

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής : Καθηγητής Γεωργούλιας Βασίλειος
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Διευθυντής : Επ. Καθηγητής Σταθόπουλος Ν. Ευστάθιος

Μελέτη της αγγειογένεσης στην οξεία λεμφοβλαστική
λευχαιμία της παιδικής ηλικίας

Διδακτορική Διατριβή
Καλμαντή Λήδας
Ιατρού

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής : Καθηγητής Γεωργούλιας Βασίλειος
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Διευθυντής :Επ. Καθηγητής Ευστάθιος Ν. Σταθόπουλος

Μελέτη της αγγειογένεσης στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία
της παιδικής ηλικίας

Διδακτορική Διατριβή
Καλμαντή Λήδας
Ιατρού

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Β. Γεωργούλιας	Καθηγητής παθολογικής ογκολογίας (επιβλέπων)
Δ. Μαυρουδής	Αναπληρωτής καθηγητής παθολογικής ογκολογίας
Ε. Ν. Σταθόπουλος	Επίκουρος καθηγητής παθολογικής ανατομικής
Γ. Σαμώνης	Καθηγητής παθολογίας - λοιμωξιολογίας
Α. Γραβάνης	Καθηγητής φαρμακολογίας
Ε. Δημητρίου	Επίκουρη καθηγήτρια εργαστηριακής παιδιατρικής αιματολογίας ογκολογίας
Ε. Στειακάκη	Επίκουρη καθηγήτρια παιδιατρικής αιματολογίας ογκολογίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Γεωργούλια Βασίλειο για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με την Ογκολογία. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί μας διδάσκει με τη καθημερινή μάχη που δίνει για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στο Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ.Δελίδη Γιώργιο για την αμέριστη και συνεχή υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της διατριβής και για τη συμμετοχή του στην επιτέλεση των μεθόδων της εκτίμησης της αγγειογένεσης .

Ειλικρινείς ευχαριστίες οφείλω στον Διευθυντή Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής επίκουρο καθηγητή κ Σταθόπουλο Ευστάθιο για την αδιάλειπτη παρουσία του , την επιστημονική και ηθική συμπαράσταση και την καθοδήγησή και συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Την κ Δημητρίου Ελένη ,επίκουρη καθηγήτρια , ευχαριστώ θερμά για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής , την συνεχή της παρουσία και καθοδήγηση στις δύσκολες στιγμές .

Τον αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας -Ογκολογίας κ.Μαυρουδή Δημήτριο ευχαριστώ θερμά για τη συμπαράστασή του στη παρούσα διατριβή και την καθημερινή καθοδήγησή του στην άσκηση της ογκολογίας.

Δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την κ Στειακάκη Ευτυχία, επίκουρη καθηγήτρια , για τη συμβολή της στα κλινικά δεδομένα των παιδιών που μελετήθηκαν και την εποικοδομητική της κριτική στη παρούσα διατριβή.

Τους καθηγητές Παθολογίας- Λοιμωξιολογίας κ Σαμώνη Γεώργιο, και Φαρμακολογίας κ. Γραβάνη Αχιλλέα , μέλη της επταμελούς επιτροπής ευχαριστώ θερμότατα.

Τη συνάδελφο Νταμπάκη Κωσταντίνα ευχαριστώ θερμά για τη βοήθειά της στα πρώτα βήματα της αξιολόγησης των μετρήσεων αυτής της μελέτης καθώς και για την υπομονή και ενθάρρυνσή της.

Τέλος ευχαριστώ τους αρρώστους με καρκίνο και ιδιαίτερα τα παιδιά για τη δύναμη που μου μετέδωσαν.

Περιεχόμενα	Σελίδα
Βιογραφικό σημείωμα	4
Εισαγωγή	9
	10
I. Αγγειογένεση	
1. Γενικά	10
2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης	11
3. Αγγειογένεση σε φυσιολογικές καταστάσεις	14
4. Αγγειογένεση σε μη νεοπλασματικά νοσήματα	14
5. Αγγειογένεση σε νεοπλάσματα	15
α. Αγγειογένεση σε συμπαγείς όγκους	15
β. Αγγειογένεση σε αιματολογικές κακοήθειες	16
6. Αγγειογενετική μεταστροφή	18
7. Ο ρόλος της υποξίας στην αγγειογένεση	20
8. Αγγειογενετικά και αγγειοστατικά μόρια	22
8.1 Αγγειογενετικά μόρια	23
α1. Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF).	23
α2. Υποδοχείς του VEGF	25
β. Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF)	26
γ. Άλλοι αγγειογόνοι παράγοντες-αγγειοποιητίνες	27
8.2 Αγγειοστατικοί παράγοντες	28
α. Θρομβοσπονδίνη	28
β. Ντεκορίνη	29
γ. Ενδοστατίνη	29
δ. Αγγειοστατίνη	29
9. Αντι-αγγειογενετική θεραπεία	30

II. Δομή του φυσιολογικού μυελού των οστών	33
III. Αξιολογήση της αγγειογένεσης	36
IV. Η συμμετοχή της αιμαγγειοβλάστης στις αιματολογικές κακοήθειες	38
V. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στα παιδιά	39
1. Κλινικά προγνωστικά χαρακτηριστικά	39
2. Γενετικά και μοριακά προγνωστικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων	40
3. Παράγοντες φαρμακοδυναμικής και φαρμακοκινητικής	43
4. Υπολειπόμενη νόσος	44
5. Στρατηγική θεραπείας για την ΟΛΛ στα παιδιά	45
6. Χαρακτηριστικά των ηλικιών ομάδων στα παιδιά με ΟΛΛ	45
7. Αρχικοί καθοριστικοί παράγοντες του θεραπευτικού αποτελέσματος ανά ηλικία	47
8. Εκτίμηση της πρώιμης ανταπόκρισης στη θεραπεία	48
9. Κατευθυνόμενη θεραπεία σε σχέση με την υπολειπόμενη νόσο	48
10. Σημαντικές παράμετροι για τη θεραπεία	49
11. Αλλογενετική μεταμόσχευση	50
12. Θεραπεία συντήρησης	50
13. Μελλοντικές προοπτικές για την ΟΛΛ των παιδιών	50
VI. Αγγειογένεση και λευχαιμία- πιθανός μηχανισμός	52
VII. Προβλήματα στην αξιολόγηση της	55

αγγειογένεσης	
VIII. Εφαρμογή της μορφομετρίας στην εκτίμηση της αγγειογένεσης	56
1. Μετρήσεις «στιγμών»	56
2. Μετρήσεις θερμών σημείων (hot spots)	59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
ΣΚΟΠΟΣ	62
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	64
1. Υλικό βιοψίας - Ομάδες ασθενών	65
2. Επεξεργασία βιοψιών	71
α. Ιστοχημικός έλεγχος	71
β. Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος	72
- Ανοσοϊστοχημική μέθοδος	72
αλκαλικής φωσφατάσης για τα μονοκλωνικά αντισώματα	
3. Μέτρηση μικροαγγείωσης μυελού των οστών	75
α. Μετρήσεις εστιών μικροαγγειακής πυκνότητας «hot spots»	77
β. Εκτίμηση της μικροαγγείωσης του μυελού με εφαρμογή του κατ' όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης	78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΊΑ	95
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	114
SUMMARY	116

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΚΑΛΜΑΝΤΗ ΛΗΔΑ ΤΟΥ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	17 / 06 / 1977
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΑΘΗΝΑ

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

Ελληνική Αριθ.Πρωτ. 8865 Νομαρχία Αττικής /Διεύθυνση Υγιεινής

Ιταλική Αριθ. Πρωτ. 02/10982 Υπουργείο Υγείας Ρώμη

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ (Proficiency of Cambridge)

ΙΤΑΛΙΚΑ (Κρατικό πιστοποιητικό γλωσσομάθειας, επίπεδο Γ2 «Άριστη γνώση» της Ιταλικής γλώσσας Υπ.αποφ.26/01/2005)

ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ (Grundstufe, Mittelstufe Goethe Institut)

ΓΑΛΛΙΚΑ (Sorbonne I)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Σεπτέμβριος 1995 - Οκτώβριος 2001 Ιατρική και Χειρουργική Σχολή Πανεπιστημίου Νεάπολης Ιταλίας (Facolta di medicina e chirurgia dell'università degli studi di Napoli FEDERICO II)

Σεπτέμβριος 1996 - Σεπτέμβριος 1997 Ιατρική σχολή πανεπιστημίου Κρήτης (Πρόγραμμα Erasmus - ECTS).

Μάρτιος 2000 - Ιούλιος 2000 Ιατρική σχολή πανεπιστημίου του Βερολίνου Humboldt University (Πρόγραμμα Erasmus - ECTS).

Οκτώβριος 2001 Πτυχίο ιατρικής (Ιατρική Σχολή της Νεάπολης Ιταλίας "FEDERICO II") με βαθμό επίδοσης «Άριστα» (8,52 , 97/110).
Πτυχιακή εργασία με τίτλο « Υπερέκκριση Ινσουλίνης σε νεογνά και παιδιά »

Οκτώβρης 2001- Μάιος 2002 Εξάμηνη Κλινική Άσκηση στην Παθολογία , Παιδιατρική Γυναικολογία και Χειρουργική (Νοσοκομείο Cardarelli Νεάπολης, Πανεπιστήμιακό νοσοκομείο Νεάπολης FEDERICO II).

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

Νοέμβριος 2002 - Ιανουάριος 2003 Τρίμηνη κλινική άσκηση στην Παθολογία , Χειρουργική και Καρδιολογία στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Ρεθύμνου στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπήρεσίας υπαίθρου.

Φεβρουάριος 2003 - Φεβρουάριος 2004 Εκπλήρωση υπήρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Σπηλίου νομού Ρεθύμνης και τα γύρω χωριά.

Συμμετοχή στο περιφερικό σύστημα υγείας Κρήτης σε εργασίες που αφορούσαν στο Σακχαρώδη διαβήτη .

Μάρτιος 2004 - σήμερα Επιστημονικός συνεργάτης στην Ογκολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης

Συμμετοχή σε συνέδρια

Ελληνικά

- 3^ο Επιστημονικό συνέδριο φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας πανευρωπαϊκό συμπόσιο φοιτητών ιατρικής 1997
- 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό συνέδριο 1-3 Νοέμβρη Χανιά Κρήτης 2002
- 10^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 13-17 Νοέμβριου Ηράκλειο Κρήτης 2002
- 12^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό συμπόσιο 31 Μαρτίου Ηράκλειο Κρήτης 2002
- 13^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό συμπόσιο 16 Μαρτίου Ηράκλειο Κρήτης 2003
- 15^ο Παγκρήτιο Παιδιατρικό συνέδριο 25-26 Οκτώβρη Ρέθυμνο Κρήτης 2003
- 11^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 12-16 Νοέμβριου Ηράκλειο Κρήτης 2003
- Σεμινάριο Γενετική Συμβουλευτική και Προγεννητικός έλεγχος 18-19 Ιουνίου Ηράκλειο Κρήτης 2004
- 3^ο Συμπόσιο νέων μορίων στη θεραπεία του καρκίνου 23-24 Οκτωβρίου Αθήνα 2004
- 12^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 10-13 Νοέμβριου Ηράκλειο Κρήτης 2004
- 14^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό συμπόσιο 20-21 Μαρτίου Ηράκλειο Κρήτης 2004
- 1^ο Πολυθεματικό Συνέδριο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης 27-29 Ιανουαρίου Ηράκλειο Κρήτης 2005
- 15^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό συμπόσιο 2-3 Απρίλη Ηράκλειο Κρήτης 2005

Διεθνή

- 35th Congress of the International Society of Paediatric Oncology 8-11 October Cairo Egypt 2003
- Panitumimab (ABX- EGF) Investigators meeting Metastatic Colorectal Cancer 4-5 October Paris - France 2004
- Fifth Interdisciplinary EuroConference on Angiogenesis 27-30 May Sitges Spain 2005

Μονογραφίες -Μεταφράσεις

Ομάδα πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας για την Ευρώπη ,Διακήρυξη St Vincent στη καθημερινή πρακτική (Primary care diabetes Europe, St Vincent Declaration in primary practice). Φεβρ. 2005

Επιμέλεια μετάφρασης εγχειριδίου, σχόλια: Λιονής Χ.

Μετάφραση: Γεωργακίλα Ε ,Θηραίος Ε, Καλμαντή Λ ,Μπατίκας Α ,Τζιράκη Μ.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1) Μορφομετρική μελέτη της αγγειογένεσης στο μυελό των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Καλμαντή Λ, Δημητρίου Ε, Νταμπάκη Κ, Στειακάκη Ε, Σταθόπουλος Ε, 41^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο Ρόδος σελ 8 (ΕΑ0003)

2) Study of angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia Kalmanti L, Dimitriou H, Dambaki K, Stiakaki E, Stathopoulos E, Kalmanti M Delides G SIOPXXXV Meeting, p 288, (0127)

3) Molecular detection of HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer Mavroudis D, Perraki M, Kallergi G, Pallis A, Kanellou P, Kalmanti L, Xenidis N, Bozionelou V, Manousakis E, Georgoulas V, ISCO 2005 Belfast 5-9 April

4) Effect of adjuvant tamoxifen and letrozol on the fate of peripheral blood CK-19 mRNA + cells in patients with early breast cancer Xenidis N , Mavroudis D, Kourousis Ch, Kalmanti L, Pallis A, Kanellou P, Sfakiotaki G, Perraki M, Apostolaki S, Vamvakas L, Kalykaki A, Georgoulas V ISCO 2005 Belfast 5-9 April

5) The effect of recombinant human growth hormone (rhGH) therapy on urinary microalbumin a1 and b2 microglobulin levels in growth hormone deficient children Karakaidos D, Triantafyllidis G, Drakatos A, Kalmanti L, Zosi P, Kalmanti M, Karis C

a) European Society of Paediatric Endocrinology (ESPE) Basel Switzerland 10-13 September 2004 (P2716)

b) ESPE/LWPES 7th Joint Meeting Paediatric Endocrinology Lyon France
21-24 September 2005 (accepted P3-1018).

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- 1) A morphometric approach for the evaluation of angiogenesis in acute lymphoblastic leukemia of childhood Kalmanti L , Dambaki K , Dimitriou H , Stiakaki E , Chaniotis V , Stathopoulos E Leukemia Research 29 (2005) 673-677

- 2) Assessment of megakaryopoiesis in childhood acute lymphoblastic leukemia Kalmanti M , Stiakaki E , Mantadakis E , Gianoulia A , Kalmanti L , Dimitriou H Acta Haematologica 2005 in press

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

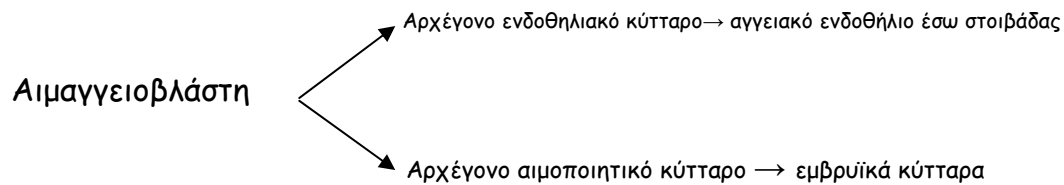
1.Γενικά

Κατά την εμβρυϊκή ζωή τα πρόδρομα κύτταρα του μεσοδέρματος διαφοροποιούνται σε αγγειοβλάστες και στη συνέχεια σε ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν το αρχέγονο αγγειακό δίκτυο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αγγειοπλασία (vasculogenesis)(Risau W, Flamme I 1995).

Αγγειογένεση (angiogenesis) είναι η διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων από ένα προ υπάρχον αγγειακό δίκτυο. Στη διεργασία αυτή ενέχονται μηχανισμοί διάφοροι από αυτούς της αγγειοπλασίας (Poole TJ 1989) και συμβαίνει τόσο στο αναπτυσσόμενο έμβρυο όσο και μετά τη γέννηση (Asahara T 1997, Risau W 1997).

Πολλοί ερευνητές θεωρούν την αγγειοπλασία και την αγγειογένεση ξεχωριστές διαδικασίες αγγειακής ανάπτυξης καθώς προτείνεται ότι η πρώτη δε συμβαίνει σε ενήλικες αλλά περιορίζεται μόνο στην εμβρυογένεση (Risau W 1995 ,Cine 1998 ,Yancopoulos DG 1998). Άλλες όμως μελέτες αναφέρουν ότι η αγγειοπλασία πέραν της πρώιμης εμβρυογένεσης φαίνεται να εμπλέκεται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στους ενήλικες (Shi 1998 , Tepper OM 2005).

Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα φαίνεται ότι μεταξύ ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων υπάρχει ένα κοινό προγονικό κύτταρο. Το κύτταρο αυτό, η αιμαγγειοβλάστη , βρίσκεται στις αγγειακές νησίδες του λεκιθικού ασκού και δίνει γένεση και στα ενδοθηλιακά και στα αιμοποιητικά κύτταρα (Murray PDF 1934).



Σχήμα 1 Σχηματική παράσταση οντογενετικής διαφοροποίησης της αγγειοπλασίας

2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης

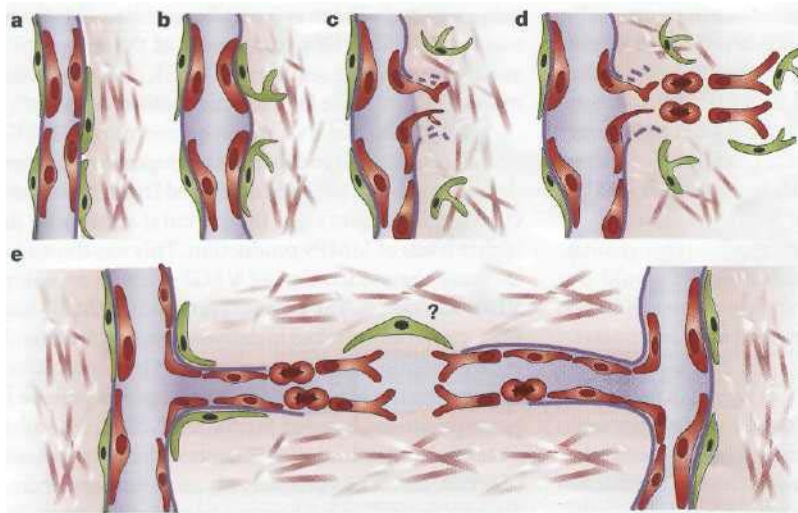
Η αγγειογένεση εξαρτάται από μια αλληλουχία συντονισμένων γεγονότων. Για την ανάπτυξη νέων αγγείων σε αναγεννώμενους και νεοπλασματικούς ιστούς έχουν περιγραφεί τρεις μηχανισμοί.

Στον πρώτο γίνεται ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενός προϋπάρχοντος μικρού αγγείου από έναν φαινότυπο 'ηρεμίας σε φαινότυπο αγγειογενετικού πολλαπλασιασμού και διαίρεσης (αγγειογενετική μεταστροφή, *angiogenic switch*). Αυτό προϋποθέτει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών από το στρώμα που διαπερνούν το εξωκυτταρικό στρώμα, και την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες ανβ3 που βοηθούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα να προσκολλώνται μεταξύ τους κατά τη διείσδυση στο στρώμα. Στη συνέχεια νέα ενδοθηλιακά κύτταρα οργανώνονται σε σωληνίσκους δημιουργώντας νέα δίκτυα αγγείων (Yancopoulos G.D. 2000, Palmblad J. 2001, Bergers G 2003)(Εικόνα 1). Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι η αυξημένη τάση των τοιχωμάτων του αγγείου και η αυξημένη γλοιότητα του αίματος ευοδώνουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ η αυξημένη πίεση προς το αγγειακό τοίχωμα προκαλεί δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων (*sprouting angiogenesis*) (Hudlicka O 1992).

Αγγειογένεση μπορεί να προκύψει επίσης από την αύξηση, το διαχωρισμό και τη σύντηξη των προυπαρχόντων αγγείων, μέσω του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα (αγγειογένεση με εγκολεασμό, non sprouting angiogenesis)(Burri PH 2004, Fidler I.J 2004). Στον μηχανισμό αυτό, τα αγγεία ανακατασκευάζονται και επεκτείνονται μέσα στον αυλό των προυπαρχόντων αγγείων σχηματίζοντας νέα αγγεία συχνά ανώμαλα και λιγότερο καλά οργανωμένα.

Μια παραλλαγή αυτής της υπόθεσης είναι η προσάρτηση των νέων αυτών αγγείων στα ήδη υπάρχοντα. Όταν ένας όγκος αναπτύσσεται, επωφελείται από τα γειτονικά του αγγεία. Στη συνέχεια το αγγείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκβλαστήσει σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό αλλά επίσης μπορεί να υποστραφεί λόγω της εκφυλιστικής δράσης της αγγειοποιητίνης (Carmeliet P. 2000).

Στον τρίτο μηχανισμό, ο οποίος έχει περιγραφεί σε μελέτες που αφορούσαν σε νεοπλάσματα, η αρχέγονη αιμαγγειοβλάστη του μυελού με τη διέγερση αυξητικών παραγόντων, κυκλοφορεί στο αίμα και συνεισφέρει στη δημιουργία νέων ενδοθηλιακών κύτταρων. Αυτά τα κύτταρα αποτελούν το τοίχωμα αγγείων με αυλό και δρουν ως λειτουργικά αγγεία. Η διαδικασία αυτή καθώς και οι δυο προηγούμενες μπορεί να σχηματίσουν αγγεία των οποίων η εσωτερική στοιβάδα να αποτελείται από ένα μωσαϊκό νεοπλασματικών και ενδοθηλιακών κυττάρων (Chang YS 2000) .



Εικόνα 1 (Bergers & 2003)

Σχηματισμός νέων αγγείων α, β) Αρχικά τα περικύτταρα (πράσινα) αποκολλώνται και τα αγγεία διαστέλλονται πριν την αποσύνθεση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας c) αυτό επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα (κόκκινα) να μεταναστεύσουν στον περιαγγειακό χώρο με αγγειογενετικά ερεθίσματα τα οποία παράγονται από τα κύτταρα του όγκου. d) τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και έλκονται από τα περικύτταρα e) τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσκολλώνται μεταξύ τους και δημιουργούν έναν αυλό ο οποίος συνοδεύεται από σχηματισμό βασικής μεμβράνης και προσκόλληση των περικύτταρων. Τέλος οι εκβλαστήσεις των αγγείων ενώνονται με άλλες αγγειακές εκβλαστήσεις για σχηματισμό νέων κυκλοφορικών συστημάτων. Ο μηχανισμός της σύντηξης των εκβλαστήσεων δεν είναι διευκρινισμένος.

Προκειμένου να γίνει πλήρης κατανόηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης τόσο σε παθολογικές όσο και σε φυσιολογικές καταστάσεις θα πρέπει να διερευνηθούν και να ληφθούν υπ' όψη όλοι οι προταθέντες μηχανισμοί πρόκλησής της.

3. Αγγειογένεση σε φυσιολογικές καταστάσεις

Η αγγειογένεση είναι θεμελιώδης για την αναπαραγωγή την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση ιστών. Σε φυσιολογικές συνθήκες εκτεταμένη αγγειογένεση συμβαίνει μόνο στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας (Reynolds LP, 1992), δηλαδή στην ωοθυλακιορρηξία, στην έμμηνο ρύση και στο σχηματισμό του πλακούντα. Επίσης η αγγειογένεση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει κατά την επούλωση των τραυμάτων (Folkman J 1995 α). Οι φυσιολογικές αυτές διαδικασίες εξαρτώνται από τη ελεγχόμενη αύξηση των μικροαγγείων. Κάτω από ορισμένες παθολογικές καταστάσεις όμως οι ανασταλτικοί παράγοντες που εκκρίνονται δε μπορούν να εμποδίσουν την αυξημένη δραστηριότητα των αγγειογενετικών επαγωγέων (inducers) και έτσι η υπερβολική αγγειογένεση είναι ταυτόσημη με τη παθολογία του νοσήματος (Risau W 1995 , Hanahan D, 1996). Όταν η αύξηση είναι μη ελεγχόμενη, η αγγειογένεση είναι παθολογική και ενέχεται στην ανάπτυξη κυρίως νεοπλασματικών αλλά και μη νεοπλασματικών νοσημάτων.

4. Αγγειογένεση σε μη νεοπλασματικά νοσήματα

Οι παθολογικές καταστάσεις αγγειογένεσης περιλαμβάνουν νοσήματα του καρδιαγγειακού όπως η ισχαιμική νόσος του μυοκαρδίου (Marti HH 1999), η εγκεφαλική υποξία (Marti HJ 2000), νοσήματα χρόνιας φλεγμονής όπως η ρευματοειδής αρθρίτις (Matsuno H 2002) και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Griffioen AW 2000), η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Aiello LP 1994), η εκφύλιση ωχράς κηλίδας (Gragoudas E.S. 2004), η ψωρίαση (Kim HJ 2005) και η ενδομητρίωση (Taylor RN 2001).

5. Αγγειογένεση σε νεοπλάσματα

Η παρατήρηση ότι η αύξηση ενός όγκου συνοδεύεται από τον πολλαπλασιασμό αιμοφόρων αγγείων έγινε περίπου έναν αιώνα πριν .Πρώτος το 1939 ο Ide και συν. έδειξε σε πειραματικά μοντέλα ανάπτυξης όγκων σε ζώα, ότι η αύξηση του όγκου συνοδεύεται από εμφάνιση νέων αιμοφόρων αγγείων .

