

Artykuły oryginalne • Original papers

Analiza ekspresji wybranych czynników krzepnięcia krwi w guzie pierwotnym raka piersi i ogniskach przerzutowych w okolicznych węzłach chłonnychMarek Z. Wojtukiewicz¹, Zbigniew Sawicki¹, Ewa Sierko¹, Lech Zimnoch²

Wstęp. W Polsce rak piersi jest główną przyczyną zachorowań i zgonów kobiet z powodu nowotworów złośliwych. W przebiegu tego nowotworu stosunkowo często obserwuje się występowanie powikłań zakrzepowo-zatorowych. Celem niniejszej pracy była ocena ekspresji wybranych czynników krzepnięcia krwi w ognisku pierwotnym tego nowotworu i przerzutach nowotworowych w węzłach chłonnych pachowych.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiły wycinki raka gruczołowego piersi pobrane podczas zabiegów operacyjnych. W badaniach wykorzystano barwienie immunohistochemiczne według metody ABC.

Wyniki. Wykazano ekspresję czynnika tkankowego (TF), fragmentu 1+2 protrombiny (F1 + 2) i fibryny zarówno w ognisku pierwotnym, jak również w przerzutach nowotworowych.

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazują, iż w raku piersi dochodzi do lokalnej aktywacji krzepnięcia krwi zarówno w ognisku pierwotnym, jak i w miejscach przerzutów nowotworowych zlokalizowanych w węzłach chłonnych. Z uwagi na fakt, że składowe układu hemostazy, m. in. TF, trombina i fibryna ułatwiają wzrost i rozsiew nowotworów, celowe wydaje się przeprowadzenie u chorych na raka piersi badań klinicznych z zastosowaniem czynników interferujących z układem krzepnięcia krwi.

Słowa kluczowe: rak piersi, krzepnięcie krwi

Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Jest on przyczyną około 20% wszystkich zachorowań na nowotwory oraz około 15% ogółu zgonów z tego powodu. Leczenie chorych na raka piersi ma charakter wielodyscyplinarny i długotrwały. Wybór rodzaju leczenia jest uzależniony m.in. od stadium klinicznego zaawansowania choroby nowotworowej. Niestety, u wielu pacjentów, z uwagi na obecność przerzutów odległych, już w momencie ustalenia rozpoznania, leczenie radykalne nie może być podjęte. Ponadto brak przerzutów odległych w chwili rozpoznania choroby nowotworowej wcale nie gwarantuje sukcesu terapeutycznego, ponieważ u części chorych, pomimo zastosowania skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, dochodzi po pewnym czasie do nawrotu choroby. Rozsiew nowotworu jest możliwy dopiero wówczas, gdy w ognisku pierwotnym pojawią się zmiany fenotypu komórek nowotworowych, umożliwiające zwiększoną zdolność miejscowego naciekania, oddzielenia się od masy nowotworu złośliwego, penetracji błony podstawnej naczynia, przemieszczania się i prze-

życia w łożysku naczyniowym oraz przeżycia i proliferacji w miejscu odległym. Okazuje się, iż w interakcjach pomiędzy komórką nowotworową a otaczającym ją środowiskiem istotną rolę odgrywa układ hemostazy. Efektem aktywacji krzepnięcia krwi są zarówno klinicznie jawne powikłania zakrzepowo-zatorowe, np. zakrzepica żył głębokich kończyn, wędrujące zapalenie żył powierzchownych, niebakteryjne zakrzepowe zapalenie wsierdza, zakrzepica tętnic mózgowych i palców, jak również nieprawidłowości stwierdzane jedynie w badaniach laboratoryjnych krwi, m.in. wzrost stężenia kompleksu trombina – antytrombina III, fibrynogenu, produktów degradacji fibrynogenu, zwiększenie aktywności czynnika XIII czy zmniejszenie aktywności białka C [1-4].

