

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



ANGIOGENEZE V KOSTNÍ DŘENI

MUDr. Petra Kašparová

Autoreferát disertační práce

Hradec Králové, 2006

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

ANGIOGENEZE V KOSTNÍ DŘENI

MUDr. Petra Kašparová

Autoreferát disertační práce

Obor: Patologie

Hradec Králové, 2006

(práce byla částečně podpořena granty IGA MZ č. NR/8076-3, NR/8373-3)

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního studia v oboru patologie na Fingerlandově ústavu patologie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Uchazeč: MUDr. Petra Kašparová roz. Benešová .
Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice,
Hradec Králové, 500 05

Školitel: doc. MUDr. Karel Dědič, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice,
Hradec Králové, 500 05

Oponenti: Doc. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.
Ústav patologie LF, Masarykova univerzita, FN Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno

Doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.
Šiklův patologicko-anatomický ústav LF UK Plzeň, FN Plzeň
Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

Stanovisko k disertaci bylo vypracováno vedením Fingerlandova ústavu patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S disertací je možné se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty v Hradci Králové, Šimkova 870.

Prof. MUDr. Josef Špaček, DrSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v oboru patologie

I. Úvod

Angiogeneze je proces tvorby nových cév z cév stávajících. Podílí se na mnoha fyziologických procesech, jako je hojení a embryogeneze, zároveň je však zapojena do rozvoje nádorového bujení.

Ačkoliv je již hodně známo o angiogenezi u solidních tumorů, kde nádorová angiogeneze přispívá k invazivitě nádoru a k jeho metastatickému potenciálu (byly již zjištěny markery přesvědčivě se podílející na nádorové angiogenezi a mající prognostický význam), angiogeneze u hematologických malignit se dostala do středu zájmu teprve v nedávné době. Ale přestože se ukazuje, že u hematologických nádorů jsou patrné známky abnormální angiogeneze, výsledky příslušných studií nejsou dosud zcela jednotné a v některých případech jsou spíše rozporuplné (8).

Nádorová angiogeneze může být studována na různých úrovních: Na klinické úrovni je nejznámější sledování hladin angiogenních faktorů v krvi, nejčastěji hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF) a bazického fibroblastického růstového faktoru (basic fibroblastic growth factor, bFGF), nověji např. i solubilní frakce CD105 endoglinu (sCD105) (1, 2, 5, 6, 10, 13). Na histologické úrovni je angiogeneze studována v infiltrovaných tkáních; v naší studii ve vzorcích kostní dřeni. Stupeň angiogenních změn na histologické úrovni může být kvantifikován měřením mikrovaskulární denzity (MVD). K tomuto měření je používán imunohistochemický průkaz různých endoteliálních markerů (1, 7, 9, 12, 15-18, 20, 21).

V angiogenezi je zapojeno mnoho cest, ale většina dosavadních studií se věnovala odděleně vždy jen jedné z nich – buď sledovala jen klinické či naopak jen histologické známky zvýšené angiogeneze. Jen málo studií korelovalo histologické znaky s klinickými. Málo studií se také zabývalo porovnáním známek angiogeneze s dalšími parametry onemocnění. A pokud ano, byl v těchto studiích většinou sledován pouze jeden vybraný faktor, který byl dále porovnáván s ostatními (7, 14, 15, 21).

Pokud jde o diagnostické jednotky, v hematologické oblasti se dosud nejvíce prací o angiogenezi týkalo mnohočetného myelomu (multiple myeloma, MM). Tato jednotka vykazuje některé vlastnosti solidních tumorů, a proto se při jejím studiu dalo dobře využít poznatků získaných předchozím studiem solidních nehematologických malignit. Tím však zároveň tato afekce z hematologické problematiky poněkud vybočuje a poznatky získané studiem tohoto nádoru nelze pak zcela jednoznačně přenést na jiné, „klasické“ hematologické jednotky.

MM se tedy stal vzorem pro studium nádorové angiogeneze v hematologii a soubor pacientů s tímto onemocněním byl i základem pro naši studii. Poznatky získané při studiu souboru MM však byly použity především pro studium vzorků od pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (chronic lymphocytic leukaemia, CLL). Tito pacienti byli hlavní cílovou skupinou naší studie.

CLL patří k typickým hematologickým onemocněním, její diagnostika se však v minulosti opírala téměř výhradně o klinické nálezy. Trepanobiopsický odběr kostní dřeni se stal standardní součástí vyšetřovacího protokolu teprve v poměrně nedávné době, a proto histologické nálezy z kostní dřeni nejsou dosud důkladně prostudovány. Ukazuje se však, že i tyto nálezy mohou mít diagnostický a prognostický význam.

Ve spolupráci s Oddělením klinické hematologie (OKH, II. interní klinika LF UK a FN v Hradci Králové) bylo u pacientů s MM, CLL, kteří splňovali dále uvedená kritéria, a u kontrolní skupiny (pacienti vyšetřovaní pro jiná onemocnění, s negativním nálezem v kostní dřeni) sledováno několik parametrů charakterizujících stav onemocnění. Důraz byl kladen na hodnocení intenzity angiogeneze a to jak na úrovni klinické, tak i histologické. Na úrovni klinické byly u pacientů s MM a s CLL měřeny hladiny angiogenních faktorů v krvi. Na histologické úrovni bylo cílem studie zavést metodiku imunohistochemického vyšetřování

vaskulárních markerů v kostní dřeni, studovat známky angiogeneze v kostní dřeni, kvantifikovat ji pomocí měření MVD a tyto nálezy porovnat s některými dalšími parametry.

Nálezy byly ve skupinách pacientů s MM a s CLL korelovány v rámci skupiny s dalšími parametry popisujícími stav onemocnění a zároveň porovnávány s kontrolní skupinou. Bylo tak možné korelovat nejen histologické a klinické známky angiogeneze, ale i porovnat tyto známky s dalšími histologickými a klinickými parametry, které mají nebo by mohly mít vztah ke stavu a vývoji onemocnění.

Mnohočetný myelom

MM je zatím jediný nádor krvetvorné tkáně, kde již byla angiogeneze prokázána jako nezávislý prognostický faktor v multivariantní analýze (15, 17). Zvýšená angiogeneze koreluje s proliferací a aktivitou plazmatických buněk, je paralelní s progresí nádoru a je spojena s jeho horší prognózou (5, 17).

Byla prokázána zvýšená exprese VEGF a bFGF v myelomových buněčných liniích i v plazmatických buňkách kostní dřene (1, 20). Přínos každého angiogenního faktoru do patogeneze onemocnění je však zřejmě odlišný; koncentrace VEGF korelovaly spíše se známkami agresivity onemocnění (hladiny β 2-mikroglobulinu), zatímco hladiny bFGF korelovaly s hladinami albuminu, který vypovídá spíše o fyzické kondici pacienta.

