

## Podstawowe parametry oceny angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych o lokalizacji pozaczaszkowej u dzieci

Katarzyna Sznurkowska<sup>1</sup>, Stefan Popadiuk<sup>1</sup>, Monika Klimkowska<sup>2</sup>, Maria Korzon<sup>1</sup>, Alicja Chybicka<sup>3</sup>, Katarzyna Bilaska<sup>4</sup>, Mariusz Wysocki<sup>5</sup>, Maria Dzierżęga<sup>6</sup>, Maryna Krawczuk-Rybak<sup>7</sup>, Jerzy Kowalczyk<sup>9</sup>, Krzysztof Szmyd<sup>3</sup>, Małgorzata Szumera<sup>1</sup>, Joanna Trelińska<sup>10</sup>, Jacek Wachowiak<sup>8</sup>, Halina Wiśniewska-Słusarz<sup>9</sup>, Wojciech Woźniak<sup>4</sup>

*Wstęp.* Angiogeneza nowotworowa stanowi przedmiot zainteresowania onkologów, ponieważ jest jedną z cech biologicznej złośliwości nowotworów oraz nieodzownym warunkiem 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.

*Cel pracy.* Celem pracy była ocena stopnia angiogenezy w złośliwych guzach germinalnych u dzieci na podstawie średniej gęstości naczyń (MVD – microvessel density) i ekspresji VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń) oraz poszukiwanie związków pomiędzy badanymi parametrami a podstawowymi cechami klinicznymi i morfologicznymi nowotworu.

*Materiał i metody.* 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 przeciwciała przeciw VEGF, do wyznakowania naczyń użyto monoklonalne przeciwciała 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.

*Wyniki.* 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 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.

*Wniosek.* Stopień angiogenezy koreluje z niektórymi cechami klinicznymi złośliwych guzów germinalnych u dzieci.

<sup>1</sup> Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej  
AM w Gdańsku

<sup>2</sup> Zakład Patomorfologii  
AM w Gdańsku

<sup>3</sup> Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii  
Dziecięcej  
AM we Wrocławiu

<sup>4</sup> Klinika Chirurgii Onkologicznej Dzieci i Młodzieży  
IMiDz w Warszawie

<sup>5</sup> Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii  
AM w Bydgoszczy

<sup>6</sup> Klinika Chirurgii Dziecięcej IP  
Collegium Medicum UJ w Krakowie

<sup>7</sup> Klinika Onkologii Dziecięcej  
AM w Białymstoku

<sup>8</sup> Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej  
II Katedry Pediatrii AM w Poznaniu

<sup>9</sup> Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej  
AM w Lublinie

<sup>10</sup> Klinika Pediatrii  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

## Basic parameters of angiogenesis' assessment in extracranial malignant germ cell tumors in children

*Introduction.* Tumor angiogenesis is a subject of interest of oncologists, being one of the hallmarks of biological malignancy necessary for their progression. Numerous publications according malignant tumors in children and adults show the correlation between angiogenesis and clinical and pathological characteristics as well as the prognostic value of angiogenesis.

Malignant germ cell tumors are a rare group of children's malignancies characterized by varied histology and clinical course. No reports on angiogenesis in pediatric germ cell tumors have been found in available publications.

*Aim of the study.* The aim of the study was the assessment of angiogenesis in pediatric malignant germ cell tumors on the basis of MVD and VEGF expression and finding the correlation between angiogenesis and clinical and pathological characteristics.

*Patients and methods.* 47 patients (29 girls and 18 boys) with malignant germ cell tumors treated in 9 centers cooperating within the Polish Pediatric Group for Treatment of Solid Tumors between 1994-2004 were included in the study. Immunohistochemistry was performed to assess studied parameters in histological specimens of tumors. VEGF expression was evaluated using polyclonal antibodies, MVD was determined using anti CD34 monoclonal antibody to highlight vessels, which were calculated by means of Weidner's method. VEGF expression was shown as a percentage of positively stained cells in tissue specimens.

*Results.* The mean value of microvessel density was  $45.9 \pm 20.6$  in a microscopic field ( $0.78 \text{ mm}^2$ ) ranging from 6.8-81.0. MVD was significantly higher in a group of younger children (<3 years) and in tumors located in testis comparing with ovarian germ cell tumors.

