

Patrycja Marciniak-Stępak

**Ocena rokowniczego znaczenia
wybranych biologicznych markerów
nerczaka zarodkowego u dzieci**

Rozprawa doktorska

zrealizowana w ramach grantu promotorskiego

N N407 543338

Promotor: Prof. zw. dr hab. med. Jacek Wachowiak

Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej
II Katedra Pediatrii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2012

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi Panu Profesorowi Jackowi Wachowiakowi za poświęcony czas oraz wszelkie twórcze wskazówki udzielone podczas pisania tej pracy, a Panu Profesorowi Michałowi Nowickiemu i Panu Profesorowi Andrzejowi Marszałkowi za cenne rady i życzliwość.

Dziękuję moim Najbliższym za wyrozumiałość i wsparcie.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
Spis tabel.....	7
Spis rycin.....	9
1. Wstęp.....	11
1.1. Rys historyczny.....	11
1.2. Epidemiologia.....	11
1.3. Etiopatogeneza.....	12
1.4. Objawy kliniczne i badania pomocne w ustaleniu rozpoznania oraz stopnia zaawansowania ..	14
1.5. Budowa histologiczna nerczaka zarodkowego przed i po zastosowaniu chemioterapii przedoperacyjnej.....	14
1.6. Stopień zaawansowania.....	15
1.7. Czynniki o ustalonym znaczeniu rokowniczym.....	16
1.8. Zasady leczenia – dawniej i obecnie.....	16
1.9. Wyniki leczenia I linii.....	17
1.10. Wznowa – przyczyny i znane czynniki ryzyka we wznowie.....	18
1.11. Wybrane markery biologiczne i ich potencjalne znaczenie rokownicze.....	19
1.11.1 Markery aktywności proliferacyjnej (białka Ki-67 i p27 ^{Kip1}).....	19
1.11.2. Ekspresja białka supresorowego p53.....	20
1.11.3. Ekspresja białka błonowego CD274.....	21
1.11.4. Aktywność ludzkiej telomerazowej odwrotnej transkryptazy (hTERT).....	22
1.11.5. Gęstość naczyń włosowatych (ekspresja białka CD31).....	24
1.12. Geny związane z modulowaniem procesu angiogenezy i różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych.....	26
1.13. Założenia pracy.....	27
2. Cele pracy.....	28
3. Pacjenci i metody.....	29
3.1. Charakterystyka pacjentów.....	29
3.2. Materiał.....	31
3.3. Metody.....	31
3.3.1. Badania immunohistochemiczne.....	31
3.3.1.1. Materiał do badań immunohistochemicznych.....	31
3.3.1.2. Metodologia badań immunohistochemicznych.....	32
3.3.1.3. Ocena ekspresji reakcji immunohistochemicznych.....	34
3.3.2. Badania molekularne.....	36
3.3.2.1. Materiał do badań molekularnych.....	36
3.3.2.2. Metodologia badań molekularnych.....	37
3.3.2.3. Ocena ekspresji genów regulujących proces angiogenezy i embriogenezy.....	45
3.3.3. Analiza statystyczna.....	45

3.3.3.1. Analiza przeżycia w badanej grupie chorych	45
3.3.3.2. Wieloczynnikowa analiza wariancji.....	46
3.3.3.3. Analiza statystyczna wyników badań immunohistochemicznych.....	46
3.3.3.4. Analiza ekspresji badanych białek na podstawie wykresów sekwencyjnych.....	46
3.3.3.5. Analiza statystyczna wyników badań molekularnych	46
3.4. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań	47
3.5. Źródło finansowania badań.....	47
4. Wyniki	48
4.1. Wyniki leczenia	48
4.2. Wyniki badań immunohistochemicznych	51
4.2.1. Analiza wyników badań ekspresji Ki-67	51
4.2.2. Analiza profilu ekspresji p27 ^{kip1}	52
4.2.3. Analiza profilu ekspresji p53	54
4.2.4. Analiza profilu ekspresji CD274	54
4.2.5. Analiza profilu ekspresji hTERT	54
4.2.6. Wyniki analizy ekspresji badanych białek na podstawie wykresów sekwencyjnych	55
4.2.7. Analiza profilu ekspresji CD31 (analiza MVD)	56
4.2.8. Wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji.....	57
4.3. Wyniki badań ekspresji genów regulujących proces angiogenezy i embriogenezy	57
4.3.1. Analiza ekspresji genów regulujących proces angiogenezy	57
4.3.2. Analiza ekspresji genów regulujących proces embriogenezy.....	63
5. Dyskusja	69
6. Wnioski	86
Streszczenie	87
Summary	90
Piśmiennictwo.....	93
Dokumentacja fotograficzna	105

Wykaz skrótów

- aFGF - kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów, *acidic fibroblast growth factor*
- bFGF - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, *basic fibroblast growth factor*
- B - utkanie blastemiczne
- CDK - kinaza cyklinozależna, *cyclin-dependent kinase*
- cDNA - komplementarny DNA, *complementary DNA*
- COL4A3 - gen kodujący łańcuch $\alpha 3$ kolagenu typu IV
- CXCL2 - chemokina CXCL2, *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*
- CXCR2 - receptor dla chemokiny CXCL2
- DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy, *deoxyribonucleic acid*
- EDF - nabłonkowe zróżnicowanie cewkowe, *epithelial differentiated tubular*
- egr1* - *early growth response 1 gene*
- FLT-1 - *fms-like tyrosine kinase*
- FGFR - receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów
- HBGF-5 - czynnik wzrostu wiążący heparynę-5, *heparin-binding growth factor-5*
- HGF - czynnik stymulujący hepatocyty, *hepatocyte growth factor*
- HGK - gen referencyjny, *housekeeping gene*
- HIF-alfa - czynnik indukowany przez niedotlenienie, *hypoxia-induced factor*
- HIGH - grupa wysokiego ryzyka pod względem budowy histopatologicznej
- HIPK2 - *homeodomain-interacting protein kinase 2*
- IGF2 - insulinopodobny czynnik wzrostu 2, *insulin-like growth factor 2*
- IHH - *indian hedgehog*
- IL-6 - interleukina 6
- INT - grupa pośredniego ryzyka pod względem budowy histopatologicznej
- IRS - skala według Remmele i Stegner, *immunoreactive score*
- LOH - utrata heterozygotyczności, *loss of heterozygosity*
- MAPK - kinaza aktywowana mitogenami, *mitogen-activated protein kinase*
- MMP - metaloproteinaza, *metalloproteinase*
- mRNA - informacyjny RNA, *messenger RNA*
- MVD - gęstość naczyń krwionośnych, *microvascular density*
- N - utkanie nabłonkowe
- NP - neuropilina, *neuropilin*
- NWTS - *National Wilms Tumor Study*
- pDFS - prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby, *probability of disease free survival*
- PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu, *platelet-derived growth factor*
- PECAM-1 - adhezyjna cząsteczka płytek krwi i śródbłonka, *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
- pEFS - prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń, *probability of event free survival*
- PGF - łożyskowy czynnik wzrostu, *placental growth factor*
- pOS - prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia, *probability of overall survival*

pRFS - prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od wznowy, *probability of relapse free survival*

rt-PCR - metodą reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, *real-time polimerase chain reaction*

RT-PCR - metoda odwrotnej transkrypcji PCR, *reverse transcription PCR*

RUNX2 - *runt-related transcription factor 2*

SEMA - semaforyna, *semaphorin*

SIOP - Międzynarodowe Towarzystwo Onkologii Pediatricznej, *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*

TERT - telomerazowa odwrotna transkryptaza, *telomerase reverse transcriptase*

TIMP - tkankowy inhibitor metaloproteinazy, *tissue inhibitor of metalloproteinase*

TP1 - białko związane z telomerazą, *telomerase associated protein 1*

VEGF - czynnik wzrostu komórek śródbłonka naczyniowego, *vascular-endothelial growth factor*

WAGR - *Wilms` tumor, Aniridia, Genitourinary malformations, mental Retardation*

Z - utkanie zrębowe

Spis tabel

- Tabela 1.** Współczynnik zachorowalności na nowotwory u dzieci w Polsce i Europie Zachodniej w 2004 roku
- Tabela 2.** Charakterystyka zastosowanych przeciwciał
- Tabela 3.** Skala IRS wg Remmele i Stegner
- Tabela 4.** Lista genów zaangażowanych w proces modulowania angiogenezy oraz reakcji kontrolnych dla macierzy płytkowych
- Tabela 5.** Lista genów związanych z różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych oraz reakcji kontrolnych dla macierzy płytkowych
- Tabela 6.** Przyporządkowanie do grupy w zależności od wartości liczbowej otrzymanej w skali IRS
- Tabela 7.** Charakterystyka pacjentów z niepowodzeniem leczenia
- Tabela 8.** Ekspresja Ki-67 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego
- Tabela 9.** Ekspresja Ki-67 w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS
- Tabela 10.** Ekspresja Ki-67 w zależności od wieku (<4rż>) rozpoznania w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS
- Tabela 11.** Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS
- Tabela 12.** Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego w grupie pośredniego ryzyka oceniona w skali IRS
- Tabela 13.** Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<4rż>) w utkaniu zrębowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS
- Tabela 14.** Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<4rż>) w utkaniu zrębowym nerczaka zarodkowego w grupie pośredniego ryzyka oceniona w skali IRS
- Tabela 15.** Ekspresja p53 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS u pacjentów pozostających w I CR i u pacjentów, u których wystąpiła progresja/wznowa nerczaka zarodkowego
- Tabela 16.** Ekspresja hTERT w grupach ryzyka w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS
- Tabela 17.** Średnie wartości MVD w grupie pośredniego i wysokiego ryzyka
- Tabela 18.** Wieloczynnikowa analiza wariancji
- Tabela 19.** Wieloczynnikowa analiza wariancji prawdopodobieństwa wystąpienia wznowy nerczaka zarodkowego
- Tabela 20.** Zmiana ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w nerczaku zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej z w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Tabela 21.** Zmiana ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w nerczaku zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną

Tabela 22. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezy w nerczaku zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Tabela 23. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezy w nerczaku zarodkowym pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Tabela 24. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezy w nerczaku zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną

Spis rycin

- Rycina 1.** Częstość występowania wybranych chorób nowotworowych u dzieci z uwzględnieniem wieku
- Rycina 2.** Charakterystyka całej badanej grupy (n=45) dotycząca stopnia zaawansowania oraz grupy ryzyka
- Rycina 3.** Charakterystyka grupy pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (n=40) dotycząca stopnia zaawansowania oraz grupy ryzyka
- Rycina 4.** Wyniki leczenia badanej grupy
- Rycina 5.** Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pOS w badanej grupie
- Rycina 6.** Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pDFS w badanej grupie
- Rycina 7.** Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pEFS w badanej grupie
- Rycina 8.** Analiza typu clustergram przedstawiająca pacjentów z progresją/wznową choroby
- Rycina 9.** Analiza typu *clustergram* przedstawiająca pacjentów z nerczakiem zarodkowym o utkaniu rozszanym anaplastycznym
- Rycina 10.** Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Rycina 11.** Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Rycina 12.** Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Rycina 13.** Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej
- Rycina 14.** Analiza „*volcano plot*” ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej
- Rycina 15.** Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Rycina 16.** Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego
- Rycina 17.** Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Rycina 18. Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II względem guza w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Rycina 19. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej

Rycina 20. Analiza „*volcano plot*” ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej

1. Wstęp

1.1. Rys historyczny

Przez wieki choroby nowotworowe u dzieci uważano za „marginalny” problem, a jedynym dostępnym sposobem leczenia, możliwym do zastosowania tylko u tych dzieci, u których nowotwór miał charakter guza, było częściowe lub całkowite operacyjne usunięcie. Dopiero w XIX wieku pojawiło się więcej opisów nowotworowych guzów litych u dzieci, co pozwoliło na wysunięcie hipotezy, że mogą one mieć pochodzenie zarodkowe [Adamkiewicz-Drożyńska 2009].

W tym też czasie pojawiły się pierwsze wzmianki o występującym u dzieci guzie nerki. W 1814 roku Rance scharakteryzował ten guz jako „*fungus hematoides*”, w 1875 roku Conheim zasugerował jego pochodzenie zarodkowe, a w 1989 roku Birsch-Hirschfeld opisał złożony obraz histopatologiczny [Sawicz-Birkowska 2008]. Prawdopodobnie pierwsza opisana próba chirurgicznego leczenia nerczaka miała miejsce w 1877 roku, kiedy to Jessop usunął ogromny guz nerki u 2-letniego chłopca [Willets 2003]. Jednak największy wkład w poznanie natury zarodkowego guza nerki miał niemiecki chirurg i patolog Karl Maximilian Wilhelm Wilms, który w 1899 roku w monografii „*Die Mischgeschwülste der Niere*” szczegółowo opisał zarówno przebieg kliniczny jak i budowę histopatologiczną tego nowotworu, nazywając go „guzem mieszanym” [Sawicz-Birkowska 2007].

1.2. Epidemiologia

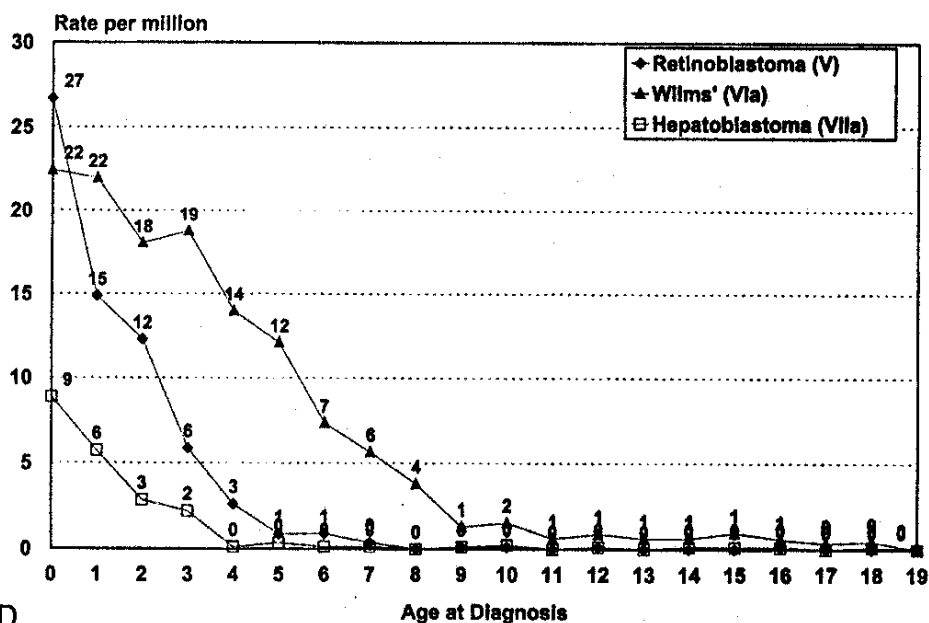
Wprawdzie nowotwory wieku dziecięcego stanowią zaledwie 0,85% spośród wszystkich chorób onkologicznych, tj. rocznie w Polsce stwierdza się ok. 1100-1200 nowych zachorowań na nowotwory u dzieci, wobec wykrytych w 2011 roku ok. 170 000 nowych zachorowaniach u osób dorosłych, jednak nadal nowotwory wieku dziecięcego są drugą, po wypadkach i urazach, najczęstszą przyczyną zgonu wśród dzieci i młodzieży w wieku (>1)–(<19) lat (ok. 5,2-5,5%). [Didkowska 2011, Kowalczyk 2008, Gurney 2006]. (Tabela 1.)

Tabela 1. Współczynnik zachorowalności na nowotwory u dzieci w Polsce i Europie Zachodniej w 2004 roku (na podstawie Kowalczyk J. Epidemiologia nowotworów złośliwych u dzieci. w: Chybicka A., Sawicz-Birkowska K. (red.). Onkologia i hematologia dziecięca. PZWL, Warszawa 2008; 3-7)

Częstość występowania chorób nowotworowych na 1 mln dzieci (2004 rok)		
	Polska	Europa Zachodnia
Białaczki	35,4	44,0
Chłoniaki	21,2	15,2
Nowotwory OUN	29,8	29,9
Nowotwory ukł. współczulnego	9,3	11,2

Retinoblastoma	3,7	4,1
Nowotwory nerek	7,4	8,8
Nowotwory wątroby	1,3	1,5
Nowotwory kości	6,0	5,5
Mięsaki tk. miękkich	10,6	9,1
Nowotwory zarodkowe	6,3	4,5
Nowotwory nabłonkowe	2,7	4,1
Inne	0,4	0,6
Ogółem	134,1	138,5

Nerczak zarodkowy jest najczęstszym pierwotnym guzem nerki u dzieci i młodzieży, stanowiąc ok. 6-8% wszystkich chorób nowotworowych w tej grupie wiekowej. Występuje głównie u dzieci w wieku przedszkolnym, tzn. między 2. a 5. rokiem życia [Sawicz-Birkowska 2008]. (Rycina 1.)



Rycina 1. Częstość występowania wybranych chorób nowotworowych u dzieci z uwzględnieniem wieku (rycina z Gurney J.G., Bondy M.L. Epidemiology of childhood cancer. w: Pizzo P.A., Poplack D.G. (red.) Principles and Practice of Pediatric Oncology. 5th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 3-13)

1.3. Etiopatogeneza

Uważa się, że nerczak zarodkowy powstaje z pozostałości zarodkowej tkanki nefrogennej w wyniku uszkodzenia genów regulujących wzrost, różnicowanie i proliferację komórek [Tołoczko-Garbarek 2002].

W 90% przypadków nerczak zarodkowy występuje sporadycznie, zazwyczaj w rezultacie mutacji somatycznych określonych genów supresorowych odpowiedzialnych za regulację wzrostu, różnicowania i proliferacji zarodkowej tkanki nefrogennej, która zwykle całkowicie zanika do 36. tygodnia życia płodowego, a której pozostałości spostrzega się

aż u 30-40% chorych z nerczakiem jednostronnym i u wszystkich chorych z guzem obustronnym [Beckwith 1998]. U około 10% pacjentów guz Wilmsa rozwija się w następstwie mutacji konstytucyjnych *de novo*, a tylko 1-2% zachorowań na nerczaka stanowi postać rodzinna wywołana mutacjami germinalnymi (konstytucyjnymi dziedzicznymi). Mutacje konstytucyjne zarówno *de novo*, jak i dziedziczne, w odróżnieniu od mutacji somatycznych, predysponują nie tylko do rozwoju guza, ale także do występowania zespołów wad rozwojowych. Do tej pory zidentyfikowano dwa geny odpowiedzialne za rozwój nerczaka zarodkowego, tj. *WT1* i *WT2*.

Gen supresorowy *WT1* zlokalizowany jest na chromosomie 11 (11p13) i koduje czynnik transkrypcyjny niezbędny do prawidłowego rozwoju nerek i gonad. Mutacje genu *WT1* wiążą się z wysokim ryzykiem rozwoju nerczaka zarodkowego, a w przypadku mutacji konstytucyjnych z wystąpieniem zespołu Denysa-Drasha (małe mutacje części genu) oraz zespołu WAGR (akronim z języka angielskiego od „*Wilms` tumor, Aniridia, Genitourinary malformations, mental Retardation*”), tj. zespołu, w którym spostrzega się jednocześnie guz Wilmsa, wrodzony brak tęczówki, wrodzone wady układu moczowo-płciowego i upośledzenie umysłowe (delecja całego genu) [Tolłoczko 2002].

W regionie *WT2* zlokalizowanych jest co najmniej 10 genów, które prawidłowo ulegają ekspresji tylko w jednym allelu. Natomiast w nerczaku zarodkowym ekspresja niektórych z nich jest zaburzona - stwierdza się zmniejszoną ekspresję genu *H19* i genu supresorowego *p57* oraz zwiększoną ekspresję genu *IGF2*. Mutacje germinalne *WT2* prowadzą do powstania zespołu Beckwitha-Wiedemanna, który może występować rodzinie (15%) lub sporadycznie (85%). Cechami charakterystycznymi dla tego zespołu są: nadmierny wzrost całego ciała, przerost połowicy ciała oraz asymetryczne powiększenie narządów i niektórych okolic ciała, powiększenie języka (*macroglossia*), wady ściany jamy brzusznej (m.in.: przepuklina pępowinowa, przepuklina pępkowa), hipoglikemia w okresie noworodkowym oraz zwiększone ryzyko powstania nowotworów o pochodzeniu embrionalnym (zarówno nerczaka zarodkowego jak i wątrobiaka i nerwiaka zarodkowego) [Wiedemann 1964, Beckwith 1969, Cohen 2002].

Innym znanym zespołem przerostowym o zwiększonym ryzyku powstania nerczaka zarodkowego jest zespół Simpsona-Golabiego-Behmela będący wynikiem mutacji genu *GPC3* (Xq26) kodującego glikan-3. U pacjentów stwierdza się zarówno nadmierny przerost ciała oraz narządów wewnętrznych, jak i charakterystyczną dysmorfie twarzy („twarz buldoga”) oraz wady serca i przewodu pokarmowego. Zwiększone jest również ryzyko wystąpienia nerczaka oraz wątrobiaka zarodkowego [Weidle 1998].

1.4. Objawy kliniczne i badania pomocne w ustaleniu rozpoznania oraz stopnia zaawansowania

Ponieważ nerczak zarodkowy początkowo nie daje typowych wczesnych objawów, rozpoznanie zazwyczaj stawiane jest, gdy nowotwór osiągnął już znaczne rozmiary, a często także wyższy stopień zaawansowania klinicznego [Wachowiak 2008]. Do późnych objawów spowodowanych obecnością guza o dużym wymiarze, należy zaliczyć powiększenie obwodu brzucha oraz asymetrię powłok, które mogą być poprzedzone pojawieniem się nawracającego bólu brzucha, krwinkomoczu lub krwiomoczu, nadciśnienia, wymiotów, nawracającego zakażenia układu moczowego, a także mało charakterystycznych objawów ogólnych takich jak brak apetytu i osłabienie [Sawicz-Birkowska 2009].

Nie istnieje żadne badanie przesiewowe lub marker, które byłyby charakterystyczne dla nerczaka zarodkowego. Rozpoznanie kliniczne opiera się przede wszystkim na objawach stwierdzanych w badaniu podmiotowym i przedmiotowym dziecka, jak również wynikach badań obrazowych. Szczególnie pomocnym i łatwo dostępnym badaniem jest badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej, w którym można potwierdzić obecność guza w okolicy nerek. Dalsza diagnostyka obejmuje tomografię komputerową jamy brzusznej oraz zdjęcie radiologiczne klatki piersiowej i/lub uzupełniającą tomografię komputerową klatki piersiowej, dzięki którym możliwe jest wykrycie ewentualnych przerzutów oraz dokładna ocena stopnia zaawansowania klinicznego. W diagnostyce różnicowej należy przede wszystkim uwzględnić zwojaka zarodkowego, dlatego konieczna jest ocena wydalania katecholamin w dobowej zbiorce moczu. Należy podkreślić, że zgodnie z obowiązującym obecnie protokołem leczenia SIOP-2001 rutynowa biopsja guza nie jest zalecana i powinna być wykonana jedynie w ściśle określonych przypadkach (np. w przypadku wątpliwości diagnostycznych) [Sawicz-Birkowska 2008].

1.5. Budowa histologiczna nerczaka zarodkowego przed i po zastosowaniu chemioterapii przedoperacyjnej

Utkanie nerczaka zarodkowego wywodzi się z pozostałości rozwojowych zarodkowej struktury nerek. Zwykle nerczak zarodkowy usunięty operacyjnie bez wstępnej chemioterapii jest tzw. guzem trójfazowym, który zbudowany jest z komórek pochodzenia blastemicznego, podścieliskowego oraz nabłonkowego, występujących w różnych proporcjach oraz demonstrujących różnorodny stopień zróżnicowania i dojrzałości. Czasem jednak nowotwór ten może mieć budowę mono- lub dwufazową lub zawierać także elementy dojrzałe innych tkanek [Kalapurakal 2004].

Budowa histologiczna nerczaka jest bardzo istotna, ponieważ wykazano zależność między obrazem mikroskopowym tkanki nowotworowej a odpowiedzią na prowadzone leczenie oraz rokowaniem [Beckwith 1997].

W Europie, także w Polsce, najczęściej oceniany jest materiał z guza usuniętego operacyjnie po wstępnej chemioterapii. Stąd w materiale operacyjnym dokonuje się nie tylko oceny budowy histologicznej ale także odpowiedzi na zastosowane wcześniej wstępne leczenie, która wyraża się różnym stopniem nasilenia martwicy guza.

W zależności od typu utkania histologicznego nerczaka oraz nasilenia zmian martwiczych po wstępnym leczeniu, obowiązująca obecnie w Europie klasyfikacja *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP)* zalicza guz do jednego z trzech stopni ryzyka:

- guzy niskiego ryzyka: typ mezoblastyczny, postać torbielowata częściowo zróżnicowana, postać całkowicie martwicza;
- guzy pośredniego ryzyka: typ zrębowy, nabłonkowy, mieszany, postać ze zmianami regresyjnymi, postać z anaplazją ogniskową;
- guzy wysokiego ryzyka: typ blastemiczny, typ z rozsianą anaplazją, rak jasnokomórkowy nerki, guz rabdoidalny [Vujanic 2002].

Należy wspomnieć, że klasyfikacja SIOP różni się od stosowanej w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej klasyfikacji *National Wilms Tumor Study (NWTS)*, w której ze względu na odmienną kolejność leczenia, tj. pierwszeństwo leczenia operacyjnego, nie obserwuje się postaci całkowicie martwiczej oraz ze zmianami regresyjnymi [Kalapurakal 2004].

1.6. Stopień zaawansowania

Obecnie w oparciu o kryteria kliniczne i patologiczne stosuje się poniższy podział na stopnie zaawansowania nerczaka zarodkowego w chwili rozpoznania choroby, który najpierw został zaproponowany w programach NWTS-1 i NWTS-2 [Green 2004], a następnie przyjęty również przez SIOP:

- I°: nowotwór ograniczony do nerki lub otoczony włóknistą pseudo-torebką; nie doszło do zajęcia zatoki i naczyń nerkowych; wykonaną doszczętną resekcję;
- II°: nowotwór przekracza nerkę lub penetruje przez torebkę; doszło do zajęcia zatoki nerkowej, naczyń wewnątrz- i zewnątrznerkowych, sąsiednich narządów lub żyły głównej ale wykonano resekcję całkowitą;
- III°: wykonano biopsja lub resekcję niecałkowitą; doszło do pęknięcia torebki guza; obecne są implanty w otrzewnej; zakrzepy nowotworowe w naczyniach; zajęcie węzłów chłonnych w obrębie jamy brzusznej;
- IV°: obecne są odległe przerzuty krwiopochodne (płuca, wątroba, kości, mózg i inne odległe lokalizacje);
- V°: obustronny nowotwór nerki [Graf 2004].

1.7. Czynniki o ustalonym znaczeniu rokowniczym

Dzięki wieloletnim obserwacjom oraz badaniom wieloośrodkowym ustalono, że do najbardziej istotnych czynników rokowniczych u dzieci z nerczakiem zarodkowym zalicza się stopień zaawansowania klinicznego guza w chwili rozpoznania [Weirich 2004, Reinhard 2004] oraz budowę histopatologiczną [Kalapurakal 2004], na podstawie których pacjent kwalifikowany jest do grupy ryzyka standardowego, pośredniego lub wysokiego i dokonywany jest dobór odpowiedniego leczenia.

Ponadto wykazano, że na rokowanie niekorzystny wpływ mają także niżej wymienione czynniki:

- wiek pacjenta powyżej 5 roku życia w momencie rozpoznania choroby [Breslow 1978];
- obecność rozsianej anaplazji świadczącej zwykle o chemiooporności [Vujanic 1999];
- zajęcie węzłów chłonnych [Jereb 1980];
- powiększenie guza w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej [Ora 2006];
- nefroblastomoza [Beckwith 1990];
- utrata heterozygotyczności (*loss of heterozygosity*, LOH) chromosomu 1p, 11q oraz 16q, [Klamt 1998, Grundy 2005];
- zaburzenia w obrębie chromosomu 11p13 (locus genu *WT1*) i 11p15 (locus genu *WT2*) [Bown 2002].

1.8. Zasady leczenia – dawniej i obecnie

Pierwsze próby operacyjnego leczenia nerczaka zarodkowego zostały omówione już wcześniej w podrozdziale 1.1. Radioterapię w pooperacyjnym leczeniu nerczaka zastosował po raz pierwszy Heineman w 1915 roku, a w roku 1916 Freidlander podjął próbę leczenia tego guza wyłącznie za pomocą radioterapii. Następnie Ladd w latach 30-tych udoskonalił technikę operacyjnego leczenia guza, dzięki czemu odsetek wyleczeń wzrósł do ok. 30%. Kolejnym milowym krokiem w leczeniu nerczaka zarodkowego u dzieci było zastosowanie aktynomycyny D przez Farbera w 1954 roku, a zatem wdrożenie chemioterapii jako trzeciej, obok leczenia operacyjnego i radioterapii, składowej leczenia tego nowotworu [Godziński 2008].

Od tego momentu leczenie I linii nerczaka zarodkowego u dzieci ma charakter terapii kompleksowej, która od początku lat 60-tych jest systematycznie doskonalsza dzięki wieloośrodkowej współpracy w ramach NWTs w USA oraz w ramach SIOP w Europie, umożliwiających ocenę wyników leczenia i przyczyn jego niepowodzeń w dużych grupach dzieci. Główna różnica między europejską a amerykańską strategią leczenia nerczaka dotyczy przede wszystkim pierwszego etapu terapii, a mianowicie w Europie leczenie zaczyna się od chemioterapii przedoperacyjnej a w USA od zabiegu operacyjnego [D'Angio 1976, Lemerle 1976].

W Polsce od 2002 roku kompleksowe leczenie nerczaka zarodkowego u dzieci prowadzone jest zgodnie protokołem terapeutycznym SIOP-2001, który uwzględnia:

- chemioterapię przedoperacyjną: w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego 4-tygodniową (winkrystyna, aktynomycyna-D) lub 6-tygodniową (winkrystyna, aktynomycyna-D, doksorubicyna);
- zabieg operacyjny: w zależności od odpowiedzi na chemioterapię przedoperacyjną oraz lokalizację guza resztkowego wykonuje się hemi- lub nefrektomię z dostępu otwartego lub metodą laparoskopową;
- chemioterapię pooperacyjną: intensywność i czas trwania chemioterapii różnią się w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego oraz wyniku badania histopatologicznego;
- radioterapię, którą stosuje się wyłącznie u pacjentów z nerczakiem o niekorzystnym utkaniu histologicznym i u pacjentów z III i IV stopniem zaawansowania choroby.

1.9. Wyniki leczenia I linii

Przez ponad czterdzieści lat istnienia i rozwoju onkologii dziecięcej systematyczne udoskonalanie protokołów chemio- i radioterapii oraz dalsza optymalizacja metod operacyjnych, jak również postępy leczenia wspomagającego, przyniosły istotną poprawę wyników leczenia nowotworów u dzieci. Dotyczy to także wyników leczenia nerczaka zarodkowego, którego udaje się obecnie wyleczyć ogółem aż u około 85% pacjentów. Obecnie uznaje się, że pomimo innego podejścia do leczenia nerczaka zarodkowego w grupie SIOP i NWTS, wyniki leczenia osiągnane w obu grupach są porównywalne.

Należy jednak zwrócić uwagę na różnice osiągniętych wyników leczenia w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego i typu utkania histologicznego nerczaka. Analiza wyników leczenia nerczaka zarodkowego według stosowanego poprzednio protokołu leczenia SIOP 93-01 wykazała, że u chorych w I stopniu zaawansowania klinicznego prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia wolnego od wznowy (*probability of relapse free survival*, pRFS) wyniosło 88,3%, a prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (*probability of overall survival*, pOS) 97% [de Kraker 2004], a zatem podobnie jak w protokole NWTS-5, gdzie pRFS wyniosło 92,4%, a pOS 98,3% [Dome 2006]. Green i wsp. analizując wyniki leczenia pacjentów z nerczakiem zarodkowym w II stopniu zaawansowania poddanych terapii według NWTS-4 stwierdzili, że pOS u tych chorych wyniosło 93,8% [Green 1998] i nie różniło się od pOS wynoszącego 92% spostrzeganego u dzieci leczonych zgodnie z protokołem SIOP93-01 [Reinhard 2004]. Natomiast pOS u pacjentów z nerczakiem w III i IV stopniu zaawansowania leczonych według protokołu SIOP 93-01 było znamienne niższe i wynosiło odpowiednio 82% i 76,3% [Weirich 2004].

Mimo, że leczenie nerczaka zarodkowego jest dość dobrze tolerowane przez pacjentów, a poważne wczesne objawy uboczne nie stanowią tak dużego problemu jak w przypadku leczenia wielu innych nowotworów wieku dziecięcego, to jednak należy wspomnieć, że wyższy stopień zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania wiąże się bezpośrednio z większą intensywnością leczenia, które trzeba będzie podjąć, a tym samym z wyższym ryzykiem poważnych wczesnych i późnych powikłań terapii. Stąd obecnie u pacjentów z korzystnym rokowaniem dąży się do dalszego obniżenia całkowitej dawki stosowanych cytostatyków oraz radioterapii, w celu dalszego ograniczenia ryzyka występowania odległych niekorzystnych następstw leczenia w przyszłości [Spreafico 2006].

1.10. Wznowa – przyczyny i znane czynniki ryzyka we wznowie

Pomimo na ogół dobrych wyników leczenia nerczaka zarodkowego u dzieci, nadal u ok. 15% chorych dochodzi do wznowy procesu nowotworowego. Niestety wznowa występuje także u pacjentów zakwalifikowanych do grupy o korzystnym rokowaniu [Dome 2002]. Co więcej, w przypadku wystąpienia wznowy nerczaka, pomimo intensywnej chemioterapii II linii (ifosfamid, karboplatyna, etopozyd) skojarzonej z radioterapią oraz leczeniem operacyjnym, szanse na drugą długotrwałą remisję ma ok. 50-60% pacjentów [Abu-Gosh 2002, Campbell 2004, Reinhard 2008]. Wyników leczenia wznowy nie poprawiło także zastosowanie autologicznej transplantacji komórek krwiotwórczych - skuteczność tej metody leczenia wynosi 50-70% [Spreafico 2008].

Stąd prowadzone są badania kliniczne, których celem jest poprawa wyników leczenia wznowy nerczaka zarodkowego [Spreafico 2009] oraz określenie bardziej czułych czynników ryzyka we wznowie, które precyzyjniej niż dotąd stosowane pozwoliłyby określić szanse na uzyskanie drugiej długotrwałej remisji. Obecnie do czynników niekorzystnej prognozy we wznowie nerczaka zarodkowego zalicza się [Dome 2002, Reinhard 2008, Kaste 2008]:

- wiek pacjenta powyżej 4 roku życia;
- III stopień zaawansowania miejscowego;
- zakwalifikowanie do grupy wysokiego ryzyka na podstawie obrazu histopatologicznego, w tym obecność rozsianej anaplazji świadczącej o oporności na chemioterapię;
- rozsiew komórek nowotworowych podczas zabiegu operacyjnego;
- wystąpienie wczesnej wznowy (poniżej 6 miesięcy od zakończenia leczenia)
- wystąpienie wznowy „łącznej” (wznowa miejscowa oraz przerzuty odległe)

1.11. Wybrane markery biologiczne i ich potencjalne znaczenie rokownicze

1.11.1 Markery aktywności proliferacyjnej (białko Ki-67 i p27^{Kip1})

Nerczak zarodkowy zbudowany jest z różnych typów komórek, które różnią się nie tylko pochodzeniem i stopniem zróżnicowania, ale także aktywnością proliferacyjną. W chłoniakach, u chorych z rakiem gruczołu piersiowego oraz w raku płuc stwierdzono zależność między aktywnością proliferacyjną komórek nowotworowych a odpowiedzią na leczenie i rokowaniem, przy czym im wyższa była aktywność proliferacyjna tym gorsze było rokowanie. Szczególnie wysoką aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych spostrzegano w przerzutach oraz we wznowie, co korelowało z krótszym czasem przeżycia [Brown 1999].

Proliferacja komórek zależna jest od postępu cyklu komórkowego, w czym kluczową rolę regulatorową pełnią cykliny oraz kinazy cyklinozależne (*cyclin-dependent kinase*, CDK), które tworzą aktywny kompleks cyklina-CDK o właściwościach modyfikujących aktywność szeregu białek biorących udział w cyklu podziałowym komórki [John 2001].

Istotny wpływ na proliferację komórkową ma białko jądrowe Ki-67 uznawane za jądrowy antygen proliferacyjny wykrywany jedynie w komórkach dzielących się. Mimo, że jego rola nie jest nadal jednoznaczna, wiadomo, iż ekspresja zależy od fazy cyklu komórkowego, będąc dowodem trwania cyklu podziałowego. Tzw. indeks mitotyczny (ilość komórek z dodatnią reakcją na 1000 komórek ocenianych) pozwala na ilościową ocenę ekspresji Ki-67 i uznaje się go za czynnik rokowniczy m.in. w chorobach nowotworowych [Scholzen 2000]. Wykazano korelację z przebiegiem choroby, jak to miało miejsce np. w przypadku raka gruczołu krokowego [Khor 2009] oraz sutka [Nishimura 2011].

Kolejnym białkiem wpływającym na aktywność proliferacyjną komórek jest inhibitor kinaz cyklinozależnych - białko p27^{Kip1}, które hamuje proliferację na skutek blokowania aktywności cykliny E wpływającej na przejście fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Stwierdzono, że spadek ekspresji tego białka oraz wzrost aktywności cykliny E-CDK2 wiąże się z gorszym rokowaniem oraz zwiększa ryzyko progresji choroby nowotworowej [Lee 2009]. Potwierdzono to w badaniach nad inwazyjnością i niekorzystnym rokowaniem w raku piersi oraz jelita grubego u pacjentów z obniżoną ekspresją tego białka [Loda 1997]. Dowiedziono ponadto, że białko to może także regulować apoptozę oraz migrację komórek. Co ciekawe, może ono zarówno pobudzać jak i hamować te procesy w zależności od lokalizacji białka w obrębie komórki. Zaobserwowano, że jeśli białko p27^{Kip1} zlokalizowane jest wewnątrzjądrowo, pełni rolę białka supresorowego, natomiast obecność w cytoplazmie wiąże się z pobudzaniem szkieletu komórki do remodelowania i może mieć wpływ na uzyskanie przez komórkę nowotworową zdolności do tworzenia ognisk przerzutowych. Założenia te wydają się mieć także potwierdzenie kliniczne, ponieważ wykazano, że zmniejszona ekspresja wewnątrzjądrowa białka p27^{Kip1} ma wpływ na gorsze rokowanie w wielu chorobach

nowotworowych u ludzi [Borriello 2011]. Konieczne są dalsze badania nad rolą białka p27^{kip1}, zwłaszcza mechanizmów regulacji ekspresji poszczególnych jego izoform, co może mieć także istotne przełożenie kliniczne [Isabel 2008, Larrea 2009].