Η σχέση της αγγειογένεσης με την αύξηση ενός όγκου αποδείχθηκε έμμεσα για πρώτη φορά το 1971 από τον J.Folkman .Ένας όγκος όταν αυξηθεί πάνω από 2mm^3 (περίπου 10^6 κύτταρα) δε μπορεί να λάβει οξυγόνο και άλλα θρεπτικά συστατικά μέσω της διάχυσης. Επομένως χρειάζεται ένα αγγειακό δίκτυο που να τροφοδοτεί τον όγκο με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να απομακρύνει τα άχρηστα προϊόντα (Folkman J. 1995 b). Αργότερα αποδείχθηκε ότι η ανάπτυξη νέων αγγείων σε έναν όγκο βοηθά στη διασπορά του όγκου και τη μετάστασή του (Weidner N. 1991) ενώ το 1993 έγινε η πρώτη πειραματική απόδειξη μείωσης όγκου με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυξητικών παραγόντων του ενδοθηλίου των αγγείων (Kim K.J. 1993).

α. Αγγειογένεση σε συμπαγείς όγκους

Αυξημένη αγγειογένεση έχει παρατηρηθεί σε πάρα πολλούς συμπαγείς όγκους: στον καρκίνο του μαστού (Weidner N. 1991), στον καρκίνο του προστάτη (Volansek M. 1999), στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Kern A. 2002, Prall F. 2003), στον καρκίνο του δέρματος (Graham C.H. 1994, Loggini B. 2003, Cernea C.R. 2004) , στον καρκίνο του νεφρού (Lee J.S. 2001, Turner K.J. 2002), στους όγκους της κεφαλής και τραχήλου

(Gasparini G. 1993, Forootan S.S. 1999, Krecicki T. 2002), στον καρκίνο του πνεύμονα (Fontanini G. 1995, Giatromanolaki A. 1996, Offersen B.V. 2001), τους όγκους του ΚΝΣ (Zadeh G. 2003), καθώς και στον καρκίνο του στομάχου (Tsujiitani S. 2004), του παγκρέατος (Duffy J.P. 2003) και άλλους.

Έχει γίνει συσχέτιση της αγγειογένεσης με τη πτωχή πρόγνωση σε πολλά νεοπλάσματα όπως το μελάνωμα (Graham C.H. 1994), ο καρκίνος του μαστού (Hansen 2000, Guidi 2000), ο καρκίνος του προστάτη (Weidner N. 1993), το μεσοθηλίωμα (Kumar-Singh S. 1997), ο καρκίνος τραχήλου της μήτρας (Lenczewski A. 2001), ο καρκίνος του ενδομητρίου (Obermair A. 1999), ο καρκίνος των ωοθηκών (Ogawa S. 2002) πρόσφατα το ρετινοβλάστωμα (Rossler J. 2004) και το οστεοσάρκωμα (Mikulic D. 2004). Αντίθετα ευρήματα προέκυψαν από μια μελέτη συσχέτισης της αγγειογένεσης με τη πρόγνωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (Prall F. 2003).

Σε παλαιότερες εργασίες η αγγειογένεση έχει συσχετιστεί επίσης με την ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία (Delides G.S. 1988, Revesz L. 1989, Delides G.S. 1990) και στην χημειοθεραπεία (Protorapa E. 1993).

β. Αγγειογένεση σε αιματολογικές κακοήθειες

Όσον αφορά στις αιματολογικές κακοήθειες, οι μελέτες είναι πιο πρόσφατες και δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση αυξημένης αγγειογένεσης με την πρόγνωση τους. Έχει μελετηθεί η νεοαγγείωση μέχρι σήμερα σε οξείες και χρόνιες λευχαιμίες (Padr6 T.2000, Korkoloroulou P.2003), μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Αποστολιδου Ε. 2003), λεμφώματα (Korkoloroulou P.2005) και μυελώματα (Palmbiad J.2001). Στις μελέτες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλοι ενδοθηλιακοί δείκτες. Οι Perez-Atayde και συν το 1997 (Perez-Atayde A. 1997) χρησιμοποίησαν τα μονοκλωνικά

αντισώματα CD31 και CD34 και το πολυκλωνικό αντίσωμα FVIIIr Ag σε βιοψίες μυελού οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Η μελέτη έδειξε αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα στους λευχαιμικούς ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Ο Aguayo και συν. (Aguayo A. 2000), εκτίμησαν την αγγειογένεση σε ενήλικες ασθενείς με ποικίλες διαταραχές της μυελικής και λεμφικής σειράς όπως μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, οξεία μυελογενή λευχαιμία, οξεία λεμφογενή λευχαιμία, χρόνια μυελογενή λευχαιμία και χρόνια λεμφογενή λευχαιμία. Οι βιοψίες μυελού αξιολογήθηκαν μετά από χρώση με αντίσωμα κατά FVIIIrAg και η μικροαγγειακή πυκνότητα βρέθηκε αυξημένη σημαντικά στις περιπτώσεις οξείας μυελογενούς, χρόνιας μυελογενούς και οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας καθώς και μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων όχι όμως στατιστικά σημαντική σε σχέση με τους μάρτυρες στις περιπτώσεις χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Το 2001 ο Vacca A. ανέφερε μετά από εκτίμηση της αγγειογένεσης σε περιπτώσεις πολλαπλού μυελώματος, θετική συσχέτιση μεταξύ αυξημένης αγγειογένεσης του μυελού και πολλαπλασιασμού των μυελωματικών κυττάρων. Όσον αφορά μελέτες αγγειογένεσης στα λεμφώματα φαίνεται ότι έχει συσχετισθεί με την ενεργό νόσο στα μη Hodgkin λεμφώματα από B κύτταρα (Ribatti D. 1996), στα λεμφώματα από T κύτταρα (Mazur G. 2004) και στα Hodgkin λεμφώματα (Korkoloroulou P. 2005).

6. Αγγειογενετική μεταστροφή (angiogenic switch)

Ένας όγκος μπορεί να παραμείνει *in situ* χωρίς νεοαγγείωση για μήνες ή χρόνια έως ότου μια υποομάδα κυττάρων του υποστεί γενετικές μεταλλάξεις και αποκτήσει νέο φαινότυπο που επάγει την αγγειογένεση και προωθεί την ανάπτυξη και τη μετάστασή του (Folkman J. 1995 b). Αυτή η μεταστροφή στον "αγγειογενετικό φαινότυπο" αφορά αλλαγές στην ισορροπία ανάμεσα στους παράγοντες που προάγουν την αγγειογένεση και αυτούς που την αναστέλλουν (Dameron K.M. 1994). Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να υπερεκφράζουν έναν ή περισσότερους από τους "θετικούς" ρυθμιστές της αγγειογένεσης, να κινητοποιήσουν μια αγγειογενετική πρωτεΐνη από το εξωκυττάριο στρώμα, να προσελκύουν ξένα κύτταρα όπως τα μακροφάγα (που παράγουν τις δικές τους αγγειογενετικές πρωτεΐνες) ή να δράουν με συνδυασμό όλων των παραπάνω μηχανισμών (Folkman J. 1993). Για την αγγειογένεση σε νεοπλασίες δεν αρκεί μόνο η ενεργοποίηση των αγγειογενετικών μορίων αλλά είναι απαραίτητη και παρεμπόδιση των αναστολέων της αγγειογένεσης (Dameron K.M. 1994).

Στην εικόνα 2 απεικονίζεται η κλασική αγγειογενετική μεταστροφή (τροποποιημένο από Bergers G. 2003).

Εικόνα 2 Απεικόνιση κλασικής αγγειογενετικής μεταστροφής (Bergers G 2003)

7. Ο ρόλος της υποξίας στην αγγειογένεση

Η υποξία επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (Carmeliet P. 1998) και την αποπτωση (Graeber T.G. 1996) όπως και τη μετάσταση (Britzel D.M. 1996). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου καθορίζει το επίπεδο του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 (hypoxia inducible factor) (Huang L.E. 1996, Jiang B.H. 1996).

Ο παράγοντας HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής παράγοντας που ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που ελέγχουν :τη μεταφορά της γλυκόζης ,τα γλυκολυτικά ένζυμα, τη γλυκονεογένεση, τον μεταβολισμό υψηλής ενέργειας των φωσφορονικοτιναμιδο αδενικό δινουκλεοτιδίων (NADP) ,τους αυξητικούς παράγοντες ,την ερυθροποίηση ,το μεταβολισμό της αίμης, τη μεταφορά του σιδήρου ,την αγγειοκινητική ρύθμιση και τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (Semenza G.L. 1999, Ratcliffe P.I. 1998). Με αυτές τις δράσεις αυξάνει την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων κάτω από συνθήκες υποξίας.

Ο HIF αποτελείται από δυο πρωτεϊνικές υπομονάδες,την α και τη β, που παρουσιάζουν τη δομή bHLH-PAS (basic Helix-Loop -Helix, PAS domains)(Wang G.L. 1995). Η υπομονάδα α συμμετέχει αποκλειστικά στο σύμπλεγμα του HIF-1 και αποδομείται μέσω του συστήματος ubiquitin/proteasome .Η β υπομονάδα ονομάζεται και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) και αποτελεί τμήμα πολλών άλλων παραγόντων μεταγραφής.

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου στα κύτταρα ,η πρωτεΐνη HIF-1α αποσυντίθεται συνεχώς μέσω της οδού της ουμπικιτίνης .Σε συνθήκες υποξίας εμποδίζεται αυτή η οδός, η πρωτεΐνη σταθεροποιείται (Huang L.E. 1996, Sutler C.H. 2000). Επομένως η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της αυξάνεται. Αν και δεν είναι ακόμα σαφής ο μηχανισμός με

τον οποίο γίνεται αντιληπτή από το κύτταρο η έλλειψη οξυγόνου πιστεύεται ότι η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης HIF-1α προκαλείται από μηχανισμούς οξειδοαναγωγής (Salceda S, 1997).

Μια εντολή που ξεκινά από το πυρήνα από το τελικό άκρο C του HIF-1α επιτρέπει τη μεταφορά του HIF-1α από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου ενώνεται με τον HIF-1β και σχηματίζει ένα ενεργό σύμπλεγμα HIF-1. Ο HIF-1β μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή και με άλλες πρωτεΐνες όπως με την AR (aryl hydrocarbon receptor) (Reyes H. 1992) και έτσι είναι διαρκώς παρών σε αφθονία μέσα στο κύτταρο (Sutler C.H. 2000, Martin C. 1998). Συμπερασματικά η ποσότητα της πρωτεΐνης HIF-1α στον πυρήνα καθορίζει τη λειτουργική δράση του συμπλέγματος HIF-1 (Semenza G.L. 1999).

Ο παράγοντας HIF ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF, Vascular endothelial growth factor) (Forsythe JA 1996) που όπως αναφέρεται κατωτέρω είναι από τα πιο σημαντικά μόρια που επάγουν την αγγειογένεση. Άλλα ογκογόνα πεπτίδια που ενεργοποιούνται με τον ίδιο τρόπο είναι η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) (Schmedtje JF, 1997), ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) (Koyrembanas S. 1990) και ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF) (O'Rourke JF, 1996).

8. Αγγειογενετικά και αγγειοστατικά μόρια

Στο πίνακα 1 συνοψίζονται οι κυριότεροι ενδογενείς διεγέρτες και αναστολείς της αγγειογένεσης ανάλογα με την ιδιότητά τους και τη δράση τους.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	Ενεργοποιητές	Αναστολείς
Κυτταροκίνες	IL-6 , IL-8	IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ
Ενδογενείς ρυθμιστές	ανβ3 ιντεγκρίνη Αγγειοποιητίνη-1 Αγγειοστατίνη II(υποδοχέας AT 1) Ενδοθηλίνη Ερυθροποιητίνη Υποξία Συνθάση νιτρικού οξέος Ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων Προσταγλανδίνη E Θρομβοποιητίνη	Αγγειοτενσίνη Αγγειοτενσίνη II(υποδοχέας AT 2) Αγγειοποιητίνη-2(απουσία VEGF) Καβεολίνη-1,-2 Ενδοστατίνη IFN-α Ισοφλαβόνες Αιμοπεταλιακός παράγοντας -4 Προλακτίνη (τμήμα 16 kd) Θρομβοσπονδίνη Τροπονίνη-1
Αυξητικοί παράγοντες	Αγγειογενίνη Αγγειοτροπίνη EGF, FGF, G-CSF, HGF, PDGF, TNF-α, VEGF	
Ογκογονίδια	c-myc, ras, c-src, v-raf, c-jun	p53, Rb
Πρωτεάσες - αναστολείς πρωτεασών	Καθεψίνη Ζελατινάση A, B Στρωμελίσίνη Ενεργοποιητής πλασμινογόνου (u-PA)	TIMP-1, TIMP-2 ,TIMP-3 Αναστολέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1(PAI-1)
Ένζυμα ενδοκυττάριας μετάδοσης σήματος	Φωσφορυλάση θυμιδίνης Φαρνεσυλτρανσφεράση Γερανυλ γερανυλτρανσφεράση	
Στοιχεία	Χαλκός	Πυρίτιο

Πίνακας 1 Ενδογενείς ενεργοποιητές και αναστολείς της αγγειογένεσης (Thomas D.A et al.2001)

8.1 Αγγειογενετικά μόρια

α1. Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο αυξητικός παράγοντας ενδοθηλίου των αγγείων είναι ο πιο σημαντικός αγγειογενετικός παράγοντας που εμπλέκεται στη φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση (Scarpaticci F.A. 2002). Η οικογένεια του VEGF, που αναφέρεται και ως VEGF A περιλαμβάνει ακόμα 4 μέλη, τον VEGF B (Olfsson B. 1996), VEGF C (Joukon V. 1996) με ιδιαίτερη κατανομή στους μύς και το μυοκάρδιο, τον VEGF D (Achen M.G. 1998) και τον VEGF E καθώς και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα, PlGF που φαίνεται να περιορίζεται αποκλειστικά στο πλακούντα και σε ορισμένες μορφές νεοπλασμάτων (Hauser S. 1993).

Ο VEGF είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 45kD. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (Vincenti V. 1996). Από τη διαφορετική συναρμογή (alternative splicing) των 8 εξονίων του μοναδικού γονιδίου VEGF- A προκύπτουν 5 ισομορφές ,206 ,189 ,165, 145 και 121 αμινοξέων (Park J.E. 1993, Poltorak Z. 1997). Όλες οι ισομορφές του VEGF είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης και της διαπερατότητας των αιμοφόρων αγγείων και δρουν σαν μιτογόνα των ενδοθηλιακών κυττάρων.(Tischer E. 1989, Leung D.W. 1989, Keck P.J. 1989). Η ταυτόχρονη παραγωγή των παραπάνω ισόμορφων από διάφορα είδη κυττάρων μπορεί να συνεισφέρει στην ισορροπημένη αγγειογενετική απάντηση κάτω από διάφορες αντιρροπούμενες συνθήκες,όπως για παράδειγμα στην επούλωση των ιστών. Δηλαδή κάτω από ορισμένες συνθήκες γίνεται επιλογή παραγωγής συγκεκριμένων κάθε φορά ισόμορφων (Bacic M. 1995). Οι

μηχανισμοί που καθορίζουν τη παραγωγή των ισομορφών από διάφορα είδη κυττάρων χρήζουν παραπέρα διερεύνηση.

Ο VEGF παράγεται τόσο από κακοήθη κύτταρα όσο και φυσιολογικά κύτταρα (π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα ξενιστές παρεγχυματικών οργάνων) που αθροίζονται σαν απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα περιβαλλοντικά όπως η υποξία, ορισμένες κυτταροκίνες και η οιστραδιόλη (Gasparini G. 2001, Ferrara N 1999). Ο VEGF είναι *in vitro* ειδικά μιτογόνο για τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση αλλά εμποδίζει την απόπτωση (Shelaby F. 1997, Gerber H.P. 1999). *In vivo* ο παράγοντας VEGF είναι απαραίτητος για την αγγειοπλασία (Shelaby F. 1997, Carmeliet P. 1997) την αγγειογένεση (Grunstein G. 1999, Brekken R.A. 1998) και τη ρύθμιση της διαπερατότητας των αιμοφόρων αγγείων (Senger D.R. 1993, Yuan F 1996). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο παράγοντας ο επαγόμενος από την υποξία HIF ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου του VEGF. Άλλοι παράγοντες συμπεριλαμβάνουν την υπογλυκαιμία (Sone H. 1996), αυξητικούς παράγοντες όπως αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης 1 (IGF), τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), τον ιστικό παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), ορισμένες κυτταροκίνες όπως ιντερλευκίνη 6 (IL-6) (Podar K. 2005). Επίσης την έκφραση του VEGF ευνοούν η αγγειογενετική δράση ογκογονιδίων όπως *c-myc*, *Fos*, *Src*, και *Bcl-2*, *raf* (Kerbel R. 2002, Grugel S. 1995) ή μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Kieser A. 1994) και του ογκογονιδίου Ras (Rak J. 1995). Αυξημένη έκφραση του VEGF έχει παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες. Μερικές από αυτές είναι: ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του ΚΝΣ, του παγκρέατος, ο καρκίνος των ωοθηκών του νεφρού και της ουροδόχου κύστεως (Podar K 2005).

α2. Υποδοχείς του VEGF

Οι αυξητικοί παράγοντες VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, καθώς και ο PlGF προσδένονται με διαφορετική συγγένεια ο καθένας, σε τρεις υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης, τον υποδοχέα VEGFR-1 ή Flt-1, τον VEGFR-2 ή Flk-1 και τον VEGFR-3. Οι υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης του VEGF είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο πρωτεϊνικό τμήμα που προσομοιάζει στην ανοσοσφαιρίνη (Ig like), ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική περιοχή με δομή τυροσινικής κινάσης.

Η υποξία ενεργοποιεί άμεσα την γονιδιακή έκφραση του VEGFR-1 μέσω της σύνδεσης του HIF-1 α σε ένα ειδικό τμήμα που βρίσκεται στον προαγωγέα του υποδοχέα. Αντίθετα ο υποδοχέας VEGFR-2 δε διαθέτει αυτό το τμήμα σύνδεσης και έτσι δεν ενεργοποιείται από την υποξία.

Οι δυο υποδοχείς εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ενηλίκων με εξαίρεση τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ΚΝΣ (Millauer B. 1993). Εκτός από την έκφραση του VEGFR-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο υποδοχέας εκφράζεται επίσης στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και στα μονοκύτταρα (Barleon B. 1996), την τροφοβλάστη, τα κύτταρα του χοριοκαρκινώματος (Ferrara N. 1997, Charnock-Jones D.S. 1994), τα νεφρικά και μεσαγγειακά κύτταρα (Takahashi T. 1995), τα λεία μυϊκά κύτταρα (Grosskreutz C.L. 1999), τα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος και τα λευχαιμικά κύτταρα (Bellamy W.T. 2001, Ria R. 2003). Ο VEGFR-2 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα, σε κύτταρα παγκρεατικών πόρων ενώ σε ορισμένους φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς έχει βρεθεί συνέκφραση και των δυο υποδοχέων (Podar K.2005).

Ο ρόλος του VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει μελετηθεί εκτενέστατα: Ο VEGFR-2 κατευθύνει την αναπτυξιακή αγγειογένεση και αιμοποίηση προκαλώντας πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, διαφοροποίηση και διατήρηση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς επίσης προκαλώντας αγγειακή διαπερατότητα και σχηματισμό αιμοποιητικών νησίδων (Shelaby F 1995).

Ο ρόλος του VEGFR1 είναι πιο πολύπλοκος και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης και το τύπο του κυττάρου (Fong G.H. 1999, Hiratsuka S.1998). Αν και ο ρόλος αυτού του υποδοχέα δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, η σηματοδότηση του απαιτείται στην αιμοποίηση (Hattori K. 2002, Gerber H.P. 2002), στη μετανάστευση των μονοκυττάρων (Barleon B. 1996, Clauss M. 1996, Sawano A. 2001) και στη παρακρινή απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (Luttun A. 2002, LeCouter J. 2003). Η αναστολή του VEGFR-1 εξασθενεί το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων στον καρκίνο, την ισχαιμική αμφιβληστροειδοπάθεια και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενώ η αναστολή του VEGFR-2 όχι (Luttun A.2002).

B. Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών FGF

Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors, FGF) περιλαμβάνει πολυπεπίδια σημαντικά για την ανάπτυξη των κυττάρων. Υπάρχουν δυο μορφές αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών, ο όξινος και ο βασικός, (α-FGF ή FGF -1 και b-FGF ή FGF- 2 αντίστοιχα). Ο FGF-2 απελευθερώνεται από την εξωκυττάρια ουσία (Sottile J. 2004). Σε πειραματόζωα ο FGF-2 προάγει την αγγειογένεση (Jivenez B. 2000, Ribatti D. 1999, Toltsma S.S. 1993) διεγείρει το πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Folkman J. 1992) και δρά σε συνεργία με τον VEGF προάγοντας την αγγειογένεση in vivo (Neufeld G.

1999). Ο FGF-2 που είναι προσδεδεμένος στην εξωκυττάρια ουσία απελευθερώνεται με πρωτεόλυση (Saksela O. 1990, Ribatti D. 1999) .Οι μορφές του VEGF που προσδέονται στην ηπαρίνη μπορούν επίσης να απελευθερώσουν τον προσδεδεμένο στην εξωκυττάρια ουσία FGF-2 (Jonca F. 1997) γεγονός που υποδεικνύει ότι για ορισμένες από τις βιολογικές δράσεις του VEGF διαμεσολαβεί ο FGF-2 (Jonca F. 1997). Ο FGF-2 επίσης προάγει την έκφραση του VEGF απ' τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Seghezzi G. 1998).

γ. Άλλοι αγγειογόνοι παράγοντες-αγγειοποιητίνες

Άλλοι παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση είναι η αγγειοποιητίνη-1 (ANG 1) και η αγγειοποιητίνη 2 (ANG 2), πεπτιδικά μόρια που δεσμεύονται στον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης TIE 2, που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Yancopoulos G.D 2000). Οι αγγειοποιητίνες δρούν συνεργικά με τον VEGF και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση των αγγείων. Συγκεκριμένα η ANG2 με τη παρουσία του VEGF προάγει την απομάκρυνση των περιαγγειακών κυττάρων (περικυττάρων) προκαλώντας τη διαστολή των τριχοειδικών αγγείων, την αναδιοργάνωση της βασικής μεμβράνης και την ανάπτυξη νέων αγγείων (sprouting) Εικόνα 1 (Bergers G. 2003, Ramsauer M. 2002). Σε απουσία του VEGF η αγγειοποιητίνη 2 οδηγεί σε υποστροφή της αγγειογένεσης και θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αγγειοποιητίνη 1 δρά ως σταθεροποιητής των αγγείων σε περίπτωση απουσίας των περιαγγειακών κυττάρων. Επίσης και άλλα πεπτιδικά μόρια έχουν αναγνωρισθεί ως επαγωγείς της αγγειογένεσης. Ένας από αυτούς είναι ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγων, (TGF-β1, Transforming Growth Factor β1) του οποίου η δράση ενισχύεται και από τον PDGF (Platelet

Derived Growth Factor) ο οποίος πέραν της δράσης του στην αιμοποίηση (Dainiak N. 1983) είναι απαραίτητος για την εγκατάσταση των περικυττάρων και των λύων μυϊκών ινών γύρω από το αγγειακό τοίχωμα (Lindahl P 1997). Επίσης η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2) και ο ιστικός παράγων (TF, Tissue Factor) δρουν ανεξάρτητα του HIF 1 στην δημιουργία της νεοαγγειογένεσης.

8.2 Αγγειοστατικοί παράγοντες

α. Θρομβοσπονδίνη

Η θρομβοσπονδίνη 1, μια ομοτριμερής γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας, αναστέλλει την αγγειογένεση που διεγείρεται από τον FGF, την αγγειογένεση που σχετίζεται με την επούλωση των ιστών και την ογκογένεση (Good D.J. 1990, Tolma S.S. 1993, Volpert O.V. 1998). Πιστεύεται ότι η θρομβοσπονδίνη 1 αναστέλλει την αγγειογένεση προκαλώντας απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ικανότητα του p53 να δρά ως αντιαγγειογενετικός παράγοντας οφείλεται στη κατιούσα ρύθμιση της θρομβοσπονδίνης 1 (Dameron K.M.1994). Η θρομβοσπονδίνη 2 είναι μέλος της οικογενείας γονιδίων της θρομβοσπονδίνης 1 με παρόμοια δομή με τη θρομβοσπονδίνη 1 (Bornstein P. 1994). Είναι παρούσα στους ιστούς του εξωκυττάριαου στρώματος. Εμποδίζει την αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Panetti T.S. 1997, Armstrong L.C. 2002), την αγγειογένεση και την αύξηση όγκου (Streit M. 1999, Bornstein P. 2000).

β. Ντεκορίνη

Η ντεκορίνη είναι ένα πρωτεογλυκανικό μόριο του εξωκυττάριου στρώματος με αντιαγγειογενετική δράση. Πιστεύεται ότι ρυθμίζει την οργάνωση των ινών κολλαγόνου (Kinsella M.G. 2000) και ότι εμποδίζει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων (Kinsella M.G. 2000, De Lange C. 2001) και το σχηματισμό σωληνωδών δομών αν και ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι προάγει το σχηματισμό νέων αγγείων (Schonherr E. 1999). Οι πρωτεάσες του εξωκυττάριου στρώματος εκτός από την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων συνδεδεμένων με το στρώμα ,μπορούν να δημιουργήσουν τμήματα από μόρια του στρώματος που να διαθέτουν αντιαγγειογενετικές ιδιότητες τις οποίες δε διαθέτει το ακέραιο μόριο.

