

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych- streszczenie

**Katarzyna Galica**

**OCENA POTENCJALNEJ WARTOŚCI DIAGNOSTYCZNEJ  
I PROGNOSTYCZNEJ EKSPRESJI BIAŁEK CD133, HIF-1 alfa i SDF-1  
W WYBRANYCH ANOMALIACH NACZYNIOWYCH WIEKU  
ROZWOJOWEGO ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM  
PROCESÓW PROLIFERACJI i REGRESJI  
ORAZ WPŁYWU ZASTOSOWANIA PROPANOLOLU.**

Promotor: Prof. UM dr hab. n. med. Katarzyna Taran

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Katedra Onkologii, Zakład Patomorfologii,  
Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych  
Kierownik Katedry Onkologii i Zakładu Patomorfologii  
Prof. dr hab. n. med. Radziław Kordek**



## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Znamię (piętno) przyrodzone („birthmark”) było jednym z pierwszych powszechnie stosowanych określeń anomalii naczyń, obecnie sklasyfikowanych wg International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) w oparciu o obraz kliniczny, morfologiczny oraz podłoże molekularne tych zmian. Klasyfikacja ta dzieli anomalie naczyń na dwie podstawowe grupy: guzy naczyń (do których należą naczyńki wczesnodziecięce) oraz malformacje naczyń, obie grupy będące przedmiotem niniejszej rozprawy z uwagi na podnoszoną w literaturze możliwość istnienia wspólnych patomechanizmów w rozwoju tych zmian.

Naczyńki wczesnodziecięce (*ang.: Infantile Hemangiomas- IHs*) są najczęstszymi łagodnymi nowotworami wieku rozwojowego. W przeciwieństwie do innych guzów charakteryzują się wyjątkowym dwufazowym przebiegiem, w którym można wyróżnić okres proliferacji i inwolucji. Pochodzenie tych zmian pozostaje nie w pełni poznane, podobnie jak same mechanizmy procesu regresji.

Większość naczyń wczesnodziecięcych nie wymaga leczenia. Ustępują one samoistnie, co biologicznie uwarunkowane jest ich spontaniczną inwolucją. Około 10% naczyń wczesnodziecięcych wymaga leczenia specjalistycznego z powodu znacznych rozmiarów guza lub niekorzystnej lokalizacji nowotworu, stanowiących zagrożenie dla zdrowia i życia dziecka.

Terapia naczyń dziecięcych została zrewolucjonizowana w 2008 roku poprzez wprowadzenie propranololu. Ten lek okazał się wysoce skuteczny i bardzo dobrze tolerowany, jednak mechanizm jego działania pozostaje nie w pełni zrozumiany.

Malformacje naczyń są następstwem zaburzeń morfogenezy naczyń. Dotyczą one około 1–2% dzieci. Anomalie te są widoczne w momencie urodzenia i rosną proporcjonalnie ze wzrostem dziecka, nie ulegając regresji.

Malformacje naczyń są łączone w jedną grupę z uwagi na ich embriogenezę, a podstawą podziału tych zmian jest typ tworzących je naczyń (włosowate, tętnicze, żyłne, limfatyczne, mieszane), co uwzględniono również w Klasyfikacji ISSVA, w której malformacje naczyń podzielono ponadto na

proste, złożone, „channel type” oraz związane z innymi anomaliami. Rozpoznanie malformacji naczyniowej wiąże się z koniecznością poszukiwania wad rozwojowych lub zespołów, które mogą towarzyszyć tym anomaliom.

Niedotlenienie jest związane z angiogenezą i neowaskularyzacją w wielu nowotworach. Podczas niedotlenienia ekspresja czynnika transkrypcyjnego indukowanego przez niedotlenienie (Hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1alfa) jest zaburzona i indukuje produkcję innych czynników proangiogennych, takich jak czynnik 1 pochodzący z komórek zrębowych (Stromal cell derived factor-1, SDF-1), który rekrutuje komórki pochodzące ze szpiku kostnego (komórki progenitorowe śródbłonna, EPCs) CD133(+), z krążenia do obszarów niedokrwionych, co rozpoczyna angiogenezę i waskulogenezę.