Największy wkład w badanie związku między proliferacją a rokowaniem w nerczaku zarodkowym ma Ghanem i wsp. [2004], którzy zasugerowali, że wykazanie wysokiej ekspresji markerów proliferacji, np. białka Ki-67 i p27^{kip1}, w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego pozostałym po otrzymaniu chemioterapii przedoperacyjnej może stanowić istotny wskaźnik niekorzystnego rokowania. Powyższa hipoteza potwierdzona została zarówno w badaniach Juric i wsp. [2010], jak i Berrebi i wsp. [2008], w których wykazano, że wysoka ekspresja białek związanych z proliferacją w tkance poddanej chemioterapii świadczy o mniejszej wrażliwości na stosowane leczenie, stanowiąc dowód na większą inwazyjność i gorsze rokowanie.

1.11.2. Ekspresja białka supresorowego p53

Białko p53 kodowane jest przez gen *TP53* położony na chromosomie 17. Wykazano, że białko to w formie natywnej występuje w niewielkim stężeniu, pełniąc funkcję czynnika transkrypcyjnego o aktywności modulatora cyklu komórkowego, ma właściwości supresorowe w stosunku do komórek nowotworowych i nazywane jest „strażnikiem” genomu. Aktywacja białka zachodzi pod wpływem różnych, potencjalnie szkodliwych dla komórki, czynników jak np.: promieniowanie X i UV lub hipoksja [El-Deiry 1998]. Białko to może zarówno zapobiegać przekazywaniu zaburzeń w materiale genetycznym kolejnym komórkom poprzez wydłużenie fazy G1, w której powinna dokonać się naprawa DNA, bądź też, jeśli uszkodzenia genetyczne są zbyt duże, uruchamiać proces apoptozy. Właściwości takie ma tylko odpowiednio ufosforylowana postać białka p53 - pośredniczą w tym procesie kinazy HIPK2 oraz MAPK [Vogelstein 2000].

Natomiast w przypadku pojawienia się mutacji genu *TP53* może dochodzić zarówno do przekazywania błędów w genomie komórkom potomnym, jak i prowadzić do powstawania komórek „nieśmiertelnych”, które nie podlegają apoptozie [Sionov 1999]. Wysoką ekspresję białka p53 w postaci zmutowanej wykazano w komórkach wielu nowotworów u osób dorosłych. Stwierdzono także związek z większą agresywnością choroby, niekorzystnym przebiegiem i rokowaniem [Vousden 2002].

W związku z właściwościami zmutowanej postaci białka p53 wysunięto hipotezę, że przywrócenie endogennej aktywności prawidłowej formy tego białka miałyby istotne działanie hamujące dalszy rozwój nowotworu. Istotnie, w badaniach doświadczalnych wykazano, iż w zależności od rodzaju nowotworu prowadziłyby to do wystąpienia apoptozy komórek nowotworowych lub zatrzymania ich proliferacji [Ventura 2007].

Zwrócono także uwagę na możliwość stworzenia celowanego leku przeciwnowotworowego o aktywności prawidłowego białka p53, który mógłby być stosowany np. u pacjentów z wrodzoną mutacją tego białka, tj. z zespołem Li-Fraumeni, którzy, ze względu na niestabilność materiału genetycznego i stąd wysokie ryzyko powstania mutacji, są szczególnie narażeni na wystąpienie różnego rodzaju nowotworów [Senzer 2007].

Co ciekawe, mutacja białka p53 nie jest spotykana zbyt często w nowotworach wieku dziecięcego, choć wyjątkiem jest postać anaplastyczna nerczaka zarodkowego, w której to obecność nieprawidłowej formy p53 wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie oraz progresją choroby. Sugerowano także, iż obecność mutacji p53 w postaciach nerczaka o korzystnym obrazie histopatologicznym może wiązać się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i gorszym rokowaniem w następstwie m.in. zaburzenia powstawania nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza i zwiększonego ryzyka powstawania przerzutów w płucach [Huang 2002]. Za słuszością tej hipotezy przemawiają także wyniki przedstawione w kilku wcześniejszych badaniach, w których wskazano, że białko p53, chociaż nie stanowi niezależnego czynnika prognostycznego w nerczaku zarodkowym, może być przydatne w identyfikacji pacjentów niskiego i wysokiego ryzyka wznowy [Skotnicka-Klonowicz 2001, Sredni 2001, Jadali 2011].

1.11.3. Ekspresja białka błonowego CD274

Odkryte w 1999 roku przez Donga i wsp. [1999] białko CD274 (PD-L1/B7-H1) jest glikoproteiną błony cytoplazmatycznej, która jest obecna na komórkach linii makrofagów i bierze istotny udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej, poprzez indukcję apoptozy oraz hamowanie wydzielania cytokin i funkcji limfocytów T cytotoksycznych [Latchman 2004]. Dowiedziono, że interakcja CD274 z białkiem PD-1, obecnym na pobudzonych komórkach T, B oraz monocytach wywiera działanie immunosupresyjne poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T oraz wytwarzania interferonu-gamma, interleukiny-2 i interleukiny-10 [Wang 2003, Freeman 2000]. Dużą ilość transkryptu CD274 stwierdzono w komórkach łożyska, węzłów chłonnych, serca oraz grasicy [Latchman 2002], a także w komórkach ponad 20 różnych nowotworów, m.in. w czerniaku złośliwym, raku płuc, pęcherza, piersi, a także glejakach mózgu [Dong 2002, Brown 2003]. Wykazano, że białko CD274 ma zdolność hamowania przeciwnowotworowej odpowiedzi gospodarza, a poprzez to może sprzyjać progresji choroby [Dong 2002, Iwai 2002]. Dokładne poznanie mechanizmu interakcji zachodzącej pomiędzy białkiem a jego cząsteczką kostymulującą, tj. białkiem PD-1 może w przyszłości przyczynić się do opracowania i wdrożenia immunoterapii w leczeniu chorób nowotworowych, w których stwierdza się zwiększoną ekspresję CD274 [Hirano 2005].

Jednym z nowotworów o potwierdzonej wyższej ekspresji CD274 w tkance guza jest rak jasnokomórkowy nerki. Thompson i wsp. w kolejnych pracach udowodnili, że zwiększona

ekspresja CD274 w guzie świadczy o wysokim ryzyku progresji choroby, stanowiąc tym samym czynnikiem niekorzystnego rokowania [Thompson 2006, Thompson 2007, Krambeck 2007]. Stąd wysunięto hipotezę, że skonstruowanie i wyprodukowanie, humanizowanego przeciwciała blokującego szlak CD274/PD1, umożliwiłoby wysoko specyficzną terapię celowaną raka jasnokomórkowego nerki, co mogłoby istotnie poprawić wyniki leczenia u pacjentów o niekorzystnym rokowaniu [Thompson 2007]. Co więcej, podjęto już nie tylko badania eksperymentalne, ale także badania kliniczne I fazy z zastosowaniem monoklonalnego przeciwciała blokującego wyżej wymieniony szlak u chorych z guzami litymi opornymi na konwencjonalną terapię [Brahmer 2011].

W oparciu o wyniki, które uzyskali Thompson i wsp. oraz Routh i wsp. [2008], analizując cechy histopatologiczne nerczaka zarodkowego zasugerowano, że także w tym nowotworze białko CD274 może stanowić ważny wskaźnik niekorzystnego rokowania. Hipoteza ta została potwierdzona w badaniach wykazujących, że ekspresja białka CD274 była znacznie częściej obserwowana w guzach anaplastycznych a także blastemicznych uznanych za guzy o niekorzystnej histopatologii. Co ciekawe, ekspresja CD274 w nerczakach obecnie kwalifikowanych do grupy o korzystnym rokowaniu, prawie 4-krotnie zwiększała ryzyko wznowy w tej grupie pacjentów. Można więc wnioskować, że białko to może stanowić czuły marker prognostyczny przydatny w odpowiedniej stratyfikacji leczenia nerczaka.

1.11.4. Aktywność ludzkiej telomerazowej odwrotnej transkryptazy (hTERT)

Ważnym elementem cyklu komórkowego jest replikacja DNA, w której udział bierze polimeraza DNA. Ponieważ enzym ten może syntetyzować nić DNA jedynie w kierunku od końca 3' do 5', jedna z nici tworzona jest w sposób ciągły, natomiast druga fragmentami (są to tzw. fragmenty Okazaki). Jednak polimeraza nie może skopiować końcowych odcinków liniowego DNA. Z tego względu po usunięciu starterów mogłoby dojść do utraty końcowych fragmentów chromosomów (telomerów) i ich skrócenia. Telomery są końcowymi odcinkami chromosomu mającymi chronić i zapewniać stabilność materiału genetycznego, jednak nie zawierają żadnych genów ani nie kodują białek. U człowieka tworzy je stała sekwencja nukleotydów (TTAGGG). Z uwagi na „ochronną rolę” telomerów, ich skracanie jest procesem niekorzystnym ze względu na ryzyko utraty materiału genetycznego w trakcie kolejnych podziałów komórkowych, a zatem jest swoistym „zegarem biologicznym” dla każdej komórki, limitującym jej zdolność do podziału oraz inicjującym apoptozę [Aragona 2000].

Jednak niektóre komórki posiadły możliwość odnowy, czemu służy telomeraza - enzym rybonukleoproteinowy o cechach odwrotnej transkryptazy, który syntetyzuje materiał genetyczny w oparciu o RNA, utrzymując względnie stałą długość telomerów i chroniąc materiał genetyczny przed utratą. Z tego względu uważa się, że enzym ten zapewniając

komórkom zdolność odnawiania, może przyczyniać się do ich nieśmiertelności. Kompleks telomerazy składa się z nici telomerazowego RNA, białka związanego z telomerazą (*telomerase associated protein 1*, TP1) oraz trzech podjednostek odwrotnej transkryptazy (*telomerase reverse transcriptase*, TERT) [Chan 2004]. Aktywność tego enzymu jest wysoka w komórkach ulegających podziałowi, zapewniając im „długowieczność”, natomiast stopniowo zmniejsza się z wiekiem. U człowieka aktywność telomerazy stwierdza się m.in. w komórkach płciowych, komórkach zarodka, komórkach macierzystych szpiku, nabłonka jelitowego oraz torebki włosa [Kazanowska 2003].

Istnieje dużo dowodów wskazujących, iż aktywność telomerazy jest wyjątkowo wysoka w komórkach nowotworowych, co tłumaczy ich zdolność do niepostrzeżonego podziału oraz nieuleganie apoptozie, a także może być pomocne w wyodrębnieniu zmian o podłożu nowotworowym od prawidłowych tkanek. Obecność tego enzymu stwierdzono w wielu nowotworach, m.in.: żołądka, piersi, ostrej białaczce szpikowej oraz przewlekłej białaczce limfatycznej [Shaw 1997, Hiyama 2001].

Co istotne, zaobserwowano zależność między wysoką aktywnością enzymu a niekorzystnym rokowaniem u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Sugeruje to, iż odwrotna telomeraza mogłaby stać się nie tylko markerem zmian nowotworowych, ale także punktem uchwytu działania leków przeciwnowotworowych, ponieważ można uznać, że pełniąc rolę ochronną w stosunku do telomerów, wpływa na naprawę tych końcowych odcinków chromosomów [Bednenko 1997].

Wśród dzieci z chorobami nowotworowymi wykazano, iż zwiększona aktywność hTERT była związana z gorszym rokowaniem u pacjentów ze zwojakiem zarodkowym [Krams 2003], wątrobiakiem zarodkowym [Hiyama 2004], mięsakiem kościopochodnym [Sanders 2004] oraz ostrą białaczką szpikową [Verstovsek 2003]. Z drugiej strony niską aktywność hTERT obserwowano u pacjentów ze zwojakiem zarodkowym w stopniu 4s, który uznawany jest za stadium o korzystnym rokowaniu, z tendencją do samoistnej regresji [Hiyama 1997, Brinkschmidt 1998], co wskazuje, iż w przypadku zmian o niskiej aktywności telomerazy, z powodu ograniczenia możliwości ochrony telomerów, zdolności proliferacyjne tkanki nowotworowej są zmniejszone i łatwiej dochodzi do apoptozy [Hamad 2002].

Oceną aktywności hTERT w nerczaku zarodkowym zajmowali się Dome i wsp. [1999], którzy zaobserwowali zależność pomiędzy wysoką aktywnością telomerazy a budową anaplastyczną nerczaka zarodkowego. Co więcej, u pacjentów z najwyższym poziomem aktywności tego enzymu, ryzyko wznowy choroby było dwukrotnie wyższe w porównaniu z pacjentami o najniższym poziomie ekspresji enzymu [Dome 2005]. Ponadto Diniz i wsp. [2011] wskazali na zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją hTERT a krótszym czasem przeżycia. Sugeruje się więc, iż stwierdzenie zwiększonej aktywności hTERT, pozwoliłoby

na wyselekcjonowanie spośród pacjentów z nerczakiem o korzystnej budowie histologicznej tych, u których ryzyko niepowodzenia leczenia (wystąpienia progresji i/lub wznowy) byłoby jednak większe.

1.11.5. Gęstość naczyń włosowatych (ekspresja białka CD31)

Jednym z czynników sprzyjających inwazyjności choroby nowotworowej jest powstawanie nowych naczyń krwionośnych dostarczających do guza substancji odżywczych. Tylko początkowo komórki nowotworowe otrzymywać mogą wspomniane substancje na drodze dyfuzji. Udowodniono, że guz o średnicy powyżej 1-3 mm do dalszego wzrostu wymaga stałego dostarczania substancji odżywczych, stając się bezpośrednio zależnym od unaczynienia [Folkman 1992, Gupta 2003]. Powstanie nowych naczyń krwionośnych sprzyja dalszej ekspansji guza, w tym zarówno wzrostowi masy nowotworu, jak i powstawaniu odległych ognisk przerzutowych [Blood 1990]. W odróżnieniu od angiogenezy spotykanej w tkankach prawidłowych, w czasie nowotworzenia jest to proces długotrwały i złożony, scharakteryzowany przez Dworaka jako „niegojąca się rana” [Dworak 1986]. Najważniejszą rolę pełnią komórki śródbłonka, których funkcja jest regulowana przez liczne czynniki zarówno autokrynne, jak i wytwarzane przez komórki nowotworowe [Szala 2011]. Do ważnych substancji proangiogennych należą m.in.: czynnik wzrostu komórek śródbłonka naczyniowego (*vascular-endothelial growth factor*, VEGF) [Kim 1993] oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) [Korc 2009], natomiast dojrzewanie naczyń stymuluje płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor*, PDGF) [Cao 2008], czynnik indukowany przez niedotlenienie (*hypoxia-induced factor*, HIF-alfa) [Ryan 1998] oraz antygeny komórek śródbłonka naczyniowego CD31 [Muller 1996] oraz CD34 [Kuzu 1992].

Pod wpływem wspomnianych czynników wzrostu inicjujących neoangiogenezę, komórki śródbłonka ulegają pobudzeniu. Powstawanie nowych naczyń może zachodzić na drodze jednego z kilku mechanizmów:

- tzw. „pączkowania” komórek śródbłonka: dochodzi do rozgałęziania się istniejących naczyń do elementów nieunaczynionych;
- angiogenezy wgłobieniowej: istniejące naczynie krwionośne zostaje rozdzielone poprzez tzw. kolumnę tkankową złożoną z tkanki łącznej;
- angiogenezy kłębuszkowej: wokół naczynia krwionośnego tworzy się struktura złożona z nowych naczyń krwionośnych połączonych perycytami, przypominająca kłębuszek;
- wbudowywania naczyń krwionośnych gospodarza w utkanie nowotworowe;
- tworzenia tzw. pseudonaczyń na skutek mimikry naczyniowej.

Co ciekawe, w wielu przypadkach wspomniane mechanizmy postępują równolegle lub stanowią kolejne etapy tego samego procesu, w zależności od stadium rozwoju nowotworu. Ponadto powstające naczynia w swej budowie istotnie różnią się od prawidłowych naczyń krwionośnych [Sacewicz 2009].

Zagadnieniem, które budzi szczególne zainteresowanie jest zależność między tzw. gęstością naczyń krwionośnych (*microvascular density*, MVD) w guzach litych a agresywnością choroby. Dotychczas wykazano, że nowotwory o wysokim wskaźniku MVD, np. guzy piersi, prostaty oraz płuc, demonstrują tendencję do szybkiej progresji, rozprzestrzeniania i są związane z niekorzystnym rokowaniem [Weidner 1993, Weidner 1995]. Pomocna w określaniu MVD może być ocena ekspresji oznaczonych na komórkach śródbłonna naczyń przeciwciał przy użyciu tzw. metody „*hot spots*” („gorących miejsc”) [Owoc-Lempach 2006]. Jednym z takich przeciwciał jest anti-CD31. CD31 jest adhezyjną cząsteczką płytek krwi i śródbłonna (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1) będąca białkiem przezłonowym, która pełni ważną rolę m.in. w adhezji między sąsiadującymi komórkami śródbłonna ciągłego (np. tętnic, żył, naczyń włosowatych). Udowodniono, że jej wysoka ekspresja spotykana jest w tkankach o dużym potencjale angiogennym, do których należy zaliczyć wiele zmian nowotworowych [DeLisser 1997].

Jak dotąd zależność między unaczynieniem a agresywnością chorób nowotworowych u dzieci nie została tak szczegółowo zbadana, jak w populacji pacjentów dorosłych. Sugeruje się jednak, iż np. ocena wskaźnika MVD może być przydatna do wyodrębnienia pacjentów z nerczakiem zarodkowym o niekorzystnym rokowaniu, w tym także chorych kwalifikowanych obecnie do grupy niskiego lub pośredniego ryzyka [Abramson 2003, Ozluk 2006]. Nerczaka zarodkowego można uznać za nowotwór zależny od powstawania sieci nowych naczyń krwionośnych [Nowicki 2006], co potwierdziły badania eksperymentalne oceniające ekspresję czynników wzrostu (np. VEGF) w tkance guza, sugerując możliwość zastosowania w przyszłości terapii opartej m.in. o leki hamujące powstawanie nowych naczyń [Fischer 2004, Nowicki 2007], które możnaby uznać za element celowanego leczenia przeciwnowotworowego, ograniczającego w ten sposób wzrost nieprawidłowych komórek nowotworowych. Obecnie, w leczeniu niektórych nowotworów dorosłych stosuje się już kilka leków o takich właściwościach (bevacizumab, sorafenib, sunitib), których cechą wspólną jest swoiste działanie skierowane tylko przeciwko nieprawidłowym naczyniom nowotworowym, niezależnie od lokalizacji nowotworu i jego rodzaju [Adamkiewicz-Drożyńska 2008].

1.12. Geny związane z modulowaniem procesu angiogenezy i różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych

Mimo tego, że znane są czynniki niekorzystnej prognozy, zwiększające ryzyko wystąpienia wznowy nerczaka zarodkowego, takie jak wspomniane już powyżej anaplazja czy obecność przerzutów, jak wynika z obserwacji klinicznych są one niedoskonałe. Stąd duże nadzieje wiąże się obecnie z zastosowaniem metod biologii molekularnej, które mogą pomóc w określeniu zależności między zaburzeniami ekspresji (wyższa/niższa) określonych genów a rokowaniem i ryzykiem niekorzystnych zdarzeń. Stworzenie takiego „panelu” genów o wartości predykcyjnej wystąpienia wznowy mogłoby być przydatne w indywidualizacji terapii, i w ten sposób przyczynić się do dalszej poprawy wyników leczenia wznowy nerczaka zarodkowego.

Wielu badaczy starało się określić, które z genów mają kluczowy wpływ na rokowanie w nerczaku zarodkowym [Bown 2002, Grundy 2005, Natrajan 2006]. Mimo, że początkowo wyniki nie były jednoznaczne, kolejne prace potwierdzały zasadność ich kontynuacji, zarówno metodą reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (*real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR), jak i techniką mikromacierzy [Takashi 2002, Kullendorff 2003, Williams 2004, Zirn 2006]. Co więcej, wskazuje się, iż ekspresja określonych genów może być także pomocna w uzupełnieniu obrazu histopatologicznego oraz kwalifikacji do odpowiedniej grupy ryzyka. Mogłoby to mieć szczególne znaczenie w przypadkach rzadkich guzów nerek występujących u dzieci, które mogą czasem nastroczać trudności oceniającemu histopatologowi [Huang 2006].

Huang i wsp. [2009] badali zależność między ekspresją panelu wybranych genów a ryzykiem wystąpienia wznowy u chorych z nerczakiem zarodkowym o korzystnym obrazie histopatologicznym. U wspomnianych pacjentów z guzem w I i II stopniu zaawansowania klinicznego nie wykazano istotnej zależności między zmianą ekspresji genów a ryzykiem wznowy choroby. Natomiast u pacjentów z nowotworem w III stopniu zaawansowania w badaniu tym określono 50 różnych genów, których ekspresja z 47% czułości i 70% specyficzności wskazywała na ryzyko wznowy przy korzystnym obrazie mikroskopowym. Grundy i wsp. [2005] wykazali, iż u pacjentów z guzem w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego utrata heterozygotyczności chromosomu 1p oraz 16q stanowiły niekorzystny czynnik wznowy o czułości 8% i specyficzności 96%. Także Li i wsp. [2005] na podstawie analizy ponad 4900 genów biorących udział w nowotworzeniu, wyselekcjonowali cztery geny (*C/EBPB*, cDNA *CF542255*, *p21*, *H4FG*), które potencjalnie mogłyby „przepowiadać” wystąpienie wznowy nerczaka. Podkreślono jednak związek między rokowaniem a określoną sekwencją wyższej lub niższej ekspresji poszczególnych genów.

Sredni i wsp. [2009] analizowali ekspresję genów wśród dzieci z nerczakiem kwalifikowanym do grupy bardzo niskiego ryzyka, tj. w I stopniu zaawansowania klinicznego o korzystnym obrazie histopatologicznym i masie poniżej 550g, występującym u dzieci

poniżej 2 roku życia. Na podstawie wyników badań grupy NWTS prowadzonych od 1979 roku wykazano, że u tych pacjentów rokowanie jest bardzo dobre, a skutecznym leczeniem jest sam zabieg operacyjny [Green 1993]. Jednak jak wynika z danych literaturowych [Green 2001] oraz własnych doświadczeń [Marciniak 2009] u ok. 10% zakwalifikowanych do grupy o korzystnym rokowaniu może dojść do wznowy choroby. Co ciekawe, Sredni i wsp. wyselekcjonowali podgrupę młodszych pacjentów z nerczakiem o zróżnicowaniu nabłonkowym cewkowym (*epithelial differentiated tubular*, EDF), u których stwierdzono m.in. wyższą ekspresję genów *PAX8*, *CCND1* i *WT1* oraz brak utraty heterozygotyczności 1p, 16q i 11p, co wiązało się z brakiem wznowy choroby. Natomiast w przypadku chorych zakwalifikowanych do grupy bardzo niskiego ryzyka, u których stwierdzono mutację *WT1* i/lub utratę heterozygotyczności chromosomu 11p, ze względu na podwyższone ryzyko wznowy, leczenie nie powinno obejmować jedynie zabiegu operacyjnego [Perlman 2011].

1.13. Założenia pracy

Jak wynika z dokonanego przeglądu piśmiennictwa, nadal brakuje w pełni czułych i specyficznych markerów rokowniczych nerczaka zarodkowego, które pozwoliłyby jeszcze precyzyjniej niż obecnie ustalać rokowanie i dobierać najwłaściwszą terapię, a w przyszłości być może także wyznaczać punkty uchwytu do terapii celowanej i poprzez to przyczyniać się do dalszej poprawy wyników leczenia nerczaka u dzieci.

Wśród markerów biologicznych nerczaka zarodkowego, które mogą mieć znaczenie rokownicze wydają się, że należy przede wszystkim wziąć pod uwagę te białka, które regulują aktywność proliferacyjną komórek, białka supresorowe oraz regulujące proces apoptozy, a ze względu na szczególną rolę jaką w rozwoju nowotworowych guzów litych odgrywa ich unaczynienie, także białka oraz ekspresję genów regulujących procesy angiogenezy.

Ponadto zważywszy, że nerczak zarodkowy powstaje na podłożu dojrzewającego utkania wchodzącego w skład nerki, nie można wykluczyć, że istotne znaczenie rokownicze może mieć również ekspresja genów regulujących embriogenezę.

Znaczenie rokownicze niektórych spośród wymienionych markerów zostało już wstępnie wykazane przez niektórych autorów cytowanych we wstępie do niniejszej rozprawy i wymaga jedynie dalszej weryfikacji, natomiast szereg innych markerów biologicznych nerczaka zarodkowego nie było dotąd oceniane pod kątem znaczenia rokowniczego.

2. Cele pracy

Celem pracy była identyfikacja markerów biologicznych nerczaka zarodkowego, których ekspresja miałaby istotnie znaczenie rokownicze i pozwoliłaby na odpowiednią kwalifikację pacjentów do grup ryzyka, co mogłoby przyczynić się do poprawy wyników leczenia tego nowotworu.

Podjęto próbę wykorzystania badań immunohistochemicznych do oceny znaczenia rokowniczego następujących markerów biologicznych:

- a. ekspresji markerów aktywności proliferacyjnej, tj. białek Ki-67 i p27^{Kip1};
- b. ekspresji białka supresorowego p53;
- c. ekspresji białka błonowego CD274;
- d. aktywności ludzkiej telomerazowej odwrotnej transkryptazy (hTERT);
- e. gęstości naczyń włosowatych - ekspresji białka CD31;

a także znalezienia przydatnych testów przesiewowych ekspresji genów związanych z modulowaniem procesu angiogenezy oraz różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych mających wpływ na rozwój nerczaka zarodkowego u dzieci.

3. Pacjenci i metody

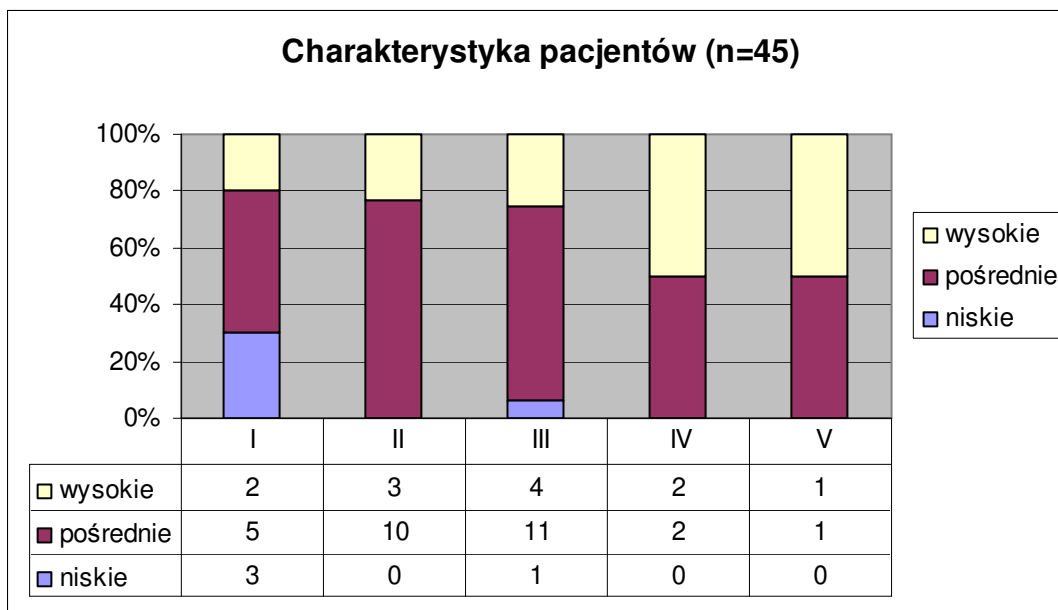
3.1. Charakterystyka pacjentów

Badaniem objęto 45 dzieci w wieku poniżej 18 roku życia w momencie rozpoznania z pierwszą manifestacją i wznową nerczaka zarodkowego, które były leczone w latach 2002-2011 zgodnie z protokołem terapeutycznym SIOP-2001 w niżej wymienionych ośrodkach onkologii dziecięcej należących do Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Guzów Litych i akredytowanych przez Polskiego Towarzystwo Onkologii i Hematologii Dziecięcej:

- Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (n=19),
- Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy (n=1),
- Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (n=5),
- Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (n=19),
- Oddziału Chirurgii Dziecięcej Dolnośląskiego Szpitala Specjalistycznego im. Tadeusza Marciniaka we Wrocławiu (n=1).

W analizowanej grupie chorych były 23 dziewczynki (51%) i 22 chłopców (49%), w wieku od 0,1-17,5 lat (mediana 3,2 roku) w momencie zachorowania. Rozpoznanie a także stopień zaawansowania choroby zostały ustalone na podstawie obrazu klinicznego a także badań obrazowych (USG jamy brzusznej, RTG klatki piersiowej, TK klatki piersiowej i jamy brzusznej, ewentualnie MR jamy brzusznej), z uwzględnieniem diagnostyki różnicowej wykluczającej zwojaka zarodkowego (dobowa zbiórka moczu oceniająca wydalanie metabolitów katecholamin, w niektórych przypadkach także biopsja aspiracyjna szpiku kostnego). U 3 pacjentów ze względu na niejednoznaczny obraz kliniczny i wyniki w/w badań wykonana została biopsja guza, która zgodnie z protokołem SIOP-2001 kwalifikuje pacjenta do wyższego stopnia zaawansowania (tj. st. III).

Na podstawie wyników wykonanych badań diagnostycznych i zgodnie z kryteriami przyjętymi przez SIOP [Graff 2004] ustalano stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz określono grupę ryzyka uwzględniając obraz histopatologiczny (Rycina 2.).



Rycina 2. Charakterystyka całej badanej grupy (n=45). W kolejnych kolumnach przedstawiono procentowy udział pacjentów z guzami zakwalifikowanymi do odpowiednich grup ryzyka w zależności od budowy histopatologicznej w poszczególnych stopniach zaawansowania klinicznego. W tabeli podano liczbowy rozkład pacjentów w zależności od grupy ryzyka i stopnia zaawansowania choroby.

W zależności od stopnia zaawansowania klinicznego pacjenci otrzymywali odpowiednią chemioterapię przedoperacyjną, tj. w przypadku st. I-III była to 4-tygodniowa chemioterapia (AV) złożona z winkrystyny i aktynomycyny-D, natomiast pacjenci z nerczakiem zarodkowym w IV stopniu zaawansowania kwalifikowani byli do grupy wysokiego ryzyka i otrzymywali chemioterapię przedoperacyjną trwającą 6 tygodni (winkrystyna, aktynomycyna-D, dokсорubicyna). Dwoje pacjentów z nerczakiem zarodkowym w st. V otrzymało 4-tygodniową chemioterapię (AV) złożoną z winkrystyny i aktynomycyny-D.

Sześcioro pacjentów nie otrzymało chemioterapii przedoperacyjnej, ponieważ ze względu na wątpliwości diagnostyczne lub wskazania życiowe zabieg operacyjny wykonano już na wstępie leczenia.

Po zakończeniu chemioterapii przedoperacyjnej oraz ocenie obrazowej odpowiedzi na zastosowane leczenie wykonywana była doszczętna operacyjna resekcja guza resztkowego, następnie, w oparciu o klasyczne barwienie histologiczne hematoksyliną i eozyną (H+E), a w niektórych przypadkach także badania immunohistochemiczne wykonywane w pracowniach patomorfologii ośrodków leczących, ustalane było rozpoznanie histopatologiczne. Następnie pacjenci stratyfikowani byli do odpowiedniego ramienia terapeutycznego w zależności od stopnia klinicznego zaawansowania nerczaka i typu jego utkania. Czas obserwacji w badanej grupie pacjentów wyniósł od 1 do 9 lat (mediana: 6,1 lat).

3.2. Materiał

Badania immunohistochemiczne i molekularne wykonywane były wyłącznie w materiale (błoczki parafinowe, świeża tkanka) pobranym do rutynowych badań diagnostycznych z guza usuniętego podczas zabiegu operacyjnego stanowiącego podstawową składową kompleksowej terapii.

Z uwagi na niewielką liczbę nowych rozpoznań nerczaka zarodkowego dokonanych w czasie realizacji projektu badawczego (lata 2009-2011) duża część materiału otrzymanego do badań immunohistochemicznych, które było elementem rozprawy doktorskiej, pochodziła ze zbiorów archiwalnych poszczególnych ośrodków. Natomiast świeża tkanka pochodziła od pacjentów, u których w trakcie trwania projektu po resekcji guza na sali operacyjnej pobrano fragment tkanki nowotworowej.

3.3. Metody

3.3.1. Badania immunohistochemiczne

3.3.1.1. Materiał do badań immunohistochemicznych

Początkowo badaniem objęto grupę 75 dzieci hospitalizowanych z powodu guza nerki w wymienionych ośrodkach onkologii dziecięcej:

- Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (n=40),
- Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy (n=3),
- Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (n=6),
- Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (n=23),
- Oddziału Chirurgii Dziecięcej Dolnośląskiego Szpitala Specjalistycznego im. Tadeusza Marciniaka we Wrocławiu (n=3).

Po wstępnej ocenie preparatów barwionych metodą H+E, próbki pochodzące od 24 dzieci uznano za niediagnostyczne (brak utkania nowotworowego nerczaka: martwica [13], tkanka tłuszczowa [3], tkanka łączna [3], utkanie zdrowej nerki [5]), 6 pacjentów wykluczono z badania z powodu innego niż nerczak zarodkowy rozpoznania histopatologicznego (rak jasnokomórkowy nerki [1], nerczak mezoblastyczny [5]).

Z tego względu, dalsza analiza dotyczyła materiału pochodzącego od 45 pacjentów. Materiał histologiczny pochodził z guza usuniętego chirurgicznie bez wstępnej chemioterapii przedoperacyjnej (6 pacjentów) lub z guza resekowanego po zrealizowaniu chemioterapii

przedoperacyjnej (38 pacjentów), a w jednym przypadku z usuniętej chirurgicznie zmiany stwierdzonej we wczesnej wznowie nerczaka zarodkowego.

W pracowniach patomorfologii w ośrodkach, w których leczone były dzieci stanowiące grupę badaną, materiał tkankowy wcześniej utrwalony był w 10% formalinie buforowanej i zatapiany w parafinie. Przygotowane w ten sposób bloczki krojono na skrawki, które montowano na szkiełkach podstawowych SuperFrost® Plus (Thermo Scientific, firma Menzel-Glaser) i tak zabezpieczone wysyłano do doktorantki celem wykonania dalszych badań.

Wśród otrzymanych 47 preparatów pochodzących od 45 pacjentów (2 preparaty pochodzące od pacjenta z nerczakiem zarodkowym w st. V oraz 2 preparaty pochodzące od pacjenta z nerczakiem zarodkowym w pierwszej manifestacji oraz wznowy) stwierdzono:

- 12 preparatów zawierających utkanie guza monofazowego (w tym u jednej pacjentki w nerce lewej, z nerczakiem zarodkowym w st. V),
- 27 preparatów zawierających utkanie guza dwufazowego (w tym w guzie u chłopca z pierwszą manifestacją choroby oraz wznowie),
- 8 preparatów zawierających utkanie klasycznego guza trójfazowego (w tym u dwóch pacjentów z nerczakiem zarodkowym w st. V).

Badania immunohistochemiczne doktorantka wykonywała w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.3.1.2. Metodologia badań immunohistochemicznych

W otrzymanych preparatach wykonano odczyny immunohistochemiczne z wykorzystaniem dwuetapowego systemu detekcyjnego Dako REAL™ EnVision™, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (firma Dako, kod K5007).

Po odparafinowaniu w szeregu ksylenów (3×10 minut) i odwodnieniu w szeregu alkoholi o malejących stężeniach: 99,8%, 96%, 85%, 70% (po 3 minuty), skrawki płukano w wodzie kranowej (5 minut) i destylowanej (5 minut). Następnie zablokowano aktywność endogennej peroksydazy w 1% roztworze nadtlenu wodoru (30 minut) i ponownie preparaty płukano w wodzie kranowej (5 minut) oraz destylowanej (5 minut). W celu odmaskowania epitopu skrawki umieszczono w buforze cytrynianowym o pH 6,0 (Dako REAL™, Target Retrieval Solution, kod S2031) i poddano obróbce termicznej (2×5 minut, moc kuchenki mikrofalowej 600 W). Po wystudzeniu preparaty płukano w wodzie destylowanej (3×5 minut) a następnie w buforze fosforanowym (PBS; firma Sigma-Aldrich, kod P4417) o pH 7,4 (3×5 minut). Pierwszy etap oceny immunohistochemicznej z użyciem systemu detekcyjnego Dako REAL™ EnVision™ zakończył się całonocną inkubacją w komorze wilgotnej z pierwotnymi przeciwciałami w odpowiednich stężeniach. Następnie po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, skrawki przemywano wodą destylowaną i trzykrotnie płukano w buforze PBS (3×5

minut). W celu uwidocznienia reakcji antygen-przeciwciała, wykonywano półgodzinną inkubację z odczynnikiem detekcyjnym Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse, który jest polimerem koniugowanym z peroksydazą oraz wtórnymi przeciwciałami króliczymi i mysimi. Po trzykrotnym wypłukaniu preparatów w roztworze PBS, reakcja została zobrazowana po inkubacji (4 minuty) z Dako REAL™ DAB+ Chromogen (tetrachlorek 3,3 diaminobenzzydiny). Po zakończeniu reakcji immunohistochemicznej preparaty zostały wypłukane w wodzie bieżącej (10 minut) i destylowanej (5 minut), zabarwione hematoksyliną (1 minuta) i odwadniane w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach i szeregu ksylenów, a następnie zamknięte szkiełkiem nakrywkowym montowanym w histofluidzie.

Badania przeprowadzone zostały przy użyciu swoistych przeciwciał przeznaczonych do preparatów zatopionych w parafinie. Zastosowane przeciwciała podano w Tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka zastosowanych przeciwciał

Nazwa biała	Rodzaj przeciwciała	Klon przeciwciała	Kod produktu	Firma	Rozcieńczenie
Ki-67	monoklonalne mysie antyludzkie	MIB-1	M7240	DAKO	1:150
p27^{kip1}	monoklonalne mysie antyludzkie	SX53G8	M7203	DAKO	1:40
p53	monoklonalne mysie antyludzkie	DO-7	M7001	DAKO	1:40
CD274	poliklonalne królicze antyludzkie	-	AHP1703	AbDSerotec	1:400
hTERT	poliklonalne królicze antyludzkie	-	T2399-29	USBiological	1:400
CD31	monoklonalne mysie antyludzkie	JC70A	M0823	DAKO	1:40

Wykonywano także kontrolne reakcje negatywne - skrawki nie były inkubowane z pierwszorzędowym przeciwciałem a jedynie z mysim IgG1 (Dako ER/PR pharmDx™ Negative Control Reagent).