In all the patients the expression of VEGF was evident ranging from 40-90 % of positively stained cells. VEGF expression was significantly higher in metastatic malignant germ cell tumors. Positive correlation between measured parameters: MVD and VEGF was found.

*Conclusions.* The extent of angiogenesis correlates with some clinical features of malignant germ cell tumors in children.

**Słowa kluczowe:** złośliwe guzy germinalne, angiogeneza, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, średnia gęstość naczyniowa

**Key words:** malignant germ cell tumors, angiogenesis, microvessel density, VEGF expression

Złośliwe guzy germinalne należą do rzadkich nowotworów złośliwych u dzieci, stanowiąc jedynie 3% nowotworów złośliwych wieku rozwojowego [1]. 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. Do najczęstszej lokalizacji należą gonady, okolica krzyżowogonowa oraz centralny układ nerwowy. W Polsce notuje się około 25 zachorowań rocznie na złośliwe guzy germinalne o lokalizacji pozaczaszkowej oraz 5-6 zachorowań na guzy germinalne ośrodkowego układu nerwowego, które są ujmowane w rejestrach łącznie z innymi procesami rozrostowymi wewnątrz jamy czaszkowej [1, 2].

Podział morfologiczny złośliwych guzów germinalnych u dzieci oparty jest na kierunku różnicowania pierwotnej komórki płciowej [3].

Różnorodna budowa histologiczna złośliwych guzów germinalnych warunkuje ich odmienny obraz kliniczny oraz odmiennie rokowanie, co wiąże się także ze zróżnicowaną strategią leczniczą [2].

Leczenie złośliwych guzów germinalnych jest skojarzone i obejmuje zabieg chirurgiczny oraz wielolekową chemioterapię, dostosowaną do rozpoznania histopatologicznego oraz grupy ryzyka, która ustalana jest w zależności od wyjściowego poziomu AFP (w przypadku guzów wydzielających) oraz stopnia zaawansowania klinicznego

[4, 5]. 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 [4, 5].

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 [6]. 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.

Istnieją różne metody oceny stopnia angiogenezy. Do najczęstszych i najstarszych należy oznaczanie gęstości naczyń w guzach nowotworowych (*microvessel density* – MVD), która jest bezpośrednią metodą oceny angiogenezy – w jej końcowym etapie [7]. W bardzo licznych badaniach dokonuje się także oceny ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), który jest najważniejszą cytokiną proangiogenną, stymulującą angiogenezę na wszystkich etapach [8].

Badania nad unaczynieniem guzów litych wykazały dodatnią zależność pomiędzy gęstością naczyń krwionoś-

nych i tworzeniem przerzutów, nawrotami choroby oraz złym rokowaniem [7].

Większość dotychczas prowadzonych badań nad angiogenezą nowotworową dotyczy nowotworów osób dorosłych – zwłaszcza guzów litych [7, 9-11]. Znacznie mniejsza liczba doniesień dotyczy problemu neoangiogenezy w nowotworach dziecięcych [12,13]. Brak jest doniesień na temat angiogenezy w guzach germinalnych u dzieci, w związku z czym podjęto temat niniejszej pracy.

### Cel pracy

Za cel pracy przyjęto ocenę podstawowych parametrów angiogenezy: MVD (gęstości naczyń w guzie) i stopnia ekspresji VEGF w złośliwych guzach germinalnych u dzieci, a także poszukiwanie związku pomiędzy badanymi parametrami, a podstawowymi cechami klinicznymi i patomorfologicznymi w tych nowotworach.

### Materiał i metody

#### Pacjenci

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 materiał histopatologiczny, pochodzący z pierwotnych zabiegów operacyjnych resekcji guza oraz z diagnostycznych biopsji operacyjnych. Dane kliniczne pochodziły z ankiet przesłanych z poszczególnych ośrodków klinicznych, biorących udział w badaniu.

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). Badaną grupę podzielono ze względu na wiek, płeć, stadium zaawansowania, rozpoznanie histopatologiczne i obecność przerzutów (Tab. I).

