

dr n. med. Magdalena Zakrzewska

Received: 22.09.2011

Accepted: 30.09.2011

Published: 31.10.2011

## Profil ekspresji genów w gwiżdżiakach włosowatokomórkowych wieku dziecięcego w odniesieniu do lokalizacji, obrazu radiologiczno-morfologicznego i przebiegu klinicznego choroby

Gene expression profiles of pilocytic astrocytoma in relation to the location, radiological features and clinical course of the disease

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 675 76 29, e-mail: magdalena.zakrzewska@umed.lodz.pl

Praca finansowana z grantu MNiSW nr N401 196 32/4137

### Streszczenie

Gwiżdżiak włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*, PA) jest najczęstszym nowotworem mózgu występującym u dzieci, u których stanowi około 30% wszystkich nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Biologia molekularna tego nowotworu, pomimo jego częstego występowania w populacji dziecięcej, nie została dotąd wystarczająco poznana, a ewentualnego związku pomiędzy obecnością zaburzeń molekularnych a parametrami klinicznymi nie zdefiniowano na poziomie pozwalającym wykorzystać wyniki badań genetycznych w sferze działań klinicznych. Celem projektu było ustalenie profili ekspresji genów różnicujących gwiżdżiaka włosowatokomórkowego wieku dziecięcego w zależności od jego umiejscowienia, obrazu radiologiczno-morfologicznego oraz przebiegu klinicznego choroby. Do badań zakwalifikowano nowotworowy materiał tkankowy pochodzący od 86 dzieci (55 chłopców, 31 dziewcząt) w wieku od 1 do 17 lat (mediana 7 lat). Wszystkie przypadki zostały zdiagnozowane w Zakładzie Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w oparciu o kryteria bieżącej klasyfikacji nowotworów ośrodkowego układu nerwowego według WHO. Badania mające na celu identyfikację istotnych biologicznie odchyień w ekspresji genów przeprowadzono przy użyciu mikromacierzy wysokiej gęstości Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) w 50 przypadkach gwiżdżiaków włosowatokomórkowych. Badana grupa była zróżnicowana pod względem lokalizacji (28 nowotworów mózdzku i komory IV, 11 nowotworów dróg wzrokowych i podwzgórza, 9 nowotworów półkul mózgu, 2 nowotwory pnia mózgu), obrazu radiologiczno-morfologicznego (27 nowotworów litych, 10 nowotworów torbielowatych, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulegały ściana torbieli i guzek przyścienny, 8 nowotworów torbielowatych z guzkiem przyściennym, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulegał tylko guzek przyścienny, 5 nowotworów z obecnymi cechami martwicy centralnej) i przebiegu klinicznego choroby (5 przypadków z cechami klinicznymi progresji choroby po resekcji subtotalnej, 2 przypadki rozwijające się w przebiegu neurofibromatozy typu 1.). Po normalizacji wyników przy użyciu algorytmu GC-RMA przeprowadzono analizy bioinformatyczne wykorzystujące przede wszystkim pakiet Bioconductor. Wyselekcjonowano 862 geny różnicujące gwiżdżiaki włosowatokomórkowe pod względem umiejscowienia anatomicznego i wykazano obecność istotnej zależności statystycznej pomiędzy profilem ekspresji genów w odniesieniu do lokalizacji zmiany ( $p=0,001$ ). Na podstawie uzyskanych wyników dokonano wyboru genów będących markerami molekularnymi dla nowotworów rozwijających się w poszczególnych lokalizacjach (*JRX2*, *PAX3*, *CXCL14*, *LHX2*, *SIX6*, *CNTN1*, *SIX1*). Nie wykazano możliwości zróżnicowania badanej grupy w zależności od obrazu radiologiczno-morfologicznego. Geny najlepiej różnicujące badaną grupę cechowały się małą amplitudą zmian i brakiem znamienności statystycznej ( $p=0,88$ ). Podobnie progresja choroby nie była związana z profilem ekspresji genów ( $p=0,83$ ). Walidację uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o QRT-PCR. Przeprowadzone analizy pozwoliły stwierdzić, że gwiżdżiaki

włosowatokomórkowe w zależności od lokalizacji anatomicznej posiadają charakterystyczny profil ekspresji genów, sugerujący ich różne pochodzenie. Z kolei obraz radiologiczno-morfologiczny oraz przebieg kliniczny choroby nie mają związku z całkowitym profilem ekspresji genów.

**Słowa kluczowe:** dzieci, gwiazdziak włosowatokomórkowy, lokalizacja, obraz radiologiczny, profil ekspresji genów, przebieg choroby

## Summary

Pilocytic astrocytoma (PA) is the most common type of brain tumour in paediatric population connected with favourable prognosis although in numbered cases recurrence or dissemination could be observed. PA accounts for 30% of all brain tumours occurring in children. The tumours affect various anatomical structures and show different radiological appearance. Genetics of this tumour as well as the plausible correlations between molecular profile and clinical course of the disease and/or radiological features are still undefined. The purpose of our research was the identification of gene expression profiles related to localization and radiological features of pilocytic astrocytomas and clinical course of the disease. Eighty six children with PAs, operated on in the Department of Neurosurgery, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, were included in this study. The group was comprised of 55 males and 31 females. The mean age of patients at the time of diagnosis was 7 years (ranging from 1 to 17 years). All specimens were diagnosed at the Department of Molecular Pathology and Neuropathology Medical University of Lodz, according to the WHO criteria. The analysis was done by high density oligonucleotide microarrays (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0) in 50 snap-frozen tissue samples diversified in terms of localization (28 cerebellar tumours, 11 optic tracts and hypothalamic tumours, 9 hemispheric tumours, 2 brain stem tumours), radiological appearance (27 solid or mainly solid tumours, 10 cystic tumours where the mural nodule and the cyst wall were enhanced, 8 cystic tumours where only the mural nodule was enhanced, 5 largely necrotic tumours) and clinical course (5 cases of progressive disease after subtotal resection, 2 cases connected with neurofibromatosis type 1). Bioinformatic analyses with using Bioconductor packages were done after normalization of data with using GC-RMA algorithm. Gene expression profile of pilocytic astrocytomas highly depends on the tumour localization. This correlation reach statistical significance ( $p=0.001$ ). Eight hundred sixty-two probesets differentiated tumours of different localization with high significance of global test. Most prominent differences were noted for *IRX2*, *PAX3*, *CXCL14*, *LHX2*, *SIX6*, *CNTN1* and *SIX1* genes. Analysis of the genes differentiating between radiological features showed much weaker transcriptome differences, with the borderline significance in the global test of association ( $p=0.88$ ). No genes showed significant association with the tendency to progression in univariate analysis ( $p=0.83$ ). The results of microarray analysis were confirmed by QRT-PCR. In the conclusion we showed that gene expression profile in pilocytic astrocytomas is connected with tumour localization and such relationship suggest different origin of PA arising within various anatomical brain structures. Morphological and radiological features as well as clinical course of disease seem not to be associated with different gene expression pattern.

**Key words:** children, gene expression profiling, location, outcome, pilocytic astrocytoma, radiology

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

aCGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa z zastosowaniem mikromacierzy (ang. *array comparative genomic hybridization*)  
 ALDH – rodzina dehydrogenaz aldehydowych (ang. *aldehyde dehydrogenase gene superfamily*)  
 ARX – ang. *aristaless-related homeobox X-linked*  
 ASCL1 – ang. *achaete-scute homolog 1*  
 ASE – ekspresja allelospecyficzna (ang. *allele-specific expression*)  
 BCL7A – ang. *B-cell CLL/lymphoma 7A*  
 BCL7B – ang. *B-cell CLL/lymphoma 7B*  
 BRAF – ang. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*  
 C1NH – ang. *complement component 1 inhibitor*  
 CASP7 – ang. *caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase*  
 CD68 – antygen lizosomalny, marker makrofagów  
 CDH5 – ang. *cadherin 5*  
 CDKN2A (*p16INK4A*) – gen inhibitora kinazy cyklozależnej 2A (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa (ang. *comparative genomic hybridization*)  
 CHAD – ang. *chondroadherin*  
 CNS PNET – prymitywny nowotwór neuroektodermalny ośrodkowego układu nerwowego (ang. *central nervous system primitive neuroectodermal tumor*)  
 CNTN1 – ang. *contactin 1*  
 COL9A1 – ang. *collagen type IX alpha-1*  
 CXCL14 – ang. *chemokine, CXC motif, ligand 14*  
 CTGF – czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. *connective tissue growth factor*)  
 DNER – ang. *Delta/Notch-like EGF-related*  
 DYPSL3 – ang. *dihydropyrimidinase-like 3*  
 EFS – okres przeżycia wolnego od nawrotu choroby (ang. *event-free survival*)  
 EGFR – gen receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)  
 ERBB3 (*HER3*) – gen receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*)

- ESM1* – ang. *endothelial cell-specific molecule 1*  
*FDR* – odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate*)  
*FLN1* – ang. *filamin A*  
*FN1* – gen fibronektyny (ang. *fibronectin 1*)  
*FOXP1B* – ang. *forkhead box G1*  
*FOXM1* – ang. *forkhead box M1*  
*GABA* – kwas gamma-aminomasłowy (ang. *gamma-aminobutyric acid*)  
*GCRMA* – ang. *Guanine Cytosine Robust Multi-array Analysis*  
*GFAP* – kwaśne fibrylarne białko glejowe (ang. *glial fibrillary acidic protein*)  
*GSEA* – ang. *gene set enrichment analysis*  
*HIF* – gen czynnika indukowanego hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor*)  
*HIPK2* – ang. *homeodomain interacting protein kinase 2*  
*IDH1* – gen dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (ang. *isocitrate dehydrogenase 1*)  
*IGFBP2* – gen białka wiążącego insulinopodobne czynniki wzrostowe (ang. *insulin-like growth factor-binding protein 2*)  
*IL8* – gen interleukiny 8 (ang. *interleukin 8*)  
*IRX* – ang. *iroquois homeobox proteins*  
*Ki-67 (MIB1)* – antygen proliferacyjny  
*KIT* – gen kinazy tyrozynowej (ang. *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*)  
*KRAS* – ang. *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
*KS* – test permutacyjny Kołmogorowa-Smirnowa  
*LAMB1* – ang. *laminin, beta-1*  
*L1CAM* – ang. *L1 cell adhesion molecule*  
*LHX2* – ang. *lim homeobox gene 2*  
*LHX9* – ang. *lim homeobox gene 9*  
*LOX* – oksydaza lizylowa (ang. *lysyl oxidase*)  
*LOH* – utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*)  
*LS* – test permutacyjny najmniejszych kwadratów (ang. *Least Squares*)  
*MA* – mikromacierze (ang. *microarray*)  
*MAPK* – kaskada sygnałowa kinaz aktywowanych mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase signaling pathway*)  
*MATN2* – ang. *matrilin-2*  
*MB* – rdzeniak (ang. *medulloblastoma*)  
*MBP* – zasadowe białko mieliny (ang. *myelin basic protein*)  
*MGMT* – metylotransferaza O6 metyloguaniny (ang. *O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase*)  
*MYB* – ang. *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*  
*MYOD1* – ang. *myogenic differentiation antigen 1*  
*NEDD4L* – ang. *ubiquitin protein ligase NEDD4-like*  
*NF1* – gen neurofibrominy 1 (ang. *neurofibromin 1*)  
*NF1* – neurofibromatoza typu 1 (ang. *neurofibromatosis type 1*)  
*NR2E1* – ang. *nuclear receptor subfamily 2 group E member 1*  
*NUSE* – znormalizowany nieskalowany błąd standardowy (ang. *normalized unscaled standard error*)  
*O2A* – komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. *oligodendrocyte type-2 astrocyte progenitors*)  
*OLIG1* – ang. *oligodendrocyte transcription factor 1*  
*OLIG2* – ang. *oligodendrocyte transcription factor 2*  
*OUN* – ośrodkowy układ nerwowy  
*PA* – gwiazdziać włosowatokomórkowy (ang. *pilocytic astrocytoma*)  
*PAX3* – ang. *paired box gene 3*  
*PCA* – analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis*)  
*PDGFR-α* – gen receptora α płytkowego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor alpha*)  
*PEN5 (CD162)* – glikoproteina powierzchniowa  
*PFS* – czas przeżycia bez progresji choroby (ang. *progression-free survival*)  
*PI3* – kinaza 3-fosfatydilinozytolu  
*PLM* – ang. *Probe Level Model*  
*PLP1* – białko proteolipidowe (ang. *proteolipid protein 1*)  
*PM* – wartość fluorescencji sond komplementarnych (ang. *Perfect Match*)  
*PMA* – gwiazdziać pilomyksoidny (ang. *pilomyxoid astrocytoma*)  
*POSTN* – ang. *perostin*  
*PROM1* – ang. *prominin 1*  
*PTCH1* – ang. *human homologue of Drosophila patched*  
*PTEN* – ang. *phosphatase and tensin homolog*  
*PTGS2* – ang. *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*  
*PTPN1* – ang. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1*  
*PTPRZ1* – ang. *protein tyrosine phosphatase receptor-type Z 1*  
*QRT-PCR* – półilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real time PCR*)  
*RAF1* – ang. *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog 1*  
*RASSF1A* – ang. *Ras-association domain family protein 1, isoform A*  
*RASSF2* – ang. *Ras-association domain family protein 2*  
*RIN* – współczynnik integralności RNA (ang. *RNA integrity number*)  
*RLE* – mediana ekspresji (ang. *Relative Log Expression, RLE*)  
*RM* – rezonans magnetyczny  
*SAGE* – seryjna analiza ekspresji genów (ang. *serial analysis of gene expression*)  
*SDC1* – ang. *syndecan 1*  
*SEMA3E* – ang. *semaphorin 3E*  
*SEMA5A* – ang. *semaphorin 5A*  
*SHH* – szlak sygnałowy SHH (ang. *sonic hedgehog signaling pathway*)  
*SIX3* – ang. *sine oculis homeobox homolog 3*  
*SIX6* – ang. *sine oculis homeobox homolog 6*  
*SMAD* – rodzina białek jądrowych  
*SNP* – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
*SOC3* – ang. *suppressor of cytokine signaling 3*  
*SOX10* – ang. *sry box 10*  
*SOX8* – ang. *sry box 8*  
*SRGAP3* – ang. *SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3*  
*TGF-β* – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta, TGF-β*)  
*THBS1* – gen trombospondyny 1 (ang. *thrombospondin 1*)  
*THBS4* – gen trombospondyny 4 (ang. *thrombospondin-4*)  
*TIMP4* – gen tkankowego inhibitora metaloproteinazy 4 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-4*)  
*TJP2* – ang. *tight junction protein 2*  
*TLE2* – ang. *transducin-like enhancer of split 2*  
*TNC* – gen tenascyny C (ang. *tenascin C*)  
*TNR* – gen tenascyny R (ang. *tenascin R*)  
*TK* – tomografia komputerowa  
*TP53* – gen białka supresorowego TP53 (ang. *tumor protein p53*)  
*TSS* – miejsce startu transkrypcji (ang. *transcription start site*)  
*TTC9* – ang. *tetratricopeptide repeat domain 9*  
*VEGF* – gen czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*)  
*WT1* – gen guza Wilmsa 1 (ang. *Wilms tumor 1*)  
*ZNF140* – ang. *zinc finger protein 140*  
*ZYX* – ang. *zyxin*

## WSTĘP

**N**owotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN), ze względu na częste występowanie w populacji dziecięcej, stanowią poważny problem medyczny. Pomimo znacznego postępu w sferze diagnostyki, technik chirurgicznych i metod terapeutycznych, które znacząco wpłynęły na poprawę wyników leczenia, nadal istnieje potrzeba pogłębiania wiedzy opisującej podstawy procesów przyczyniających się do rozwoju pierwotnych nowotworów mózgu. Poznanie mechanizmów związanych z przebiegiem choroby nowotworowej jest również niezbędnym krokiem na drodze poszukiwania molekularnych czynników prognostycznych, predykcyjnych oraz tych, które mogą posłużyć opracowaniu ukierunkowanej i efektywnej terapii. Stosowane obecnie zaawansowane narzędzia biologii molekularnej wykorzystywane są zarówno do poszukiwania zmian genetycznych charakterystycznych dla poszczególnych typów histologicznych nowotworów OUN, jak i do definiowania znamienych różnic w obrazie molekularnym, które mogą pozwolić na różnicowanie nowotworów o zbliżonej czy nawet takiej samej morfologii.

## BADANIA EKSPRESJI GENÓW

W ostatnich kilku latach można zaobserwować znaczący rozwój metod badawczych dotyczących analiz ekspresji genów. Po okresie dynamicznych badań dotyczących zmian strukturalnych genomu nadeszła pora na analizy dotyczące aktywności genów, mające na celu poznanie podstaw ich funkcjonowania i związków z nowotworzeniem. Stało się to możliwe dzięki wprowadzeniu nowych technik analizy molekularnej pozwalających na prowadzenie badań ekspresji dużej liczby genów w pojedynczych eksperymentach.

Do najpopularniejszych technik, które są wykorzystywane do prowadzenia analiz profili genowych obejmujących cały genom, należą metody oparte na stosowaniu mikromacierzy. Mają one najczęściej fizyczną postać płytek zawierających sondy przeznaczone do hybrydyzacji z badanym materiałem biologicznym. Wprowadzenie takiej technologii pozwoliło na ocenę ekspresji niejednokrotnie wszystkich znanych genów oraz ich różnych wariantów transkrypcyjnych. Efektem dobrze zaplanowanego i wykonanego eksperymentu mikromacierzowego jest możliwość wyselekcjonowania genów o zmienionej ekspresji oraz stworzenie unikalnego wzoru ekspresji dla każdej próby. Ten ostatni aspekt badań miałby się przyczynić do możliwości przewidywania przebiegu chorób, odpowiedzi na leczenie czy nawet wyboru odpowiedniej terapii.

Badania oparte na ocenie całkowitej ekspresji genów przyczyniły się już do odpowiedzi na wybrane problemy neuroonkologii. Dzięki niej jednoznacznie rozstrzygnięto toczący się przez wiele lat spór o to, czy rdzeniak (ang. *medulloblastoma*, MB) i prymitywny nowotwór neuroektodermalny ośrodkowego układu nerwowego (ang. *central nervous system primitive neuroectodermal tumor*, CNS PNET) to ten sam typ nowotworu, tylko o innym umiejscowieniu, czy też dwa odmienne rodzaje nowotworów. Podczas gdy klasyczne badania histopatologiczne

nie wykazywały znamienych różnic fenotypowych, analizy w oparciu o profilowanie genomowe dostarczyły istotnych dowodów na istniejące pomiędzy nimi różnice<sup>(1)</sup>. Przesłanki pojawiające się w bieżącym piśmiennictwie pozwalają przypuszczać, że podobne obserwacje mogą dotyczyć również innych nowotworów OUN.