Rola białek CD133, HIF-1 alfa i SDF-1 jest obecnie szeroko ewaluowana i omawiana w literaturze przedmiotu. Jest to związane z potencjalną możliwością wykorzystania badanych białek w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu wielu chorób związanych z intensywną proliferacją komórkową, jednakże możliwości wykorzystania dotychczas uzyskanych wyników badań w praktyce klinicznej pozostają nieznane.

Projekt badawczy został oparty o najnowsze odkrycia dotyczące etiopatogenezy anomalii naczyniowych oraz roli białek CD133, HIF-1 alfa i SDF-1 w złożonej biologii komórek nowotworowych.

Cele pracy:

**1.**

Ocena potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej ekspresji białek: CD133, HIF-1 alfa i SDF-1 w wybranych anomaliach naczyniowych (naczyniakach wczesnodziecięcych i malformacjach naczyniowych), ze szczególnym uwzględnieniem możliwych związków z procesami proliferacji i regresji.

**2.**

Ocena możliwego wpływu propranololu na ekspresję badanych białek w naczyniakach wczesnodziecięcych i próba wyjaśnienia mechanizmów takiego procesu.

### 3.

Poszukiwanie patomechanizmów wspólnych dla biologii badanych anomalii naczyniowych o potencjalnych implikacjach w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu.

Na podstawie zgody Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nr RNN/416/18/KE z dnia 10 grudnia 2018 roku przeprowadzono badania immunoekspresji białek: CD133, HIF-1 alfa oraz SDF-1 w tkankach anomalii naczyniowych z Kliniki Chirurgii i Onkologii Dziecięcej UM w Łodzi, z lat 2009-2019.

Badaniem objęto 111 anomalii naczyniowych (73 wycinki pochodziły z naczynek wczesnodziecięcych a 38 z malformacji (w tym 17 limfatycznych i 21 żylnych). Średni wiek dzieci z badanymi anomaliami naczyniowymi wynosił 22 miesiące, 36 chorych poddano leczeniu propranololem, 37 nie wymagało farmakoterapii.

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach wykonanych z bloków parafinowych zawierających utrwalone tkanki badanych anomalii naczyniowych z wykorzystaniem PowerVision firmy ImmunoLogic według metody immunoperoksydazowej, z użyciem pierwotnych, króliczych przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciw CD133 (orb99113) , HIF-1 alfa (orb216126) i SDF-1(orb303876) firmy Biorbyt.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu R v4.0 (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

W toku przeprowadzonej ewaluacji ujawniono istnienie znamiennych różnic w ekspresji badanych białek pomiędzy badanymi grupami anomalii naczyniowych, pomiędzy fazami proliferacji i regresji oraz pomiędzy zmianami poddanymi propranololoterapii i nieleczonymi. Ponadto zaobserwowano jedenaście korelacji pomiędzy badanymi parametrami w grupie naczynek wczesnodziecięcych oraz trzy w malformacjach naczyniowych.

Wynioskowano, że

1. W obu grupach badanych anomalii naczyniowych, zarówno w naczyniakach wczesnodziecięcych, jak i w malformacjach, ekspresja wszystkich ewaluowanych białek: CD133, HIF-1 alfa oraz SDF-1 jest zróżnicowana. Naczyniaki wczesnodziecięce charakteryzują się wyższą immunoekspresją białek HIF-1 alfa oraz SDF-1 w porównaniu z malformacjami naczyniowymi, a w samych malformacjach naczyniowych immunoekspresja HIF-1 alfa jest także znamienne zależna od lokalizacji zmiany.

2. Immunoekspresja dwóch badanych białek, HIF-1 alfa oraz SDF-1, wykazuje związek z procesami proliferacji i involucji. Pełne zrozumienie tego zjawiska i ujawnienie jego mechanizmów potencjalnie może ukazać nowe implikacje kliniczne nie tylko dla pacjentów z anomaliami naczyniowymi, ale także w szeroko pojętej onkologii.