3.3.1.3. Ocena ekspresji reakcji immunohistochemicznych

Reakcje immunohistochemiczne w preparatach pochodzących od pacjentów z nerczakiem zarodkowym oceniane były przez dwie niezależne osoby, w tym doktorantkę, przy użyciu mikroskopu świetlnego konsultacyjnego BH2 firmy Olympus pod końcowym powiększeniem 100× i 200×. Ekspresja wszystkich analizowanych białek oceniana była w trzech elementach składowych klasycznego utkania nerczaka zarodkowego (nabłonkowym, zrębowym i blastemicznym).

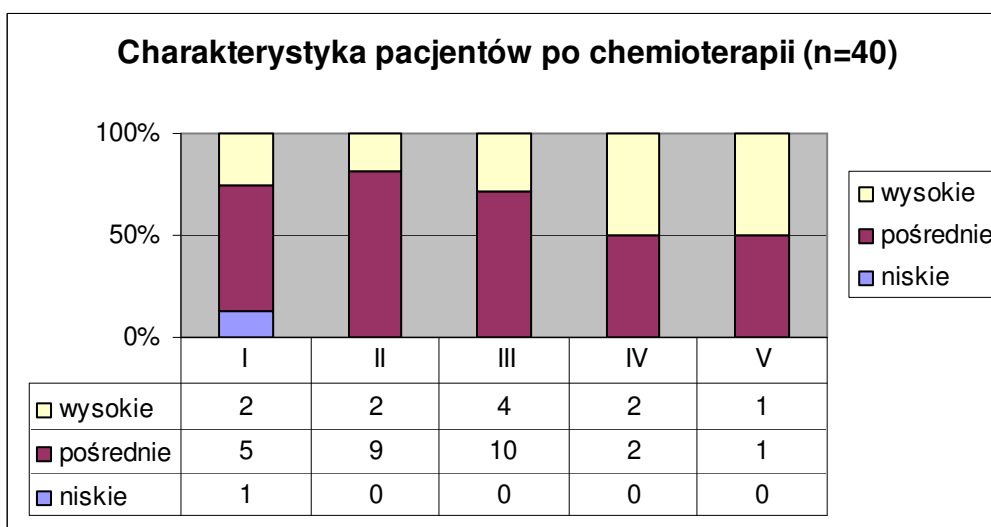
Ocena ekspresji białek Ki-67, p27^{kip1}, p53, CD274 oraz hTERT

Ocenę ekspresji w/w białek oparto o półilościową 12-punktową skalę według Remmele i Stegner (*immunoreactive score, IRS*) (Tabela 3.) [Remmele 1987], oceniając zarówno odsetek komórek z pozytywną reakcją (A), jak i intensywność reakcji immunohistochemicznej (B). Wartość końcową stanowił iloczyn A x B, będąc wartością w przedziale 0 do 12 punktów.

Tabela 3. Skala IRS wg Remmele i Stegner

Skala IRS wg Remmele i Stegner (0-12 punktów)	
A: liczba komórek immunopozytywnych	B: intensywność reakcji
0: brak komórek z pozytywną reakcją	0: brak reakcji barwnej
1: do 10% komórek z pozytywną reakcją	1: słabo nasilona reakcja barwna
2: 11 do 50% komórek z pozytywną reakcją	2: średnio nasilona reakcja barwna
3: 51 do 80% komórek z pozytywną reakcją	3: intensywna reakcja barwna
4: > 80% komórek z pozytywną reakcją	
iloczyn A x B	

Ze względu na małą liczbę pacjentów, którzy nie otrzymali chemioterapii przedoperacyjnej (n=6) i ich znaczne zróżnicowanie (niskie ryzyko: 3, pośrednie ryzyko: 2, wysokie ryzyko: 1) nie uwzględniono ich w analizie porównawczej. Natomiast dalsza analiza dotyczyła preparatów pochodzących od pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną (n=40, w tym pacjentka z obustronnym nerczakiem zarodkowym w V stopniu zaawansowania) (Rycina 3).



Rycina 3. Charakterystyka grupy pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (n=40). W kolejnych kolumnach przedstawiono procentowy udział pacjentów z guzami zakwalifikowanymi do odpowiednich grup ryzyka w zależności od budowy histopatologicznej w poszczególnych stopniach zaawansowania klinicznego. W tabeli podano liczbowy rozkład pacjentów w zależności od grupy ryzyka i stopnia zaawansowania choroby.

Zdecydowano ocenić zależności w obrębie trzech poniższych grup:

- u wszystkich pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną (n=40);
- u pacjentów pośredniego ryzyka, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną (n=28);
- u pacjentów wysokiego ryzyka, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną (n=11).

W obrębie opisanych grup zdecydowano przeanalizować poniższe zależności:

1) ekspresja badanych białek w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego oceniona wg skali IRS a grupa ryzyka wg podziału histopatologicznego:

a) grupa pośredniego (n: 28) vs wysokiego (n: 11) ryzyka;

2) ekspresja badanych białek w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego oceniona wg skali IRS a stopień zaawansowania klinicznego:

a) wszyscy pacjenci po chemioterapii przedoperacyjnej (I:8, II: 11, III:14, IV: 4, V:3): I-III vs IV

b) pacjenci pośredniego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej (I: 5, II: 9, III: 10, IV: 2, V:2): I-III vs IV

c) pacjenci wysokiego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej (I: 2, II: 2, III: 4, IV: 2, V:1): I-III vs IV

3) ekspresja badanych białek w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego oceniona wg skali IRS a wiek rozpoznania nerczaka zarodkowego (<2rż>):

- a) wszyscy pacjenci po chemioterapii przedoperacyjnej: <2 rż: 11 vs >2 rż: 29;
 - b) pacjenci pośredniego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej: <2rż: 8 vs >2 rż: 20;
 - c) pacjenci wysokiego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej: <2 rż: 2 vs >2 rż: 9;
- 4) ekspresja badanych białek w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego oceniona wg skali IRS a wiek rozpoznania nerczaka zarodkowego (<4rż>):**
- a) wszyscy pacjenci po chemioterapii przedoperacyjnej: <4 rż: 23 vs >4 rż: 17;
 - b) pacjenci pośredniego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej: <4rż: 14 vs >4 rż: 14;
 - c) pacjenci wysokiego ryzyka po chemioterapii pooperacyjnej: <4 rż: 8 vs >4 rż: 3;
- 5) ekspresja badanych białek w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego oceniona wg skali IRS a wystąpienie progresji/wznowy choroby:**
- a) wszyscy pacjenci po chemioterapii przedoperacyjnej: progresja/wznowa: 5 vs remisja: 35;

Ocena ekspresji CD31 (gęstość naczyń krwionośnych)

Gęstość naczyń krwionośnych (*microvessel density*, MVD) oznaczającą uśrednioną ilość naczyń krwionośnych na 1 mm², oceniano w mikroskopie świetlnym na preparatach „wyznakowanych” antygenem CD31. Oglądając preparaty pod małym powiększeniem poszukiwano obszaru o najbogatszym unaczynieniu, tzw. „*hot spot*”, w obrębie którego, pod końcowym powiększeniem 200x, wybierano trzy najbardziej unaczynione fragmenty analizowanej tkanki. Następnie zliczano w nich ilość naczyń krwionośnych, w których doszło do ekspresji CD31 w obrębie pola widzenia o powierzchni 0,19625 mm² naczynia [Owoc-Lempach 2006]. Należy wspomnieć, że do oceny ekspresji CD31 brane były wszystkie wybarwione komórki tworzące naczynia krwionośne, bez względu na obecność lub brak światła naczynia. Kolejnym etapem było przeliczenie liczby naczyń występujących w każdym ocenianym miejscu na 1 mm². Pozwoliło to obliczyć średnią arytmetyczną z trzech ocenionych wcześniej „*hot spots*”, która jako wartość MVD, była konieczna do dalszej analizy. Następnie oceniono zależności podobne jak w przypadku wymienionych powyżej białek.

3.3.2. Badania molekularne

3.3.2.1. Materiał do badań molekularnych

Materiał do badań molekularnych pochodził od 23 pacjentów, u których w trakcie realizacji projektu badawczego w latach 2009-2011 po resekcji guza wykonanej po zastosowaniu chemioterapii przedoperacyjnej pobrano fragment tkanki nowotworowej. Ośrodki współpracujące otrzymały wskazówki dotyczące pobierania i zabezpieczania materiału do dalszych badań. Zgodnie z nimi przed umieszczeniem w formalinie usuniętego

guza, w warunkach pełnej jałowości pobierano 1 cm³ tkanki i umieszczono go w płynie *RNA-later* a następnie w temperaturze +4°C materiał był przesyłany do doktorantki i zamrażany w temperaturze - 25°C.

Badania molekularne wykonywane były w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.3.2.2. Metodologia badań molekularnych

Aby ocenić ekspresję genów zaangażowanych w proces modulowania angiogenezy oraz genów związanych z różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych zastosowano metodę odwrotnej transkrypcji PCR (*reverse transcription PCR*, RT-PCR). Na wstępie z materiału tkankowego izolowano informacyjny RNA (*messenger RNA*, mRNA), a następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji na komplementarny DNA (*complementary DNA*, cDNA), po czym wykonano reakcję *real time-PCR* inkubując uzyskany materiał w dostępnych komercyjnie odpowiednich macierzach płytkowych.

Izolacja RNA

Po rozmrożeniu otrzymanych fragmentów tkanek nowotworowych pochodzących od dzieci z nerczakiem zarodkowym i rozdrobnieniu do homogenatu, dodano po 1 ml odczynnika lizującego TRI Reagent (firma Sigma-Aldrich). Następnie do probówek dodano 0,2 ml chloroformu. Po energicznym wytrząsaniu, probówki były pozostawione w temperaturze pokojowej na około 15 minut. Kolejnym etapem było odwirowanie ich w temperaturze 4°C z prędkością 12 000 g (przez 15 minut). Pozostały na dnie probówki osad był usunięty, natomiast górna warstwa zawierająca RNA była umieszczana w nowych probówkach, do których dodano po 0,5 ml izopropanolu w celu wytrącenia wody. Po wymieszaniu probówki pozostawione były przez 10 minut w temperaturze pokojowej a następnie odwirowane w temperaturze 4°C z prędkością 12 000 g (przez 10 minut). Po usunięciu supernatantu osad RNA rozpuszczony został w 1 ml 75% etanolu i wytrząsany przez 20 sekund. Powstałą mieszaninę wirowano w temperaturze 4°C z prędkością 20 000 g (przez 5 minut). Następnie alkohol etylowy był usunięty a pozostały osad osuszony i rozpuszczony w czystej wodzie wolnej od RNAz. Stężenie wyizolowanego RNA określone zostało przy pomocy spektrofotometru.

Materiał genetyczny udało się wyizolować u 22 pacjentów, ponieważ w jednym przypadku jego ilość była niewystarczająca do dalszej analizy.

Odwrotna transkrypcja

Reakcja odwrotnej transkrypcji, która ma na celu przepisanie mRNA na cDNA oparta była o zestaw odczynników Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (firma Roche).

Do próbki każdego badanego pacjenta dodano 1000 ng wyizolowanego wcześniej mRNA oraz 1 µl startera oligo(dT)₁₈ o stężeniu 50 pmol/µl, 2 µl startera hexamer o stężeniu 600 pmol/µl a następnie dopełniono wodą dejonizowaną do objętości 13 µl. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze 65°C, mieszaninę reakcyjną schładzano na lodzie. W kolejnym etapie dodano 4 µl buforu reakcyjnego RB (5-krotnie stężonego), 0,5 µl inhibitora RNAz (40 U/µl), 2 µl mieszaniny deoksynuleotydów dNTP (10mM) oraz 0,5 µl odwrotnej transkryptazy (20 U/µl). Następnie, używając termocyklera firmy Eppendorf, przeprowadzono reakcję w temperaturach wzrastających: przez 10 minut w temperaturze 25°C, 60 minut w temperaturze 50°C oraz 5 minut w temperaturze 85°C, by następnie schłodzić mieszaninę reakcyjną na lodzie.

Należy wspomnieć, że ze względu na niewielką ilość wyizolowanego mRNA, aby możliwe było uzyskanie odpowiedniej ilości cDNA, objętość zastosowanych odczynników została 6-krotnie zwiększona w porównaniu z zaleceniami producenta.

Reakcja łańcuchowej polimerazy PCR w czasie rzeczywistym (real time-PCR)

Po uzyskaniu cDNA możliwe było wykonanie reakcji *real time*-PCR w oparciu o inkubację na komercyjnie dostępnych 96-dółkowych macierzach płytkowych zawierających pary starterów dla odpowiednich grup genów, tj. genów zaangażowanych w proces modulowania angiogenezy (Human Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors PCR Array, firma SABioscience, nr kat. PAHS-072A) (Tabela 4.) oraz genów związanych z różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych (Human Embryonic Stem Cells PCR Array, firma SABioscience, nr kat. PAHS-081A) (Tabela 5.). U każdego pacjenta ekspresja wymienionych genów wykonywana została na osobnej płytce (96 oddzielnych reakcji RT-PCR), przy czym każda z nich zawierała startery dla 84 badanych genów, 5 genów referencyjnych (*housekeeping genes*, HKG) oraz kontrole pozwalające na wykrycie zanieczyszczenia genomowym DNA, kontrolę reakcji odwrotnej transkrypcji a także pozytywną kontrolę PCR oceniającą wydajność reakcji. Nie podano sekwencji starterów oraz wielkości powstających produktów.

Tabela 4. Lista genów zaangażowanych w proces modulowania angiogenezy oraz reakcji kontrolnych dla macierzy płytkowych (Human Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors PCR Array, nr kat. PAHS-072, firma SABiosciences)

Pozycja	Unigene	GeneBank	Symbol	Opis	Nazwa genu
A01	Hs.634849	NM_018046	AGGF1	Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1	FLJ10283, GPATC7, GPATCH7, HSU84971, HUS84971, VG5Q
A02	Hs.528051	NM_133265	AMOT	Angiomotin	KIAA1071
A03	Hs.283749	NM_001145	ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ALS9, HEL168, MGC22466, MGC71966, RNASE4, RNASE5
A04	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1, AGPT, ANG1
A05	Hs.583870	NM_001147	ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2, ANG2

A06	Hs.591474	NM_004673	ANGPTL1	Angiopoietin-like 1	ANG3, ANGPT3, ARP1, AngY, KIAA0351, UNQ162, dJ595C2.2
A07	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	FLJ41988, GDAIF
A08	Hs.73853	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	BMP2A
A09	Hs.255935	NM_001731	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	-
A10	Hs.272493	NM_032965	CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	HCC-2, HMRP-2B, LKN-1, LKN1, MIP-1D, MIP-5, MRP-2B, NCC-3, NCC3, SCYA15, SCYL3, SY15
A11	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF
A12	Hs.126517	NM_000574	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	CR, CROM, DAF, TC
B01	Hs.278573	NM_000611	CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein	16.3A5, 1F5, EJ16, EJ30, EL32, FLJ38134, FLJ92039, G344, HRF-20, HRF20, MAC-IP, MACIF,
B02	Hs.150793	NM_001275	CHGA	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	CGA
B03	Hs.517356	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	FLJ27325, FLJ34914, KNO, KNO1, KS, MGC74745
B04	Hs.570065	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-
B05	Hs.2233	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	C17orf33, CSF3OS, GCSF, MGC45931
B06	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7, IFI10, INP10, IP-10, SCYB10, crg-2, gIP-10, mob-1
B07	Hs.632592	NM_005409	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	H174, I-TAC, IP-9, IP9, MGC102770, SCYB11, SCYB9B, b-R1
B08	Hs.522891	NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	IRH, PBSF, SCYB12, SDF1, SDF1A, SDF1B, TLSF, TPAR1
B09	Hs.100431	NM_006419	CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	ANGIE, ANGIE2, BCA-1, BCA1, BLC, BLR1L, SCYB13
B10	Hs.483444	NM_004887	CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	BMAC, BRAK, KEC, KS1, MGC10687, MIP-2g, MIP2G, NJAC, SCYB14
B11	Hs.590921	NM_002089	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CINC-2a, GRO2, GROb, MGSA-b, MIP-2a, MIP2, MIP2A, SCYB2
B12	Hs.89690	NM_002090	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CINC-2b, GRO3, GROg, MIP-2b, MIP2B, SCYB3
C01	Hs.89714	NM_002994	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78, SCYB5
C02	Hs.164021	NM_002993	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CKA-3, GCP-2, GCP2, SCYB6
C03	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CMK, Humig, MIG, SCYB9, crg-10
C04	Hs.592212	NM_001953	TYMP	Thymidine phosphorylase	ECGF, ECGF1, MEDPS1, MNGIE, MTDPS1, PDECGF, TP, hPD-ECGF
C05	Hs.482730	NM_005711	EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	DEL1, MGC26287
C06	Hs.115263	NM_001432	EREG	Epiregulin	ER
C07	Hs.483635	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	AFGF, ECGF, ECGF-beta, ECGFA, ECGFB, FGF-alpha, FGFA, GLIO703, HBGF1
C08	Hs.6540	NM_004114	FGF13	Fibroblast growth factor 13	FGF-13, FGF2, FHF-2, FHF2
C09	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF, FGFB, HBGF-2

C10	Hs.1690	NM_005130	FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1	FGFBP, HBP17
C11	Hs.11392	NM_004469	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D, VEGFD
C12	Hs.203717	NM_002026	FN1	Fibronectin 1	CIG, DKFZp686F10164, DKFZp686H0342, DKFZp686H1370, DKFZp686O13149, ED-B, FINC, FN, FNZ, GFND, GFND2, LETS, MSF
D01	Hs.9914	NM_006350	FST	Follistatin	FS
D02	Hs.514220	NM_002087	GRN	Granulin	GEP, GP88, PCDGF, PEPI, PGRN
D03	Hs.153444	NM_002091	GRP	Gastrin-releasing peptide	BN, GRP-10, preproGRP, proGRP
D04	Hs.396530	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	DFNB39, F-TCF, HGFB, HPTA, SF
D05	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL, IFN, IFN-ALPHA, IFN-alphaD, IFNA13, IFNA@, MGC138207, MGC138505, MGC138507
D06	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB, IFF, IFNB, MGC96956
D07	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFG, IFI
D08	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10	CSIF, IL-10, IL10A, MGC126450, MGC126451, TGIF
D09	Hs.673	NM_000882	IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	CLMF, IL-12A, NFSK, NKSF1, P35
D10	Hs.674	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	CLMF, CLMF2, IL-12B, NKSF, NKSF2
D11	Hs.272295	NM_052872	IL17F	Interleukin 17F	IL-17F, ML-1, ML1
D12	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6
E01	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	CXCL8, GCP-1, GCP1, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1, NAP1
E02	Hs.1048	NM_003994	KITLG	KIT ligand	DKFZp686F2250, FPH2, KL-1, Kitl, MGF, SCF, SF, SHEP7
E03	Hs.171995	NM_001648	KLK3	Kallikrein-related peptidase 3	APS, KLK2A1, PSA, hK3
E04	Hs.194236	NM_000230	LEP	Lepton	FLJ94114, OB, OBS
E05	Hs.82045	NM_002391	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	FLJ27379, MK, NRG2
E06	Hs.584654	NM_005938	FOXO4	Forkhead box O4	AFX, AFX1, MGC120490, MLLT7
E07	Hs.219140	NM_002521	NPPB	Natriuretic peptide B	BNP
E08	Hs.490330	NM_000906	NPR1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	ANPRA, ANPa, GUC2A, GUCY2A, NPRA
E09	Hs.1976	NM_002608	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	FLJ12858, PDGF2, SIS, SSV, c-sis
E10	Hs.352298	NM_025208	PDGFD	Platelet derived growth factor D	IEGF, MGC26867, SCDGF-B, SCDGFB
E11	Hs.81564	NM_002619	PF4	Platelet factor 4	CXCL4, MGC138298, SCYB4
E12	Hs.252820	NM_002632	PGF	Placental growth factor	D12S1900, PGFL, PLGF, PIGF-2, SHGC-10760
F01	Hs.143436	NM_000301	PLG	Plasminogen	DKFZp779M0222
F02	Hs.2164	NM_002704	PPBP	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	B-TG1, Beta-TG, CTAP-III, CTAP3, CTAPIII, CXCL7, LA-PF4, LDGF, MDGF, NAP-2, PBP, SCAR10,
F03	Hs.1905	NM_000948	PRL	Prolactin	-
F04	Hs.514793	NM_032414	PROK1	Prokineticin 1	EGVEGF, PK1, PRK1

F05	Hs.371249	NM_002825	PTN	Pleiotrophin	HARP, HBGF8, HBNF, NEGF1
F06	Hs.502876	NM_004040	RHOB	Ras homolog gene family, member B	ARH6, ARHB, MST081, MSTP081, RHOH6
F07	Hs.530687	NM_002939	RNH1	Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	MGC18200, MGC4569, MGC54054, RAI, RNH
F08	Hs.149261	NM_001754	RUNX1	Runt-related transcription factor 1	AML1, AML1-EVI-1, AMLCR1, CBFA2, EVI-1, PEBP2aB
F09	Hs.75599	NM_000488	SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	AT3, ATIII, MGC22579
F10	Hs.414795	NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1
F11	Hs.532768	NM_002615	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	EPC-1, PEDF
F12	Hs.331555	NM_006846	SPINK5	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	DKFZp686K19184, FLJ21544, FLJ97536, FLJ97596, FLJ99794, LEKTI, LETKI, NETS, NS,
G01	Hs.301989	NM_015136	STAB1	Stabilin 1	CLEVER-1, FEEL-1, FELE-1, FEX1, KIAA0246,
G02	Hs.170009	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, Ralpha	TFGA
G03	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFbeta
G04	Hs.164226	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1
G05	Hs.78824	NM_005424	TIE1	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	JTK14, TIE
G06	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI, EPA, EPO, FLJ90373, HCI, TIMP
G07	Hs.633514	NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	CSC-21K
G08	Hs.644633	NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	HSMRK222, K222, K222TA2, SFD
G09	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor	DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2
G10	Hs.523403	NM_003282	TNNI2	Troponin I type 2 (skeletal, fast)	AMCD2B, DA2B, FSSV, fsTnl
G11	Hs.644596	NM_000363	TNNI3	Troponin I type 3 (cardiac)	CMD1FF, CMD2A, CMH7, MGC116817, RCM1, TNNC1, cTnl
G12	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	MGC70609, MVCD1, VEGF, VPF
H01	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	-
H02	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1	HGPRT, HPRT
H03	Hs.728776	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	L13A, TSTA1
H04	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD, GAPD, MGC88685
H05	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Tabela 5. Lista genów związanych z różnicowaniem macierzystych komórek embrjonalnych oraz reakcji kontrolnych dla macierzy płytkowych (Human Embryonic Stem Cells PCR Array, nr kat. PAHS-081A, firma SABioscience)

Pozycja	Unigene	GeneBank	Symbol	Opis	Nazwa genu
A01	Hs.518808	NM_001134	AFP	Alpha-fetoprotein	FETA, HPAFP
A02	Hs.718510	NM_018321	BRX1	BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (S. cerevisiae)	BRX1, BXDC2, FLJ11100
A03	Hs.374990	NM_001773	CD34	CD34 molecule	-
A04	Hs.114286	NM_001769	CD9	CD9 molecule	BTCC-1, DRAP-27, FLJ99568, MIC3, MRP-1, TSPAN-29, TSPAN29
A05	Hs.76206	NM_001795	CDH5	Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)	7B4, CD144, FLJ17376
A06	Hs.174249	NM_001265	CDX2	Caudal type homeobox 2	CDX-3, CDX3
A07	Hs.172928	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	O14
A08	Hs.534398	NM_012071	COMMD3	COMM domain containing 3	BUP, C10orf8, DKFZp686K0399,
A09	Hs.405662	NM_001878	CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	CRABP-II, RBP6
A10	Hs.223581	NM_024415	DDX4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	MGC111074, VASA
A11	Hs.594952	NM_001927	DES	Desmin	CMD11, CSM1, CSM2, FLJ12025, FLJ39719,
A12	Hs.226483	NM_006729	DIAPH2	Diaphanous homolog 2 (Drosophila)	DIA, DIA2, DRF2, FLJ11167, POF, POF2
B01	Hs.643024	NM_006892	DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	ICF, M.HsaIIIB
B02	Hs.82002	NM_000115	EDNRB	Endothelin receptor type B	ABCD5, ET-B, ET-BR, ETB, ETBR, ETRB, HSCR, HSCR2, WS4A
B03	Hs.591663	NM_005442	EOMES	Eomesodermin	TBR2
B04	Hs.1755	NM_002007	FGF4	Fibroblast growth factor 4	HBGF-4, HST, HST-1, HSTF1, K-FGF, KFGF
B05	Hs.37055	NM_004464	FGF5	Fibroblast growth factor 5	HBGF-5, Smag-82
B06	Hs.654360	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT, VEGFR1
B07	Hs.203717	NM_002026	FN1	Fibronectin 1	CIG, DKFZp686F10164, DKFZp686H0342, DKFZp686I1370, DKFZp686O13149, ED-B,
B08	Hs.155651	NM_021784	FOXA2	Forkhead box A2	HNF3B, MGC19807, TCF3B
B09	Hs.546573	NM_012183	FOXD3	Forkhead box D3	AIS1, Genesis, HFH2
B10	Hs.302352	NM_000814	GABRB3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3	ECA5, MGC9051
B11	Hs.278959	NM_015973	GAL	Galanin prepropeptide	GALN, GLNN, GMAP, MGC40167
B12	Hs.243987	NM_002052	GATA4	GATA binding protein 4	MGC126629
C01	Hs.514746	NM_005257	GATA6	GATA binding protein 6	-
C02	Hs.184945	NM_001485	GBX2	Gastrulation brain homeobox 2	-
C03	Hs.516494	NM_002054	GCG	Glucagon	GLP1, GLP2, GRPP
C04	Hs.28346	NM_003643	GCM1	Glial cells missing homolog 1 (Drosophila)	GCMA, hGCMa
C05	Hs.86232	NM_020634	GDF3	Growth differentiation factor 3	KFS3, MCOP7, MCOPCB6
C06	Hs.86859	NM_005310	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7	-
C07	Hs.523443	NM_000518	HBB	Hemoglobin, beta	CD113t-C, beta-globin
C08	Hs.585357	NM_005332	HBZ	Hemoglobin, zeta	-
C09	Hs.655210	NM_002110	HCK	Hemopoietic cell kinase	JTK9
C10	Hs.46835	NM_000415	IAPP	Islet amyloid polypeptide	DAP, IAP
C11	Hs.458414	NM_003641	IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1	9-27, CD225, IFI17, LEU13

C12	Hs.709321	NM_006435	IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2	1-8D
D01	Hs.35354	NM_006548	IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	IMP-2, IMP2, VICKZ2, p62
D02	Hs.532082	NM_002184	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	CD130, CDW130, DKFZp564F053, GP130, IL-6RB
D03	Hs.654579	NM_000207	INS	Insulin	IDDM2, ILPR, IRDN, MODY10
D04	Hs.479754	NM_000222	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	C-Kit, CD117, PBT, SCFR
D05	Hs.80828	NM_006121	KRT1	Keratin 1	CK1, EHK, EHK1, EPPK, K1, KRT1A, NEPPK
D06	Hs.270364	NM_005559	LAMA1	Laminin, alpha 1	LAMA, S-LAM-alpha
D07	Hs.650585	NM_002291	LAMB1	Laminin, beta 1	CLM, MGC142015
D08	Hs.609663	NM_002293	LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	LAMB2, MGC87297
D09	Hs.656214	NM_020997	LEFTY1	Left-right determination factor 1	LEFTB, LEFTYB
D10	Hs.520187	NM_003240	LEFTY2	Left-right determination factor 2	EBAF, LEFTA, LEFTYA, MGC46222, TGFB4
D11	Hs.133421	NM_002310	LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor alpha	CD118, FLJ98106, FLJ99923, LIF-R, SJS2, STWS, SWS
D12	Hs.86154	NM_024674	LIN28A	Lin-28 homolog A (C. elegans)	CSDD1, FLJ12457, LIN-28, LIN28, ZCCHC1
E01	Hs.178023	NM_005593	MYF5	Myogenic factor 5	bHLHc2
E02	Hs.181768	NM_002478	MYOD1	Myogenic differentiation 1	MYF3, MYOD, PUM, bHLHc1
E03	Hs.661360	NM_024865	NANOG	Nanog homeobox	-
E04	Hs.527971	NM_006617	NES	Nestin	FLJ21841
E05	Hs.574626	NM_002500	NEUROD1	Neurogenic differentiation 1	BETA2, BHF-1, MODY6, NEUROD, bHLHa3
E06	Hs.370414	NM_018055	NODAL	Nodal homolog (mouse)	MGC138230
E07	Hs.248201	NM_005450	NOG	Noggin	SYM1, SYNS1
E08	Hs.33446	NM_003822	NR5A2	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	B1F, B1F2, CPF, FTF, FTZ-F1, FTZ-F1beta, LRH-1, LRH1, hb1F-2
E09	Hs.586460	NM_001489	NR6A1	Nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	GCNF, GCNF1, NR61, RTR
E10	Hs.654609	NM_003744	NUMB	Numb homolog (Drosophila)	S171
E11	Hs.176977	NM_005806	OLIG2	Oligodendrocyte lineage transcription factor 2	BHLHB1, OLIGO2, PRKCBP2, RACK17, bHLHe19
E12	Hs.129706	NM_006193	PAX4	Paired box 4	KPD, MGC129960, MODY9
F01	Hs.270303	NM_000280	PAX6	Paired box 6	AN, AN2, D11S812E, MGC17209, MGDA, WAGR
F02	Hs.32938	NM_000209	PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1	GSF, IDX-1, IPF1, IUF1, MODY4, PDX-1, STF-1
F03	Hs.514412	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	CD31, FLJ34100, FLJ58394, PECAM-1
F04	Hs.690098	NM_005397	PODXL	Podocalyxin-like	Gp200, MGC138240, PC, PCLP, PCLP-1
F05	Hs.249184	NM_002701	POU5F1	POU class 5 homeobox 1	MGC22487, OCT3, OCT4, OTF-3, OTF3, OTF4, Oct-3, Oct-4
F06	Hs.500466	NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10q23del, BZS, DEC, GLM2, MGC11227, MHAM, MMAC1, PTEN1, TEP1
F07	Hs.351503	NM_178161	PTF1A	Pancreas specific transcription factor, 1a	PTF1-p48, bHLHa29
F08	Hs.631513	NM_005612	REST	RE1-silencing transcription factor	NRSF, XBR
F09	Hs.535845	NM_004348	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	AML3, CBFA1, CCD, CCD1, MGC120022, MGC120023, OSF-2, OSF2, PEA2aA, PEBP2A1,
F10	Hs.252451	NM_006080	SEMA3A	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig),	Hsema-I, Hsema-III, MGC133243, SEMA1, SEMAD, SEMAIII, SEMAL,

				short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	SemD, coll-1
F11	Hs.525557	NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1	A1A, A1AT, AAT, MGC23330, MGC9222, PI, PI1, PRO2275, alpha1AT
F12	Hs.481022	NM_003013	SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	FRP-2, SARP1, SDF-5
G01	Hs.98367	NM_022454	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	FLJ22252, VUR3
G02	Hs.518438	NM_003106	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	ANOP3, MCOPS3, MGC2413
G03	Hs.12409	NM_001048	SST	Somatostatin	SMST
G04	Hs.506504	NM_153694	SYCP3	Synaptonemal complex protein 3	COR1, MGC71888, SCP3
G05	Hs.389457	NM_003181	T	T, brachyury homolog (mouse)	MGC104817, TFT
G06	Hs.161640	NM_000353	TAT	Tyrosine aminotransferase	-
G07	Hs.385870	NM_003212	TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1	CR, CRGF, CRIPTO
G08	Hs.492203	NM_198253	TERT	Telomerase reverse transcriptase	EST2, TCS1, TP2, TRT, hEST2, hTRT
G09	Hs.156471	NM_014553	TFCP2L1	Transcription factor CP2-like 1	CRTR1, LBP-9, LBP9
G10	Hs.458406	NM_003577	UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	-
G11	Hs.591980	NM_000378	WT1	Wilms tumor 1	AWT1, GUD, NPHS4, WAGR, WIT-2, WT33
G12	Hs.335787	NM_174900	ZFP42	Zinc finger protein 42 homolog (mouse)	REX1, ZNF754
H01	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	-
H02	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT, HPRT
H03	Hs.728776	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	L13A, TSTA1
H04	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD, GAPD, MGC88685
H05	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Reakcja *real time*-PCR wykonana została w termocyklerze firmy Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR. Do każdej reakcji zastosowano 25 µl mieszaniny reakcyjnej złożonej z 1 µl wyizolowanego wcześniej cDNA, 12,5 µl 2XMaster Mix (Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2X, firma Roche) oraz 11,5 µl dejonizowanej wody. W pierwszym etapie w temperaturze 95°C doprowadzono do denaturacji matrycy cDNA (przez 10 minut) aktywującej jednocześnie polimerazę, a następnie do amplifikacji DNA, która odbywała się w 40 cyklach i składała się z denaturacji cDNA (w temperaturze 95°C przez 15 s), przyłączenia starterów (w temperaturze 60°C przez 30 s) oraz elongacji DNA (w temp. 72°C przez 30 s). Kolejnym etapem była denaturacja końcowa (w temp. 95°C przez

15 s). W zastosowanej metodzie badania do detekcji poszukiwanych genów zastosowano barwnik SYBR Green I interkalujący pomiędzy zasady DNA.

3.3.2.3. Ocena ekspresji genów regulujących proces angiogenezy i embriogenezy

W celu oceny profilu ekspresji genów włączonych w angiogenezę oraz embriogenezę, wcześniej otrzymane dane (wartości Ct) zostały zaimportowane do programu RT² Profiler PCR Array Data Analysis.

Zdecydowano o porównaniu ekspresji genów pomiędzy następującymi grupami pacjentów z nerczakiem zarodkowym:

- 1) wszyscy pacjenci po chemioterapii przedoperacyjnej (n=16): st. I-II (n=9) vs III-IV (n=7)
- 2) pacjenci z guzami pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej (n=14): st. I-II (n=8) vs III-IV (n=6)
- 3) pacjenci z guzami w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed (n=5) vs po (n=9) chemioterapii przedoperacyjnej

W normalizacji wyników uwzględniono także wartości Ct genów referencyjnych, których ekspresja powinna być stała w danej tkance, bez względu na rodzaj zaburzenia oraz warunki w jakich wykonywane jest badanie. Dalszą analizę oparto na zalecanych przez producenta 5 genach referencyjnych: fosforybozylotransferazie hipoksantynowej, β -2 mikroglobulinie, białku rybosomalnym L13a, dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz β -aktynie.

Przyjęto, że granicą istotności zmian ekspresji poszczególnych genów (zarówno obniżenie, jak i podwyższenie ekspresji) pomiędzy porównywanymi grupami jest 3-krotna różnica wartości ekspresji a wynik był istotny statystycznie jeśli $p < 0,05$.

3.3.3. Analiza statystyczna

3.3.3.1. Analiza przeżycia w badanej grupie chorych

Wykonano analizę Kaplana Meiera oceniając w badanej grupie:

- prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (*probability of overall survival*, pOS),
- prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby (*probability of disease free survival*, pDFS) - z uwzględnieniem wznów
- prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (*probability of event free survival*, pEFS) - z uwzględnieniem wszystkich wydarzeń wpływających na długość przeżycia

3.3.3.2. Wieloczynnikowa analiza wariancji

Wykonano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oceniając wpływ ekspresji ocenianych białek na wystąpienie wznowy choroby w badanej grupie.

3.3.3.3. Analiza statystyczna wyników badań immunohistochemicznych

Różnice między badanymi grupami pacjentów weryfikowano następującymi testami statystycznymi:

- test U Manna-Whitneya dla dwóch grup niezależnych,
- test Kruskala-Wallisa dla kilku grup niezależnych.

Wyniki uznano za istotne statystycznie, gdy poziom istotności p wynosił $<0,05$. Analizę statystyczną prowadzono z zastosowaniem programu Statistica PL v. 10 (StatSoft Inc.).

3.3.3.4. Analiza ekspresji badanych białek na podstawie wykresów sekwencyjnych

Ze względu na znaczną heterogenność analizowanej grupy pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej oraz stosunkowo małe podgrupy, w obrębie których wykonywano analizy porównawcze, a także ryzyko uzyskania wyników nieistotnych statystycznie, zdecydowano się również na bardziej indywidualną ocenę otrzymanych wyników badań immunohistochemicznych ocenionych w skali IRS. Wzorując się na wykresach sekwencyjnych, w zależności od wartości liczbowej dany parametr ekspresji białek ocenianych wg skali IRS miał przyporządkowany odpowiedni kolor (Tabela 6.)

Tabela 6. Przyporządkowanie do grupy w zależności od wartości liczbowej otrzymanej w skali IRS

Skala IRS
0
1-4
5-12

Takie zobrazowanie wyników pozwala na ich łatwiejszą indywidualną analizę i ocenę zależności, przypominając wykres typu *clustergram* stosowany do przedstawienia zależności między ekspresjami genów.

3.3.3.5. Analiza statystyczna wyników badań molekularnych

Uzyskane wyniki poddane zostały analizie statystycznej dzięki zastosowaniu dostępnych na stronie internetowej firmy SABiosciences aplikacji programu Standard RT² PCR Array dla odpowiednich genów, tj.:

- do oceny ekspresji genów zaangażowanych w proces modulowania angiogenezy:

http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-072A.html

- do oceny ekspresji genów związanych z różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-081A.html

Za pomocą w/w aplikacji analizowano wartość C_t oznaczającą numer cyklu reakcji, w którym ilość produktu zaczęła wzrastać w sposób wykładniczy. Dzięki analizie porównawczej $\Delta\Delta C_t$ uwzględniającej normalizację względem kontroli endogennej (C_t dla genów metabolizmu podstawowego) oraz kalibratora (C_t dla grupy kontrolnej) uzyskano wynik, który określił różnicę poziomu ekspresji genów między próbkami badanymi a referencyjnymi. Istotność statystyczną spostrzeganych różnic ekspresji poszczególnych genów oceniano przy użyciu testu T-studenta.