γ. Ενδοστατίνη

Η ενδοστατίνη είναι ένα πρωτεολυτικό τμήμα του κολλαγόνου XVIII, μεγέθους 20 k-Da που παράγεται τόσο από τις ελασάσες όσο και από άλλες πρωτεάσες. Σε όγκους πειραματοζώων έχει διαπιστωθεί σημαντική αύξηση της αγγειογένεσης (O'Reilly M.S. 1997), η οποία αναστέλλεται με τη δράση της ενδοστατίνης (O'Reilly M.S. 1997, Blezinger P. 1999). Αυτό έχει οδηγήσει σε εφαρμογή της ενδοστατίνης σε κλινικές μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα δεν έχουν πλήρως αναλυθεί.

δ. Αγγειοστατίνη

Η αγγειοστατίνη είναι ένα πολυπεπτιδικό μόριο μεγέθους 38 kd που αποτελεί πρωτεολυτικό προϊόν του πλασμινογόνου. Δρά και αυτή ως αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (O'Reilly M.S. 1997). Η συγχορήγηση των δυο ανωτέρω παραγόντων φαίνεται ότι έχει

υψηλή αποτελεσματικότητα όσον αφορά στη συρρίκνωση των όγκων σε πειραματόζωα (Thomas D. A. 2001).

9. Αντι-αγγειογενετική Θεραπεία

Η έρευνα έχει στραφεί σε αναζήτηση παραγόντων που έχουν αντιαγγειογενετική δράση με στόχο την αναχαίτιση της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες ανάλογα με τη δράση τους διακρίνονται σε διαφορετικές κατηγορίες όπως αναστολείς αυξητικών παραγόντων, αναστολείς μετάδοσης σήματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστολείς πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων, αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, αναστολείς επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων και αναστολείς προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού (Kerbel R. 2001, Brian I. 2005). Στο πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι κύριοι αγγειογενετικοί παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ανάλογα με το τρόπο δράσης τους.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΑΛΛΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΣΧΟΛΙΑ
<i>Άμεσοι αναστολείς ενδοθηλιακών κυττάρων</i>		
Αγγειοστατίνη	Επαγωγή απόπτωσης των ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων Αναστολή μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμού σωληνίσκων Αναστολή ενεργοποίησης πλασμινογόνου	Τμήμα του πλασμινογόνου 38 kd
Κομπρεταστατίνη	Επαγωγή απόπτωσης σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται.	
Ενδοστατίνη	Αναστολή ενδοθηλιακών κυττάρων.	Τμήμα κολλαγόνου τύπου XVIII 20 kd
FTI L-778,123 SCH66336 R11577	Αναστολή μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων.	Κλινικές μελέτες σε επιμένουσες λευχαιμίες ,μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, χρόνια μυελογενής λευχαιμία, πολλαπλό μύελωμα, αγγειογενετική μυελοειδής μεταπλασία.
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΑΛΛΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΣΧΟΛΙΑ
Πενικιλλαμίνη	Αναστολέας ουροκινάσης Εμποδίζει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων	
Σκουαλαμίνη	Αναστολή της αντλίας νατρίου υδρογόνου	Εκχύλισμα ήπατος καρχαρία
Θαλιδομίδη	Αναστολή του VEGF b-FGF, TNFα, Διέγερση IFNγ, IL-2,	Δράση στο πολλαπλό μύελωμα, μυελοδυσπλασία
TNP-470	Συνθετικό ανάλογο φουμαγιλίνης Αναστολή αύξησης ενδοθηλιακών κυττάρων	Ιn vitro κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινες κυτταρικές λευχαιμικές σειρές.
<i>Αναστολείς ενεργοποιητών αγγειογένεσης</i>		
Αγγειοζύμη	Εξασθένηση υποδοχέων του VEGF και του mRNA	
Αντι-VEGF	Μονοκλωνικό αντίσωμα του VEGF	Δράση στο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου
IM862	Αναστολή παραγωγής b-FGF και VEGF. Ανιούσα ρύθμιση IL-12	
IFN-α	Αναστολή παραγωγής b-FGF και VEGF	
PTK787/ZK22584	Αναστολή σήματος του VEGFR	
SU5416	Αναστολή σήματος του VEGFR (f1k1/KDR)	Αιματολογικές κακοήθειες
SU6668	Αναστολή σήματος του VEGF ,FGF, PDGFR	Ανθεκτικές κακοήθειες. Από το στόμα

Εἰδικὸὶ ἐνδοθηλιακοὶ ἀναστολεῖς σήματος ιντεγκρίνης		
ABT-627	Ανταγωνιστὴς υποδοχέα ἐνδοθηλίνης.	
EMD121974	Μικρὸ μόριο ἀναστολέας τῆς ιντεγκρίνης ανβ3. Επαγωγὴ ἀπόπτωσης ἐδοθηλιακῶν κυττάρων.	
Βιταξίνη	Αντίσωμα τῆς ανβ3 ιντεγκρίνης ἐπαγωγὴ ἐνδοθηλιακῆς κυτταρικής ἀπόπτωσης.	
Διάφοροι		
IL-12	Ανιούσα ρύθμιση τῆς IFN-γ. Αναστολὴ παραγωγῆς MMP.	
Αναστολεῖς μεταλλοπρωτεϊνῶν		
Neovastat Marimastat BMS-275291, Bay 12-9566		Καρκίνος νεφροῦ, πνεύμονα (NSCLC) (Φυσικὸ προϊόν-εκχύλισμα χόνδρου καρχαριοειδῶν). καρκίνος πνεύμονα (SCLC) καὶ μαστοῦ(συνθετικὸ). καρκίνος πνεύμονα (συνθετικὸ).

Πίνακας 2 Αντιαγγειογενετικοὶ παράγοντες (Thomas D. A. 2001)

II. Δομή του φυσιολογικού μυελού των οστών

Ο μυελός των οστών, ο οποίος καταλαμβάνει τους χώρους μεταξύ των δοκίδων της δοκιδώδους μοίρας των οστών, αποτελείται από διακλαδιζόμενα τριχοειδικά κολποειδή και δικτυωτό υπόστρωμα. Οι διάμεσοι χώροι ανάμεσα στα κολποειδή καταλαμβάνονται από αιμοποιητικά κύτταρα. Το αιμοποιητικό στοιχείο του μυελού συνίσταται από μικροπεριβάλλον αποτελούμενο από κύτταρα στρώματος τα οποία κατανέμονται τυχαία στη μυελική κοιλότητα, από εξωκυττάρια ουσία και από αγγειακές δομές οι οποίες διακλαδίζονται ανώμαλα από τη μια θέση στην άλλη. Τα κύτταρα του στρώματος αποτελούνται από διάφορους υποτύπους όπως λιποκύτταρα, κύτταρα δικτύου, ενδοθηλιακά κύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες που το καθένα έχει ειδικό λειτουργικό ρόλο. Η εξωκυττάρια ουσία που παράγεται από στρωματικά κύτταρα του μυελού αποτελείται από πλειάδα ουσιών όπως κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, θρομβοσπονδίνη, αιμονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες. Οι ουσίες αυτές πέραν του ρόλου τους στην ευόδωση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μπορούν να προσκολλώνται και να ευοδώνουν τη δράση των αυξητικών παραγόντων στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (Wineman J. 1996). Η συγκέντρωση των μικρών αγγείων και των κολποειδών είναι μεγαλύτερη στη περιφέρεια του οστού απ' ό,τι στις κεντρικές περιοχές. Αυτή η κατανομή πιθανόν ευθύνεται για τη ανομοιογενή κατανομή της αιμοποίησης (Tanassoli M. 1983). Η τοπογραφία του μυελού φαίνεται ότι είναι διαφορετική για κάθε μια από τις αιμοποιητικές σειρές π.χ η κοκκιοποίηση λαμβάνει χώρα κυρίως σε παροστικές περιοχές και σε εστίες οι οποίες συνδέονται με στρωματικά κύτταρα θετικά στην αλκαλική φωσφατάση (Westen H. 1979). Η ερυθροποίηση λαμβάνει χώρα σε διακριτές ανατομικές μονάδες, γνωστές ως ερυθροβλαστικές νησίδες. Αυτές οι νησίδες συνήθως βρίσκονται μακριά από τις οστικές δοκίδες πλησίον των αγγειακών δομών και αποτελούνται από

προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς που περιβάλλουν κεντρικά μακροφάγα τα οποία παρέχουν ερυθροποιητίνη και λειτουργούν σαν τροφοφόρα αιμοποιητικά κύτταρα σε αυτές της νησίδες (Tanassoli M, 1981). Η μεγακαρυοποίηση τελείται κοντά στο ενδοθήλιο των κολποειδών (Yong K. 1994). Σε αυτή τη θέση μεγάλα τμήματα του κυτταροπλάσματος του μεγακαρυοκυττάρου εισέρχονται στον αυλό και απελευθερώνουν αιμοπετάλια στη κυκλοφορία.

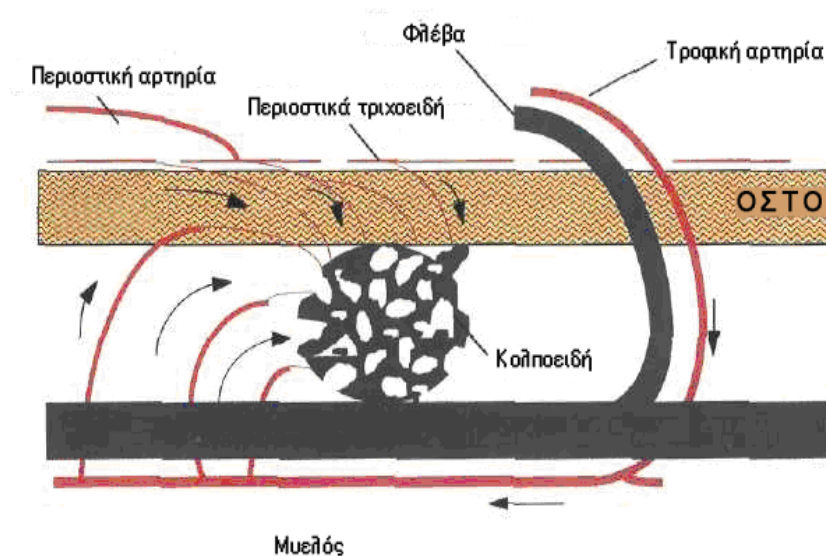
Η αναλογία των αιμοποιητικών κυττάρων σε σχέση με το λιπώδη ιστό χαρακτηρίζεται ως κυτταροβρίθεια του μυελού. Η κυτταροβρίθεια του μυελού ορίζεται ως το ποσοστό του όγκου του μυελού που καταλαμβάνεται από αιμοποιητικά κύτταρα και εξαρτάται από την ηλικία του ατόμου και τη θέση του μυελού (Hartsoc R. 1965). Η κυτταροβρίθεια στη γέννηση πλησιάζει το 100% και μετέπειτα μειώνεται περίπου 10 % για κάθε δεκαετία της ζωής.

Το ιστικό υλικό που λαμβάνεται από τη οστεομυελική βιοψία αποτελείται από: τον οστίτη ιστό, το στρώμα (αγγεία, δικτυωτή ουσία, ινοβλάστες, λίπος, εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης), τις αιμοποιητικές σειρές (κοκκιώδης, ερυθρά, μεγακαρυοκυτταρική) καθώς και άλλα κύτταρα όπως λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, μαστοκύτταρα και άλλα.

Ο μυελός των οστών αιματώνεται από τους μυελικούς κλάδους της τροφοφόρου αρτηρίας του οστού, η οποία αφού διαπεράσει το φλοιό, μέσα από ένα θρεπτικό κανάλι, διακλαδίζεται σε σειρά αγγείων που εφοδιάζουν με αίμα τόσο το φλοιό όσο και τις οστεοδοκίδες. Αυτή η αγγείωση εμπλουτίζεται με μικρότερα αγγεία που προέρχονται από το μυϊκό ιστό και το περίοστεο, τα οποία διαπερνούν με παρόμοιο τρόπο το φλοιό.

Το τριχοειδικό δίκτυο αποτελείται από κολποειδή με λεπτά τοιχώματα που καταλήγουν σε ένα μεγάλο κεντρικό κόλπο, ο οποίος εκβάλλει στην εκφορητική φλέβα, που εξέρχεται τελικά από το ίδιο θρεπτικό κανάλι.

Τα κολποειδή του μυελού καλύπτονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που είναι αποπλατυσμένα κύτταρα, και φέρουν μια ασυνεχή βασική μεμβράνη. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ελέγχουν τη διέλευση εισερχόμενων και εξερχόμενων ουσιών προς και από το αιμοποιητικό διαμέρισμα, λόγω της ικανότητας ενδοκυττάρωσης που διαθέτουν. Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τη βασική τους μεμβράνη, υπάρχει και ένας ασυνεχής χιτώνας από περιαγγειακά κύτταρα (περικύτταρα ή δικτυωτά κύτταρα) που χορηγούν ένα εκτεταμένο δίκτυο κυτταροπλασματικών αποφυάδων οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της εξωτερικής επιφάνειας του τοιχώματος των κολποειδών και διακλαδίζονται και στον αιμοποιητικό χώρο. Τα κύτταρα αυτά εκτός από τη δημιουργία ενός πλέγματος στήριξης των αιμοποιητικών κυττάρων, συσσωρεύουν λιπίδια και μετασχηματίζονται σε λιποκύτταρα του μυελού των οστών.



ΕΙΚΟΝΑ 3 Δομή αγγειακού συστήματος μυελού (Faramarz N. 1998)

III. Αξιολόγηση της αγγειογένεσης

Στο μινερό των οστών καθώς και σε άλλους ιστούς η αξιολόγηση της αγγειογένεσης δεν είναι δυνατή με συμβατικές τεχνικές όπως η χρώση ρουτίνας με αιματοξυλίνη-ηωσίνη ή Giemsa. Η αγγειακή πυκνότητα μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στο ευρύ φάσμα των διαθέσιμων ειδικών για τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντισωμάτων μπορούν να αναγνωριστούν δυο κατηγορίες: οι παν-ενδοθηλιακοί κυτταρικοί δείκτες και τα αντισώματα που προσδέονται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορούν να αξιοποιηθούν και άλλα συστατικά του αγγειακού τοιχώματος, όπως τα περικύτταρα και τα συστατικά της περιβάλλουσας βασικής μεμβράνης, για να γίνει ορατός ο βαθμός αγγειογένεσης τόσο μέσα σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες. Στη κατηγορία των πανενδοθηλιακών δεικτών ανήκουν το σχετιζόμενο με τον παράγοντα VIII/von Willebrand αντίσωμα (anti-FVIII-rAg) ή το αντίσωμα κατά του CD31 ή PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) (Augustin H.G. 1994). Τα αντισώματα anti-CD31 υπερέχουν σε τομές παραφίνης με δεύτερη επιλογή τα αντισώματα κατά FVIII-rAg και CD34. Παρότι ειδικό, το αντίσωμα κατά CD31 μπορεί εκτός από τα μικροαγγεία να αντιδρά και με τα πλάσματοκύτταρα. Το anti-CD34 είναι ένας ευαίσθητος δείκτης όσον αφορά στα μικρά και στα μεγάλα αγγεία, συνδέεται όμως εξίσου και με φυσιολογικά και με νεοπλασματικά κύτταρα προερχόμενα από τα περιαγγειακά στρωματικά κύτταρα. Τα ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά των ειδικών αντισωμάτων έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνονται στο πίνακα που ακολουθεί (Vermeulen P.B. 1996).

Αντίσωμα	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Αντιδραστικότητα Κρυστάτης Παραφίνης	Λεμφαγγειακή χρώση
Anti-CD 31	Μικρά και μεγάλα αγγεία -ίση ένταση σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό.	Μη ειδικό σε τομές κρυστάτη. Ενίοτε, χρώση πλασματοκυττάρων.	+ +	Όχι
Anti-FVIII RAg	Μεγάλα αγγεία-τριχοειδή. Ποικίλλη και εστιακή.	Μονοκλωνικό αντίσωμα: έντονη θετικότητα. Πολυκλωνικό αντίσωμα: χρώση στρώματος.	+ +	ποσοστό
UEA	Μικρά και μεγάλα αγγεία-ίση ένταση σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό.	Μικρού βαθμού: χρώση νεοπλασματικών κυττάρων.	+ +	Ναι
Anti-CD34	Μικρά και μεγάλα αγγεία-ίση ένταση σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό.	Έντονη: Ποικίλλη περιαγγειακή χρώση στρωματικών κυττάρων.	+ +	ποσοστό
Anti-CD36	Έντονη χρώση των μικρών αγγείων-ποικίλη-ασθενής χρώση μεγάλων αγγείων.	Χρώση μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων.	+ ;/+	άγνωστο
PAL-E	Μικρά και μεγάλα αγγεία-ίση ένταση σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό.	Υψηλή.	+ -	Όχι
BMAI20-BW 200	Μικρά και μεγάλα αγγεία-ίση ένταση σε φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό.	Υψηλή.	+ +	άγνωστο
EN-4	Μικρά και μεγάλα αγγεία-περιορισμένο εύρος κατανομής.	Χρώση στρωματικών κυττάρων και ενίοτε νεοπλασματικών.	+ +/-	άγνωστο

Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά αντισωμάτων ειδικών για τα ενδοθηλιακά κύτταρα
(Vermeulen P.B 1996)

IV.Η Συμμετοχή της αιμαγγειοβλάστης στις αιματολογικές κακοήθειες

Η συμμετοχή της αιμαγγειοβλάστης στις κακοήθειες του αιμοποιητικού συστήματος είναι ενδιαφέρουσα λόγω της γειννίας των προγονικών κυττάρων στο μυελό. Επιπρόσθετα, η πιθανότητα ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να μετέχουν στην κακοήθη διαδικασία τέθηκε ερευνητικά με το εύρημα της παρουσίας του bcr/abl στα ενδοθηλιακά κύτταρα της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Palmblad J. 2001, Gunsilius E. 2000). Εξάλλου η πρόσφατα περιγραφείσα ικανότητα των μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων να μετατρέπονται σε ενδοθηλιακά ή να επηρεάζουν τα ενδοθηλιακά και τα περιβάλλοντα περικύτταρα έχει προσθέσει αρκετά στο πολύπλοκο αυτό μηχανισμό(Reynes M. 2000, Egginton S. 2000). Με την ίδια έννοια σε αιματολογικές κακοήθειες, εμφανείς ή δυνητικά κλωνικές όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία και η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, μπορεί να ενέχεται η αγγειογένεση στους παθογενετικούς μηχανισμούς ανάπτυξής τους, αντικείμενο που αποτελεί και τον στόχο της παρούσας μελέτης.

V .Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στα παιδιά

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά αποτελεί το 30%-40% όλων των κακοηθειών της παιδικής ηλικίας και η επιτυχημένη θεραπεία της νόσου έχει δώσει ποσοστά ίασης μέχρι 80% (Silverman L.B. 2001). Η επίπτωση της νόσου είναι 3-4 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 παιδικό πληθυσμό. Η αναλογία αγόρια/κορίτσια είναι 1.2-1.4 με συχνότερη ηλικία εμφάνισης 3-5 ετών.

1.Κλινικά προγνωστικά χαρακτηριστικά

Οι δύο σταθερά σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι η ηλικία και ο αριθμός των λευκών στη διάγνωση. Τα κριτήρια του Εθνικού Ινστιτούτου Ογκολογίας των ΗΠΑ και της Ρώμης (NCI/Rome criteria) ταξινομούν τους ασθενείς σε ομάδες με βάση την ηλικία 1-9.99 χρόνια και λευκά < 50.000μL (σταθερού κινδύνου) η ηλικία ≥10 χρόνων και λευκά ≥50.000 μL (υψηλότερος κίνδυνος) (Sather H.N. 1986, Crist W. 1986).

Η καλή ανταπόκριση που παρατηρείται στις μικρότερες ηλικίες συνδέεται με ευνοϊκά γενετικά χαρακτηριστικά των βλαστών. Έκτός από τον αριθμό των λευκών που αντιπροσωπεύει το λευχαιμικό φορτίο, άλλα κλινικά χαρακτηριστικά όπως ηπατοσπληνομεγαλία και διόγκωση μεσοθωρακίου συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής.

Το φύλο και ο ανοσοφαινότυπος είναι επίσης χαρακτηριστικά τα οποία έχει αποδειχθεί σταθερά ότι συνδέονται με την πρόγνωση της νόσου. Τα κορίτσια έχουν καλύτερη επιβίωση ελεύθερης νόσου σε σύγκριση με τα αγόρια ακόμη και όταν λαμβάνουν λιγότερο εντατική θεραπεία. Ο ανοσοφαινότυπος των βλαστών έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει προγνωστική αξία αν και η σημασία του έχει σχετικά υποβαθμιστεί με τη βελτίωση της θεραπείας. Η συνέκφραση μυελικών αντιγόνων στους βλάστες της λεμφικής σειράς (My+

ALL) έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει χειρότερη πρόγνωση, πρόσφατες μελέτες όμως δείχνουν ότι η έκβαση στην My+ ALL δεν διαφέρει από την τυπική λευχαιμία από πρόδρομα Β κύτταρα (Uckum F.M., Sather H.N. 1997). Ο Τ ανοσοφαινότυπος έχει συσχετισθεί με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης ελεύθερης νόσου ίσως εξαιτίας της παρουσίας κακών προγνωστικών παραγόντων όπως μεγαλύτερη ηλικία, μάζα στο μεσοθωράκιο και λεμφαδενοπάθεια (Uckum F.M., Gaynon P.S. 1997). Παρόλα αυτά η φιλοσοφία της ταξινόμησης και θεραπείας των Τ λευχαιμιών σε ξεχωριστά πρωτόκολλα σήμερα, βασίζεται στις συγκεκριμένες φαρμακολογικές ιδιότητες των Τ βλαστών δηλαδή στην ευαισθησία τους σε παράγοντες όπως η ασπαραγινάση και το 506u και τη σχετική ανθεκτικότητα τους σε χαμηλές δόσεις μεθοτρεξάτης.

Η παρουσία νόσου στο ΚΝΣ στην πρωτοδιάγνωση αποτελεί επίσης ένα δυσμενή προγνωστικό παράγοντα παρά την εντατικοποίηση της θεραπείας με επιπλέον ενδοραχιαία θεραπεία και ακτινοβολία του ΚΝΣ (Burger B, 2003).

2.Γενετικά και Μοριακά προγνωστικά χαρακτηριστικά λευχαιμικών κυττάρων

Τα διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα ανάλογα με τους υπότυπους της ΟΛΛ αποδίδονται κυρίως σε ευαισθησία των βλαστικών κυττάρων στα κυτταροστατικά ή σε ανθεκτικότητα τους εξαιτίας γενετικών ανωμαλιών (Pui C.H., Relling M.V. 2004). Ευνοϊκά γενετικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με λευχαιμία από πρόδρομα Β κύτταρα περιλαμβάνουν υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα) και σύντηξη TEL - AML1. Η μοναδική ευαισθησία των υπερδιπλοειδικών βλαστών στη χημειοθεραπεία σχετίζεται με την τάση τους να υφίστανται αυτόματα απόπτωση όταν καλλιεργηθούν *in vitro* και να συγκεντρώνουν υψηλά επίπεδα μεθοτρεξάτης και ενεργών πολυγλουταμινικών μεταβολιτών της (Pui C.H. 2002, Ferrando A.A. 2003).