#### Badania immunohistochemiczne

Materiał tkankowy utrwalano w 4% formalinie przez 24-72 godziny, odwadniano przy użyciu alkoholu etylowego, a następnie zatopiano w parafinie. Po skrojeniu bloków na skrawki grubości 4  $\mu\text{m}$  materiał poddano rutynowemu barwieniu hematoksyliną i eozyną. Następnie dokonywano selekcji skrawków – wybierano te, które zawierały utkanie nowotworowe, bez cech 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 przypadkach użyto następnie 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 diaminobenzzydinę (DAB). 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,

Tab. I. Podsumowanie danych klinicznych, epidemiologicznych i histopatologicznych badanej grupy

Cecha	Podgrupy	n	%
Płeć	Dziewczynki	29	61,7
	Chłopcy	18	38,3
Rozpoznanie histopatologiczne	<i>Yolk sac tumor</i>	16	34,1
	<i>Tumor mixtus</i>	13	27,6
	<i>Carcinoma embryonale</i>	5	10,6
	<i>Teratoma immaturum et malignum</i>	8	17,1
Stadium zaawansowania	<i>Dysgerminoma</i>	5	10,6
	I	10	21,3
	II	17	36,2
	III	11	23,4
Obecność przerzutów	IV	9	19,1
	M1	9	19,1
Lokalizacja	M0	38	80,9
	Jądnik	21	44,7
	Jądro	16	34,0
	Okolica krzyżowo-ogonowa i miednica mniejsza	10	21,3

*Yolk sac tumor* – guz pęcherzyka żółtkowego

*Tumor mixtus* – mieszany guz germinalny

*Carcinoma embryonale* – rak zarodkowy

*Teratoma immaturum et malignum* – potworniak niedojrzały i złośliwy

*Dysgerminoma* – rozrodczak

zgodnie z procedurą opisywaną przez Weidnera [14]. Następnie przy powiększeniu 200x, naczynia liczone w 3 polach widzenia. Stopień ekspresji VEGF oceniano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x na podstawie odsetka komórek immunoreaktywnych.

#### Metody statystyczne

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 [15].

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

##### Średnia gęstość naczyń-MVD (*microvessel density*)

Średnia gęstość naczyń 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).

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic gęstości naczyniowej w poszczególnych grupach różniących się płcią, stadium zaawansowania i budową histologiczną i obecnością przerzutów.

Znamieną statystycznie różnicę gęstości naczyniowej znaleziono natomiast pomiędzy grupami wiekowymi

Tab. II. Rozkład gęstości naczyniowej w poszczególnych podgrupach badanych dzieci ze złośliwymi guzami germinalnymi

Cecha	n	średnia	OS	mediana	wartość p
Płeć					
dziewczynki	29	42,00	21,29	35,10	0,07
chłopcy	18	52,25	18,28	54,15	
Rozpoznanie histopatologiczne					
<i>yolk sac tumor</i>	16	48,33	22,94	51,95	0,62
<i>tumor mixtus</i>	13	38,66	16,86	43,50	
<i>carcinoma embryonale</i>	5	46,26	31,62	30,80	
<i>teratoma immaturum et malignum</i>	4	54,08	16,29	59,40	
<i>dysgerminoma</i>	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
M0	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 36 m-cy	32	41,31	35,35	19,71	

pacjentów. W grupie dzieci poniżej 3 lat parametr ten wynosił średnio 55,78 w porównaniu do 41,31 u dzieci starszych ( $p=0,02$ ). Znamienne wyższe wartości MVD stwierdzano także w jądrze w porównaniu do jajnika.

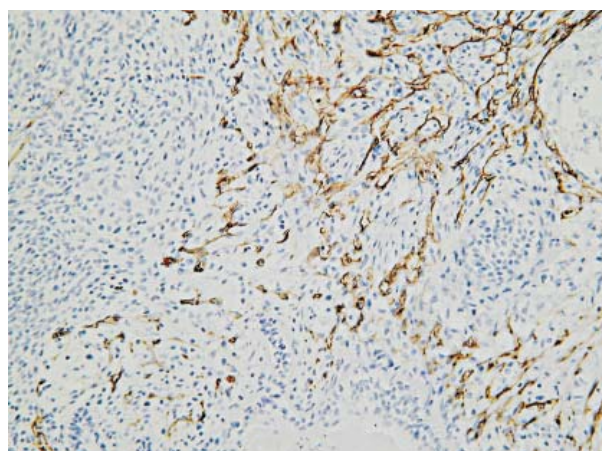
Uzyskane wartości średniej gęstości naczyniowej w tych grupach wraz z wartościami p przedstawiono w Tabeli II.