3. Immunoekspresja wszystkich badanych białek: CD133, HIF-1 alfa oraz SDF-1 ulega zmianom w naczyniakach wczesnodziecięcych poddanych leczeniu propranololem. Wydaje się, że wpływ propranololoterapii na ekspresję CD133 w okresie involucji jest niezależny od SDF-1, a mechanizmy działania tego leku w obu fazach rozwoju anomalii są złożone.

4. Immunoekspresja tych samych ewaluowanych białek: CD133, HIF-1 alfa oraz SDF-1 ujawnia się w obu grupach badanych anomalii naczyniowych, podobnie jak tożsama, silnie dodatnia korelacja pomiędzy immunoekspresją CD133 i HIF-1 alfa. Zarówno w naczyniakach wczesnodziecięcych, jak i malformacjach istnieją związki pomiędzy ekspresją badanych markerów a wiekiem chorych. Obecność tych znalezisk może przemawiać za częściowo wspólnymi patomechanizmami biologii badanych zmian.

5. Malformacje naczyniowe wydają się być grupą niejednorodną, w której immunoekspresja białka CD133 znamienne wzrasta w zmianach u dzieci powyżej 5 roku życia, dzieląc malformacje pod względem biologii w podobny do naczyniaków wczesnodziecięcych sposób tj. w oparciu o kryterium wieku.

Ukazane w prezentowanej pracy liczne zależności pomiędzy ewaluowanymi białkami: CD133, HIF-1 alfa i SDF-1 oraz różnice w ich ekspresji w badanych grupach anomalii naczyniowych wskazują na celowość poszukiwania innych niż już poznane mechanizmów, które mogą wpływać na przebieg procesów proliferacji i inwolucji w IHs, a także nowych markerów, na które oddziaływać może propranolol, a których ujawnienie miałoby potencjalne implikacje kliniczne.

## **ABSTRACT**

**Evaluation of potential diagnostic and prognostic value of expression of CD133, HIF-1 alfa and SDF-1 proteins in chosen vascular anomalies with regard to proliferation and regression processes and propranolol treatment impact.**

The birthmark was one of the first commonly used terms for vascular anomalies, currently classified according to International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) which based on distinct clinical, pathological and molecular features. This classification divides vascular anomalies into two basic groups: vascular tumors (which include infantile hemangiomas) and vascular malformations, both of which are the subject of this dissertation due to the suggestion in the literature of an overlap in the pathomechanisms of their development.

Infantile hemangiomas are the most common tumors of developmental age. Unlike other tumors, they are characterized by unique biphasic nature with proliferation and involution phase. The origin of these lesions remains unclear, the same as the mechanisms of regression processes.

Most infantile hemangiomas are self-limiting and often they will resolve without any intervention due to their spontaneous regression. Approximately 10% of infantile hemangiomas require specialist treatment due to the large size of the tumor or the unfavorable location which appear a threat to the health and life of the child.

The therapy of infantile hemangiomas was revolutionized in 2008 by introduction of propranolol. This drug has proven to be highly effective and very well tolerated, however, the mechanism of its influence remains unclear.

Vascular malformations are a consequence of impaired vascular morphogenesis. They affect about 1-2% of children. These anomalies are visible at birth and grow proportionally with the child's growth without being regressed.

Vascular malformations are combined into one group due to their embryogenesis, and the division of these lesions is based on the vessels type (capillary, arterial, venous, lymphatic, mixed), which was also included in the ISSVA Classification, where vascular malformations were also divided into simple, complex, "channel type" and related to other anomalies. The diagnosis of vascular malformation requires the search for developmental abnormalities or syndromes that may accompany these anomalies.

Low oxygen tension (hypoxia) has been associated with tumor angiogenesis and neovascularization in many cancers. During hypoxia, the expression of transcription factor hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is upregulated and induces production of other proangiogenic factors, such as stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) which recruits bone marrow-derived cells (Endothelial progenitor cells, EPCs) CD133(+), from the circulation to ischemic areas and starts angiogenesis and vasculogenesis.

The role of CD133, HIF-1 alpha and SDF-1 proteins is currently widely evaluated and discussed in the literature. This is related to the potential use of these proteins in the diagnosis, prognostication and treatment of many diseases associated with intensive cell proliferation, however, the possibilities of using the results obtained so far in clinical practice remain unknown.