W trakcie realizacji badań mikromacierzowych pojawiają się dwa dość istotne problemy. Pierwszy z nich jest związany z olbrzymią ilością otrzymywanych informacji, co wymaga użycia odpowiednich narzędzi statystycznych i bioinformatycznych. Drugi wiąże się z koniecznością potwierdzenia (walidacji) uzyskiwanych wyników przy wykorzystaniu innych metod badawczych.

W badaniach mających na celu profilowanie genomowe stosowane są obecnie trzy typy mikromacierzy: mikromacierze cDNA, mikromacierze oligonukleotydowe oraz mikromacierze oligonukleotydowe o wysokiej gęstości (mikroczipy DNA). Poszczególne techniki różnią się przede wszystkim metodyką prowadzenia eksperymentu obejmującą procesy hybrydyzacji i znakowania sond, jak również akwizycją i analizą uzyskiwanych danych (rys. 1).

Stosowanie mikromacierzy cDNA nie wymaga znajomości sekwencji całego genomu, niezbędna jest natomiast matryca, na bazie której przygotowywane są sondy. Technologia ta służy głównie poszukiwaniu zmian genomowych pod postacią dużych aberracji chromosomalnych, a jej modyfikacja jest obecnie wykorzystywana w porównawczej hybrydyzacji genomów z zastosowaniem mikromacierzy pozwalającej na określanie miejsc w genomie objętych amplifikacją lub delecją.

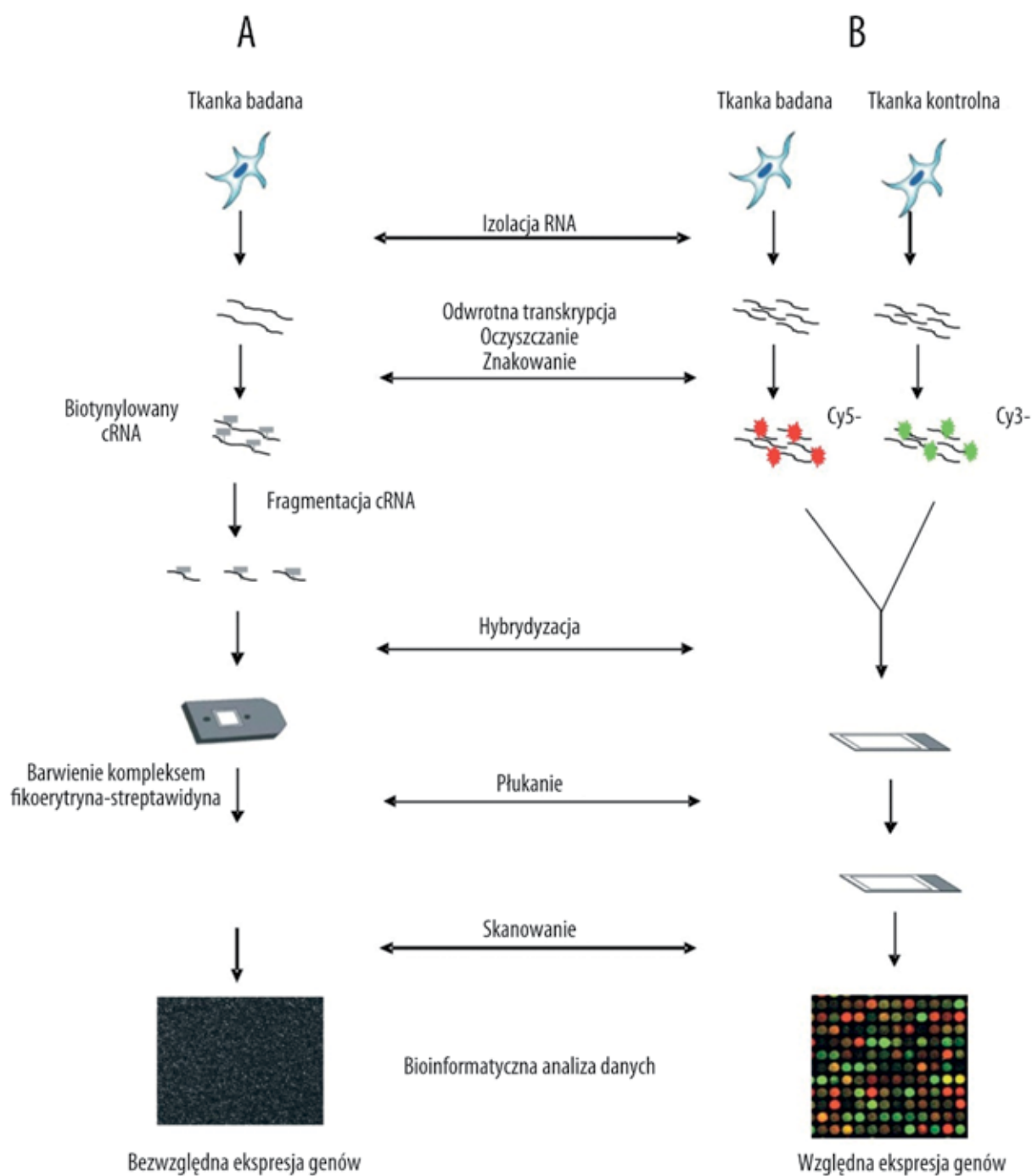
W mikromacierzach oligonukleotydowych wykorzystuje się długie sondy zbudowane z oligonukleotydów o długości około 60 monomerów, które za pomocą specjalistycznych drukarek są nanoszone na szkiełko w dowolnym układzie, podyktowanym przede wszystkim założeniami eksperymentu. Za główne zalety tej techniki uważa się długość używanych sond, mającą zapewnić większą swoistość procesu hybrydyzacji, możliwość analizy próby badanej i kontrolnej na jednym szkiełku oraz możliwość modyfikacji zestawu badanych genów. Wśród głównych wad wymienia się zaś możliwość wzajemnej kontaminacji materiału w procesie drukowania macierzy i wiążącą się z tym konieczność wieloetapowego sprawdzania jakości drukowanych sond oraz trudności związane z uzyskaniem powtarzalnych wyników hybrydyzacji analizowanego materiału badawczego.

Badania z wykorzystaniem mikroczipów zapewniają z kolei wysoką swoistość hybrydyzacji, a dzięki stałej kontroli nad produktem, zapewnionej przez producentów, zachowują przy tym wysoką jakość analiz i gwarantują uzyskanie wiarygodnych wyników. Przykładem tego typu mikromacierzy są czipy firmy Affymetrix, które pozwalają obecnie na ocenę ponad 47 tysięcy transkryptów (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Ich produkcja opiera się na bezpośredniej syntezie oligonukleotydów na odpowiedniej płytce, przy użyciu technologii fotolitografii. Niewątpliwą wadę tych macierzy stanowią brak elastyczności w doborze sond i wysoki koszt pojedynczego badania, który jest rekompensowany wysoką specyficznością i powtarzalnością wyników<sup>(2-5)</sup>.

Częściowym rozwiązaniem tych problemów mogą być wprowadzone niedawno na rynek macierze produkowane w oparciu o technologię *bead arrays*, zbudowane z sond zakotwiczonej do kropli silikonowych umieszczonych na silikonowych płytkach analitycznych. Pozwalają one na jednoczesną ocenę ekspresji ponad 29 tysięcy transkryptów (Whole-Genome DASL HT Assay, Illumina). Technologia ta pozwala na jednoczesną analizę kilku prób i tym samym ograniczenie kosztów eksperymentu. Kolejną korzyścią jest możliwość prowadzenia analiz

na bazie częściowo zdegradowanego materiału, np. RNA pochodzącego z bloków parafinowych.

Wśród innych technik służących ocenie poziomu transkryptów należy wymienić seryjną analizę ekspresji genów (ang. *serial analysis of gene expression*, SAGE), która pozwala na równoczesną ilościową ocenę ekspresji tysięcy genów w oparciu o bibliotekę oznakowanych sond, tzw. *SAGE tags*, o długości około 10 par zasad. Metoda ta umożliwia identyfikację do 100 tysięcy transkryptów bez konieczności wstępnej znajomości



Rys. 1. Schemat ilustrujący metodykę dwóch najczęściej stosowanych typów eksperymentów mikromacierzowych. A – mikromacierze oligonukleotydowe o wysokiej gęstości; B – mikromacierze oligonukleotydowe

ich sekwencji. Rozwinięciem tej metody jest system SOLiD™ SAGE™, w którym seryjna analiza ekspresji genów została połączona z profilowaniem miejsc startu transkrypcji (ang. *transcription start site*, TSS). Generowanie dłuższych niż w technice SAGE, znakowanych sond o długości około 27 par zasad pozwala na uzyskiwanie obszernych profili ekspresji genów i niezidentyfikowanych transkryptów, porównywanie analizowanych transkryptomów oraz identyfikację nowych genów.

Do oceny ekspresji mniejszej liczby genów służy półilościowa analiza PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real time PCR*, QRT-PCR). Pozwala ona na elastyczne planowanie eksperymentu, dostarcza wiarygodnych wyników i jest wykorzystywana głównie do potwierdzania wyników uzyskiwanych w trakcie analiz mikromacierzowych. W związku z rosnącą potrzebą jednoczesnej oceny ekspresji większej liczby genów producenci platform służących analizie ekspresji z użyciem QRT-PCR oferują coraz nowsze aplikacje dedykowane takim właśnie projektom (ang. *Quantitative RT-PCR & PCR Array*, *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array*). Najczęściej reakcje takie przeprowadza się na 96- lub 384-dółkowych płytkach zawierających sondy dedykowane genomowi związanym z wybranymi procesami biologicznymi, szlakami przekazywania sygnałów czy zespołami chorobowymi. Znacznie rzadziej do oceny ekspresji RNA używana jest metoda hybrydyzacji typu Northern, pozwalająca dodatkowo określać szereg właściwości mRNA wynikających np. z mechanizmów związanych z alternatywnym składaniem genów. Metoda ta oprócz tego, że nie jest wystarczająco swoista, ma inną zasadniczą wadę – jako bezpośredni materiał wykorzystuje RNA, który jest materiałem biologicznym wyjątkowo niestabilnym i łatwo ulegającym degradacji.

Do oceny ekspresji genów na poziomie ich produktów stosowane są metody oparte na detekcji białek z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał, *western blot* i analizy immunohistochemiczne.

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH WIEKU DZIECIĘCEGO

### KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Gwiaździatek włosowatokomórkowy jest nowotworem o niskim stopniu złośliwości histologicznej, zaliczanym do grupy nowotworów gleju gwiaździstego. W najnowszej klasyfikacji nowotworów OUN (*WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*) przypisano mu pierwszy stopień złośliwości i kod Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób 9421/1<sup>(6)</sup>.

Początkowo w celu opisania tej zmiany o cechach łagodnego rozrostu nowotworowego i dobrym rokowaniu używano określenia *spongioblastoma*. W kolejnych proponowanych terminach: *piloid astrocytoma* i *gliocytoma embryonale* starano się odzwierciedlić charakterystyczną dla tego nowotworu morfologię. Jednak obecna nazwa *gwiaździatek włosowatokomórkowy* najlepiej oddaje cechy obrazu histologicznego guza,

którego podstawowym elementem, oprócz elementów drobnotorbielkowych, są wydłużone „włosowate” komórki astrocytarne. W obrazie histologicznym tego nowotworu typowa jest również obecność włókien Rosenthala i eozynochłonnych ciał ziarnistych. W niektórych przypadkach obserwuje się komórki o hiperchromatycznych, atypowych jądrach, pola martwicy i pojedyncze mitozy. Dla nowotworów z silnie zaznaczonymi histopatologicznymi cechami złośliwości (duża liczba figur podziału, martwica z obecnością palisad, rozlana anaplazja) zaleca się stosowanie nazwy *anaplastyczny (złośliwy) gwiaździatek włosowatokomórkowy*<sup>(6-8)</sup>. W celu podkreślenia faktu występowania nowotworu głównie u dzieci i młodych dorosłych używano nazwy *juvenile pilocytic astrocytoma*, która jednak nie została przyjęta w oficjalnym mianownictwie. Pojawiające się niekiedy uwagi sugerujące traktowanie gwiaździatek włosowatokomórkowych jako wrodzonych, nienowotworowych zaburzeń rozwojowych wydają się niesłuszne, zwłaszcza w świetle opisywanych przypadków progresji czy rozsiewu tego nowotworu<sup>(9,10)</sup>.

## HISTOGENEZA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Na podstawie obserwacji wykazujących obecność w gwiaździatekach włosowatokomórkowych nielicznych zmian cyto-genetycznych uważa się, że nowotwory te mają pochodzenie monoklonalne. Ostatnich dowodów na to, że gwiaździatek włosowatokomórkowy wywodzi się z rozrostu pojedynczej linii glejowych komórek prekursorowych o zmienionym genotypie, dostarczyły analizy Payton i wsp. Na podstawie allelospecyficznej oceny ekspresji genów (ang. *allele-specific expression*, ASE) autorzy określili stopień inaktywacji chromosomu X wskazujący jednoznacznie na monoklonalne pochodzenie wszystkich badanych przez zespół nowotworów (siedem informacyjnych przypadków spośród ośmiu poddanych badaniu)<sup>(11)</sup>.

Za komórki prekursorowe gwiaździateka włosowatokomórkowego uznaje się komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. *oligodendrocyte type-2 astrocyte progenitors*, O2A) wykazujące możliwość dwukierunkowego różnicowania. Pierwsze dane sugerujące obecność związku pomiędzy onkogenozą tego nowotworu a zaburzeniami różnicowania komórek prekursorowych oligodendrocytów przedstawili w 1999 roku Figarella-Branger i wsp. Zespół ten wykazał istotne odchylenie w ekspresji antygenu PEN5 (CD162) we wszystkich dziesięciu badanych gwiaździatekach włosowatokomórkowych i zasugerował wykorzystanie tego markera proliferujących komórek prekursorowych w diagnostyce różnicowej<sup>(12)</sup>. Kontynuacją tych analiz jest doniesienie Takei i wsp. przedstawiające charakterystykę ekspresji białek będących markerami oligodendrogleju w 64 gwiaździatekach włosowatokomórkowych. W powyższej analizie immunohistochemicznej uwzględniono białka: MBP (ang. *myelin basic protein*), będące markerem dojrzałych oligodendrocytów, PDGFR- $\alpha$  (ang. *platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$* ), uznawane za marker niedojrzałych oligodendrocytów (potencjalnych komórek prekursorowych) oraz OLIG1 (ang. *oligodendrocyte*

*transcription factor 1*) i OLIG2 (ang. *oligodendrocyte transcription factor 2*) obecne w oligodendrocytach zarówno rozwijającego się, jak i dojrzałego mózgowia. Autorzy wykazali odwrotnie proporcjonalny związek pomiędzy wartością indeksu proliferacyjnego komórek gwiazdziaków włosatokomórkowych a ekspresją markerów różnicowania oligodendrocytów i zasugerowali, że ekspresja ww. białek, a zwłaszcza MBP i PDGFR- $\alpha$ , może być pomocna przy identyfikacji nowotworów o odmiennym rokowaniu. Wysoki poziom ekspresji MBP przy jednoczesnej niskiej ekspresji PDGFR- $\alpha$  miałyby być związany z lepszym rokowaniem, podczas gdy wysoka ekspresja markera niedojrzałych oligodendrocytów wiązałyby się z dużym prawdopodobieństwem wczesnej wznowy i progresji choroby. Zespół uznał obecność ekspresji markerów oligodendrocytów w komórkach gwiazdziaków włosatokomórkowych za potwierdzenie przypuszczeń dotyczących pochodzenia tego nowotworu ze szczególnej subpopulacji komórek progenitorowych oligodendrogleju lub komórek gleju promienistego (ang. *radial glial cells*)<sup>(13,14)</sup>. Obecność gleju promienistego w gwiazdziakach włosatokomórkowych rozwijających się u dzieci i u dorosłych wykazali Tchoghandjian i wsp. Autorzy doniesienia opisali obecność komórek zachowujących cechy fenotypowe progenitorowych komórek glejowych pomiędzy dnem komory trzeciej a nerwami wzrokowymi, czyli w miejscu występowania komórek prekursorowych oligodendrocytów w okresie rozwoju zarodkowego. Komórki te charakteryzowały się obecnością odczynu dla GFAP i wimentyny oraz możliwością dwukierunkowego różnicowania. Według autorów miałyby one stanowić punkt wyjścia dla rozwoju gwiazdziaków włosatokomórkowych okolicy skrzyżowania dróg wzrokowych<sup>(15)</sup>. Podobny mechanizm leży prawdopodobnie u podstaw onkogenezy tego nowotworu o lokalizacji podnamiotowej, gdzie komórki gleju gwiazdzistego przyjmujące formę komórek gleju Bergmanna odgrywają znaczącą rolę w migracji komórek warstwy ziarnistej mózdzku. Dla tych potencjalnych komórek prekursorowych cechą charakterystyczną mają być zaburzenia regulacji genów *SOX8* (ang. *sry box 8*) i *DNER* (ang. *Delta/Notch-like EGF-related*) odpowiedzialnych za dojrzewanie i różnicowanie komórek glejowych i neuronalnych mózgowia<sup>(15-17)</sup>.

### EPIDEMIOLOGIA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Gwiazdziak włosatokomórkowy jest najczęstszym nowotworem OUN wieku dziecięcego, stanowiącym około 30% nowotworów występujących w tym okresie życia i około 62% wszystkich gwiazdziaków rozpoznawanych w populacji dziecięcej. U osób dorosłych częstość jego występowania jest znacznie mniejsza i wynosi około 6%. Nowotwór ten rozpoznaje się najczęściej w dwóch pierwszych dekadach życia. Szczyt zachorowań przypada pomiędzy 5. a 10. rokiem życia, średni wiek zachorowania wynosi 8 lat. Częstość występowania tego nowotworu wśród dzieci oceniana jest na 0,8/100 000/rok i wykazuje niewielkie zmiany w zależności od analizowanej grupy wiekowej. Wartości te w kolejnych

przedziałach wiekowych kształtują się następująco: 0-4 lat – 0,9/100 000/rok, 5-9 lat – 0,89/100 000/rok, 10-14 lat – 0,83/100 000/rok, 15-19 lat – 0,6/100 000/rok<sup>(18-20)</sup>.

Nowotwory tego typu obserwowane u dzieci mogą rozwijać się we wszystkich obszarach mózgowia, najczęściej jednak występują w przestrzeni podnamiotowej, w obrębie robaka i półkul mózdzku (około 67% przypadków). Jako ciekawostkę należy przytoczyć doniesienie Burkharda i wsp., którzy w grupie 55 gwiazdziaków włosatokomórkowych rozwijających się u chorych poniżej 12. roku życia nie odnotowali ani jednego przypadku zajęcia przestrzeni nadnamiotowej. Analizy prowadzone na dużych liczebnie grupach wskazują na występowanie tego nowotworu z nieco większą częstością u chłopców niż u dziewcząt (1,12:1). Jedynie gwiazdziaki włosatokomórkowe dróg wzrokowych rozwijające się w przebiegu nerwiakowłókniałości typu 1. (NF1, choroba von Recklinghausena) częściej pojawiają się u dzieci płci żeńskiej<sup>(6,21-26)</sup>. Nie stwierdzono związku pomiędzy częstością występowania tego nowotworu a rasą<sup>(27)</sup>.