Otrzymane wyniki przedstawione zostaną na wykresach:

- typu „*scattered plot*”, który przedstawia różnice w ekspresji badanych genów stwierdzanych pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Linia środkowa określa brak zmiany ekspresji genów. Na osi Y podany jest logarytm dziesiętny wartości $2^{-\Delta C_t}$ dla grupy badanej a na osi X logarytm dziesiętny wartości $2^{-\Delta C_t}$ dla grupy kontrolnej. Na wykresach nie uwzględniono wartości ekspresji genów referencyjnych i kontroli.

- typu „*volcano plot*”, który przedstawia różnice w ekspresji badanych genów stwierdzanych pomiędzy grupą badaną a kontrolną uwzględniając istotność statystyczną i wskazując wielokrotność zmian ekspresji. Na osi Y podany jest ujemny logarytm dziesiętny wartości p a na osi X logarytm o podstawie 2 ze zmiany ekspresji genów w Grupie 1. względem Grupy 2. Na wykresach nie uwzględniono wartości ekspresji genów referencyjnych i kontroli.

3.4. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 587/09 z dnia 18 czerwca 2009).

Uzyskano także zgodę na udział w badaniu od rodziców pacjentów, od których pobrano fragment świeżej tkanki nerczaka zarodkowego usuniętego podczas resekcji guza.

3.5. Źródło finansowania badań

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach promotorskiego grantu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N407 543338.

4. Wyniki

4.1. Wyniki leczenia

W badanej grupie 45 dzieci z nerczakiem zarodkowym leczonych zgodnie z protokołem SIOP-2001 początkowo pełną pierwszą remisję (I CR) uzyskano u 44 (98%) dzieci. Niepowodzenie leczenia spostrzegano ogółem u 5 (11%) dzieci.

U jednego dziecka (2%) doszło do progresji nowotworu po upływie 3 miesięcy od rozpoczęcia leczenia (progresja zmian przerzutowych w płucach oraz w łożu po guzie), a wznowa wystąpiła u 4 chorych (9%), w tym:

- wznowę wczesną rozpoznano u 3 pacjentów po 5,5, 5,6 i 6,5 miesiącach od rozpoczęcia leczenia (u 2 w łożu po usuniętym guzie, u 1 pacjenta w łożu po usuniętym guzie i w płucach),
- wznowę późną rozpoznano u 1 pacjenta po upływie 3 lat i 4 miesięcy od zakończenia leczenia i miała ona charakter wznowy miejscowej w pozostałej części nerki.

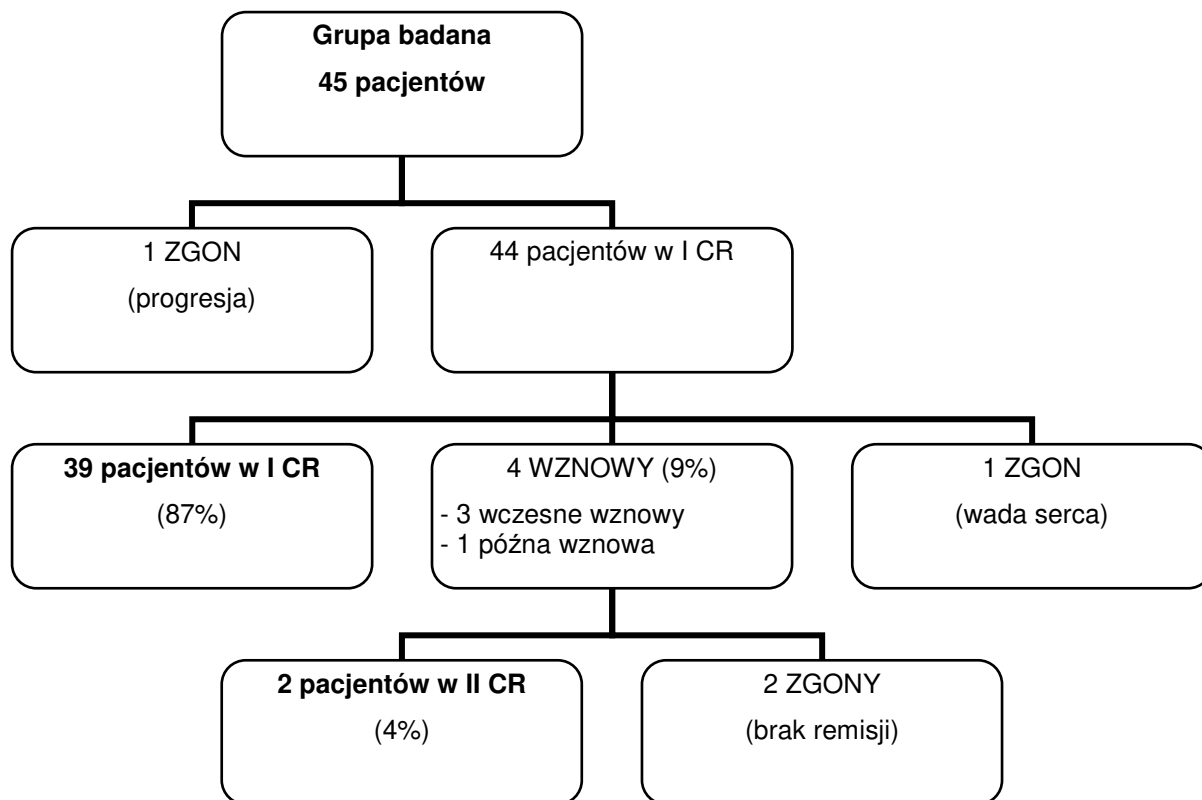
Stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz grupa ryzyka zgodnie z kryteriami przyjętymi przez SIOP [Graf 2004] całej badanej grupy pacjentów (n=45) zostały przedstawione już na Rycinie 2., natomiast stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz grupa ryzyka u 5 pacjentów, u których wystąpiła progresja oraz wznowa choroby przedstawia Tabela 7.

Tabela 7. Charakterystyka pacjentów z niepowodzeniem leczenia

Niepowodzenie leczenia	Stopień zaawansowania klinicznego	Grupa ryzyka
Progresja	IV	wysokie ryzyko
Wznowa wczesna		
- pacjent 1.	IV	wysokie ryzyko
- pacjent 2.	IV	wysokie ryzyko
- pacjent 3.	IV	pośrednie ryzyko
Wznowa późna	V	wysokie ryzyko

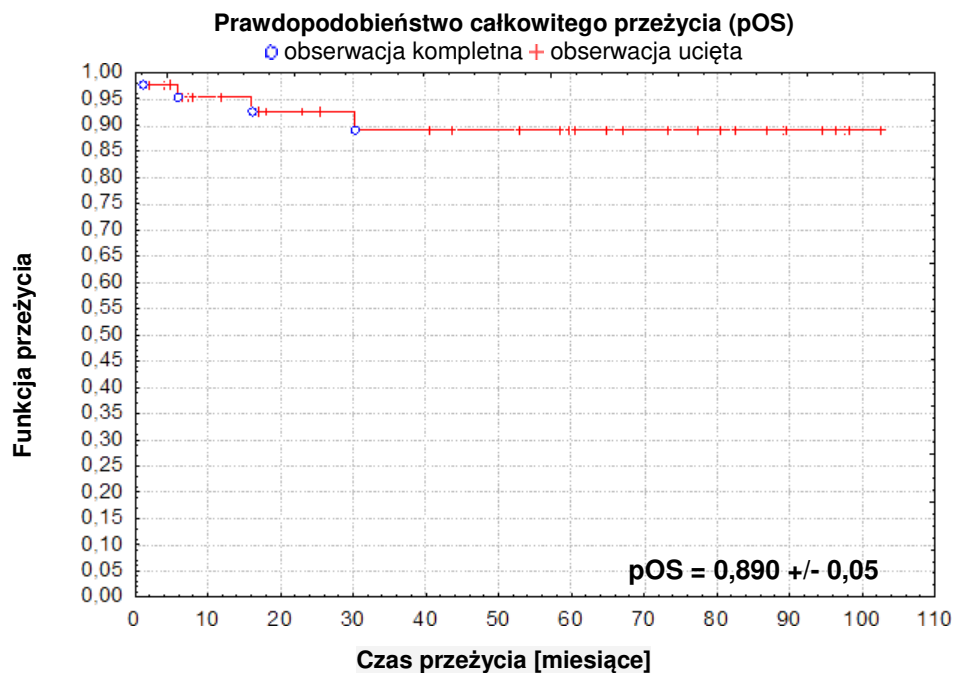
II CR uzyskało 2 pacjentów z wczesną wznową miejscową nerczaka zarodkowego. Natomiast pomimo zastosowanego leczenia nie uzyskano remisji u pacjentki z progresją choroby, pacjenta z wczesną wznową mieszaną a także pacjenta z późną wznową miejscową. Ponadto jeden pacjent z nerczakiem zarodkowym grupy pośredniego ryzyka, w I stopniu zaawansowania klinicznego, zmarł w I CR z powodu wrodzonej wady serca (zespół hipoplazji lewego serca) po zakończeniu leczenia wg protokołu AV-1. Zgon nastąpił 18 miesięcy od rozpoznania choroby nowotworowej, po kolejnym etapie leczenia kardiochirurgicznego i nie miał związku z chorobą nowotworową.

Spośród 45 dzieci, które znalazły się w grupie badanej żyje 41 dzieci (91%), w tym w I CR 39 pacjentów (87%) (2,5-19 lat, mediana 9,4 lat), a w II CR 2 pacjentów (4%) (11,6 lat i 6,5 lat). Wyniki leczenia grupy badanej przedstawia poniższa rycina (Rycina 4.).



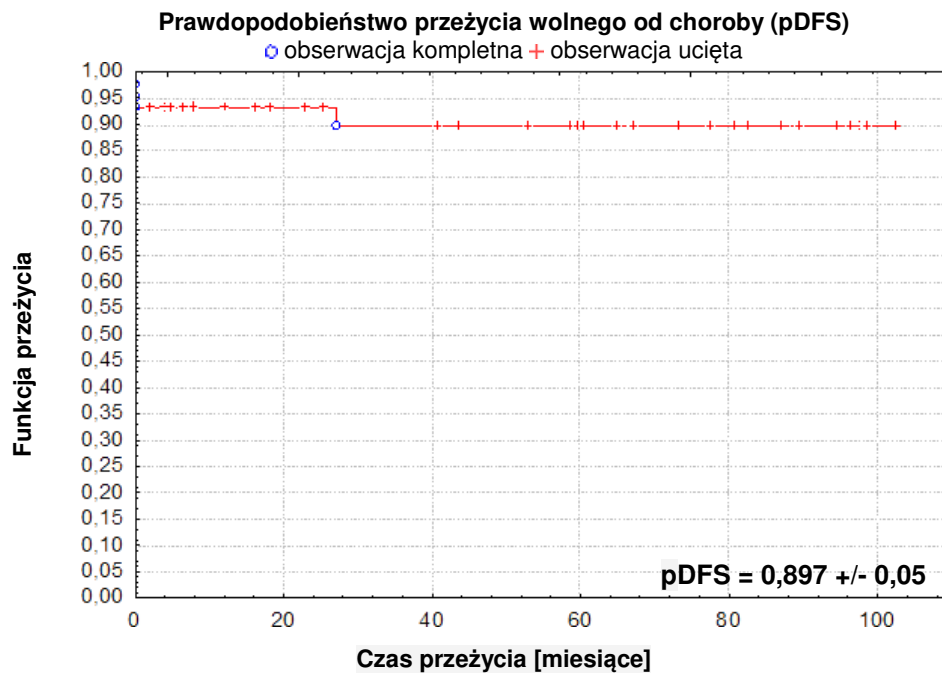
Rycina 4. Wyniki leczenia badanej grupy (n=45)

Wykonano analizę Kaplana Meiera oceniając w badanej grupie (n=45):
 - prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (pOS) wyniosło 0,890 +/- 0,05 (Rycina 5.)



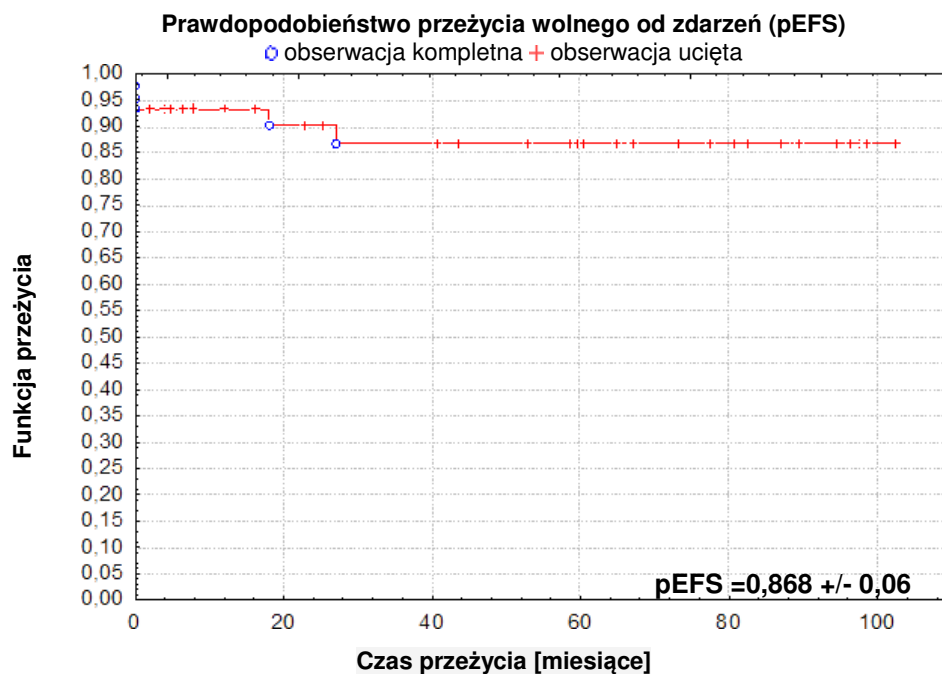
Rycina 5. Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pOS w badanej grupie

- prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby (pDFS) wyniosło $0,897 \pm 0,05$ (Rycina 6.)



Rycina 6. Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pDFS w badanej grupie

- prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (pEFS) wyniosło $0,868 \pm 0,06$ (Rycina 7.)



Rycina 7. Krzywa Kaplana Meiera przedstawiająca pEFS w badanej grupie

4.2. Wyniki badań immunohistochemicznych

(Dokumentacja fotograficzna analizowanych wyników IHC znajduje się na stronie 105)

4.2.1. Analiza wyników badań ekspresji Ki-67

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję Ki-67 w utkaniu nabłonkowym stwierdzono w 8 (20%), zrębowym w 14 (35%), a w blastemicznym w 19 preparatach (47,5%) ($p=0,003$).

Nie stwierdzono różnic ekspresji Ki-67 ocenianej w skali IRS w zależności od grupy rokowniczej według typu utkania histopatologicznego nerczaka zarodkowego.

Porównując w skali IRS ekspresję Ki-67 w poszczególnych elementach utkania nerczaka zarodkowego w zależności od stopnia zaawansowania choroby (I-III stopień vs IV stopień) stwierdzono:

a) w całej badanej grupie pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną (I-III: $n=33$; IV: $n=4$) wyższą ekspresję Ki-67 w utkaniu nabłonkowym u pacjentów z nowotworem w IV stopniu zaawansowania (test Manna-Whitneya, $p=0,002$) (Tab. 8.) (Fot.1).

Tabela 8. Ekspresja Ki-67 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

N Ki67	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
I-III (n=33)	0,47	1,16	0,00	0,00	0,00
IV (n=4)	6,00	4,90	1,50	6,00	10,50
Poziom istotności (test M-W)	p=0,002				

Z uwagi na znaczne różnice w liczebności poszczególnych podgrup pacjentów z nerczakiem zarodkowym o utkaniu pośredniego oraz wysokiego ryzyka odstąpiono od analizy statystycznej.

Porównując w skali IRS ekspresję Ki-67 w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w całej badanej grupie pacjentów poddanych chemioterapii przedoperacyjnej i w zależności od wieku, w którym rozpoznano chorobę (<2rż>) (<2 rż: $n=11$ vs >2 rż: $n=29$) stwierdzono, wyższą ekspresję w utkaniu blastemicznym u pacjentów, u których chorobę rozpoznano poniżej 2 roku życia (test Manna-Whitneya, $p=0,009$) (Tab.9.) (Fot.2).

Tabela 9. Ekspresja Ki-67 w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS

B Ki-67	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<2 rż (n=11)	5,64	4,32	0,00	6,00	9,00
>2 rż (n=29)	1,79	3,00	0,00	0,00	2,50
Poziom istotności (test M-W)	p=0,009				

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji Ki-67 ocenianej w skali IRS w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w zależności od wieku u pacjentów z guzem o utkaniu pośredniego ryzyka (<2 rż: n=8 vs >2 rż: n=20) oraz u pacjentów z guzem o utkaniu wysokiego ryzyka (<2 rż: n=2 vs >2 rż: n=9).

Porównując w skali IRS ekspresję Ki-67 w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w całej badanej grupie pacjentów poddanych chemioterapii przedoperacyjnej i w zależności od wieku, w którym rozpoznano chorobę (<4 rż>) (<4rż: n=23 vs >4 rż: n=17) stwierdzono wyższą ekspresję w utkaniu blastemicznym u pacjentów, u których chorobę rozpoznano poniżej 4 roku życia (test Manna-Whitneya, p=0,049) (Tab.10.).

Tabela 10. Ekspresja Ki-67 w zależności od wieku (<4rż>) rozpoznania w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS

B Ki67	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<4 r.ż. (n=23)	3,77	4,10	0,00	2,50	9,00
>4 r.ż. (n=17)	1,47	2,98	0,00	0,00	2,00
Poziom istotności (test M-W)	p=0,049				

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji Ki-67 ocenianej w skali IRS w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w zależności od wieku u pacjentów z guzem o utkaniu pośredniego ryzyka (<4 rż: n=14 vs >4 rż: n=14) oraz u pacjentów z guzem o utkaniu wysokiego ryzyka (<4 rż: n=8 vs >4 rż: n=3).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy ekspresji Ki-67 ocenianej w skali IRS po zastosowaniu chemioterapii przedoperacyjnej u pacjentów pozostających w I CR (n=35) w porównaniu z pacjentami, u których wystąpiła progresja lub wznowa nerczaka (n=5).

4.2.2. Analiza profilu ekspresji p27^{kip1}

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję białka p27^{kip1} w utkaniu nabłonkowym stwierdzono w 8 (20%), w zrębowym w 11 (27,5%), a w blastemicznym w 6 preparatach (15%) (p=0,348).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji p27^{kip1} ocenianych w skali IRS w zależności od grupy rokowniczej według typu utkania histopatologicznego nerczaka zarodkowego oraz w zależności od stopnia zaawansowania choroby.

Porównując w skali IRS ekspresję p27^{kip1} w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w całej badanej grupie pacjentów poddanych chemioterapii przedoperacyjnej i w zależności od wieku, w którym rozpoznano chorobę (<2rż>) (<2 rż: n=11 vs >2 rż: n=29) stwierdzono wyższą ekspresję w utkaniu blastemicznym u pacjentów, u których chorobę rozpoznano poniżej 2 roku życia (test Manna-Whitneya,

p=0,019) (Tabela 11.) (Fot. 3.) oraz u pacjentów z guzem o utkaniu pośredniego ryzyka (<2rż: n=8 vs >2 rż: n=20) (Tabela 12.), u których nerczaka zarodkowego rozpoznano poniżej 2 roku życia (test Manna-Whitneya, odpowiednio p=0,019 i p=0,024).

Tabela 11. Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS

B p27 ^{kip1}	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<2 rż (n=11)	0,73	1,20	0,00	0,00	1,00
>2 rż (n=29)	0,10	0,41	0,00	0,00	0,00
Poziom istotności (test M-W)	p=0,019				

Tabela 12. Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<2rż>) w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego w grupie pośredniego ryzyka oceniona w skali IRS

INT B p27 ^{kip1}	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<2 rż (n=8)	0,87	1,36	0,00	0,00	2,50
>2 rż (n=20)	0,05	0,22	0,00	0,00	0,00
Poziom istotności (test M-W)	p=0,024				

Porównując w skali IRS ekspresję p27^{kip1} w poszczególnych elementach utkania nerczaka zarodkowego u pacjentów w zależności od wieku, w którym rozpoznano chorobę (<4rż>), wyższą ekspresję stwierdzono w utkaniu zrębowym u tych spośród całej badanej grupy pacjentów (<4 rż: n=23 vs >4 rż: n=17) (Tabela 13.) (Fot.4.) oraz spośród pacjentów z guzem o utkaniu pośredniego ryzyka (<4rż: n=14, >4 rż: n=14) (Tabela 14.), u których nerczaka zarodkowego rozpoznano poniżej 4 roku życia (test Manna-Whitneya, odpowiednio p=0,031 i p=0,026).

Tabela 13. Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<4rż>) w utkaniu zrębowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS

Z p27 ^{kip1}	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<4 rż (n=23)	1,73	2,58	0,00	0,00	0,00
>4 rż (n=17)	0,23	0,66	1,50	6,00	10,50
Poziom istotności (test M-W)	p=0,031				

Tabela 14. Ekspresja p27^{kip1} w zależności od wieku rozpoznania (<4rż>) w utkaniu zrębowym nerczaka zarodkowego w grupie pośredniego ryzyka oceniona w skali IRS

Z INT p27 ^{kip1}	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
<4 rż (n=14)	2,28	2,95	0,00	1,00	4,50
>4 rż (n=14)	0,28	0,73	0,00	0,00	0,00
Poziom istotności (test M-W)	p=0,026				

Z uwagi na znaczne różnice w liczebności podgrup pacjentów z nerczakiem zarodkowym o utkaniu wysokiego ryzyka odstąpiono od analizy statystycznej.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy ekspresji p27^{kip1} ocenianej w skali IRS po zastosowaniu chemioterapii przedoperacyjnej u pacjentów pozostających w I CR (n=35) w porównaniu z pacjentami, u których wystąpiła progresja lub wznowa nerczaka (n=5).

4.2.3. Analiza profilu ekspresji p53

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję białka p53 w utkaniu nabłonkowym stwierdzono w 4 (10%), zrębowym w 2 (5%) a blastemicznym w 9 preparatach (22,5%) (p=0,02).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji p53 ocenianej w skali IRS w zależności od grupy rokowniczej według typu utkania histopatologicznego nerczaka zarodkowego i wieku, w którym rozpoznano chorobę (<2rz> oraz <4rz>) oraz w poszczególnych elementach utkania guza w zależności od stopnia zaawansowania choroby.

Porównując w skali IRS ekspresję p53 w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego u pacjentów pozostających w I CR (n=35) i u pacjentów, u których wystąpiła progresja lub wznowa nerczaka (n=5) stwierdzono wyższą ekspresję p53 w utkaniu nabłonkowym u tych ostatnich chorych (test Manna-Whitneya, p=0,009) (Tabela 15.) (Fot. 5.).

Tabela 15. Ekspresja p53 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS u pacjentów pozostających w I CR i u pacjentów, u których wystąpiła progresja/wznowa nerczaka zarodkowego

N p53	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
bez progresji/wznowy (n=35)	0,14	0,60	0,00	0,00	0,00
progresja/wznowa (n=5)	0,75	0,96	0,00	0,50	1,75
Poziom istotności (test M-W)	p=0,009				

4.2.4. Analiza profilu ekspresji CD274

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję białka CD274 w utkaniu nabłonkowym stwierdzono w 7 (17,5%), zrębowym w 1 (2,5%) a blastemicznym w 5 preparatach (12,5%) (p=0,097).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji CD274 ocenianych w skali IRS w zależności od grupy rokowniczej według typu utkania histopatologicznego nerczaka zarodkowego, stopnia zaawansowania klinicznego, wieku, w którym rozpoznano nerczaka zarodkowego oraz wystąpienia progresji/wznowy choroby.

4.2.5. Analiza profilu ekspresji hTERT

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję hTERT w utkaniu nabłonkowym stwierdzono w 7 (17,5%), zrębowym w 2 (5%) a blastemicznym w 15 preparatach (37,5%) ($p=0,002$).

Porównując ekspresję hTERT w skali IRS u pacjentów z nerczakiem zarodkowym w zależności od grupy rokowniczej według typu utkania histopatologicznego guza (ryzyko pośrednie: $n=28$; ryzyko wysokie: $n=11$) stwierdzono wyższą ekspresję hTERT w utkaniu nabłonkowym u pacjentów wysokiego ryzyka (test Manna-Whitneya, $p=0,017$) (Tab.16.) (Fot. 6.).

Tabela 16. Ekspresja hTERT w grupach ryzyka w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego oceniona w skali IRS

N hTERT	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q75
INT (n=28)	0,18	0,77	0,00	0,00	0,00
HIGH (n=11)	2,27	3,58	0,00	0,00	6,00
Poziom istotności (test M-W)	p=0,017				

Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ekspresji hTERT w poszczególnych elementach utkania nowotworowego nerczaka zarodkowego w zależności od stopnia zaawansowania choroby, w zależności od wieku rozpoznania choroby (<2rż> oraz <4rż>) a także u pacjentów pozostających w I CR ($n=35$) w porównaniu z pacjentami, u których wystąpiła progresja lub wznowa nerczaka ($n=5$).

4.2.6. Wyniki analizy ekspresji badanych białek na podstawie wykresów sekwencyjnych

Na wykresie typu *clustergram* przedstawiono ekspresję badanych białek w poszczególnych elementach utkania u pacjentów, u których doszło do progresji i wznowy choroby (Rycina 8.).

	nabłonek					Zrąb					blastema				
	Ki67	P27	p53	CD 274	h TERT	Ki67	p27	P53	CD 274	H TERT	Ki67	p27	p53	CD 274	h TERT
1	red	green	green	yellow	yellow	yellow	green	green	green	green	yellow	green	green	green	green
2	green	red	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green
3	green	yellow	green	green	green	green	green	green	green	green	green	yellow	green	green	yellow
4	green	green	yellow	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green	green	yellow
5	red	green	yellow	green	green	yellow	yellow	green	green	green	red	yellow	yellow	green	green

Rycina 8. Analiza typu *clustergram* przedstawiająca pacjentów z progresją/wznową choroby

Na wykresie typu *clustergram* przedstawiono ekspresję badanych białek w poszczególnych elementach utkania u dwóch pacjentów z grupy wysokiego ryzyka z utkaniem rozszianym anaplastycznym (Rycina 9.).

	nabłonek					zrąb					blastema				
	Ki67	P27	p53	CD 274	h TERT	Ki67	P27	p53	CD 274	h TERT	Ki67	p27	p53	CD 274	h TERT
A	red	green	yellow	green	green	yellow	yellow	green	green	green	red	yellow	yellow	green	green
B	green	green	green	green	red	green	green	green	green	green	green	green	green	green	yellow

Rycina 9. Analiza typu *clustergram* przedstawiająca pacjentów z nerczakiem zarodkowym o utkaniu rozszianym anaplastycznym

4.2.7. Analiza profilu ekspresji CD31 (analiza MVD)

Spośród 40 analizowanych preparatów pochodzących od 39 pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię przedoperacyjną, ekspresję CD31 w utkaniu nabłonkowym stwierdzono u 4 (10%), a w blastemicznym u 23 pacjentów (57,5%).

Ponieważ nie stwierdzono ekspresji CD31 w utkaniu zrębowym, a ekspresja w utkaniu nabłonkowym stwierdzona została tylko u 4 pacjentów, dalsza analiza statystyczna objęła jedynie pacjentów, u których MVD oceniono w elemencie blastemicznym.

Nie stwierdzono zależności między wartością MVD a grupą rokowniczą według typu utkania histopatologicznego nerczaka zarodkowego, stopniem zaawansowania klinicznego, wiekiem, w którym rozpoznano nerczaka zarodkowego oraz wystąpieniem progresji/wznowy choroby.

Średnia wartość MVD w grupie pośredniego ryzyka wyniosła 43,06/mm² natomiast w grupie wysokiego ryzyka 34,28/mm², jednak nie wykazano różnic istotnych statystycznie między grupami ryzyka (Tabela 17.) (Fot.7.).

Tabela 17. Średnie wartości MVD w grupie pośredniego i wysokiego ryzyka

MVD [mm ²]	Średnia	SD	Q25	Mediana	Q 75
INT (n=28)	48,04	50,17	0,00	39,91	87,90
HIGH (n=11)	34,28	37,25	0,00	28,87	56,05
Poziom istotności	p = 0,447				

4.2.8. Wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji

W wieloczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) oceniającej wpływ ekspresji ocenianych białek na wystąpienie wznowy choroby w badanej grupie nie wykazano różnic istotnych statystycznie (Tabela 18.).

Tabela 18. Wieloczynnikowa analiza wariancji

	Brak wznowy	Wznowa
	-0,99978	-0,99975
E Ki-67	-0,99977	-0,99966
Z Ki-67	-0,99967	-0,99985
B Ki-67	-0,99986	-0,99972
E p27kip1	-0,99973	-0,99972
Z p27kip1	-0,99975	-0,99982
B p27kip1	-0,99985	-0,99970
E p53	-0,99972	-0,99974
Z p53	-0,99975	-0,99992
B p53	-0,99992	-0,99994
E CD274	-0,99992	-0,99988
Z CD274	-0,99987	-0,99996
B CD274	-0,99995	-0,99968
E hTERT	-0,99967	-0,99979
Z hTERT	-0,99978	-0,99976
B hTERT	-0,99977	-0,99976
E MVD	-0,99967	-0,99953
Z MVD	-0,99986	-0,99955
B MVD	-0,99973	-0,99975

Na podstawie wieloczynnikowej analizy wariancji prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy nerczaka zarodkowego w zależności od ekspresji ocenianych białek w poszczególnych elementach utkania guza wynosi 17,99% (Tabela 19.).

Tabela 19. Wieloczynnikowa analiza wariancji prawdopodobieństwa wystąpienia wznowy nerczaka zarodkowego

	Wartość własna	% wariancji	Wartość własna skumulowana	% skumulowany
Brak wznowy	9,96026	13,99444	9,96026	13,99444
Wznowa	9,995244	17,99144	19,955504	31,98588

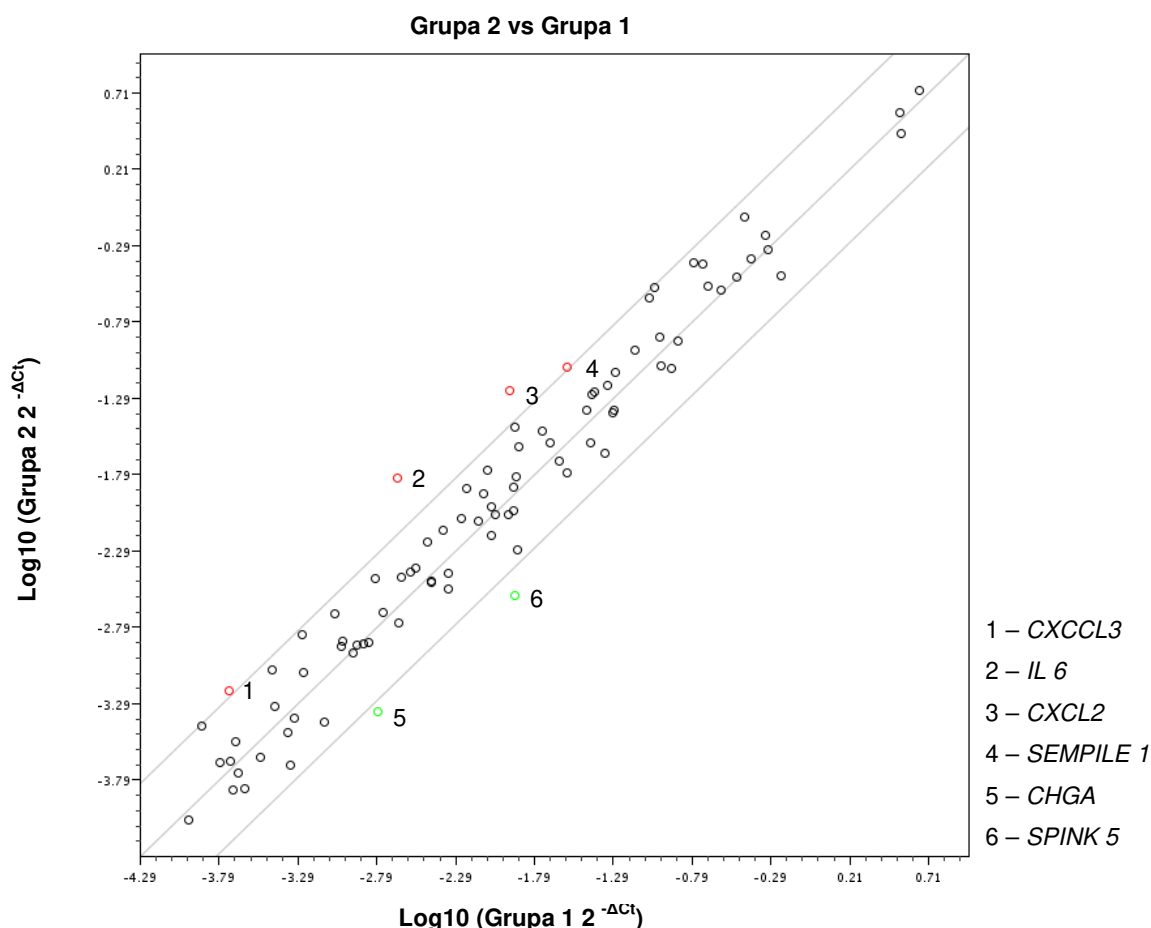
4.3. Wyniki badań ekspresji genów regulujących proces angiogenezy i embriogenezy

4.3.1. Analiza ekspresji genów regulujących proces angiogenezy

W zależności od składowej utkania nerczaka, punktu czasowego, w którym wykonano badanie (przed lub po chemioterapii przedoperacyjnej), stopnia klinicznego zaawansowania oraz wieku w chwili rozpoznania guza stwierdzono następujące różnice ekspresji badanych genów regulujących proces angiogenezy:

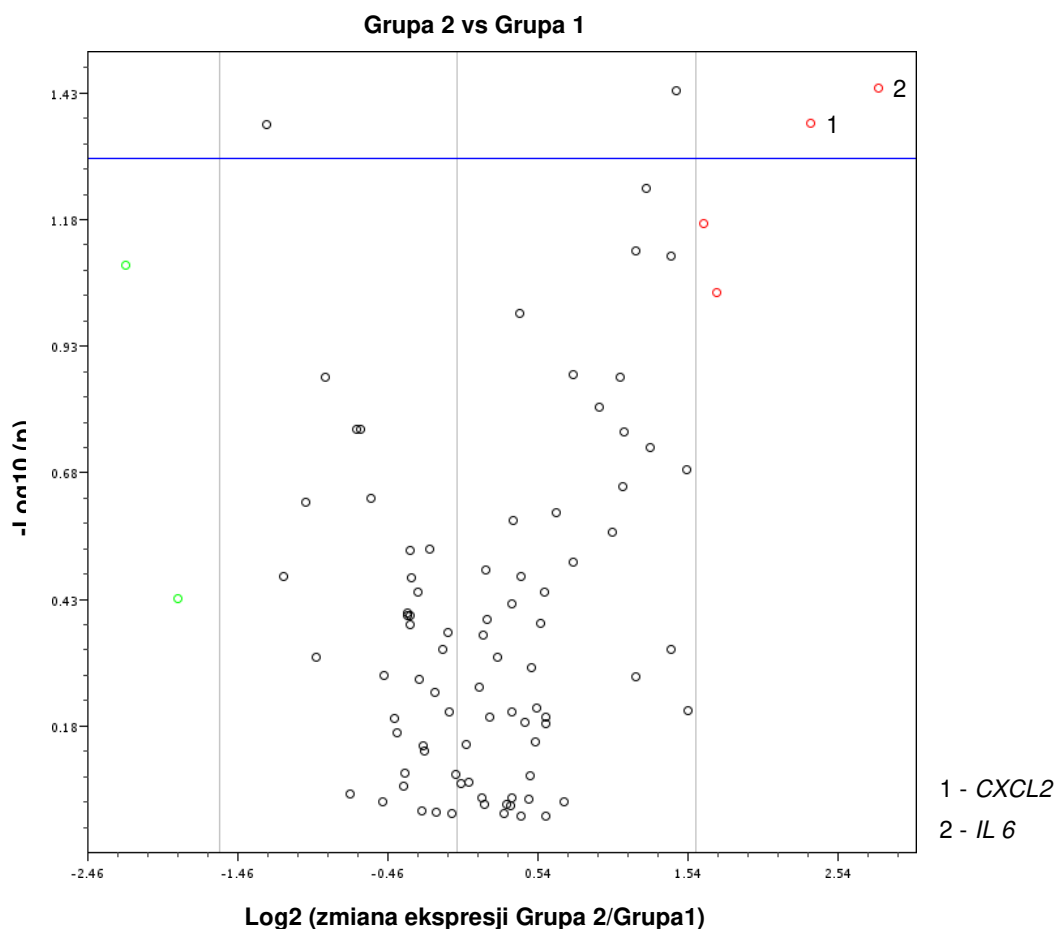
1) nerczak zarodkowy po chemioterapii przedoperacyjnej w st. I-II (n=9) vs III-IV (n=7)

W analizie „scatter plot” u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 4 genów (*CXCL2*, *CXCL3*, *IL6*, *SERPINE1*) oraz niższą ekspresję 2 genów (*CHGA*, *SPINK5*) w porównaniu z pacjentami po chemioterapii przedoperacyjnej w I-II stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 1) (Rycina 10.).



Rycina 10. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), ○ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ○ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

Po wykonaniu analizy „volcano plot” uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję już tylko 2 genów (*CXCL2*, *IL6*) ($p < 0,05$) (Rycina 11.).