Τα κύτταρα της ΟΛΛ που εκφράζουν το γόνο TEL - AML1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη ασπαραγινάση in vitro για λόγους όχι απόλυτα κατανοητούς (Armstrong S.A. 2004). Η ευνοϊκή πρόγνωση που συνδέεται με αυτό το γονότυπο, παρατηρείται κυρίως σε κλινικές μελέτες που περιέχουν εντατική χημειοθεραπεία ιδιαίτερα με ασπαραγινάση (Pui C.H, Relling M.V. 2004). Μελέτες από την ομάδα ογκολογίας των Η.Π.Α. καθώς και από το Ερευνητικό Ιατρικό Συμβούλιο της Βρετανίας έχουν δείξει ότι οι τρισωμίες 4,10, 17 και 18 είναι ενδεικτικές καλής πρόγνωσης (Pui C.H, Schrappe M. 2004) χωρίς επίσης να υπάρχει ικανοποιητική ερμηνεία. Η προ-B ΟΛΛ με t(1:19)/E2A-PBX1 σύντηξη συνδέονταν με κακή πρόγνωση όταν η θεραπεία δεν ήταν εντατική. Σήμερα όμως με την εντατικοποίηση της θεραπείας η ομάδα αυτή κατατάσσεται σε μία από τις πιο ευνοϊκές υποομάδες της λευχαιμίας των παιδιών με αποτελέσματα μακράς επιβίωσης ίσης που πλησιάζουν ακόμη και το 90% (Pui C.H, Sandlung J.T. 2004). Ασθενείς με το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας ή τη μετάθεση t(4:11) (MLL -AF4) θεωρείται ότι έχουν πολύ κακής πρόγνωσης νόσο. Η πρόγνωση είναι ακόμη χειρότερη όταν αφορά σε εφήβους ενώ σχετικά καλύτερη για παιδιά ηλικίας 1-9 χρόνων με χαμηλά λευκά στην πρωτοδιάγνωση (Pui C.H. 2002). Στην ΟΛΛ με MLL -AF4 σύντηξη, τα βρέφη κάτω του 1 έτους έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση από τα μεγαλύτερα παιδιά (Pui C.H. 2002). Οι διαφορές στην πρόγνωση ανάλογα με την ηλικία μπορεί να οφείλονται σε δευτεροπαθή γενετικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την ανάπτυξη του κυττάρου στόχου που μετατρέπεται σε κακόηθες, σε φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του ασθενούς ή και σε συνδυασμό όλων των παραπάνω. Πρόσφατα η χαρτογράφηση της έκφρασης των γονιδίων έδειξε ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις Τ ΟΛΛ μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη συμμετοχή ενός ή περισσότερων ειδικών ογκογονιδίων: LYL1 και LMO2, HOX11, TAL1 και LMO1 ή LMO2, HOX11 L2 και MLL-ENL (Ferrando A.A. 2003 , Pui C.H. Relling M.V. 2004)

Σε δευτεροπαθείς μεταλλάξεις τα γονίδια που ενέχονται είναι το FLT-3 που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης σημαντικό για την φυσιολογική ανάπτυξη των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Armstrong S.A. 2004) καθώς και αυτά που ενέχονται στην κατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος ($\rho 16^{INK4a}$, $\rho 14^{ARF}$) και $\rho 53$ (Pui C.H., Relling M.V. 2004). Αυξημένη έκφραση της HDM2 (πρωτεΐνη που συνδέεται με το $\rho 53$ και προκαλεί την αποσύνθεσή του), μεταλλάξεις στο $\rho 53$ και αναστολή του μεταγραφέντος στόχου $\rho 21^{cp1}$ έχουν συνδεθεί με πολύ κακή πρόγνωση. Σε μια ευρεία μελέτη γονιδίων σε κύτταρα ευαίσθητα στη θεραπεία σε σχέση με ανθεκτικά ταυτοποιήθηκαν 123 διακριτά γονίδια των οποίων η έκφραση επιβεβαίωσε αντοχή στη χημειοθεραπεία και πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε δύο ανεξάρτητες σειρές ασθενών (Holleman A, 2004). Το εύρημα αυτό προσέδωσε νέες προοπτικές για τη θεραπεία στοχεύοντας σε καινούργιες στρατηγικές για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της αντοχής στα φάρμακα.

<u>Υπότυπος Λευχαιμίας</u>	<u>Ευνοϊκοί Προγνώστικοί παράγοντες</u>	<u>Δυσμενείς προγνώστικοί παράγοντες</u>
B πρόδρομο κύτταρο	Υπερδιπλοειδισμός (>50 χρωμοσώματα) TEL - AML1 Τρισωμίες 4, 10 και 17	Πτωχή πρώιμη ανταπόκριση. MLL αναδιατάξεις σε βρέφη. Χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας. Λευκά $>50 \times 10^9 /L$
T κύτταρο	Υπερέκφραση HOX<1 T(11;19) με σύντηξη MLL-ENL	Πτωχή πρώιμη ανταπόκριση Όχι εντατική χημειοθεραπεία

Πίνακας 4 Γενετικά και Μοριακά χαρακτηριστικά λευχαιμικών κυττάρων (Pui C.H., Relling M.V. 2004)

3. Παράγοντες Φαρμακοδυναμικής και Φαρμακοκινητικής

Είναι γνωστό ότι μεγάλες διαφορές μεταξύ των ασθενών όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων καθώς και τη φαρμακολογική δράση μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της θεραπείας. Σαν παραδείγματα αναφέρονται οι χαμηλές δόσεις μεθοτρεξάτης και μερκαπτοπουρίνης που έχουν συνδεθεί με πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα (Pui C.H, Relling M.V. 2002). Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει γενετικούς πολυμορφισμούς ορισμένων ενζύμων για μεταβολισμό των φαρμάκων, μεταφορέων, υποδοχέων ή κυττάρων στόχων με θεραπευτικό αποτέλεσμα (Evans W.E. 2004). Ανεπάρκεια ομόζυγη ή ετερόζυγη της μεθυλτρανσφεράσης της θειοπουρίνης δηλαδή του ενζύμου που καταλύει την S μεθυλίωση (απενεργοποίηση) της μερκαπτοπουρίνης έχει συνδεθεί με έλεγχο της λευχαιμίας αλλά και αυξημένο κίνδυνο δευτεροπαθών κακοηθειών από την προηγηθείσα θεραπεία (Holleman A. 2004). Αδρανείς πολυμορφισμοί διαφόρων ενζύμων έχουν συνδεθεί με αυξημένη τοξικότητα στη χημειοθεραπεία αλλά και με πολύ καλό έλεγχο της λευχαιμίας λόγω εντατικής χημειοθεραπείας. Από την άλλη μεριά ομοζυγωτία για επαναλαμβανόμενο πολυμερισμό της συνθετάσης της θυμιδίνης που αποτελεί σημαντικό στόχο της μεθοτρεξάτης έχει συνδεθεί με αυξημένη έκφραση του ενζύμου και πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα (Krajinovic M. 2002). Είναι λοιπόν επόμενο ότι ασθενείς με παρόμοιες μεταλλάξεις απαιτούν αυξημένες δόσεις μεθοτρεξάτης για βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

4. Υπολειπόμενη νόσος

Η μέτρηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease;MRD) στο μυελό (δηλαδή ανοσοφαινοτυπική ανίχνευση λευχαιμικών κυττάρων, ανάλυση με PCR των αντιγόνων των υποδοχέων στις αναδιατάξεις των γόνων) είναι πολύ περισσότερο ειδική και ευαίσθητη από τη μορφολογία των βλαστών (Pui C.H. 2001). Πράγματι σε πρόσφατες μελέτες ο καθορισμός της MRD κατέστησε πολλούς προηγούμενα ταυτοποιήσιμους προγνωστικούς παράγοντες μη ισχυρούς με την εξαίρεση του t(4;11)/ MLL-AF4 και του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας (Pui C.H, Sandlund J.T. 2004). Ασθενείς στους οποίους επιτυγχάνεται ανοσολογική ή μοριακή ύφεση, η οποία ορίζεται ως λευχαιμικό φορτίο <0.01% εμπύρνα κύτταρα μυελού στο τέλος της ύφεσης, εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση (Pui C.H, 2001.) Ασθενείς οι οποίοι είναι σε μορφολογική ύφεση αλλά έχουν MRD 1% ή περισσότερο στο τέλος της 6^{ης} εβδομάδας εφόδου έχουν μεγάλη πιθανότητα υποτροπής και θεωρούνται υποψήφιοι για αλλογενετική μεταμόσχευση. Λόγω του ότι η εφαρμογή της κυτταρομετρίας όπως και της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτη της MRD σε όλους τους ασθενείς, η εκτίμηση της MRD σήμερα εφαρμόζεται σαν ένα τμήμα της ταξινόμησης της νόσου σε κλινικές μελέτες πρώτης γραμμής στο Νοσοκομείο Παιδων St. Jude (ΗΠΑ). Μια συνεχιζόμενη μελέτη της γερμανικής ομάδας (BFM) καθώς και της Ιταλικής Παιδιατρικής Αιματολογικής /Ογκολογικής Ομάδας ερευνά κατά πόσον η εντατικοποίηση της θεραπείας μετά την ύφεση της μπορεί με ασφάλεια να μειωθεί για τους ασθενείς σταθερού κινδύνου στους οποίους επιτυγχάνεται μοριακή ύφεση. Παρόλο που δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι η εντατικοποίηση της θεραπείας βελτίωσε το αποτέλεσμα σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα MRD στο τέλος της εφόδου τα αποτελέσματα του ενισχυμένου BFM πρωτοκόλλου ενισχύουν αυτή την άποψη. Σε αυτή τη μελέτη η εντατικοποίηση της θεραπείας ωφέλησε σαφώς τους ασθενείς

υψηλού κινδύνου με αργή ανταπόκριση στην έφοδο (Nachman J.B. 1998). Περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να καθοριστεί αν το αποτέλεσμα της MRD σχετίζονται με τα προφίλ της έκφρασης των γόνων.

5.Στρατηγική Θεραπείας για την ΟΛΛ στα παιδιά

Η επιτυχημένη θεραπεία της ΟΛΛ στα παιδιά έχει δώσει ποσοστά πάνω από 80% μακράς επιβίωσης ίασης. Η θεραπεία είναι έντονη παρά την αφαίρεση στις περισσότερες περιπτώσεις της ακτινοβολίας κρανίου. Στις διάφορες υποομάδες της νόσου παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στο αποτελέσματα (Gaynon P.S. 2000) οι οποίες πιθανόν οφείλονται σε κυτταρογενετικούς υποτύπους(Rui C.H, Evans WE 1998).

6.Χαρακτηριστικά των ηλικιακών ομάδων στα παιδιά με ΟΛΛ

Η κατανομή των σημαντικών προγνωστικών παραγόντων όπως η ηλικία, τα λευκά στην πρωτοδιάγνωση η νόσος του ΚΝΣ είναι διαφορετικά στις διάφορες ανοσοφαινοτυπικές υποομάδες (Pullen J. 1999). Χαρακτηριστικά διαγνωστικά ευρήματα σε 3076 ασθενείς (ηλικία 0-18 χρόνων) που κατατάχτηκαν σε 2 μελέτες του πρωτοκόλλου BFM το 1986 & το 1990 φαίνονται στον πίνακα 5 αναδεικνύοντας τις μεγάλες διαφορές όχι μόνο μεταξύ των διάφορων ηλικιακών ομάδων αλλά και μεταξύ των λευχαιμιών από πρόδρομο Β κύτταρο και των Τ λευχαιμιών ιδιαίτερα στις ηλικίες πάνω από 10 χρόνων. (Πίνακας 2Α, 2Β)

Αντίθετα μεταξύ της προ -Β ΟΛΛ η μικρή υπεροχή των αγοριών διατηρείται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες εκτός από τα βρέφη.

Ηλικία

Χαρακτηριστικά	<1	1-5	6-9	10-14	15-18
A. προ Β ΟΛΛ					
Συνολικός αριθμός ασθενών	10	1709	464	318	89
Άρρενα (ποσοστό %)	50	54,6	52,4	54,7	53,9
Λευκά (per μL)					
<10,000	12,2	49,7	60,8	54,4	46,1
10-19,999	7,8	18,4	11,4	15,4	13,5
20-99,999	21,1	25,4	21,3	21,1	31,5
≥100,000	58,9	6,5	6,4	9,2	9,0
Προσβολή ΚΝΣ	11,1	1,4	0,4	1,3	4,5
t(9;22)	-	1,3	4,9	5,5	4,1
Πτωχή ανταπόκριση σε Pdn	24,4	4,3	6,0	9,4	7,9
Πρώιμος θάνατος	2,2	0,6	0,4	1,6	5,6
Όχι πλήρης ύφεση	3,3	0,1	0,2	1,3	1,1
υποτροπή	45,6	15,8	25,4	29,9	28,1
Θάνατος στην ύφεση	2,2	1,1	1,3	3,8	0
10χρονα πιθανότητα επιβίωσης ελεύθερης συμβαμάτων	46,3(5,3)	80,4(1,0)	70,8(2,2)	60,6(2,9)	63,7(5,3)

Πίνακας 5α: Χαρακτηριστικά ασθενών, ανταπόκριση στη θεραπεία σε υποομάδες ηλικιών προ Β ΟΛΛ

Β. Τ ΟΛΛ					
Συνολικός αριθμός ασθενών		117	132	122	32
Άρρενα		71,8	69,7	77,9	90,6
Λευκά (per μL)					
<10,000		7,7	14,4	17,2	12,5
10-19,999		6,8	12,9	9,0	3,1
20-99,999		38,5	40,2	36,9	50
≥100,000		47,0	32,6	36,9	34,4
Προσβολή ΚΝΣ		10,3	9,1	7,4	12,5
Πτωχή ανταπόκριση σε Pdn		32,5	29,5	32,0	40,6
Πρώιμος θάνατος		2,6	1,5	-	-
Όχι πλήρης ύφεση		2,6	2,3	2,5	3,1
υποτροπή		22,2	26,5	31,1	37,5
Θάνατος στην ύφεση		6,8	1,5	0	0
10χρονια πιθανότητα επιβίωσης ελεύθερης συμβαμάτων		58,3(4,8)	66,1(4,2)	63,9(4,5)	58,5(8,8)

Πίνακας 5 β Χαρακτηριστικά ασθενών, ανταπόκριση στη θεραπεία σε υποομάδες ηλικιών Τ ΟΛΛ

*Συνδυασμός δεδομένων από μελέτες ΟΛΛ-BFM86(n=998) και ΟΛΛ- BFM90 (n=2178)

7. Αρχικοί καθοριστικοί παράγοντες του θεραπευτικού αποτελέσματος ανά ηλικία

Το φύλο έχει ιδιαίτερη σημασία σε όλες τις ηλικιακές ομάδες με ποσοστά επιβίωσης ελεύθερης νόσου στη δεκαετία, που είναι για τα κορίτσια 10% υψηλότερα απ' ότι για τα αγόρια. Επίσης ο αριθμός των λευκών, ο ανοσοφαινότυπος και τα γενετικά χαρακτηριστικά των βλαστών ενδεικτικά

έχουν προγνωστική αξία. Αναφέρεται ότι ασθενείς με προ Β ΟΛΛ TEL / AML1 και BCR/ABL αρνητικοί μεγαλύτεροι από 10 χρόνων έχουν χειρότερη πρόγνωση από ότι μικρότερα παιδιά με τα ίδια χαρακτηριστικά με δεκαετή επιβίωση- ίαση για ηλικίες 10-14 χρόνων 52,5%, 44.4% για 15-18 χρόνων αλλά 72,1% και 81,9% για 6-9 χρόνων και 1-5 αντίστοιχα (δεδομένα από μελέτες του BFM '90 και '95) (Rui C.H. Gaymon P.S. 2002).

8.Εκτίμηση της πρώιμης ανταπόκρισης στη θεραπεία

Η επιμονή των βλαστών στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό μετά τις πρώτες 7 ή 14 ημέρες θεραπείας είναι προγνωστικός δείκτης υποτροπής της νόσου (Gaymon P.S. 1997). Ο πίνακας 2 δείχνει τη μεγάλη ετερογένεια σε σχέση με τις ομάδες ηλικίας και την πρώιμη ανταπόκριση στη θεραπεία δηλαδή στην προδιζόνη που υποδηλώνει και in vivo ευαισθησία στη νόσο. Αν η Τ συγκριθεί με την προ Β ΟΛΛ 3 έως 7 φορές περισσότεροι ασθενείς με Τ ΟΛΛ έχουν περισσότερους από 1000 βλάστες /μL μετά από την «αρχική φάση» με προδιζόνη και μια δόση ενδοραχιαίας μεθοτρεξάτης την ημέρα 1. Η αντοχή στην ύφεση είναι επίσης ελαφρώς υψηλότερη στην Τ ΟΛΛ απ' ότι στις προ Β . Στις μελέτες των BFM πρωτοκόλλων ήταν εφικτό να καταδειχθεί ότι μεταξύ των ασθενών με <1000 βλάστες την 8^η ημέρα θεραπείας παρατηρείται και καλύτερη πρόγνωση (Lanten M. 2001).

9.Κατευθυνόμενη θεραπεία σε σχέση με την υπολειπόμενη νόσο

Η πλειονότητα των υποτροπών συμβαίνει σε ασθενείς που έχουν ενδιάμεσο κίνδυνο με βάση τα αρχικά χαρακτηριστικά τους και την ανταπόκριση στη θεραπεία (Vilmer E. 2000). Στη μελέτη της ΟΛΛ του BFM-90, 90% των ασθενών είχαν ταξινομηθεί σε σταθερού και ενδιάμεσου κινδύνου. Παρά ταύτα τα 2/3 από αυτούς υποτροπίασαν. Για το λόγο αυτό μια πλέον ακριβής εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία κατέστη επιτακτική

και αυτό φαίνεται ότι επιτεύχθηκε με την εισαγωγή της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Neale G.A. 2004).

Η σύγκριση των κλινικών μελετών ήταν δύσκολο να καθορίσει ποια ήταν πιο αποτελεσματική για ελάττωση της MRD. Σήμερα μερικά πρωτόκολλα για ΟΛΛ χρησιμοποιούν την εκτίμηση της MRD για προσαρμογές στη θεραπεία κυρίως όμως για να διαχωρίσουν ποιοι ασθενείς είναι σε κίνδυνο για υποτροπή (Jan Dongen J.J. 1999).

10. Σημαντικές παράμετροι για τη θεραπεία

Ύφεση - έφοδος

Ένα από τα κύρια ευρήματα στη θεραπεία εφόδου της ΟΛΛ τα τελευταία χρόνια είναι και η επιλογή του σωστού κορτικοειδούς. Μερικές κλινικές μελέτες τυχαιοποίησαν τη δεξαμεθαζόνη σε σχέση με τη πρεδνιζόνη. Μερικοί ερευνητές παρατήρησαν σοβαρή τοξικότητα με τη δεξαμεθαζόνη (Hurwitz C.A, 2000, Arico M, 2002, Mantadakis E. 2004). Η δόση των στεροειδών μπορεί να ξεπεράσει την ανοχή στη θεραπεία (Schwartz C.L. 2001). Σε χαμηλού κινδύνου ΟΛΛ ασθενείς που θεραπεύτηκαν στο πρωτόκολλο CCG-1922 τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν δεξαμεθαζόνη ή κορτιζόνη κατά τη διάρκεια της θεραπείας εκτός από την αργή επανέφοδο στην οποία όλοι οι ασθενείς έλαβαν δεξαμεθαζόνη. Αν και δεν ήταν δυνατόν να καθορισθεί απόλυτα, φάνηκε ότι η χρήση της δεξαμεθαζόνης έδινε καλύτερα αποτελέσματα (Boston B.C. 2003).

11. Αλλογενετική μεταμόσχευση

Στην πρώτη ύφεση η ένδειξη για αλλογενετική μεταμόσχευση θα πρέπει να μελετηθεί προσεχτικά και να προσαρμοστεί στα τρέχοντα αποτελέσματα με τη χημειοθεραπεία (Silverman L.B. 2001). Μερικοί υπότυποι ΟΛΛ όπως αυτοί που εκφράζουν το χρωμόσωμα Φιλαδέλφιας φαίνεται ότι θα επωφεληθούν από αυτή την παρέμβαση. Από την άλλη πλευρά καλύτερη αντιμετώπιση στη υποστηρικτική θεραπεία αλλά κυρίως περισσότερο ακριβής και λεπτομερής τυποποίηση των HLA θα βοηθήσει στην επιλογή μη συγγενών δοτών (Locatelli F. 2002).

12.Θεραπεία συντήρησης

Υπάρχουν πολλές μεταναλύσεις όσον αφορά αυτό το σκέλος της Θεραπείας και είναι πράγματι πολύ δύσκολο να τις εκτιμήσει κανείς με ακρίβεια. Μερικές ομάδες μελέτης όπως το BFM δεν χρησιμοποιούν καμία ενδορραχιαία θεραπεία ή και ώσεις στεροειδών στη φάση αυτή. Άλλοι επαναλαμβάνουν ανά τακτά χρονικά διαστήματα αυτές τις Θεραπείες. Σε σχέση με τη διάρκεια υπάρχει γενική ομοφωνία ότι η σμίκρυνση της περιόδου συντήρησης σε λιγότερο από 24 μήνες ποτέ δεν ήταν διαχρονικά επιτυχής (Childhood -ALL- Collaborative -Group 1996).

13.Μελλοντικές προοπτικές για την ΟΛΛ των παιδιών

Παρά το υψηλό ποσοστό ίασης στην ΟΛΛ των παιδιών οι ανθεκτικές μορφές της νόσου αντιπροσωπεύουν την κύρια αιτία θανάτου καρκίνου στα παιδιά.

Οι προσπάθειες που γίνονται κατευθύνονται σε νέα αντιλευχαιμικά φάρμακα σε χαρτογράφηση νέων γονιδίων που προδικάζουν σε υψηλό ποσοστό την πρόγνωση αλλά και την ένταση της Θεραπείας και σε ανακάλυψη μικρών

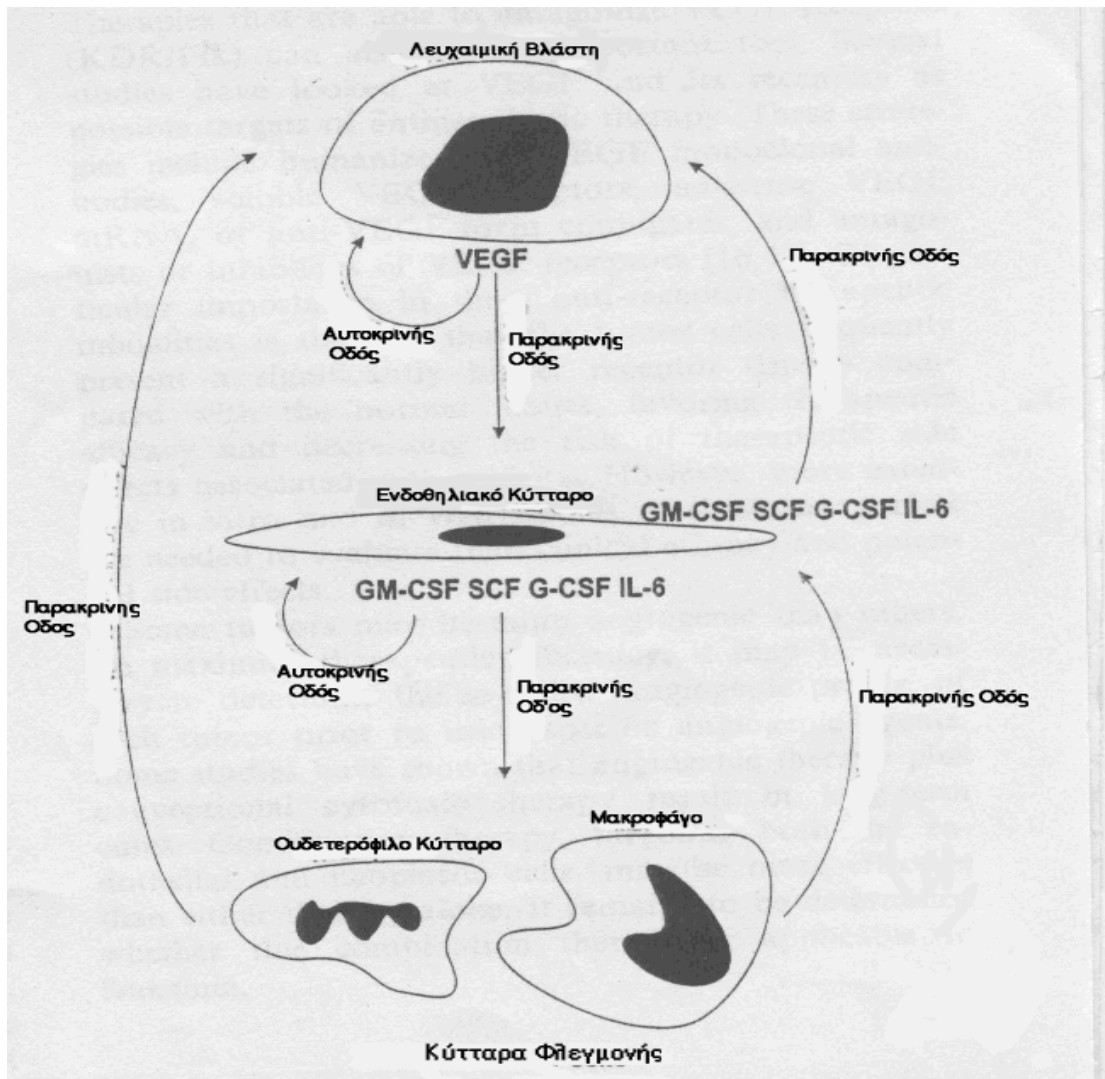
διαπερατών στο λευχαιμικό κύτταρο μορίων που αναστέλλουν τη μετεγγραφή ειδικών γόνων (Gonesfeld J.M. 1997).

Σχετικά πρόσφατα οι παρατηρήσεις ότι αγγειογενετικοί μηχανισμοί ενέχονται και στη λευχαιμία, έδωσαν νέα ώθηση σε θεραπεία με αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες οι οποίοι σε συνδυασμό ίσως με την κλασσική θεραπεία μπορούν στο μέλλον να στοχεύσουν και σε καταστολή των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί λευχαιμική εκτροπή.