U pacientů s MM byla prokázána zvýšená MVD (20). Nebyla však dosud prokázána korelace mezi MVD a dalšími důležitými parametry onemocnění jako je věk, hladina monoklonálního proteinu v séru, β 2-mikroglobulinu a sérového kreatininu (18). Rovněž nebyla zjištěna korelace mezi MVD a hladinami angiogenních faktorů v periferní krvi (1).

Chronická lymfatická leukémie

CLL je nejběžnější leukémie dospělých (11). Přestože klinický průběh může být indolentní, je onemocnění běžnou terapií nevléčitelné a průměrné přežití pacientů je 7 let. Průběh onemocnění může být velice různorodý. U části pacientů je průběh pomalý, pouze s pozvolným narůstáním nádorové populace. U jiných však dochází k poměrně časné infiltraci mnoha orgánů, s narušením jejich funkce a paraneoplastickými projevy způsobovanými cytokiny vyplavovanými nádorovými buňkami. U všech pacientů s CLL hrozí také velkobuněčný vzrůst nádorového onemocnění, tzv. Richterův syndrom, který je popisován ve 3,5% případů. Proto byla a je snaha o nalezení markerů, které by dovedly odlišit pacienty s dlouhodobým stacionárním průběhem od pacientů, kde bude možné očekávat rychle nastupující progresi a agresivní průběh onemocnění. V případě objevení se takovýchto varovných znaků pak použít způsob léčby, který by byl zaměřen na potlačení progresu nebo by ji v ideálním případě předcházel.

Na základě řady studií byl nalezeno několik markerů, včetně chromozomálních odchylek, mutačního stavu genu pro variabilní oblasti těžkých řetězců (Immunoglobulin variable heavy, IgVH), zdvojnásobení času lymfocytů (lymphocyte doubling time, LDT) a dalších, které mají vztah k vývoji onemocnění a prognóze pacienta; některé z nich jsou již uznané, ověřené, jiné teprve ve fázi výzkumu a prověřování. Žádný z faktorů však dosud není považován za definitivní a absolutní (10, 13).

O stupni angiogeneze je spekulováno jako o dalším možném prognostickém markeru CLL. V naší studii jsme proto sledovali několik markerů, které by mohly odpovídat angiogenezi:

- a) mikrovaskulární denzita v kostní dřeni
- b) počet mastocytů v kostní dřeni
- c) plazmatické hladiny angiogenních faktorů.

Známky abnormální angiogeneze v kostní dřeni a v lymfatických uzlinách u B-CLL jsou zřejmé (6). Dosud však bylo publikováno jen málo studií o tomto tématu a jejich

výsledky jsou značně rozporuplné. Přesto se má za to, že angiogeneze je součástí patogeneze CLL a její klinicko-prognostický význam byl již demonstrován u pacientů v časně fázi onemocnění (13). U pacientů s B-CLL byly prokázány i zvýšené hladiny VEGF i bFGF (4, 11) i zvýšená MVD v kostní dřeni (3, 4, 13). Při porovnávání MVD s dalšími parametry onemocnění bylo zjištěno, že genomické aberace jsou nezávislými prediktory progresu nemoci B-CLL, dosud však nebyla nalezena korelace mezi těmito aberacemi a MVD (54) ani mezi MVD a vyšší hladinou sérového VEGF (11).

II. Cíle studie

1. Zavedení a standardizace metodiky hodnocení angiogeneze v kostní dřeni pomocí stanovení MVD za použití imunohistochemického průkazu endotelálních markerů.
2. Zhodnocení MVD u pacientů s MM, s CLL a v kontrolních vzorcích.
3. Zhodnocení dalších potenciálních markerů progresu nádorového onemocnění v kostní dřeni.
4. Korelace vybraných histologických a klinických markerů angiogeneze.
5. Korelace markerů angiogeneze s dalšími známými i potencionálními markery nádorové progresu.

III. Materiál a metodika

Soubor tvořili pacienti, kterým bylo v období let 1999-2005 provedeno bioptické vyšetření kostní dřene a splňovali následující kritéria:

a) byli nebo jsou v dispenzarizaci Oddělení klinické hematologie (OKH) II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové a bylo u nich možné dohledat sledované klinické údaje (věk, klinické stádium onemocnění a dobu sledování)

b) nález v kostní dřeni splňoval požadovaná diagnostická kritéria (infiltrace při CLL nebo MM), materiál byl vhodně fixován (Löwyho roztok) a jeho množství bylo dostatečné pro další vyšetřování

c) v době odběru vzorku byl pacient bez léčby

d) byla provedena další klinická vyšetření (stanovení plazmatické hladiny bFGF, VEGF, sCD105, mutační stav IgVH, hladina β 2-mikroglobulinu, LDT).

Tato kritéria byla splněna u 22 případů CLL a u 15 případů MM.

Jako kontrolní skupina (CON) sloužily vzorky kostní dřene od pacientů vyšetřovaných v rámci stagingu Hodgkinovy nemoci, non Hodgkinových lymfomů a solidních tumorů a vzorky pacientů vyšetřovaných s podezřením na blíže neurčenou hematologickou malignitu, s normálním histologickým nálezem nebo jen s reaktivními změnami krvetvorné tkáně.

Skupinu CON tvořilo 11 vzorků od pacientů s rovnoměrným zastoupením pohlaví a věkově srovnatelných s vlastním souborem.

Ke studiu angiogeneze byly použity trepanobiopticky odebrané vzorky kostní dřene z lopaty kosti kyčelní. Materiál každého vzorku byl zpracován v celém rozsahu a po zalití do parafínu byly z každého vzorku krájeny řezy o tloušťce 3 μ m. Vždy byla nejprve zhotovena sada sériových preparátů zahrnující barvení: hematoxylin-eozin, May-Grunewald-Giemsma (MGG), PAS, průkaz chloracetátsterázy, Perlsovo barvení na průkaz trojmocného železa a impregnace retikulinových vláken dle Gömöriho. Dále dle potřeby imunohistochemické vyšetření ke stanovení základní diagnózy a vždy imunohistochemický průkaz fVIII (von Willebrandova faktor).

K imunohistochemickému vyšetření byla pro zhodnocení angiogeneze v kostní dřeni použita monoklonální myš protilátka proti lidskému fVIII, klon F8/86 (Dako, Dánsko),

ředění 1:2000. Bylo provedeno tepelné demaskování antigenů s použitím Target Retrieval Solution (TRS) S1700 (Dako). Při průkazu byla použita nepřímá imunohistochemická metoda s použitím vizualizačního systému EnVision Dual Link System (Dako) značený peroxidázou. Jako chromogen byl použit diaminobenzidin (DAB). Jako pozitivní byly hodnoceny všechny hnědě zbarvené buňky bez morfologie megakaryocytů, bez ohledu na to, zda bylo či nebylo přítomno lumen.