Rycina 11. Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), linia pozioma - granica istotności statystycznej, ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

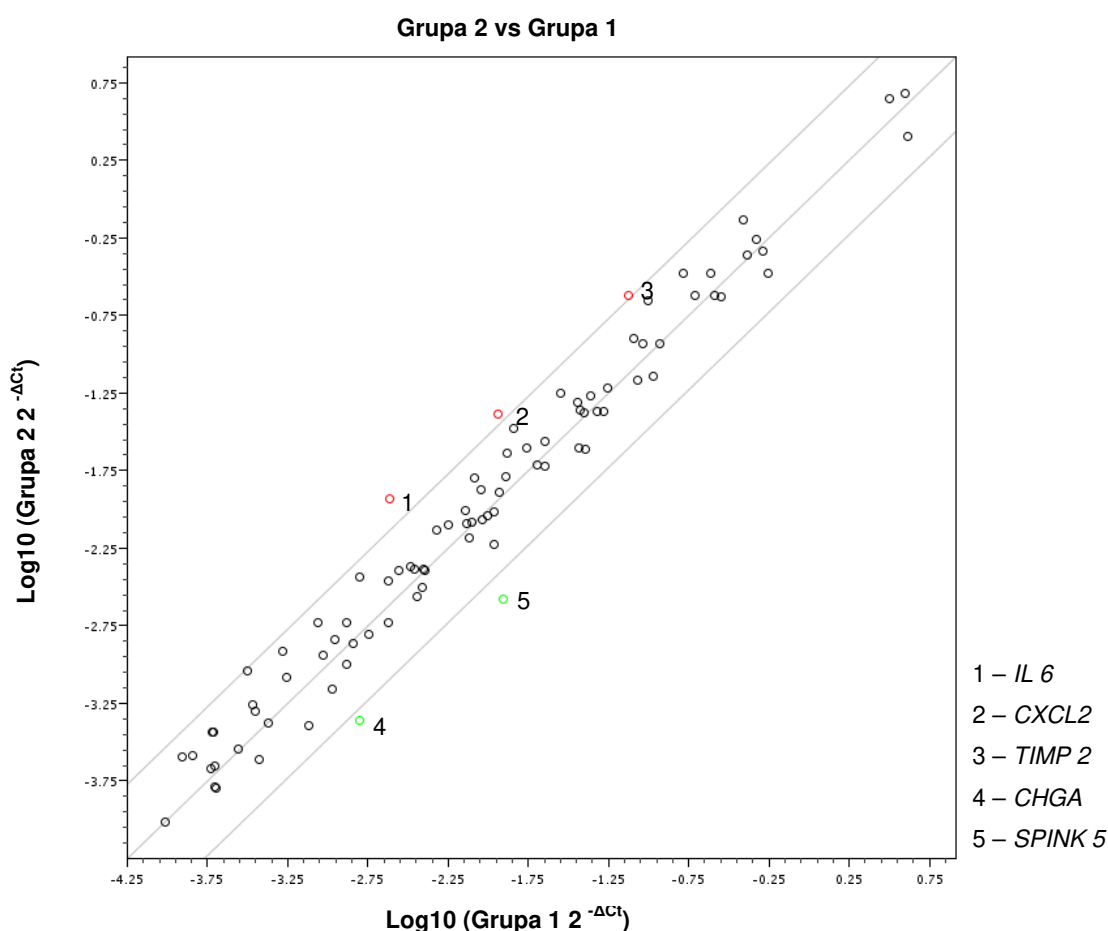
Podsumowując, w analizowanym porównaniu u pacjentów z guzem w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję genów *CXCL2* (zwiększenie ekspresji 5,1264-krotne, $p=0,0427$) oraz *IL6* (zwiększenie ekspresji 6,9995-krotne, $p=0,0363$) (Tabela 20.).

Tabela 20. Zmiana ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w nerczaku zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej z w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Nazwa genu	Krotność zmiany ekspresji	Poziom istotności p
<i>CXCL2</i>	5,1264	0,0427
<i>IL6</i>	6,9995	0,0363

2) nerczak zarodkowy pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w st. I-II (n=8) vs III-IV (n=6)

W analizie „scatter plot” u pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 3 genów (*CXCL2*, *IL6*, *TIMP2*) oraz niższą ekspresję 2 genów (*CHGA*, *SPINK5*) w porównaniu z pacjentami pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w I-II stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 1) (Rycina 12.).

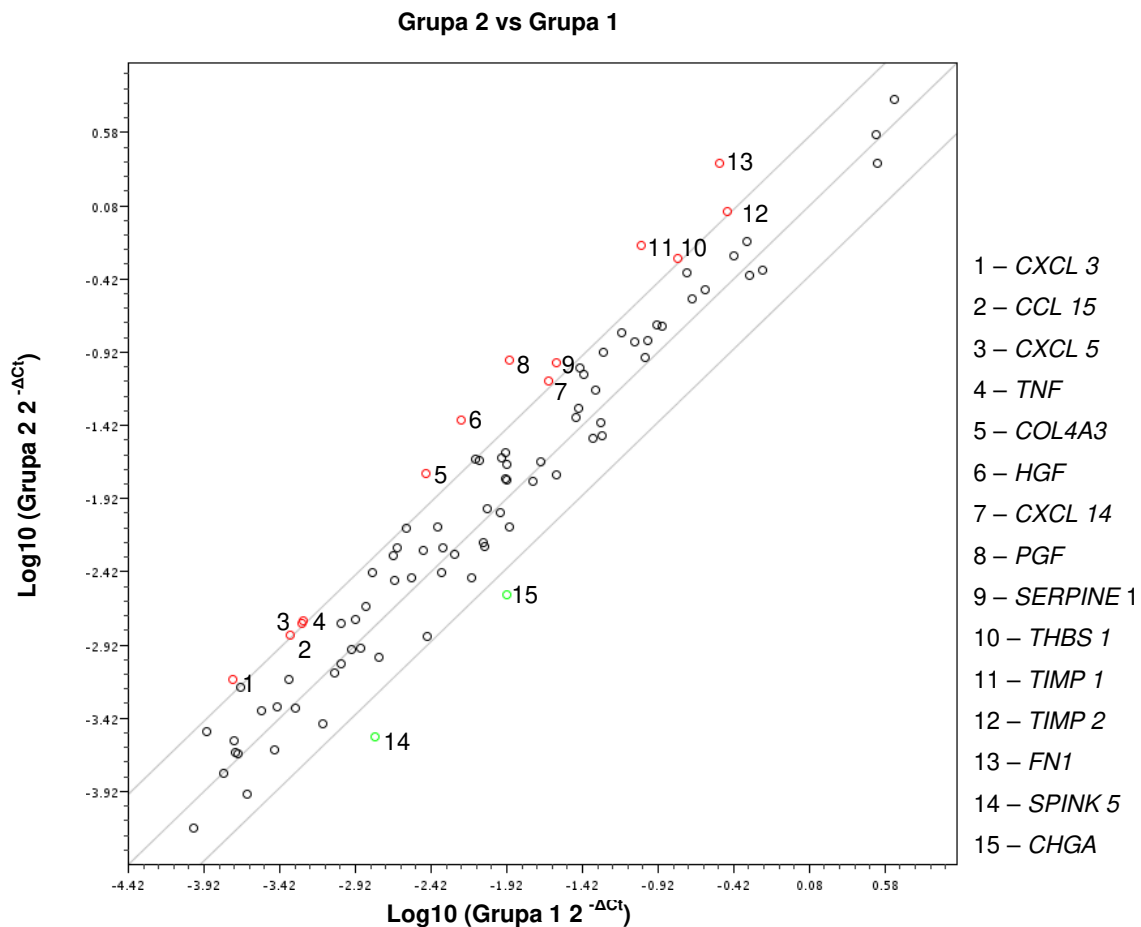


Rycina 12. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), ○ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ○ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

Po wykonaniu analizy „volcano plot” uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, nie stwierdzono istotnych zmian ekspresji genów w obrębie porównywanych grup.

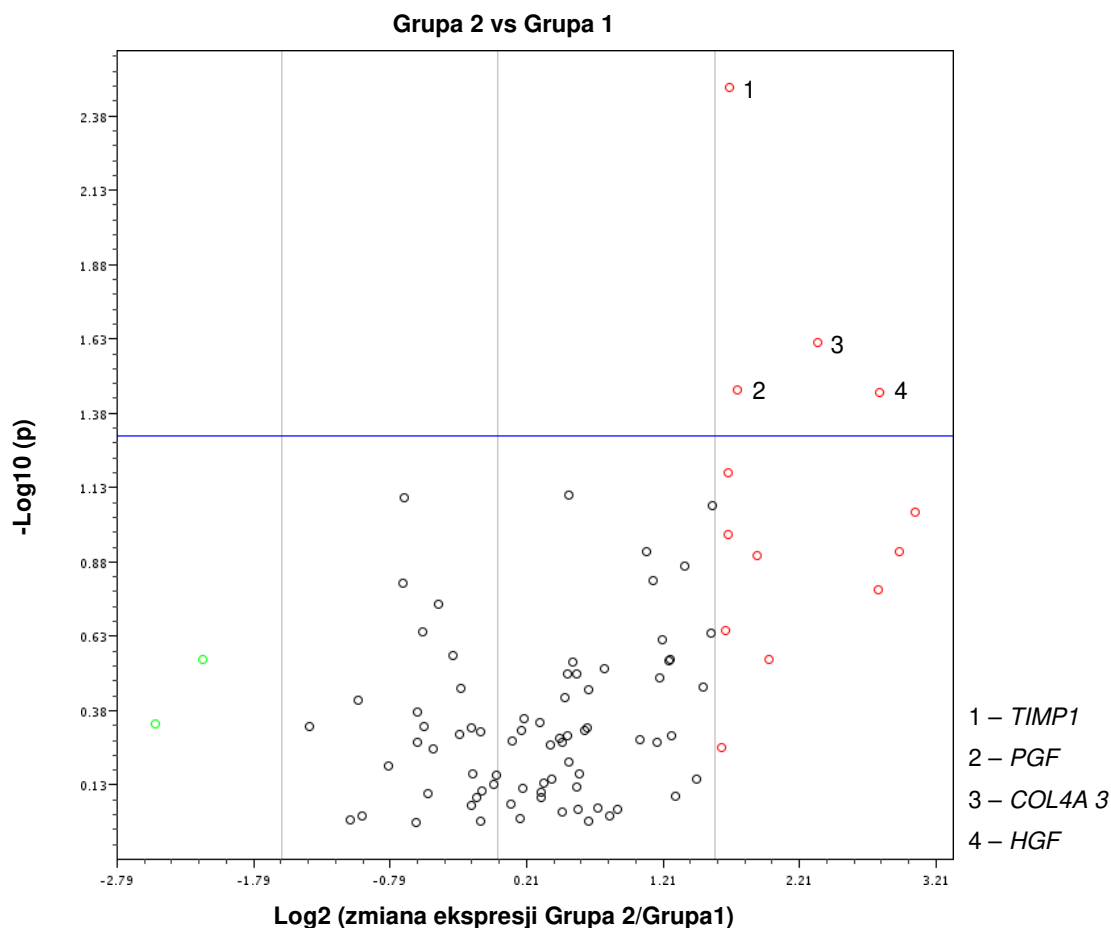
3) nerczak zarodkowy w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed (n=5) vs po (n=9) chemioterapii przedoperacyjnej

Na analizie „scatter plot” u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 13 genów (*CCL15*, *COL4A3*, *CXCL14*, *CXCL3*, *CXCL5*, *FN1*, *HGF*, *PGF*, *SERPINE1*, *THBS1*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TNF*) oraz niższą ekspresję 2 genów (*CHGA*, *SPINK5*) w porównaniu z pacjentami z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1) (Rycina 13.).



Rycina 13. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1). Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną.

Po wykonaniu analizy „volcano plot”, uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną stwierdzono wyższą ekspresję już tylko 4 genów (*COL4A3*, *HGF*, *PGF*, *TIMP1*) ($p < 0,05$) (Rycina 14.).



Rycina 14. Analiza „volcano plot” ekspresji wszystkich badanych genów regulujących angiogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1). Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), linia pozioma - granica istotności statystycznej, ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną.

Podsumowując, u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną stwierdzono wyższą ekspresję genów *COL4A3* (zwiększenie ekspresji 5,0578-krotne, $p=0,0242$), *HGF* (zwiększenie ekspresji 6,96-krotne, $p=0,0357$), *PGF* (zwiększenie ekspresji 3,3738-krotne, $p=0,0351$) oraz *TIMP1* (zwiększenie ekspresji 3,2331-krotne, $p=0,0034$) (Tabela 21.)

Tabela 21. Zmiana ekspresji genów regulujących proces angiogenezy w nerczaku zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną

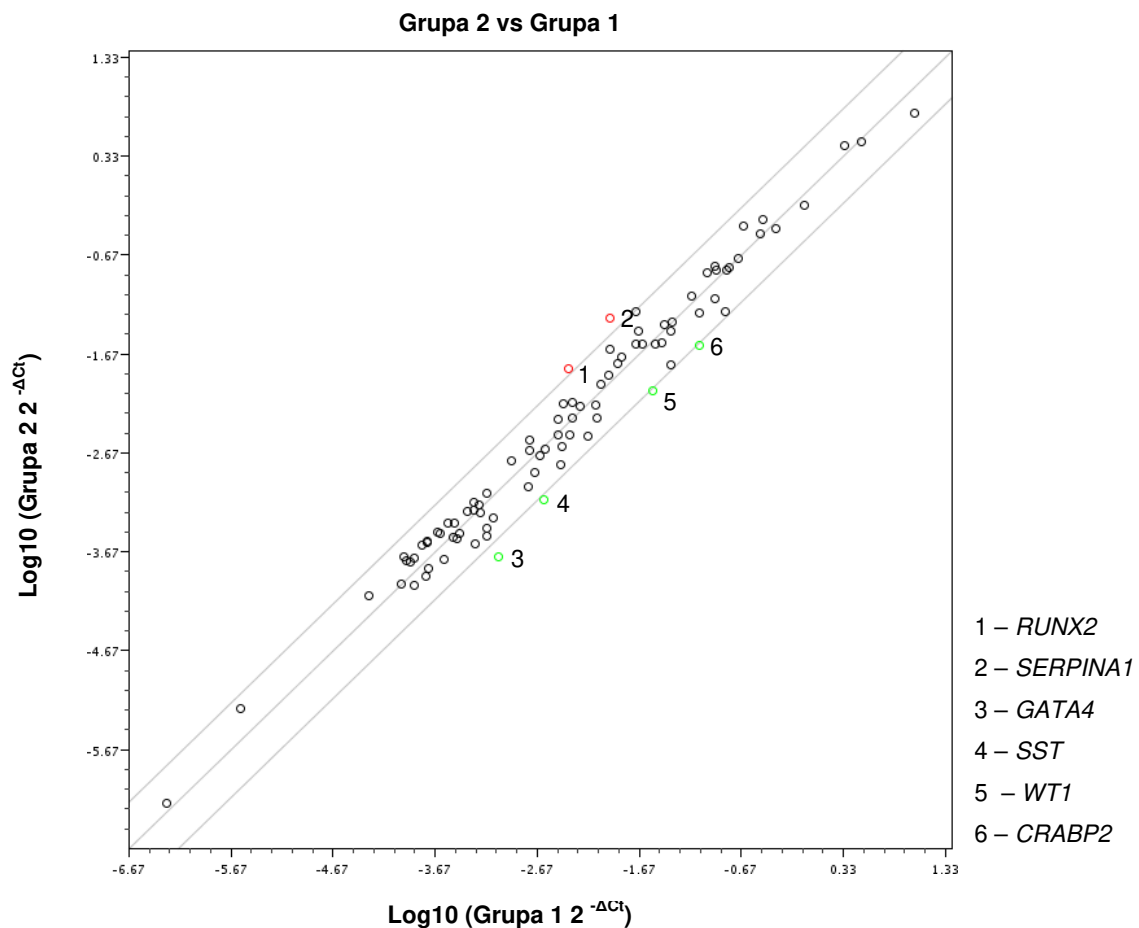
Nazwa genu	Krotność zmiany ekspresji	Poziom istotności p
COL4A3	5,0578	0,0242
HGF	6,9600	0,0357
PGF	3,3738	0,0351
TIMP1	3,2331	0,0034

4.3.2. Analiza ekspresji genów regulujących proces embriogenezy

W zależności od składowej utkania nerczaka, punktu czasowego, w którym wykonano badanie (przed i po chemioterapii przedoperacyjnej), stopnia klinicznego zaawansowania oraz wieku w chwili rozpoznania guza stwierdzono następujące różnice ekspresji badanych genów regulujących proces embriogenezy:

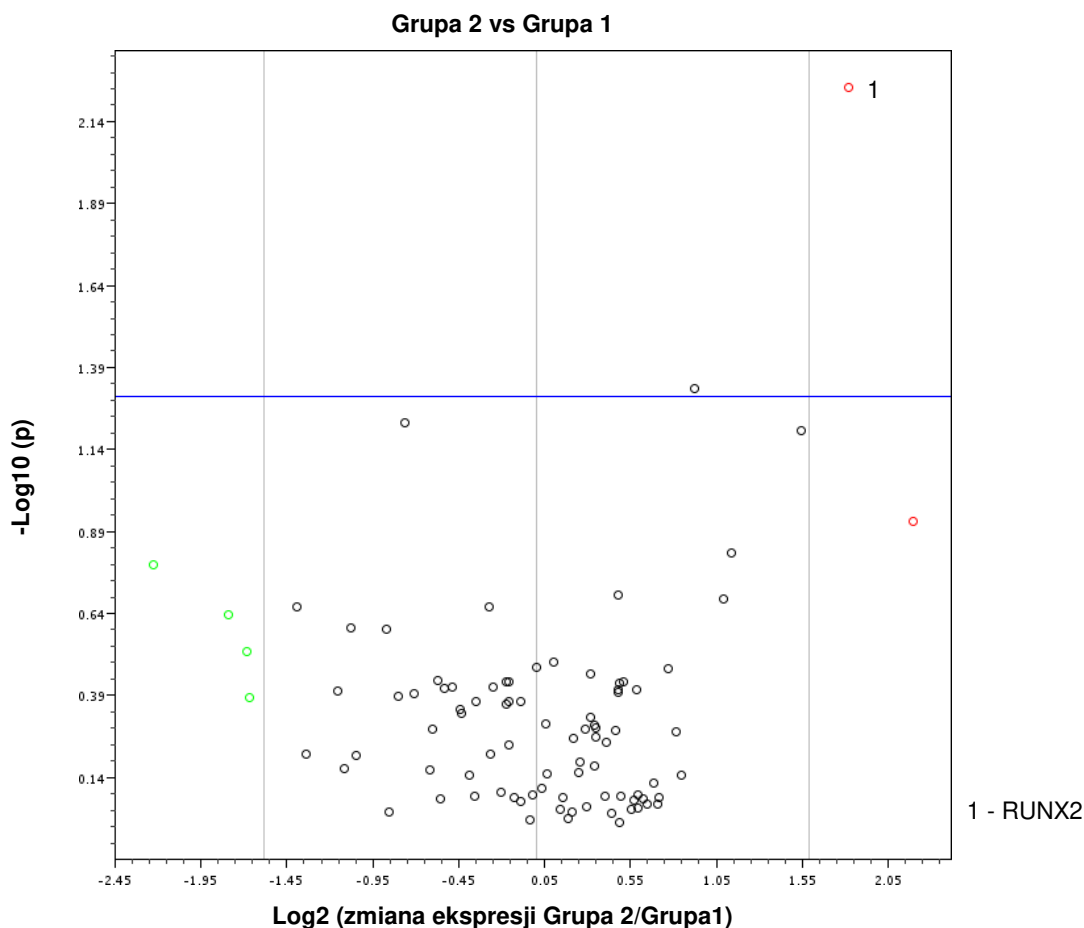
1) nerczak zarodkowy po chemioterapii przedoperacyjnej w st. I-II (n=9) vs III-IV (n=7):

Na wykresie „scatter plot” u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 2 genów (*RUNX2*, *SERPINA1*) oraz niższą ekspresję 4 genów (*CRABP2*, *GATA4*, *SST*, *WT1*) w porównaniu z pacjentami po chemioterapii przedoperacyjnej w I-II stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 1) (Rycina 15.).



Rycina 15. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), \blacksquare - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, \blacksquare - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

Po wykonaniu analizy „volcano plot” uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję już tylko 1 genu (*RUNX2*) ($p < 0,05$) (Rycina 16.).



Rycina 16. Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), linia pozioma - granica istotności statystycznej, ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

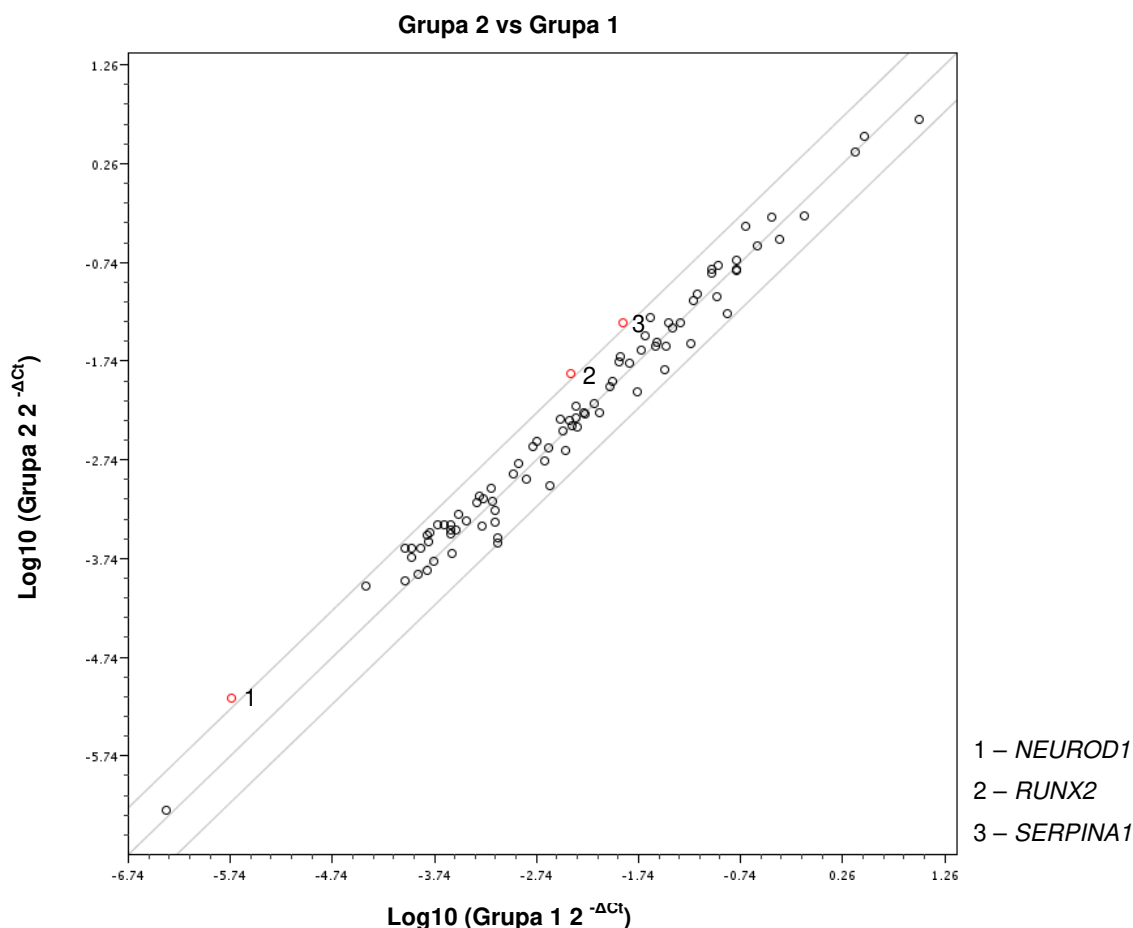
Podsumowując, u pacjentów z guzem w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję genu *RUNX2* (zwiększenie ekspresji 3,5265-krotne, $p = 0,0057$) (Tabela 22.).

Tabela 22. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezy w nerczaku zarodkowym po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Nazwa genu	Krotność zmiany ekspresji	Poziom istotności p
<i>RUNX2</i>	3,5265	0,0057

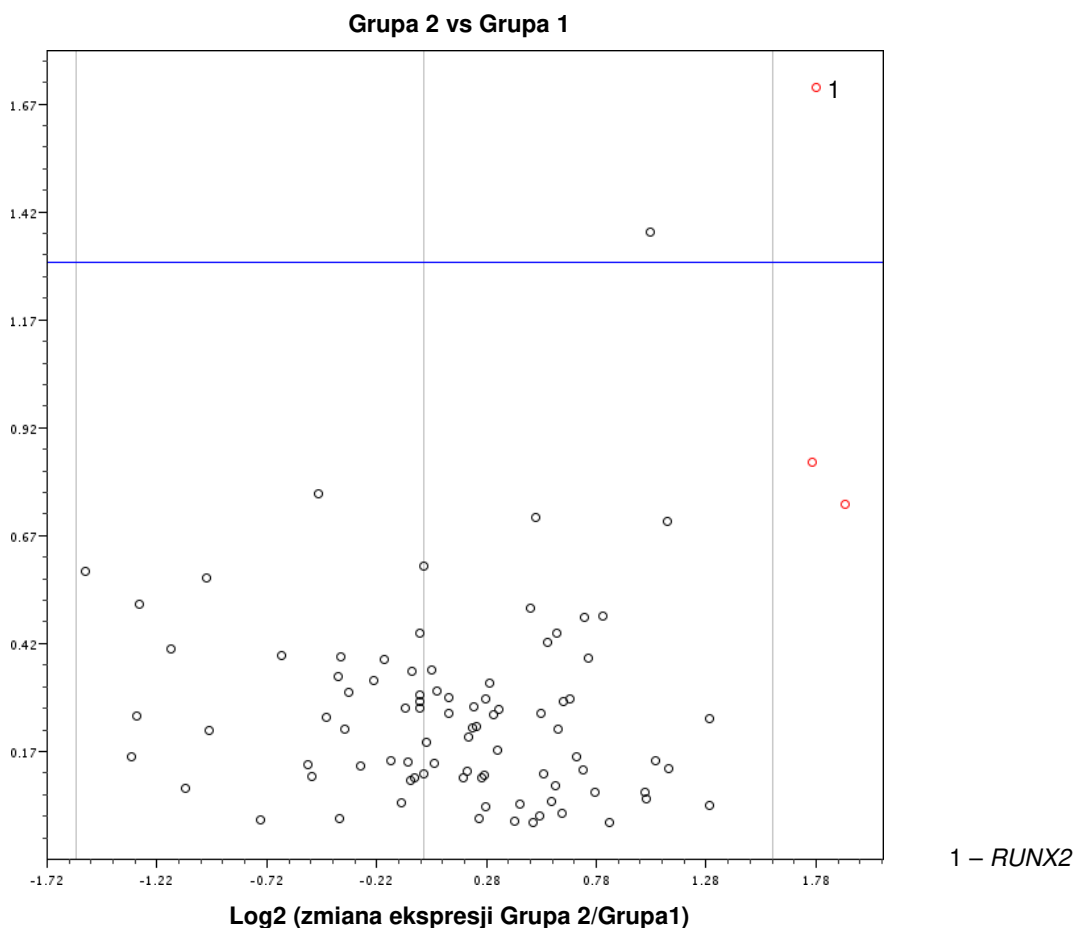
2) nerczak zarodkowy pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w st. I-II (n=8) vs III-IV (n=6):

W analizie „scatter plot” u pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 3 genów (*NEUROD1*, *RUNX2*, *SERPINA1*) w porównaniu z pacjentami pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w I-II stopniu zaawansowania klinicznego (Grupa 1) (Rycina 17.).



Rycina 17. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), ○ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ○ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

Po wykonaniu analizy „*volcano plot*” uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, u pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję już tylko 1 genu (*RUNX2*) ($p < 0,05$) (Rycina 18.).



Rycina 18. Analiza typu *volcano plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej porównująca guza w I-II (Grupa 1) względem guza w III-IV (Grupa 2) stopniu zaawansowania klinicznego. Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), linia pozioma - granica istotności statystycznej, ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej z guzem w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego.

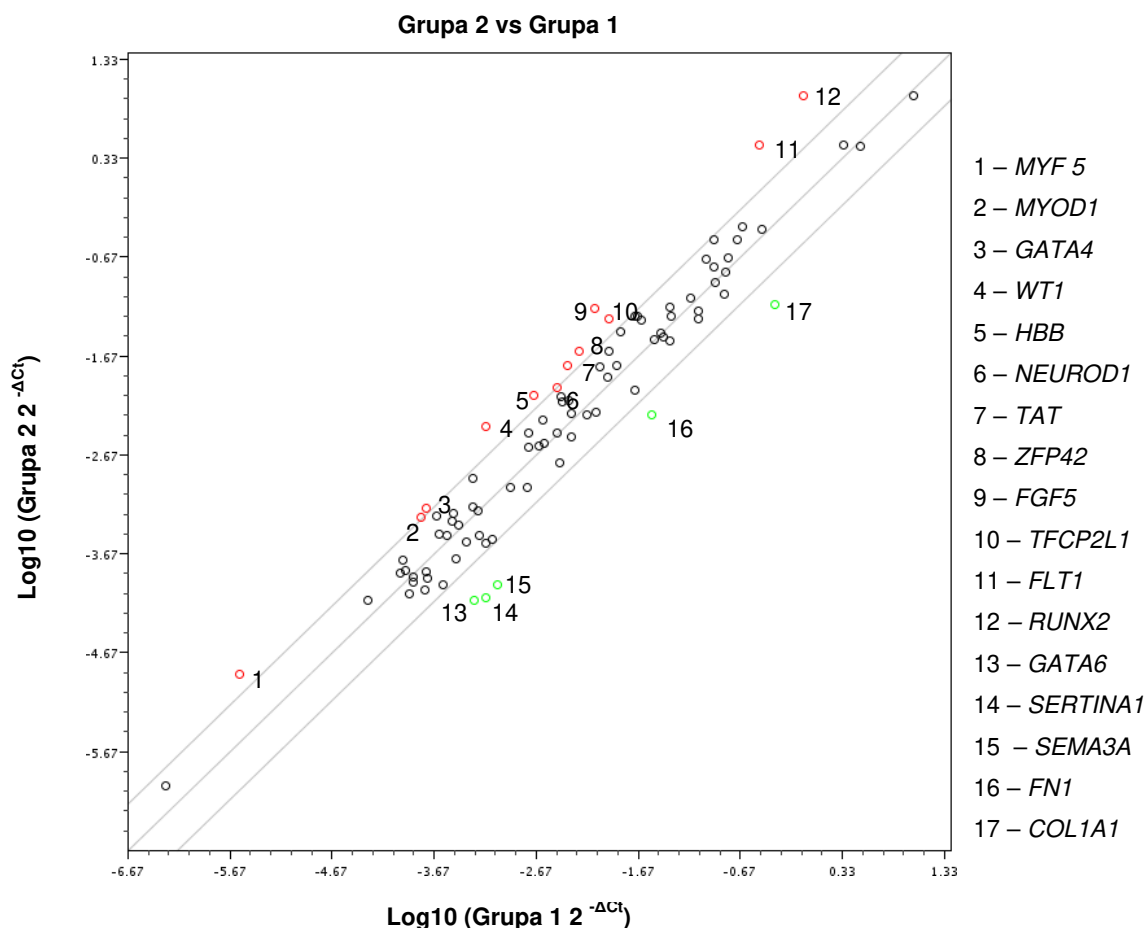
Podsumowując, u pacjentów pośredniego ryzyka z guzem w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego stwierdzono wyższą ekspresję genu *RUNX2* (zwiększenie ekspresji 3,4463-krotne, $p=0,0197$) (Tabela 23.).

Tabela 23. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezę w nerczaku zarodkowym pośredniego ryzyka po chemioterapii przedoperacyjnej w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego

Nazwa genu	Krotność zmiany ekspresji	Poziom istotności p
<i>RUNX2</i>	3,4463	0,0197

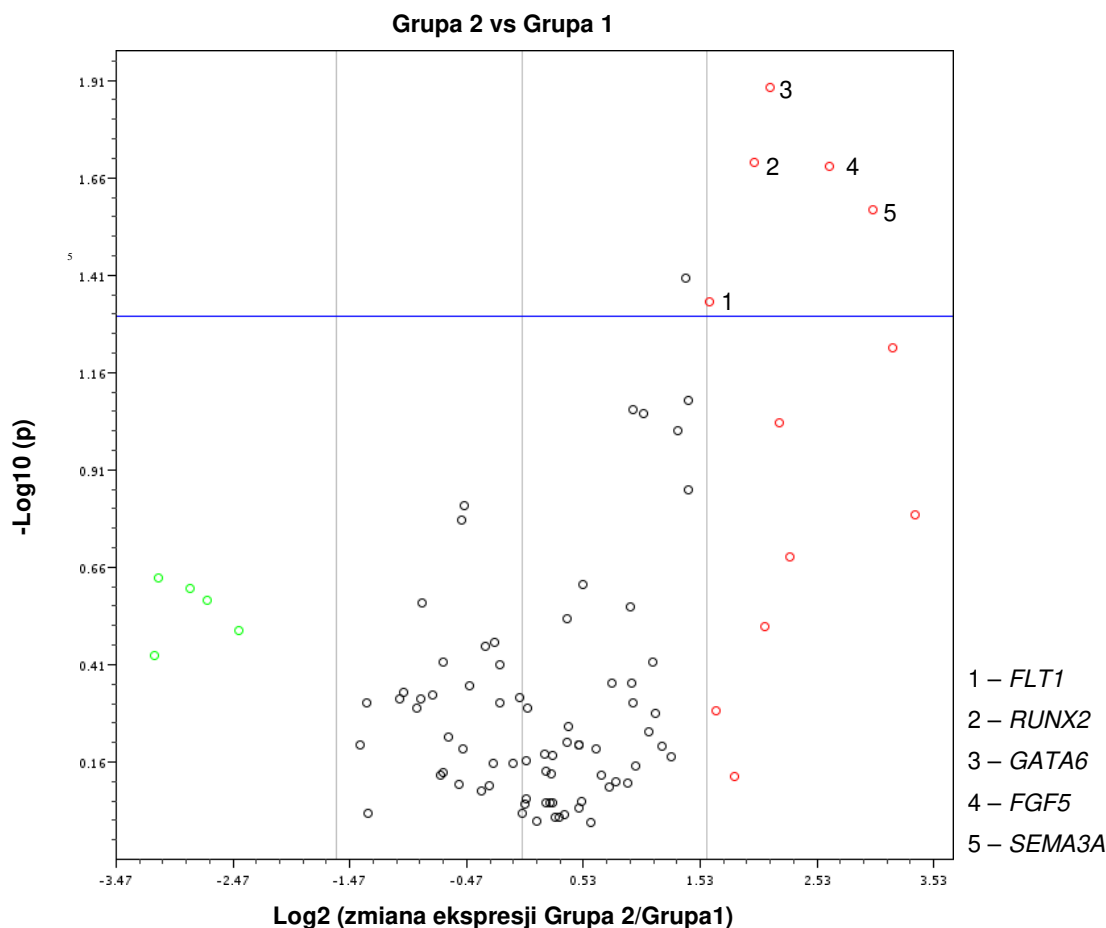
- 3) nerczak zarodkowy pośredniego ryzyka w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (n=5) vs po chemioterapii przedoperacyjnej (n=9):

Na analizie „scatter plot” u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) stwierdzono wyższą ekspresję 12 genów (*COL1A1*, *FGF5*, *FLT1*, *FN1*, *GATA6*, *NEUROD1*, *RUNX2*, *SEMA3A*, *SERPINA1*, *TAT*, *TFCP2L1*, *ZFP42*) oraz niższą ekspresję 5 genów (*GATA4*, *HBB*, *MYF5*, *MYOD1*, *WT1*) w porównaniu z pacjentami z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1) (Rycina 19.).



Rycina 19. Analiza *scatter plot* ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1). Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), ○ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną, ○ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną.

Po wykonaniu analizy „volcano plot”, uwzględniającej odchylenia standardowe dotyczące zmian ekspresji genów oraz oceniającej istotność statystyczną, u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną stwierdzono wyższą ekspresję już tylko 5 genów (*FGF5*, *FLT1*, *GATA6*, *RUNX2*, *SEMA3A*) ($p < 0,05$) (Rycina 20.).



Rycina 20. Analiza „volcano plot” ekspresji wszystkich badanych genów regulujących embriogenezę (z wyłączeniem genów referencyjnych i kontroli) w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną (Grupa 2) względem pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej (Grupa 1). Linia środkowa - ekspresja identyczna dla badanych grup, linie boczne - granica istotności zmian w ekspresji (3x), linia pozioma - granica istotności statystycznej, ◻ - geny o podwyższonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną, ◻ - geny o obniżonej ekspresji w grupie pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną.

Podsumowując, u pacjentów z guzem w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną stwierdzono wyższą ekspresję genów *FGF5* (zwiększenie ekspresji 6,2085-krotne, $p=0,0206$), *FLT1* (zwiększenie ekspresji 3,0403-krotne, $p=0,0460$), *GATA6* (zwiększenie ekspresji 4,3789-krotne, $p=0,0129$), *RUNX2* (zwiększenie ekspresji 3,9877-krotne, $p=0,0201$) oraz *SEMA3A* (zwiększenie ekspresji 8,0167-krotne, $p=0,0267$) (Tabela 24.).

Tabela 24. Zmiana ekspresji genów regulujących proces embriogenezy w nerczaku zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną

Nazwa genu	Krotność zmiany ekspresji	Poziom istotności p
<i>FGF5</i>	6,2085	0,0206
<i>FLT1</i>	3,0403	0,0460
<i>GATA6</i>	4,3789	0,0129
<i>RUNX2</i>	3,9877	0,0201
<i>SEMA3A</i>	8,0167	0,0267

5. Dyskusja

Nerczak zarodkowy jest najczęstszym pierwotnym guzem nerki u dzieci i młodzieży, stanowiąc ok. 6-8% wszystkich chorób nowotworowych w tej grupie wiekowej. Dzięki kompleksowej terapii złożonej z leczenia operacyjnego, chemioterapii i radioterapii, udaje się wyleczyć około 85% pacjentów z tym nowotworem [Weirich 2004]. Jednak u ok. 10-15% chorych dochodzi do wznowy choroby, w tym także u pacjentów, którzy zgodnie z aktualnie przyjętymi kryteriami, zakwalifikowani zostali do grupy o korzystnym rokowaniu. Stąd nadal poszukuje się wskaźników prognostycznych, które pozwoliłyby jeszcze precyzyjniej niż obecnie ocenić rokowanie u chorego z nerczakiem zarodkowym i dobrać najwłaściwsze leczenie, tj. takie, którego intensywność dostosowana do rokowania nie spowoduje ani zbędnego zagrożenia powikłaniami terapii, ani nadmiernego ryzyka wznowy nerczaka w przyszłości. W tym celu z zastosowaniem metod immunohistochemicznych podjęto próbę oceny ekspresji i znaczenia rokowniczego wybranych markerów biologicznych nerczaka zarodkowego u dzieci, a wykorzystując metody molekularne próbę oceny ekspresji i znaczenia rokowniczego genów związanych z regulacją procesów angiogenezy oraz genów wpływających na różnicowanie macierzystych komórek embrionalnych.

Badania immunohistochemiczne

Badanie immunohistochemiczne pozwala na wykrycie, określenie lokalizacji i ilościowej ocenie wybranych antygenów zarówno w komórkach jak i tkankach, na zasadzie reakcji antygen-przeciwciała. W przypadku obecności białek przeciwko którym skierowane jest zastosowane swoiste przeciwciało oraz gotowych kompleksów z odpowiednimi znacznikami, uzyskuje się barwną reakcję. Jednak należy podkreślić, że wielokrotnie konieczne jest wykonanie badania z użyciem kilku przeciwciał, ponieważ rzadko dostępne jest jedno wysoce specyficzne przeciwciało, którego obecność umożliwia jednoznaczne postawienie diagnozy. Z tego względu często do ostatecznego rozpoznania wykorzystuje się panel przeciwciał.