Gwiazdziaki włosatokomórkowe występują przede wszystkim jako nowotwory sporadyczne, rzadziej obserwuje się je w przebiegu schorzeń uwarunkowanych genetycznie. Najczęstszym zespołem, w którego przebiegu rozwija się te nowotwory, jest nerwiakowłókniałość typu 1. U chorych tych przebieg choroby nowotworowej jest zwykle łagodniejszy, co wiąże się z bardzo powolnym wzrostem guza<sup>(28,29)</sup>. Gwiazdziaki włosatokomórkowe występują u około 10% chorych z NF1, przy czym zwykle są to zmiany umiejscowione w obrębie dróg wzrokowych. Znacznie rzadziej nowotwory rozwijają się w innych przestrzeniach anatomicznych, czego przykładem jest opisany w literaturze przypadek 17-letniej chorej z wieloogniskowym gwiazdziakiem włosatokomórkowym zlokalizowanym podnamiotowo. Gwiazdziaki włosatokomórkowe związane z NF1 charakteryzuje obecność mutacji w genie *NF1* (ang. *neurofibromin 1*) odpowiedzialnym za rozwój schorzenia oraz możliwość utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH) na chromosomach 1p, 10q i 19q<sup>(6,30,31)</sup>.

Istnieją pojedyncze doniesienia opisujące występowanie gwiazdziaka włosatokomórkowego u chorych z zespołami Frasiera i Noonan, związanymi odpowiednio z mutacjami w genach *WT1* (ang. *Wilms tumor 1*) i *PTPN1* (ang. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1*)<sup>(32,33)</sup>.

### CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Jak wcześniej wspomniano, gwiazdziaki włosatokomórkowe mogą rozwijać się praktycznie we wszystkich możliwych przestrzeniach anatomicznych mózgowia. Najczęściej jednak zlokalizowane są w obrębie mózdzku i komory IV, następnie w okolicy skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza (glejaki dróg wzrokowych) i w obrębie półkul mózgu. Pojedyncze przypadki spotyka się w obrębie pnia mózgu, w okolicy szyszynki i w kącie mostowo-mózdkowym.

Objawy kliniczne u chorych z gwiaździami włosowatokomórkowymi, podobnie jak w przypadku innych nowotworów OUN, można podzielić na ogólne, będące wynikiem wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego, i ogniskowe, spowodowane miejscowym rozrostem zmian.

W przypadku nowotworów mózdzku najczęściej są to objawy wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego spowodowane wodogłowiem (ból głowy, nudności i wymioty, zmiana zachowania, zaburzenia świadomości, bradykardia) oraz objawy uszkodzenia mózdzku (zaburzenia równowagi, ataksja, dysmetria, oczopląs).

W gwiaździanach włosowatokomórkowych okolicy podwzgórza i skrzyżowania dróg wzrokowych głównymi objawami są zaburzenia okulistyczne (osłabienie ostrości wzroku, zaburzenia pola widzenia, obrzęk lub zanik tarcz nerwów wzrokowych, oczopląs oraz wytrzeszcz gałki ocznej) oraz zaburzenia endokrynologiczne wynikające z uszkodzenia osi podwzgórzowo-przysadkowej. U chorych dzieci stosunkowo często dochodzi do powstania wodogłowia.

Nowotwory zlokalizowane w obrębie półkul mózgu, oprócz objawów wzmożonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego, mogą powodować niedowłady kończyn, zaburzenia mowy, napady padaczkowe oraz zaburzenia zachowania<sup>(6,34)</sup>.

Leczenie chorych z gwiaździami włosowatokomórkowymi polega przede wszystkim na chirurgicznym usunięciu guza, zwykle bez konieczności włączania terapii adiuwantowej (chemioterapia, radioterapia). Obecnie, dzięki znacznemu rozwojowi diagnostyki obrazowej i technik mikroneurochirurgicznych, u większości pacjentów możliwa jest resekcja całkowita. W takich przypadkach przeżycie 5-letnie ocenia się nawet na 100%, a 10-letnie na 96%.

Nieco inaczej jest w przypadku resekcji niecałkowitej, gdzie w prawie 50% przypadków obserwuje się cechy progresji pozostawionych resztek nowotworu. U części pacjentów, przede wszystkim u niemowląt i chorych z guzami dróg wzrokowych i podwzgórza, obserwuje się niekiedy rozsiew komórek nowotworowych w obrębie dróg przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego, z tworzeniem ognisk przerzutowych. W obu wyżej wymienionych grupach w sposób znaczący pogarsza się rokowanie. W przypadku niemowląt z nowotworami dróg wzrokowych i podwzgórza pojawiały się nawet sugestie, aby tę podgrupę wyróżnić jako pacjentów o szczególnie złym rokowaniu<sup>(22,26,35-37)</sup>. Zależność ta może być uwarunkowana częstszym występowaniem w tej grupie wiekowej gwiaździanki pilomyksoidnej (ang. *pilocyctic astrocytoma*, PMA). Jednostka ta została po raz pierwszy wyszczególniona w najnowszej klasyfikacji nowotworów OUN według WHO jako podtyp omawianego nowotworu o gorszym rokowaniu, któremu przypisano II stopień złośliwości<sup>(6,8)</sup>.

Istnieje także możliwość złośliwej transformacji gwiaździanki włosowatokomórkowej, która ze względu na stosunkowo rzadkie występowanie nie stanowi znaczącego problemu klinicznego<sup>(9,38,39)</sup>. Opisano również samoistną regresję gwiaździanki włosowatokomórkowej, częściej obserwowaną u dzieci z NF1<sup>(28,29)</sup>.

## CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

### ZMIANY CHROMOSOMALNE W GWIAZDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Biologia molekularna gwiaździanek włosowatokomórkowych, pomimo ich częstego występowania w populacji dziecięcej, nie została dotąd wystarczająco poznana. Większość istniejących w piśmiennictwie opracowań obejmuje grupę dzieci i młodych dorosłych, dla której to kategorii wiekowej, w zależności od kraju, wyznaczono granice od 15. do 21. roku życia.

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów OUN, pierwsze dociekania, które miały przybliżyć biologię molekularną gwiaździanek włosowatokomórkowych, opierały się na wykorzystaniu standardowych badań cytogenetycznych. Zmiany chromosomalne obserwowano w 10-50% badanych przypadków, jednak w znaczącej większości odnotowywano prawidłowy kariotyp badanych nowotworów. Na zwiększenie częstości obserwowanych zaburzeń nie miało wpływu wykorzystanie nowoczesnych metod cytogenetycznych o dużej rozdzielczości, takich jak porównawcza hybrydyzacja genomowa (ang. *comparative genomic hybridization*, CGH) czy porównawcza hybrydyzacja genomowa z zastosowaniem mikromacierzy (ang. *array comparative genomic hybridization*, aCGH), które umożliwiają określanie niewielkich obszarów delekcji i/lub amplifikacji. Występowanie alteracji chromosomalnych ze zmienną częstością tłumaczy się różną liczebnością badanych grup, zmiennymi proporcjami nowotworów o odmiennej lokalizacji oraz jednoczesnym analizowaniem nowotworów występujących sporadycznie i uwarunkowanych genetycznie. Rozbieżności te mogą być również spowodowane heterogennością histologiczną badanych grup. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że wcześniejsze opracowania dotyczące biologii gwiaździanek włosowatokomórkowych obejmowały przypadki gwiaździanki pilomyksoidnego.

Najczęściej opisywanymi zaburzeniami chromosomalnymi w gwiaździanach włosowatokomórkowych były zmiany postacią nadmiaru materiału genetycznego na chromosomach 5., 6., 7., 8., 9., 11., 12., 15., 17., 19., 20. i 22., utraty materiału genetycznego na chromosomach 8., 9. i 15. oraz trisomia chromosomów 5., 7. i 8.<sup>(40-44)</sup> Jones i wsp. zaobserwowali związek pomiędzy wiekiem chorych (powyżej 15. roku życia) i wzrastającą liczbą zmian chromosomalnych<sup>(41)</sup>. U dzieci nie potwierdzono związku pomiędzy zmianami w kariotypie a zwiększonym prawdopodobieństwem nawrotu choroby, którą to zależność obserwowano u dorosłych chorych. Nie potwierdzono również związku pomiędzy rodzajem zaburzeń cytogenetycznych a lokalizacją nowotworu<sup>(45,46)</sup>.

Zmianą chromosomalną, która okazała się najbardziej znacząca dla dalszego poznawania biologii gwiaździanek włosowatokomórkowych, był nadmiar materiału genetycznego na długim ramieniu chromosomu 7.<sup>(41,43,44)</sup> Amplifikacja 7q, najczęściej przybierająca postać ograniczonej duplikacji obszaru



7q34, dotyczy około 45% gwiżdżiaków o niskim stopniu złośliwości i zarazem od 53% do 77% gwiżdżiaków włosowatokomórkowych wieku dziecięcego<sup>(47,48)</sup>. W obszarze tym zawiera się locus onkogenu *BRAF* (ang. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*).

### ZABURZENIA MOLEKULARNE W OBRĘBIE ZNANYCH GENÓW I SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH W GWIŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Najczęstszym zaburzeniem dotyczącym znanego genu w gwiżdżiakach włosowatokomórkowych jest aktywacja genu *BRAF* ulegającego ekspresji w większości tkanek organizmu człowieka. Szczególnie wysokie poziomy białka obserwuje się w tkance nerwowej.

Podstawowym mechanizmem aktywacji genu *BRAF* w gwiżdżiakach włosowatokomórkowych jest duplikacja tandemowa, w wyniku której powstaje gen fuzyjny *KIAA1549-BRAF*, pozbawiony regulatorowej domeny N-końca, zachowujący aktywność domeny kinazowej C-końca. Dotychczas opisano pięć wariantów genu fuzyjnego, w zależności od miejsc pęknięcia genów zaangażowanych w jego tworzenie, przy czym najczęściej występującym wariantem jest fuzja pomiędzy eksonem 16. genu *KIAA1549* a eksonem 9. genu *BRAF*. Obecność genu fuzyjnego *KIAA1549-BRAF* w gwiżdżiakach włosowatokomórkowych nie wykazywała związku z lokalizacją nowotworu i/lub wiekiem zachorowania<sup>(47,49-52)</sup>. Alternatywnym mechanizmem zmieniającym aktywność genu *BRAF* w gwiżdżiakach włosowatokomórkowych jest obecność aktywującej mutacji V600E. Zmiana ta dotyczy 6% nowotworów, przebiega bez duplikacji materiału genetycznego na chromosomie 7q34 i może współistnieć z inaktywacją genu *NFI*<sup>(47,48,50,53)</sup>. Obecnie sugeruje się możliwość wykorzystania obecności genu fuzyjnego *KIAA1549-BRAF* w diagnostyce różnicowej gwiżdżiaków wieku dziecięcego<sup>(54)</sup>. *BRAF* jest kinazą serynowo-treoninową, która w kaskadzie sygnałowej kinaz aktywowanych mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase signaling pathway*, MAPK) przekazuje sygnały mitogenne z powierzchni komórek do jądra. Powstające w wyniku aktywacji genu białko fuzyjne posiada właściwości onkogenne i wywołuje zmianę aktywności szlaku MAPK. Następnym tego jest pobudzenie procesów proliferacyjnych w nowotworach pochodzenia glejowego<sup>(47,48,50,51)</sup>. Aktywację szlaku MAPK opisuje się nawet w 100% analizowanych gwiżdżiaków włosowatokomórkowych, co podkreśla jego potencjalny związek z powstawaniem tego typu nowotworów<sup>(47,49-51,54-56)</sup>. Wśród rzadziej występujących mechanizmów prowadzących do aktywacji szlaku MAPK wymieniano obecność genu fuzyjnego powstającego z połączenia genów *SRGAP3* (ang. *SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3*) i *RAF1* (ang. *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog 1*) oraz insercję trzech par zasad w kodonie 598. genu *BRAF*<sup>(50,52)</sup>.

Pobudzenie szlaku MAPK może ponadto nastąpić w wyniku aktywacji genów z rodziny *RAS*, które dodatkowo powodują deregulację szlaku sygnałowego PI3/AKT, zaangażowanego w procesy nowotworzenia części gwiżdżiaków

włosowatokomórkowych. Mechanizm odpowiedzialny za pobudzenie tego szlaku, poza stwierdzanymi z małą częstotliwością (4-7%) aktywującymi mutacjami genu *KRAS* (ang. *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), pozostaje niewyjaśniony<sup>(50,57-59)</sup>. Zmiany w ekspresji genów działających na szlakach sygnałowych MAPK i PI3/AKT potwierdzono także w trakcie analiz profilowania genomowego gwiżdżiaków włosowatokomórkowych<sup>(58)</sup>.

W warunkach prawidłowych szlaki MAPK i PI3/AKT są drogami przekazywania sygnałów dla czynników wzrostu *PDGFR-α* i *EGFR* (ang. *epidermal growth factor receptor*), które odgrywają istotną rolę między innymi na ścieżkach sygnałowych pobudzających proliferację komórek nowotworowych w guzach pochodzenia glejowego. Ich nadmierna aktywność jest molekularnym czynnikiem związanym zwłaszcza z progresją nowotworów o wyższych stopniach złośliwości. W gwiżdżiakach włosowatokomórkowych Huang i wsp. wykazali niskie poziomy białek *PDGFR-α* i *EGFR*, co jest związane z małą aktywnością proliferacyjną tych nowotworów<sup>(60)</sup>. Niemniej jednak istnieją również pojedyncze doniesienia potwierdzające zmiany w genach z rodziny nabłonkowych i płytkopochodnych czynników wzrostu i/lub ich receptorów. Addo-Yobo i wsp. opisałi nadekspresję genu *ERBB3* (ang. *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*), protoonkogenu z rodziny *ERBB* i prawdopodobną przyczynę tej zmiany – nadekspresję genu *SOX10* (ang. *sry box 10*). Funkcja tych genów jest ściśle związana z procesami rozwojowymi mózgowia, co skłoniło autorów do założenia, że za rozwój gwiżdżiaka włosowatokomórkowego odpowiadają zmiany molekularne w obrębie szlaków sygnałowych zaangażowanych w kontrolę tych procesów. Opisano również nadekspresję białka z tej rodziny, kodowanego przez gen *ERBB2*. Współistniejąca nadekspresja *ERBB2* i *ERBB3* przyczynia się do przewagi heterodimerów *ERBB2/ERBB3*, które mogą odgrywać znaczącą rolę w onkogenezie gwiżdżiaków włosowatokomórkowych poprzez silne działanie mitogenne<sup>(61,62)</sup>.

Puputti i wsp. opisałi wzmoczoną ekspresję kinazy tyrozynowej *KIT* (ang. *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarkoma viral oncogene homolog*), członka rodziny receptorów dla czynników wzrostu *PDGFR*. Aktywowaną formę białka obserwowano w śródbłonku naczyń nowotworowych zwłaszcza u młodych chorych<sup>(63)</sup>. Wymienione powyżej zmiany molekularne stanowią obiecujące pole do poszukiwań molekularnych celów terapeutycznych dla nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, których skuteczność działania wykazano między innymi w leczeniu raka płuc, okrężnicy i tarczycy<sup>(56,64,65)</sup>. I chociaż stosowanie wybranych preparatów u chorych z gwiżdżiakami o wysokim stopniu złośliwości nie przyniosło spodziewanych efektów, dotychczasowe doniesienia opisujące efekty takich prób w przypadku gwiżdżiaka włosowatokomórkowego są zarazem obiecujące i zaskakujące.

Dla przykładu, w badaniach *in vitro* gwiżdżiaka włosowatokomórkowego zaobserwowano antyproliferacyjne działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (gefitynib) na drodze niezależnej od *EGFR*. Opisano również regresję nowotworu u 14-letniej chorej

z cechami rozsiewu procesu nowotworowego leczonej inhibitorem kinaz tyrozynowych (imatynib) przy jednoczesnym braku zmian w ekspresji tych kinaz będących bezpośrednim celem działania leku<sup>(66-69)</sup>. Celem terapeutycznym może być również białko ERBB3, którego aktywność próbowano hamować gefitynibem<sup>(61)</sup>. W ostatnim czasie ukazało się również doniesienie przedstawiające wyniki badania przedklinicznego preparatu AZD6244 (selumetynib), w przypadku którego wykazano pozytywne działanie przeciwnowotworowe u ksenograftów z gwiaździakami włosowatokomórkowymi, jednakże tylko w przypadku nowotworów związanych z obecnością mutacji V600E w genie *BRAF*<sup>(68,70)</sup>.

Jako ciekawostkę należy przytoczyć obserwację dotyczącą obecności zmian na szlaku SHH (ang. *sonic hedgehog signaling pathway*) w gwiaździakach włosowatokomórkowych<sup>(71)</sup>. Szlak ten odgrywa istotną rolę jako czynnik promujący proliferację komórek nowotworowych w gwiaździakach o wysokim stopniu złośliwości i nowotworach pochodzenia zarodkowego<sup>(72,73)</sup>. W analizach dotyczących omawianego typu nowotworów szlak ten pojawiał się w grupie kaskad sygnałowych, które wykazywały zmienioną ekspresję genów, a jego szczegółowe analizy wykazały podwyższoną ekspresję genu *PTCH1* (ang. *human homologue of Drosophila patched*), kluczowego dla działania szlaku. Ponadto zaobserwowano znamiennej statystycznie zależność pomiędzy odczynami immunohistochemicznymi dla białek *PTCH1* i *GLI1* a młodszy wiekiem chorych oraz aktywnością proliferacyjną<sup>(71)</sup>. Zmiany te, w przypadku gwiaździaków włosowatokomórkowych, mogą mieć znaczenie zwłaszcza w świetle przesłanek świadczących o synergistycznym działaniu szlaków SHH, MAPK i PI3/AKT w procesach sprzyjających proliferacji komórkowej. Podobne zależności opisywano między innymi w raku żołądka, a obecność tego typu zaburzeń stwarza potencjalną możliwość opracowania celowanych metod terapeutycznych<sup>(74,75)</sup>.

W ciągu mniej więcej dwóch dekad analiz molekularnych w gwiaździakach włosowatokomórkowych opisywano ponadto szereg pojedynczych zmian molekularnych, które na przestrzeni kilku lat niejednokrotnie wzajemnie się wykluczały. Dotyczy to między innymi genu *HIPK2* (ang. *homeodomain interacting protein kinase 2*), który ze względu na swą lokalizację w obszarze często ulegającym amplifikacji (7q34) i związek ze szlakami apoptotycznymi mógł odgrywać znaczącą rolę w promocji tego nowotworu. Jednak poza doniesieniem Deshmukha i wsp. jego znaczenie w onkogenezie gwiaździaka włosowatokomórkowego nie zostało potwierdzone<sup>(48,55,76,77)</sup>.