Od klinických lékařů byly získány výsledky dalších vyšetření, která byla prováděna na specializovaných pracovištích podle standardů daných metod. Takto byly získány údaje o hladinách angiogenních faktorů VEGF a bFGF a u pacientů s CLL i mutační stav IgVH, chromozomální odchylky a LDT.

Histologické parametry vyšetřované ve vzorcích kostní dřene:

a) Typ infiltrace kostní dřene

1 = intersticiální: nádorové buňky jednotlivě či v malých skupinkách (do 10 buněk), celkově převažuje nepostížená krvevorná tkáň

2 = fokální (nodulární nebo patchy): jasně patrné ostrůvky nádorových buněk (řádově desítky buněk), nádorová a krvevorná tkáň zhruba ve stejném zastoupení

3 = difúzní: splývající nádorové infiltráty, zřetelně převažuje nádorová tkáň nad krvevornou.

b) Počet mastocytů

Při celkovém zvětšení 400x (= 1 zorné pole při velkém zvětšení, high power field, HPF) bylo hodnoceno tolik zorných polí, aby byla zaujata celá plocha vzorku. Ve výsledku udáván maximální počet mastocytů na jedno velké zorné pole.

c) Imunohistochemické vyšetření MVD

Preparáty s imunohistochemických průkazem fVIII byly hodnoceny počítačovou analýzou obrazu za použití software LUCIA M/Comet 3.52 od firmy Laboratory Imaging (Praha, Česká republika).

Při histologickém vyšetření byla angiogeneze v kostní dřeni hodnocena jako mikrovaskulární denzita. Preparáty s imunohistochemickým průkazem fVIII byly nejprve celkově zhodnoceny při přehledném zvětšení 100x nebo 200x a pokud možno, byly vybrány tři oblasti s nejvyšším počtem patrných cév, tzv. „hot spots“. V případě menšího množství materiálu bylo další vyšetření provedeno na dosažitelném materiálu kontinuálně, bez výběru.

Dále byl při zvětšení 400x (měřená plocha v jednom zorném poli 0,069 mm²) manuálně označen obvod zastížených cév a vyznačena jejich plocha. Byl zaznamenán:

- počet cév
- jejich plocha vyjádřená v mm²
- plocha vyjádřená v procentuálním zastoupení z celkové měřené plochy.

Byly hodnoceny vždy jen cévy, jejichž stěna byla tvořena pouze jednou vrstvou endotelií a neobsahovaly ve stěně hladkou svalovinu. Odděleně byly hodnoceny cévy s průměrem menším než 10µm a větším než 10µm. Takto bylo hodnoceno v každém vzorku 9 zorných polí (3 v každém hot spot).

Statistické zpracování provedla RNDr. Eva Čermáková z Ústavu biofyziky LF UK v Hradci Králové. Ke statistické analýze získaných dat byl použit program NCSS 2004. Byly provedeny deskriptivní statistické testy. Korelace mezi jednotlivými parametry byly hodnoceny korelačním koeficientem (Spearmanovým). Ke zhodnocení vztahu mezi sledovanými parametry byly použity dvouvýběrový t-test případně neparametrický Mann-Whitney (MW) test a dále jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním (anova) případně neparametrická Kruskal-Wallisova (KW) analýza rozptylu.

IV. Výsledky

Tabulka 1: Popis sledovaných proměnných

jsou uváděny medián a minimální a maximální hodnota sledovaných proměnných

| | MM | CLL | CON |
|------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| m:ž | 11 : 4 | 16 : 6 | 6 : 5 |
| věk | 63 (46-70) | 57 (44-74) | 56 (27-77) |
| K mm | 54,5 (19,2-181,1) | 22,4 (1,6-102,6) | 9,6 (0-12,8) |
| K | 3,8 (0,3-12,6) | 1,56 (0,1-3,9) | 0,7 (0-0,9) |
| plocha K | 1548,4 (24,4-5308,4) | 255,4 (47,1-638,6) | 152,7 (0-300,0) |
| % K | 2,2 (0,1-1,6) | 0,4 (0,1-4,2) | 0,2 (0-0,7) |
| S mm | | 11,2 (0-27,3) | 11,2 (1,6-25,6) |
| S | | 0,8 (0-1,9) | 0,8 (0,1-1,8) |
| plocha S | | 1257,8 (0-5608,2) | 1755,6 (448,4-9691,1) |
| % S | | 0,2 (0-13,0) | 0,3 (0,7-0,1) |
| mastocyty | 0 (0-3) | 5 (0-20) | 1 (0-4) |
| VEGF | 127,7 (25-694) | 94,5 (5,5-589,4) | x |
| b FGF | 40,05 (4,5-215,4) | 121,2 (7,5-222,9) | x |

- K mm** průměrný počet kapilár na 1 mm²
K průměrný počet kapilár na 1HPF
plocha K celková plocha kapilár v 1HPF [μm²]
% K plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy
Smm průměrný počet sinusů na 1 mm²
S průměrný počet sinusů na 1 HPF
plocha S celková plocha sinusů v 1 HPF [μm²]
% S plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy
masto maximální počet mastocytů na 1 HPF
VEGF plazmatická hladina VEGF [ng/l]
bFGF plazmatická hladina bFGF [ng/l]
x nezjištěno

Tabulka 2A: Statistické srovnání angiogeneze s ostatními prognostickými markery ve skupině pacientů s MM

| | infiltrace (p) | test | skupiny, které se navzájem statisticky liší |
|------------------|----------------|-------|---|
| K mm | 0,005194 | anova | 1x3, 2x3 |
| K | 0,005194 | anova | 1x3, 2x3 |
| % K | 0,002525 | anova | 1x3, 2x3 |
| plocha K | 0,002506 | anova | 1x3, 2x3 |
| mastocyty | 0,479 | KW | |

- anova jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním
 KW neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu
 K mm průměrný počet kapilár na 1 mm²
 K průměrný počet kapilár na 1HPF
 plocha K celková plocha kapilár v 1HPF [μm^2]
 % K plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy
 1, 2, 3 skupiny podle typu infiltrace