Zaburzenia krzepnięcia krwi mogą być inicjowane przez komórki nowotworowe, mogą być pochodzenia jatrogennego [5-7], jak też mogą być skutkiem działania innych bodźców patogenetycznych (np. otyłość, unieruchomienie, zakażenia, etc.) [8]. Powikłania zakrzepowo-zatorowe występują w każdym stadium zaawansowania choroby nowotworowej. Mogą o kilka lat wyprzedzać rozpoznanie choroby nowotworowej [9], mogą pojawiać się w jawnej klinicznie fazie choroby nowotworowej [10], mogą też być bezpośrednią przyczyną zgonu chorego na nowotwór [11]. Aktywacja krzepnięcia krwi u tych chorych może zachodzić nie tylko w łożysku naczyniowym, ale także w przestrzeni pozanaczyniowej [2, 12].

¹ Klinika Onkologii

² Zakład Patomorfologii Lekarskiej
AM w Białymstoku

Koncepcja monoklonalnego rozwoju nowotworu zakłada, iż nowotwór złośliwy jest jednym klonem „prakomórki”. Spostrzeżenia kliniczne w wielu wypadkach nie potwierdzają tej teorii. Istnieją różnice fenotypowe pomiędzy komórkami nowotworowymi zarówno w obrębie jednego ogniska nowotworowego, jak również pomiędzy różnymi ogniskami nowotworowymi. Przejawia się to w szczególności heterogennością cech morfologicznych poszczególnych komórek nowotworowych [13]. Efektem występowania różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi, nawet w tym samym ognisku chorobowym, są między innymi ich odmienne właściwości antygenowe, metaboliczne i proliferacyjne [14]. W komórkach nowotworowych w ognisku pierwotnym i w przerzutach nowotworowych w węzłach chłonnych pachowych wykazano porównywalną ekspresję receptorów EGFR [15] i c-erbB2 [15, 16] oraz białka p53 [15, 16], Ki-67 [16], a także odsetek komórek w fazie S [17]. Natomiast znaczące różnice ilościowe występują w ekspresji receptorów hormonalnych [18, 19]. Z kolei analiza 54 przypadków obustronnych metachronicznych raków piersi wykazała, iż ekspresja białka p53 oraz HER2 jest w tych przypadkach porównywalna, natomiast różnice występują w nasileniu stopnia ekspresji receptorów hormonalnych [20].

Jak dotąd zbadano ekspresję białek układu krzepnięcia krwi w ognisku pierwotnym wielu nowotworów złośliwych [21-26], brak jest jednak jakichkolwiek danych dotyczących ekspresji składowych układu krzepnięcia krwi w przerzutach nowotworowych pochodzących z raka piersi. Porównanie ekspresji białek układu krzepnięcia krwi w ognisku przerzutowym w odniesieniu do miejsca pierwotnego może pomóc w określeniu roli układu hemostazy w rozwoju raka piersi.

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji wybranych białek układu krzepnięcia krwi (czynnik tkankowy – TF, fragment 1+2 protrombiny – F1+2, fibryna) w ognisku pierwotnym raka piersi i przerzutach nowotworowych zlokalizowanych w obrębie pachowych węzłów chłonnych.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły fragmenty naciekającego przewodowego raka gruczołowego (*adenocarcinoma ductale infiltrans*) pochodzące z ogniska pierwotnego i przerzutów nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych, pobrane podczas zabiegu operacyjnego od 10 chorych na raka piersi. Fragmenty guzów nowotworowych utrwalono w zbuforowanej formalinie, a następnie zatopiono w parafinie o niskiej temperaturze topnienia. Wycinki nowotworów poddano barwieniom techniką immunohistochemiczną według metody ABC z wykorzystaniem zestawów Vectastain Kits firmy Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA [27]. Powyższa metoda opiera się na tworzeniu kompleksów awidyna – biotyna, z wykorzystaniem diaminobenzydyny jako substratu. Ocena ekspresji badanych białek została dokonana przy zastosowaniu następujących unikatowych, wysokospecyficznych przeciwciał:

- przeciwciało T₂G₁ – reagujące z fibryną II. Użyto mieszaniny dwóch, mysich przeciwciał monoklonalnych: intact oraz

F(ab')₂. Otrzymano je od dr Bohdana Kudryka z Lindsley F. Kimball Research, New York, Blood Center, NY, USA;

- królicze, poliklonalne przeciwciało przeciwko ludzkiemu rekombinowanemu czynnikowi tkankowemu. Otrzymano je od prof. Waltera Kisiela z University of New Mexico, Department of Patology, School of Medicine, Albuquerque, USA;
- królicze, poliklonalne przeciwciało przeciwko fragmentowi protrombiny 1+2. Otrzymano je od prof. Waltera Kisiela z University of New Mexico, Department of Patology, School of Medicine, Albuquerque, USA.