W pojedynczych doniesieniach opisywano próby poszukiwania zmian molekularnych typowych dla gwiaździaków o wyższych stopniach złośliwości. Dla przykładu mutacje genu *TP53* (ang. *tumor protein p53*) w tym typie nowotworu opisywane są na tyle rzadko, że sugerowano wykorzystanie tej zmiany do różnicowania gwiaździaków włosowatokomórkowych z gwiaździakami rozlanymi<sup>(78)</sup>. Dane dotyczące związku pomiędzy ekspresją białka TP53 a indeksem proliferacyjnym i/lub apoptotycznym są sprzeczne, opisano natomiast obecność silnego

odczynu immunohistochemicznego w obszarach objętych anaplazją. Nie wykazano natomiast statystycznie znamiennej zależności pomiędzy immunoreaktywnością TP53 a przeżyciem chorych<sup>(79-87)</sup>.

W pojedynczym doniesieniu zasugerowano znaczenie obniżonej ekspresji genu *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*) w patogenezie gwiaździaków włosowatokomórkowych. Wśród nowych kandydatów na geny supresorowe istotne dla rozwoju nowotworu wymieniano ponadto gen *FOXG1B* (ang. *forkhead box G1*) zaangażowany w szlak PI3/AKT oraz geny z rodziny *BCL7B* (ang. *B-cell CLL/lymphoma 7B*) i *BCL7A* (ang. *B-cell CLL/lymphoma 7A*)<sup>(58,78,88)</sup>.

Ostatnio opisano zmiany w genie *TNR* (ang. *tenascin R*) kodującym glikozylowane białko macierzy zewnątrzkomórkowej, ulegającym ekspresji głównie w obrębie OUN. Zaobserwowane w nowotworach pochodzenia glejowego zmiany na poziomie RNA i białka świadczą o możliwej supresorowej roli genu, a różnice w ekspresji mogą być wykorzystane do różnicowania pomiędzy glejakami o wysokim i niskim stopniu złośliwości (zachowującymi wysoką ekspresję genu)<sup>(89)</sup>. Znotowano także zmiany dotyczące onkogenu *MYB* (ang. *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), aktywatora transkrypcyjnego zaangażowanego w procesy onkogenezy glejaków o niskim stopniu złośliwości<sup>(90)</sup>.

#### ZABURZENIA EPIGENETYCZNE W GWIAŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Ponieważ poziom ekspresji genów jest pochodną ich aktywności podlegającej regulacji między innymi na drodze mechanizmów epigenetycznych, w gwiaździakach włosowatokomórkowych analizowano także zmiany tego rodzaju. Dotychczas opisano hipometylację genu *MYOD1* (ang. *myogenic differentiation antigen 1*), hipermetylację genów *CDKN2A* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) i *THBS1* (ang. *thrombospondin 1*) oraz hipermetylację promotora genu supresorowego *RASSF1A* (ang. *Ras association domain family protein 1, isoform A*) hamującego aktywność szlaku MAPK<sup>(91-95)</sup>. Ponadto zwrócono uwagę na odwrotną korelację pomiędzy poziomem metylacji genu *LHX9* (ang. *lim homeobox gene 9*) a stopniem złośliwości gwiaździaków<sup>(96)</sup>.

#### PROFIL EKSPRESJI GENÓW W GWIAŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

W ostatniej dekadzie prężnie rozwijającą się gałęzią biologii molekularnej była złożona analiza ekspresji genów. W przypadku gwiaździaków włosowatokomórkowych badania tego rodzaju rozpoczęły się od uwzględniania tych nowotworów w analizach oceniających profil ekspresji genów w nowotworach pochodzenia glejowego o różnym stopniu złośliwości. W doniesieniu Rickmana i wsp. autorzy określili profil molekularny gwiaździaków I, II i IV stopnia złośliwości wg skali WHO oraz porównali je ze sobą, a także ze zdrowymi tkankami

mózgu. Wśród genów, które miały różnicować nowotwory I i IV stopnia złośliwości, znalazły się geny *ZYX* (ang. *zyx-in*), *SDC1* (ang. *syndecan 1*), *FLN1* (ang. *filamin A*), *FOXG1B* (ang. *forkhead box G1*) i *FOXM1* (ang. *forkhead box M1*). Według autorów doniesienia miałyby one odpowiadać za progresję choroby nowotworowej. Jedną z ciekawszych obserwacji zaprezentowanych w powyższym opracowaniu był przypadek gwiaździanki włosowatokomórkowej, który po przeprowadzeniu analizy metodą grupowania hierarchicznego prezentował profil molekularny zbliżony do *glioblastoma*. I choć w doniesieniu brakuje danych klinicznych dotyczących dalszych losów chorego, taką obserwację można uznać za próbę wytłumaczenia występowania rzadkiego zjawiska złośliwej transformacji tego nowotworu. Autorzy pracy wskazują ponadto na obecność w gwiaździankach włosowatokomórkowych podwyższoną ekspresję genów zaangażowanych w hamowanie procesów migracji komórek, co może tłumaczyć ich niewielką skłonność do rozsiewu i tworzenia ognisk przerzutowych<sup>(97)</sup>.

Dotychczasowe nieliczne doniesienia przedstawiające wyniki badań ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy cDNA, prowadzone tylko na gwiaździankach włosowatokomórkowych, można podzielić na dwie grupy. Pierwsze z nich prezentowały dane sugerujące obecność molekularnych czynników prognostycznych, drugie natomiast dotyczyły prezentacji różnic w profilu molekularnym, w zależności od lokalizacji badanych nowotworów.

Analiza 21 przypadków tego nowotworu przeprowadzona przez Wonga i wsp. pozwoliła na wyselekcjonowanie genów, które ulegały wyraźnym zmianom ekspresji w porównaniu ze zdrowymi tkankami mózgu. Wśród nich autorzy wymienili przede wszystkim geny związane z rozwojem mózgowia i regulacją procesów neurogenezy: *SEMA5A* (ang. *semaphorin 5A*), *SEMA3E* (ang. *semaphorin 3E*), *DYPSL3* (ang. *dihydropyrimidinase-like 3*), *PTPRZ1* (ang. *protein tyrosine phosphatase receptor-type Z 1*) i *ASCL1* (ang. *achaete-scute homolog 1*). W pracy tej po raz pierwszy zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania profilowania genomowego do oceny przebiegu choroby nowotworowej u dzieci z gwiaździanką włosowatokomórkową. Miałyby temu służyć różnice w ekspresji genów odpowiedzialnych za przyleganie i wzrost komórek, procesy angiogenezy, proliferacji naczyń oraz tworzenie osłonek nerwowych: *FNI* (ang. *fibronectin 1*), *IL8* (ang. *interleukin 8*), *PLP1* (ang. *proteolipid protein 1*), *MBP* (ang. *myelin basic protein*), *VEGF* (ang. *vascular endothelial growth factor*). Według autorów zwłaszcza obniżona ekspresja genów *MBP* i *PLP*, związanych z tworzeniem osłonek nerwowych, miałyby być pomocną w ocenie prawdopodobieństwa złośliwej przemiany tego nowotworu<sup>(98)</sup>.

W kolejnym opracowaniu zwrócono uwagę na możliwe znaczenie genu *MATN2* (ang. *matrilin-2*) dla powstawania gwiaździanek włosowatokomórkowych. Białko macierzy wewnątrzkomórkowej *MATN2* zapewnia właściwe warunki dla komórkowych procesów wzrostu, proliferacji i różnicowania. Poziom ekspresji kodującego go genu był wyższy w gwiaździankach włosowatokomórkowych występujących sporadycznie w porównaniu z przypadkami związanymi

z nerwiakowłóknikowością typu 1. oraz w nowotworach zlokalizowanych nadnamiotowo w porównaniu ze zmianami położonymi w obrębie mózdzku. Podwyższona ekspresja genu miałyby również mieć związek z gorszym przebiegiem klinicznym choroby nowotworowej<sup>(99)</sup>.

W kolejnym opracowaniu Sharma i wsp. przeprowadzili analizę mikromacierzową 41 przypadków tego nowotworu. Zespołowi nie udało się ustalić zmian związanych z przebiegiem choroby nowotworowej, natomiast w wyniku przeprowadzonej analizy wytypowano geny charakterystyczne dla zmian rozwijających się w różnych obszarach anatomicznych mózgowia. Nowotwory występujące nadnamiotowo charakteryzowała nadekspresja genów: *LHX2* (ang. *lim homeobox gene 2*), *NR2E1* (ang. *nuclear receptor subfamily 2 group E member 1*), *SIX3* (ang. *sine oculis homeobox homolog 3*), *TTC9* (ang. *tetratricopeptide repeat domain 9*), *CASP7* (ang. *caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase*) i *ZNF140* (ang. *zinc finger protein 140*), podczas gdy zmiany zlokalizowane w obrębie tylnego dołu czaszki związane były z nadmierną aktywnością genów: *PAX3* (ang. *paired box gene 3*), *IRX2* (ang. *iroquois homeobox 2*) i *RASSF2* (ang. *Ras-association domain family protein 2*). Autorzy nie opisali specyficznych zmian w profilu ekspresji genów w nowotworach związanych z NF1<sup>(100)</sup>.

W kolejnym opracowaniu, uwzględniającym 31 przypadków gwiaździanki włosowatokomórkowej, wykazano również znamienny związek pomiędzy lokalizacją nowotworów a ich profilem ekspresji. Tchoghandjian i wsp. zasugerowali możliwość pochodzenia nowotworów umiejscowionych w okolicy dróg wzrokowych od odmiennych komórek prekursorowych niż w przypadku nowotworów zlokalizowanych w obrębie mózdzku. Co więcej, przedstawili także tezę zakładającą traktowanie gwiaździanek włosowatokomórkowych o różnej lokalizacji jako odmiennych genetycznie jednostek nozologicznych wymagających specyficznego postępowania terapeutycznego. Wśród genów mających mieć szczególne znaczenie w rozwoju nowotworów okolicy skrzyżowania wzrokowego wymieniono, podobnie jak w poprzednim opracowaniu, geny homeoboksove (ang. *homeobox genes*) *LHX2* i *SIX6* (ang. *sine oculis homeobox homolog 3*), zaangażowane w procesy rozwojowe dróg wzrokowych<sup>(15)</sup>.

Próbą podsumowania wczesnych badań dotyczących profilowania genomowego nowotworów linii glejowej jest doniesienie Rorive i wsp., w którym autorzy przeprowadzili analizę wyników przedstawionych w jedenastu publikacjach uwzględniających również gwiaździanki włosowatokomórkowe. Założeniem przedsięwzięcia była próba wytypowania genów, których zmiany ekspresji najlepiej różnicowałyby gwiaździanki włosowatokomórkowe od gwiaździanek o wyższym stopniu złośliwości, a także od prawidłowych tkanek mózgu. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że najlepszymi kandydatami na tego typu markery molekularne są geny: *CHAD* (ang. *chondroadherin*), *THBS4* (ang. *thrombospondin-4*), *TLE2* (ang. *transducin-like enhancer of split 2*), *C1NH* (ang. *complement component 1 inhibitor*), *TIMP4* (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-4*) i *IGFBP2* (ang. *insulin-like growth factor-binding protein 2*), odpowiedzialne za przeciwdziałanie migracji komórek. Ich nadekspresja

w gwiazdziakach włosatokomórkowych może stanowić wytłumaczenie specyficznego typu wzrostu tych nowotworów, charakteryzującego się wyraźnym odgraniczeniem od otaczających tkanek<sup>(101)</sup>.

W kolejnym doniesieniu Potter i wsp. analiza 19 przypadków gwiazdziaka włosatokomórkowego umiejscowionych podnamiotowo nie wykazała związku pomiędzy całkowitym profilem ekspresji genów a lokalizacją nowotworów czy przebiegiem klinicznym choroby<sup>(58)</sup>.

## CHARAKTERYSTYKA RADIOLOGICZNA GWIAZDZIAKÓW WŁOSWATOKOMÓRKOWYCH

### PODZIAŁ GWIAZDZIAKÓW WŁOSWATOKOMÓRKOWYCH W OPARCIU O METODY OBRAZOWANIA RADIOLOGICZNEGO

W badaniach obrazowych (tomografia komputerowa, TK) częstym obrazem gwiazdziaka włosatokomórkowego jest guz lity, niekiedy zawierający mikrotorbiele, lub zmiana lito-torbielowata z przewagą części płynowej i obecnym guzkiem przyściennym. Nowotwory zlokalizowane w obrębie półkul mózgu i mózdzku zachowują bardziej regularne kształty w porównaniu ze zmianami położonymi w okolicy dróg wzrokowych. W badaniach z użyciem środka cieniującego często obserwuje się wzmocnienie części litych, rzadziej kontrastowe wzmocnienie elementów torbielowatych. W badaniach przeprowadzanych z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (RM) gwiazdziak włosatokomórkowy uwidacznia się jako izo- lub hipointensywna zmiana w obrazach T1-zależnych i hiperintensywna w obrazach T2-zależnych, z możliwymi, zwykle niewielkimi cechami obrzęku otaczających tkanek. W badaniach spektroskopowych nowotwór ten wykazuje typowe dla zmian o niskim stopniu złośliwości wartości parametru Cho/NAA, zawierające się w zakresie 1,19-3,40<sup>(6,102,103)</sup>.

W 1999 roku Pencalet i wsp. na podstawie analizy radiologicznej 168 nowotworów obrazowanych przy użyciu tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego zaproponowali wyróżnienie czterech charakterystycznych postaci radiologicznych gwiazdziaka włosatokomórkowego:

- I – guz torbielowaty z guzkiem przyściennym, w którym wzmocnieniu kontrastowemu ulega tylko guzek przyścienny;
- II – guz torbielowaty, w którym wzmocnieniu kontrastowemu ulega ściana torbieli i guzek przyścienny;
- III – guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej;
- IV – guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowej.

Powyższy podział został skonstruowany na podstawie obserwacji gwiazdziaków włosatokomórkowych rozwijających się podnamiotowo, niemniej jednak wydaje się najlepszą jak dotąd analizą radiologiczną tego typu nowotworu, która może mieć zastosowanie także do zmian zlokalizowanych w innych obszarach anatomicznych mózgowia<sup>(10,102,104,105)</sup>.

## ZWIĄZEK OBRAZU RADIOLOGICZNEGO Z PRZEBIEGIEM CHOROBY W GWIAZDZIAKACH WŁOSWATOKOMÓRKOWYCH

Charakterystyczne cechy obserwowane w obrazach radiologicznych gwiazdziaków włosatokomórkowych próbowano skorelować z przebiegiem klinicznym choroby. Wskazywano między innymi na możliwość gorszego rokowania w przypadkach nowotworów litych. Wnikliwe analizy wykazały jednak, że związek ten jest podyktowany częstszym występowaniem zmian litych w obrębie pnia mózgu oraz częściej możliwą do osiągnięcia całkowitą resekcją zmian torbielowatych<sup>(104,106-108)</sup>. Wydawało się, że duże znaczenie dla działań klinicznych, szczególnie w przypadku możliwości pozostawienia fragmentu ściany torbieli w trakcie zabiegu neurochirurgicznego, będzie miała jej ocena po podaniu środka cieniującego. Jednak ściana torbieli niezawierająca elementów pochodzenia nowotworowego może ulegać wzmocnieniu kontrastowemu, np. w wyniku wzmoczonej reaktywności naczyń krwionośnych, co utrudnia jej właściwą ocenę. Analizy retrospektywne uwzględniające obecność tej cechy nie wykazały znaczenia wzmocnienia się ściany torbieli dla przewidywania rokowania chorych, a całkowite jej usunięcie nie było związane z poprawą rokowania<sup>(102,109)</sup>. Przebieg kliniczny choroby nie zależał również od obecności zwapnień w obrębie masy guza<sup>(107)</sup>.

Dorward i wsp. w analizie obrazów pooperacyjnych, wykonywanych w okresie od trzech do sześciu miesięcy po subtotalnej resekcji gwiazdziaka włosatokomórkowego, wykazali związek pomiędzy guzkowym wzmocnieniem łoża obecnym w badaniu MR a zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej. Zgodnie z sugestiami autorów tego rodzaju badanie powinno być jednak poszerzone o analizy immunohistochemiczne markerów Ki67 i CD68. Na uwagę zasługuje fakt, że brak zmian w badaniu MR nie wykluczał prawdopodobieństwa wznowy<sup>(110)</sup>.

Również w gwiazdziakach włosatokomórkowych rozwijających się w przebiegu NF1 nie wykazano związku pomiędzy obrazem radiologiczno-morfologicznym a rokowaniem. Wykazywały one natomiast pewne cechy charakterystyczne, wśród których należy wymienić jednakową częstość zajęcia nerwów wzrokowych i skrzyżowania dróg wzrokowych, zachowanie anatomicznego kształtu nerwu oraz brak części torbielowej. W przeciwieństwie do nich nowotwory niezwiązane z NF1 częściej zajmowały skrzyżowanie wzrokowe, miały wzrost egzofityczny i zawierały elementy torbielowe<sup>(102,111)</sup>.

## ZWIĄZEK OBRAZU RADIOLOGICZNEGO Z PROFILEM MOLEKULARNYM W NOWOTWORACH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Pierwsze próby przedstawienia tego typu zależności występujących w nowotworach OUN podjęto dla skąpodrzewiaków. Charakterystyczną i jednocześnie wczesną zmianą genetyczną pojawiającą się w tych nowotworach jest utrata materiału genetycznego na chromosomach 1p i 19q. Zaburzenie to dotyczy

70-90% skąpodrzewiaków oraz 30-50% skąpodrzewiakogwiaździków i jest związane z lepszą odpowiedzią na chemioterapię i dłuższym czasem przeżycia. Megyesi i wsp. wykazali związek pomiędzy obecnością tej zmiany a charakterystycznym obrazem guza w rezonansie magnetycznym (nieostre granice zmiany, obecność zwapnień, podatność na wzmocnienie kontrastowe)<sup>(112)</sup>. Jednak autorzy kolejnego doniesienia, Jenkinson i wsp., nie byli już tak optymistyczni i podkreślili brak jednoznacznego i silnego związku pomiędzy genotypem tych nowotworów a obrazem RM. Kładli nacisk na dużą zmienność dotyczącą tej potencjalnej zależności i zwrócili uwagę na konieczność w tym wypadku zachowanie ostrożności w ustalaniu ewentualnych związków radiologiczno-molekularnych<sup>(113)</sup>.