Tabulka 2B: Statistické srovnání angiogeneze s ostatními prognostickými markery ve skupině pacientů s CLL

| | IgVH (p) | test | genetika (p) | test | st Rai (p) | test | infiltrace (p) | test |
|------------------|----------|--------|--------------|------|------------|-------|----------------|-------|
| K mm | 0,4033 | MW | 0,5315 | MW | 0,1197 | KW | 0,8743 | KW |
| K | 0,4033 | MW | 0,5315 | MW | 0,1197 | KW | 0,8743 | KW |
| % K | 0,1604 | KW | 0,3577 | MW | 0,1617 | KW | 0,6544 | KW |
| plocha K | 0,08878 | MW | 0,3579 | MW | 0,1446 | KW | 0,6544 | KW |
| S mm | 0,1745 | t-test | 0,8179 | MW | 0,5144 | KW | 0,5325 | KW |
| S | 0,1745 | t-test | 0,8179 | MW | 0,5144 | KW | 0,5314 | KW |
| % S | 0,3825 | t-test | 0,3579 | MW | 0,4148 | KW | 0,5339 | anova |
| plocha S | 0,3922 | t-test | 0,3579 | MW | 0,2095 | anova | 0,5345 | anova |
| mastocyty | 0,3822 | MW | 0,6921 | MW | 0,7197 | KW | 0,2699 | KW |

- MW neparametrický Mann-Whitney test
 anova jednofaktorová analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním
 KW neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu.

| | |
|-----------------|---|
| K mm | průměrný počet kapilár na 1 mm ² |
| K | průměrný počet kapilár na 1HPF |
| plocha K | celková plocha kapilár v 1HPF [μm^2] |
| % K | plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy |
| S mm | průměrný počet sinusů na 1 mm ² |
| S | průměrný počet sinusů na 1 HPF |
| plocha S | celková plocha sinusů v 1 HPF [μm^2] |
| % S | plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy |
| masto | maximální počet mastocytů na 1 HPF |
| VEGF | plazmatická hladina VEGF [ng/l] |
| bFGF | plazmatická hladina bFGF [ng/l] |

Tabulka 3A: Porovnání histologických parametrů mezi skupinami pacientů s MM, CLL a CON

Jsou uvedeny hodnoty hladiny významnosti (p), použité testy a v případě zjištění statisticky významného rozdílu v daném parametru, je ve třetím sloupci uvedeno mezi jakými skupinami byl rozdíl nalezen.

| | p | test | statisticky odlišné skupiny |
|------------------|----------|-------------|------------------------------------|
| K mm | 0,00002 | KW | MM x CON CLL x CON |
| K | 0,00002 | KW | MM x CON CLL x CON |
| % K | 0,00326 | KW | MM x CON |
| plocha K | 0,002478 | KW | MM x CON |
| S mm | 0,7448 | MW | |
| S | 0,7448 | MW | |
| % S | 0,6884 | MW | |
| plocha S | 0,6884 | MW | |
| mastocyty | 0,00001 | KW | MM x CLL CLL x CON |

| | |
|-----------------|---|
| MW | neparametrický Mann-Whitney test |
| KW | neparametrická Kruskal-Wallisova analýza rozptylu. |
| K mm | průměrný počet kapilár na 1 mm ² |
| K | průměrný počet kapilár na 1HPF |
| plocha K | celková plocha kapilár v 1HPF [μm^2] |
| % K | plocha kapilár vyjádřená v procentech z měřené plochy |

| | |
|----------|--|
| S mm | průměrný počet sinusů na 1 mm ² |
| S | průměrný počet sinusů na 1 HPF |
| plocha S | celková plocha sinusů v 1 HPF [μm^2] |
| % S | plocha sinusů vyjádřená v procentech z měřené plochy |
| masto | maximální počet mastocytů na 1 HPF |

V. Diskuse

Výsledky této práce navazují na výsledky předchozích prací jiných autorů a rozšiřují je o některé nové údaje. Studie věnující se angiogenezi u hematologických onemocnění jsou často zaměřené jednostranně: sledují buď převážně klinické známky zvýšené angiogeneze – nejčastěji hladiny angiogenních faktorů v krvi, nebo převážně histologický korelát angiogeneze – mikrovaskulární denzitu (MVD) v kostní dřeni či v jiných tkáních. Nedostatkem většiny těchto studií je chybějící propojení těchto dvou oblastí. Ve spolupráci s klinickými lékaři jsme se proto v této studii pokusili o poněkud komplexnější pohled.

U pacientů jsme sledovali histologické i klinické koreláty zvýšené angiogeneze. Na histologické úrovni byla angiogeneze měřena jako MVD, byl sledován počet kapilár na zorné pole při velkém zvětšení, s přepočtem na 1mm² (pro snadnější srovnání s jinými studii) a jejich plocha, vyjádřená jednak v μm^2 , jednak v procentuálním poměru z celkové měřené plochy. Současně jsme však sledovali i klinické znaky angiogeneze, reprezentované plazmatickými hladinami angiogenních faktorů VEGF a bFGF.

Kromě toho jsme hodnotili i další faktory hovořící o stavu onemocnění a pacienta, ať už s uznávanou prognostickou hodnotou (věk, klinické stádium onemocnění, chromozomální odchylky, mutační stav variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů), nebo ty, které se jevily jako nápadné v průběhu zpracování vzorků a byly proto rovněž zavzaty mezi vyšetřované parametry (sinusy, mastocyty).

Mnohočetný myelom

Východím bodem naší studie byl soubor 15 pacientů s MM. Mnohočetný myelom je „modelovým“ typem hematologické malignity pro zkoumání angiogeneze. Bylo opakovaně prokázáno, že u pacientů s plazmocytárními afekcemi je zvýšená angiogeneze (1, 5, 9, 16-20).

Průměrný počet kapilár byl statisticky významně vyšší ve skupině pacientů s MM oproti kontrolní skupině (medián 54 K/mm² u MM oproti 10 K/mm² v kontrolní skupině; $p = 0,00002$).

Rovněž se mezi těmito skupinami statisticky významně lišila plocha kapilár (medián 1548 μm^2 u MM oproti 153 μm^2 u kontrolní skupiny; $p = 0,0025$).

Námi získané výsledky jsou tak ve shodě s prací autorů Rajkumar a spol. (18), kde byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v mikrovaskulární denzitě mezi skupinou pacientů s MM a kontrolní skupinou.

Dále bylo prokázáno, že se statisticky významně liší počet, plocha a procentuální zastoupení kapilár mezi skupinami pacientů s intersticiálním, fokálním a difúzním typem infiltrace ($p = 0,0052$). Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi intersticiálním a difúzním a mezi fokálním a difúzním typem infiltrace. Mezi intersticiálním a fokálním typem infiltrace tento rozdíl zjištěn nebyl.

Předchozí studie se přesnou kvantifikací MVD v závislosti na typu nádorové infiltrace v kostní dřeni nezabývaly, ale vzhledem k tomu, že typ infiltrace zhruba odpovídá pokročilosti nádorového onemocnění, lze usuzovat, že i tento nále z je v souladu s obdobnými studii prokazujícími zvyšující se MVD současně s progresí MM (15).