VI Αγγειογένεση και λευχαιμία –πιθανός μηχανισμός

Η διαδικασία της λευχαιμογένεσης δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως διευκρινισθεί. Ένας από τους λόγους για τους οποίους δεν είναι πλήρως κατανοητή η παθοφυσιολογία της λευχαιμίας είναι το ότι το λευχαιμικό μικροπεριβάλλον είναι πλούσιο σε κυτταρικά και χημικά συστατικά. Λόγω αυτού τα κύτταρα του στρώματος και τα παρεγχυματικά κύτταρα φαίνεται ότι δρουν και αντιδρούν υπό τον έλεγχο ενός άριστα οργανωμένου δικτύου κυτταροκινών (Palmblad J. 2001). Δεν είναι πλήρως κατανοητό γιατί οι αγγειογενετικοί παράγοντες που προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα ή οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά αλλά και άλλα στρωματικά κύτταρα παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (Keyhani A 2001). Λόγω του ότι η λευχαιμία είναι κακοήθεια του αιμοποιητικού είναι δύσκολη η κατανόηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης σαν παράγοντα ανάπτυξης και εξέλιξης της νόσου σε σχέση με τους συμπαγείς όγκους. Ένα σχήμα που έχει προκύψει από διάφορες ερευνητικές ομάδες οι οποίες μελετούν την αγγειογένεση στην λευχαιμία φαίνεται στο σχήμα 2. Αυτό το μοντέλο βασίζεται σε αυτοκρινείς και παρακρινείς οδούς μεταξύ των κυττάρων του στρώματος και των παρεγχυματικών κυττάρων του μυελού. Τα λευχαιμικά κύτταρα απελευθερώνουν αγγειογενετικούς παράγοντες , π.χ τον VEGF ο οποίος συνδέεται με υποδοχείς που φέρουν τα λευχαιμικά κύτταρα στην επιφάνεια τους και δημιουργείται μια αυτοκρινής οδός , ή εναλλακτικά συνδέεται με τους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων σε μια παρακρινή δράση. Στη συνέχεια τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται με τη τυροσινική κινάση που ευοδώνεται από τον VEGF με συνέπεια την απελευθέρωση και άλλων αυξητικών παραγόντων όπως GM-CSF, IL-6, SCF και G-CSF. Η απελευθέρωση αυτών των αυξητικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε παραγωγή και πολλαπλασιασμό λευχαιμικών

κυττάρων (παρακρινής οδός) αλλά και σε πολλαπλασιασμό των ίδιων των ενδοθηλιακών κυττάρων (αυτοκρινής οδός). Επιπλέον οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί ακόμη να ασκούν διεγερτική δράση στα κύτταρα φλεγμονής, δηλαδή στα ουδετερόφιλα και μακροφάγα τα οποία μπορεί να έχουν θετική αλληλοεξάρτηση στα βλαστικά και ενδοθηλιακά κύτταρα ευοδώνοντας έτσι συνεχώς τη παρακρινή οδό. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι τα διεγερμένα ενδοθηλιακά κύτταρα όχι μόνο απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες αλλά επίσης εξωκυττάρια ουσία και μεταλλοπρωτεΐνάσες οι οποίες προκαλούν εξαγγείωση και μετανάστευση νεοσχηματισθέντων ενδοθηλιακών κυττάρων και διάσπαση των ισομερών μορφών του VEGF που είναι συνδεδεμένες με την εξωκυττάρια ουσία. Συνεπώς αυτά τα γεγονότα απεικονίζουν ένα ιδανικό περιβάλλον στο μυελό για την ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων.



Σχήμα 2: Ρυθμιστικές δυνάμεις που επιδρούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση (τροποποιημένο από Keyhani A 2001).

VII .Προβλήματα στην αξιολόγηση της αγγειογένεσης σε νεοπλασίες του αιμοποιητικού ιστού

Από αρκετές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει σαφές αν τα λευχαιμικά κύτταρα τα οποία συνήθως αναπτύσσονται απουσία ενός ορατού συνδετικού ιστικού στρώματος και κυκλοφορούν στο αίμα εξαρτώνται και από την νεοαγγείωση για να πολλαπλασιαστούν και να καταλάβουν το χώρο που έχουν τα φυσιολογικά αιμοποιητικά στοιχεία. Με βάση τη θεωρία της αυτοκρινούς και παρακρινούς οδού που αναφέρθηκε (KeyhaniA. 2001) φαίνεται ότι τα «διεγερμένα» ενδοθηλιακά κύτταρα εκτός από την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων οδηγούν και σε απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών με τελικό αποτέλεσμα την αγγειογένεση.

Επειδή όμως η αυξημένη αγγειογένεση όπως έχει διαφανεί από τις περισσότερες μελέτες μπορεί να είναι αποτέλεσμα άλλων παραγόντων όπως η υποκειμενική επιλογή περιοχών για αρίθμηση (αξιολόγηση) των αγγείων ή η μη αντικειμενική αξιολόγηση των αγγείων καθώς και η διαφορετική μεγέθυνση στην παρατήρηση μεταξύ των διαφόρων ομάδων μελέτης (Vermeulen 1996), απαιτούνται μέθοδοι αντικειμενικές που να λαμβάνουν υπ' όψη τους παραπάνω παράγοντες.

VIII. Εφαρμογή της μορφομετρίας στην εκτίμηση της αγγειογένεσης

1. Μετρήσεις “στιγμών”

Η μορφομετρία δίνει πληροφορίες για τρισδιάστατους σχηματισμούς από μετρήσεις που γίνονται σε δισδιάστατες οπτικές εικόνες.

Η θεωρία ότι οι σχέσεις επιφάνειας εκφράζουν σχέσεις όγκων παρουσιάστηκε από το γάλλο γεωλόγο M.A.Delesse (1847) ο οποίος διετύπωσε την αρχή που φέρει το όνομα του: « Σε ένα πέτρωμα που αποτελείται από έναν αριθμό ορυκτών το εμβαδόν που καλύπτεται από ένα δεδομένο ορυκτό στην επιφάνεια μιας τυχαίας διατομής του πετρώματος είναι ανάλογο με τον όγκο του ορυκτού στο πέτρωμα». Η αρχή του Delesse εφαρμόστηκε σε μικροσκοπικές εικόνες μετάλλων από τον Ρώσο μεταλλειολόγο A.A.Glagolen το 1934 ενώ ο Αμερικανός H.N.Chalkley (Chalkley H.N. 1949) προκειμένου να υπολογίσει τις πολύπλοκες σχέσεις επιφάνειας στοιχείων ιστολογικών παρασκευασμάτων και επομένως τις σχέσεις των όγκων τους εισήγαγε την μεθοδολογία της μέτρησης στιγμών στις ιστολογικές τομές.

Με την μέτρηση αυτή αν το οπτικό πεδίο καλυφθεί από ένα πλέγμα στιγμών που βρίσκονται σε σταθερές μεταξύ τους αποστάσεις, τότε ο λόγος του αριθμού των στιγμών που καλύπτει την επιφάνεια του προς μέτρηση ιστοικού στοιχείου προς τον αριθμό των στιγμών που καλύπτει το σύνολο των ιστοικών στοιχείων μας δίνει την σχέση της επιφάνειας του προς μέτρηση στοιχείου, προς την επιφάνεια του ιστού και επομένως το ποσοστό του όγκου που καταλαμβάνει αυτό μέσα στον ιστό.

Η μέτρηση στιγμών έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του όγκου που καταλαμβάνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα σε ένα νεόπλασμα δεδομένου ότι ο όγκος αυτός μπορεί να διαφέρει μεταξύ νεοπλασμάτων ίδιων συνολικών διαστάσεων (π.χ. καρκινωμάτων) εξαρτώμενος από την κυτταροβρίθεια (Delides G.S 1981).

Για τον υπολογισμό μεμονωμένων στοιχείων (μιτώσεων) οι Haarasalo και συν (1989) πρότειναν τον τύπο του διορθωμένου κατ'όγκο μιτωτικού δείκτη(VCMI):

$$VCMI = k \frac{\sum_{i=1}^n MI_i}{\sum_{i=1}^n V_i}$$

όπου n = ο αριθμός των οπτικών πεδίων MI = ο αριθμός των μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο που λαμβάνεται τυχαία από τις περισσότερο κυτταροβριθείς περιοχές και Vn το ποσοστό του όγκου % υπολογιζόμενο υποκειμενικά. Η σταθερά k (=100/πr²)αφορά τη διάμετρο του οπτικού πεδίου και υπολογίζεται αν οι μετρήσεις δεν γίνουν στο ίδιο μικροσκόπιο

Ο τύπος αυτός υπολογίζει τον αριθμό μιτώσεων ανά τετραγωνικό χιλιοστό νεοπλασματικού ιστού.και για τον λόγο αυτό έχει γίνει αντικείμενο κριτικής (Baak J.P. 1991 b).

Προκειμένου να υπολογιστεί η αγγειοβρίθεια καρκινωμάτων μαστού οι Protorara et al τροποποίησαν τον τύπο του Haarasalo και την υπολόγισαν με τον τύπο:

$$Vi = \frac{\frac{V1}{T1} + \frac{V2}{T2} + \dots + \frac{Vn}{Tn}}{n}$$

όπου Vi= (vascularity index), V= ο αριθμός των αγγείων και T = ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων που συμπίπτουν σε στιγμές επιπροβαλλόμενου πλέγματος.

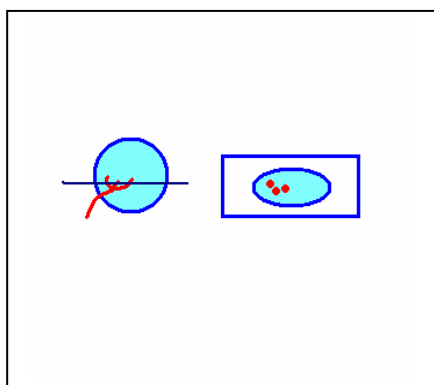
Στην εξίσωση περιλαμβάνεται και η σταθερά k εφόσον γίνουν μετρήσεις σε περισσότερα από 1 μικροσκόπια.

Ο παραπάνω δείκτης Vi έχει εφαρμοστεί σε συμπαγείς όγκους (καρκινώματα μαστού).

Επειδή το υλικό μας αφορούσε βιοψίες μυελών οι οποίες εκτός από τα μυελικά κύτταρα περιλαμβάνουν και λιποκύτταρα ο τύπος Vi τροποποιήθηκε ώστε να συνυπολογίζονται και αυτά όπως αναφέρεται στο «υλικό και μέθοδοι».

2. Μετρήσεις Θερμών σημείων (hot spots)

Η μέθοδος μέτρησης των Θερμών σημείων εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό της αγγειογένεσης δεδομένου ότι έχει γίνει αποδεκτό ότι η νεοαγγείωση ξεκινά από αγγεία που εισέρχονται στον νεοπλασματικό ιστό από την περιφέρεια του όγκου (βλ. Σχήμα 3). Οι θέσεις όπου τα αγγεία διακλαδίζονται φαίνονται στην ιστολογική τομή ως συρρέοντα αγγεία και αποτελούν ένα hot spot. Έχει γίνει επίσης αποδεκτό ότι τα Hot spots πρέπει να αναζητούνται στην περιφέρεια των συμπαγών όγκων.



Σχήμα 3 (Thompson W.D. 2001)

Το πλεονέκτημα της μεθόδου μέτρησης hot spots έναντι αυτής των σημείων είναι ότι η τελευταία απαιτεί πολύ χρόνο και κόπο. Τα μειονεκτήματα αφορούν στην ετερογένεια μεταξύ περιοχών της ιστολογικής τομής και θέσεων του νεοπλάσματος καθώς και στην υποκειμενικότητα της μεθόδου (De Jong J.S. 1995).

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά η ομάδα του Baak πρότεινε την αυτοματοποίηση της μεθόδου με αναλυτή εικόνας και λογισμικό που διατίθεται σήμερα στο εμπόριο (Belien J.A. 1999).

Οπωσδήποτε είναι σαφές ότι η μέτρηση των αγγείων σε όλη την ιστολογική τομή και ο υπολογισμός τους σε σχέση με τον όγκο των νεοπλασματικών κυττάρων είναι ακριβέστερη. Επιπλέον δεν είναι

τεκμηριωμένο ότι η νεοαγγείωση του λευχαιμικού μυελού ακολουθεί το πρότυπο των συμπαγών όγκων και ενδεχόμενα η μέτρηση των hot spots να μην είναι η ακριβέστερη.

Στη παρούσα μελέτη εφαρμόσθηκε η μέθοδος της αξιολόγησης των μικροαγγείων με βάση τον «διορθωμένο όγκο» (volume corrected) και η σύγκριση της με την κλασσική μέθοδο αξιολόγησης της αγγειογένεσης με αυτή των θερμών σημείων "hot spots" με τη χρήση του αντισώματος κατά FVIIIrAg .

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν:

1. η εκτίμηση της αγγειογένεσης στη διάγνωση της ΟΛΛ σε παιδιά , με τη χρήση μιας νέας μορφομετρικής μεθόδου που λαμβάνει υπ ' όψη την κυτταροβρίθεια του μυελού.
2. η σύγκριση της μεθόδου αυτής με την κλασικά εφαρμοζόμενη μέθοδο της μικροαγγειακής πυκνότητας (hot spots)
3. η πιθανή πρόταση για ευρύτερη χρήση της νέας αυτής μεθόδου για αντικειμενική αξιολόγηση της αγγειογένεσης και παρακολούθησης στις διάφορες φάσεις της νόσου.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΟ ΒΙΟΨΙΑΣ -ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η μελέτη έγινε σε οστεομυελικές βιοψίες από παιδιά της Παιδιατρικής κλινικής Αιματολογίας-Ογκολογίας του ΠΑΓΝΗ . Το τεχνικό μέρος της μελέτης καθώς και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τη μελέτη των ιστοικών τομών του μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 26 οστεομυελικές βιοψίες εμπεδωμένες σε παραφίνη από αντίστοιχο αριθμό παιδιών, τα οποία διαγνώστηκαν με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και 27 οστεομυελικές βιοψίες παιδιών μαρτύρων.

Η ομάδα των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία απαρτιζόταν από 16 αγόρια και 10 κορίτσια ηλικίας από 3 - 13,5 ετών (μέση ηλικία 6.44 έτη) με ΟΛ Β-σειράς. Ο μυελός των οστών σε όλα τα παιδιά με ΟΛ ήταν διηθημένος με βλάστες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%.

Όλοι οι ασθενείς διαγνώστηκαν και παρακολουθήθηκαν στη Παιδιατρική Αιματολογική -Ογκολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου από το 1/1/ 1992 έως 31/3/2005.

Για όλα τα παιδιά υπήρχαν τεκμηριωμένα κλινικοεργαστηριακά στοιχεία που προέκυπταν ύστερα από κλινική εξέταση καταγραφή και μελέτη των φύλλων νοσηλείας.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 27 οστεομυελικές βιοψίες παιδιών χωρίς διήθηση του μυελού, που έπασχαν από κακοήθειες και καλοήθειες αιματολογικές διαταραχές και στα οποία ήταν απαραίτητη η βιοψία για τη σταδιοποίηση της νόσου τους και τη διάγνωση. Η μέση ηλικία των παιδιών της ομάδας ελέγχου ήταν από 1 μηνός έως 21 ετών με μέση ηλικία 8.5 έτη.

Αναλυτικά 7 παιδιά έπασχαν από λέμφωμα Hodgkin, 2 από μη Hodgkin λέμφωμα, 3 από νευροβλαστωμα, 1 από γαγγλιονεύρωμα, 2 από σαρκώμα

(ραβδομυομυωσάρκωμα, σάρκωμα Ewing), 2 από όγκο του Wilms, 1 από όγκο ΚΝΣ, 1 από ιστιοκυττάρωση από κύτταρα Langerhans ,4 από Θρομβοπενία , 3 από αδιευκρίνιστη αναιμία και 1 από ερυθροκυττάρωση.

Πίνακας 6 Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

Α.Α. Ασθενούς	Ξύλο	Ηλικία (έτη)	Ανοσοφαινότυπος	καρυότυπος	Ομάδα κινδύνου	Αιματολογική Εικόνα (Hb: g/dl, λευκά : /κκχ)	Θεραπεία	Υφεση 33 ^η ημέρα	Υποτροπή	Παρούσα Κατάσταση [Π.Υ.:Πληρης υφεση (μήνες)]
1. ΟΛΛ	Θήλυ	3	CD 10 92%, CD 19 93%, CD 34 93%, CD 20 16 %, HLA DR 92 %	Κ.Φ	σταθερού	Hb:6,5 Λευκά 6400	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 20+
2.ΟΛΛ	Άρρεν	4 5/12	CD 10 93%, CD 19 94 %, CD 34 94%, CD 20 0.01%, HLA DR 92 %	Κ.Φ	σταθερού	Hb 8,5, Λευκά 7400	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 58+
3. ΟΛΛ	Άρρεν	3	CD10 91%	TEL/AML	υψηλού	Hb 6.8 Λευκά 69.500	BFM95	ΝΑΙ	ΝΑΙ μυελού 41 μήνες	Ύφεση 8 +
4. ΟΛΛ	Θήλυ	5 5/12	CD10 97%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	υψηλού	Hb 9.6 Λευκά 500.000	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 42+
5. ΟΛΛ	Θήλυ	4 2/12	CD 10 95%, CD 19 96%, CD 34 1%, HLA DR 95%	Κ.Φ	σταθερού	Hb 6.9 Λευκά 48.000	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 42+
6. ΟΛΛ	Άρρεν	3 3/12	CD10 81%, CD 19 81 %, CD 34/CD 10 70%, HLA DR 74 %	Κ.Φ	σταθερού	Hb 5.6 Λευκά 5.000	BFM95	ΝΑΙ	ΝΑΙ μυελού 49 μήνες	Ύφεση 3+
7. ΟΛΛ	Άρρεν	13 2/12	CD10 88%	4pdel 5, 8q del 9	σταθερού	Hb 7.6 Λευκά 44.800	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 43 +
8. ΟΛΛ	Θήλυ	4 5/12	CD10 89%, CD13 82%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 5.6 Λευκά 36.400	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 53 +

A. Α. Ασθενούς	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Ανοσοφαινότυπος	καρυότυπος	Ομάδα κινδύνου	Αιματολογική Εικόνα (Hb: g/dl, λευκά : /κκχ)	Θεραπεία	Υφεση 33 ^η ημέρα	Υποτροπή	Παρούσα Κατάσταση [Π.Υ.:Πλήρης υφεση (μήνες)]
9. ΟΛΛ	Θήλυ	9 5/12	CD 10 97%, CD 19 97%, CD 34 50%, HLA DR 98%	BCR/ABL	υψηλού	Hb :10,8 Λευκά 431.000	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 8 +
10.ΟΛΛ	Άρρεν	3	CD 10 28%, CD 19 37%, CD34 3,2%, HLA DR 41%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 8.3 Λευκά 11.400	BFM90	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 76+
11.ΟΛΛ	Άρρεν	13	CD 10 86%, CD 19 93%, HLA DR 86%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 9.9 Λευκά 5.000	BFM90	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 75+
12. ΟΛΛ	Θήλυ	4 8/12	CD 10 84,8%, CD 19 82,7%, HLA DR 78,2%	Κ.Φ	σταθερού	Hb 6,4 Λευκά 18. 400	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 8+
13.ΟΛΛ	Θήλυ	5	CD10 80%, CD19 90% HLA DR 55%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	υψηλού	Hb 4.1 Λευκά 70.000	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 88 +
14.ΟΛΛ	Θήλυ	4	CD 10 90 % , CD 19 80%	ΚΦ	σταθερού	Hb 12,9 Λευκά 1900	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΘΑΝΑΤΟΣ ΑΠΟ ΛΟΙΜΩΞΗ
15.ΟΛΛ	Άρρεν	11	CD 10 55% CD 19 74%, CD 34 78%, HLA DR 21%	† (12 ; 17)	σταθερού	Hb 9.5 Λευκά 2.500	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 42+
16.ΟΛΛ	Άρρεν	8	CD10 76%	Κ.Φ	σταθερού	Hb 8.3 Λευκά 4.500	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 41+
17. ΟΛΛ	Άρρεν	5 5/12	CD10 99 % , CD 19 99% HLA DR99%,	Κ.Φ	σταθερού	Hb :11 Λευκά 21.800	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ8 +

Α.Α. Ασθενούς	Ώλο	Ηλικία	Ανοσοφαινότυπος	Καρούτυπος	Ομάδα κινδύνου	Αιματολογική Εικόνα (Hb: g/dl, λευκά : /κκχ)	Θεραπεία	Υφεση 33 ^η ημέρα	Υποτροπή	Παρούσα Κατάσταση [Π.Υ.:Πλήρης υφεση (μήνες)]
18.ΟΛΛ	Άρρεν	4	CD 10 84%, CD 19 85%, CD 34 81 %	Κ.Φ	σταθερού	Hb 7.5 λευκά 2.600	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 42
19.ΟΛΛ	Άρρεν	5 5/12	CD10 95%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	υψηλού	Hb 12.8 λευκά 100.000	BFM95	ΝΑΙ	ΝΑΙ ΚΝΣ ΜΥΕΛΟΣ	ΘΑΝΑΤΟΣ
20.ΟΛΛ	Άρρεν	16	CD10 89%	Κ.Φ	σταθερού	Hb 8.5 λευκά 12.300	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΘΑΝΑΤΟΣ
21.ΟΛΛ	Άρρεν	2 7/12	CD 19 94%, CD 10 94%, HLA DR 92%, CD 20 65%, CD 45 99,9%	Κ.Φ	σταθερού	Hb 4,2 λευκά 8.300	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΠΥ 39+
22.ΟΛΛ	Άρρεν	1 1/12	CD 19 50%, CD 10 56%, CD 20 19%, CD 45 80%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 7.8 λευκά 7.700	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 3+

Α.Α. Ασθενούς	Φύλο	Ηλικία	Ανοσοφαινότυπος	καρυότυπος	Ομάδα κινδύνου	Αιματολογική Εικόνα (Hb: g/dl, λευκά : /κκx)	Θεραπεία	Υφεση 33 ^η ημέρα	Υποτροπή	Παρούσα Κατάσταση [Π.Υ.:Πληρης υφεση (μήνες)]
23.ΟΛΛ	Θήλυ	5 6/12	CD 10 97%, CD 19/CD 34 1,3 % , HLADR : 88 %	Κ.Φ	σταθερού	Hb 9.1 λευκά 2.300	BFM95	ΝΑΙ	ΝΑΙ ΚΝΣ	Υποτροπή 54+
24.ΟΛΛ	Άρρεν	3 5/12	CD 10 68%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 8.7 λευκά 9.100	BFM95	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 52 +
25ΟΛΛ	Θήλυ	9 6/12	CD 19 98% CD 10 98% CD 34 87% HLA DR 98%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 9,9 λευκά 16.500	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 9+
26.ΟΛΛ	Άρρεν	3 9/12	CD 19 84.3% CD 10 93.4% HLA DR 80% TdT 84%	Χωρίς επαρκείς μεταφάσεις	σταθερού	Hb 5,7 λευκά 6700	BFM 2000	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Π.Υ 12 +

2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΨΙΩΝ

Το υλικό βιοψιών μυελού μονιμοποιήθηκε επί 24 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης τελικής αραιώσης 3,7% και pH 7-7,4 (υδατικό διάλυμα 37% αερίου φορμαλδεΰδης αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:10) (Prophet EB 1992). Μετά τη μονιμοποίησή του, το υλικό τοποθετήθηκε σε βραδεία ελεγχόμενη αφαλάτωση, σε υγρό Sheffer (100 gr EDTA, 33 gr Tris, 1000 ml αποσταγμένο νερό) με pH 7-7,2 (Scheffer M.K. 1987) επί 48 ώρες. Ακολούθησε αφυδάτωση, διαύγαση και εμπότιση σε υλικό έγκλεισης ιστών, σε αυτόματο περιστροφικό επεξεργαστή (ιστοκινέττα) διάρκειας 15 ωρών και 30 λεπτών. Στη συνέχεια έγινε έγκλειση σε υλικό Paraplast (μείγμα παραφίνης και πλαστικών πολυμερών, θερμοκρασίας τήξεως 56 ° C) (Kendall, Mansfield M.A. -02048 USA).

Λαμβάνονταν διαδοχικές μικροσκοπικές τομές πάχους 3 μm επί αρνητικά φορτισμένων αντικειμενοφόρων πλακών (Superfrost Plus, O.Kindler and Co, D-79110 Freiburg ,Germany).

α. Ιστοχημικός έλεγχος

Από τις τομές αυτές δυο χρωματίζονταν με αιματοξυλίνη- ηωσίνη (H & E) και ανά μια με ιστοχημικές χρώσεις Giemsa, PAS, Gomori, Perl-Van Gieson και τριχρωμική Masson (Scheffer M K 1987).

β. Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος

Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του σήματος του τύπου της αλκαλικής φωσφατάσης με χρωμογόνο Fast Red και αντίχρωση αιματοξυλίνης. Τα κύρια βήματα της μεθόδου αυτής αναλύονται παρακάτω:

Ανοσοϊστοχημική μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης τύπου APAAP για τα μονοκλωνικά αντισώματα -κύρια βήματα της μεθόδου

- 1) Αποπαραφίνωση και βαθμιαία επανυδάτωση των ιστικών τομών
- 2) Έκπλυση με αποσταγμένο νερό
- 3) Επεξεργασία ανάκτησης αντιγονικότητας (πίνακας 7)
- 4) Επαναφορά των πλακιδίων σε θερμοκρασία δωματίου, επί πάγκου, μέσα στο υγρό ανάκτησης της αντιγονικότητας (20 min).
- 5) Έκπλυση με αποσταγμένο νερό (5 min) και εμβάπτισή του σε TBS (pH: 7,6) επί 5 min.
- 6) Επώαση, επί 30 min, με Normal Rabbit Serum (DAKO, X 902)
- 7) Επώαση, με το πρωτοταγές αντίσωμα (πίνακας 7)
- 8) Έκπλυση με TBS (pH: 7,6), 2X 5 min.
- 9) Επώαση επί 30 min, με δευτεροταγές αντίσωμα (DAKO ZO259), σε αραιώση 1/25.
- 10) Έκπλυση με TBS(pH: 7,6), 2X5 min.
- 11) Επώαση με το σύμπλοκο APAAP (DAKO D-651) επί 30 min σε αραιώση 1/25.
- 12) Έκπλυση με TBS (pH: 7,6) 2X5 min
- 13) Επώαση επί 30 min με τη χρωστική Fast Red (DAKO -K 669).
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης ,5 min
- 15) Αντίχρωση με αιματοξυλίνη Harris, 30 min
- 16) Έκπλυση με νερό βρύσης, 10 min
- 17) Επικάλυψη με Glycergel (DAKO Carpinteria, USA) και μικροσκόπηση.