Poszukiwane antygeny uwiadczały się jako brązowy produkt reakcji.

Wyniki

TF

Silną ekspresję TF związanego z komórkami nowotworowymi wykazano zarówno w ognisku pierwotnym raka piersi, jak również w miejscach przerzutów nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych. Antygeny TF stwierdzono także w ścianach drobnych naczyń krwionośnych oraz w makrofagach – zarówno w obrębie guza pierwotnego, jak również w przerzutach nowotworowych w węzłach chłonnych (Ryc. 1, 2).

Fragment protrombiny 1+2

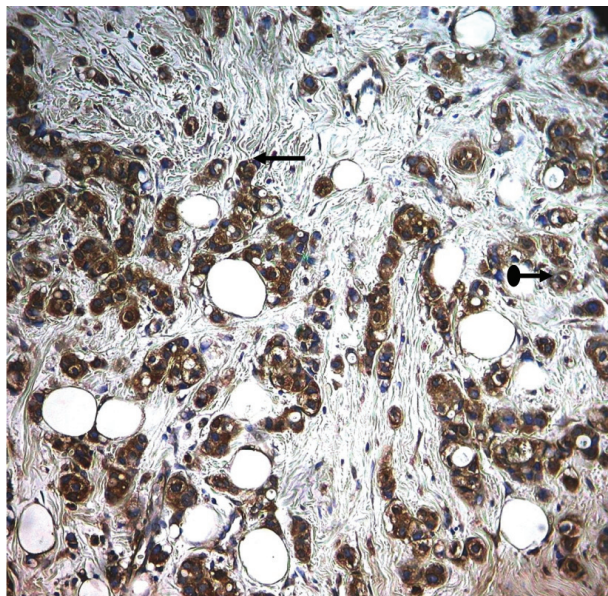
Nierównomierną, intensywną ekspresję antygenów fragmentu protrombiny 1+2 wykazano w komórkach nowotworowych w ognisku pierwotnym raka piersi oraz w miejscach przerzutów nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych. Zaobserwowana ekspresja tego peptydu była nierównomierna – tzn. nie wszystkie komórki nowotworowe wykazywały obecność F1+2. Występowanie F1+2 stwierdzono także w makrofagach i ścianach drobnych naczyń krwionośnych – zarówno w obrębie guza pierwotnego, jak również w przerzutach nowotworowych (Ryc. 3, 4).

Fibryna

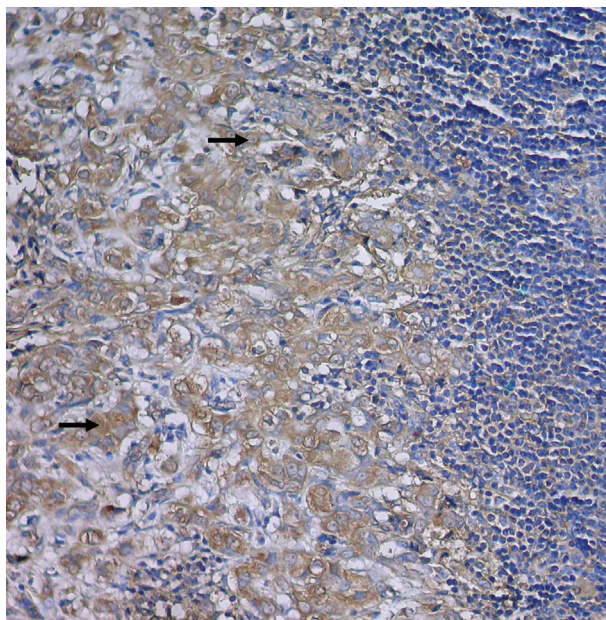
Wykazano silny odczyn immunohistochemiczny na obecność antygenów fibryny, powiązany z komórkami nowotworowymi raka piersi, zlokalizowanymi w obrębie ogniska pierwotnego. Natomiast w komórkach nowotworowych raka piersi zlokalizowanych w przerzutach nowotworowych w pachowych węzłach chłonnych ekspresja fibryny była słabsza niż w ognisku pierwotnym. W niektórych przypadkach ekspresja fibryny była widoczna we wszystkich komórkach nowotworowych, w innych zaś – była bardzo nierównomierna – dotyczyła tylko części komórek raka piersi (Ryc. 5, 6).