Decyzja dotycząca wyboru zastosowanych w pracy doktorskiej przeciwciał poprzedzona była wnikliwym przeglądem piśmiennictwa.

Oceniając ekspresję markerów proliferacji - białek Ki-67 i p27^{Kip1} stwierdzono istotnie wyższą ekspresję pierwszego z omawianych białek w elemencie nabłonkowym guzów o wysokim stopniu zaawansowania klinicznego, co można tłumaczyć faktem, iż to utkanie nerczaka zarodkowego uznaje się za znacznie mniej chemiowrażliwe niż np. utkanie blastemiczne. Z tego względu obecność przetrwałej ekspresji znanego markera proliferacji, białka Ki-67, można uznać za dowód niecałkowitego zniszczenia żywego utkania

nowotworowego. Juric i wsp. [2010] oceniając ekspresję Ki-67 w nerczaku zarodkowym także wykazali jego wyższą ekspresję w utkaniu nabłonkowym, choć podkreślili iż wartość prognostyczną i wpływ na czas przeżycia pacjentów miała raczej ekspresja w utkaniu blastemicznym, co także potwierdził Berrebi i wsp. [2008]. Jednakże Juric i wsp. wskazali, iż ekspresja w utkaniu nabłonkowym może być dowodem przetrwałej aktywności proliferacyjnej lepiej zróżnicowanych komórek nabłonkowych guza. Scholzen i wsp [2000], wykazali, że obecność Ki-67 w surowicy pacjentów z nowotworami stanowi marker niekorzystnego rokowania, sugerując istotnie wyższe ryzyko progresji choroby. Podobne obserwacje poczynił Bruy i wsp. [2010] w kontekście pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną. Ghanem i wsp. [2011] wykazali zależność między ekspresją Ki-67 oraz p27^{Kip1} w utkaniu blastemicznym pacjentów po pierwotnej resekcji nerczaka zarodkowego, bez uprzedniej chemioterapii a zwiększonym ryzykiem progresji choroby. Z tego powodu stwierdzenie ekspresji Ki-67 w blastemie u dzieci, u których guza nerki rozpoznano poniżej 2 roku życia może wskazywać na niedostateczną odpowiedź na zastosowane leczenie i być potencjalnie czynnikiem niekorzystnej prognozy. Jednakże, w analizowanej grupie pacjentów, u których doszło do wznowy choroby, ekspresja białka Ki-67 w utkaniu blastemicznym była niska, co może świadczyć o bardziej złożonej zależności między obecnością przetrwałego żywego utkania nowotworowego o dużej agresywności, jaką jest blastema a wystąpieniem wznowy choroby, na co wskazuje Barocca [2010], sugerując iż w obrębie utkania blastemicznego istnieją dwa podtypy o różnych cechach biologicznych świadczących o agresywności choroby. Konieczne jest badanie na znacznie większej grupie pacjentów by zweryfikować otrzymane wyniki.

Rola białka p27^{Kip1} w nerczaku zarodkowym nie jest jednoznacznie wyjaśniona, ponieważ, jak już wspomniano wcześniej, hamowanie proliferacji lub pobudzanie tworzenia ognisk przerzutowych, zależy od lokalizacji białka w obrębie komórek, co obserwowano zarówno w nowotworach pochodzenia nabłonkowego jak i nienabłonkowego [Borrelli 2011]. W grupie badanych pacjentów wyższą ekspresję białka p27^{Kip1} w utkaniu blastemicznym stwierdzono u dzieci, u których guz nerki rozpoznano poniżej 2 roku życia, co można tłumaczyć obecnością przetrwałego żywego utkania nowotworowego, pomimo stosowanej wcześniej chemioterapii. Zastanawiający jest fakt, iż w grupie pacjentów poniżej 4 roku życia w momencie rozpoznania, obserwowano wyższą ekspresję p27^{Kip1} w obrębie zrębu, co może dowodzić znacznie gorszej odpowiedzi na wcześniejszą chemioterapię w tej podgrupie chorych, co sugerował także Juric i wsp. [2010], i może stanowić potencjalnie czynnik niekorzystny rokowniczo. Z drugiej jednak strony, wcześniejsze doniesienia wskazywały na znacząco mniejszy potencjał proliferacyjny tego elementu utkania nerczaka w porównaniu

z pozostałymi elementami, co tłumaczono obecnością zarówno komórek nowotworowych, jak i elementów desmoplastycznych [Juric 2010].

Mimo, iż początkowo ekspresję białka p53 łączono jedynie z obecnością utkania anaplastycznego, o istotnie gorszym rokowaniu [Bardeesy 1995], dalsze obserwacje wykazały ekspresję tego białka także w guzach kwalifikowanych do grupy o korzystnym obrazie histopatologicznym, co potwierdziło wielu badaczy [Huang 2002, Jadali 2011]. Mimo, że nadal pojawiają się sprzeczne doniesienia, uznaje się, iż obecność białka p53 jest wskaźnikiem przepowiadającym gorsze wyniki leczenia, niezależnie od obrazu histopatologicznego [Agarwal 2011]. W związku z tym stwierdzenie wyższej ekspresji białka p53 w utkaniu nabłonkowym u analizowanych pacjentów z progresją/wznową choroby, może stanowić potwierdzenie przydatności tego białka w identyfikacji przypadków nerczaka zarodkowego charakteryzujących się większą złośliwością i wyselekcjonować pacjentów, którzy będą wymagać dodatkowego wzmocnienia leczenia, by zapobiec jego niepowodzeniu (w badanej grupie progresja/wznowa wystąpiła u pacjentów z chorobą w IV lub V stopniu zaawansowania klinicznego).

Z kolei brak istotnych statystycznie różnic ekspresji białka CD274 może wynikać z faktu, iż u stosunkowo niewielu pacjentów stwierdzano dodatnią reakcję. Jednym z argumentów może być nieodpowiednio dostosowane stężenie użytego przeciwciała. Istnieje prawdopodobieństwo, iż w przypadku powtórzenia reakcji z zastosowaniem wyższego stężenia przeciwciała wykazana zostałaby dodatnia reakcja, na przykład u pacjentów, u których doszło do progresji/wznowy choroby, co przystaje do wniosków Routh i wsp. [2008], którzy wykazali wyższą ekspresję białka w przypadku niekorzystnego obrazu histopatologicznego. Ponadto zwiększenie liczebności grupy mogłoby pomóc w wykazaniu, iż białko CD274, co prawda nieprzydatne jako pojedynczy marker, w panelu wraz z innymi białkami, może stanowić pomocne narzędzie diagnostyczno-rokownicze.

Dome i wsp. [1999] wskazywali na związek wyższej aktywności hTERT z obecnością utkania anaplastycznego, a kolejne prace sugerowały, że także w obrębie pozostałych elementów utkania guza przetrwała ekspresja enzymu wiąże się z wyższym ryzykiem wznowy oraz krótszym przeżyciem [Diniz 2011]. Z tego względu obserwowaną wyższą aktywność w utkaniu wśród pacjentów grupy wysokiego ryzyka, można interpretować jako dowód niedostatecznej odpowiedzi utkania guza na prowadzoną wcześniej chemioterapię a także czynnik niekorzystnej prognozy. Świadczy to również o większym potencjale regeneracyjnym nieprawidłowych komórek, co może mieć wpływ na dalszy przebieg choroby, i z tego względu konieczna jest dalsza wnikliwa obserwacja takich pacjentów.

Pomimo faktu, iż progresja lub wznowa choroby wystąpiła jedynie u 5 pacjentów, analizując bardziej szczegółowo wyniki badań immunohistochemicznych zwrócono uwagę na fakt, iż w poszczególnych elementach utkania u pacjentów, u których doszło do niepowodzenia leczenia ekspresja wszystkich analizowanych białek stwierdzana była głównie w utkaniu nabłonkowym, jednak różniła się ilością punktów wg skali IRS (najwięcej Ki-67 i p27^{kip1}). Można to tłumaczyć faktem, iż w obrębie tego elementu, uznanego za mniej wrażliwy na chemioterapię, u pacjentów z progresją/wznową choroby częściej pozostawało żywe utkanie nowotworowe, które mogło być punktem wyjścia dla dalszego rozwoju choroby.

Jak już wspomniano, utkanie anaplastyczne stanowi czynnik niekorzystnego rokowania, jednak w obrębie analizowanej grupy było tylko dwóch pacjentów z guzem o utkaniu rozsiałym anaplastycznym. Co ciekawe przebieg kliniczny w obu przypadkach był całkowicie inny, co może wskazywać na znacznie większą złożoność zależności między utkaniem histopatologicznym a rokowaniem. Analizując ekspresję ocenioną w skali IRS u pacjenta z guzem o utkaniu rozsiałej anaplazji, u którego nie uzyskano remisji choroby i doszło do zgonu z powodu progresji (A) z pacjentem z guzem o tym samym utkaniu, u którego stwierdzono remisję i nie doszło do żadnego niekorzystnego zdarzenia (B), zwraca uwagę fakt, iż u pacjenta z niepowodzeniem leczenia obserwowano znacznie bardziej nasiloną ekspresję białek Ki-67, p27^{kip1} oraz p53 w obrębie wszystkich elementów utkania guza, co może świadczyć o tym, że pomimo 6-tygodniowej chemioterapii przedoperacyjnej (wyjściowo IV stopień zaawansowania klinicznego), nadal znaczna część usuniętego guza wykazywała cechy świadczące o dużej inwazyjności.

Brak wyników istotnych statystycznie dotyczących wartości MVD może być spowodowany analizowaniem wyników dotyczących ekspresji białka CD31 jedynie w utkaniu blastemicznym pochodzących od zbyt małej grupy pacjentów. Bezsprzecznie, istotnym czynnikiem warunkującym agresywność choroby nowotworowej jest zdolność do tworzenia nowych naczyń krwionośnych, co udowodniło wielu badaczy [Blood 1990, Gupta 2003]. Jednak jest to proces złożony, na który oddziałują wiele różnych czynników. Abramson i wsp. [2003] po raz pierwszy podkreślili istotną rolę oceny MVD w rokowaniu w nerczaku zarodkowym, co zostało potwierdzone także przez Ozluka i wsp. [2006], którzy wskazali przydatność tego parametru do przewidywania rokowania także u pacjentów o korzystnym obrazie histopatologicznym. Jest to zgodne z doniesieniami na temat prognostycznej wartości MVD w chorobach nowotworowych osób dorosłych, u których wysoka wartość MVD świadczyła o dużej agresywności choroby i złym rokowaniu [Weidner 1995].

Należy także odnieść się do wyboru przeciwciała CD31 a nie CD34, które jest również używane w ocenie nasilenia neoangiogenezy, uznając je za marker obecności także

niedojrzałych naczyń. Jednakże na wtedy, kiedy planowano pracę doktorską, w dostępnym piśmiennictwie, nie było jeszcze jednoznacznych wniosków dotyczących wyższości CD34 nad CD31. Ponadto mimo, że otrzymana wartość MVD w utkaniu blastemicznym może wydawać się niska w porównaniu z innymi nowotworami, wynik jest zbliżony z wcześniejszymi doniesieniami niektórych autorów [Ozluik 2006]. Należy także podkreślić, że wartość MVD oceniana była w tkance poddanej wcześniejszej chemioterapii, co mogło doprowadzić także do istotnego zniszczenia powstałych w utkaniu nowotworowym naczyń krwionośnych.

Badania molekularne

Technika *real time-PCR* jest czułą metodą analityczną, która pozwala na ilościowe określenie kopii genu a także poziomu ekspresji RNA, dzięki wykorzystaniu barwników fluorescencyjnych wiążących się do określonych fragmentów DNA lub oznakowanych sond oligonukleotydowych.

Ze względu na dużą czułość i specyficzność technika ta stosowana jest bardzo szeroko nie tylko w badaniach doświadczalnych, potwierdzając obecność określonych genów lub ekspresję białek ale także jest ogromnie przydatna w praktyce klinicznej, będąc istotną metodą diagnostyki onkologicznej i mikrobiologicznej, wykrywając obecność specyficznych mutacji genetycznych czy obecności genomów wirusowych oraz bakteryjnych. Co istotne, do wykonania tych badań nie jest konieczna duża ilość materiału komórkowego, a samo badanie nie zabiera tyle czasu co np. standardowe badania histopatologiczne lub mikrobiologiczne.

Jednym z celów pracy doktorskiej była ocena zmian ekspresji genów regulujących proces angiogenezy i embriogenezy, co mogłoby pozwolić w przyszłości na stworzenie swoistego panelu ekspresji określonych genów charakterystycznych dla nerczaka zarodkowego. Mimo, że trwają intensywne poszukiwania genów, których mutacja jest bezpośrednio przyczyną tego nowotworu, i jest dużo potencjalnych „genów-kandydatów”, nadal brak jest jednoznacznych wyników. Jednak dalsze badania są istotne, ponieważ pozwolą na lepsze poznanie bardzo skomplikowanego procesu nowotworzenia, który prowadzi do powstania nerczaka zarodkowego.

Z uwagi na małą grupę analizowanych pacjentów oraz ich znaczne zróżnicowanie, do otrzymanych wyników należy podchodzić z ostrożnością, jednak wskazują one ciekawy kierunek dalszych badań na większej grupie chorych.

Geny regulujące proces angiogenezy

Jak już wspomniano we Wstępie, angiogeneza jest warunkiem koniecznym do rozwoju nowotworu, ponieważ zapewnia nie tylko dostarczanie substancji odżywczych, ale także zwiększa potencjał inwazyjny komórek nowotworowych [Blood 1990]. Jest to złożony

proces, na który wpływ mają komórki śródbłonna, macierzy komórkowej i komórki nowotworowe oraz wydzielane przez nie substancje.

Jedną z grup takich związków są chemokiny - cytokiny chemotaktyczne wytwarzane głównie przez leukocyty, których główną funkcją jest aktywacja układu immunologicznego do walki z patogenami. W zależności od obecności konserwatywnej sekwencji trzech aminokwasów (tzw. motyw ELR) rozróżnia się dwie podgrupy: związki ELR(+) aktywujące neutrofile oraz ELR(-) które pobudzają m.in. monocyty i limfocyty. Do podgrupy chemokin ELR(+) należą chemokiny GRO- α , - β , - γ (nazywane także: CXCL1, CXCL2, CXCL3) [Luan 1997]. Badania dotyczące tych związków wykazały, że poszczególne chemokiny mogą także pełnić rolę w embriogenezie i angiogenezie, w rozwoju chorób autoimmunologicznych, jak również stymulować proliferację komórek nowotworowych oraz tworzenie przerzutów. W związku z tym sugeruje się, że inhibicja aktywności poszczególnych chemokin lub ich receptorów może mieć działanie nie tylko przeciwzapalne, ale także przeciwnowotworowe [Waśniowska 2004].

Chemokina CXCL2 ma właściwości prozapalne i wydzielana jest głównie przez leukocyty pod wpływem odpowiednich cytokin, a jej rolą jest rekrutacja leukocytów do miejsca zakażenia lub zapalenia [Proudfoot 2002]. Jednak jest także obecna m.in. w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, modyfikując wydzielanie neurotransmiterów. Obecność chemokiny CXCL1 potwierdzono w wielu nowotworach, stąd jej inaktywacja może hamować wzrost guza oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych, natomiast rola CXCL2 w nowotworzeniu nie jest do końca wyjaśniona, a wyniki niektórych badań są sprzeczne [Dong 2011]. Jednym z możliwych mechanizmów jest autokrylna aktywacja szlaku Ras-ERK1/2, co z kolei prowadzi do ekspresji genu *egr1* (*early growth response 1 gene*) posiadającego zdolność regulowania ekspresji czynników wpływających na cykl komórkowy (m.in białko p27) i pobudzenia proliferacji nowotworu [Wang 2006, Dong 2011]. Wydzielana przez komórki nowotworowe, może także aktywować angiogenezę poprzez receptor CXCR2 [Strieter 2006].

Jak dotąd nie ma doniesień dotyczących ekspresji CXCL2 w nerczaku zarodkowym oraz związku CXCL2 z biologicznymi i klinicznymi cechami nerczaka. Tymczasem w przeprowadzonych badaniach stwierdzono wyższą ekspresję genu CXCL2 w grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego. Podobny związek pomiędzy ekspresją CXCL2 a stopniem zaawansowania nowotworu i innymi wykładnikami agresywności nowotworu spostrzegano także w przypadku innych nowotworów, np. raka jelita grubego [Doll 2010] lub raka przetyku [Wang 2006]. W związku z tym można wnioskować, że ocena ekspresji CXCL2 mogłaby być pomocna w praktyce klinicznej do kwalifikacji pacjentów z nerczakiem zarodkowym do grupy wyższego ryzyka i ewentualnej modyfikacji zaplanowanej terapii.

Z kolei interleukina 6 (IL-6) jest glikoproteiną o zróżnicowanym działaniu - wpływa nie tylko na prawidłową odpowiedź układu odpornościowego, ale także reguluje reakcję zapalną, hematopoezę oraz pobudza osteoklasty. Białko to, produkowane głównie przez makrofagi i monocyty, ale także m.in. przez komórki śródbłonna i fibroblasty, wykazuje podobieństwo budowy do czynnika stymulującego hepatocyty (*hepatocyte growth factor*, HGF), który indukuje produkcję białek ostrej fazy w stanie zapalnym. Natomiast gen kodujący IL-6 przypomina gen czynnika stymulującego kolonie granulocytów, i z tego powodu IL-6 określa się także jako pozytywny regulator wzrostu, który pobudza proliferację i dojrzewanie hematopoetycznych komórek macierzystych. Główną rolą IL-6 jest stymulacja końcowego różnicowania limfocytów B w kierunku plazmacytów oraz aktywacja limfocytów T rozpoznających antygen [Łukaszewicz 2007].

Ponieważ IL-6 może także indukować apoptozę oraz pobudzać komórki NK i limfocyty cytotoksyczne, próbowano wykorzystać jej działanie do niszczenia komórek nowotworowych, jednak okazało się, że w przypadku niektórych guzów, białko to wręcz stymulowało nieprawidłowe komórki do wzrostu [Gołąb 2002]. Z tego względu, obecnie IL-6 uważana jest za czynnik pobudzający wzrost nowotworu na drodze hamowania apoptozy nieprawidłowych komórek oraz indukcję angiogenezy. Poza tym pobudzanie osteoklastów może także ułatwiać powstawanie przerzutów w kościach [Ara 2010]. Podwyższone stężenie IL-6 obserwowano u wielu pacjentów z nowotworami, przy czym najwięcej doniesień dotyczy raka jelita grubego [Esfandi 2006], gruczołu krokowego [Culig 2005], chłoniaków nieziarniczych [Pedersen 2005] oraz szpiczaka mnogiego [Kovacs 2006], co korelowało zarówno z zaawansowaniem choroby, jak również z rokowaniem. Ze względu na fakt, iż IL-6 stymuluje powstawanie plazmacytów, zastosowanie przeciwciał przeciwko IL-6 lub jej receptorom może stać się elementem celowanego leczenia szpiczaka [Kovacs 2006]. Natomiast Ara i wsp. [2009] przedstawili wyniki badań nad zależnością między stężeniem we krwi tej interleukiny a progresją zwojaka zarodkowego, w tym nasilenia przerzutowych zmian w kościach. Co więcej, zasugerowano, że IL-6 ma zdolność ochrony komórek *neuroblastoma* przed działaniem cytostatyków, stąd także w tym przypadku duże nadzieje na poprawę wyników leczenia pacjentów ze zwojakiem zarodkowym wysokiego ryzyka wiąże się z możliwością zastosowania leków blokujących tę interleukinę, np. tocilizumabu (przeciwciało przeciwko receptorowi dla IL-6), który jest już obecnie wykorzystywany w leczeniu pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, w tym także dzieci (z układową postacią młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów) [Paul-Pletzer 2006]. Natomiast jak dotąd nie badano ekspresji genu *IL-6* w nerczaku zarodkowym.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, podobnie jak w przypadku CXCL2, wyższą ekspresję genu *IL6* w grupie pacjentów z guzem w wysokim stopniu zaawansowania klinicznego, a zatem wykazującym większą inwazyjność, co może wskazywać na zależność

podobną jak obserwowana przez Ara i wsp. [2009] w zwojaku zarodkowym, demonstrującym oporność na leczenie i progresję. W związku z tym w przyszłości istnieje możliwość zastosowania leków blokujących działanie IL-6 w leczeniu nerczaka z wysoką ekspresją tej interleukiny.

Jednym z białek posiadających zdolność indukowania angiogenezy jest czynnik wzrostu hepatocytów (HGF). Jest to plejotropowe białko produkowane m.in. przez fibroblasty i komórki mięśni gładkich, które poprzez aktywację receptora tyrozynowy *c-Met* wpływa m.in. na morfogenezę, stymuluje angiogenezę poprzez pobudzanie proliferacji, migracji i adhezji komórek śródbłonna oraz inwazyjność ułatwiając proliferującym komórkom tworzenie mikroprzerzutów [Birchmeier 2003]. Udowodniono, że zaburzenia działania HGF i jego receptora *Met* stanowią istotny czynnik wpływający na powstawanie nowotworów [Li 2005]. Z tego względu sugeruje się, iż przeciwciała anty-HGF mogłyby być skutecznym lekiem hamującym powstawanie przerzutów. Obecnie trwają badania II fazy nad skutecznością takiego leku (crizotinib) w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc, raka żołądka oraz prostaty [Bowles 2012].

Badania dotyczące wpływu HGF na nowotworzenie dotyczą głównie pacjentów dorosłych, u których stwierdzono wysokie stężenie tego białka m.in. w raku jelita grubego [Zeng 2008], raku żołądka [Lee 2011] oraz niedrobnokomórkowym raku płuc [Nakamura 2007], uznając je za czynnik niekorzystnej prognozy, który może być także pomocny w diagnostyce wymienionych nowotworów [Sierra 2011]. Jednak, choć nieliczne, dostępne są także badania obejmujące populację pediatryczną. Li i wsp. [2005] wykazali zależność między ekspresją białka HGF a wzrostem masy guza w utkaniu rdzeniaka zarodkowego, który jest jednym z najczęściej występujących nowotworów ośrodkowego układu nerwowego u dzieci.

Natomiast Alami [2002] ocenił ekspresję HGF we wszystkich elementach utkania nerczaka, stwierdzając najwyższą ekspresję w obrębie utkania nabłonkowego i blastemicznego. Porównując ekspresję białka Ki-67 w tym samym nowotworze wykazał koekspresję HGF oraz indeksu proliferacyjnego ocenionego na podstawie ekspresji Ki-67 we wspomnianych elementach utkania nerczaka. Jednak Vuononvirta i wsp. [2009] prowadząc badania na znacznie większej grupie pacjentów zwrócili uwagę, iż stwierdzana obecność HGF/*Met* w utkaniu nerczaka mogła być raczej pozostałością z prawidłowej nefrogenezy, z okresu, gdy komórki mezenchymalne przekształcały się w nabłonkowe, bez związku z onkogenezą. Wymaga to dalszych badań i obserwacji klinicznej większej liczby chorych z guzem Wilmsa.

W badanej grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego wyższą ekspresję genu *HGF* stwierdzono w materiale pochodzącym od pacjentów po pierwotnej resekcji guza, co może być efektem zarówno oceny materiału, który nie uległ jeszcze martwicy po chemioterapii wstępnej, jak i faktu, iż było to utkanie guza o niskim stopniu zaawansowania, z dużą komponentą prawidłowego

utkania nerki. Ponadto niższa ekspresja genu *HGF* po chemioterapii przedoperacyjnej może wskazywać na dużą wrażliwość komórek nerczaka wykazujących wysoką ekspresję tego genu na chemioterapię.

Kolejnym białkiem biorącym udział w neoangiogenezie jest łożyskowy czynnik wzrostu (*placental growth factor*, PGF), będący białkiem należącym do rodziny VEGF, do której należą także VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. VEGF pełni istotną rolę w proliferacji, dojrzewaniu oraz migracji prawidłowych komórek śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych [Korpelainen 1998] oraz mobilizuje prekursorowe komórki śródbłonna ze szpiku kostnego [Ashara 1999]. Ponadto będąc silnym mitogenem produkowanym przez większość komórek nowotworowych stymuluje neoangiogenezę [Ferrara 2003]. U człowieka gen *PGF* koduje 4 izoformy białka, które wykazują duże podobieństwo do PDGF-podobnego fragmentu VEGF, mając zdolność łączenia się z receptorem VEGFR-1 i potęgowania działania angiogenego VEGF [Maglione 1993]. Jego obecność początkowo wykazano w błonie naczyniowo-syncytialnej łożyska oraz błonie środkowej dużych naczyń krwionośnych łożyska [Khaliq 1996] oraz trofoblastu, będąc ważnym czynnikiem inicjującym unaczynienie doczesnej oraz łożyska na wczesnym etapie embriogenezy [Aachen 1997]. Dalsze badania stwierdziły także, iż białko to obecne jest także w wielu innych narządach, np. sercu, płucach, tkance mięśniowej i tłuszczowej [Persico 1999, Voros 2005]. PGF wpływając na mięśnie gładkie stabilizuje i stymuluje dojrzewanie powstających naczyń krwionośnych, a także pobudza komórki progenitorowe szpiku kostnego oraz komórki zapalne, które również wpływają na prawidłowy proces angiogenezy [Autiero 2003].

Ponadto PGF będąc istotnym czynnikiem stymulującym proces angiogenezy, bierze udział m.in. w prawidłowym gojeniu ran, a także nowotworzeniu. W warunkach niedokrwienia, które stwierdza się w masie proliferujących komórek nowotworowych PGF może stymulować neoangiogenezę, wspomagając komórki śródbłonna nowotworu oraz makrofagi. Wykazano zależność między stężeniem PGF w surowicy a stopniem zaawansowania niektórych nowotworów, ich unaczynieniem, obecnością przerzutów a także ryzykiem wznowy [Ribatti 2008] - podwyższone stężenie w nowotworach pochodzenia nabłonkowego (rak piersi, płuc, jelita grubego) [Fisher 2007] oraz w czerniaku złośliwym łączyło się z gorszym rokowaniem [Konstantina 2001]. Ponadto stwierdzono, że ekspresja PGF istotnie wzrastała w czasie leczenia przeciwnowotworowego, co mogło sprzyjać rozwojowi oporności na terapię poprzez stymulację powstawania nowych naczyń krwionośnych oraz być przyczyną dalszego wzrostu masy nowotworu [Ebos 2007]. Z tego względu białko to może stać się nowym celem działania dla leków przeciwiangiogennych, w przypadku oporności na leki działające na VEGFR (np. bevacizumab) [Loges 2009]. Obecnie trwają badania oceniające skuteczność dwóch nowych leków - afliberceptu (ma posiadać zdolność łączenia się

zarówno z VEGF-A jak i PGF) oraz TB403 (przeciwciało monoklonalne przeciwko PGF) [Tew 2010]. Ponadto sugeruje się, że u pacjentów leczonych z powodu raka nerkowokomórkowego pomiar stężenia PGF może być przydatny w ocenie odpowiedzi na leczenie sunitinibem a wzrost stężenia byłby wczesnym wskaźnikiem sugerującym progresję lub wznowę choroby [DePrimo 2007]. Należy jednak wspomnieć o pojawiających się kontrowersjach związanych ze stosowaniem leków hamujących angiogenezę, ze względu na doniesienia wskazujące, iż na skutek tzw. polekowej hipoksji [Ebos 2011] może dochodzić do wzrostu stężenia PGF, który na skutek krzyżowej reakcji z VEGFR, *de facto* ma zdolność stymulowania komórek nowotworowych do tworzenia ognisk przerzutowych [Paez-Ribes 2009].

Do tej pory niewiele uwagi poświęcono ekspresji *PGF* i jego rokownicemu znaczeniu w nerczaku zarodkowym, choć wydaje się, że ta zależność może być podobna jak w raku nerkowokomórkowym, ponieważ guz Wilmsa jest nowotworem dobrze unaczynionym.

Podobnie jak w przypadku ekspresji wcześniej omówionych genów, stwierdzona wyższa ekspresja genu *PGF* wśród pacjentów, którzy nie otrzymali chemioterapii, może być wynikiem oceny ekspresji w obrębie żywego utkania nowotworowego o dużym potencjale angiogennym. Z tego powodu stwierdzenie wysokiej ekspresji PGF w guzie poddanym chemioterapii, mogłoby być wskaźnikiem niekorzystnym rokowniczo, sugerując obecność przetrwałej tkanki nowotworowej. W takim przypadku przydatne w terapii mogłyby być leki celowane o zdolności hamowania aktywności PGF.

Aby w obrębie tkanki nowotworowej mogły powstawać nowe naczynia krwionośne, konieczna jest nie tylko aktywacja czynników proangiogennych, ale także hamowanie wydzielania czynników antyangiogennych. Z tego powodu białka takie jak angiostatyna, endostatyna, wazostatyna czy tumstatyna, dzięki swej funkcji hamującej rozwój nowych naczyń, stanowią potencjalne punkty uchwytu dla działania nowych leków [Carmeliet 2000].

Strukturą, która jest także włączona w ten proces jest m.in. błona podstawna, zbudowana m.in. z kolagenu typu IV, lamininy, fibronektyny i siarczanu heparanu [Kalluri 2003]. Na podstawie wyników badań nad hamowaniem proliferacji komórek czerniaka, wykazano, że dzięki kodowanemu przez gen *COL4A3* kolagenowi typu IV, a dokładniej domenie NC1 na C-końcu łańcucha $\alpha 3$ nazwanej tumstatyną, białko to posiada właściwości przeciwiangiogenne [Han 1997]. Do tej pory zaburzenia w obrębie genu *COL4A3* łączone były jedynie z dziedzicznymi nefropatiami, tj. chorobą cienkich błon kłębuszkowych oraz zespołem Alporta [Klimek 2006], a także rozsianą mięśniakowatością macicy [Heidet 1997]. Jednak te doniesienia przyczyniły się do intensywnych prac nad wykorzystaniem właściwości hamujących angiogenezę w leczeniu chorób nowotworowych. Obecnie wiadomo, iż tumstatyna nie tylko hamuje angiogenezę, ale także proliferację komórek śródbłona oraz komórek nowotworowych [Hamano 2005].

Mimo, że brak jest prac dotyczących zależności między obniżonym stężeniem tumstatyny a rozwojem nerczaka zarodkowego, ciekawe badania eksperymentalne przeprowadzono w hodowli raka nerki, wykazując obniżenie stężenia tumstatyny w obrębie utkania nowotworu [Xu 2010]. Obecnie trwają badania nad wykorzystaniem właściwości tumstatyny w terapii przeciwnowotworowej, choć coraz częściej wspomina się o niezadowolających wynikach stosowanych już leków przeciwingiennych. Wykazano, że w niektórych sytuacjach komórki nowotworowe mogą nabywać cech świadczących o chemiooporności pod wpływem leków antyangiennych, a czasem, pomimo ciągłego stosowania wspomnianego leczenia masa guza może się zwiększać [Fernando 2008]. Jedną z przyczyn może być zjawisko „*up-regulation*” prowadzące do zwiększenia aktywności czynników proangiennych [Folkman 2006].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotnie zmniejszoną ekspresję genu *COL4A3* w nerczaku zarodkowym u pacjentów poddanych chemioterapii przedoperacyjnej, co może wskazywać na dobrą odpowiedź komponenty naczyniowej utkania nowotworowego na zastosowane leczenie i z czego można wnioskować, że duża część żywego utkania nerczaka została zniszczona.

Metaloproteinazy (*metalloproteinase*, MMP) są enzymami proteolitycznymi, których funkcją jest degradacja elementów zrębu zewnątrzkomórkowego, dlatego pełnią ważną rolę zarówno w procesach fizjologicznych (organogeneza), naprawczych (gojenie ran) jak i patologicznych (stan zapalny, choroby autoimmunologiczne, miażdżyca, nowotwory). Podkreśla się ich ważną rolę w rozwoju oraz przebiegu chorób nowotworowych, a niektóre z nich uznaje się nie tylko za biochemiczne markery nowotworu, ale także za ważne czynniki rokownicze, bowiem wykazano dodatnią korelację pomiędzy wzrostem stężenia MMP-9 a stopniem zaawansowania raka sutka [Wu 2008] oraz jelita grubego [Damodharan 2011].

Aktywność MMP regulowana jest poprzez ich tkankowe inhibitory (*tissue inhibitors of metalloproteinase*, TIMP) [Lambert 2004]. Białka te hamują powstawanie nowych naczyń krwionośnych, migrację i proliferację komórek śródbłonka oraz zmniejszają potencjał inwazyjny nowotworu a najlepiej poznaną cząsteczką jest TIMP1. Zaobserwowano związek między aktywnością TIMP a zróżnicowaniem nowotworu [Baker 2002], wykazując, że w przypadku inwazyjnej postaci nowotworu wzrasta stężenie MMP, co wtórnie powoduje wydzielanie TIMP1 przez komórki zrębu i hamowanie dalszego rozwoju guza [Łukaszewicz-Zajac 2009]. Jednak niektóre z ostatnich doniesień dotyczących raka sutka sugerują, że wysokie stężenie TIMP1 może stanowić wskaźnik chemiooporności, stając się markerem niekorzystnego rokowania [Neri 2012].

W populacji dziecięcej najwięcej badań oceniających przydatność TIMP1 w prognozowaniu wyników leczenia dotyczy ostrej białaczki limfoblastycznej [Krawczuk-Rybak

2010, Scrideli 2010], natomiast brak jest doniesień w aspekcie rokowania u dzieci z nerczakiem zarodkowym. Wydaje się, że wyższa ekspresja genu *TIMP1* u pacjentów z nerczakiem zarodkowym przed chemioterapią przedoperacyjną może być wykładnikiem współlistnienia procesów stymulujących i ograniczających wzrost i rozprzestrzenianie się nerczaka. Gdyby stwierdzono odwrotną sytuację, tj. wyższą ekspresję wspomnianego genu u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej, mogłoby to stanowić informację o potencjalnej chemiooporności przetrwałego utkania nerczaka zarodkowego i/lub ryzyku jego progresji.

Geny regulujące proces embriogenezy

W analizowanej grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym, we wszystkich wykonanych porównaniach, stwierdzono także wyższą ekspresję genu kodującego białko RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*). Jest to czynnik transkrypcyjny, należący do rodziny białek RUNX, które wpływają na proliferację i różnicowanie komórek, np. białko RUNX1 pełni ważną rolę w hematopoezie a RUNX3 m.in. w neurogenezie [Baniwal 2010]. Natomiast RUNX 2 wpływa na zachowanie równowagi między tworzeniem a resorpcją kości, poprzez działanie hamujące lub aktywujące odpowiednie geny kontrolujące osteoklasty i osteoblasty [Pratap 2011]. Ponadto białka te mają także zdolność hamowania proliferacji niektórych komórek, w tym także nowotworowych - dlatego np. brak aktywności białka RUNX1 może przyczyniać się do rozwoju białaczki [Osato 2004] a obniżenie aktywności RUNX3 promuje powstanie raka żołądka [Oshimo 2004]. Jednak najnowsze doniesienia wskazują, że białko RUNX2, ze względu na ważną rolę w osteogenezie, może zwiększać inwazyjność raka sutka oraz prostaty poprzez pobudzanie do tworzenia ognisk przerzutowych w kościach [Baniwal 2010]. Właściwość tą tłumaczy się m.in. interakcją RUNX2 z białkami macierzy kości, VEGF, TGFβ1R oraz integrynami, których aktywność ma związek zarówno ze stopniem zaawansowania nowotworu, jak i ryzykiem powstania przerzutów [Pratap 2011].

Mimo, że w nerczaku zarodkowym niezmiernie rzadko (w ok. 1%) stwierdza się przerzuty do kości i brak jest doniesień o wpływie RUNX2 na inwazyjność tego nowotworu, wydaje się, że taka zależność może jednak wystąpić. Wskazują na to uzyskane wyniki badania PCR doktorantki, w których wyższą ekspresję genu RUNX2 wykazano zarówno u pacjentów z nerczakiem zarodkowym w wyższym stopniu zaawansowania jak i u chorych, którzy nie otrzymali chemioterapii przedoperacyjnej. Wskazana byłaby ocena ekspresji RUNX2 w materiale pochodzącym od pacjentów z grupy wysokiego ryzyka i/lub wysokiego stopnia zaawansowania klinicznego, ponieważ mogłoby to pozwolić na wyłonienie z tych chorych, osób o podwyższonym ryzyku niekorzystnego zdarzenia pod postacią progresji lub wznowy guza.

Czynnik wzrostu fibroblastów-5 (*fibroblast growth factor-5*, FGF-5) nazywany także czynnikiem wzrostu wiążącym heparynę-5 (*heparin-binding growth factor-5*, HBGF-5) należy do dużej rodziny czynników wzrostu fibroblastów, pełniących istotną rolę w angiogenezie a także proliferacji i różnicowaniu komórek oraz tkanek, jak również hamowaniu apoptozy. Aktywność całej grupy FGF zależy od obecności swoistych receptorów (*fibroblast growth factor receptor 1-4*, FGFR 1-4) należących do przezłonowych receptorów kinazy tyrozynowej. W tkankach zarodkowych głównym ich zadaniem jest proliferacja i dojrzewanie komórek oraz tkanek, podczas gdy u dorosłych biorą udział w ich naprawie [Powers 2000].

Udowodniono, że zaburzona funkcja białek FGF oraz ich receptorów ma bezpośredni wpływ na nowotworzenie m.in.: w raku piersi, pęcherza i niedrobnokomórkowym raku płuc [Grose 2005]. Co istotne, w większości badań podkreślano rolę FGF-1 (kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów, *acidic fibroblast growth factor*, aFGF) oraz FGF-2 (zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów, *basic fibroblast growth factor*, bFGF) ale także FGF-3 i FGF-4, uznanych za nowe protoonkogeny [Wesche 2011], jak również nieprawidłowego działania FGFR (na skutek zaburzonej ekspresji, mutacji, rearanżacji chromosomalnych oraz amplifikacji) [Haugsten 2010]. Należy podkreślić, że FGF-2, jako jeden z pierwszych poznanych czynników proangiogennych, wraz z VEGF, grają kluczową rolę w angiogenezie [Norrby 1994].

Wpływ zaburzeń FGF-2 na prawidłowy rozwój nerek był już dość szeroko analizowany [Bates 2007] - sugeruje się, że zaburzenia przekazywania sygnału na drodze pomiędzy białkiem FGF a receptorem mogą być przyczyną wad rozwojowych nerek [Bates 2011]. Co więcej, Li i wsp. [1995] wykazali, iż stężenie FGF-2 w moczu pacjentów z nerczakiem zarodkowym koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu a także wystąpieniem progresji lub wznowy choroby. Mimo potencjalnych korzyści, zwłaszcza możliwości monitorowania pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, pomiar stężenia wydzielanego FGF-2, ze względu na stosunkowo niską czułość i swoistość, nie został uznany za przydatny w praktyce klinicznej.