Προκειμένου για τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο APAAP ,στη θέση του DAKO X 902 και στο βήμα 9 αντί του DAKO

ZO259 χρησιμοποιείται το DAKO D-306 (Swine Anti-Rabbit Ig s - αλκαλική φωσφατάση) σε αραιώση 1/50.

Τα αντισώματα που προσδιορίστηκαν στις ιστικές τομές είναι τα: FVIIIrAg , CD 34, TdT, CD 10, CD 79 α, Ig M, CD 2, CD 3, CD 7, CD 15, μυελοπεροξειδάσης /MPO, Γλυκοφορίνης C και CD 61.

Από αυτά τα FVIIIIR Ag και CD 34, χρησιμεύουν στην ανάδειξη μικροαγγείων ενώ τα λοιπά περιλαμβάνονταν στη διαγνωστική διαδικασία. Για τις μετρήσεις των αγγείων χρησιμοποιήθηκε τελικά ο FVIIIIR Ag ο οποίος έχει καλύτερα αποτελέσματα στην σήμανση των ενδοθηλιακών κυττάρων γεγονός που διαπιστώθηκε στη παρούσα μελέτη αλλά αναφέρεται και στη σχετική βιβλιογραφία (Martin L 1997, El-Gazzar R.F. 2005)

Τα κύρια χαρακτηριστικά των αντισωμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Σε κάθε ανοσοχρώση χρησιμοποιήθηκε γνωστός θετικός μάρτυρας από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του ΠΑΓΝΗ και αρνητικός μάρτυρας (αντικατάσταση του πρωτοταγούς αντισώματος από φυσιολογικό ορό του είδους του ζώου στο οποίο είχε παραχθεί το κάθε πρωτοταγές αντίσωμα).

Η λήψη όλων των ιστικών τομών γινόταν στον ίδιο χρόνο ώστε να αποφεύγεται η απώλεια υλικού από την επανευθείαση του κύβου παραφίνης. Επίσης, σε ένα χρόνο έγιναν και όλες οι ανοσοχρώσεις του κάθε δείγματος.

Αντίσωμα κατά :	Τύπος αντισώματος	Προέλευση αντισώματος	Αραίωση	Χρόνος Επώασης	Ανάκτηση αντιγονικότητας
FVIII R Ag	Πολυκλωνικό (Rabbit)	DAKO ,A0082	1/100	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
CD 34	Μονοκλωνικό (Mouse)	Immunotech IMM 0786	1/50	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
TdT	Μονοκλωνικό (Mouse)	Novocastra NCL-TdT -339	1/25	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
CD 10	Μονοκλωνικό (Mouse)	Novocastra NCL-270	1/25	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
CD 79a	Μονοκλωνικό (Mouse)	Neomarkers MS-357	1/50	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
Ig M	Μονοκλωνικό (Mouse)	DAKO M7255	1/25	60'	Πρωτεϊνάση K 5x1'
CD 3	Πολυκλωνικό (Rabbit)	DAKO A0452	1/50	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
CD 2	Μονοκλωνικό (Mouse)	Neomarkers MS-1074-S	1/30	120'	Μικροκύματα EDTA PH:8 5'x3
CD 7	Μονοκλωνικό (Mouse)	DAKO M7255	1/25	60'	Μικροκύματα EDTA PH:8 5'X3
CD 15	Μονοκλωνικό (Mouse)	Neomarkers MS-1259-P	1/20	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
Μυελοπεροξειδάσης (MPO)	Πολυκλωνικό (Rabbit)	DAKO A-0398	1/3000	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5X3
Glycophorin C	Μονοκλωνικό (Mouse)	DAKO MO820	1/50	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3
CD 61	Μονοκλωνικό (Mouse)	DAKO MO753	1/40	60'	Μικροκύματα Citrate Buffer PH:6 5x3

Πίνακας 7 Χαρακτηριστικά αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

DAKO Cytomation, Denmark A/S, D/K -2600, Glostrup
Novocastra Labs, Newcastle upon Tyne NE 128EW, UK
Immunotech, 13009 Marseille, France
Neomarkers, Fremont, CA, USA

3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

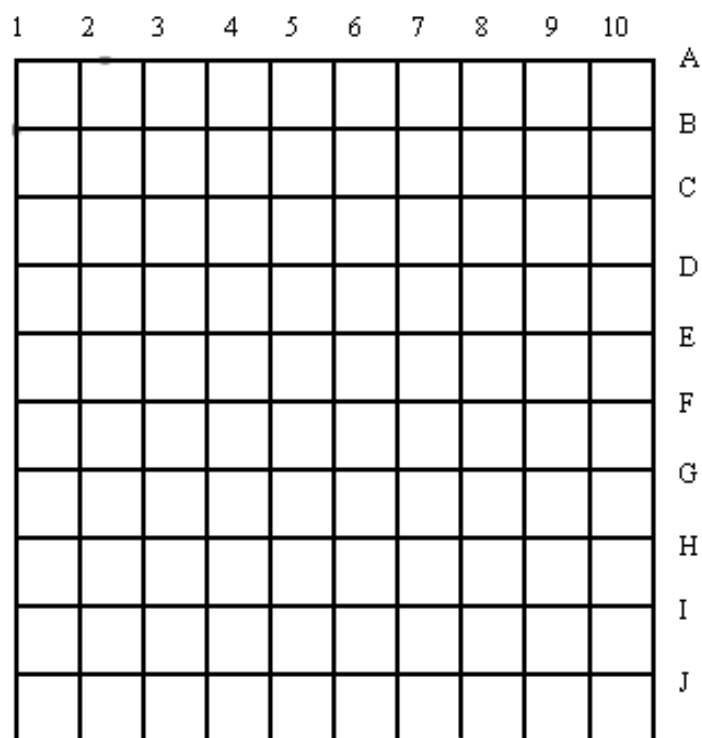
Η μικροαγγείωση του μυελού υπολογίστηκε με τη βοήθεια οπτικού (φωτο)μικροσκοπίου Zeiss, Standard 16. Στον ένα από τους δυο προσοφθάλμιους (Kpl/W10X/18) είχε τοποθετηθεί προσοφθάλμιο τετράγωνο πλέγμα με αρίθμηση-σήμανση, καθέτως και οριζοντίως, σταθερού μήκους πλευράς 1 εκ (cm) διαιρεμένο συολικά σε 100 τετραγωνίδια σταθερού μήκους, πλευράς 1 χιλ (mm), [τύπου NE35 (Graticule Ltd, Kent, England)].

Μετά την εγκατάστασή του προσοφθάλμιου πλέγματος (Graticule) και πριν από την κάθε μέτρηση, γινόταν βαθμονόμησή του με βάση βαθμομετρική αντικειμενοφόρο πλάκα (Zeiss, 5+ 100/100 mm) 76 mm x 76 mm με 100 υποδιαιρέσεις του 1/100 mm η καθεμιά, της κλίμακας την οποία φέρει.

Οι εννέα εσωτερικές οριζόντιες και κάθετες γραμμές που διαιρούν το τετράγωνο πλέγμα σε τετραγωνίδια δημιουργούν στα σημεία της διατομής τους και της συμβολής με το περιφερικό πλαίσιο, 121 σημεία "κόμβους" ή στιγμές (Σχήμα 4). Αυτές χρησιμεύουν για τη μέτρηση των διατομών των μικροαγγείων σε κάθε ανοσοχρωματισμένη με αντίσωμα κατά FVIIIrAg εξεταζόμενη ιστική τομή.

Η εξέταση των ιστικών τομών έγινε σε τελική μεγέθυνση X400 (προσοφθάλμιος/αντικειμενικός φακός). Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 40/0,75 (160/0.17 Zeiss).

Η αξιολόγηση της μικροαγγείωσης έγινε χωρίς να είναι γνωστά κατά το χρόνο του ελέγχου, τα λοιπά κλινικοεργαστηριακά δεδομένα και η έκβαση των ασθενών.



Σχήμα 4 Αναπαράσταση του τετράγωνου πλέγματος που τοποθετήθηκε στον προσοφθάλμιο φακό για τη μέτρηση της μικροαγγείωσης.

α. Μετρήσεις εστιών μικροαγγειακής πυκνότητας (hot spots - θερμά σημεία)

Η μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας έγινε με βάση την αρχή του Weidner (Weidner N. 1991), τη διεθνή συμφωνία για τη μέτρηση της MVD (Veurmeulen P.B. 1996) και την εφαρμογή των οδηγιών που προήλθαν από τη μελέτη Radro και συν. (2000) για την εκτίμηση της αγγειογένεσης στο μυελό των οστών.

Μετά τον έλεγχο του συνόλου του κάθε παρασκευάσματος σε μικρές μεγεθύνσεις (τελικές μεγεθύνσεις X40 και X100) γινόταν επιλογή τριών περιοχών με τη μεγαλύτερη αγγειοβρίθεια (hot spots), αριθμός που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ο απαραίτητος για αυτού του είδους τις μετρήσεις (Offeresen B.V. 2003). Η μέτρηση των μικροαγγείων γινόταν σε μεγέθυνση X400 με πλήρη σάρωση των τριών hot spots. Οι τιμές των καταγράφονταν και ως τελική τιμή θεωρήθηκε η διάμεση τιμή των τριών μετρήσεων. Μετρήθηκαν όλες οι διατομές μικροαγγείων (τριχοειδών, αρτηριδίων και φλεβιδίων). Δεν λαμβάνονταν υπ' όψη διατομές αγγείων μεγαλύτερες του 1 χιλιοστού (1mm).

Τα μικροαγγεία σε άμεση γειτνίαση με τις οστεοδοκίδες ή σε θέσεις πυκνού συνδετικού ιστού δε συμπεριλαμβάνονταν στη μέτρηση. Όλα τα θετικά ανοσοχρωματισμένα (κόκκινα) κυτταρικά στοιχεία με κυτταρομορφολογικούς χαρακτήρες ενδοθηλιακού κυττάρου, μεμονωμένα ή κατά μικροαρθροίσεις, είτε σχημάτιζαν αναγνωρίσιμο στη μεγέθυνση X400 κυτταρικό αυλό είτε όχι, μετρήθηκαν, θεωρούμενα στοιχεία της μικροαγγείωσης (Weidner N. 1991). Κυτταρικά στοιχεία τα οποία δεν πληρούσαν τους μορφολογικούς χαρακτήρες ενδοθηλιακού κυττάρου δεν καταμετρήθηκαν.

β. Εκτίμηση της μικροαγγείωσης του μυελού με εφαρμογή του κατ' όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης

Η μικροαγγείωση του μυελού των οστών εκτιμήθηκε επίσης και εκφράστηκε με την εφαρμογή του κατ'όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης (Volume corrected Microvessel density Index/VC-MVDI) ο οποίος ισούται με τον αριθμό των μικροαγγείων ανά κλάσμα νεοπλασματικών κυττάρων και φυσιολογικών κυττάρων του μυελού των οστών (εμπύρηνα κύτταρα μυελού/εμπύρηνα κύτταρα +λιποκύτταρα, NBMC/NBMC +λιποκύτταρα).

Ο αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων μιας περιοχής του μυελού, τα οποία αντιστοιχούν στα μικροαγγεία της περιοχής αυτής προσδιορίστηκαν με μια τροποποιημένη τεχνική μέτρησης στιγμών (point counting technique, Elias H. 1983, Haapasalo H. 1989). Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο προσοφθάλμιο πλέγμα 121 στιγμών που αξιοποιήθηκε στη μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας (όπως παραπάνω).

Μετρήθηκαν τα μικροαγγεία και ο αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού, τα οποία συνέπιπταν με τα σημεία διασταύρωσης του προσοφθάλμιου πλέγματος ανά περιοχή προβολής του προσοφθάλμιου πλέγματος επί του οπτικού πεδίου. Οι μετρήσεις κάλυπταν το σύνολο της έκτασης της ανοσοχρωματισμένης ιστικής τομής, της κάθε περίπτωσης.

Μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης κάθε hot spot και τη καταγραφή των αποτελεσμάτων ανά πεδίο προβολής του προσοφθάλμιου πλέγματος, υπολογιζόταν ο επιμέρους VC-MVDI (partial VC-MVDI) σε κάθε πεδίο, καλυπτόμενο από το προσοφθάλμιο πλέγμα, που εξεταζόταν.

Ως τελικός VC-MVDI του κάθε παρασκευάσματος θεωρήθηκε η μέση τιμή του συνόλου των μερικών VC-MVDI, που υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$VC - MVDI = \frac{\frac{V1}{(NBMC1/Tot 1)} + \frac{V2}{(NBMC2/Tot 2)} + \dots + \frac{Vn}{(NBMCn /Tot n)}}{N}$$

Όπου

V1..... Vn = ο αριθμός των μικροαγγείων ανά πεδίο προβολής του προσοφθάλμιου πλέγματος.

NBMC1....NBMCn = ο αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού που συνέπιπταν με τις στιγμές του προβαλλόμενου πλέγματος.

Tot 1...Tot n = ο συνολικός αριθμός των στιγμών του πλέγματος, σε κάθε προβολή του επί της ιστικής τομής, που συνέπιπταν με εμπύρηννα κύτταρα του μυελού και με λιποκύτταρα.

N =ο αριθμός των οπτικών πεδίων που κάλυπταν την κάθε εξεταζόμενη ιστική τομή (ο αριθμός των προβολών του προσοφθάλμιου πλέγματος που κάλυπταν την εξεταζόμενη ιστική τομή).

Προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των στιγμών που έπρεπε συνολικά να μετρηθεί σε κάθε περίπτωση ώστε η μέτρηση να είναι αξιόπιστη, υπολογίσθηκε το Σχετικό Σταθερό Σφάλμα (RSE) το οποίο πρέπει να είναι ≤

του 0.05 σύμφωνα με τον τύπο: $RSE = \frac{\sqrt{1 - NBMC}}{\sqrt{n}}$

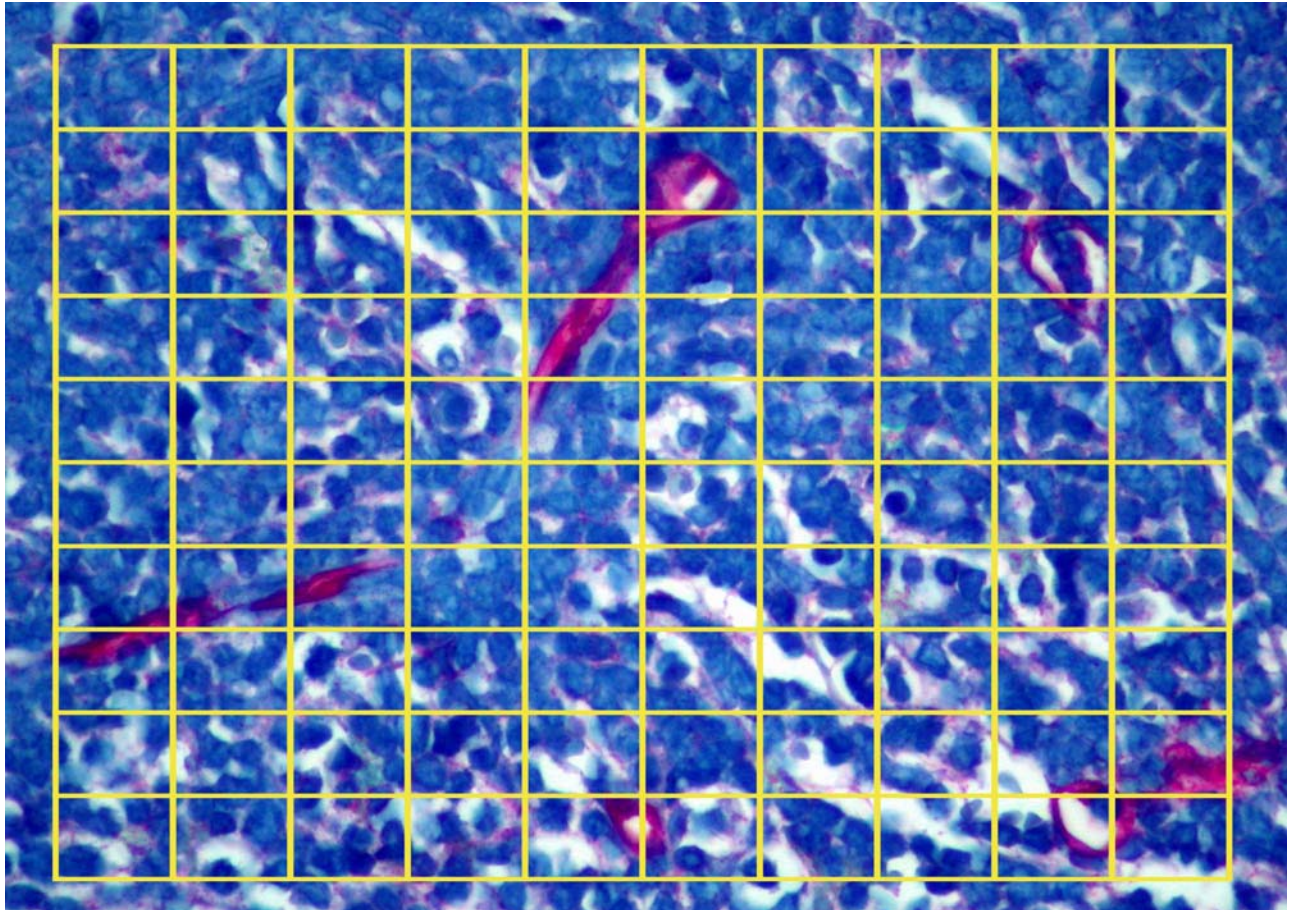
Η μέτρηση γίνεται σε 50 τυχαία οπτικά πεδία με πλέγμα 100 σημείων (από τα 121 σημεία του πλέγματος αγνοούνται τα σημεία συμβολής με τις πλευρές του τετραγώνου) και μετρώνται τα κύτταρα του μυελού που συμπίπτουν με αυτά.

ΑΠ	4	4	5	3	4	4	6	4	2	3	3	4	4
Σ/Π	23	13	15	28	19	16	27	26	29	24	25	21	17
ΣΣ	92	52	75	84	76	64	162	104	58	72	75	84	68

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μετρήσεις όπου ΑΠ είναι ο αριθμός πεδίων το ΣΠ οι στιγμές/πεδίο και ΣΣ το σύνολο στιγμών (πχ στην πρώτη στήλη σε 4 οπτικά πεδία 23 στιγμές/100 συνέπιπταν με κύτταρα μυελού και το σύνολο στα πεδία αυτά ήταν 92. Η παρουσίαση έγινε έτσι για λόγους σύντηξης του πίνακα).

Το σύνολο των στιγμών που συνέπιπταν με κύτταρα ήταν 1066 και η μέση τιμή 21.32 (21,32% = 0,21).

Όταν αντικατασταθεί το RSE με το ζητούμενο 0.05 η εξίσωση λύνεται ως προς το n που είναι ο αριθμός των σημείων/στιγμών που πρέπει να μετρηθεί (De Hoff R.T. 1968). Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις η μέση τιμή των στιγμών ήταν 318 στιγμές που να συμπίπτουν με κύτταρα. Περιπτώσεις που δεν θα πληρούσαν το κριτήριο αυτό (μη επαρκές υλικό βιοψίας) δεν θα έπρεπε να περιληφθούν στην μελέτη. Τέτοιες όμως περιπτώσεις δεν υπήρχαν στο υλικό μας.



Εικόνα 4 Στην εικόνα φαίνονται τα αγγεία (κόκκινα) ύστερα από χρώση με το αντίσωμα κατά του FVIII RAg και το επιπροβαλλόμενο στον προσοφθάλμιο φακό, πλέγμα, που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των μικροαγγείων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η μέση τιμή είτε της μικροαγγειακής πυκνότητας (μέθοδος hot spots) είτε του κατ'όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης (VC-MVDI) \pm το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (standard error of the mean-SE.M) των 27 ιστικών τομών εμπεδωμένων σε παραφίνη της ομάδας ελέγχου και 26 οστεομυελικών βιοψιών των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στη διάγνωση.

Για τη σύγκριση μεταξύ των δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε Mann-Whitney U-test και οι τιμές του $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν.

A/A ΟΛΛ	VC-MVDI	Hot spots
1.ΟΛΛ	2,402	5
2.ΟΛΛ	1,509	4
3.ΟΛΛ	1,675	2
4.ΟΛΛ	0,295	1
5.ΟΛΛ	2,125	3,33
6.ΟΛΛ	3,681	5
7.ΟΛΛ	0,351	3
8.ΟΛΛ	2,164	3,33
9.ΟΛΛ	0,302	1,47
10.ΟΛΛ	1,329	2,5
11.ΟΛΛ	0,569	2
12.ΟΛΛ	0,041	0,02
13.ΟΛΛ	1,354	2,666
14.ΟΛΛ	0,436	1,53
15.ΟΛΛ	0,633	2
16.ΟΛΛ	0,292	0,666
17.ΟΛΛ	1,5	2
18.ΟΛΛ	0,48	3
19.ΟΛΛ	1,373	4,11
20.ΟΛΛ	0,791	2,83
21.ΟΛΛ	0,12	1,2
22.ΟΛΛ	0,2	0,1
23.ΟΛΛ	0,333	2
24.ΟΛΛ	0,254	1
25.ΟΛΛ	0,441	3,11
26.ΟΛΛ	0,443	1,43

Πίνακας 8 Αποτελέσματα μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (hot spots) και του κατ'όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης (VC-MVDI) στα δείγματα πρωτοδιάγνωσης παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία .

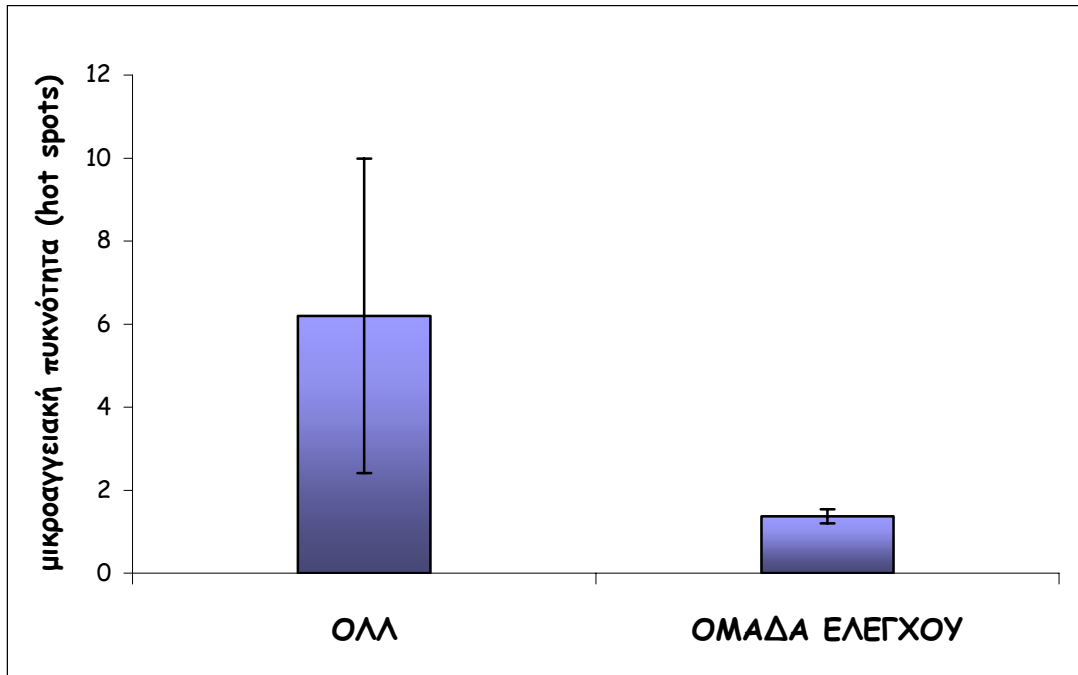
A/A Μάρτυρες	VC-MVDI	Hot spots
M1	0,475	1
M2	1,581	3,5
M3	0,192	2
M4	0,642	2
M5	0,363	1,5
M6	0,584	2
M7	0,447	2
M8	0,551	2
M9	0,167	1,166
M10	1,015	2,666
M11	0,248	1,33
M12	0,371	0,666
M13	0,405	1,83
M14	0,282	1,5
M15	0,341	2
M16	0,458	1
M17	0,214	1
M18	5,048	0,333
M19	1,184	1,666
M20	1,467	2,666
M21	0,394	0,333
M22	1,001	1
M23	0,721	0,02
M24	0,692	0,666
M25	0,231	1
M26	0,01	0,01
M27	0,027	0.03

Πίνακας 9 Αποτελέσματα μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (hot spots) και του κατ' όγκο διορθωμένου δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης (VC-MVDI) στα δείγματα της ομάδας ελέγχου (μάρτυρες).