Omówienie

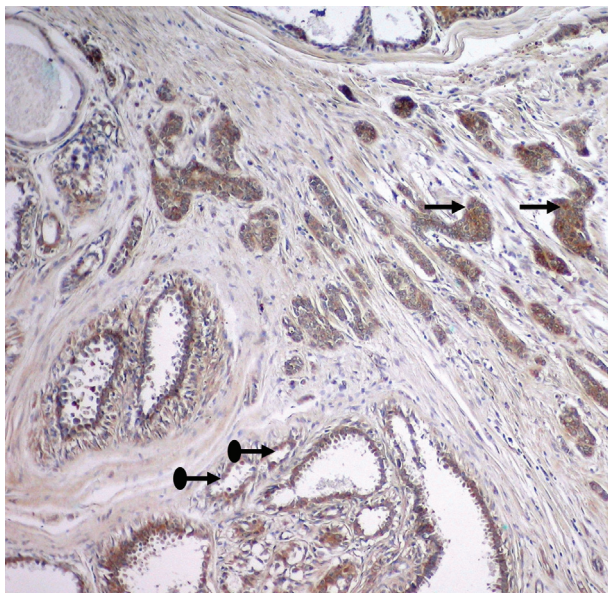
Już w 1865 roku Armand Trousseau opisał u chorych na nowotwory przewodu pokarmowego zwiększoną zapadalność na zakrzepicę. Obecnie wiadomo, iż zaburzenia hemostazy są częstym powikłaniem choroby nowotworowej.



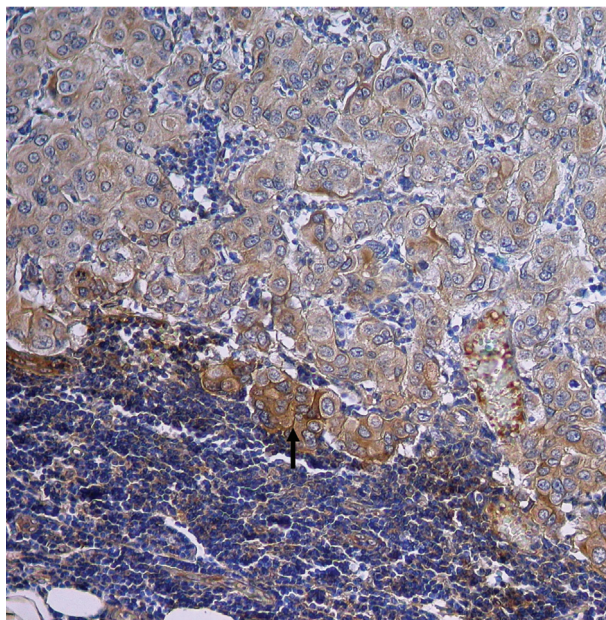
Ryc. 1. Rak piersi – ognisko pierwotne. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność czynnika tkankowego w komórkach nowotworowych (→) i w ścianach drobnych naczyń krwionośnych (●→). Powiększenie około 200 x



Ryc. 2. Rak piersi – węzeł chłonny pachowy. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność czynnika tkankowego w komórkach nowotworowych (→). Powiększenie około 200 x



Ryc. 3. Rak piersi – ognisko pierwotne. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność fragmentu protrombiny 1+2 w komórkach nowotworowych (→) i w ścianach drobnych naczyń krwionośnych (●→). Powiększenie około 200 x