Rola FGF-5 przez długi czas pozostawała niejasna, nie licząc kontroli w cyklu wzrostu włosów [Suzuki 2000], jednak pojawiły się publikacje sugerujące, iż czynnik ten może pełnić podwójną rolę - zarówno stymulować komórki nowotworowe do proliferacji i migracji oraz hamować ich apoptozę, jak również pobudzać proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych [Hanada 2001]. Poza tym Allerstorfer i wsp. [2008] wykazali, iż wyższa ekspresja FGF-5 obserwowana w gwiazdziakach jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo, wskazując na wysoki potencjał onkogenny takich guzów.

Z uwagi na wysoką ekspresję w tkankach zarodkowych, stanowiącą ich swoisty marker [Pelton 2002], wydaje się, że białko FGF-5 mogłoby stać się przydatnym wskaźnikiem oceniającym odpowiedź na leczenie w onkologii dziecięcej. Jednak do tej pory poświęcono mu niewiele uwagi.

Obserwowana wyższa ekspresja genu *FGF-5* wśród pacjentów z nerczakiem zarodkowym w I-II stopniu zaawansowania klinicznego przed chemioterapią przedoperacyjną, wskazuje, iż u chorych, którzy zrealizowali już ten etap leczenia, odpowiedź na podane leki była zadowalająca i pozostało niewiele żywego utkania nowotworowego. Ciekawe mogłoby być sprawdzenie czy podobna zależność obserwowana byłaby także u pacjentów z tym nowotworem w wyższym stopniu zaawansowania, w zależności od etapu leczenia, co mogłoby być dowodem niedostatecznej odpowiedzi na cytostatyki.

W pracy wielokrotnie podkreślono kluczową rolę neoangiogenezy w procesie nowotworzenia. Oprócz opisanego powyżej FGF, w chwili obecnej dostępnych jest wiele doniesień dotyczących kluczowej roli VEGF w tym procesie koniecznym dla ekspansji choroby nowotworowej. Jak już wyżej wspomniano, ta glikoproteina posiada właściwości mitogenne, pobudzające wzrost komórek śródbłonna oraz przepuszczalność naczyń. Najlepiej zbadaną postacią jest VEGF-A, który działa poprzez dwa receptory należące do rodziny kinazy tyrozynowej: VEGFR-1/FLT1 oraz VEGFR-2/FLK-1. Ponadto receptor VEGFR-1 oddziałuje także z opisywanym już także PGF. Receptor FLT-1 (*fms-like tyrosine kinase*, FLT-1) występuje na komórkach śródbłonna oraz makrofagów i ma zdolność pobudzania migracji oraz różnicowania komórek [Charnock-Jones 2005]. Oprócz udziału w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, receptor ten jest konieczny do prawidłowego rozwoju poszczególnych narządów oraz regeneracji tkanek [Carmeliet 2003]. Jednakże sugeruje się, że receptor może być także obecny na niektórych komórkach nowotworowych a jego aktywacja powoduje ich pobudzenie proliferacji oraz inwazyjności, co znacząco pogarsza rokowanie [Wu 2006, Kowanetz 2006]. Z kolei nadal trwają intensywne badania wyjaśniające funkcję rozpuszczonej postaci receptora FLT-1 (*soluble VEGFR-1*, *sVEGFR-1* lub Salt-1). Niektórzy badacze wskazują, iż ze względu na swoją budowę receptor ten ma zdolność hamowania angiogenezy poprzez ograniczone łączenie się z VEGF zmniejszające dostępność tego białka [Baleron 2001]. Potwierdzają to wyniki obserwacji zarówno pacjentów z rakiem jelita grubego, u których stężenie sVEGFR-1 zależało od zajęcia węzłów chłonnych [Myśliwiec 2004], a także kobiet z rakiem piersi. Ponieważ sVEGFR-1 uważany jest raczej za inhibitor angiogenezy, obserwowane zjawisko „*up-regulation*” mogłoby wynikać ze zwiększenia masy guza w następstwie progresji choroby [Thielemann 2010].

Ghanem i wsp. [2003] w grupie 62 pacjentów z nerczakiem zarodkowym, w większości pośredniego ryzyka, ocenili ekspresję VEGF, FLT-1 oraz MVD, wykazując, że podwyższona ekspresja w tkance usuniętego guza poddanego wcześniej chemioterapii jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, wskazującym na znaczne ryzyko wznowy. Silna ekspresja wspomnianych markerów angiogenezy w usuniętym nowotworze była efektem przetrwania dużej komponenty blastemicznej, którą cechuje znaczny potencjał inwazyjny. W analizie

jednoczynnikowej potwierdzono, że ekspresja VEGF i FLT-1 w obrębie wspomnianego utkania łączyła się z progresją lub wznową choroby.

Uzyskane wyniki doktorantkę są spójne z opisanymi przez Ghanema i wsp, ponieważ on także wspomniał, że oceniając ekspresję w niewielkiej grupie pacjentów z nerczakiem zarodkowym, wykazano, że była ona odpowiednio wyższa ale nie wykazano bezpośredniego wpływu na pogorszenie rokowania tych chorych. Ponieważ zarówno pod względem rozkładu stopnia zaawansowania klinicznego jak i grupy ryzyka, porównywane grupy były dość podobne, obserwowana wyższa ekspresja wynikała z obecności żywego utkania nerczaka.

GATA6 jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny białek GATA zawierających domeny typu palec cynkowy klasy C2. Białka GATA1-3 obecne są głównie w komórkach hematopoetycznych, podczas gdy GATA4-6 w narządach pochodzenia mezodermalnego i mezenchymalnego (przewód pokarmowy, trzustka, płuca, serce, błona mięśniowa naczyń krwionośnych) [Molkentin 2000]. Co ciekawe zaobserwowano, że mutacja genu *GATA6* na wczesnym etapie rozwoju prowadzi do obumarcia zarodka, ze względu na nieprawidłowy rozwój narządów trzewnych [Koutsourakis 1999]. Białka GATA biorą udział w regulacji proliferacji komórek, ich apoptozie a w określonych sytuacjach także przekształceniu w komórki nowotworowe [Belaguli 2010].

GATA6 posiada także zdolność aktywowania genu *indian hedgehog (IHH)*, który bierze udział w organogenezie – stwierdzono jego pobudzenie w czasie prawidłowej morfogenezy jelit a zaburzenie w przypadku nowotworu tego odcinka przewodu pokarmowego [Fujikura 2002]. Podkreśla się jednak, że nadal rola genu *IHH* jest nie do końca zrozumiała, choć udział rodziny GATA w embriogenezie jest udowodniony [Duncan 2005].

Niedawno wykazano także, iż białko GATA6 odgrywa istotną rolę nie tylko w rozwoju trzustki ale może także promować powstanie nowotworu trzustki [Ketola 2004]. Białko to posiada zdolność zarówno hamowania jak i pobudzania nowotworzenia, co potwierdziły badania na wielu różnych nowotworach: w guzach jajnika [Capo-Chichi 2003] oraz gwiazdziakach [Kamnasaran 2007], gdzie gen ma funkcje supresorowe, podczas gdy w nowotworach przewodu pokarmowego silnie pobudza nowotworzenie [Haveri 2008]. Wykazano również wyższą ekspresję genu *GATA6* w przypadku metaplastji stwierdzanej w przełyku Baretta [Kimchi 2006] a także amplifikację genu w nowotworach trzustki i dróg żółciowych [Kwei 2008].

Wykazano także, iż ze względu na ekspresję m.in. w miocytach naczyń krwionośnych oraz komórkach mezangium, *GATA6* pełni ważną rolę w prawidłowym rozwoju kłębuszka naczyniowego w nerce, co może być przydatne w prawidłowym leczeniu kłębuszkowego zapalenia nerek z obecnością rozplemowych zmian mezangialnych [Nagata 2000].

Ekspresję *GATA6* badano także wśród dzieci z guzami zarodkowymi, stwierdzając jej podwyższenie u pacjentów z guzem typu „yolk sac tumour” a także niektórych

potworniakach. Z tego względu Siltanen i wsp. [2003] sugerowali by ocenę ekspresji *GATA6* włączyć do diagnostyki różnicowej guzów zarodkowych u dzieci.

Mimo, że brak jest badań dotyczących zależności między ekspresją *GATA6* a rozwojem nerczaka zarodkowego, biorąc pod uwagę fakt, iż białko to bierze aktywny udział w embriogenezie, istnieje prawdopodobieństwo, iż zaburzenia ekspresji genu mogą wpływać na nieprawidłowe dojrzewanie nerki, prowadząc do rozwoju nerczaka zarodkowego. Z tego względu uzyskany wynik wyższej ekspresji *GATA6* u pacjentów z nerczakiem zarodkowym przed podaniem chemioterapii przedoperacyjnej, skłania do kontynuacji tego oznaczenia u większej liczby pacjentów, w celu lepszego zrozumienia zaburzeń zachodzących w trakcie dojrzewania nerki.

Semaforyny są grupą 8 klas białek przezbłonowych regulujących neurogenezę poprzez m.in. ukierunkowanie wzrostu aksonów [Kolodkin 1993]. Niedawno dowiedziono także, iż biorą udział w angiogenezie, nowotworzeniu oraz regulacji układu odpornościowego [Capparuccia 2009]. Do swego prawidłowego działania białka te wymagają obecności receptorów przezbłonowych nazywanych pleksynami, jednak łączą się z nimi tylko w obecności koreceptorów – neuropiliny 1 (NP1) i 2 (NP2) [Capparuccia 2009]. Co ciekawe, neuropiliny wiążą się także z wybranymi białkami z rodziny VEGF, w tym VEGF₁₆₅, pośrednicząc w angiogenezie [Soker 2002]. Wspomniana izoforma VEGF ma zdolność zarówno pobudzania proliferacji śródbłonka naczyń, jak również zwiększania przepuszczalności obecnych już naczyń [Ostalska-Nowicka 2006].

Jedną z semaforyn jest SEMA3A, która oprócz wpływu na neurogenezę, w warunkach eksperymentalnych, ma także zdolność hamowania proliferacji niektórych nowotworów, regulacji tworzenia nowych naczyń krwionośnych w tkance mięśniowej oraz nowotworowej a także migracji i apoptozy komórek śródbłonka [Casazza 2011], jednak do swej aktywności koniecznie wymaga obecności NP1 [Neufeld 2005]. W modelu mysim wykazano, że zarówno systemowe, jak i miejscowe podanie SEMA3A wywołało zahamowanie wzrostu nowotworu, poprzez upośledzenie funkcji naczyń krwionośnych a także ograniczało zdolność tworzenia odległych przerzutów [Casazza 2011].

Należy podkreślić, że agresywność nowotworu nie wynika jedynie z gęstości naczyń krwionośnych w obrębie jego utkania ale głównie od tego czy są one „funkcjonalne” [Stockmann 2008]. Wcześniej wspomniano już, że neoangiogeneza w guzie znacząco różni się od prawidłowego procesu. Ze względu na ograniczoną ilość komórek ściennych w obrębie ściany naczyń, ułatwione jest tworzenie przerzutów jak również pogarszona jest perfuzja w guzie, co nasila martwicę i niedotlenienie, dodatkowo stymulując tworzenie nowych naczyń krwionośnych [Xian 2006].

Wykazano obecność SEMA3A oraz NP1 w rozwijającym się kłębuszku nerkowym a u dorosłych – w podocytach i cewkach zbiorczych [Villegas 2002], a niedawne badania wskazują, że białko SEMA3A pełni istotną rolę w tworzeniu prawidłowej bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego, a także bierze udział w hamowaniu przeżycia komórek śródbłonna oraz ich migracji podczas organogenezy, reguluje różnicowanie podocytów [Reidy 2009] a także przekształcenie pączka moczowodowego w moczowód [Reidy 2011]. Nadal trwają intensywne badania poszerzające tą wiedzę.

Mimo, że brak jest doniesień o bezpośrednim udziale *SEMA3A* w powstaniu nerczaka zarodkowego, bezsprzecznie białko to pełni istotną rolę w rozwoju nerki. Stąd też można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że z uwagi na zarodkowe pochodzenie guza Wilmsa, zaburzenie funkcjonowania semaforyn wpływa na rozwój tego nowotworu. Potwierdzić może to fakt, iż gen kodujący SEMA3A obecny był w utkaniu nerczaka zarodkowego analizowanej grupy pacjentów a stwierdzona różnica ekspresji wynikała z ilości żywej tkanki.

Ze względu na małą liczebność badanej grupy oraz jej znaczną heterogenność, z dużą ostrożnością starano się wyciągać wnioski z otrzymanych wyników, mając świadomość konieczności zweryfikowania dokonanych spostrzeżeń w większej grupie pacjentów i w czasie dłuższej trwającej obserwacji. Jednakże otrzymane wyniki wskazują na nowe ciekawe kierunki badań, które mogą przyczynić się do lepszego poznania zaburzeń spostrzeganych w nowotworzeniu, w tym także w nerczaku zarodkowym.

6. Wnioski

1. U dzieci z nerczakiem zarodkowym o tym samym typie budowy histologicznej i stopniu zaawansowania klinicznego stwierdza się znacznego stopnia zróżnicowanie ekspresji białek związanych z regulacją aktywności proliferacyjnej, cyklu komórkowego, odpowiedzi immunologicznej, apoptozy i angiogenezy oraz genów regulujących angiogenezę i embriogenezę, co świadczyć może o znacznym zróżnicowaniu biologicznym nerczaków u pacjentów zakwalifikowanych według obecnie obowiązujących kryteriów do tej samej grupy rokowniczej, w szczególności do grupy ryzyka pośredniego.
2. Podwyższona ekspresja białka Ki-67 w utkaniu nabłonkowym u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z nerczakiem zarodkowym w najwyższym stopniu zaawansowania klinicznego może świadczyć o obecności w tym elemencie guza przetrwałych chemoopornych komórek charakteryzujących się wysoką aktywnością proliferacyjną i stanowić czynnik niekorzystny rokowniczo.
3. Podwyższona ekspresja białka p27^{Kip1} w utkaniu zrębowym u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej, u których chorobę rozpoznano poniżej 4 roku życia może świadczyć o gorszym rokowaniu z powodu obecności utkania o złej odpowiedzi na chemioterapię, a w przyszłości może pozwolić na wyodrębnienie pacjentów wymagających zintensyfikowanego leczenia.
4. Podwyższona ekspresja białka p53 w utkaniu nabłonkowym nerczaka spostrzegana w przypadku wznowy, wiąże się z niekorzystnym rokowaniem i przebiegiem choroby.
5. Podwyższoną ekspresję hTERT stwierdzono w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego o niekorzystnej budowie histologicznej po chemioterapii przedoperacyjnej.
6. Wstępne wyniki badań molekularnych wskazują na istotne różnice ekspresji genów związanych z angiogenezą oraz ekspresji genów związanych z embriogenezą w zależności od stopnia zaawansowania nerczaka zarodkowego oraz etapu leczenia. Dla oceny znaczenia rokowniczego spostrzeganych różnic ekspresji badanych genów konieczne są dalsze badania i dalsza obserwacja kliniczna.

Streszczenie

Wstęp

Nerczak zarodkowy jest najczęstszym pierwotnym guzem nerki u dzieci i młodzieży, stanowiąc ok. 6-8% wszystkich chorób nowotworowych w tej grupie wiekowej. Dzięki kompleksowej terapii złożonej z leczenia operacyjnego, chemioterapii i radioterapii, udaje się wyleczyć około 85% pacjentów. Jednak u ok. 15% chorych dochodzi do wznowy procesu nowotworowego, w tym także u pacjentów zakwalifikowanych do grupy o korzystnym rokowaniu. Stąd nadal poszukuje się wskaźników prognostycznych, które pozwoliłyby jeszcze precyzyjniej niż obecnie ocenić rokowanie u chorego z nerczakiem zarodkowym, co pozwoliłoby na dalszą personalizację leczenia i poprawę wyników.

Cel

Celem pracy była ocena rokowniczego znaczenia ekspresji białek Ki-67 i p27^{Kip1}, białka supresorowego p53, białka błonowego CD274, aktywności ludzkiej telomerazowej odwrotnej transkryptazy (hTERT) oraz gęstości naczyń włosowatych (MVD) ocenianych metodą immunohistochemiczną a także oceny ekspresji genów związanych z modulowaniem procesu angiogenezy oraz różnicowaniem macierzystych komórek embrionalnych przy użyciu metody *real time*-PCR u dzieci z nerczakiem zarodkowym w pierwszej manifestacji choroby i we wznowie.

Pacjenci i metodyka pracy

Badaniem objęte zostały dzieci w wieku ≤ 18 lat z pierwszą manifestacją i ze wznową nerczaka zarodkowego leczone wg protokołu SIOP-2001 w latach 2002-11 w ośrodkach onkologii dziecięcej w Polsce. Grupa badana obejmowała 45 pacjentów (23 dziewczynek, 22 chłopców) w wieku 0,1-17,5 lat (mediana 3,2 lat) w momencie rozpoznania, których ze względu na stopień zaawansowania klinicznego zaliczono do stadium I: 10; II: 13; III: 16; IV: 5; V: 2 a na podstawie obrazu histopatologicznego: 4 pacjentów zakwalifikowano do grupy niskiego, 30 do pośredniego a 13 do wysokiego ryzyka. 6 pacjentów nie otrzymało chemioterapii przedoperacyjnej. Do progresji/wznowy choroby doszło u 5 pacjentów, II remisję uzyskało 2 pacjentów. Spośród wszystkich pacjentów przeżyło 41 dzieci (91%).

Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w materiale pobranym do rutynowych badań diagnostycznych z guza usuniętego podczas zabiegu operacyjnego. Badanie immunohistochemiczne wykonano przy użyciu systemu detekcyjnego Dako REALTM EnVisionTM, Peroxidase/DAB+. Ekspresja badanych białek oceniana była w trzech elementach składowych klasycznego utkania nerczaka zarodkowego (nabłonkowym,

zrębowym, blastemicznym) i analizowana z wykorzystaniem półilościowej skali IRS wg Remmele i Stegner. Natomiast badania *real-time PCR* wykonane zostały na macierzach płytkowych Human Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors PCR Array (PAHS-072A) oraz Human Embryonic Stem Cells PCR Array (PAHS-081A) firmy SABiosciences. Wyniki analizowano w programie Standard RT² PCR Array, granica istotności zmian wynosiła 3-krotną różnicę ekspresji ($p < 0,05$).

Wyniki

Metodą immunohistochemiczną u pacjentów poddanych chemioterapii przedoperacyjnej wykazano następujące zmiany ekspresji białek:

- podwyższoną ekspresję białka Ki-67 w utkaniu nabłonkowym u pacjentów z chorobą w IV stopniu zaawansowania klinicznego;
- podwyższoną ekspresję białka p27^{Kip1} w utkaniu zrębowym u pacjentów w wieku $< 4r\dot{z}$ a $> 2r\dot{z}$ w momencie rozpoznania;
- podwyższoną ekspresję białka p53 w utkaniu nabłonkowym w przypadku progresji/wznowy;
- brak różnic ekspresji białka CD274 w trzech elementach utkania nerczaka we wszystkich analizowanych zależnościach;
- podwyższoną ekspresję hTERT w utkaniu nabłonkowym u pacjentów w grupie wysokiego ryzyka;
- brak różnic ekspresji białka CD31 oraz wartości MVD we wszystkich analizowanych zależnościach.

Wyniki badań metodą *real time-PCR* wykazały, iż wśród genów związanych z angiogenezą stwierdzono różnice ekspresji genów w zależności od stopnia zaawansowania oraz etapu leczenia natomiast wśród genów związanych z embriogenezą stwierdzono różnice ekspresji genów w zależności od stopnia zaawansowania, grupy ryzyka oraz etapu leczenia.

Wnioski

1. U dzieci z nerczakiem zarodkowym o tym samym typie budowy histologicznej i stopniu zaawansowania klinicznego stwierdza się znaczne zróżnicowanie ekspresji białek związanych z regulacją aktywności proliferacyjnej, cyklu komórkowego, odpowiedzi immunologicznej, apoptozy i angiogenezy oraz genów regulujących angiogenezę i embriogenezę, co świadczyć może o znacznym zróżnicowaniu biologicznym nerczaków u pacjentów zakwalifikowanych według

obecnie obowiązujących kryteriów do tej samej grupy rokowniczej, w szczególności do grupy ryzyka pośredniego.

2. Podwyższona ekspresja białka Ki-67 w utkaniu nabłonkowym u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej z nerczakiem zarodkowym w najwyższym stopniu zaawansowania klinicznego może świadczyć o obecności w tym elemencie guza przetrwałych chemoopornych komórek charakteryzujących się wysoką aktywnością proliferacyjną i stanowić czynnik niekorzystny rokowniczo.
3. Podwyższona ekspresja białka p27^{Kip1} w utkaniu zrębowym u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej, u których chorobę rozpoznano poniżej 4 roku życia może świadczyć o gorszym rokowaniu z powodu obecności utkania o złej odpowiedzi na chemioterapię, a w przyszłości może pozwolić na wyodrębnienie pacjentów wymagających zintensyfikowanego leczenia.
4. Podwyższona ekspresja białka p53 w utkaniu nabłonkowym nerczaka spostrzegana w przypadku wznowy, wiąże się z niekorzystnym rokowaniem i przebiegiem choroby.
5. Podwyższoną ekspresję hTERT stwierdzono w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego o niekorzystnej budowie histologicznej po chemioterapii przedoperacyjnej.
6. Wstępne wyniki badań molekularnych wskazują na istotne różnice ekspresji genów związanych z angiogenezą oraz ekspresji genów związanych z embriogenezą w zależności od stopnia zaawansowania nerczaka zarodkowego oraz etapu leczenia. Dla oceny znaczenia rokowniczego spostrzeganych różnic ekspresji badanych genów konieczne są dalsze badania i dalsza obserwacja kliniczna.

Summary

Introduction

Nephroblastoma is the most common primary renal tumor in children - it occurs in 6-8% of all malignant diseases in this group of patients. Due to complex therapy consisting of surgery, chemotherapy and radiotherapy, curability rate is 85%. However in 15% patients relapse can occur, also in patients qualified, according to current clinical and pathological criteria, to group with favorable histology. An intermediate risk group patients is a very heterogeneous group and therefore more detailed qualification system would be needed to help in conducting more individualized therapy.

Purpose

The aim of this study was an analysis of prognostic usefulness of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), proliferation proteins Ki-67 and p27^{kip1}, suppressor protein p53, membrane protein CD274 expressions and microvascular density (MVD) in immunohistochemistry as well as an analysis of real time-PCR expression of an angiogenic growth factors and inhibitors genes and an embryonic stem cell-specific genes in nephroblastoma patients in order to find new prognostic parameters.

Patients and methods

Study was done in patients ≤ 18 years with first manifestation of nephroblastoma and in relapse treated according to protocol SIOP-2001 in departments of paediatric oncology in Poland during the period 2002-11. 45 patients (23 girls, 22 boys) median age 3,2 years at the diagnosis (range 0,1-17,5 years) were classified according to clinical stage (I-10, II-13, III-16, IV-5, V-2) and pathology (4-low, 30-intermediate, 13-high risk). 7 patients did not receive pre-operative chemotherapy. Relapse occurred in 5 patients, second remission was achieved in 2 patients; OS was 91% (41/45).

Immunohistochemical analysis was performed in Department of Histology and Embriology in samples from tumors removed surgically, with Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+. Expression was assessed in three components seen in classic untreated Wilms' tumour (blastemal, stromal, epithelial) and evaluated according to Remmele and Stegner immunoreactive score. Molecular analysis based on real time-PCR with Human Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors PCR Array (PAHS-072A) and Human Embryonic Stem Cells PCR Array (PAHS-081A) SABiosciences was performed. Results were analyzed with RT² ProfilerTM PCR Array. Treshold of 3-fold change in expression was determined as significant ($p < 0,05$).

Results

Immunohistochemistry performed in patients after preoperative chemotherapy has shown following changes in protein expressions:

- increased expression of Ki-67 in epithelial component in stage IV patients;
- increased expression of p27^{Kip1} in stromal compartment in patients <4-years old at the moment of diagnosis;
- increased expression of p53 in epithelial component in relapse;
- no differences in expression of CD274 in three compartments of nephroblastoma;
- increased expression of hTERT in epithelial compartment in high risk patients;
- no differences in expression of CD31 and MVD in analyzed comparisons.

In real time-PCR differences in expressions of genes involved into angiogenesis depending on clinical stage and phase of treatment as well as expression differences of genes involved into embryogenesis depending on clinical stage, risk group and phase of treatment were found.

Conclusions

1. In patients with nephroblastoma in the same clinical stage and pathology, significant differences in an expression of proteins involved in proliferation regulation, cell cycle, immunological response, apoptosis and angiogenesis as well as in expression of genes involved in angiogenesis and embryogenesis were found, being the proof of significant biological differentiation of nephroblastoma among patients qualified to the same prognosis group according to current criteria, especially into intermediate risk group.
2. An increased expression of Ki-67 in epithelial component in patients after preoperative chemotherapy, in clinical stage IV can be an evidence of presence of persisting chemo-resistant cells with high proliferative index and can be a factor of bad prognosis.
3. An increased expression of p27^{Kip1} in stromal compartment in patients after preoperative chemotherapy, < 4-years old at the moment of diagnosis can be an evidence of separate group of patients with worse prognosis due to presence of compartment with bad response to chemotherapy.
4. An increased expression of p53 in epithelial component in patients after preoperative chemotherapy with relapse can be an evidence of bad prognosis and course of nephroblastoma.
5. An increased expression of hTERT can be seen in epithelial component in high risk patients after preoperative chemotherapy.

6. Preliminary molecular results have shown significant differences of genes involved in angiogenesis and embryogenesis, depending on clinical stage and phase of treatment. To assess prognostic usefulness of these changes in expression, further study and follow-up are needed.

Piśmiennictwo

1. Abramson L.P., Grundy P.E., Rademaker A.W. i wsp. Increased microvascular density predicts relapse in Wilms' tumor. *J. Pediatr. Surg.*, 2003, 3, 325-30
2. Abu-Ghosh A.M., Krailo M.D., Goldman S.C i wsp. Ifosfamide, carboplatin and etoposide in children with poor-risk relapsed Wilms' tumour: a Children's Cancer Group report. *Ann. Oncol.*, 2002, 13, 460-69
3. Achen M.G., Gad J.M., Stacker S.A. i wsp. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors*, 1997, 15, 69–80
4. Adamkiewicz-Drożyńska E., Balcerska A., Iżycka-Świeszewska E. Historia leczenia nowotworów wieku dziecięcego. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2009, 3, 64-70
5. Adamkiewicz-Drożyńska E., Balcerska A., Stefanowicz J. i wsp. Wczoraj, dziś i jutro terapii antyangiogennej. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 2008, 12, 995-1000
6. Agarwal S., Iyer V.K., Agarwala S. i wsp. Apoptotic protein expression in favorable-histology Wilms tumor correlates with tumor recurrence. *Pediatr. Surg. Int.*, 2011, 27, 303-08
7. Alami J., Williams B.R.G., Yeager H. i wsp. Expression and localization of HGF and met in Wilms' tumours. *J. Pathol.*, 2002, 196, 76–84
8. Allerstorfer S., Sonvilla G., Fischer H. i wsp. FGF5 as an oncogenic factor in human glioblastoma multiforme: autocrine and paracrine activities. *Oncogene*. 2008, 27, 4180-90
9. Ara T., DeClerck Y.A., Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur. J. Cancer*, 2010, 46, 1223–31
10. Ara T., Song L., Shimada H. i wsp. Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 2009, 69, 329–37
11. Aragona M., Pontoriero A., Panetta S. i wsp. The role of telomere-binding proteins in carcinogenesis. *Minerva Med.*, 2000, 91, 299–304
12. Asahara T, Takahashi T, Masuda H i wsp. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999; 18: 3964-72
13. Autiero M., Lutun A., Tjwa M. i wsp. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1, 1356-70
14. Baker E., Stephenson T., Reed M. i wsp. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 2002, 55, 300-04
15. Baniwal S.K., Khalid O., Gabet Y. i wsp. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Mol. Cancer*, 2010, 9, 258
16. Bardeesy N., Beckwith J.B., Pelletier J. i wsp. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations. *Cancer Res.*, 1995, 55, 215–19
17. Barleon B., Reusch P., Totzke F. i wsp. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis*, 2001, 4, 143-54
18. Barroca H. Nephroblastoma is a success of paediatric oncologic therapy. How further can we go?: Results of a cyto-histologic correlation study. *Diagn Cytopathol.*, 2010, 38, 477-81
19. Bates C.M. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Pediatr. Nephrol.*, 2007, 22, 343–49
20. Bates C.M. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Pediatr. Nephrol.*, 2011, 26, 1373-79

21. Beckwith J.B. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. w: Bergsma D., McKusick V.A., Hall J.G., Scott C.I. (red). Birth defects: original article series, New York, Stratton Intercontinental, 1969, 188–96
22. Beckwith J.B., Kiviat N.B., Bonadio J.F. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumour. *Pediatr. Pathol.*, 1990, 10, 1–36
23. Beckwith J.B. New developments in the pathology of Wilms' tumor. *Cancer Invest*, 1997, 15, 153–162
24. Beckwith J.B. Nephrogenic rest, and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am. J. Med. Genet*, 1998, 79, 268-73
25. Bednenko J., Melek M., Greene EC. i wsp. Developmentally regulated initiation of DNA synthesis by telomerase: Evidence for factor-assisted de novo telomere formation. *EMBO J*, 1997, 16, 2507-18
26. Belaguli N.S., Aftab M., Rigi M. i wsp. GATA6 promotes colon cancer cell invasion by regulating urokinase plasminogen activator gene expression. *Neoplasia* 2010, 12, 856-65
27. Berrebi D., Leclerc J., Schleiermacher G. i wsp. High cyclin E staining index in blastemal, stromal or epithelial cells is correlated with tumor aggressiveness in patients with nephroblastoma. *PLoS One*, 2008, 3, e2216
28. Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E. i wsp. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4, 915-25
29. Blood C.H., Zetter B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1032, 89-118
30. Borriello A., Bencivenga D., Criscuolo M. i wsp. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2011, 15, 677-93
31. Bowles D.W., Weickhardt A.J., Doebele R.C. i wsp. Crizotinib for the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Drugs Today*, 2012, 48, 271-82
32. Bown N., Cotterill S.J., Roberts P. i wsp. Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2002, 38, 11-21
33. Breslow N.E., Palmer N.F., Hill L.R., i wsp. Wilms' tumor: Prognostic factors for patients without metastases at diagnosis. Results of the National Wilms' Tumor Study. *Cancer*, 1978, 41, 1577–89
34. Brinkschmidt C., Poremba C., Christiansen H. i wsp. Comparative genomic hybridization and telomerase activity analysis identify two biologically different groups of 4S neuroblastomas. *Br J Cancer*, 1998, 77, 2223–29
35. Brown D.C., Gatter K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 1990, 17, 489-503
36. Brown J.A., Dorfman D.M., Ma F.R. i wsp. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.*, 2003, 170, 1257–66
37. Bruey J.M., Kantarjian H., Estrov Z. i wsp. Circulating Ki-67 protein in plasma as a biomarker and prognostic indicator of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 2010, 34, 173-76
38. Campbell A.D. Cohn S.L., Reynolds M. i wsp. Treatment of relapsed Wilms' tumor with high dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell rescue: the experience at Children's Memorial Hospital. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22, 2885-90
39. Cao Y., Cao R., Hedlund E.M. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J. Mol. Med.*, 2008, 86, 785-89
40. Capo-Chichi C.D., Roland I.H., Vanderveer L. i wsp. Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. *Cancer Res.*, 2003, 63, 4967–77
41. Capparuccia L., Tamagnone L., Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment: two sides of a coin. *J. Cell Sci.* 2009, 122, 1723–36

42. Carmeliet P., Jain R.K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407, 249–57
43. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-60
44. Casazza A., Fu X., Johansson I. i wsp. Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, 31, 741-49
45. Chan S.R., Blackburn E.H. Telomeres and telomerase. *B Biol. Sci.*, 2004, 359, 109–21
46. Charnock-Jones D.S., Vascular endothelial growth factors (VEGFS), their receptors and their inhibition. *Cell Transmissions. SIGMA*, 2005, 21, 2-6
47. Chu I.M., Hengst L., Slingerland J.M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8, 253-67
48. Cohen M.M., Neri G., Weksberg R. Overgrowth syndromes. w: Beckwith- Wiedemann syndrome. M.M. Cohen, G. Neri, R. Weksberg (red.), Oxford University Press, London, 2002, 18-26
49. Culig Z., Steiner H., Bartsch G., Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J. Cell Biochem.*, 2005, 95, 497-505
50. Damodharan U., Ganesan R., Radhakrishnan U.C., Expression of MMP2 and MMP9 (gelatinases A and B) in human colon cancer cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011, 165, 1245-52
51. D'Angio G.J., Evans A.E., Breslow N. i wsp. The treatment of Wilms' tumor: Results of the national Wilms' tumor study. *Cancer*, 1976, 38 633-46
52. de Kraker J., Graf N. van Tinteren H. i wsp. Reduction of postoperative chemotherapy in children with stage I intermediate-risk and anaplastic Wilms' tumour (SIOP 93-01 trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2004, 364, 1229-35
53. DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M. i wsp. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1997, 151, 671-77
54. DePrimo S.E., Bello C.L., Smeraglia J. i wsp. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J. Transl. Med.*, 2007, 5, 32–43
55. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku. Centrum Instytut Onkologii, Warszawa, 2011, 16-18
56. Dimitriu C., Martignoni M.E., Bachmann J., Clinical impact of cachexia on survival and outcome of cancer patients. *Rom. J. Intern. Med.*, 2005, 43, 173-85
57. Diniz G., Aktas S., Turedi A. i wsp. Telomerase reverse transcriptase catalytic subunit expression and proliferation index in Wilms tumor. *Tumor Biol.*, 2011, 32, 761-67
58. Doll D., Keller L., Maak M. i wsp. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int. J. Colorectal. Dis* 2010, 25,573-81
59. Dome J.S., Liu T, Krasin M i wsp. Improved survival for patients with recurrent Wilms' tumour: the experience at St Jude Children's research hospital. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2002, 24, 192–98
60. Dome J.S., Bockhold C.A., Li S.M. i wsp. High Telomerase RNA Expression Level Is an Adverse Prognostic Factor for Favorable-HistologyWilms' Tumor. *Clin. Oncol.*, 2005, 23, 9138-45
61. Dome J.S., Chung S., Bergemann T. i wsp. High Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Messenger RNA Level Correlates with Tumor Recurrence in Patients with Favorable Histology Wilms' Tumor. *Cancer Research*, 1999, 59, 4301–07
62. Dome J.S., Cotton C.A., Perlman E.J. i wsp. Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study. *J. Clin. Oncol.*,2006, 24, 2352-58
63. Dong H., Strome S.E., Salomao D.R. i wsp. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, 2002, 8, 793–800

64. Dong H., Zhu G., Tamada K. i wsp. B7-1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.*, 1999, 5, 1365–69
65. Dong Q.M., Zhang J.Q., Li Q. i wsp. Clinical significance of serum expression of GRO β in esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2011, 17, 2658-62
66. Duncan S.A., Generation of embryos directly from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation reveals a role for GATA factors in organogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 2005, 33, 1534-36
67. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 1986; 315, 1650–59
68. Ebos J.M., Kerbel R.S., Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011, 8, 210–21
69. Ebos J.M.L., Lee C.R., Christensen J.G. i wsp. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc. Natl. Assoc. Sci.*, 2007, 104, 17069–74
70. El-Deiry W.S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.*, 1998, 8, 345–57
71. Esfandi F., Mohammadzadeh Ghobadloo S., Basati G., Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett.*, 2006, 244, 76-78
72. Fernando N.T., Koch M., Rothrock C. i wsp. Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 1529–39
73. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J., The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, 9, 669-76
74. Fisher C., Jonckx B., Mazzone M. i wsp. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor - resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.*, 2007, 131, 463–75
75. Flies D.B. Blockade of B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J. Biol. Med.*, 2011, 84, 409-411
76. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.*, 1992, 3, 65-71
77. Folkman J., Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res.*, 2006, 312, 594–607
78. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y. i wsp. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, 2000, 192, 1027–34
79. Frischer J.S., Huang J., Serur A. i wsp. Effects of potent VEGF blockade on experimental Wilms tumor and its persisting vasculature. *Int. J. Oncol.*, 2004, 25, 549-53
80. Fujikura J., Yamato E., Yonemura S. i wsp. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* 2002,1:784-9.
81. Ghanem M.A., van der Kwast T.H., Molenaar W.M. i wsp. The predictive value of immunohistochemical markers in untreated Wilms' tumour: are they useful? *World J. Urol.*, 2011, 5
82. Ghanem M.A., Van der Kwast T.H., Sudaryo M.K. i wsp. MIB-1 (KI-67) proliferation index and cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 protein expression in nephroblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 1, 591–97
83. Ghanem M.A., van Steenbrugge G.J., Sudaryo M.K. i wsp. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J. Clin. Pathol.* 2003, 56, 107-13
84. Godziński J. Nephroblastoma. w: Zachariou Z. (red.) *Pediatric Surgery Digest*, 2008, 579-591
85. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. *Cytokiny. Immunologia. Warszawa, Wyd. Nauk. PWN*, 2002, 15, 198-205
86. Graf N., Semler O., Reinhard H. Prognosis of Wilm's tumor in the course of the SIOP trials and studies. *Urologe A.*, 2004, 43, 421-28