Η μικροαγγειακή πυκνότητα εκτιμήθηκε και μετρήθηκε και με τις δυο μεθόδους μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα VIII (FVIIIrAg). Η μικροαγγειακή πυκνότητα που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο των hot spots στις 27 οστεομυελικές βιοψίες της ομάδας ελέγχου είχε μέση τιμή 1.3 ± 0.16 (εύρος από 0.01-3.5) ενώ βρέθηκε αυξημένη στη διάγνωση της ΟΛΛ με τιμή 6.2 ± 3.79 (εύρος από 0.1-101). Η διαφορά της μικροαγγειακής πυκνότητας μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία βρέθηκε στατιστικά σημαντική $p < 0.05$.

Στα ίδια δείγματα ο κατ'όγκο διορθωμένος δείκτης πυκνότητας της μικροαγγείωσης (VC-MVDI) βρέθηκε για την ομάδα ελέγχου 0.70 ± 0.18 (εύρος 0.01-5.048) ενώ για τα δείγματα οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας 0.943 ± 0.169 (εύρος 0.041-3.681). Αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική $p > 0.05$.

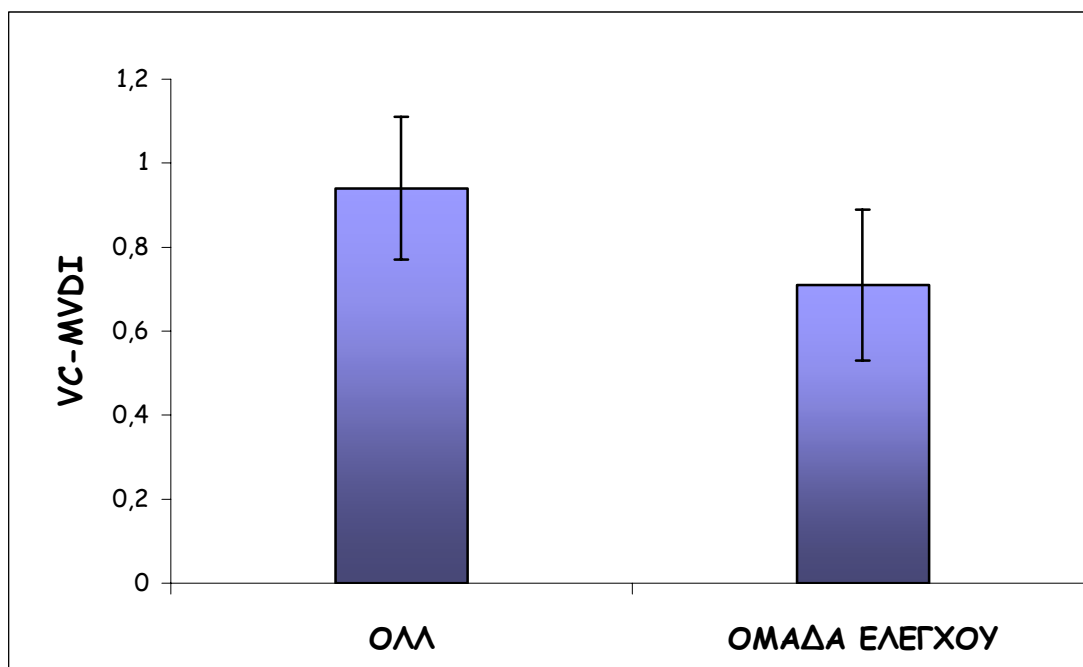
Τα αποτελέσματα φαίνονται στα σχεδιαγράμματα 1 και 2.



Σχεδιάγραμμα 1

Η στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U test) μετρώντας την μικροαγγειακή πυκνότητα με τη μέθοδο των hot spots στις δύο ομάδες δίνει $p < 0.05$, δηλαδή στατιστικά σημαντική διαφορά.

	mean	SEM	min	max	n
ΟΛΛ	6,2	3,79	0,1	101	26
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	1,37	0,168	0,01	3,5	27



Σχεδιάγραμμα 2

Η στατιστική ανάλυση με το Mann-Whitney U test ανάμεσα στις δύο ομάδες (ΟΛΛ και ομάδα ελέγχου) δίνει $p > 0.05$, ένδειξη ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη νεοαγγείωση στις δύο ομάδες μετρώντας τον κατ'όγκο διορθωμένο δείκτη πυκνότητας της μικροαγγείωσης (VC-MVDI).

	mean	SEM	min	max	n
ΟΛΛ	0,94	0,17	0,004	3,681	26
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	0,71	0,18	0,001	5,048	27

Συζήτηση

Η μελέτη της αγγειογένεσης στον καρκίνο έχει συνεισφέρει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του, ιδιαίτερα σε συμπαγείς κακοήθειες (Moehler, 2003).

Πρόσφατα ο ρόλος της έχει αρχίσει να διερευνάται και σε αιματολογικές κακοήθειες κυρίως ενηλίκων (Aguayo A. 2000, Padro T. 2000, Moehler T.M. 2003, Korkoloroulou P. 2001) ενώ ελάχιστες αναφορές έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την αγγειογένεση με κακοήθη νοσήματα των παιδιών όπως συμπαγείς όγκους (Ρανλακovic Η, 2001) αλλά και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Perez-Atayde A, 1997, Pule MA, 2002) Η σχετική καθυστέρηση της μελέτης της αγγειογένεσης στις αιματολογικές κακοήθειες (liquid tumors) οφείλεται μάλλον στο ερώτημα ποιός είναι ο μηχανισμός με τον οποίο τα λευχαιμικά κύτταρα αναπτύσσονται απουσία ενός ορατού στρώματος και κυκλοφορούν στο αίμα ενώ παράλληλα πρέπει να είναι εξαρτημένα από μια διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων προκειμένου να πολλαπλασιάζονται και να επεκτείνονται (Perez A. 1997).

Με βάση τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα φαίνεται ότι η θεωρία των αυτοκρινών και παρακρινών αλληλεπιδράσεων στα οποία ενέχονται διάφοροι τύποι κυττάρων, παρόντων στο μικροπεριβάλλον του μυελού είναι αυτή που ευσταθεί και ερμηνεύει τη συμμετοχή της αγγειογενετικής διαδικασίας στην παθοφυσιολογία τουλάχιστον των κυριότερων αιματολογικών κακοηθειών στους ενήλικες (Aguayo A. 2000, Vacca A. 1995, Ribatti P. 1996, Korkoloroulou P. 2005).

Όσον αφορά την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των παιδιών παρά την εξαιρετικά καλή πρόγνωση που φτάνει και το 80% (Silverman L.B. 2001) σε μερικές μορφές της νόσου ένα μικρό ποσοστό, που δεν εμφανίζει δυσμενή αρχικά προγνωστικά στην πρωτοδιάγνωση, υποτροπιάζει και αυτό αποτελεί

ουσιαστικά και την κύρια αιτία θανάτου σε μια κακοήθεια δυνητικά ιάσιμη (Pui C.H. 2004).

Οι προσπάθειες στην οξεία λευχαιμία των παιδιών στρέφονται σήμερα σε νέους προγνωστικούς παθογενετικούς παράγοντες που μπορούν ξεχωρίσουν τις μορφές αυτές της νόσου που θα υποτροπιάσουν παρά τα αρχικά ευμενή προγνωστικά (Pullen J. 1999).

Η αγγειογένεση είναι ένας από τους μηχανισμούς που έχει προταθεί σαν προγνωστικός αλλά και σαν στόχος θεραπευτικός με βάση τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες (Pule M.A. 2002). Η μελέτη αυτή έχει σκοπό την αξιολόγηση της αγγειογένεσης με τη συσχέτιση στην πρωτοδιάγνωση της ΟΛΛ σε παιδιά με μετρήσεις αντικειμενικές που λαμβάνουν υπ' όψη και την κυτταροβρίθεια του μυελού έτσι ώστε τυχόν αυξημένη αγγειογένεση να μην αποδοθεί σε «επιφαινόμενο» λόγω αυτής της αυξημένης κυτταροβρίθειας.

Προηγούμενες μελέτες (Aguayo A. 2000, Keyhani A. 2001) σε ενήλικες δίνουν μια μάλλον «μηχανική» ερμηνεία για το αυξημένο ποσοστό της σε ΟΛΛ λόγω αυξημένης παροχής οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών και απομάκρυνσης μεταβολικών προϊόντων τα οποία απαιτούνται για την επιβίωση λευχαιμικών κυττάρων. Άλλοι ερευνητές αποδίδουν την αυξημένη αγγειογένεση σε συνεργική δράση μεταξύ των ΟΜΛ βλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Senger D.R. 1996, Fiedler W. 1997, Mc William N. 1998 , Bellamy W.T. 1999) ενώ ο Radro και συν. (2000) λόγω των ευρημάτων τους την ημέρα 16 από την έφοδο της θεραπείας σε ασθενείς με ΟΜΛ απέδωσαν τη μεταβολή της αγγειογένεσης σε απευθείας κυτταροτοξική δράση της χημειοθεραπείας στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ένας επιλεκτικός μηχανισμός γι' αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να ερμηνευτεί από την

απώλεια σημάτων από τα λευχαιμικά κύτταρα λόγω της απόπτωσης τους ως αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας (Fielder W. 1997).

Στην προσπάθεια να ακολουθήσουμε μεθοδολογία και κριτήρια αντικειμενικά για εκτίμηση της αγγειογένεσης στις βιοψίες μυελού παιδιών με νεοδιαγνωσμένη οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και παιδιών μαρτύρων χρησιμοποιήσαμε ως δείκτη ενδοθηλιακών κυττάρων το FVIIIrAg. Θεωρείται ότι υπερτερεί των άλλων δεικτών οι οποίοι μπορεί να σημαίνουν και άλλα στοιχεία του μυελού και αποτελεί τον πλέον ειδικό ενδοθηλιακό δείκτη ικανό να διαφοροποιεί τα μικροαγγεία από τα περιβάλλοντα ιστικά στοιχεία (Weidner N. 1995).

Επιπλέον στην αναφορά της Διεθνούς Επιτροπής Θέσπισης κριτηρίων για την εφαρμοζόμενη μεθοδολογία αξιολόγησης της αγγειογένεσης η μέθοδος των θερμών σημείων (hot spots) για τη μέτρηση πυκνότητας των μικροαγγείων έχει αναλυθεί και έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι υπάρχουν σφάλματα μερικά μη ειδικά, μερικά ειδικά. Αυτά περιλαμβάνουν την επιλογή του δείγματος του ιστού σαν μέρος του συνολικού ιστοικού δείγματος, την επιλογή της περιοχής της μέτρησης της μικροαγγείωσης τη μεγέθυνση του μικροσκοπίου και τέλος την εκπαίδευση και εμπειρία του ερευνητή (Vermeulen P.B. 1996).

Η μέθοδος είχε αρχικά εφαρμοσθεί από τους Βαακ και συν για τον υπολογισμό των μιτώσεων των κακοήθων νεοπλασμάτων όπου ως "θερμό σημείο" λαμβανόταν η «περιοχή με τη μεγαλύτερη κυτταροβρίθεια του νεοπλασματικού ιστού» και είχε σχολιασθεί αρνητικά για τους παραπάνω αναφερόμενους λόγους (Quinn C.M. 1991). Ως προς την μέτρηση των μικροαγγείων με θερμά σημεία και ο Βαακ (1995) αναφέρει ότι *«υπάρχει σημαντική ετερογένεια μεταξύ διάφορων περιοχών της ίδιας τομής, μεταξύ τομών του ιδίου κύβου παραφίνης και μεταξύ τομών από κύβους παραφίνης*

του ίδιου περιστατικού και συμπερασματικά κάποιος πρέπει να σαρώνει υπό το μικροσκόπιο όλο το υλικό για την επιλογή του καλύτερου θερμού σημείου. Η μέτρηση με θερμά σημεία είναι ικανοποιητική και έχει επαναληψιμότητα αλλά μόνο μια συγκριτική προγνωστική εκτίμηση μπορεί να δείξει κατά πόσο είναι κλινικά πιο χρήσιμη από τις συστηματικές μετρήσεις». (De Jong JS 1995) και εισηγείται την αυτοματοποίηση με αναλυτή εικόνα (Belien JA, 1999).

Στο υλικό της μελέτης μας στην αξιολόγηση της αγγειογένεσης με hot spots δεν υπάρχει πρόβλημα επιλογής «θέσης λήψης» δεδομένου ότι αυτό αφορούσε σε βιοψίες μυελού αλλά το πρόβλημα της υποκειμενικότητας εν τούτοις υφίσταται. Επιπλέον τίθενται τα ερωτήματα με πόσες π.χ. διατομές αγγείων θα μπορούσε μια εστία να θεωρηθεί "θερμό σημείο"; η προβολή ενός μόνου αγγείου μπορεί να αφορά περιφέρεια παρακειμένου "θερμού σημείου" που υπολογίστηκε ή άλλου που δεν περιλαμβάνεται στην ιστολογική τομή; και τέλος πόσα "θερμά σημεία" θα πρέπει να μετρηθούν για να θεωρηθεί η μέτρηση ικανοποιητική;

Σε μια προσπάθεια να αποσαφηνιστούν οι γκρίζες περιοχές της αρίθμησης των μικροαγγείων του μυελού σε βιοψίες παιδιών με ΟΛΛ και να αξιολογηθεί η αγγειογένεση στην πρόγνωση αλλά και σε μελλοντική θεραπεία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά μια νέα μέθοδο η οποία λαμβάνει υπ' όψη το «διορθωμένο όγκο» (volume corrected) στη μικροαγγείωση. Προκειμένου να συμπεριληφθεί στην αξιολόγηση το πολύ σημαντικό στοιχείο της κυτταροβρίθειας του μυελού τη νέα αυτή μέθοδο αξιολόγησης της αγγειογένεσης τη συγκρίναμε με προηγούμενες συμβατικές μεθόδους εκτίμησης μικροαγγειακής πυκνότητας δηλαδή με την μέθοδο των θερμών σημείων "hot spots" δηλαδή της περιοχής με τη μέγιστη πυκνότητα μικροαγγείων έτσι όπως αποκαλυπτόταν με την ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα VIII.

Τα αποτελέσματα μας με τη χρήση της VC- MVDI μεθόδου που λαμβάνει υπ' όψη τη σημαντική παράμετρο της κυτταροβρίθειας του μυελού δεν συμφωνούν με τις ελάχιστες προηγούμενες μελέτες στα παιδιά (Perez A. 1997, Pule M. 2002). Όταν στη μελέτη μας τα ίδια δείγματα εκτιμήθηκαν από τους ίδιους παρατηρητές με τη μέθοδο των «θερμών σημείων» παρατηρήθηκε αυξημένη αγγειογένεση σε σύγκριση με τους μάρτυρες στη διάγνωση της νόσου, εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Perez 1997, Pule MA, 2002). Η ερμηνεία μας γι' αυτό είναι ότι η μέθοδος των θερμών σημείων δεν λαμβάνει υπ' όψη την κυτταροβρίθεια του μυελού (Vermeulen P.B. 1996). Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη προσφέρει μια αξιόπιστη και εύκολα αναπαραγώγιμη τεχνική ανεξάρτητη από το μέγεθος του υπό εξέταση δείγματος του οπτικού πεδίου. Το μέγεθος του υπό εξέταση δείγματος, λαμβάνει υπ' όψη την κυτταροβρίθεια του μυελού αποτελώντας έτσι μια αντικειμενική προσέγγιση της εκτίμησης της αγγειογένεσης που επιτρέπει επίσης και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευτεί από τα διάφορα κέντρα.

Ένα επόμενο βήμα θα είναι να συσχετιστεί η μικροαγγειακή πυκνότητα στις βιοψίες μυελού παιδιών με ΟΛΛ με το λευχαιμικό φορτίο το οποίο είναι εφικτό λόγω του ότι τα φυσιολογικά στοιχεία του μυελού και τα λιποκύτταρα είναι μορφολογικά αναγνωρίσιμα σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις τομών.

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής έχουν ιδιαίτερη σημασία γιατί με τη νέα αυτή μέθοδο εκτιμάται η πραγματική αύξηση της αγγειογένεσης στη πρωτοδιάγνωση της ΟΛΛ και αυτή πλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης πορείας νόσου στις διάφορες φάσεις θεραπείας.

Βιβλιογραφία

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. 1998 Vascular endothelial growth factor D (VEGF D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-553.

Aguayo A, Kantarijan H, Manshoury T et al. 2000 Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes *Blood* 96:2240-2245

Aherne WA, Dunnill MS 1982 Morphometry Edward Arnold eds London

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. 1994 Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331:1480-1487.

Amstrong LC, Bjorkblom B, Hankenson A.W 2002. Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism *Mol Biol Cell* 13:1893-1905.

Αποστολίδου Ε. 2003 Διδακτορική διατριβή Πανεπιστήμιο Αθηνών

Arico M, Valsecchi MG, Conter V, et al. 2002 Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone poor response treated with double Berlin- Frankfurt- Muenster Protocol II. *Blood*. 100:420-426.

Armstrong SA, Mabon MA, Silverman LB et al. 2004 FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:3544-3546.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. 1997 Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis *Science* 275:964-967.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC 1994 Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes *Bioassays* 16:901-906.

Baak JP 1991 a. Manual of Quantitative Pathology in cancer diagnosis and prognosis Springer-Verlag, Berlin

Baak JP 1991 b. Mitosis counting in tumors *Human Pathology* 22 728-729

Bacic M., Edwards NA, and Merrill M J 1995 Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) in rat tissues. *Growth Factors* 12, 11-15

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, et al. 1996 Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1 *Blood* 87:3336-3343.

Belien JA, Somi S, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP 1999 Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol*. 52:184-192.

Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y et al 1999. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59:728-733.

Bellamy WT.2001 Expression vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies *Semin Oncol* 28:551-559.

Bergers G, Benjamin L.E 2003 Tumorigenesis and angiogenic switch *Nature* 3:401-410.

Blezinger P, Wang J, Gondo M et al.1999 Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene *Nat Biotechnol.*17:343-348.

Bornstein P, Kyriakides TR , Yang Z. 2000 Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5:61-66.

Bornstein P, Sage EH 1994 Thrombospondins *Methods Enzymol* 245:62-77

Bostom BC, Sensel MR, Sather HN et al. 2003 Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard risk acute lymphoblastic leukemia : a report from the children's Cancer Group. *Blood* 101:3809-3817.

Brekken RA, Huang X, King SW et al.1998 Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium *Cancer Res* 58:1952-59.

Brian I R, Small EJ 2005 Biology and Clinical development of Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy in Renal Cell carcinoma *J Clin Oncol* 23:1028-1043.

Britzel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al1996.Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma.*Cancer Res* 56:941- 943.

Burger B, Zimmermann M, Mann G et al. 2003 Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol.* 21:184-188.

Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V 2004 Intussusceptive angiogenesis :Its emergence,its characteristics, and its significance.*Dev Dyn* 231 :474 -477

Carmeliet P, Dor Y,Herbert JM, Fukumura D, et al1998 Role of HIF-1 alpha in hypoxia mediated apoptosis ,cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394:485-490.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G et al.1997 Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele . *Nature* 380:435-439.

- Carmeliet P, Jain RK 2000** Angiogenesis in cancer and other diseases Nature 407:249-257.
- Cernea CR, Ferraz AR de Castro IV et al 2004** Angiogenesis and skin carcinomas with skull base invasion: a case control study Head Neck 26:396-400.
- Chalkley HW 1949** Cornfield J and Park H A method for estimating volume-surface ratios. Science 110:295.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM et al. 2000** Mosaic blood vessels in tumours. Proc Natl Acad. Sci USA 97:14608-14613.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA et al. 1994** Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. Biol Reprod 51:524-530.
- Childhood -ALL- Collaborative - Group 1996** Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia overview of 42 trials involving 12000 randomized children. Lancet 347:1738-1788.
- Cine DB, Pollak ES, Buck CA et al. 1998** Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders Blood 91:3527-3561.
- Clauss M, Weich H Breier G et al. 1996** The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biologic activities: implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis J Biol Chem 271:17629-17634.
- Crist W Boyett J, Pullen J et al. 1986** Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemia in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review. Med Pediatr Oncol 14:135-139.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. 1994** Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin -1. Science 1:27-31.
- Daniak N, Davies G, Kalmanti M et al 1983** Platelet derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro J Clin Invest 71 :1206-1214.
- De Hoff RT 1968** Quantitative Microscopy. McGraw-Hill New York
- De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JP. 1995** Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. Lab Invest Dec 73: 922-926.
- De Lange DC., Melder RJ, Munn LL et al. 2001** Decorin inhibits endothelial migration and tube like structure formation :role of thrombospondin-1 Microvasc Res 62:26-42.

Delesse A 1847 Procède mécanique pour déterminer la composition des roches (extrait) *C R Academy of Science (Paris)* 25:544-545 [cited by Aherne WA , Dunnill MS .*Morphometry*. London :E Arnold publ 1982 ,p 33-45].

Delides GS, Elemenoglou J, Garas G et al. 1981 Tumor cell volume as a prognostic parameter of malignant melanoma in: O.E.C.I eds *Malignant melanoma Selected papers from the Int Meeting on Malignant Melanoma*.

Delides GS, Tzardi M, Protopapa E et al. 1990 Vascular density in bladder tumors and treatment response *Radiosensitization Newsletters* 9:10-11.

Delides GS , Venizelos J and Revesz L 1988 Vascularization and curability of stage III and IV nasopharyngeal tumors *J Cancer Res Clin Oncol* 114 : 321-323

Duffy JP, Eibel G, Reber HA et al. 2003 Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer *Mol Cancer* 2 :12-14.

Egginton S, Zhou AL, Brown MD, et al. 2000 The role of pericytes in controlling angiogenesis in vivo. *Adv Exp Med Biol* 476:81-99

El-Gazzar R.F , Macluskey M , Ogden G.R 2005 The effect of the antibody used and method of quantification on oral mucosal vascularity *Int J Oral Maxillofac. Surg* available online 10 March 2005

Elias H , Hyde DM 1983 Stereological measurements of isotropic structures. In : Elias H, Hyde DM ,editors. *A guide to practical stereology*. Basel: S. Karger p.25

Evans WE, Relling MV. 2004 Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429:464-468

Faramarz Naeim 1998 *Pathology of bone marrow* 2nd edition

Ferrando AA, Look AT. 2003 Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 40:274-280.

Ferrara N, Alitalo K. 1999 Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors *Nat Med* 5:1359-1364

Ferrara N, Davis Smyth T 1997 The biology of vascular endothelial growth factor *Endocr Rev* 18:4-25

Fidler I.J, Ellis M. 2004 L: Neoplastic angiogenesis-Not all blood Vessels are created equal. *N Engl J Med* 351:215-216

Fiedler W. , Graeven U., Ergün S. et al. 1997. Vascular endothelial growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 89:1870-1874

Folkman J 1971 Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.

Folkman J 1995a: Angiogenesis in cancer,vascular,rheumatoid and other disease. Nat Med 1:27-31.

Folkman J, Shing Y 1992 Angiogenesis J.Biol.Chem.267:10931-10934.

Folkman J.1995b Tumor angiogenesis In:Mendelson J,Howley PM, Israel MA,Liotta LA.eds.The molecular basis of cancer .Philadelphia :WB.Saunders,;206-232.

FolkmanJ 1993.Tumor angiogenesis In:Holland JF,Frei E III, Rast RC Jr,Kufe DW, Moron DL,WeichselbaumRR,eds.Cancer Medicine.3rd ed Vol1.Philadelfia :Lea&Febiger153-170.

Fong GH, Zhang L, Bryce DM et al.1999 Increased hemangioblast commitment,not vascular disorganization, is the primary defect in Flt-1 knock out mice.Development 126:3015-3025.

Fontanini G,Bigini D ,Vignati S,et al.1995 Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non small cell lung cancer J Pathol 177 :57-63.

Forootan SS, Jones AS,Helliwell TR 1999 Neoangiogenesis and squamous cell carcinoma of the tongue Cancer Detect Prev 23 :137-146.

Forsythe JA, Jiang BH, Lyer NV,et al.1996 Activation of Vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1.Moll Cell Biol 16:4604-13.

Gasparini G 2001:Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer Critical Reviews in Oncology/Hematology 37:97-114.

Gasparini G,Weidner N,Maluta S et al.1993 Intratumor microvessel density and p53 protein :Correlation with metastasis in head and neck squamous cell carcinomas Int J Cancer 55:739-744.

Gaymon PS, Desai AA, Boston BC et al. 1997 Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. A review. Cancer 80:1717-1726.

Gaymon PS, Trigg ME, Heerama NA et al. 2000 Children's cancer group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. 1983-1995. Leukemia 14:2223-2233.

Gerber HP, Hillab KJ, Ryan AM ,et al 1999 VEGF is required for growth andsurvival in neonatal mice. Development 126:1149-59.

Gerber HP, Malik AK, Solar GP et al. 2002 VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism Nature 417:954-958.