Na Rycinie 1 przedstawiono obraz mikroskopowy wycinka guza germinalnego, w którym uwidoczniono naczynia przy użyciu opisanej metody.

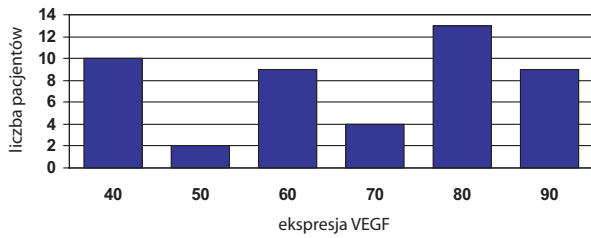
### Ekspresja VEGF

U wszystkich badanych pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi stwierdzono nasiloną ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń w tkance guza. Obecność VEGF uwidoczniono w cytoplazmie i na powierzchni komórek nowotworu. Uzyskane wyniki ekspresji VEGF zawierały się w przedziale 40-90%, a mediana wynosiła 70%. Wyniki ekspresji VEGF oraz liczby pacjentów, u których uzyskano poszczególne wartości, przedstawiono na Rycinie 2.

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. Znamienne statystycznie różnicę stopnia eks-



Ryc. 1. Potwornik niedojrzały (*teratoma immaturum*) o dużej gęstości naczyń (CD34, powiększenie 200x)



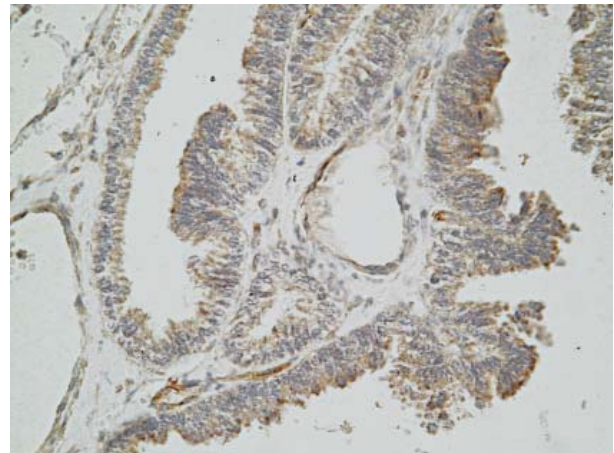
Ryc. 2. Rozkład stopnia ekspresji VEGF w badanej grupie

presji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń stwierdzono pomiędzy grupą pacjentów, w 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, stadiem zaawansowania. Wyniki ekspresji VEGF w poszczególnych grupach przedstawiono w Tabeli III.

Na Rycinie 3 przedstawiono obraz mikroskopowy wycinka guza germinalnego, w którym dokonano oceny ekspresji VEGF przy użyciu opisanej metody

Tab. III. Rozkład ekspresji VEGF w poszczególnych podgrupach badanych dzieci ze złośliwymi guzami germinalnymi

Cecha	N	Mediana	wartość p
<b>Płeć</b>			
dziewczynki	29	60	0,40
chłopcy	18	80	
<b>Rozpoznanie histopatologiczne</b>			
<i>yolk sac tumor</i>	16	80	0,22
<i>tumor mixtus</i>	13	60	
<i>carcinoma embryonale</i>	5	80	
<i>teratoma immaturum et malignum</i>	4	60	
<i>dysgerminoma</i>	5	60	
<b>Stadium zaawansowania</b>			
I	10	70	0,06
II	17	60	
III	11	70	
IV	9	80	
<b>Obecność przerzutów</b>			
M1	9	80	0,03
M0	38	60	
<b>Lokalizacja</b>			
jajnik	21	60	0,25
jądro	16	80	
okolica krzyżowo-ogonowa i miednica mniejsza	10	70	
<b>Lokalizacja</b>			
jajnik	21	60	0,23
jądro	16	80	
<b>Wysokość MVD</b>			
$\geq 43,6$	24	80	0,01
$< 43,6$	23	60	
<b>Wiek</b>			
poniżej 36 m-cy	15	80	0,37
powyżej 36 m-cy	32	60	



Ryc. 3. Guz pęcherzyka żółtkowego (*yolk sac tumor*) o dużej ekspresji VEGF w komórkach nowotworu

Przeanalizowano także związek pomiędzy badanymi parametrami. Stwierdzono średnio silną dodatnią zależność pomiędzy średnią gęstością naczyń a ekspresją czynnika wzrostu śródbłonna naczyń przy zastosowaniu analizy korelacji rang Spearmana. Współczynnik R Spearmana wynosił 0,45. Zależność średniej gęstości naczyń od ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń przedstawiono na Rycinie 4.