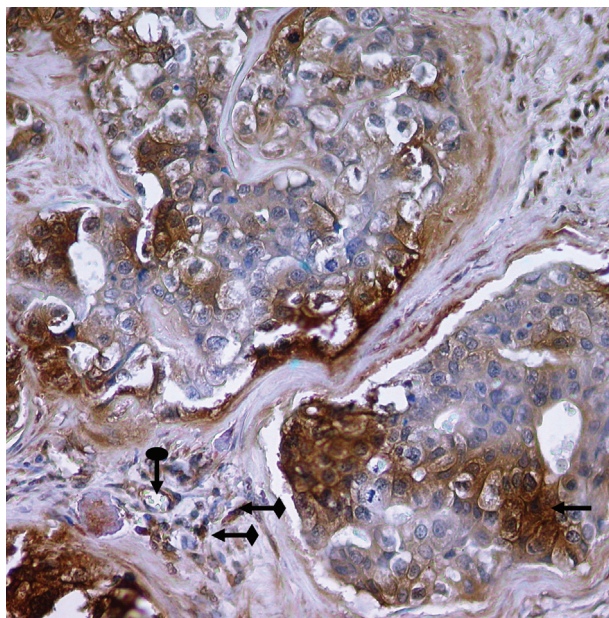


Ryc. 4. Rak piersi – węzeł chłonny pachowy. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność fragmentu protrombiny 1+2 w komórkach nowotworowych (→). Powiększenie około 200 x

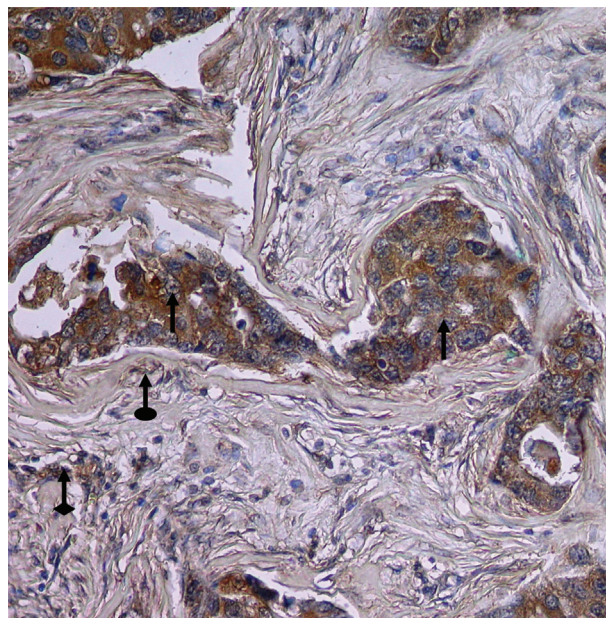
Co ciekawe, zaobserwowano, iż u chorych na raka piersi wystąpienie żylnych incydentów zakrzepowo-zatorowych w trakcie chemioterapii uzupełniającej jest niekorzystnym czynnikiem ryzyka [28]. Zwraca się uwagę na fakt, iż aktywacja krzepnięcia krwi u chorych na nowotwory nie jest tylko procesem wtórnym do obecności nowotworu, ale może sprzyjać także rozwojowi zarówno guza pierwotnego, jak i tworzeniu nowotworowych przerzutów oddległych [29, 30]. Głównym prokoagulantem odpowiedzialnym za aktywację krzepnięcia krwi u chorych na nowotwo-

ry jest czynnik tkankowy (TF) [31]. W warunkach prawidłowych TF nie kontaktuje się z krwią. W wyniku przerwania ciągłości ściany naczynia krwionośnego, a także wskutek działania czynników takich, jak TNF, C5a, endotoksyny i mukopolisacharydy bakterii, FGF, PDGF, VEGF dochodzi do ekspresji TF i w konsekwencji – do uruchomienia kaskady krzepnięcia krwi [32].