Počet mastocytů byl u pacientů s MM hodnocen dodatečně, na základě nálezů ve skupině pacientů s CLL. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi počtem mastocytů u pacientů s MM (medián 0) a kontrolní skupinou (medián 1). Počet mastocytů se významně nelišil ani v rámci skupiny pacientů s MM s ohledem na typ infiltrace.

V naší studii nebyla patrná korelace ani mezi MVD a dalšími sledovanými parametry (věk, počet mastocytů). Tento náleze je v soulase se studii dalšími autorů (15, 18).

V našem souboru nebyla zjištěna žádná významná korelace mezi mikrovaskulární denzitou v kostní dřeni a hladinami angiogenních faktorů v krvi. I tento náleze je v soulase s dalšími publikovanými studii (1, 5).

Naši získané výsledky o MVD, hladinách angiogenních faktorů a vzájemných korelacích jsou tedy ve shodě s dosud získanými znalostmi o angiogenezi u pacientů s MM. Vzhledem k tomu, že skupina pacientů s MM měla posloužit především jako vzorová pro zavedení metodiky vyšetřování angiogeneze u hematologických malignit, ověřili jsme si na tomto souboru, že výsledky získávané našim vyšetřováním jsou srovnatelné s ostatními studii a tudíž metodiku lze považovat za zavedenou. Tento výsledek byl pro naši další práci postačující.

Chronická lymfatická leukémie

Těžištěm práce byla skupina pacientů s CLL. Toto onemocnění patří k velmi častým hematologickým malignitám, do nedávné doby však bylo považováno za velmi pomalu progredující onemocnění jen s velmi nízkým maligním potenciálem. Pro stanovení diagnózy CLL bylo postačující klinické vyšetření a náleze v periferní krvi. V současné době se však s novými poznatky náleze na toto onemocnění změnil. Standardizace vyšetření se stanovováním sérologických hladin výše zmiňovaných látek v krvi, s odběrem trepanobiopsického vzorku kostní dřene a spolu s dalšími vyšetřeními jako je chromozomální a genetické vyšetření a mutační stav IgVH, vedlo k poznání dalších typických znaků CLL. Je patrná snaha o využití těchto nově zjištěných znaků, především jako možných prediktorů průběhu a prognózy tohoto, jak se zdá, proměnlivého onemocnění.

Doba sledování našich pacientů s CLL byla 12 – 150 měsíců (medián 36,5; průměr 51,5 měsíce), což je téměř trojnásobně více než v obdobné studii autorů Wolowiec a spol. (21). Během této doby došlo k ověřenému úmrtí 2 pacientů, stav 9 pacientů dosud nevyžadoval žádnou léčbu pro základní diagnózu, 8 pacientů bylo nebo je léčeno a jejich stav je v současnosti stabilizován a 3 pacienti se nedostavili do dispenzáře a byli ztraceni z evidence. Tyto údaje odpovídají údajům o pomalé progresi tohoto onemocnění, kde hodnocení a interpretace zjištěných dat jsou velmi obtížné.

Od sledování angiogeneze se očekává, že by mohla dále doplnit znalosti o tomto onemocnění a popř. se stát dalším prognostickým markerem.

Histologické vyšetření a hodnocení vzorků v naší studii probíhalo zpočátku stejným způsobem jako u MM. Avšak vzhledem k tomu, že při vyšetřování vzorků pacientů s CLL byly často nápadně výrazně dilatované cévy (sinusy), byly i tyto cévy zařazeny mezi hodnocené parametry. Tento způsob hodnocení MVD je poněkud odlišný od způsobu používaného u solidních tumorů, kde jsou hodnoceny vždy pouze cévy menší než 10 μm v průměru. Takto je postupováno na základě zkušeností, že u cév větších bývá zastížena vyvinutá cévní stěna a tudíž již nemohou být hodnoceny jako novotvořené kapiláry.

Postup obdobný jako u solidních tumorů byl jako výchozí použit při hodnocení MVD u MM. MM se totiž svými vlastnostmi z hematologických malignit poněkud vymyká; v některých oblastech se chová spíše jako solidní tumor. Při hodnocení vzorků typické hematologické malignity jako je CLL se však tento postup ukázal jako nedostačující. Často

byly totiž zastížený velmi objemné cévy, avšak stále se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií.

Na rozdíl od většiny solidních tumorů, ve kterých byla angiogeneze zkoumána, obsahuje normální kostní dřev jen velmi málo cév s plně vyvinutou, několikvrstevnou stěnou. Naopak zde převládají hojné preformované sinusy, se stěnou tvořenou pouze vrstvou endotelií, již uzpůsobené k průniku buněk z kostní dřevě do periferní krve. Autoři Molica a spol. (14) ve své studii sice tyto „nápadně dilatované cévy“ popsali, avšak jejich kvantifikaci a případným vlivem angiogenních působků na tyto preformované sinusy se dosud, pokud je nám známo, u CLL tyto autoři ani nikdo další nezabýval. Naše hypotéza byla, že by nádorové buňky mohly této vlastnosti kostní dřevě využít a místo novotvorby dalších malých cév pouze zvětšovat stávající sinusy nebo zkombinovat oba procesy (novotvorba malých cév a dilatace sinusů). Na základě této hypotézy by se v kostní dřevě u CLL dal očekávat stejný nebo vyšší počet kapilár než v kontrolních vzorcích a obdobný počet, avšak plošně rozsáhlejších sinusů.

Ve vzorcích pacientů s CLL a v kontrolních vzorcích byly tak posléze v každém zorném poli odděleně hodnoceny kapiláry a sinusy (viz výše) – u každé skupiny počet a plocha daných cév.

Průměrný počet kapilár u pacientů s CLL byl v naší studii signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (medián 22 K/mm² u CLL oproti 10 K/mm² v kontrolní skupině; p = 0,0002). Nebyl však nalezen statisticky významný rozdíl mezi plochou kapilár (plocha K, % K) ve skupině pacientů s CLL a kontrolní skupinou.

Počet, plocha ani procentuální zastoupení sinusů (S, S mm, plocha S, % S) se statisticky významně nelišila mezi žádnými z hodnocených skupin.

Rovněž nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi počtem, plochou a zastoupením kapilár a sinusů mezi skupinami pacientů s CLL s odlišnými parametry IgVH, genetickým stavem, klinickým stádiem dle Raie a typem nádorové infiltrace kostní dřevě.

Nález vyššího počtu kapilár ve vzorcích kostní dřevě pacientů s CLL oproti kontrolní skupině je ve shodě se studií autorů Wolowiec a spol. (21), která rovněž zaznamenala zvýšenou MVD v kostní dřevě u pacientů s CLL.