Opisano także możliwość wykorzystania do oceny obrazu molekularnego skąpodrzewiaków przedoperacyjnych badań obrazowych z użyciem znaczników izotopowych mających powinowactwo do tkanki nowotworowej (tal-201). Ocena metabolizmu tkanek nowotworów wywodzących się z tej linii, poczyniona przez Walker i wsp., ujawniła związek pomiędzy wzmocnionym metabolizmem tkanek nowotworowych a utratą ramion 1p/19q, zwłaszcza w zmianach o niskim stopniu złośliwości<sup>(114)</sup>.

Próby poszukiwań potencjalnych zależności pomiędzy obrazem radiologicznym a zaburzeniami molekularnymi podejmowano także dla *glioblastoma* – nowotworu posiadającego charakterystyczny i dobrze poznany wzór zmian genomowych. Mut i wsp. opisali związek pomiędzy liczbą komórek TP53-pozytywnych (powyżej 50%) a dobrze ograniczoną masą guza i pierścieniowatym wzmocnieniem kontrastowym stwierdzanym w przedoperacyjnym badaniu rezonansem magnetycznym. Według autorów ocena stopnia ekspresji białka TP53 na podstawie badań obrazowych mogłaby pomóc w podejmowaniu decyzji o doszczętności zabiegu chirurgicznego, zwłaszcza w świetle obserwacji potwierdzających lepsze rokowanie u chorych z wysoką jądrową ekspresją tego białka i związaną z tym dobrą odpowiedzią na leczenie adiuwantowe<sup>(115)</sup>. Ponieważ dane z piśmiennictwa potwierdzają związek pomiędzy silną immunoreaktywnością komórek *glioblastoma* wobec białka a obecnością mutacji genu *TP53*, obserwacje Mut i wsp. mogą stanowić przesłankę wskazującą na możliwość oceny zmian molekularnych na podstawie cech radiologicznych w przypadku *glioblastoma*<sup>(116)</sup>. Ponadto podjęto udane próby wykorzystania cech obecnych w obrazach rezonansu magnetycznego do oceny statusu metylacji promotora genu *MGMT* (ang. *methylguanine DNA methyltransferase*). Levner i wsp. z ponad 80% trafnością opisali nieinwazyjną ocenę molekularną genu, dokonaną na podstawie obrazów T1-zależnych po podaniu środka cieniującego. Obecność niewyraźnych granic guza obserwowano w przypadkach związanych z metylacją promotora genu, natomiast cechy martwicy i pierścieniowate wzmocnienie kontrastowe występowały przede wszystkim w nowotworach z obszarami promotorowymi niemetylowanymi<sup>(117)</sup>. Podobnych obserwacji dokonali Eoli i wsp., którzy ponadto stwierdzili znacząco częściej mieszane guzkowe wzmocnienie kontrastowe w *glioblastoma* ze zmetylowanym promotorem *MGMT* oraz współistniejącą utratą heterozygotyczności na chromosomach 17p i/lub 19q<sup>(118)</sup>. Powyższe obserwacje doczekały się

również potwierdzenia na poziomie ekspresji genów. Pope i wsp. wykazali obecny w *glioblastoma*, związany z przebiegiem choroby specyficzny wzór ekspresji genów, zależny od cech radiologicznych badanych nowotworów. Na podstawie porównania guzów odmiennie reagujących na podanie środków cieniujących wytypowali geny potencjalnie związane z ich obrazem radiologicznym. Biorąc pod uwagę związek pomiędzy reakcją nowotworu na podanie środka cieniującego a rokowaniem, byłyby to geny, których aktywność miałyby również związek z przebiegiem choroby. Nowotwory o różnym stopniu reaktywności na kontrast różniły się ekspresją 79 genów, spośród których autorzy wyróżnili: *TJP2* (ang. *tight junction protein 2*), *OLIG2* i *ASCL1*. Ponadto w nowotworach wzmacniających się po podaniu środka cieniującego 71 genów charakteryzowało się podwyższonymi poziomami ekspresji. Były to geny *VEGF* i *TNC* (ang. *tenascin C*), zaangażowane w procesy angiogenezy i hipoksji<sup>(119,120)</sup>. Także Barajas i wsp. w oparciu o nowoczesne metody obrazowania przy użyciu MR i ocenę molekularną materiału pochodzącego z utkania guza i z tkanek okolonowotworowych w obszarach wzmacniających się pod wpływem kontrastu potwierdzili nadekspresję genów związanych z proliferacją komórkową, angiogenezą, naciekaniem i hipoksją<sup>(121)</sup>.

#### ZWIĄZEK OBRAZU RADIOLOGICZNEGO Z PROFILEM MOLEKULARNYM W GWIAZDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

W dotychczasowym piśmiennictwie nie ma publikacji, których celem byłaby próba opisanego potencjalnych zależności pomiędzy cechami radiologicznymi a molekularnymi w gwiaździankach włosowatokomórkowych. Z drugiej strony obserwacje dotyczące skąpodrzewiaków i *glioblastoma* pozwalają przypuszczać, że podobne zależności mogą dotyczyć także innych nowotworów. Dotychczas, prawdopodobnie ze względu na szątkowe informacje dotyczące biologii molekularnej gwiaździanek włosowatokomórkowych, podobne analizy były ukierunkowane na wykazanie ewentualnego związku pomiędzy obecnością specyficznych cech obserwowanych w badaniach obrazowych a przebiegiem klinicznym choroby<sup>(107,109)</sup>. Smoots i wsp., na podstawie analizy przedoperacyjnych badań obrazowych 51 gwiaździanek włosowatokomórkowych wieku dziecięcego zlokalizowanych w obrębie mózgu, nie wykazali związku pomiędzy cechami radiologicznymi a przebiegiem choroby, potwierdzili jedynie obecność zwiększonego prawdopodobieństwa progresji guza w przypadku niecałkowitego jego usunięcia. Autorzy doniesienia zastosowali podział gwiaździanek włosowatokomórkowych zaproponowany przez Pencanaleta i wsp., wykorzystany także w niniejszej pracy<sup>(104,122)</sup>. Podobną zależność, badając grupę 40 gwiaździanek włosowatokomórkowych, odnotowali Dorward i wsp.<sup>(110)</sup> Gwiaździanki włosowatokomórkowe poddawano także analizom spektroskopowym. Porto i wsp. przeprowadzili analizę widm związków zawierających grupę cholinową (Cho), których podwyższone stężenie jest związane z procesami proliferacyjnymi i w gwiaździankach o wyższych stopniach złośliwości wykazuje dodatnią

korelację ze stopniem złośliwości guza. Analiza taka miała na celu wyjaśnienie, czy obserwowane w nielicznych przypadkach gwiaździka włosatokomórkowego cechy histologiczne i radiologiczne typowe dla gwiaździaków o wyższych stopniach złośliwości wiążą się ze statusem biochemicznym guza. Porównanie widm spektroskopowych pomiędzy tkanką zdrową i nowotworową nie wykazało jednak znamiennych różnic, nie obserwowano ich także w różnych grupach wiekowych<sup>(123)</sup>. Podsumowując, powyższe prace, będące pośrednimi obserwacjami dotyczącymi potencjalnego związku pomiędzy cechami radiologiczno-morfologicznymi gwiaździaków włosatokomórkowych a ich biologią, nie wykazały charakterystycznych zależności.

### **CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE W GWIAŹDZIAKU WŁOSOWATOKOMÓRKOWYM**

Czynniki prognostyczne u chorych z gwiaździakami włosatokomórkowymi można podzielić na kliniczne, histologiczne, immunohistochemiczne oraz molekularne.

#### ***KLINICZNE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE W GWIAŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH***

Wśród uznanych czynników klinicznych związanych z lepszym rokowaniem w gwiaździakach włosatokomórkowych wymienia się przede wszystkim całkowitą resekcję nowotworu. Lepsze rokowanie opisuje się w przypadku nowotworów zlokalizowanych w obrębie mózdzku i półkul mózgu, gorsze dla zmian zlokalizowanych w obrębie dróg wzrokowych, co jest spowodowane ograniczonymi możliwościami resekcji guza<sup>(82,87,106)</sup>. Łagodniejszy przebieg kliniczny choroby obserwuje się u chorych z NF1. Gwiaździaki włosatokomórkowe związane z tym schorzeniem charakteryzuje bardzo powolny wzrost, a nawet, dość często, obserwowana spontaniczna regresja. W przeciwieństwie do chorych dorosłych, u dzieci nie stwierdzano związku pomiędzy przebiegiem choroby a płcią i wiekiem<sup>(28,29,124-126)</sup>.

#### ***HISTOLOGICZNE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE W GWIAŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH***

Wśród cech histologicznych związanych z korzystnym przebiegiem choroby u dzieci z gwiaździakiem włosatokomórkowym Horbinski i wsp. wymienili obecność zmian zwyrodnieniowych w utkaniu nowotworu. Związek ten zachowywał istotność statystyczną niezależnie od lokalizacji nowotworu<sup>(82)</sup>. Dla odmiany Tibbetts i wsp. wśród cech związanych ze skróceniem okresu przeżycia wolnego od nawrotu choroby wymienili: martwicę, zwapnienie, szklwienie naczyń oraz obecność komórek prezentujących cechy oligodendrogleju. Obecność takich komórek w utkaniu gwiaździka włosatokomórkowego miałyby być markerem niekorzystnego rokowania jedynie

w grupie nowotworów położonych podnamiotowo<sup>(87)</sup>. Rodriguez i wsp. wykazali związek pomiędzy krótszym czasem przeżycia a obecnością cech anaplazji komórkowej. Obserwacja ta została jednak poczyniona na grupie chorych, których mediana wieku wynosiła 35 lat, i z tego względu wyników tych nie należy odnosić bezpośrednio do populacji dziecięcej<sup>(86)</sup>.

### ***IMMUNOHISTOCHEMICZNE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE W GWIAŹDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH***

Dotychczasowe analizy immunohistochemiczne gwiaździaków włosatokomórkowych w aspekcie możliwości ich wykorzystania w praktyce klinicznej dostarczają sprzecznych informacji. Dotyczy to przede wszystkim prób wykorzystania indeksu proliferacyjnego Ki-67 (MIB1). W bieżącym piśmiennictwie istnieją zarówno doniesienia potwierdzające, jak i wykluczające związek pomiędzy podwyższonym indeksem proliferacyjnym (powyżej 1%) a gorszym rokowaniem. Uważa się, że rozbieżności te mogą być spowodowane wpływem na przeżycie dodatkowych czynników zmieniających rokowanie, zwłaszcza stopnia resekcji nowotworu. Wyklucza to stosowanie indeksu mitotycznego jako niezależnego markera immunohistochemicznego pozwalającego wyróżnić podgrupę gwiaździaków włosatokomórkowych o agresywnym przebiegu klinicznym. Ostatnio opisano statystycznie znamienny związek pomiędzy liczbą komórek immunopozytywnych dla markera makrofagów CD68 a długością okresu przeżycia wolnego od nawrotu choroby, co sugerowało istotną rolę komórek nienowotworowych w patogenezie gwiaździaków włosatokomórkowych. Jednak już jednocześnie analiza uwzględniająca liczbę komórek CD68-pozytywnych i wartość indeksu proliferacyjnego nie potwierdziła ich związku z przebiegiem choroby<sup>(82,87,106,124,127)</sup>. Nie ma także zgodności dotyczącej możliwości wykorzystania – jako wykładników prognostycznych – białek będących markerami różnicowania komórek w kierunku oligodendrogleju, szczególnie analizowanych dotychczas MBP i PDGFR- $\alpha$ <sup>(14,87,98,100)</sup>. W przeciwieństwie do glejaków o wysokim stopniu złośliwości takie cechy, jak immunoreaktywność dla TP53 i MGMT, nie miały związku z rokowaniem<sup>(14,82)</sup>.

Za niekorzystne rokowanie miałyby odpowiadać także wysoka immunoekspresja MATN2 i obniżona immunoekspresja ALDH1L1 (ang. *aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*). Rola obydwu białek w patologii nowotworów mózgu nie jest dokładnie poznana, ale istniejący stan wiedzy pozwolił na wzięcie pod uwagę ich roli w formowaniu i progresji nowotworów w wyniku nasilenia proliferacji komórek OUN<sup>(99,128)</sup>. Powyższe doniesienia wskazują na istotny problem oceny cech histologicznych i immunohistochemicznych gwiaździaków włosatokomórkowych, zwłaszcza tych świadczących o możliwości złośliwej transformacji. Pomimo podkreślenia znaczenia tego problemu przez środowisko neuropatologów w bieżącej klasyfikacji nowotworów ośrodkowego układu nerwowego wg WHO nadal brakuje jednoznacznych wytycznych służących właściwej charakterystyce tego nowotworu<sup>(6,9,38,74,82,87,129-132)</sup>.

## MOLEKULARNE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE W GWIAZDZIAKACH WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Możliwości wykorzystania zmian molekularnych do prognozowania przebiegu choroby u dzieci z gwiaździami włosowatokomórkowymi są wyjątkowo nieliczne. Horbinski i wsp. opisali związek pomiędzy utratą heterozygotyczności na chromosomie 17p13 a zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby w przypadku nowotworów zlokalizowanych w obrębie mózdzku<sup>(133)</sup>. Potencjalne znaczenie dla wyodrębnienia przypadków o agresywnym przebiegu klinicznym przypisywano aktywacji szlaków sygnałowych MAPK i PI3/AKT, które mogą mieć znaczenie terapeutyczne w wyselekcjonowanej grupie chorych<sup>(51,71)</sup>. Przesłanki świadczące o możliwości identyfikacji molekularnych czynników ryzyka w gwiaździami włosowatokomórkowych pojawiły się także w wyniku prowadzenia analiz opartych na profilowaniu genomowym. Wong i wsp. wykazali obecność dwóch podgrup gwiaździami włosowatokomórkowych, charakteryzujących się odmiennym profilem ekspresji, który prawdopodobnie był związany z różną aktywnością biologiczną tych nowotworów<sup>(98)</sup>. Należy również nadmienić, że wyniki analiz przedstawionych przez zespoły Sharmy i wsp. oraz Rodrigueza i wsp., które dotyczyły znaczenia rokowniczego genów *MATN2* i *ALDH1L1*, opisane w podrozdziale „Immunohistochemiczne czynniki prognostyczne w gwiaździaku włosowatokomórkowym”, stanowią poniekąd także efekt badań mikromacierzowych<sup>(99,128)</sup>.

Co się tyczy ostatnio zdefiniowanych zmian molekularnych w genie *BRAF*, nie wykazano dotąd ich związku z przebiegiem klinicznym choroby<sup>(49,50,52,54,82)</sup>.

### CEL PRACY

Gwiaździak włosowatokomórkowy, należący do nowotworów o niskim stopniu złośliwości, przez wiele lat uchodził za nowotwór molekularnie niemy. Dopiero zastosowanie zaawansowanych technik molekularnych umożliwiło ocenę obecnych w nim zmian genomowych. Wydaje się również wysoce prawdopodobne, że ten typ histologiczny nowotworu może obejmować różne odmiany molekularne. Ponadto nie można wykluczyć odmiennego pochodzenia gwiaździami włosowatokomórkowych o różnym umiejscowieniu w obrębie mózgowia. Interesujących danych dostarczyły w ostatnim okresie badania dotyczące profilowania genomowego tego nowotworu, jednak uzyskane informacje nie są spójne. Wielość znaków zapytania skłoniła do podjęcia próby przeprowadzenia analizy profili ekspresji genów na reprezentatywnej grupie gwiaździami włosowatokomórkowych wieku dziecięcego. Szczegółowe cele zaplanowanych badań przedstawiały się następująco:

1. Przeprowadzenie oceny i charakterystyka profili ekspresji genów w odniesieniu do lokalizacji nowotworu.
2. Przeprowadzenie oceny i charakterystyka profili ekspresji genów w odniesieniu do obrazu radiologiczno-morfologicznego nowotworu.

3. Przeprowadzenie oceny i charakterystyka profili ekspresji genów w odniesieniu do przebiegu klinicznego choroby.

### MATERIAŁ I METODY

#### CHARAKTERYSTYKA BADANEJ GRUPY

Do badań molekularnych przeznaczono materiał tkankowy pobrany śródoperacyjnie od 86 dzieci operowanych w Klinice Neurochirurgii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi w latach 1990-2005. Tkanki nowotworowe pobierane w trakcie zabiegów neurochirurgicznych przechowywano w temperaturze -80°C w Zakładzie Patologii Molekularnej i Neuropatologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. We wszystkich analizowanych przypadkach rozpoznanie zostało ustalone w oparciu o ocenę histopatologiczną przeprowadzoną przez dwóch niezależnych neuropatologów. Badane nowotwory spełniały histopatologiczne kryteria określone dla gwiaździami włosowatokomórkowych w obowiązującej klasyfikacji nowotworów mózgu według Światowej Organizacji Zdrowia<sup>(6)</sup>.