Nasiloną ekspresję TF w komórkach nowotworowych wykazano w ognisku pierwotnym różnych nowotworów, m.in. w raku trzustki [22, 25], żołądka [21], krtani [23,



Ryc. 5. Rak piersi – ognisko pierwotne. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność fibryny w komórkach nowotworowych (→), makrofagach (↔) i ścianach drobnych naczyń krwionośnych (●→). Powiększenie około 200 x



Ryc. 6. Rak piersi – węzeł chłonny pachowy. Metoda ABC. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność fibryny w komórkach nowotworowych (→), makrofagach (↔) i ścianach drobnych naczyń krwionośnych (●→). Powiększenie około 200 x

25], jajnika [25], płuca [24, 25], piersi [26, 33]. W badaniach doświadczalnych (na modelu zwierzęcym) zaobserwowano, iż nasilenie stopnia ekspresji TF w komórkach nowotworowych koreluje z ich zdolnością do tworzenia przerzutów [29]. Badania *in vitro* wykazały, iż obecność antygenów TF w komórkach nowotworowych może być czynnikiem predykcyjnym – oporność na dokсорubicynę obserwuje się częściej w przypadku obecności w raku piersi komórek nowotworowych nie wykazujących ekspresji TF [34].

Okazuje się także, iż obecność TF w komórkach nowotworowych może mieć znaczenie prognostyczne. U chorych na raka piersi, u których stwierdzono ekspresję TF w komórkach nowotworowych ogniska pierwotnego obserwowano krótszy okres przeżycia całkowitego, w porównaniu do chorych, u których nie stwierdzono obecności tego białka o takiej lokalizacji [26]. Zaobserwowano również, iż ryzyko powstania przerzutów nowotworowych do wątroby jest większe u pacjentek, u których w komórkach nowotworowych wykazano ekspresję TF [26].

Tak więc, prawdopodobne jest, iż białko to może odgrywać czynną rolę w przebiegu procesu nowotworowego. TF może wpływać na rozwój choroby nowotworowej dwiema drogami: bezpośrednio – poprzez nasilenie przekazywania wewnątrzkomórkowego – oraz pośrednio – poprzez pobudzanie zewnątrzpo pochodnego układu krzepnięcia krwi. Aktywacja przekazywania wewnątrzkomórkowego może dokonywać się bądź poprzez przyłączenie czynnika VIIa do tego białka, bądź niezależnie od czynnika VIIa – poprzez domenę cytoplazmatyczną TF. Przy czym wydaje się, iż właśnie domena cytoplazmatyczna TF odgrywa wiodącą rolę w procesie tworzenia przerzutów nowotworowych. Badania na liniach komórkowych wykazujących ekspresję tzw. kadłubowego TF (*truncated*

TF) wykazały znacznie zmniejszoną zdolność tworzenia przerzutów w porównaniu do linii komórek nowotworowych z pełną cząsteczką TF [35]. TF odgrywa bardzo ważną rolę w procesie angiogenezy – przede wszystkim poprzez pobudzanie syntezy VEGF [36]. W wyniku powyższych procesów komórki nowotworowe mogą nabywać nowe cechy umożliwiające w konsekwencji tworzenie nowotworowych przerzutów odległych.

Końcowym efektem aktywacji krzepnięcia krwi jest powstawanie fibryny. Do przekształcania fibrynogenu w fibrynę konieczna jest obecność trombiny. Enzym ten powstaje po odłączeniu fragmentu F1+2 od cząstki protrombiny. A zatem na podstawie ekspresji fragmentu protrombiny 1+2 można pośrednio wnioskować o stopniu aktywacji krzepnięcia krwi w guzie nowotworowym [12]. Poza katalizowaniem konwersji fibrynogenu do fibryny, trombina – proteaza serynowa o masie molekularnej 36 kD wywiera także wielokierunkowe działanie na komórki prawidłowe, m.in. aktywuje płytki krwi, wywiera efekt mitogeniczny w stosunku do fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich, a także może wpływać na komórki śródbłonnka naczyń i leukocyty [37]. Swoje działanie na komórki trombina wywiera poprzez specyficzny receptor, którego pobudzenie prowadzi do aktywacji kinazy białkowej C, zmian w metabolizmie fosfoinozytolu oraz mobilizacji jonów wapnia. Receptor o wysokim powinowactwie do trombiny został zidentyfikowany nie tylko na komórkach prawidłowych, ale również na komórkach nowotworowych [37]. Obecność specyficznego receptora dla trombiny na komórkach nowotworowych (tzw. TLTR – *tethered ligand trombin receptor*, lub inaczej: PAR – 1 – *protease activated receptor*) może tłumaczyć właściwości proangiogenne, mitogenne i promigracyjne trombiny wykazywane w stosunku do komórek nowotworowych. W warunkach *in vitro*