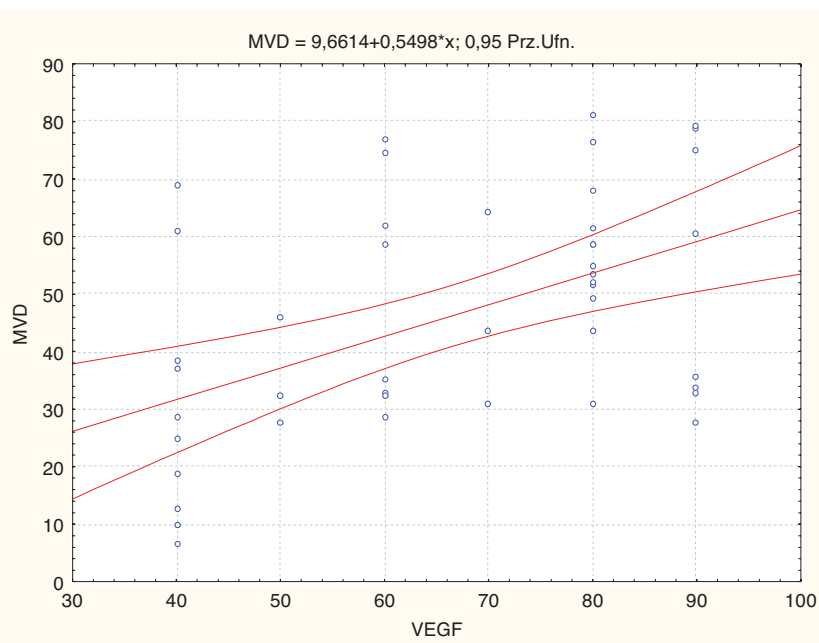
## Omówienie

Określenie związku angiogenezy z klinicznymi i morfologicznymi czynnikami złośliwości nowotworów jest najważniejszym problemem poruszonym przez badaczy zajmujących się tym zagadnieniem. Dotychczas opracowano bardzo liczne metody oceny angiogenezy, z których najważniejsze to ocena gęstości naczyń w guzie nowotworowym (*microvessel density* – MVD) oraz stopień ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Metodami tymi posłużono się także w niniejszej pracy.

Dodatnią korelację pomiędzy MVD, a klinicznymi cechami złośliwości wykazano w bardzo wielu nowotworach u ludzi dorosłych, przede wszystkim w raku piersi, jelita grubego, żołądka, gruczołu krokowego, szyjki macicy [7, 16, 17]. Wyniki badań innych autorów nie potwierdzają jednak tych zależności [18].

Trudność w wystandaryzowaniu metody oznaczania MVD jest jej najpoważniejszą wadą. Mimo prób ujednoczenia metodyki określania stopnia unaczynnienia guzów nowotworowych autorzy badań posługują się różnymi metodami, co może odpowiadać za rozbieżność uzyskiwanych wyników [19].

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 [20, 21]. Badania innych autorów nie potwierdzają tych obserwacji [22, 23]. Fakt ten można wytłumaczyć bardzo dużą złożonością procesu angiogenezy, w który zaangażowane są liczne związki



Ryc. 4. Zależność pomiędzy VEGF a MVD. Współczynnik R Spearmana = 0,45

stymulujące i inhibitory, a końcowy efekt jest wypadkową ich wzajemnego oddziaływania.

Badania na temat angiogenezy w nowotworach dziecięcych są stosunkowo nieliczne, ale podobnie jak w badaniach dotyczących neoangiogenezy u ludzi dorosłych wyniki są rozbieżne. Przykładem może być badanie dotyczące zwojaka zarodkowego współczulnego (*neuroblastoma*), opublikowane przez Cannette i wsp [24]. W badaniu tym, w przeciwieństwie do danych uzyskanych przez większość autorów, nie potwierdzono prognostycznego znaczenia stopnia angiogenezy, nie stwierdzono także dodatniej korelacji pomiędzy stopniem angiogenezy i innymi klinicznymi, morfologicznymi i molekularnymi czynnikami rokowniczymi [24, 25].