Dane kliniczne niezbędne do przeprowadzenia oceny zależności pomiędzy profilami ekspresji genów a lokalizacją, obrazem radiologiczno-morfologicznym i przebiegiem choroby zgromadzono, wykorzystując dokumentację medyczną znajdującą się w Klinice Neurochirurgii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki oraz działającej przy niej poradni. Badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N401 196 32/4137). Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

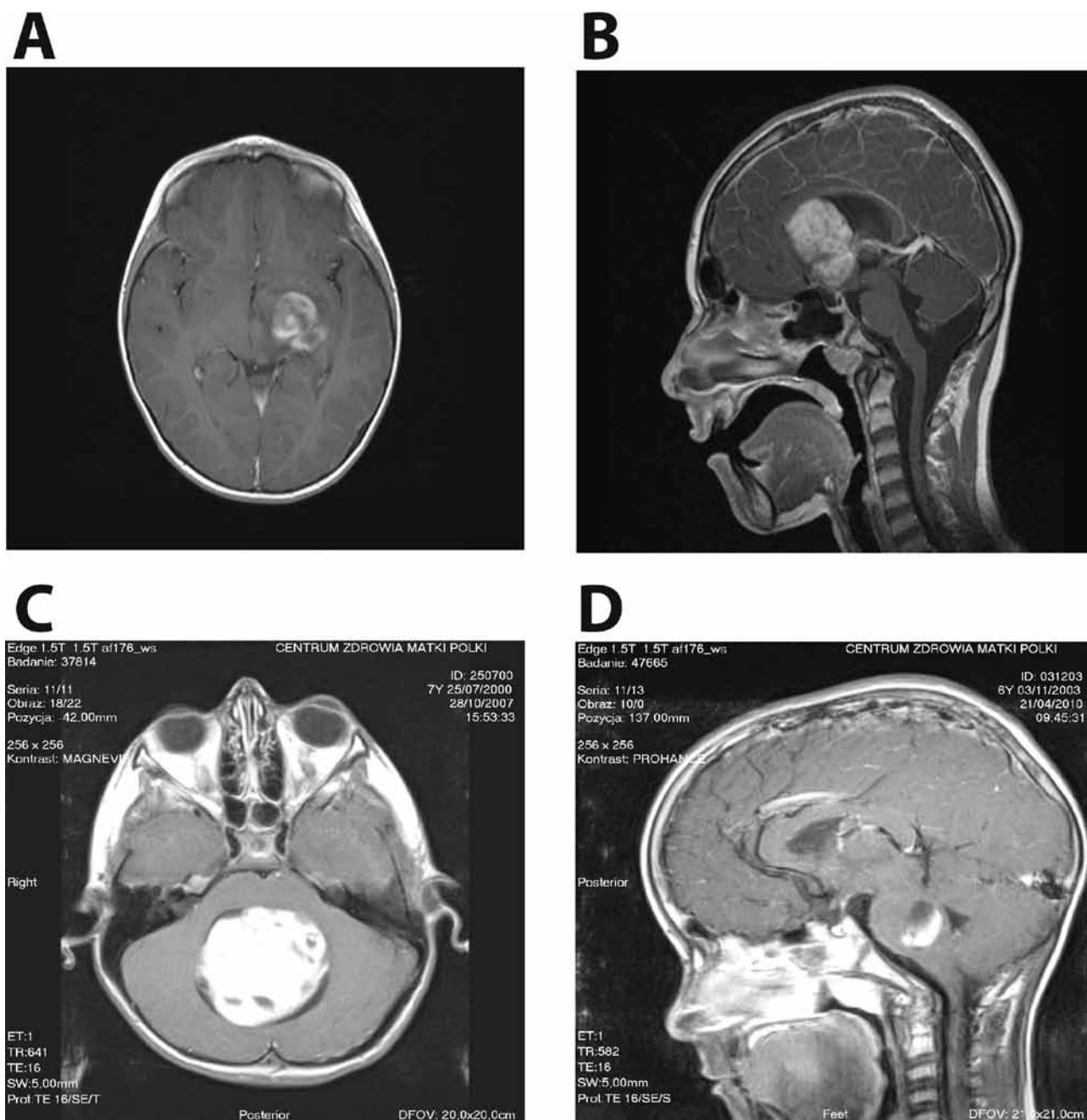
Na podstawie zebranych informacji dotyczących danych klinicznych przypadków uwzględnionych w analizie dokonano podziału nowotworów pod względem następujących cech:

- **lokalizacja nowotworu** (rys. 2):
  - M1 – gwiaździami włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie półkul mózgu – 21,
  - M2 – gwiaździami włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie dróg wzrokowych i podwzgórza – 23,
  - M3 – gwiaździami włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie mózdzku i komory IV – 40,
  - M4 – gwiaździami włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie pnia mózgu – 2;
- **obraz radiologiczno-morfologiczny nowotworu** (rys. 3):
  - R1 – nowotwory torbielowate z guzkiem przyściennym, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulega tylko guzek przyścienny – 10,
  - R2 – nowotwory torbielowate, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulegają ściana torbieli i guzek przyścienny – 24,
  - R3 – nowotwory lite z obecnymi cechami martwicy centralnej – 9,
  - R4 – nowotwory lite z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej – 43;
- przebieg kliniczny choroby nowotworowej:
  - P1 – przypadki bez cech progresji klinicznej – 81,

- P2 – przypadki z obecnymi cechami progresji klinicznej – 5,
- NF1 – przypadki w przebiegu potwierdzonej nerwiakowłóknikowości typu 1. – 2.

Kryteriami kwalifikującymi chorych do grupy klinicznej o dobrym rokowaniu były brak wznowy nowotworu po usunięciu całkowitym oraz brak progresji pozostałej części guza przy resekcji niecałkowitej. Kryteriami kwalifikującymi chorych do grupy klinicznej o gorszym rokowaniu były wznowa guza po

usunięciu całkowitym, progresja pozostawionej części guza przy resekcji częściowej oraz rozsiew procesu nowotworowego drogami przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego z tworzeniem przerzutów w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Kryterium czasowym w obydwu przypadkach był 5-letni okres obserwacji, liczony od czasu postawienia diagnozy. Dwa przypadki gwiaździka włosowatokomórkowego występującego w przebiegu NF1 zawierały się w grupie chorych, u których nie stwierdzono cech progresji klinicznej.



Rys. 2. Obrazy prezentujące zasady podziału badanych nowotworów pod względem umiejscowienia. A – gwiaździk włosowatokomórkowy zlokalizowany w obrębie półkul mózgu (M1); B – gwiaździk włosowatokomórkowy zlokalizowany w obrębie dróg wzrokowych i podwzgórza (M2); C – gwiaździk włosowatokomórkowy zlokalizowany w obrębie mózdzku i komory IV (M3); D – gwiaździk włosowatokomórkowy zlokalizowany w obrębie pnia mózgu (M4). Badania RM po podaniu środka cieniującego.



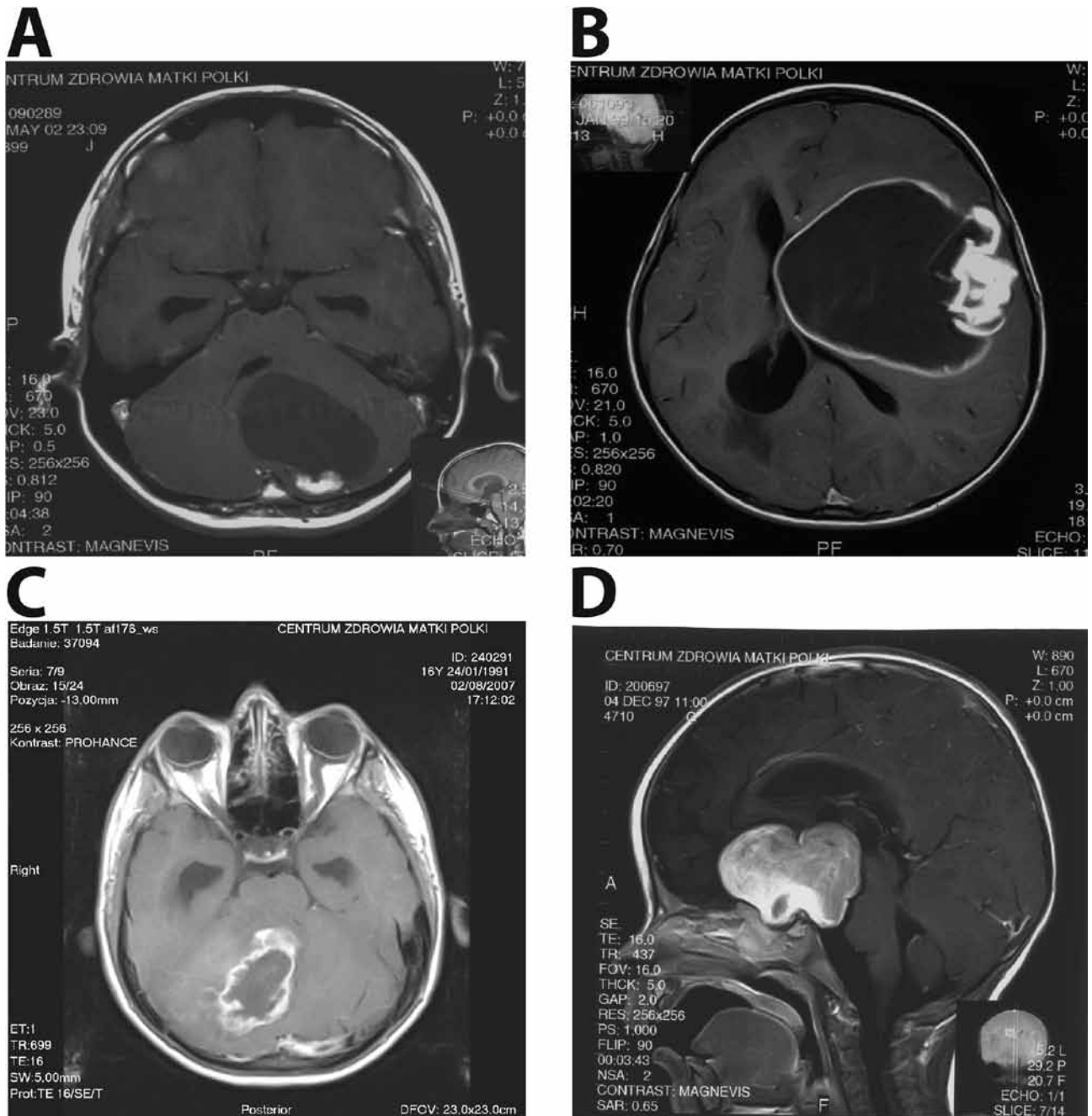
Badana grupa obejmowała 86 dzieci w wieku od 1 do 17 lat (mediana wieku 7 lat), wśród których było 55 chłopców i 31 dziewcząt. Do analiz przy użyciu mikroczipów genomowych przygotowano materiał tkankowy pochodzący od 50 dzieci (tabela 1).

Pozostałe przypadki (36 chorych) posłużyły do potwierdzenia (walidacji) wyników uzyskanych w trakcie analizy bioinformatycznej (tabela 2). Kwalifikacja badanych prób do każdej grupy opierała się na wartości współczynnika integralności RNA

(ang. *RNA Integrity Number*, RIN). Próby najlepszej jakości przeznaczono do badań mikromacierzowych.

**OCENA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA  
MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO**

Całkowity RNA izolowano w oparciu o klasyczną metodę Chomczyńskiego i Sacchi z dodatkowym etapem oczyszczania uzyskanego materiału biologicznego za pomocą zestawów



Rys. 3. Obrazy prezentujące zasady podziału badanych nowotworów pod względem obrazu radiologiczno-morfologicznego. A – nowotwór torbielowaty z guzkiem przyściennym, w którym wzmocnieniu kontrastowemu ulega tylko guzek przyścienny (R1); B – nowotwór torbielowaty, w którym wzmocnieniu kontrastowemu ulega ściana torbieli i guzek przyścienny (R2); C – nowotwór lity z obecnymi cechami martwicy centralnej (R3); D – nowotwór lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej (R4). Badania RM po podaniu środka cieniującego

Lp.	Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Lokalizacja nowotworu	Grupa	Cechy radiologiczno-morfologiczne	Grupa	Przebieg kliniczny	Grupa
1	3078	Ż	8	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
2	3398	Ż	8	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
3	3080	M	5	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Cechy progresji klinicznej	P2
4	3110	M	8	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
5	3074	M	13	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
6	3092	M	17	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
7	3097	M	16	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
8	3100	M	14	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
9	3093	M	1	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
10	3114	M	11	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P2
11	3094	Ż	11	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P2
12	3378	M	13	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P2
13	3082	Ż	10	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
14	3366	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
15	3385	Ż	8	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1 NF1
16	3397	Ż	3	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1 NF1
17	3083	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
18	3104	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1

Tabela 1. Zestawienie danych klinicznych chorych objętych analizami mikromacierzowymi

Lp.	Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Lokalizacja nowotworu	Grupa	Cechy radiologiczno-morfologiczne	Grupa	Przebieg kliniczny	Grupa
19	3115	Ż	0,4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
20	3101	M	6	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
21	3088	M	13	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
22	3095	Ż	10	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
23	3111	M	5	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
24	3371	M	3	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
25	3072	M	12	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
26	3109	M	2	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
27	3090	M	4	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
28	3099	M	11	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
29	3112	M	16	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
30	3108	Ż	16	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
31	3087	M	5	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
32	3067	M	1	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
33	3409	M	4	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
34	3096	Ż	7	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
35	3098	M	14	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
36	3071	M	6	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1

Tabela 1. Zestawienie danych klinicznych chorych objętych analizami mikromacierzowymi (cd.)

Lp.	Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Lokalizacja nowotworu	Grupa	Cechy radiologiczno-morfologiczne	Grupa	Przebieg kliniczny	Grupa
37	3079	M	5	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
38	3399	Ż	4	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
39	3368	M	6	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
40	3382	Ż	12	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
41	3375	M	6	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
42	3073	M	3	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P2
43	3391	M	4	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
44	3394	Ż	5	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
45	3373	M	5	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
46	3077	Ż	13	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
47	3389	M	10	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
48	3369	M	7	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
49	3070	M	14	Pień mózgu	M4	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
50	3105	Ż	11	Pień mózgu	M4	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1

Tabela 1. Zestawienie danych klinicznych chorych objętych analizami mikromacierzowymi (cd.)

kolumnowych RNeasy® Micro Kit (Qiagen) według standardowych procedur<sup>(134)</sup>. Ilość uzyskanego RNA oceniano wstępnie za pomocą spektrofotometru Picodrop (Picodrop Limited) i NanoDrop 1000 (Thermo Scientific NanoDrop). Następnie ilość i jakość uzyskanego RNA oceniano na podstawie elektroforezy kapilarnej przeprowadzonej za pomocą Bioanalyzera Agilent 2100 (Agilent Technologies), w oparciu o ocenę wartości RIN analizowanego przy użyciu dedykowanego oprogramowania.

### HYBRYDYZACJA BADANYCH PRÓB

Kolejnym etapem przygotowania materiału biologicznego do analiz mikromacierzowych była synteza dwuniciowego cDNA na matrycy 250 ng RNA. Po uzyskaniu, w trakcie reakcji odwrotnej transkrypcji, jednoniciowego cDNA przeprowadzono syntezę drugiej nici cDNA, a następnie w reakcji transkrypcji *in vitro* uzyskano amplifikowany RNA znakowany biotyną. Po oczyszczeniu preparatów dokonano fragmentacji zamplifikowanego i biotynowanego cRNA pod wpływem wysokiej temperatury i jonów magnezu (GeneChip® 3' IVT Express Kit,

Lp.	Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Lokalizacja nowotworu	Grupa	Cechy radiologiczno-morfologiczne	Grupa	Przebieg kliniczny	Grupa
1	3068	Ż	8	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
2	3069	Ż	8	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
3	3106	M	5	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P1
4	3086	M	8	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
5	3684	M	13	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
6	3685	M	17	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Bez cech progresji klinicznej	P1
7	3694	M	16	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
8	3695	M	14	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
9	3696	M	1	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
10	3697	M	11	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty z guzkiem przyściennym ulegającym wzmocnieniu kontrastowemu	R1	Cechy progresji klinicznej	P2
11	3698	Ż	11	Półkula mózgu	M1	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Cechy progresji klinicznej	P2
12	3699	M	13	Półkula mózgu	M1	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Cechy progresji klinicznej	P2
13	3066	Ż	10	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
14	3075	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
15	3076	Ż	8	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
16	3089	Ż	3	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
17	3103	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
18	3113	Ż	4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1

Tabela 2. Zestawienie danych klinicznych chorych objętych analizami służącymi walidacji wyników uzyskanych w trakcie profilowania genomowego

Lp.	Kod chorego	Płeć	Wiek (lata)	Lokalizacja nowotworu	Grupa	Cechy radiologiczno-morfologiczne	Grupa	Przebieg kliniczny	Grupa
19	3117	Ż	0,4	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
20	3370	M	6	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
21	3376	M	13	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
22	3386	Ż	10	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
23	3387	M	5	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
24	3686	M	3	Drogi wzrokowe i podwzgórze	M2	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
25	3102	M	12	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
26	3091	M	2	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
27	3081	M	4	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
28	3380	M	11	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
29	3381	M	16	Mózdzek	M3	Guz lity z obecnymi cechami martwicy centralnej	R3	Bez cech progresji klinicznej	P1
30	3383	Ż	16	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
31	3384	M	5	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
32	3687	M	1	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
33	3688	M	4	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1
34	3689	Ż	7	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
35	3690	M	14	Mózdzek	M3	Guz lity z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej	R4	Bez cech progresji klinicznej	P1
36	3691	M	6	Mózdzek	M3	Guz torbielowaty ulegający wzmocnieniu kontrastowemu	R2	Bez cech progresji klinicznej	P1

Tabela 2. Zestawienie danych klinicznych chorych objętych analizami służącymi walidacji wyników uzyskanych w trakcie profilowania genomowego (cd.)

Affymetrix). Tak przygotowane próby, po połączeniu z mieszaniną hybrydyzacyjną, stanowiły bezpośredni materiał przeznaczony do hybrydyzacji z płytą mikromacierzową.

Hybrydyzację do mikromacierzy o wysokiej gęstości, Human Genome U 133 Plus 2.0 (Affymetrix), przeprowadzono w temperaturze 45°C przez 16 godzin w piecu GeneChip Hybridization Oven (Affymetrix). W kolejnym etapie macierz poddano barwieniu kompleksem fikoerytryna-streptawidyna (Streptavidin, Alexa Fluor® 610 — R-phycoerythrin conjugate, Molecular Probes). Skanowanie przeprowadzono za pomocą GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix).

### ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

Surowe dane z eksperymentu mikromacierzowego pozyskano w oparciu o firmowe oprogramowanie skanera GeneChip 3000 firmy Affymetrix. Ocenę jakości wykonanych mikromacierzy przeprowadzono w systemie Bioconductor, wersja 2.10. Wstępnie dokonano oceny homogenności badanej grupy na podstawie oceny fluorescencji sond komplementarnych, czyli wartości PM (ang. *perfect match*). Następnie na podstawie liniowego modelu PLM (ang. *probe level model*) wyznaczono dwa parametry, w oparciu o które przeprowadzono analizę jakości eksperymentu mikromacierzowego: medianę ekspresji (ang. *relative log expression*, RLE) i znormalizowany błąd standardowy estymacji (ang. *normalized unscaled standard error*, NUSE). W celu oceny prawidłowości przebiegu eksperymentu

wykonano także analizę głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA).

Wstępne przetwarzanie zbioru danych, uwzględniające korektę fluorescencji tła i normalizację surowych danych, przeprowadzono w oparciu o technikę GCRMA (ang. *Guanine Cytosine Robust Multi-array Analysis*) za pomocą bibliotek pakietu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Analizowane geny opisano na podstawie informacji zawartych w pakiecie Bioconductor obejmującym bibliotekę *hgu133plus2.db* (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array annotation data, chip *hgu133plus2*) w wersji 2.3.5, z dnia 19.04.2010 roku (<http://www.bioconductor.org>).

Do selekcji zestawów sond różnicujących badane grupy wykorzystano oprogramowanie BRB-ArrayTools, wersja 4.1.0 Beta 3 Release (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>).

