-34

-
108. Eggert A., Ikegaki N., Kwiatkowski J. et al. High level of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000; 5: 1900-1908
 109. Kaya M., Wada T., Akatsuka T. et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Cancer Res* 2000; 6: 572-577
 110. Ribatti D., Surico A., Vacca F. et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 2001; 68: 1161-1168
 111. Ghanem M. A., van Steenbrugge G. J., Sudaryo M. K. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT -1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* 2003; 56: 107-113
 112. Kreuter M., Bieker R., Bielack S. S. et al. Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8531-8537
 113. Mikulič D., Ilić I., Cepulič M. et al. Tumor angiogenesis and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2004; 21: 611-619
 114. Sun X. Y., Wu Z. D., Liao X. F. et al. Tumor angiogenesis and its clinical significance in pediatric malignant liver tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 741-743
 115. Pavlaković H, von Schutz V, Rossler J et al. Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. *Int J Cancer* 2001; 92: 756-760
 116. Blann A. D., Li J. L., Li C. et al. Increased serum VEGF in 13 children with Wilms' tumor falls after surgery but rising levels predict poor prognosis. *Cancer Letters* 2001; 173: 183-186
 117. Fukuda S., Shirahama T., Imazono Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* 1999; 85: 1323-1330
 118. Vaena D. A., Abonour R., Einhorn L. H. Long -term survival after high dose chemotherapy for germ cell malignancies with adverse prognostic variables. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4100-4104
 119. Vermeulen P. B., Gasparini G., Fox S. B. et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation *Eur J Cancer* 1996; 32a: 2474-2484
 120. Gacko M. Angiogeneza i metody jej oceny. *Diagn Lab* 1997; 33: 375-394

-
121. Białas M., Okoń K., Czopek J. Assessing microvessel density in gastric carcinoma: a comparison of three markers. *Pol J Pathol* 2003; 54: 249-252
 122. Eberhard A., Kahlert S., Goede V. et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000; 60:1388-1393
 123. Orre M., Lotfi-Miri M., Mamers P. et al Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumours of the ovary. *Br J Cancer* 1998; 77: 2204-2209
 124. Nakopoulou L., Lekkas N, Lazaris N. et al. An immunohistochemical analysis of angiogenesis in invasive breast cancer with correlation to clinopathological predictors. *Anticancer Res* 1999; 19: 4547-4553
 125. Viglietto G Romano A, Maglione D et al. Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of vascular endothelial growth factor but not placental derived growth factor. *Oncogene* 1996; 13: 577-587
 126. Saclarides T. J., Speziale N. J., Drab E. et al. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-926
 127. Schneider D. T., Calaminus G., Koch S. et al. Epidemiologic analysis of 1422 children and adolescents registered in German Germ Cell Tumor Protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42: 169-175
 128. Tanigawa N., Amaya H., Matsumara M. et al. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity and patient outcome in human gastric gastrinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 826-832
 129. Och W, Mariak Z, Smółka M et al. Ekspresja czynnika wzrostowego śródbłonna naczyń w nowotworach mózgu. *Neurol. Neurochir. Pol* 2001; 35: 1071-1079