- Giatromanolaki A, Koukourakis M, O Byrne K et al. 1996** Prognostic value of angiogenesis in non small cell lung cancer *J Pathol* 179 :80-88.
- Glagolev A.A 1934.** Quantitative analysis with the microscope by the "point" method *Engin. and mining journal* 135:399 -402.
- Gonesfeld JM, Neely I, Traeger JW et al. 1997** Regulation of gene expression by small molecules. *Nature* 387:202-205.
- Good D.J, Polverini P.J, Rastinejad M.M et al. 1990** A tumor suppressor-dependant inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin, *Proc Ntl. Acad. Sci U.S.A* 96:14888-14893.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. 1996** Hypoxia- mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.
- Gragoudas E.S , Adamis A. Cunningham E.T et al. 2004** Pegaptanib for neovascular Age Related Macular Degeneration *N Engl J Med* 351:2805-2816.
- Graham CH, Rivers J, Kerbel RS et al. 1994** Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76) malignant melanomas .*Am J of Pathology* 145:510-514.
- Griffioen AW, Molema G: Angiogenesis 2000:** Potential for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52:238-262.
- Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C et al. 1999** Vascular endothelial growth factor -induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro *Micovasc Res* 58:128-136.
- Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K et al. 1995** Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 270:25915-25919.
- Grunstein G , Roberts WG, Mathieu-Costello O et al. 1999** Tumor derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor expansion and vascular function *Cancer Res* 59:1592-1598.
- Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G et al. 2000** Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer *Journal of the National Cancer Institute* 92:486-492.
- Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL et al. 2000** Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone- marrow -derived endothelial cells. *Lancet* ;355:1688-1691.

- Haapasalo H, Collan Y, Pesonen E 1989** Volume Corrected mitotic index (M/V index) the standard of mitotic activity in neoplasms .*Pathol Res Pract* 185:551-554.
- Hanahan D, Folkman J 1996:**Patterns and emerging mechanisms of the angiogenetic switch during tumorigenesis.*Cell* 86:353-364.
- Hansen CM, Hansen D, Holm PK et al.2000** Cyanoguanidine CHS 828 induces programmed cell death with apoptotic features in human breast cancer cells in vitro *Anticancer Research* 20:4211-4220.
- Hartsock R, Smith EB Petty CS 1965** Normal variations with aging at the amount of hamotopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. *AmJ Clin Pathol* 43:326-328.
- Hattori K, Heissig B, Wu Y et al. 2002** Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone marrow micrenviroenvironment *Nat Med* 8:841-849.
- Hauser S, Weich HA ,1993** A heparin -binding form of placenta growth factor (PIGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta .*Growth Factors* 9:259-68.
- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J et al.1998** Flt-1 lacking the tyrosine kinase domains sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U SA* 95:9349-9354.
- Holleman A, Cheok MH, den Boer ML et al. 2004** Gene expression patterns in drug resistance acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *New Engl J Med.* 351:533-542.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, et al.1996** Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *JBiol Chem* 271:32253-32259.
- Hudlicka O, Brown M, Egginton S 1992** Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle.*Physiol Rev* 72:369-467.
- Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA et al. 2000** Substituting dexamethasone for prednizone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer* 88:1964-1969.
- Ide AG, Baker NH, Warren SL 1939:**Vascularization of the brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber .*Am J Roentgenol* 42:891-899.
- Jan Dongen jj, Macintyre EA, Gabert JA et al. 1999** Standarized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts for chromosome abbreviations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED - 1. Concerted action, investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 13:1901-1928.

- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al.1996** Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271:1172-1180.
- Jimenez B, Volpert O.V, Crawford M et al. 2000** Signals leading to apoptosis-dependant inhibition of neovascularization by thrombospondin -1 *Nat Med* 6:41-48.
- Jonca F, Ortega N, Gleizes Net al.1997** Cell release of fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor *J Biol Chem* 272:767-775.
- Joukov V,Pajusola K,Kaipainen A,et al.1996** A novel vascular endothelial growth factor ,VEGF-C,is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases .*EMBO J* 15:1751.
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G et al.1989** Vascular permeability factor:an endothelial mitogen related to PDGF *Science* 246:1309-1312.
- Kerbel R, Folkman J 2002.**Clinical translation of angiogenesis inhibitors *Nat Rev Cancer* 2:727-739.
- Kerbel RS 2001** Clinical trials of antiangiogenic drugs :Opportunities, problems, and assessment of initial results *J Clin Oncol* 19 suppl 45-51.
- Kern A, Taubert H,Scheele J et al.2002** Association of p53 mutations,microvessel density and neoangiogenesis in pairs of colorectal cancers and their corresponding liver metastases *Int J Oncol* 21 :243-249.
- Keyhani A , Jendiroba D B , Freirich E J et al. 2001** Angiogenesis and leykemia *Leukemia Research* 25:639-645.
- Kieser A,Weich HA, Brander G,et al.1994** Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9:963-969.
- Kim HJ, Li B, Winer J et al.1993** Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo.*Nature* 362:841-844.
- Kim HJ, Kim TY 2005** Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor -II in human keratinocytes,differential involvement of mitogen activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C *Br J Dermatol* 152:418-425.
- Kinsella M.G., Fischer J.W, Mason D.P et al. 2000** Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells .Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro.*J Biol Chem* 275:13924-13932.

Korkolopoulou P ,Viniou N ,Kavatzas N et al.2003 Clinicopathological correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia:a morphometric study *Leukemia* 17:89-97.

Korkolopoulou P,Thymara I,Kavatzas N et al.2005 Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications *Leukemia* March 31 epub ahead

Koyrebanas S,Hannan RL,Faller Dv et al. 1990 Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells.*J Clin Invest* 86;670- 674.

Krajinovic M, Costea I, Chiasson S. 2002 Polymorphisms of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 359:1033-1034.

Krecicki T, Dus D, Kozlak J et al. 2002 Quantitative evaluation of angiogenesis in laryngeal cancer by digital image measurement of the vessel density *Auris Nasus larynx* 29:271-276.

Kumar-Singh S, Vermeulen P.B, Weyler J et al.1997 Evaluation of tumor angiogenesis as a prognostic marker in malignant mesothelioma. *Journal of pathology* 182:211-216.

Lanten M, Stanulla M, Zinnernann M, Welte K, Riehm H, Schrappe M. 2001 Clinical outcome of patients with childhood acute lymphoblastic leukemia and an initial leukemic blood blast count of less than 1000 per microliter. *Klin Pediatr* 213:169-174.

LeCouter J Moritz DR, Li Bet al. 2003 angiogenesis-independent endothelial prediction of the liver :role of VEGFR-1.*Science* 299:890-893.

Lee JS, Kim HS, Jung JJ et al. 2001 Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma and the relation to angiogenesis and p53 protein expression *J Surg Oncol* 77:55-60.

Lenczewski A, Terlikowski S ,Sulkowska M et al.2001 Angiogenesis as a prognostic factor in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Folia Histochemica Cytobiologica* 39:165-166.

Leung, DW, Cachianes G, Kuang W J 1989 Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen *Science* 246:1306-1309.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P,et al. 1997 Pericyte loss and microaneurism formation in PDGF-B deficient mice. *Science* 277:242-245

Locatelli F, Zecca M, Messina C, et al. 2002 Improvement over time in outcome for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission given hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Leukemia.* 16:2228-2237.

Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S et al. 2003 CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma *Pathol Res Pract* 199 :705-712.

Luttun A Tjiwa M Moons L. 2002 Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment and inhibition of tumor angiogenesis arthritis and atherosclerosis by anti-Flt 1 *Nat Med* 8 :831-840.

Mantadakis E ,Danilatou V ,Stiakaki E et al 2004 Infectious toxicity of dexamethasone during ALL remission- induction chemotherapy. Report of two cases and literature review *Ped Hem Onc* 21:27-35.

Marti HH, Risau W 1999 Angiogenesis in ischemic disease *Thromb Haemost* 82 Suppl 1:44-52.

Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A et al.2000 Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia *Am J Pathol.*156:965-976.

Martin C, Yu AY, Jiang BH, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR, et al.1998 Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Obstet Gynecol*;178:527-34.

Martin L , Green B , Renshow C et al 1997 Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 76 : 1046-1054.

Matsuno H, Yudoh K, Uzuki M et al. 2002 Treatment with the angiogenesis inhibitor endostatin: a novel therapy in rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 29:890-895

Mazur G, Wozniak Z, Wrobel T et al 2004 Increased angiogenesis in cutaneous T-cell lymphomas *Pathol Oncol Res* 10:34-36

Mc William N, Robbie L, Booth N, 1998. Plasminogen activator in acute myeloid leukemic marrows: uPA in contrast to t- PA in normal marrows. *Br J Haematol* 101:626-631

Mikulic D, Ilic I, Cepulic M et al 2004 Tumor angiogenesis and outcome in osteosarcoma *Ped Hem Onc* 21:611-619

Millauer B, Wizigman-Voos S, Schnurch H et al. 1993 High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846

Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt B, et al. 2003. Angiogenesis in hematologic malignancies. 45:227-244

Murray PDF 1934:The development in vitro of blood of the chick embryo.Proc R Soc B 1934;111:497-524

Nachman J, Sather HN, Sensel MG et al. 1998 Augmented post induction therapy for children with high risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N Eng J Med 338:1663-1671.

Neale GA, Coustan - Smith E, Stow P et al. 2004 Cooperative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 18:934-938

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch Z et al.1999 Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors FASEBJ 13:9-22

O'Reilly M.S, Boehm T ,Shing Y ,et al.1997 Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growthCell 88:277-285

O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM ,et al. 1996 Identification of hypoxically inducible m RNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1.Eur J Biochem 241:403-410

Obermair A, Tempfer C,Wasicky R et al.1999 Prognostic significance of tumor angiogenesis in endometrial cancer Obstetrics and Gynecology 93:365-371

Offersen B.V , Borre M ,Overgaard J 2003 Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas : a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density European J of Cancer 39:881-890

Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S et al. 2001 Patterns of angiogenesis in non small-cell lung carcinoma Cancer 21:1500-1509

Ogawa S, Kaku T, Kobayashi H et al. 2002 Prognostic significance of microvessel density,vascular cuffing and vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma:a special review for clear cell adenocarcinoma. Cancer Letters 176:111-118

Olfsson B,Pajusola K,Kaipainen A et al.1996 Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:2576-2581

Padro T , Ruiz S, Bieker R et al.2000 Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia Blood 95 :2637- 2634

Palmlblad J 2001 Angiogenesis in haematologic malignancies with focus on multiple myeloma Haema 4:89-98

Panetti TS, Chen H, Misenheimer SB et al 1997 Endothelial cell mitogenesis induced by LPA:inhibition by thrombospondin-1 and thrombospondin-2.J Lab Clin Med 129:208-216

- Park JE, Keller GA, Ferrara N 1993** The Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms :diferential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4:1317-1326
- Pavlakovic H, VonSchatz V, Rossler J et al.2001**, Quantification of Angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. *Int J Cancer* 92:756-760
- Perez-Atayde A,Sallan S,Tedrow U et al.1997** Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia *Am J Pathol* 150:815-821
- Podar K. ,Anderson K.C 2005** The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies:therapeutic implications *Blood* 106:1383-1395
- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, et al.1997** VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272:7151-7158.
- Poole TJ,Coffin JD 1989** Vasculogenesis and angiogenesis :two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 251:224-31
- Prall` F ,Gringmuth U, Nizze H et al.2003** Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases :significant carrelation of high microvessel densities with better survival *Histopathology* 42 :482-91
- Prophet EB , Mills B , Arrington JB et al.1992** Laboratory methods in histotechnology .Armed forces Institute of pathology American registry of pathology Washington Ch 4 13-18
- Protopapa E, Delides GS Revesz L. 1993** Vascular density and the response of breast carcinomas to mastectomy and adjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 29: 1391-1393
- Pui CH, Campana D, Evans WE. 2001** Childhood acute lymphoblastic leukemia current status and future perspectives. *Lanient Oncol* 2:597-607
- Pui CH, Evans WE. 1998** Acute lymphoblastic leukemia. *NEngl J Med* 339-605-615
- Pui CH, Gaymon PS, Boyelt JM et al. 2002 a** Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangement of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 359:1909-1915
- Pui CH, Relling MV, 2004** Downing JR-Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535-1548
- Pui CH, Relling MV, Evans WE. 2002** Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 15:741-756

- Pui CH, Sandlund JT, Pei D et al. 2004** Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. July 13 DOI 10.1182/Blood.2004-04-1616.
- Pui CH, Schrappe M, Masera G et al. 2004** Ponte di Legno Working Group : statement on the right of children to have full access to essential treatment and report on the sixth international childhood Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia 18:1043-1053.
- Pule MA, Enelman C, Dennis D et al 2002.** Increased angiogenesis in bone marrow transplantation of children with acute lymphoblastic leukemia has no prognostic significance. *Br J Haematol* 118:991-998
- Pullen J, Shuster JJ, Link M et al. 1999** Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) as compared to those with B- precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia* 13:1969-19707
- Quinn CM and Wright NA 1991** The value of mitotic counting in the assessment of prognosis and proliferation in human tumours *J.of Pathology* 163:361 -364
- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L,et al.1995** Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression:implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.*55:4575-4580
- Ramsauer M, D'Amore P.A 2002**Getting Tie(2) up in angiogenesis *J.Clin.Invest.*110:1615-1617
- Ratcliffe PI, O'Rourke JF, Maxwell PH et al.1998** Oxygen tensing, hypoxia-inducible fac-lor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *1 Exp Biol* 201:1153-1162
- Revesz L, Siracka E, Siracky J, Delides G and Pavlaki K 1989** Variation of vascular density within and between tumors of the uterine cervix and its predictive value for radiotherapy *Int.J.Radiation Oncol Biol Phys* 16 :1161-63
- Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O.1992** Identification of the Ah receptor nuclear trans-locator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256:1193-1195
- Reynes M,Verfaille CM.2000** Endothelial cells generated from human marrow derived mesenchymal stem cells.*Blood* 96:530a
- Reynolds LP, Killilea SD,Redmer DA 1992:**Angiogenesis in the female reproductive system.*FASEB J* 6:886-892
- Ria R, Rocco AM, Merchionne F.et al. 2003** Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma *Leukemia* 17:1961-1966

- Ribatti D, Leali A, Vacca R 1999** In vivo angiogenetic activity of urokinase :role of endogenous fibroblast growth factor-2 J Cell Sci 112:4213-4221
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al.1996** Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study.Eur J Haematol 87:45-51
- Risau W 1995:** Differentiation of endothelium.FASEB J 9:926-933
- Risau W 1997** Mechanisms of angiogenesis. Nature 386:671-674
- Risau W, Flamme I 1995** Vasculogenesis Annu Rev Cell Dev Biol.1995;11:73-91
- Rossler J, Dietrich T, Pavlacovic H et al 2004** Higher Vessel Densities in Retinoblastoma with Local Invasive Growth and Metastasis. American Journal of Pathology 164:391-394
- Saksela O., Rifkin D.B, 1990** Release of basic fibroblast growth factor - heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity .J Cell Biol 110:767-775
- Salceda S, Caro J.1997** Hypoxia-inducible factor I alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J Biol Chem 272:22642-22647
- Sather HN. 1986** Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 14: 166-172
- Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, et al. 2001** Flk-1 vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel surface marker for the lineage of monocyte -macrophages in humans. Blood 97:785-791
- Scappaticci FA 2002** Mechanisms and future directions for angiogenesis based cancer therapies J Clin Oncol 20:3906-3927
- Scheffer MK ,Jansen HW 1987** Visualization of vascular channels in the mandibular cortex .J Biol Buccale 15:235-238
- Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL et al. 1997** Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells.J Biol Chem 272:601-608
- Schonherr E., O'Connell B.C., Schittny J. et al. 1999** Paracrine or virus-mediated induction of decorin expression by endothelial cells contributes to tube formation and prevention of apoptosis in collagen lattices. Eur J Cell Biol 78:44-45
- Schwartz CL, Thomson EB, Gebler RD et al. 2001** Improved response with higher corticosteroid dose in children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 19:1040-1041

- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ et al. 1998** Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries:an autocrine mechanism contributing to angiogenesis.J Cell Biol 141:1659-1673
- Semenza GL.1999.**Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 551-78
- Senger DR , Van De Water L,Brown EF ,et al. 1993** Vascular permeability factor (VPF ,VEGF)in tumor biology. Breast Cancer Res Treat 12:303-324
- Senger DR, 1996.** Molecular frame for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial proteins induced by angiogenic cytokines. Am J Pathol 149:1-7
- Shelaby F, Ho J, Stanford et al 1997** A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell 89:981-90
- Shelaby F, Rossani J, Yamaguchi TP et al. 1995** Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice Nature 376:62-66
- Shi Q,Rafi S,Wu MHD et al 1998** Evidence for circulating bone marrow derived endothelial cell.Blood 92:362-367
- Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK et al. 2001** Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia results of Dana- Farber consortium Protocol 91-01. Blood 97:1211-1218
- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y et al 1996** Vascular endothelial growth factor is induced by long term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells Biochem biophys Res Comm 221:193-198
- Sottile J 2004** Regulation of angiogenesis by extracellular matrix Biochimica et Biophysica Acta 1654:13-22
- Streit M, Riccardi P ,Velasco P et al. 1999** Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis Proc Natl Acad Sci USA 87:6624-6628
- Sutler CH, Laughner E, Semenza GL 2000.** Hypoxia-inducible factor 1 alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4748-53.
- Silverman LB, Gelber RD, Dalton UK et al. 2001** Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia results of Dana - Farber Consortium Protocol 91-01. Blood 97:1211-1218.

- Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, et al 1995** Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209:218-226
- Tavassoli M, Aoki M 1981** Migration of entire megacaryocytes through the marrow-blood barrier *Br J Haematol* 48:25-28
- Tavassoli M, Yoffrey JM 1983**: Bone marrow structure and function New York, Alan R Riss
- Taylor RN, Lebovic DI, Hornung D et al 2001** Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis *Ann N Y Acad Sci.* 943:109-121
- Tepper OM, Capla JM et al. 2005** Adult Vasculogenesis occurs through the in situ recruitment proliferation and tubulization of circulating bone marrow derived cells. *Blood* 105:1068-1077
- Thomas DA, Giles FJ, Cortes J et al. 2001** Antiangiogenic therapy in leukemia *Acta Haematol* 106:190-207
- Thompson WD 2001** Tumour versus patient: vascular and tumour survival versus prognosis *J. Path* 193 : 425-6
- Tischer E., Gospodarowicz D, Mitchell R et al. 1989** Vascular endothelial growth factor : a new member of the platelet derived growth factor gene family *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:1198-1206
- Tolsma S.S , Volpert D.J, Good D.J 1993** Peptides derived by two separate domains of the matrix protein trombospondin -1 have anti-angiogenic activity *J Cell Biol* 122:497-511
- Tsuji S, Saito H, Maeta Y et al 2004** Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase *Anticancer Res* 24:1853-1859
- Turner KJ, Moore JW, Jones A et al 2002** Expression of hypoxia inducible factors in human renal cancer : Relationship to angiogenesis and to the von Hippel Lindau gene mutation *Cancer Res* 62:2957-2961
- Uckum FM, Gaynon PS, Sensel MG et al. 1997** Clinical features and treatment outcome of childhood T- lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T- lineage leukemic blasts: a children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 15:2214-2221
- Uckum FM, Sather HN, Gaynon PS et al. 1997** Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer group. *Blood* 90:28-35.
- Vacca A , Ribatti D , Roccaro A.M et al. 2001** Bone marrow angiogenesis and plasma Cell angiogenic and Invasive potential in patients with active myeloma *Acta Haematol* 106 :162-169

- Vacca A ,Ribatti D ,Roncali L et al.1994** Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma *Br J Haematol* 87:503-508
- Vermeulen PB , Gasparini G , Fox SB et al.1996** Quantification of angiogenesis in solid human tumors :an international consensus on the methodology and criteria of evaluation *Eur J Cancer* 32 :2474 -2484
- Vilmer E, Sucin S, Ferster A, et al. 2000** Long term results of three randomized trials (58531, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia a CLCG- EORTC report. *Children Cooperative Group. Leukemia* 14:2251-2266
- Vincenti V ,Cassano C ,Rocchi Met al. 1996** Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to to human chromosome 6p21.3 *Circulation* 93:1493-1495
- Volavsek M, Masera A,Ovcak Z 1999** Tumor neoangiogenesis in rebiopsied patients with prostatic carcinoma *Acta Med Croatica* 53:73-78
- Volpert OV, Lawler J, Bouck NP 1998** A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastasis via thrombospondin- 1 *Proc Natl. Acad.Sci USA* 95:6343-6348
- Wang GL,Jiang BH,Rue EA,Semenza GL 1995** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.*Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510-5514
- Weidner N 1995** Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 145:9-19
- Weidner N, Carrol PR, Flax J et al.1993** Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma *Am J Pathol* 143: 401-409
- Weidner N, Semple JP, Welch WR 1991** Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma *N Eng J Med* 324:1-8
- Westen H, Bainton DF 1979:**Asociation of alkaline phosphatase positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors *J Exp Med* 150:919-920
- Wineman J,Moore K,Lemischka I,et al 1996** Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment:Rare stromal elements maintain long term repopulating stem cells *Blood* 87:4082-4086
- Yancopoulos G.D Davis S, Gale NW et al.2000** Vascular specific growth factors and blood vessel formation.*Nature* 407,242-248
- Yancopoulos GD,Klagsbrun M,Folkman J 1998** Vasculogenesis angiogenesis and Growth factors:ephrins enter the fray at the border.*Cell* 93:661-664
- Yong K, Khwaja A 1994** Leukocyte cellular adhesion molecules *Blood Rev* 4:211-213

Yuan F, Chen Y, Dellian M et al. 1996 Time dependant vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an antivascular endothelial growth factor /vascular permeability factor antibody. Proc Natl Acad Sci USA 93:14765-14770

Zadeh G, Guha A 2003 Neoangiogenesis in human astrocytomas :expression and functional role of angiopoietins and their cognate receptors Front Biosci.8:128-137

Περίληψη

Η σημασία της αγγειογένεσης έχει μελετηθεί εκτενώς σε συμπαγείς όγκους και πρόσφατα έχει διαφανεί και ο ρόλος της στις αιματολογικές κακοήθειες κυρίως των ενηλίκων.

Σε αιματολογικές κακοήθειες των παιδιών ο ρόλος της αγγειογένεσης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να καθοριστεί η πραγματική αύξηση της αγγειογένεσης στη πρωτοδιάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας λαμβάνοντας υπόψη την κυτταροβρίθεια του μυελού.

Οστεομυελικές βιοψίες από 26 νεοδιαγνωσμένες περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας παιδικής ηλικίας (μέση ηλικία 6.44 ετών) εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα VIII και συγκρίθηκαν με αυτές από 27 παιδιά που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (μέση ηλικία 8.5 ετών) χωρίς κακοήθη κύτταρα στο μυελό. Η ανοσοϊστοχημεία εκτιμήθηκε με τεχνική αλκαλικής -αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP) με χρωμογόνο και χρώση με αιματοξυλίνη σύμφωνα με γνωστές τεχνικές.

Η μικροαγγειακή πυκνότητα ορίστηκε ως η περιοχή που περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό των μικροαγγείων (hot spots) εκτιμώμενη από τρεις ανεξάρτητους παρατηρητές.

Η μορφομετρική μελέτη της αγγειογένεσης εκφράστηκε σαν ένας δείκτης που ονομάστηκε δείκτης μικροαγγειακής πυκνότητας διορθωμένης κατ'όγκο και ο οποίος ισούται με τον αριθμό των μικροαγγείων ανα κλάσμα των νεοπλασματικών και των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού (NBMC / NBMC + λιποκύτταρα).

Συμπερασματικά τόσο η μικροαγγειακή πυκνότητα όσο και η μικροαγγειακή πυκνότητα διορθωμένη κατ'όγκο βρέθηκαν αυξημένες στη πρωτοδιάγνωση

της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας συγκρινόμενες με τους μάρτυρες (MVD 6.2 ± 3.79 , 1.3 ± 0.16 $p < 0.05$) όμως η αύξηση της VC-MVDI (VC-MVDI 0.94 ± 0.169 , 0.7 ± 0.18 $p > 0.05$) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης προτείνουμε ότι η εκτίμηση της αγγειογένεσης στη πρωτοδιάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας των παιδιών θα πρέπει να αξιολογείται με βάση τη διορθωμένη κατ'όγκο μικροαγγειακή πυκνότητα η οποία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτική και αντικειμενική .

Summary

Angiogenesis has been shown to play a key role in the growth of solid tumors. Recently, a similar role has been proposed for hematologic malignancies. Relative studies have been performed predominantly in adults, based on the principle of the "Hot Spot" counting. Considering the implication of angiogenesis in leukemias of childhood, we designed this study. The specific aim of the study was to develop a precise, of clinical importance, quantitative method for estimating bone marrow microvasculature both in normal and neoplastic bone marrow. We used acute lymphoblastic leukemia as a model, and we tested the quantitative results at the onset of disease. Formalin-fixed and paraffin-embedded bone marrow biopsies from 26 newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia (mean age 6.44) were immunostained for factor VIIIIRAg and compared with those from 27 children (mean age 8.5) with no evidence of bone marrow disease, used as controls. Immunohistochemical detection of microvasculature was reached using a standard alkaline phosphatase method with fast red as chromogen. Microvessel density (MVD) was evaluated at the area containing the highest number of microvessels (hot spots) and additionally by the VC-MDI on the whole microscopic section of the bone marrow biopsy.

The volume corrected microvessel index (VC-MDI) equates the number of microvessels per fraction of both neoplastic and normal bone marrow cells (NBMC/NBMC+fat cells).

Overall both MVD and VC-MVDI were increased at diagnosis of Acute lymphoblastic leukemia in comparison with the control group (MVD 6.2 ± 3.79 , 1.3 ± 0.16 $p < 0.05$). However the VC- MVDI increment (VC- MVDI 0.94 ± 0.169 , 0.7 ± 0.18 $p > 0.05$) was not statistically significant.

Therefore we propose that angiogenesis in childhood ALL should be evaluated by VC- MVDI since it is more representative and subjective.