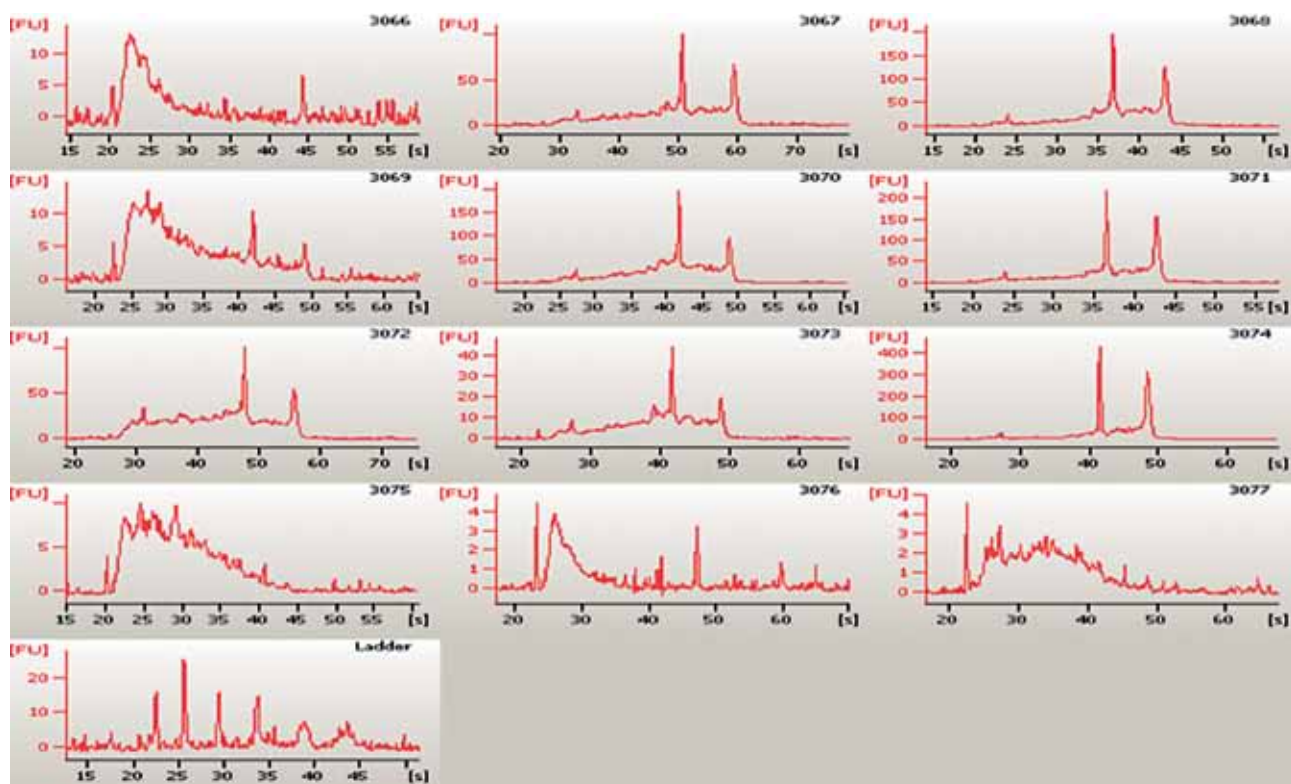
Do porównań grupy o różnej charakterystyce klinicznej wykorzystano test Welcha (analizy wariancji bez założenia jej homogenności). Oceny istotności statystycznej wyników dokonywano w oparciu o nieskorygowany poziom istotności ( $p < 0,001$ ) oraz odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate*, FDR).

Do analizy porównawczej użyto także testu globalnego (<http://www.bioconductor.org>), który pozwala ocenić liczbę genów różnicujących badane grupy.

Kolejny etap obejmował analizę w oparciu o nienadzorowane grupowanie hierarchiczne w celu pozyskania podgrup o charakterystycznym wzorze ekspresji genów. Dla odpowiedniej

Symbol i nazwa genu	Numer sondy	Lokalizacja chromosomalna	Lokalizacja eksonowa	Długość amplikonu
<b>IRX2</b> <i>iraquois homeobox gene 2</i>	Hs01383002_m1	5p15.33	1-2	85
<b>PAX3</b> <i>paired box gene 3</i>	Hs00240950_m1	2q35-q37	2-3	145
<b>CXCL14</b> <i>hemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	Hs00171135_m1	5q31	3-4	73
<b>LHX2</b> <i>lim homeobox gene 2</i>	Hs00180351_m1	9q33.3	3-4	49
<b>SIX6</b> <i>sine oculis homeobox homolog 6</i>	Hs00201310_m1	14q23.1	1-2	115
<b>CNTN1</b> <i>contactin 1</i>	Hs00169986_m1	12q11-q12	14-15	112
<b>SIX1</b> <i>sine oculis homeobox homolog 1</i>	Hs00195590_m1	14q23.1	1-2	79
<b>GAPDH</b> <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs99999905_m1	12p13	3-3	122

Tabela 3. Lista i charakterystyka sond wykorzystanych do potwierdzenia (walidacji) wyników analiz mikromacierzowych



Rys. 4. Graficzne przykłady wyników analizy ilościowej i jakościowej RNA. Próby 3067, 3068, 3070, 3071, 3072, 3073 i 3074 charakteryzuje dobra jakość RNA. Próby 3066 i 3069 nie spełniają kryteriów włączenia do analizy mikromacierzowej. Ocena na podstawie elektroforezy kapilarniej przeprowadzonej za pomocą Bioanalyzera Agilent 2100

wizualizacji uzyskane dane przedstawiono w formie dendrogramów oraz map termicznych (ang. *heatmap*), prezentujących podobieństwo ekspresji genów w analizowanych próbach. Wyselekcjonowane geny o znamiennej statystycznych odchyleniach ekspresji poddano analizie pod kątem ich zaangażowania w funkcje molekularne i procesy biologiczne komórki w oparciu o przynależność do klas ontologii, wykorzystując bazy danych projektu Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>).

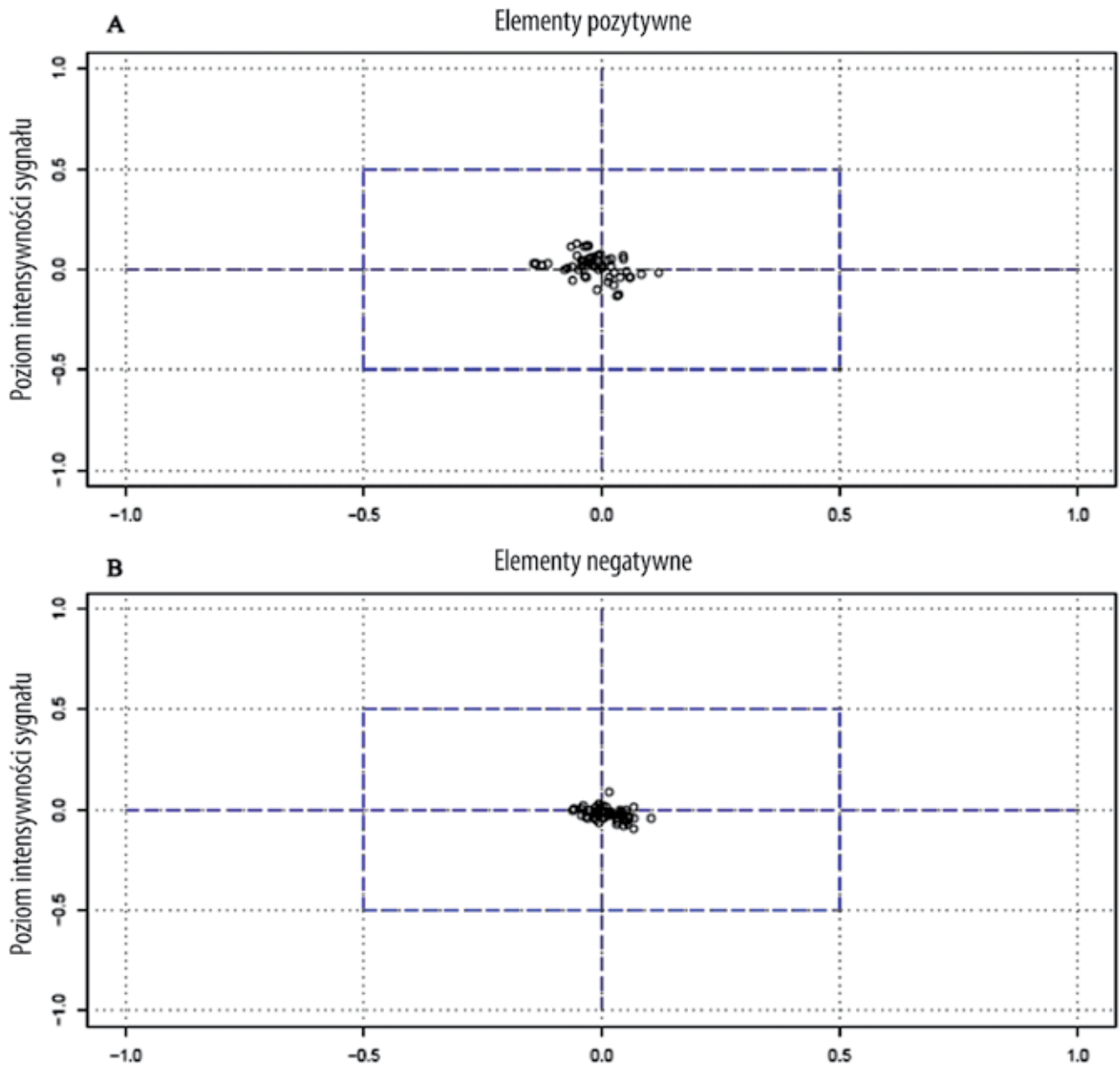
Na kolejnym etapie dokonano oceny zaangażowania genów o zmienionych poziomach ekspresji w działanie komórkowych szlaków sygnałowych. Związek ten oceniano w oparciu o analizę GSEA (ang. *gene set enrichment analysis*) z wykorzystaniem zdefiniowanych zestawów genów (*curated and motif gene set collections*) udostępnionych w bazie danych MSigDB (Molecular Signatures Database v. 3.0, <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>). Analizy przeprowadzono przy użyciu testów permutacyjnych Kołmogorowa-Smirnowa i najmniejszych kwadratów (ang. Least Squares, LS) oraz metody Gene Set Analysis, według testu Efrona i Tibshiraniego. Jako poziom istotności przyjęto  $p \leq 0,001$ <sup>(135,136)</sup>.

#### WALIDACJA UZYSKANYCH WYNIKÓW

Potwierdzenie wyników analiz mikromacierzowych dla genów różnicujących gwiazdki włosatokomórkowe o odmiennym umiejscowieniu przeprowadzono na niezależnym zbiorze prób reprezentujących wszystkie trzy badane lokalizacje nowotworów. Badania przeprowadzono w oparciu o metodę QRT-PCR, wykorzystując cDNA uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji 1  $\mu$ g RNA. Analizy przeprowadzono z użyciem sond TaqMan® Gene Expression Assays dla genów *IRX2*, *PAX3*, *CXCL14*, *LHX2*, *SIX6*, *CNTN1* i *SIX1*. Jako gen odnośnikowy został użyty gen *GAPDH* (tabela 3). Wszystkie reakcje przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach na aparacie Rotor Gene 6000 (Qiagen-Corbett Life Science, Sydney, Australia). Znormalizowany poziom ekspresji badanych genów obliczono na podstawie metody opisanej przez Pfaffla i wsp.<sup>(137)</sup>

Różnice w ekspresji genów obliczono, używając testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dwassa-Steela-Critchlowa-Flignera, pozwalającego porównać trzy analizowane grupy. Jako poziom istotny statystycznie przyjęto  $p \leq 0,05$ .





Rys. 5. Symetryczna intensywność sygnałów elementów o wysokiej (A) i niskiej (B) fluorescencji w obrębie ramki kontrolnej mikromacierzy Human Genome U 133 Plus 2.0

## WYNIKI

### OCENA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA RNA

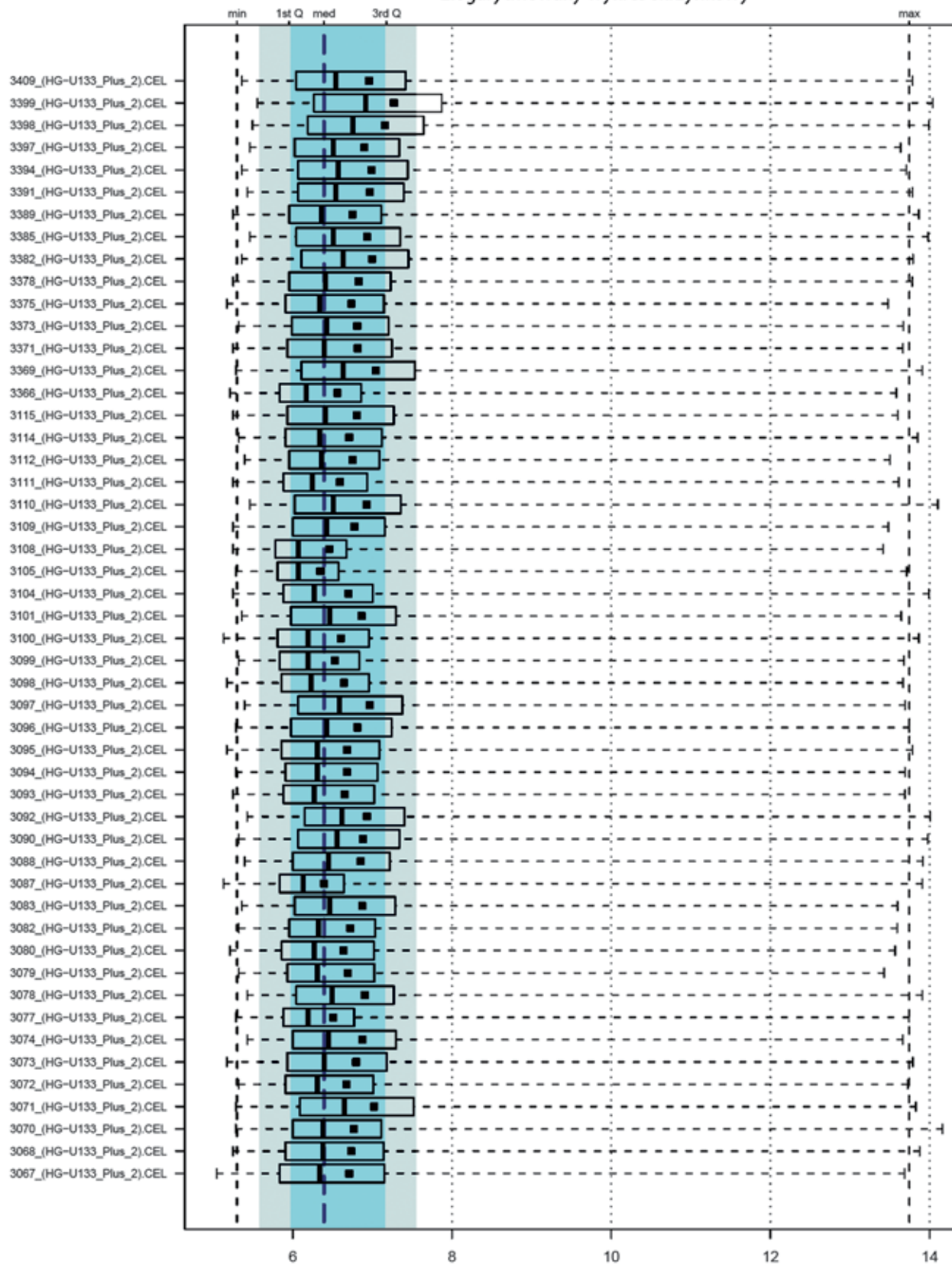
W badanej grupie nowotworów pod względem parametru wyjściowego, jakim jest współczynnik RIN, stwierdzono małego stopnia heterogenność, co może świadczyć o możliwości degradacji RNA w części badanych prób. Z tego względu 50 prób charakteryzujących się najlepszym jakościowo RNA przeznaczono do reakcji hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową HG U133 Plus 2.0, pozostałych 36 przypadków wykorzystano do potwierdzenia (walidacji) wyników profilowania genomowego. Wśród prób przeznaczonych do hybrydyzacji 35 wykazywało RIN > 6, w pozostałych 15 wartość RIN była poniżej 6.

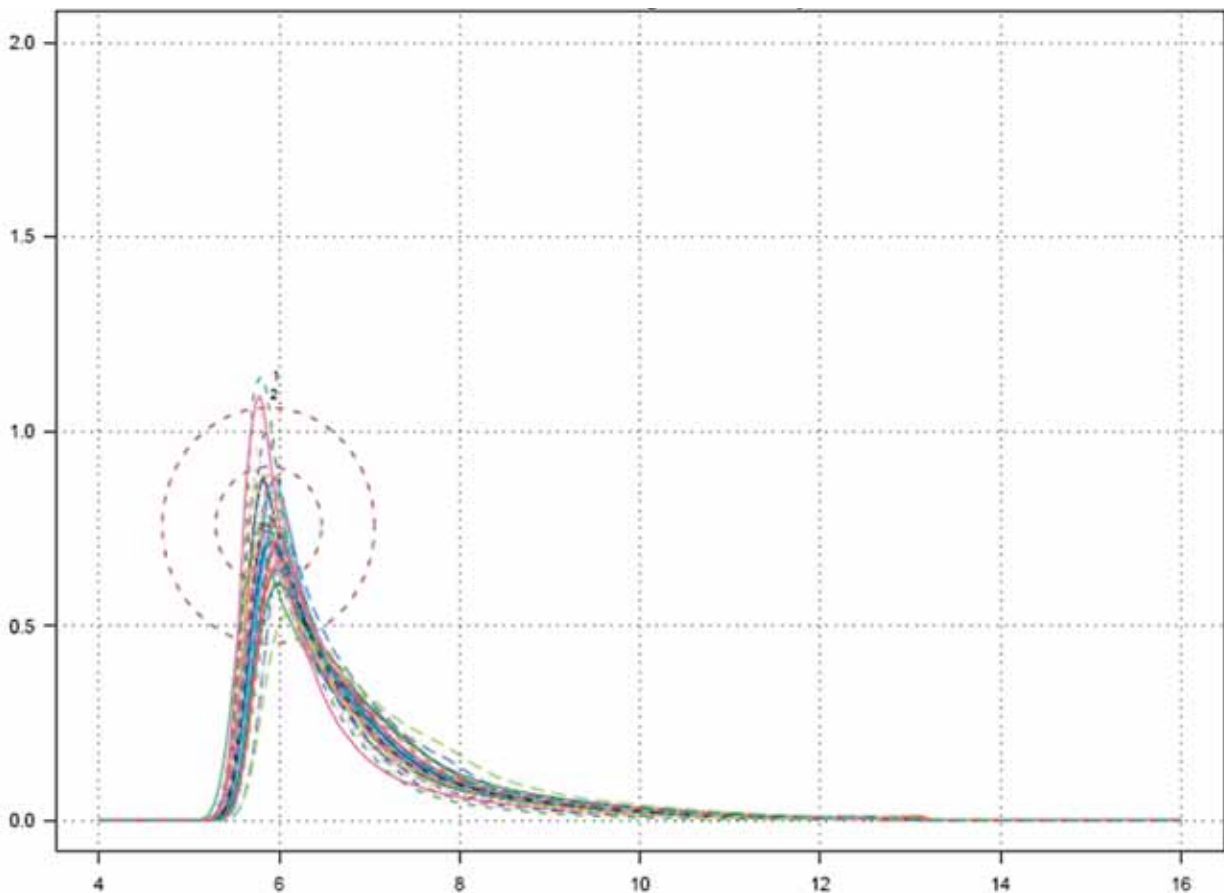
Ponieważ jakość materiału wyjściowego jest istotnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na potencjalne zmiany w ekspresji analizowanych genów, czynnik ten został także uwzględniony w analizie statystycznej i bioinformatycznej. Przykładowe wyniki obrazujące ocenę współczynnika RIN przedstawiono na rys. 4.