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 [26]. Nie ma natomiast doniesień o neoangiogenezie w guzach germinalnych o innych lokalizacjach oraz opracowań dotyczących wyłącznie dzieci.

W badanej grupie dzieci z ZGG średnia gęstość naczyń wynosiła 6,8-81,0 (wartość średnia 45,9) w polu widzenia (powierzchnia pola widzenia – 0,78 mm<sup>2</sup>). Po przeliczeniu na 1 mm<sup>2</sup> wartości te wynoszą odpowiednio 8,7-103,8/mm<sup>2</sup> – średnia 58,8/mm<sup>2</sup>.

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 niejednorodnej metodyki.

Średnia gęstość naczyniowa w ZGG u dzieci jest wyższa niż w pewnych nowotworach wieku rozwojowego, takich jak guz Wilmsa (nerczak płodowy), należącej podobnie jak złośliwe guzy germinalne do nowotworów o dość dobrym rokowaniu [27]. Inne, takie jak mięsak kościopochodny (*osteosarcoma*), cechują się bardziej

obfitym unaczynieniem, które wynosi średnio 156 naczyń na mm<sup>2</sup> [28]. Znacznie wyższą gęstość naczyniową stwierdza się w zwojaku zarodkowym, średnia liczba naczyń przypadająca na mm<sup>2</sup> jest bowiem 9-krotnie wyższa niż w złośliwych guzach germinalnych [24]. Wyniki te mogą potwierdzać znaczenie angiogenezy jako cechy złośliwości nowotworu.

W niniejszej pracy dokonano oceny związku pomiędzy stopniem unaczynienia, a tworzeniem przerzutów, który jest jednym z ważniejszych problemów poruszanych przez autorów zajmujących się angiogenezą. Stwierdzono wprawdzie 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. W grupie pacjentów z przerzutami stwierdzano natomiast znamienne wyższy stopień ekspresji VEGF, co jest zgodne z wynikami podanymi przez licznych autorów [29, 30]. Porównanie średniej gęstości naczyń w grupach wiekowych pozwoliło na stwierdzenie znamienne wyższego stopnia unaczynienia guzów germinalnych u dzieci młodszych – poniżej 3 lat, co może stanowić kolejny argument przemawiający za odmiennymi właściwościami biologicznymi guzów w tej grupie chorych. Fakt odmiennego, bardziej agresywnego przebiegu klinicznego złośliwych guzów germinalnych w grupie dzieci młodszych i starszych znany jest bowiem od dawna, a badania cytogenetyczne i molekularne potwierdzają wcześniejsze obserwacje kliniczne o biologicznych różnicach między tymi grupami nowotworów [31, 32].

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wskazują na bardzo wysoką ekspresję VEGF w badanej grupie. Odsetek komórek immunoreaktywnych zawiera się w przedziale 40-90%. U żadnego pacjenta nie stwierdzano ujemnej ekspresji VEGF. Uzyskane wyniki różnią się diametralnie od wyników podanych przez Fukudę i wsp., który stwierdził brak ekspresji VEGF aż u nie-

mal 60% pacjentów ze złośliwymi guzami germinalnymi jąder, przy czym za brak ekspresji VEGF autor ten uznał występowanie poniżej 5% komórek immunoreaktywnych w tkance nowotworowej. Należy jednak podkreślić, 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 ekspresję VEGF u 81% pacjentów z germinalnymi guzami jąder [33].

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. Wynik ten, podawany również przez innych autorów, podkreśla rolę, jaką odgrywa VEGF w tworzeniu naczyń [34].

### Wnioski

1. Złośliwe guzy germinalne u dzieci należą do nowotworów o umiarkowanie wysokiej gęstości naczyniowej.
2. U wszystkich badanych chorych stwierdzono wyraźną ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF.
3. Gęstość naczyń w złośliwych guzach germinalnych jest wyższa u dzieci młodszych.
4. Spośród guzów germinalnych zlokalizowanych w gonadach wartości wyższe obserwowano w jądrze.
5. Wyższy stopień ekspresji VEGF występuje u pacjentów z ZGG z przerzutami.
6. Wykazano dodatnią zależność pomiędzy badanymi parametrami: gęstością naczyniową i ekspresją VEGF.