wykazano, iż nasilenie ekspresji tego receptora koreluje ze zwiększeniem częstości powstawania przerzutów odległych, zaś jego blokowanie prowadzi do zahamowania inwazji komórek raka piersi [37]. W warunkach doświadczalnych zaobserwowano, iż stymulacja komórek czerniaka złośliwego i raka jelita grubego trombiną prowadzi do pobudzenia miejscowego wzrostu guza nowotworowego oraz zwiększenia zdolności tworzenia przerzutów nowotworowych [38]. Wykazano także, iż trombina pośredniczy w indukowanej przez komórki nowotworowe agregacji płytek krwi (TCIPA – *tumor cell-induced platelet aggregation*) oraz prowadzi do wzrostu ekspresji cząstek adhezyjnych (P – selektyny i ICAM – 1) w komórkach śródbłonna naczyń, ułatwiając w ten sposób tworzenie przerzutów przez komórki nowotworowe [39].

Fibryna nie tylko odgrywa rolę w hemostazie, ale także bierze czynny udział w rozwoju nowotworu. Tworzy ona przestrzenną sieć, która z jednej strony może być szkieletem dla rozwijającego się guza, z drugiej zaś – mechaniczną barierą uniemożliwiającą skuteczną reakcję układu odpornościowego przeciwko antygenom komórek nowotworowych. Fibryna jest czynnikiem pobudzającym ekspresję TF, co na zasadzie wzajemnego sprzężenia zwrotnego prowadzi do zwiększonej produkcji fibryny. Fibryna może stymulować proliferację i migrację komórek śródbłonna, a także może nasilać angiogenezę [40].

W ocenianym materiale ekspresję TF, fibryny oraz fragmentu 1+2 protrombiny zaobserwowano zarówno w obrębie guza pierwotnego, jak również w przerzutach nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych. Powyższe dane świadczą o tym, iż zarówno w ognisku pierwotnym raka piersi, jak również w miejscach przerzutów nowotworowych, dochodzi do aktywacji krzepnięcia krwi inicjowanej przez komórki nowotworowe.

Z uwagi na fakt, że składowe układu hemostazy, m.in. TF, trombina i fibryna wspomagają wzrost i rozsiew nowotworów, można przypuszczać, iż w przyszłości jednym z elementów leczenia chorych na raka piersi może być zastosowanie preparatów interferujących z układem krzepnięcia krwi.

Wnioski

Wykazanie w badaniach własnych ekspresji TF, fragmentu 1+2 protrombiny oraz fibryny, zarówno w obrębie guza pierwotnego, jak również w ogniskach przerzutowych w pachowych węzłach chłonnych wskazuje, że u chorych na raka piersi dochodzi do pozanaczyniowej aktywacji krzepnięcia krwi zależnej od czynnika tkankowego związanego z komórkami nowotworowymi.

Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz
Klinika Onkologii AM
ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok
e-mail: mwojtuk@amb.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Falanga A, Rickles FR. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25: 173-82.
2. Wojtukiewicz MZ, Rucińska M. Aktywacja krzepnięcia krwi u chorych na nowotwory: implikacje kliniczne. *Nowotwory* 1999; 49: 381-91.
3. Wojtukiewicz MZ, Rucińska M, Kloczko J i wsp. Profiles of plasma serpins in patients with advanced malignant melanoma, gastric cancer and breast cancer. *Haemostasis* 1998; 28: 7-13.
4. Mielicki WP, Tenderenda M, Rutkowski P, Chojnowski K. Activation of blood coagulation and the activity of cancer procoagulant (EC 3.4.22.26) in breast cancer patients. *Cancer Lett* 1999; 146: 61-6.
5. Caine GJ, Stonelake PS, Rea D, Lip GY. Coagulopathic complication in breast cancer. *Cancer* 2003; 98: 1578-86.
6. Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risk and outcomes. *Circulation* 2003; 107: 17-21.
7. Pitchard KI, Paterson AH, Paul NA i wsp. Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2731-7.
8. Luzzatto G, Schafer AI. The prethrombotic state in cancer. *Semin Oncol* 1990; 17: 147-59.
9. Hettiarachchi RJ, Lok J, Prins MH i wsp. Undiagnosed malignancy in patients with deep vein thrombosis: incidence, risk indicators, and diagnosis. *Cancer* 1998; 83: 180-5.
10. Hillen HF. Thrombosis in cancer patients. *Ann Oncol* 2000; Supl. 3: 273-6.
11. Nand S. Hemostasis and cancer. *Cancer J* 1993; 6: 54-8.
12. Wojtukiewicz MZ, Rucińska M, Zimnoch L i wsp. Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation. *Thromb. Res* 2000; 97: 335-42.
13. Jannink I, Risberg B, Van Diest PJ, Baak JP. Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer. *Histopathology* 1996; 29: 421-8.
14. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978; 38: 2651-60.
15. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S i wsp. EGFR, c-erbB2 and p53 protein in the primary lesions and paired metastatic regional lymph nodes in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 383-7.
16. Briffod M, Hacene K, Le Doussal V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod Pathol* 2000; 13: 841-50.
17. Goodson WH 3rd, Ljung BM, Moore DH 2nd i wsp. Tumor labeling indices of primary breast cancers and their regional lymph node metastases. *Cancer* 1993; 15: 3914-9.
18. Reameakers JM, Beex LV, Koenders AJ i wsp. Concordance and discordance of estrogen and progesterone receptor content in sequential biopsies of patients with advanced breast cancer: relation to survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20: 1011-8.
19. Cianga C, Cianga P, Cozma L i wsp. Loss of hormonal receptors expression from primary breast carcinoma to axillary lymph node metastases. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2003; 107: 540-4.
20. Matsuo K, Fukutomi T, Tsuda H i wsp. Differences in estrogen receptor status, Her2, and p53 comparing metachronous bilateral breast carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 77: 31-4.
21. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zacharski LR i wsp. Tissue factor-dependent coagulation activation and impaired fibrinolysis in situ in gastric cancer. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 291-300.
22. Wojtukiewicz MZ, Rucińska M, Zacharski LR i wsp. Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1416-20.
23. Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Rucińska M i wsp. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1659-62.
24. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zimnoch L i wsp. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Thromb Haemost* 2003; 90: 140-6.
25. Clahsen PC, van de Velde CJ, Julien JP i wsp. Thromboembolic complication after perioperative chemotherapy in women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1266-71.
26. Ueno T, Toi M, Koike M i wsp. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000; 83: 164-70.
27. Sato Y, Mukai K, Watanabe S i wsp. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 1986; 125: 431-5.
28. von Tempelhoff GF, Schönmann N, Heilmann L. Thrombosis – a clue of poor prognosis in primary non-metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 2002; 73: 275-7.

29. Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* 2001; 73: 145-50.
30. Varna JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996; 56: 5063-70.
31. Gordon SG. Cancer cell procoagulants and their role in malignant disease. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 424-33.
32. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-74.
33. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 5-20.
34. Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998; 79: 19-22.
35. Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ i wsp. Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 1999; 82: 88-92.
36. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 31-44.
37. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Ben-Josef E i wsp. Solid tumor express functional "tethered ligand" thrombin receptor. *Cancer Res* 1995; 55: 698-704.
38. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Nelson KK i wsp. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased α IIb β 3 expression on the cell surface. *Thromb Res* 1992; 68: 233-45.
39. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Ciarelli JJ i wsp. Thrombin increases the metastatic potential of tumor cell. *Int J Cancer* 1993; 54: 793-806.
40. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001; 3: 371-384.

Otrzymano: 12 grudnia 2005 r.

Przyjęto do druku: 20 lutego 2006 r.