Z výsledků naší studie je možné usuzovat, že v procesu angiogeneze převládá tvorba mnoha malých cév nad rozšiřováním cév stávajících, byť by byly tenkostěnné. Pro tento závěr svědčí jednak nezměněný počet a hlavně statisticky nevýznamný rozdíl v ploše mezi sinusy u CLL a kontrolní skupiny a dále také fakt, že přestože se nezměnila plocha zastížených kapilár ve skupině CLL oproti kontrolní skupině, bylo patrné statisticky významné zvýšení počtu těchto kapilár. Tedy kapiláry jsou menší a četnější.

Stejně jako ve skupině pacientů s MM jsme i u CLL hodnotili typ nádorové infiltrace, a to ve třech kategoriích jako intersticiální, fokální a difúzní. Oproti skupině pacientů s MM nebyl u pacientů s CLL prokázán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými kategoriemi podle typu infiltrace. Tento výsledek je odlišný od výše zmiňované studie autorů Wolowiec a spol. (21), kde byl průměrný počet kapilár na velké zorné pole signifikantně vyšší u difúzní než u nedifúzní infiltrace kostní dřevě u CLL. Je možné že na této neshodě se podílí rozdělení nádorové infiltrace do tří kategorií (v naší studii), protože jejich studie hodnotila infiltraci pouze ve dvou skupinách, jako difúzní a nedifúzní. V našem souboru bylo i dosti nerovnoměrné zastoupení pacientů v jednotlivých skupinách (5 pacientů s intersticiální, 6 s fokální a 12 s difúzní infiltrací), takže je možné, že jde i o chybu v souboru s malým počtem čísel. Vzhledem k tomu, že podle nových názorů typ infiltrace koreluje s klinickou progresí onemocnění, je nutné považovat naše nálezy za prozatímní a zaměřit se na jejich ověření či upřesnění v rozsáhlejších souborech pacientů.

Ve shodě s výše zmiňovanou studií (18) jsme i my pozorovali, že zatímco u difúzní infiltrace je vaskularizace pravidelná, u nodulární je vyšší na okrajích nádorových uzlů.

Nepodařilo se nám prokázat souvislost mezi MVD a v současnosti uznávanými

prognostickými markery CLL. Je tedy otázkou rozsáhlejších a dlouhodobějších studií, zda se v budoucnu prokáže nějaký prognostický význam angiogeneze u CLL.

Dalším nápadným znakem ve vzorcích kostní dřeně pacientů s CLL byly zmnožené mastocyty. O mastocytech je známo, že mohou být reaktivně zmnoženy u mnoha hematologických onemocnění, např. u útlumu kostní dřeně, anémií, maligních lymfomů i myelodysplastického syndromu. Bývají však zmiňovány i v souvislosti s angiogenezí, jako možní producenti angiogenních faktorů i proteáz, které se podílejí na destrukci stěny původních cév i stromatu. V této souvislosti jsou zmiňovány dva základní typy mastocytů: s převládající sekrecí tryptázy (Mc-t) a s převládající sekrecí chymázy (Mc-c). Pro angiogenezi jsou pokládány za klíčové mastocyty s převažující produkcí tryptázy. Ale práci zabývající se přesným zařazením mastocytů, které se na tomto procesu podílí a jejich kvantifikací je velmi málo.

V naší studii dosahovaly ve vzorcích kostní dřeně pacientů s CLL maximální hodnoty mastocytů na jedno velké zorné pole počtu až 20 (medián 5). Na základě těchto pozorování byly tedy i mastocyty zahrnuty do hodnocených parametrů a zpětně zhodnoceny i u pacientů s mnohočetným myelomem a v kontrolní skupině. Maximální hodnoty ve vzorcích kontrolní skupiny byly 4 mastocyty na velké zorné pole (medián 1) a u skupiny pacientů s mnohočetným myelomem 3 (medián 0).

Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi počtem mastocytů ve skupině pacientů s CLL (medián 5) a kontrolní skupinou (medián 1, $p = 0,00001$). Počet mastocytů u CLL byl rovněž odlišný od skupiny MM (viz výše).

Jak již bylo zmiňováno, MM se z hematologických malignit svými vlastnostmi poněkud vymyká. U CLL jako zástupce typické hematologické malignity by tento výsledek jistě stál za další zkoumání. Obecně je CLL onemocněním, kde jsou v kostní dřeni mastocyty hodně často patrné. Další studie by se tedy mohly věnovat významu mastocytů u CLL a porovnat jejich počet u CLL s hematologickými jednotkami, které jsou svým biologickým chováním CLL bližší než MM.

Nebyly však nalezeny žádné významné korelace mezi počtem mastocytů, MVD a klinickými parametry (VEGF, bFGF, věk, β_2 -mikroglobulin).

Vzhledem k tomu, že byl prováděn pouze prostý součet všech zastižených mastocytů a přitom v literatuře jsou v souvislosti s angiogenezí zmiňovány hlavně MC-t, bylo by jistě také vhodné ověřit, jaké enzymy převažovaly v zastižených mastocytech v našem souboru a zda by se potom údaje o počtu mastocytů v souvislosti s ostatními známkami angiogeneze nezměnily. Přestože se tedy v našem souboru nepodařilo prokázat výraznou souvislost počtu mastocytů s angiogenezí, nápadně zvýšený počet těchto buněk se jeví jako inspirace pro další studium.

Naměřené plazmatické hodnoty angiogenních faktorů u pacientů s CLL byly u VEGF v rozmezí 5,5 – 589,4 ng/l (medián 94,5 ng/l) a u bFGF 7,5 – 222,9 ng/l (medián 121,2 ng/l).

Neměřili jsme hladiny angiogenních faktorů u kontrolní skupiny, neboť bylo již opakovaně prokázáno, že tyto jsou u pacientů s CLL zvýšené oproti normálu (2). Nás zajímala spíše korelace s histologickými znaky angiogeneze a s dalšími prognostickými markery, neboť v této oblasti je dosud málo známých informací a nejsou jednoznačné.

V naší studii nebyla patrná korelace mezi hladinami angiogenních faktorů a dalšími sledovanými prognostickými markery.

I v dalších studiích jsou dosud korelace pouze vágní. Zatím se zdá, že hladiny VEGF by mohly dodat prognostický význam u časných stádií CLL, kdy u pacientů ve stádiu Rai I-II s vyššími hladinami VEGF byl zaznamenán kratší čas do progresu. Naše studie je dosud malá, s malým počtem zachycených nádorových progresí, ale očekáváme, že s časovým odstupem bude možné některé proměnné znovu zhodnotit z dlouhodobého hlediska.