**Katarzyna Sznurkowska MD**

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej  
AM w Gdańsku  
80-803 Gdańsk, ul. Nowe Ogrody 1-6  
email: k.sznurkowska@amg.gda.pl

### Piśmiennictwo

1. Kowalczyk JR, Dudkiewicz E. Częstość występowania nowotworów złośliwych u dzieci w Polsce i możliwości wczesnego wykrywania. *Przegl Pediatr* 1999; 29: 199-202.
2. Korzon M. *Złośliwe guzy zarodkowe u dzieci*. Gdańsk: Akwilon 2002.
3. Liebhart M. Patomorfologia złośliwych guzów zarodkowych u dzieci. W: Korzon M (red.). *Złośliwe guzy zarodkowe u dzieci*. Gdańsk: Akwilon 2002.
4. Popadiuk S, Korzon M, Szumera M i wsp. Złośliwe guzy germinalne u dzieci: wielośrodkowe badania prospektywne Polskiej Pediatrycznej Grupy Guzów Litych w latach 1998-2002. *Przegl Lek* 2004; 61: 29-32.
5. Popadiuk S, Korzon M, Czauderna P i wsp. Preliminary treatment results of children with malignant germ cell tumors in Poland from 1998-2000. *Med Sci Mon* 2002; 8: 52-5.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-6.
7. Szala S, Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19.

8. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis; a historical review. *Br J Hematol* 2004; 128: 303-9.
9. Leon SP, Folkerth RD, Black PM i wsp. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 1996; 77: 362-72.
10. Frangou EM, Lawson J, Kanthan R i wsp. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 3-16.
11. Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y i wsp. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 11: 2340-6.
12. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U i wsp. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-21.
13. Gesundheit B, Klement G, Senger C i wsp. Differences in vasculature between pilocytic and anaplastic astrocytomas of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41: 516-26.
14. Weidner N, Semple JP, Welch WR i wsp. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 340: 1-8.
15. Tadeusiewicz R. *Statystyka w badaniach medycznych*. Warszawa: PWN; 1998.
16. Weidner N, Carroll PR, Flax J i wsp. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-9.
17. Pavlopoulos PM, Konstantinidu AE, Agapitos E i wsp. Morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2067-75.
18. Frangou EM, Lawson J, Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 16.
19. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB i wsp. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32a: 2474-84.
20. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964-8.
21. Linderholm BK, Lindh B, Beckman L i wsp. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin Breast Cancer* 2003; 4: 340-7.
22. Tomita M, Matsuzaki Y, Shimizu T i wsp. Vascular endothelial growth factor expression in pN2 non- small cell lung cancer: lack of prognostic value. *Respiratology* 2005; 10: 31-5.
23. Ozer E, Sarialioglu E, Centigöz R i wsp. Prognostic significance of anaplasia and angiogenesis in child medulloblastoma: a pediatric oncology group study. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 501-9.
24. Canette A, Navarro S, Bermudez J i wsp. Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 27-34.
25. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J i wsp. High level of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000; 5: 1900-8.
26. Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer* 1999; 85: 1323-30.
27. Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol* 2003; 56: 107-13.
28. Mikulić D, Ilić I, Cepulić M i wsp. Tumor angiogenesis and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2004; 21: 611-9.
29. Kaya M, Wada T, Akatsuka T i wsp. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Cancer Res* 2000; 6: 572-7.
30. Meitar D, Crawford S E, Rademaker AW i wsp. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification and poor outcome in human neuroblastoma. *J. Clin Oncol* 1996; 14: 405-14.
31. Rescorla SJ, Breitfeld PP. Pediatric germ cell tumors. *Current Probl Cancer* 1999; 23: 257-303.
32. Schneider D T, Calaminus G, Koch S i wsp. Epidemiologic analysis of 1422 children and adolescents registered in German Germ Cell Tumor Protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42: 169-75.
33. Viglietto G, Romano A, Maglione D i wsp. 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: 577-87.
34. Hartenbach EM, Olson TA, Goswitz JJ i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Letters* 1997; 121: 169-75.

Otrzymano: 17 lipca 2007 r.

Przyjęto do druku: 1 października 2007 r.