87. Green D.M., Breslow N.E., Beckwith J.B. i wsp. Treatment outcomes in patients less than 2 years of age with small, stage I, favorable-histology Wilms tumors: a report from the National Wilms Tumor Study. *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11, 91–95
88. Green D.M., Breslow N.E., Beckwith J.B. i wsp. Comparison between single-dose and divided-dose administration of dactinomycin and doxorubicin for patients with Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 1998, 16, 237-245
89. Green D.M., Breslow N.E., Beckwith J.B. et al Treatment with nephrectomy only for small, stage I/favorable histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19, 3719–24
90. Green D.M. The treatment of stages I-IV favorable histology Wilms' tumor. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22, 1366-72
91. Grose R., Dickson C., Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, 16, 179-186
92. Grundy P.E., Breslow N.E., Li S. i wsp. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23, 7312-7321
93. Gupta M.K., Qin R.Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2003, 9, 1144-55
94. Gurney J.G., Bondy M.L. Epidemiology of childhood cancer. w: Pizzo P.A., Poplack D.G. (red.) Principles and Practice of Pediatric Oncology. 5th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 3-13
95. Hamad N.M., Banik S.S., Counter C.M. Mutational analysis defines a minimum level of telomerase activity required for tumourigenic growth of human cells. *Oncogene* 2002, 21, 7121-7125
96. Hamano Y., Kalluri R., Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 333, 292–298
97. Han J., Ohno N., Pasco S. i wsp. A cell binding domain from the alpha3 chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272 20395-20401
98. Hanada K., Perry-Lalley D.M., Ohnmacht G.A. i wsp. Identification of fibroblast growth factor-5 as an overexpressed antigen in multiple human adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2001, 61, 5511-5516
99. Haugsten E.M., Wiedlocha A., Olsnes S. i wsp. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.*, 2010, 8, 1439-1452
100. Haveri H., Westerholm-Ormio M., Lindfors K. i wsp. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol.* 2008, 8, 9
101. Heidet L., Cohen-Solal L., Boye E. i wsp. Novel COL4A5/COL4A6 deletions and further characterization of the diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome (DL-AS) locus define the DL critical region. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, 78, 240–246
102. Hirano F., Haneko K., Tamura H. i wsp. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity; *Cancer Res.*, 2005, 65, 1089-1096
103. Hiyama E., Hiyama K., Ohtsu K. i wsp. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur. J. Cancer*, 1997, 33, 1932–1936
104. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T. i wsp. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia*, 2001, 3, 17-26
105. Hiyama E., Yamaoka H., Matsunaga T. et al: High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer*, 2004, 91, 972-979
106. Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., i wsp. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 3551–3555

107. Huang C.C., Cutcliffe C., Coffin C. i wsp. Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. Classification of malignant pediatric renal tumors by gene expression. *Pediatr Blood Cancer* 2006,46,728-38
108. Huang J., Soffer S.Z., Kim E.S. i wsp. p53 accumulation in favorable histology Wilms' tumor to be associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. *J. Pediatr. Surg.*, 2002, 37, 523–527
109. Huang C.C., Gadd S., Breslow N. Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 1770-1778
110. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y. i wsp. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99,12293-12297
111. Jadali F., Sayadpour D., Rakhshan M. i wsp. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic factor in Wilms tumor. *Iran J. Kidney Dis.*, 2011, 5, 149-153
112. Jereb B., Tournade M.F., Lemerle J. i wsp. Lymph node invasion and prognosis in nephroblastoma. *Cancer*, 1980, 45, 1632–1636
113. John P.C., Mews M., Moore R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma*, 2001, 216, 119-142
114. Jurić I., Pogorelić Z., Kuzmić-Prusac I. i wsp. Expression and prognostic value of the Ki-67 in Wilms' tumor: experience with 48 cases. *Pediatr. Surg. Int.*, 2010, 26, 487-493
115. Kalapurakal J.A., Dome J.S., Perlman E.J. i wsp. Management of Wilms' tumor: current practice and future goals. *Lancet Oncol.*, 2004, 5, 37-46.
116. Kalluri R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.*, 2003, 3, 422-433
117. Kamnarsan D., Qian B., Hawkins C. i wsp. GATA6 is an astrocytoma tumor suppressor gene identified by gene trapping of mouse glioma model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104, 8053–8058
118. Kaste S.C., Dome J.S., Babyn P.S. i wsp. Wilms tumour: prognostic factors, staging, therapy and late effects. *Pediatr. Radiol.*, 2008, 38, 2-17
119. Kazanowska B., Mikołajewska A., Reich A. i wsp. Telomery i aktywność telomerazy w komórkach prawidłowych oraz w komórkach nowotworowych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003, 12, 87–95
120. Ketola I., Otonkoski T., Pulkkinen M.A. i wsp. Transcription factor GATA-6 is expressed in the endocrine and GATA-4 in the exocrine pancreas. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2004, 226, 51-57
121. Khaliq A., Li X.F., Shams M. i wsp. Localisation of placenta growth factor (PIGF) in human term placenta. *Growth Factors*, 1996, 13, 243–250
122. Khor L.Y., Bae K., Paulus R. i wsp. MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02. *J. Clin. Oncol.*,2009, 27, 3177-84
123. Kim K.J., Li B., Winer J. i wsp. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*, 1993, 362, 841-844
124. Kimchi E.T., Posner M.C., Park J.O. i wsp. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer Res.*, 2005, 65, 3146–3154
125. Kitanovski L., Jazbec J., Hojker S., Diagnostic accuracy of procalcitonin and interleukin-6 values for predicting bacteremia and clinical sepsis in febrile neutropenic children with cancer. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, 25, 413–415
126. Klamt B., Schulze M., Thate C. i wsp. Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, 22, 287-294

127. Klimek I., Kulig A., Kałużński A., Choroba cienkich błon podstawnych – podłoże genetyczne, obraz morfologiczny i kliniczny. *Przegląd Pediatryczny*, 2006, 36, 70-75
128. Kolodkin A.L., Matthes D.J., Goodman C.S., The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. 1993, 75, 1389–1399
129. Konstantina A., Lazaris A.C., Ioannidis E. i wsp. Immunohistochemical expression of VEGF, HIF1-a, and PIGF in malignant melanomas and dysplastic nevi. *Melanoma Research*, 2011, 21, 389–394
130. Korc M., Friesel R.E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2009, 9, 639-651
131. Korpelainen E.L., Alitalo K., Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10, 159-164
132. Koutsourakis M., Langeveld A., Patient R., The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*, 1999, 126, 723–732
133. Kovacs E., Multiple myeloma and B cell lymphoma. Investigation of IL-6, IL-6 receptor antagonist (IL-6RA), and GP130 antagonist (GP130A) using various parameters in an in vitro model. *Scientific World Journal.*, 2006, 6, 888-898
134. Kowalczyk J. Epidemiologia nowotworów złośliwych u dzieci. w: Chybicka A., Sawicz-Birkowska K. (red.). *Onkologia i hematologia dziecięca*. PZWL, Warszawa, 2008, 3-7
135. Kowanetz M., Ferrara N., Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 5018–5022
136. Krambeck AE, Dong H., Thompson RH i wsp. Survivin and B7-H1 Are Collaborative Predictors of Survival and Represent Potential Therapeutic Targets for Patients with Renal Cell Carcinoma; *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13, 1749-1756
137. Krams M., Hero B., Berthold F. i wsp. Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.*, 2003, 162, 1019-1026
138. Krawczuk-Rybak M., Kuźmicz M., Mroczo B. i wsp. Plasma matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Pol. Merkur Lekarski*, 2010, 29, 14-18
139. Kullendorff C.M., Soller M., Wiebe T. i wsp. Cytogenetic findings and clinical course in a consecutive series of Wilms tumors. *Cancer Gene Cytogenet.*, 2003, 140, 82-87
140. Kuzu I., Bicknell R., Harris A.L. i wsp. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.*, 1992, 45, 143–148
141. Kwei K.A., Bashyam M.D., Kao J. i wsp. Genomic profiling identifies *GATA6* as a candidate oncogene amplified in pancreatobiliary cancer. *PLoS Genet.* 2008, 4, e1000081.
142. Lambert E., Dassé E., Haye B. i wsp. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004, 49, 187-98
143. Larrea M.D., Wander S.A., Slingerland J.M. p27 as Jekyll and Hyde Regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle*, 2009, 8, 3455-3461
144. Latchman Y., Wood C.R., Chernova T. i wsp. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*, 2002, 2, 261–268
145. Latchman Y.E., Liang S.C., Wu Y. i wsp. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101, 10691-6
146. Lee J., Kim S.S. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp. Mol. Med.*, 2009, 41, 765-771
147. Lee J., Seo J.W., Jun H.J. i wsp. Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol. Rep.*, 2011, 25, 1517-1524

148. Lemerle J., Voûte P.A., Tournade M.F., i wsp. Preoperative versus postoperative radiotherapy, single versus multiple courses of actinomycin D, in the treatment of Wilms' tumor. Preliminary results of a controlled clinical trial conducted by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). *Cancer*, 1976, 38, 647-54
149. Li R.Y., Argenta P.A., Sullivan K.M. i wsp. Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, 327-331
150. Li W., Kessler P., Yeger H. i wsp. A gene expression signature for relapse of primary Wilms tumors. *Cancer Res.*, 2005, 65, 2592–2601
151. Li Y., Lal B., Kwon S. i wsp. The Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor: c-Met pathway in human embryonal central nervous system tumor malignancy. *Cancer Res.*, 2005, 65, 9355-9362
152. Loda M., Cukor B., Tam S.W. i wsp. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat. Med.*, 1997, 3, 231-234
153. Loges S., Schmidt T., Carmeliet P., "Antimyoangiogenic" therapy for cancer by inhibiting PlGF. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 3648–3653
154. Luan J., Shattuck-Brandt R., Haghnegahdar H. i wsp. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, 62, 588–597
155. Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitowski M., Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2007, 117, 247-251
156. Łukaszewicz-Zajac M., Mroczko B., Szmitowski M., Znaczenie metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w raku żołądka. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009, 63, 258-265
157. Maglione D., Guerriero V., Viglietto G. i wsp. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*, 1993, 8, 925–993
158. Marciniak P., Wachowiak J. Nerczak zarodkowy u dzieci i młodzieży – czynniki prognostyczne w pierwszej manifestacji guza oraz we wznowie. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 2009, 12 59-65
159. Molkenin J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 38949-38952
160. Muller W.A. CD31 workshop panel report. w: Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A.E.G., Goyert S.M., Mason D.Y., Miyasaka M. (red.) *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference 1996*, 362–364.
161. Myśliwiec P., Pitorowski Z., Zalewski B. i wsp. Plasma VEGF-A and its soluble receptor R1 correlate with the clinical stage of colorectal cancer. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 2004, 49, 95-87
162. Nagata D., Suzuki E., Nishimatsu H. i wsp. Cyclin A downregulation and p21(cip1) upregulation correlate with GATA-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells. *Circ. Res.*, 2000, 87, 699-704
163. Nakamura Y., Niki T., Goto A. i wsp. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci.*, 2007, 98, 1006-1013
164. Natrajan R., Williams R.D., Hing S.N. i wsp. Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J. Pathol.*, 2006, 210, 49-58
165. Neri A., Megha T., Bettarini F. i wsp. Is tissue inhibitor of metalloproteinase-1 a new prognosticator for breast cancer? An analysis of 266 cases. *Hum. Pathol.*, 2012. Ahead to print
166. Neufeld G., Shraga-Heled N., Lange T. i wsp. Semaphorins in cancer. *Front Biosci.* 2005, 10, 751–760
167. Nisijimura R., Osako T., Okumara Y. i wsp. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J. Surg. Oncol.*, 2011, 9, 131

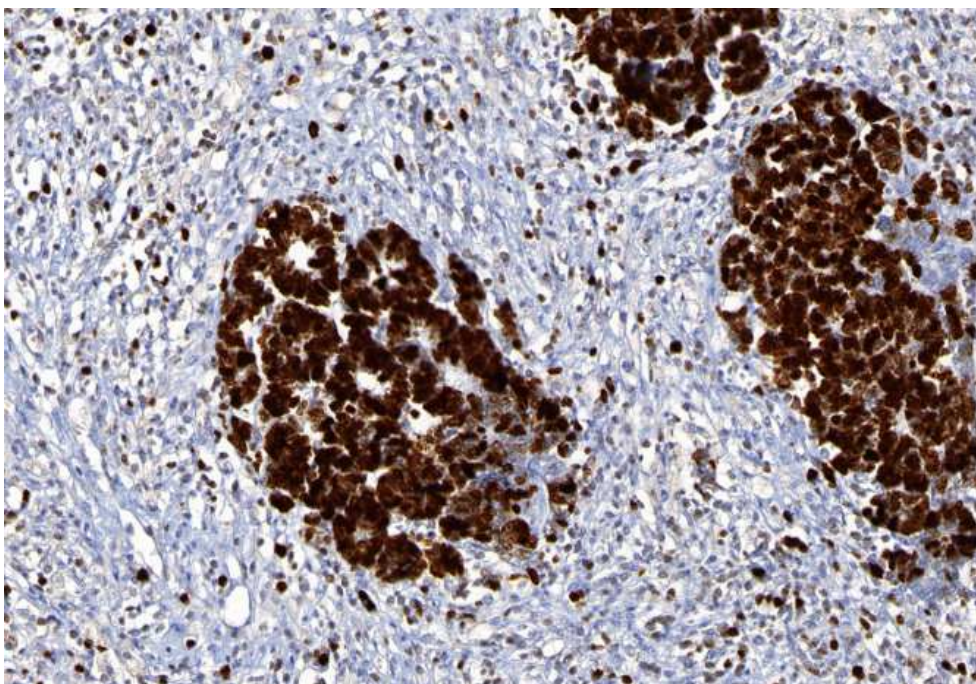
168. Norrby K., Basic fibroblast growth factor and de novo mammalian angiogenesis. *Microvasc. Res.*, 1994, 48, 96-113
169. Nowicki M., Ostalska-Nowicka D., Zachwieja J. i wsp. Wilms tumor as a novel model of angiogenesis in childhood nephropathies. *Przegl. Lek.*, 2006, 63, 87-89
170. Nowicki M., Ostalska-Nowicka D., Kaczmarek M. i wsp. The significance of VEGF-C/VEGFR-2 interaction in the neovascularization and prognosis of nephroblastoma (Wilms' tumour). *Histopathology*, 2007, 50, 358-64
171. Ora I., van Tinteren H., Bergeron C. i wsp. Progression of localised Wilms' tumour during preoperative chemotherapy is an independent prognostic factor: a report from the SIOP 93-01 nephroblastoma trial and study. *Eur. J. Cancer.*, 2007, 43, 131-136
172. Osato M., Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*, 2004, 23, 4284-4296
173. Oshimo Y., Oue N., Mitani Y. i wsp. Frequent loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Pathobiology*, 2004, 71, 137-143
174. Ostalska-Nowicka D., Zachwieja J., Nowicki M. i wsp. Prawdopodobnie parakrynowe oddziaływanie śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń krwionośnych na wzrost przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych w zespole nerczycowym u dzieci. *Przegląd Pediatryczny*, 2006, 36, 210-214
175. Owoc-Lempach J., Chybicka A. Znaczenie angiogenezy w nowotworach występujących w populacji dziecięcej, *Onkologia Polska*, 2006, 9, 87-92
176. Ozluk Y., Kilicaslan I., Gulluoglu M.G. i wsp. The prognostic significance of angiogenesis and the effect of vascular endothelial growth factor on angiogenic process in Wilms' tumour. *Pathology*, 2006, 38, 408-414
177. Paez-Ribes M., Allen E., Hudock J. i wsp. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 2009, 15, 220-231
178. Paul-Pletzer K., Tocilizumab: blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. *Drugs Today* 2006, 42. 559-576.
179. Pedersen L.M., Klausen T.W., Davidsen U.H. i wsp. Early changes in serum IL-6 and VEGF levels predict clinical outcome following first-line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Hematol.*, 2005, 84, 510-516
180. Pelton T.A., Sharma S., Schulz T.C. i wsp. Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J. Cell. Sci.* 2002, 115, 329-339
181. Persico M.G., Vincenti V., Di Palma T., Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 1999, 237, 31-40
182. Powers C.J., McLeskey S.W., Wellstein A., Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer*, 2000, 7, 165-197
183. Pratap J., Lian J.B., Stein G.S., Metastatic bone disease: role of transcription factors and future targets. *Bone*. 2011, 48, 30-36
184. Proudfoot A.E.I., Chemokine receptors: multifaced therapeutic targets. *Nature Rev Immunol.*, 2002, 2, 106-115
185. Reidy K.J., Villegas G., Teichman J. i wsp. Semaphorin3a regulates endothelial cell number and podocyte differentiation during glomerular development. *Development*. 2009, 136, 3979-3989
186. Reidy K., Tufro A., Semaphorins in kidney development and disease: modulators of ureteric bud branching, vascular morphogenesis, and podocyte-endothelial crosstalk. *Pediatr. Nephrol.*, 2011, 26, 1407-1412
187. Reinhard H., Semler O., Bürger D. i wsp. Results of the SIOP 93-01/GPOH trial and study for the treatment of patients with unilateral nonmetastatic Wilms Tumor. *Klin. Padiatr.*, 2004, 216, 132-140
188. Reinhard H., Schmidt A, Furtwangler R. i wsp. Outcome of relapse of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. *Oncology Reports*, 2008, 20, 463-467

189. Remmele W., Stegner H.E., Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunoreaktiven score (IRS) für den Immunohistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammikarzinomgewebe. *Patologie*, 1987, 8, 138-140
190. Ribatti D., The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 2008, 11(3), 215-221. Epub 2008 Jun 21
191. Routh J., Ashley RA, Sebo TJ i wsp. B7-H1 Expression in Wilms Tumor: Correlation With Tumor Biology and Disease Recurrence; *J. Uro.*, 2008, 179, 1954-1960
192. Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo. J.*, 1998, 17, 3005-3015
193. Sacewicz I., Wiktorska M., Wysocki T. i wsp. Mechanizmy angiogenezy nowotworowej. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009, 63, 159-168
194. Sanders R.P., Drissi R., Billups C.A. i wsp. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22, 3790-3797
195. Sawicz-Birkowska K. Nerczak płodowy u dzieci (guz Wilmsa, nephroblastoma). *Nowotwory wieku dziecięcego. Onkol. Prakt. Klin.*, 2007; 3, 673-679
196. Sawicz-Birkowska K. Nowotwory nerek. w: Chylicka A., Sawicz-Birkowska K. (red.). *Onkologia i hematologia dziecięca*. PZWL, Warszawa, 2008, 375–393
197. Sawicz-Birkowska K. Nerczak płodowy u dzieci (guz Wilmsa, nephroblastoma). w: *Zalecenia postępowania diagnostyczno–terapeutycznego w nowotworach złośliwych*. *Via Medica*, 2009, 711-718
198. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.*, 2000, 182, 311-22
199. Scrideli C.A., Cortez M.A., Yunes J.A. i wsp. mRNA expression of matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) 1 and 2 in childhood acute lymphoblastic leukemia: potential role of TIMP1 as an adverse prognostic factor. *Leuk. Res.*, 2010. 34, 32-37.
200. Senzer N., Nemunaitis J., Nemunaitis M. i wsp. p53 therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6, 1478–1482
201. Shay J.W., Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 1997, 33, 787-791
202. Sietta R.J., Tsao M.S., c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2011, 3, 21-35
203. Siltanen S., Heikkilä P., Bielinska M. i wsp. Transcription factor GATA-6 is expressed in malignant endoderm of pediatric yolk sac tumors and in teratomas. *Pediatr. Res.*, 2003, 54, 542-546
204. Sionov R.V., Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death, *Oncogene*, 1999, 18, 6145-6157
205. Skotnicka-Klonowicz G., Kobos J., Łoś E. i wsp. Prognostic value of p53 expression in Wilms' tumor in children. *Med. Sci. Monit.*, 2001, 7, 1224-1229
206. Soker S., Miao H.Q., Nomi M. i wsp. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* 2002, 85, 357–368
207. Spreafico F., Bellani F.F. Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 2006, 6, 249-258
208. Spreafico F., Bisogno G., Collini P. i wsp. Treatment of high-risk relapsed Wilms tumor with dose-intensive chemotherapy, marrow-ablative chemotherapy, and autologous hematopoietic stem cell support: experience by the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *Pediatr. Blood Cancer.*, 2008, 51, 23-28
209. Spreafico F., Pritchard-Jones K., Bergeron C. i wsp. Value and difficulties of a common European strategy for recurrent Wilms' tumor. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 2009, 9, 693-696

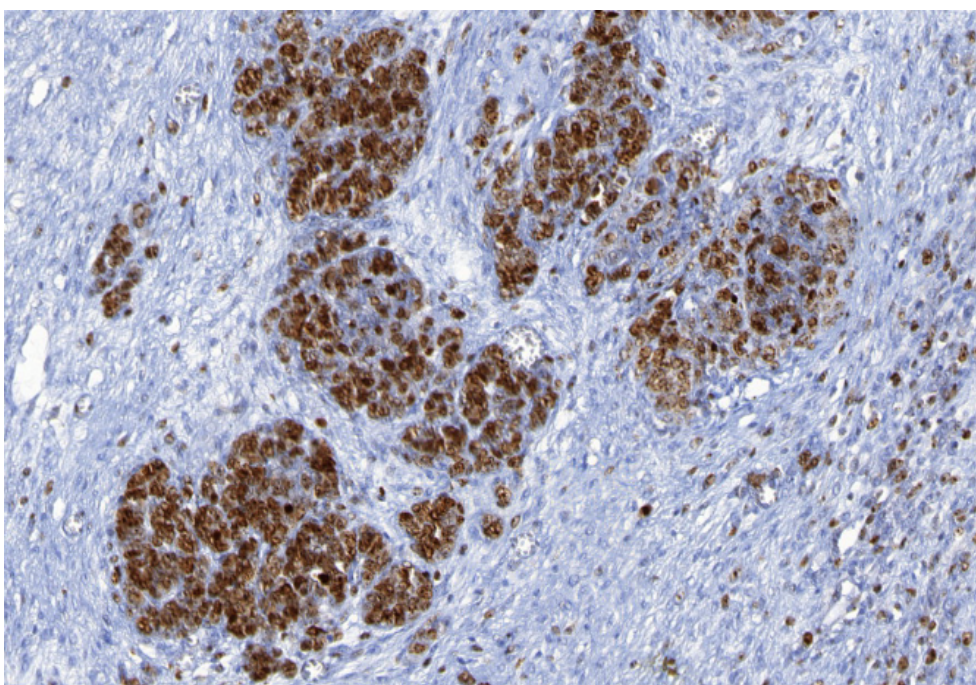
210. Sredni S.T., de Camargo B., Lopers L.F. i wsp. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol.*, 2001, 37, 455-58
211. Sredni S.T., Gadd S., Huang C.C. i wsp. Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group Subsets of very low risk Wilms tumor show distinctive gene expression, histologic, and clinical features. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 6800-6809
212. Stockmann C., Doedens A., Weidemann A. i wsp. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*. 2008, 456, 814–818
213. Strieter R.M., Burdick M.D., Mestas J. i wsp. Cancer CXCL chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J. Cancer*, 2006, 42, 768-778.
214. Suzuki S., Ota Y., Ozawa K. i wsp. Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 114, 456-463
215. Szala S., Jarosz M. Nowotworowe naczynia krwionośne. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2011, 65, 437-446
216. Takahashi M., Yang X.J., Lavery T.T. i wsp. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res.*, 2002, 62, 6598-6605
217. Tew W.P., Gordon M., Murren J. i wsp. Phase I study of aflibercept administered subcutaneously to patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16, 358–366
218. Thielemann A., Kopczyński Z., Baszczuk A. i wsp. Ocena stężenia rozpuszczalnego receptora sVEGFR-1 u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Współczesna Onkologia*, 2010, 14, 189-195
219. Thompson RH, Dong D, Kwon ED Implications of B7-H1 Expression in Clear Cell Carcinoma of the Kidney for Prognostication and Therapy; *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13, 709-715
220. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC i wsp. Tumor B7-H1 Is Associated with Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma Patients with Long-term Follow-up; *Cancer Res.* 2006, 66, 3381-3385
221. Tołoczko-Garbarek A., Jakubowska A., Górski B. i wsp. Nowotwory dziedziczne u dzieci – guz Wilmsa. *Współcz Onkol.*, 2002; 6 , 300-307
222. Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E. i wsp. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 2007, 445, 661–665
223. Verstovsek S., Manshouri T., Smith F.O. et al: Telomerase activity is prognostic in pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2003, 97, 2212-2217
224. Villegas G., Tufro A., Ontogeny of semaphorins 3A and 3F and their receptors neuropilins 1 and 2 in the kidney. *Mech. Dev.*, 2002, 119 , 149-153
225. Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000, 408, 307–310
226. Voros G., Maquoi E., Demeulemeester D. i wsp. Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology*, 2005, 146, 4545–4554
227. Vousden K.H., Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 594-604
228. Vujanic G.M., Harms D., Sandstedt B. i wsp. The new definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumour: The International Society of Paediatric Oncology experience. *Med. Pediatr. Oncol.*, 1999, 32, 317–23
229. Vujanic G.M., Sandstedt B i wsp.: Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol.*, 2002, 38, 79–82
230. Vuononvirta R., Sebire N.J., Messahel B. i wsp. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor met in Wilms' tumors and nephrogenic rests reflects their roles in kidney development. *Clin Cancer Res*, 2009, 15, 2723-30
231. Wachowiak J., Kaczmarek-Kanold M., Januszkiewicz-Lewandowska D. i wsp. Stopień zaawansowania guzów litych i chłoniaków w chwili rozpoznania u dzieci i młodzieży w województwie wielkopolskim w latach 1995-2005. *Onkol. Pol.*, 2008, 11, 108

232. Wang B., Hendricks D.T., Wamunyokoli F. i wsp. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66, 3071-3077
233. Wang S., Bajorath J., Flies D.B. i wsp. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J. Exp. Med.*, 2003, 197, 1083–1091
234. Waśniowska K., Chemokiny - perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii. *Postepy Hig. Med. Dosw* 2004, 58, 37–46
235. Weidle B., Orstavik K.H. Simpson-Golabi-Behmel syndrome. A new overgrowth syndrome with increased risk of tumor development. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, 1998, 118, 1556–1558.
236. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Semin. Diagn. Pathol.*, 1993, 10, 302-313
237. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.*, 1995, 147, 919
238. Weirich A, Ludwig R, Graf N. i wsp. Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. *Annals of Oncology*, 2004, 15, 808-820
239. Wesche J., Haglund K., Haugsten E.M., Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J.*, 2011, 437, 199-213
240. Wiedemann H.R. Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie - un syndrome nouveau? *J. Genet. Hum.* 1964, 13, 223–232.
241. Willets I.E., Jessop and the Wilms' tumor. *J. Pediatr. Surg.*, 2003, 38, 1496-1498
242. Williams R.D., Hing S.N., Greer B.T. i wsp. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 41, 65–79
243. Wu Y., Hooper A.T., Zhong Z. i wsp. The vascular endothelial growth receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2006, 119, 1519–1529
244. Wu Z.S., Wu Q., Yang J.H. i wsp. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer.*, 2008, 122, 2050-2056
245. Xian X., Hakansson J., Stahlberg A. i wsp. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2006, 116, 642–651
246. Xu C.X., Liu X.X., Hou G.S. i wsp. The expression of tumstatin is down-regulated in renal carcinoma. *Mol. Biol. Rep.*, 2010, 37, 2273-2277
247. Zeng Z.S., Weiser M.R., Kuntz E. i wsp. c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett.*, 2008, 265, 258-269
248. Zirn B., Hartmann O., Samans B. i wsp. Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. *Int. J. Cancer*, 2006, 118, 1954–1962

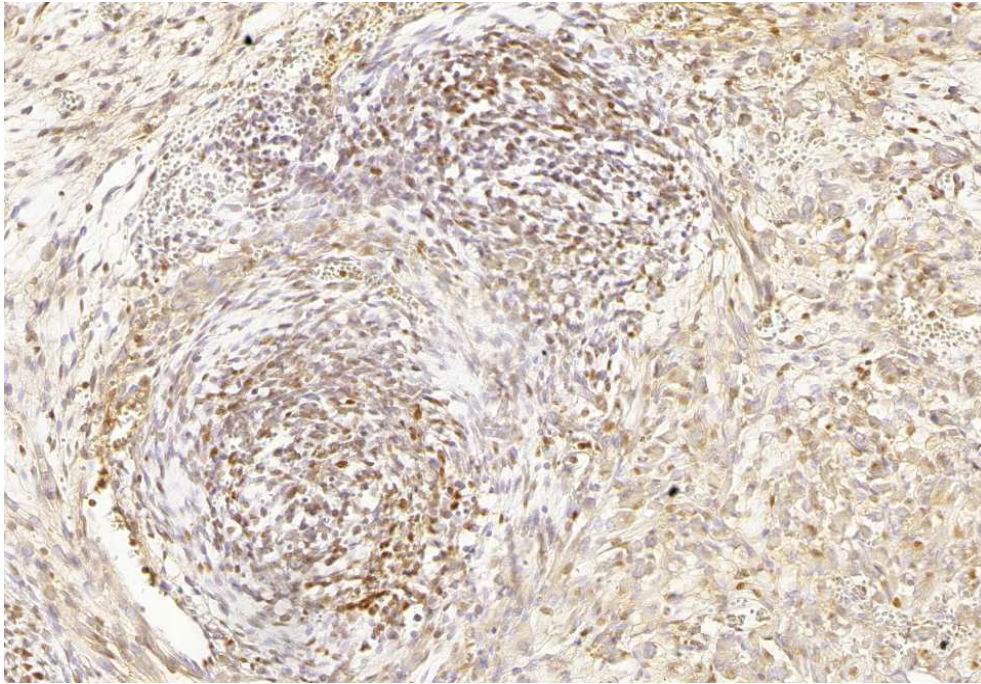
Dokumentacja fotograficzna



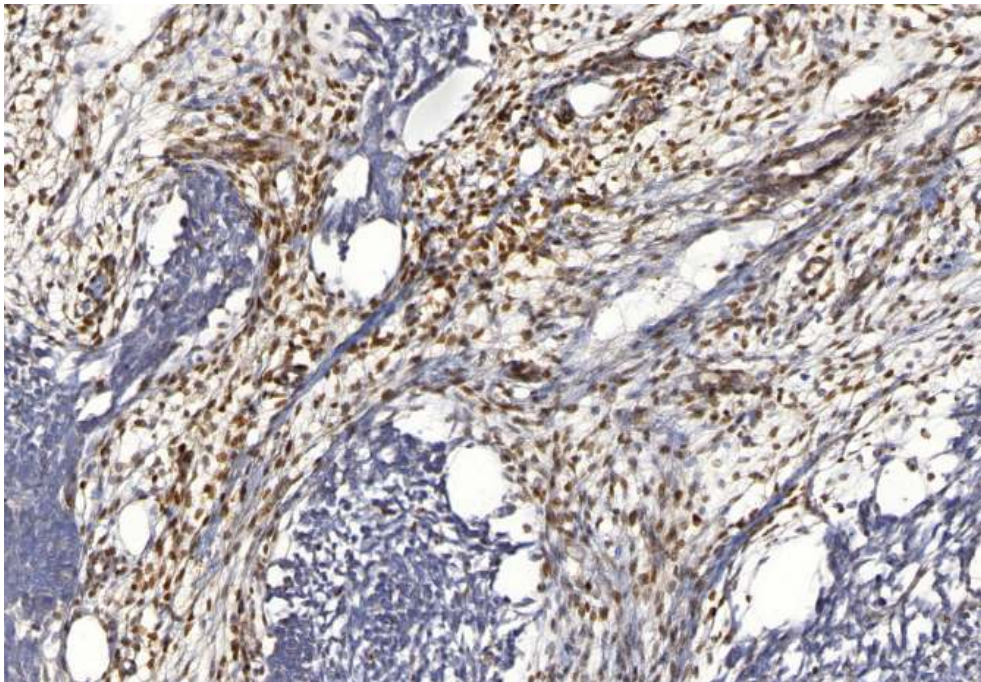
Fot. 1. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję Ki-67 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego u pacjenta z nowotworem w IV stopniu zaawansowania klinicznego. Oryginalne powiększenie 100x.



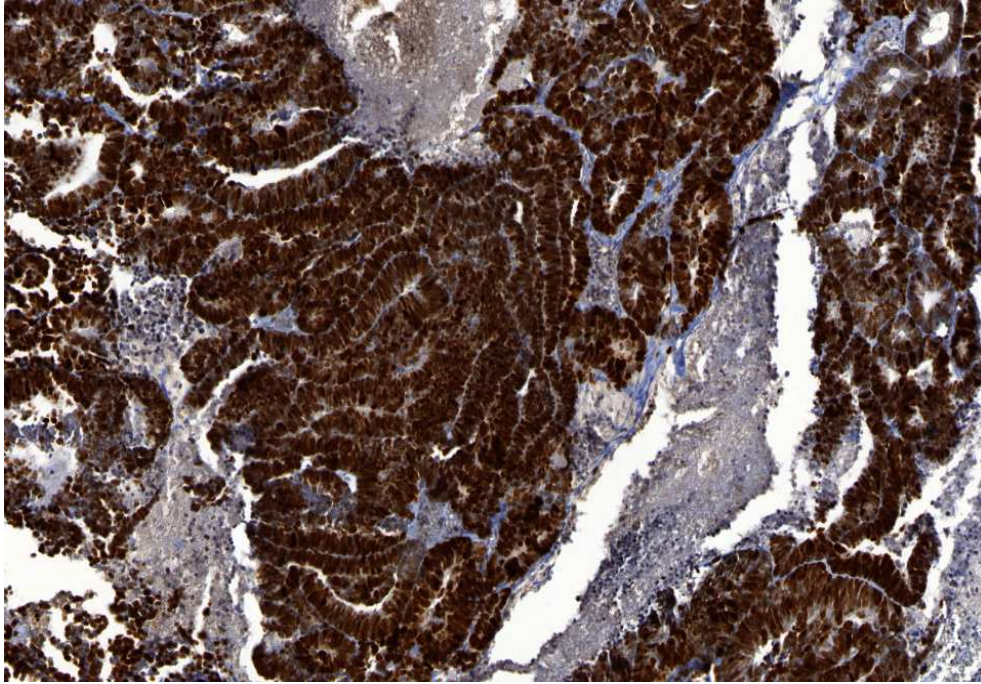
Fot.2. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję Ki-67 w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego u pacjenta z nowotworem rozpoznanym poniżej 2 roku życia. Oryginalne powiększenie 100x.



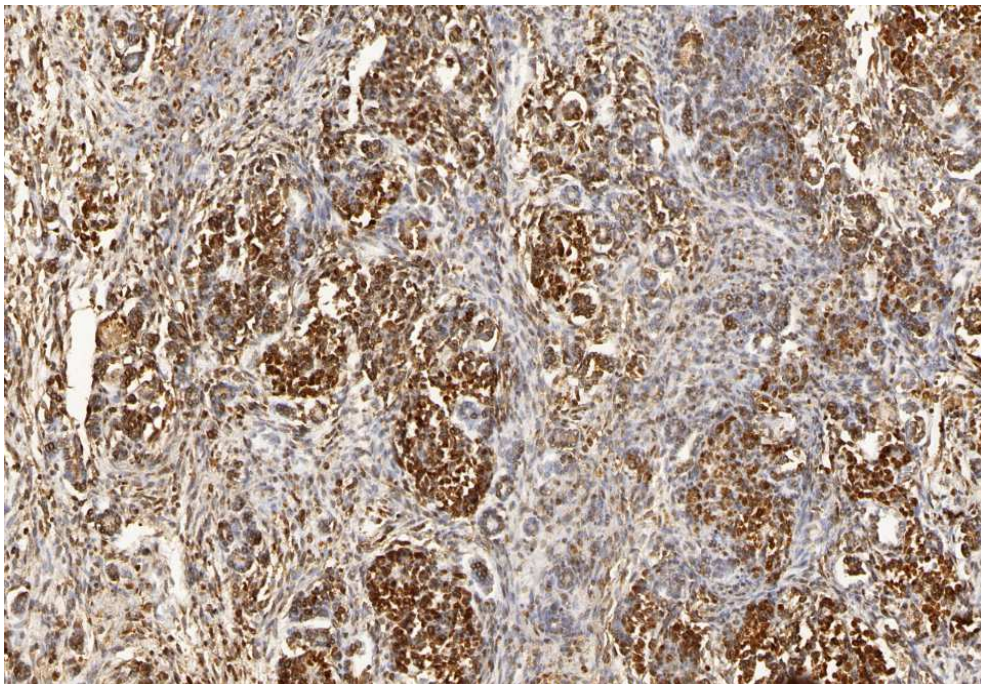
Fot.3. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję p27^{kip1} w utkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego u pacjenta z nowotworem rozpoznany poniżej 2 roku życia. Oryginalne powiększenie 100x.



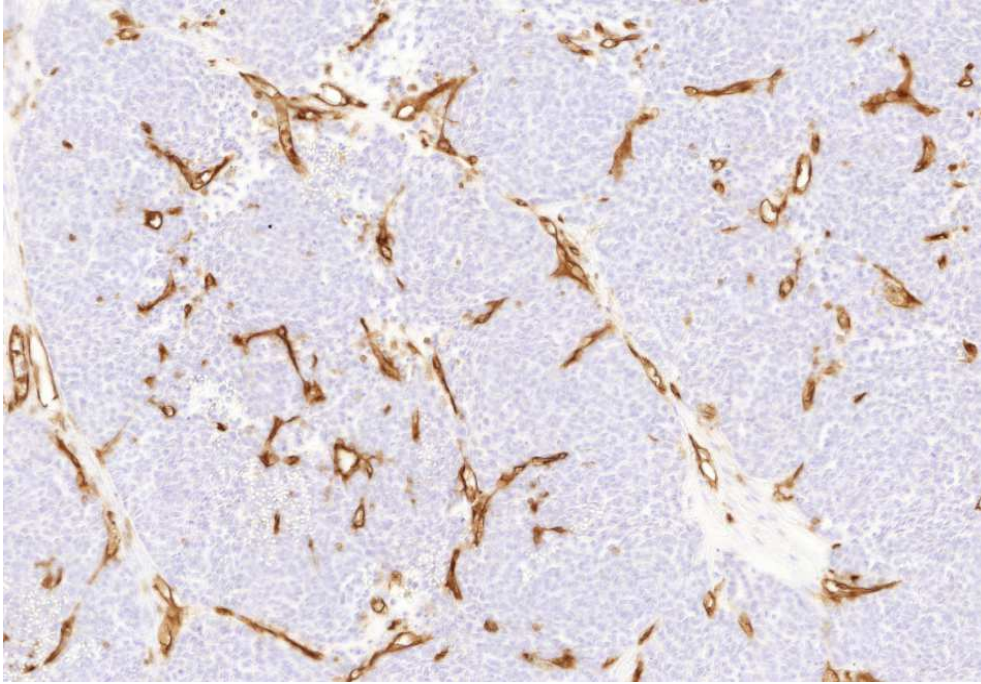
Fot.4. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję p27^{kip1} w utkaniu zrębowym nerczaka zarodkowego u pacjenta z nowotworem rozpoznany poniżej 4 roku życia. Oryginalne powiększenie 100x



Fot.5. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję p53 w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego u pacjenta ze wznową nowotworu. Oryginalne powiększenie 100x.



Fot.6. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję hTERT w utkaniu nabłonkowym nerczaka zarodkowego u pacjenta z nowotworem grupy wysokiego ryzyka. Oryginalne powiększenie 100x.



Fot.7. Reakcja immunohistochemiczna oceniająca ekspresję CD31 w tkaniu blastemicznym nerczaka zarodkowego. Oryginalne powiększenie 100x.