The research project was based on the newest discoveries regarding the etiopathogenesis of vascular anomalies and the role of CD133, HIF-1 alpha and SDF-1 proteins in the complex biology of neoplastic cells.

The aims of the study appeared as follow:

**1.**

Evaluation of potential diagnostic and prognostic value of expression of CD133, HIF-1 alfa and SDF-1 proteins in chosen vascular anomalies (infantile hemangiomas and vascular malformations) with regard to proliferation and regression processes.

**2.**

Assessment of potential propranolol treatment impact on evaluated protein expression in infantile hemangiomas and an attempt to explain the mechanisms of such a process.

**3.**

Search for pathomechanisms common to the biology of the examined vascular anomalies with potential implications in diagnosis, prognostication and treatment.

Based on the agreement of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz No. RNN/416/18/KE of 10 December 2018, the studies of immunoexpression of CD133, HIF-1 and SDF-1 proteins were performed in tissue samples of vascular anomalies from the Department of Pediatric Surgery and Oncology of the Medical University of Lodz.

The study involved 111 samples (73 samples of His tissues and 38 of vascular malformation (17 lymphatic and 21 venous, respectively). The average age of the children was 22 months. The study was based on 36 samples from children with infantile hemangioma treated with propranolol and 37 untreated. Immunohistochemical studies were carried out on sections made of paraffin blocks containing fixed tissues of examined vascular anomalies with the use of PowerVision by ImmunoLogic according to the immunoperoxidase method, and primary rabbit polyclonal antibodies against CD133 (orb99113), HIF-1 alpha (orb216126) and SDF-1 (orb303876) from Biorbyt.

Statistical analysis was performed with the use of R v4.0 (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

The conducted evaluation revealed the existence of significant differences in



the expression of the studied proteins between the studied groups of vascular anomalies, between the phases of proliferation and regression, and between the lesions subjected to propranolol therapy and untreated. In addition, eleven correlations were observed between the examined protein immunoreexpression in infantile hemangiomas and three in vascular malformations.

It was concluded that:

1. In both groups of examined vascular anomalies, the infantile hemangiomas and malformations, the expression of all evaluated proteins: CD133, HIF-1 alpha and SDF-1 appears various. Infantile hemangiomas are characterized by higher HIF-1 alpha and SDF-1 proteins immunoreexpression compared to vascular malformations. In vascular malformations group, HIF-1 alpha immunoreexpression is significantly dependent on the location of the lesion.

2. Immunoreexpression of two studied proteins, HIF-1 alpha and SDF-1, is related to the processes of proliferation and involution. A complete understanding of this phenomenon and the disclosure of its mechanisms may potentially reveal new clinical implications not only for patients with vascular anomalies, but also in broadly understood oncology.

3. Immunoreexpression of all tested proteins: CD133, HIF-1 alpha and SDF-1 undergoes changes in infantile hemangiomas treated with propranolol. It seems that the effect of propranolol therapy on the expression of CD133 during the involution period is independent of SDF-1, and the mechanisms of action of this drug in both phases of IHs development are complex.

4. Immunoreexpression of the same proteins: CD133, HIF-1 alpha and SDF-1 is revealed in both groups of the examined vascular anomalies, as is the same, strong positive correlation between CD133 and HIF-1 alpha immunoreexpression. In infantile hemangiomas and malformations, both, there are also relationships between the expression of the evaluated markers and the age of the patients. The presence of these findings may indicate some common pathomechanisms of the biology of the examined lesions.

5. Vascular malformations seem to be a heterogeneous group in which immun-expression of the CD133 protein significantly increases in lesions in children over 5 years of age, dividing the malformations in terms of biology in a manner similar to that of infantile hemangiomas, i.e. based on the age criterion.

The numerous relationships between the evaluated proteins: HIF-1 alpha, SDF-1 and CD133 presented in the study, and the differences in their expression in the examined groups of vascular anomalies indicate the desirability of searching for mechanisms other than those already known, which may affect proliferation and involution processes in IHs, as well as new markers that may be influenced by propranolol and whose disclosure would have potential clinical implications.