Celkově nebyly patrné žádné významnější korelace mezi sledovanými proměnnými. Korelační koeficient mezi sledovanými histologickými (mikrovaskulární denzitou v kostní dřeni ať už měřenou jako počet kapilár nebo sinusů) a klinickými parametry angiogeneze (hladinami VEGF a bFGF v krvi) byl velmi nízký. Rovněž nebyla patrna žádná významnější korelace mezi MVD a hladinami β 2-mikroglobulinu a věkem. Tento nále z je ve shodě se studií autorů Molica a spol. (10), kteří rovněž nezařadili korelace mezi VEGF a ostatními klinicko-biologickými parametry (absolutní lymfocytóza v periferní krvi, β 2-mikroglobulin, histologie kostní dřene, IL-6) nebo progresi onemocnění (LDT).

Porovnávali jsme histologické parametry (MVD a počet mastocytů) s prognostickými markery, a to histologickými i klinickými. Neprokázali jsme signifikantní rozdíl v histologických parametrech angiogeneze a počtu mastocytů při srovnání s mutačním stavem IgVH, genetickým vyšetřením FISH, stádiem dle Raie a typem infiltrace.

VI. Závěry

- 1) Angiogeneze měřená mikrovaskulární denzitou je v kostní dřeni pacientů s CLL a s MM oproti kontrolním vzorkům zvýšená.
- 2) Mikrovaskulární denzita se v závislosti na typu nádorové infiltrace:
 - u pacientů s CLL neliší
 - u pacientů s MM liší (intersticiální x difúzní a fokální x difúzní).
- 3) Počet mastocytů je v kostní dřeni pacientů s CLL signifikantně vyšší než u kontrolních vzorků a u vzorků pacientů s MM.
- 4) Nebyla prokázána korelace mezi mikrovaskulární denzitou a počtem mastocytů, a to ani u CLL ani u MM.
- 5) Nebyla prokázána korelace mezi histologickým parametrem angiogeneze (mikrovaskulární denzitou v kostní dřeni) a klinickými parametry (plazmatické hladiny angiogenních faktorů VEGF a bFGF).
- 6) Nebyla prokázána korelace mezi mikrovaskulární denzitou u CLL a věkem či markery progresu onemocnění (mutační stav IgVH, chromozomální odchylky, stádium dle Raie).

VII. Summary

Introduction. Aims

Angiogenesis is a process of formation of new vessels from the preexisting ones. It is involved in many physiological processes, at the same time, however, it is involved also in the progress of tumoral growth. Although a lot is known about angiogenesis in solid tumors where it plays a role in tumoral invasion and its metastatic potential, in hematological malignancies it has been appreciated only recently. However, the results of studies on abnormal angiogenesis in hematological malignancies are inconsistent. The tumoral angiogenesis can be studied at different levels; histologically, it is studied in the infiltrated tissues (lymph nodes, bone marrow) and quantified as microvessel density (MVD).

The aims of our study were to introduce the method of MVD quantification in the bone marrow using immunohistochemical proof of endothelial markers and then evaluate MVD in bone marrow samples in a group of patients with multiple myeloma (MM) and with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and compare the results with a control group of patients (CON).

Methods

Fifteen patients with MM and twenty-two patients with B-CLL were entered in the study. Bone marrow trephine biopsy was performed on all patients as a routine diagnostic procedure. Samples were fixed in Löwy fixative and embedded in paraffin. Three-

micrometer-thick sections were stained with May-Grünwald-Giemsa method (MGG), hematoxylin-eosin, PAS, chloracetatesterase and Gömöri silver impregnation, and the samples were evaluated with light microscope.

The degree of angiogenesis was quantified by measuring the microvessel numbers visualised by endothelial marker fVIII. Microvessels (M) are identified as small, thin walled vessels without smooth muscle in the wall. They are usually smaller than 10µm in diameter. In the bone marrow samples of patients with CLL we found not only the typical microvessels but also larger but still thin walled vessels. They were so prominent that we decided to involve them into the counting, calling them sinuses (S). Therefore, in the specimens of patients with CLL we counted separately microvessels and sinuses.

Angiogenesis was assessed in "hot spots", zones with the highest microvessel density and expressed by number and area of vessels per 1mm² using an image analysis software LUCIA M/Comet 3.52 (LIM, Czech Republic).

Discussion

At first, we have evaluated the MVD in a group of patients with MM. So far, MM is the only hematologic malignancy, where the increased angiogenesis was confirmed and the MVD is considered as an independent prognostic factor of this disease. In our study, the number and the area of microvessels in patients with MM were increased and our results agree with those of other authors.

CLL is a typical malignancy of the hematopoietic tissue but the course and the prognosis of patients with this disease vary considerably. For this reason there is "hunting" for prognostic markers. Angiogenesis is one of the possible markers which may add more informations about the course of this disease. But so far there are only few studies published about angiogenesis measured as MVD in CLL patients and the results are inconsistent. In our study, the number and area of microvessels were increased in bone marrow of patients with CLL, but the number and area of sinuses were not. It can be concluded that there are signs of abnormal angiogenesis in bone marrow of patients with CLL but a more long-term study is needed to give informations about prognostic value of this findings.

VIII. Literatura

- 1) Andersen NF, Standal T, Nielsen JL et al.: Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Brit J Haematol* 2004; 128:210-17.
- 2) Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E: Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Haematol* 2001; 113:400-6.
- 3) Byrd JC, Waselenko JK, Keating M et al.: Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia in the 21st century. *Seminars in Oncology* 2000; 5: 587-597.
- 4) Chen H, Treweeke AT, West DC et al.: In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96: 3181-7.
- 5) Di Raimondo F, Pia Azzaro M, Palumbo GA et al.: Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 2000; 85:800-5.
- 6) Kay NE, Jelinek DF, Peterson L: Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2001; 25:709-710.
- 7) Korkolopoulou P, Gribabis DA, Kavantzias N et al.: A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Brit J Haematol* 2003;122:900-10.

- 8) Koster A, Van Krieken HJM, MacKenzie MA et al.: Increased Vascularization Predicts Favorable Outcome in Follicular Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2005;11:154-61.
- 9) Laroche M, Brousset P, Ludot I et al: Increased vascularization in myeloma. *Eur J Haematol* 2001; 66: 89-93.
- 10) Molica S, Vitelli G, Levato D et al.: Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Haematol* 1999; 107:605-10.
- 11) Molica S, Vacca A, Levato D et al.: Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2004; 28: 321-4.
- 12) Molica S, Vacca A, Tucc L, Ribatti D: Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia following fludarabine therapy. *Haematologica* 2005;90:698-700.
- 13) Molica S, Vitelli G, Levato D et al.: Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *Eur J Haematol* 2004; 73:36-42.
- 14) Molica S, Vacca A, Ribatti D et al.: Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:3344-51.
- 15) Niemöller K, Jakob Ch, Heider U et al.: Bone marrow angiogenesis and its correlation with other disease characteristic in multiple myeloma in stage I versus stage II-III. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:234-8.
- 16) Rajkumar SV, Leong T, Roche PC et al.: Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:3111-6.
- 17) Rajkumar SV: Angiogenesis in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2001; 113:565.
- 18) Rajkumar S.V, Mesa R.A, Fonseca R et al.: Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research* 2002;8:2210-6.
- 19) Singhal S, Mehta J, Desikan R et al.: Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565-71.
- 20) Sezer O, Niemöller K, Kaufmann O et al.: Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients achieving a remission after chemotherapy. *Eur J Haematol* 2001; 66:238-44.
- 21) Wolowiec D, Wozniak Z, Potoczek S et al.: Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(5): 263-70.

IX. Seznam publikací a přednášek autorky

Přednášky

- 1) Benešová P, Smolej L, Dědič K, Maisnar V: Hodnocení angiogeneze v preparátech z trepanobiopsie kostní dřeně u nemocných s maligním onemocněním krve tvorby. XIII. český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí, Praha, 22. – 25. září 2002.
- 2) Benešová P.: Kryptokok aneb řetězítka. 11. sjezd českých a slovenských patologů s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 24. - 26. září 2003.
- 3) Benešová P, Dědič K, Žák P, Voglová J: Transplantace kmenových buněk jako terapeutický nástroj u pacientů s myelofibrózou. Seminář mladých patologů, Litomyšl, 5.4.2003.
- 4) Smolej L, Benešová P, Maisnar V, Dědič K, Malý J: Hodnocení angiogeneze u hematologických malignit. Seminář OKH FN HK, Hradec Králové, 15.4.2003.
- 5) Smolej L, Benešová P, Dědič K, Malý J: CD31 as a marker of microvessel density in trephine bone marrow biopsies in patients with hematological malignancies. A single centre

experience. Fourth Interdisciplinary Euroconference on Angiogenesis, Helsinky, Finsko 21.-24. 5. 2004.

- 6) Benešová P, Dědič K, Belada D, Neradová M., Kodet R: S enteropatií asociovaný T lymfom, Česko-slovenský sjezd patologů, Praha Motol, 11.6. 2004.
- 7) Tomšová M, Benešová P, Pohnětalová D: Malobuněčný karcinom plic v cytologickém materiálu. XV. Cytologický den, Brno, 21. 10. 2004.
- 8) Benešová P, Dědič K: Histopatologie lymfomů. Regionální hematologický seminář: Současný pohled na diagnostiku a léčbu lymfomů, Špindlerův Mlýn, 4. – 5. 2. 2005.
- 9) Dědič K, Benešová P: Primární mesenchymální nádory sleziny v archívech FÚP. Sjezd českých a slovenských patologů, Rožnov p. Radhoštěm, 14. – 16. 9. 2005.
- 10) Benešová P, Tomšová M: Úskalí plicní cytologie v terénu chronického difúzního alveolárního poškození. XVI. cytologický den, Litomyšl, 27. 9. 2005.
- 11) Benešová P.: Diagnostika chronických myeloproliferativních chorob z pohledu patologa Regionální hematologický seminář, Horní Albeřice, 21. 4. 2006.
- 12) Benešová P, Smolej L: Zvýšená mikrovaskulární denzita v kostní dřeni u pacientů s CLL. 33. sjezd českých patologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 4.-6. května 2006.
- 13) Kašparová P: Principy imunohistochemie. Program následného vzdělávání, Česká společnost histologických laborantů, Hradec Králové, 24.10.2006.
- 14) Kašparová P: Angiogenesis in the bone marrow. Fakultní konference studentů doktorského studia, Hradec Králové, 24. 10. 2006.

Publikace

původní práce

- 1) Benešová P, Dědič K, Žák P, Voglová J: Kompletní regrese fibrózy kostní dřenež po alogenní transplantaci periferních krvetvorných buněk u pacienta s idiopatickou myelofibrózou. Česko-slovenská patologie 2004; 40(4): 167-71.
- 2) Smolej L, Benešová P: Význam angiogeneze u maligních nádorů. Acta Medica (Hradec Králové) Suppl. 2005; 48 (2), 69-72.
- 3) Benešová P, Buchta V, Cerman J, Žák P: Cryptococcosis – a review of 13 autopsy cases of a 54-year period in large hospital. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica. IF = 2,127 – přijato k tisku.
- 4) Kašparová P: Jaká je vaše diagnóza? Silikonová lymfadenopatie, Česko-slovenská patologie – přijato k tisku.
- 5) Kašparová P, Smolej L: Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s CLL, Česko-slovenská patologie – přijato k tisku.

abstrakta

- 1) Benešová P, Smolej L, Dědič K, Maisnar V: Hodnocení angiogeneze v preparátech z trepanobiopsie kostní dřenež u nemocných s maligním onemocněním krvetvorby. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí, Praha, 22.-25.9.2002. Sborník abstrakt.
- 2) Smolej L, Benešová P, Maisnar V, Dědič K, Malý J: Hodnocení angiogeneze u hematologických malignit imunohistochemickým vyšetřením preparátů z trepanobiopsie kostní dřenež - naše první zkušenosti. Česko-slovenské dny laboratorní hematologie s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 28.-29.11.2002. Sborník abstrakt.
- 3) Benešová P: Kryptokok aneb řetězítka. Abstrakta 11. sjezdu českých a slovenských patologů (Aktuální problémy v patologii), 2003, editor J. Špaček, nakladatelství ATD Hradec Králové.
- 4) Žák P, Kmoníček M, Voglová J, Skořepová M, Jebavý L, Benešová P, Dědič K, Malý J: Complete Regression of Bone Marrow Fibrosis in a Patient After Tandem Allogeneic Blood

Stem Cell Transplantation. European Society for Haemapheresis and Haemotherapy 14th Congress; 9. pracovní den, 1. vyd., Hradec Králové 2003: 44.

5) Smolej L, Benešová P, Maisnar V, Malý J, Dědič K: Angiogenesis in patients with lymphoproliferative disorders: a pilot study. Hematology Journal 2004, Suppl. 2: 5.

6) Smolej L, Pour L, Andrýs C, Benešová P, Maisnar V, Hájek R, Pecka M: Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor in peripheral blood and bone marrow of patients with multiple myeloma. Acta Medica (Hradec Králové) 2005; 48 (2): 116.

7) Benešová P, Smolej L: Microvessel density is elevated in bone marrow of chronic lymphocytic leukaemia patients but is not associated with pattern of infiltration. Biomedical Papers 150, Suppl. 1: 33.

jiné

1) Smolej L, Benešová P: letter to editor – Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. Cancer 2006; 107(11): 2742-3, IF = 3,941.