### NORMALIZACJA DANYCH

Dla 50 przypadków poddanych hybrydyzacji z macierzami o wysokiej gęstości dokonano pełnej procedury kontroli jakości, wykorzystując procedury pakietu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Prawidłowy przebieg procesu hybrydyzacji potwierdzono poprzez ocenę sygnału fluorescencji w obrębie ramki kontrolnej

Zlogarytmowany wykres skrzynkowy





Rys. 7. Wykresy gęstości dla nieznormalizowanej, zlogarytmowanej wartości PM

mikromacierzy. Przeprowadzona analiza wykazała symetryczność sygnałów (rys. 5).

Na podstawie oceny intensywności fluorescencji będącej pochodną ekspresji oraz intensywności wybarwienia płytki wykazano, że uzyskany zbiór danych jest homogeny, a zmienność o charakterze technicznym przed normalizacją jest niewielka (rys. 6).

Homogenność grupy pod względem intensywności sygnału przedstawiono również za pomocą wykresu gęstości w odniesieniu do wartości PM (rys. 7).

Dalszą analizę jakości eksperymentu mikromacierzowego przeprowadzono w oparciu o wyznaczone na podstawie modelu liniowego parametry NUSE i RLE. Parametry te wykazywały istotną heterogenność pod względem intensywności sygnału w przypadku trzech prób (3077, 3087, 3105). Ze względu na największe odchylenie od wartości przeciętnych próby te zostały wyłączone z dalszej analizy bioinformatycznej (rys. 8, rys. 9).

Dla pełnej oceny technicznej zmienności w wykonanym eksperymencie mikromacierzowym przeprowadzono nienadzorowaną analizę głównych składowych na sondach kontrolnych. Nie obserwowano wyraźnych podgrup ani mikromacierzy charakteryzujących się wartościami istotnie odstającymi od reszty zbioru (rys. 10).

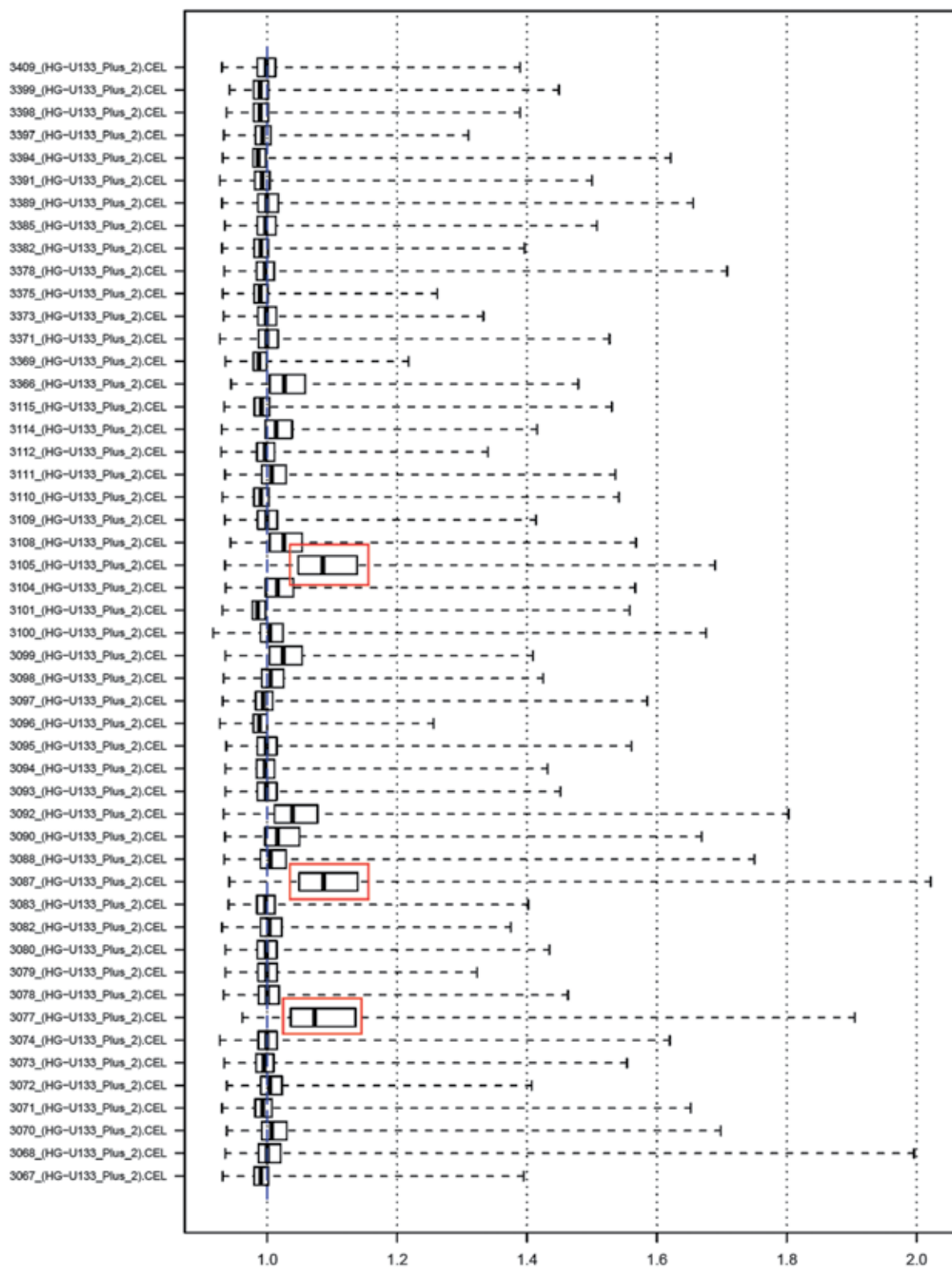
Kolejnym etapem analiz było wstępne przetworzenie surowych danych przy użyciu metody RMA opartej na odsetku par GC (GCRMA). W celu właściwej oceny zmienności w zakresie poziomu ekspresji genów zastosowano kryteria odfiltrujące geny o małej zmienności. Z dalszych analiz wyłączono geny, dla których mniej niż 10% prób wykazywało różnicę co najmniej 1,5-krotną w dowolnym kierunku w stosunku do wartości mediany, oraz te, dla których istotność w teście różnicy wariancji od próby losowej (test zaimplementowany w BRB-ArrayTools) była większa od  $p \leq 0,01$ .

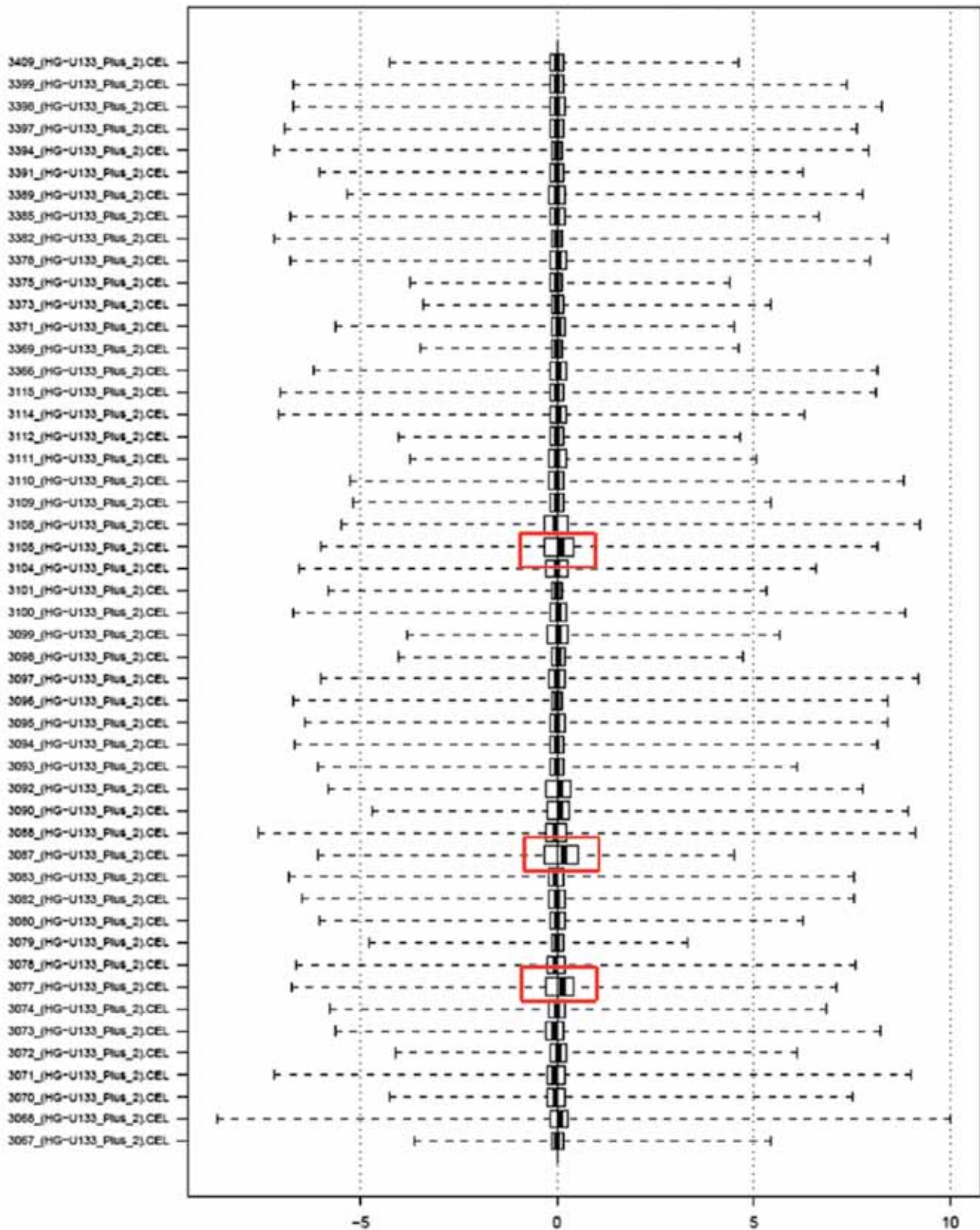
Po uwzględnieniu powyższych założeń wykazano, że 21 910 zestawów sond spełniało wymagane kryteria zmienności i mogło być wykorzystanych do dalszych analiz.

### ANALIZA BIOINFORMATYCZNA DANYCH

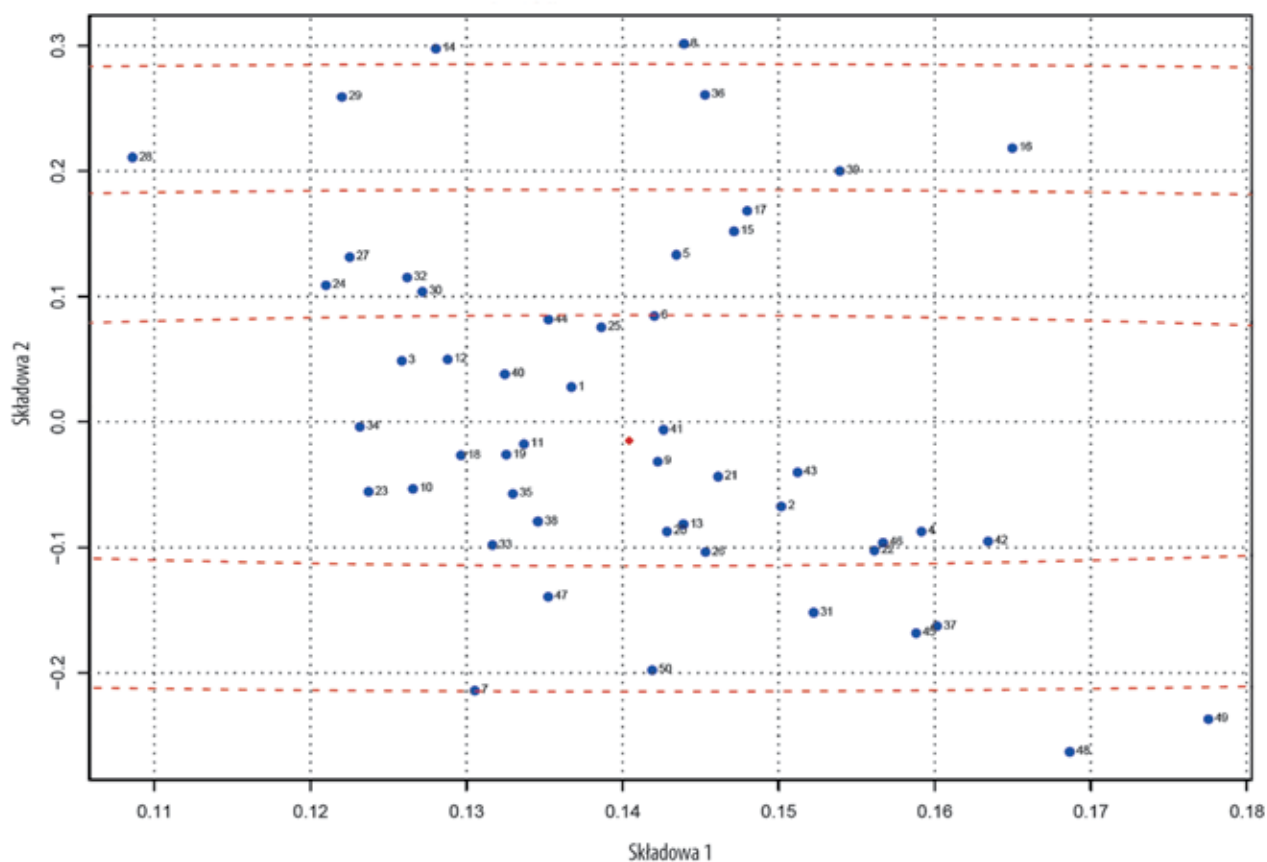
#### Selekcja genów różnicujących analizowane grupy

Pierwszym etapem analizy bioinformatycznej było porównanie grup wyodrębnionych na podstawie analizowanych danych klinicznych dotyczących lokalizacji nowotworu, obrazu radiologiczno-morfologicznego oraz przebiegu klinicznego choroby. Ze względu na konieczność wyeliminowania z analiz bioinformatycznych jednego z dwóch przypadków nowotworów zlokalizowanych w obrębie pnia mózgu (3105) zdecydowano się





Rys. 9. Wykres pudełkowy dla parametru RLE. Zaznaczono próby wykazujące największe odchylenie od wartości przeciętnych



Rys. 10. Analiza głównych składowych przeprowadzona na sondach kontrolnych

także na wykluczenie z kolejnych porównań pozostałego jednego przypadku gwiazdki włosowatokomórkowego o tej lokalizacji (3070). Próby te wykorzystywano podczas wizualizacji danych, aby sprawdzić, jak klasyfikują się one pod kątem zmienności między grupami nowotworów o odmiennej lokalizacji.

W pierwszym kroku porównano poziomy ekspresji genów pomiędzy nowotworami zlokalizowanymi w obrębie półkul mózgu (1), nowotworami zlokalizowanymi w obrębie dróg wzrokowych i podwzgórza (2), nowotworami w przebiegu potwierdzonej nerwiakowłókniałości typu 1. (7)

i nowotworami z obecnymi cechami progresji klinicznej (8). Dodatkowo w najliczniejszej grupie nowotworów rozwijających się w obrębie mózdzku i komory IV dokonano podziału na podgrupy uwzględniające cechy radiologiczno-morfologiczne (3-6). Do analizy tak wyodrębnionych ośmiu podgrup wykorzystano test Welcha. Dokonano również ich porównania testami *post-hoc*.

Stwierdzono, że 345 zestawów sond wykazuje istotne statystycznie różnice przy nieskorygowanym poziomie istotności  $p < 0,001$  (tabela 4).

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
1	1561985_at	C14orf39	Chromosome 14 open reading frame 39	<1e-07	<1e-07	7,57	166,42	4,75	4,77	4,75	4,75	4,75	9,98	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
2	226448_at	FAM89A	Family with sequence similarity 89, member A	<1e-07	<1e-07	66,93	760,13	626,27	1024,7	747,15	1083,9	299,7	488,54	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), (7, 4), (7, 6)
3	207250_at	SIX6	SIX homeobox 6	<1e-07	<1e-07	8,29	384,78	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	24,89	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2), (3, 8), (4, 8), (5, 8), (6, 8)

164 Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatokomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych

## ROZPRAWA HABILITACYJNA

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
4	207963_at	C6orf54	<i>Chromosome 6 open reading frame 54</i>	<1e-07	<1e-07	5,41	5,25	4,86	5,31	5,83	5,07	59,02	6,51	(1, 7), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
5	211111_at	HGC6.3	<i>Similar to HGC6.3</i>	<1e-07	<1e-07	5,77	5,34	5,38	6,91	5,47	5,39	23,9	6,07	(1, 7), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
6	228462_at	IRX2	<i>Iroquois homeobox 2</i>	<1e-07	<1e-07	8,65	46,07	471,6	632,71	376,91	428,5	70,56	25,39	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 3), (7, 4), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
7	1554784_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	<1e-07	61,8	11,93	282,68	416,51	331,65	413,62	720,42	68,01	(2, 1), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8), (8, 4), (8, 5), (8, 6), (8, 7)
8	227202_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	<1e-07	222,8	27,13	1410,4	1886,2	1457,5	1954,7	2143,3	374,5	(2, 1), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
9	213285_at	TMEM30B	<i>Transmembrane protein 30B</i>	<1e-07	<1e-07	7,94	34,41	5,15	5,24	4,97	4,94	5,22	8,98	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
10	231666_at	PAX3	<i>Paired box 3</i>	<1e-07	<1e-07	5,04	8,56	167,66	185,45	414,26	333,68	82,98	12,8	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 3), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
11	219885_at	SLFN12	<i>Schlafen family member 12</i>	1e-07	0,0001	16,77	59,9	12,14	14,73	16,96	15,73	33,17	26,9	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (8, 2), (3, 7), (3, 8)
12	223582_at	GPR98	<i>G protein-coupled receptor 98</i>	1e-07	0,0001	43,59	170,97	12,92	12,12	18,15	17,78	46,46	61,05	(1, 2), (3, 1), (4, 1), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (3, 8), (4, 8), (5, 8), (6, 8)
13	220117_at	ZNF385D	<i>Zinc finger protein 385D</i>	1e-07	0,000156	21,7	60,59	119,85	125,33	82,96	142,62	122,87	64,75	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), (2, 3), (2, 4), (2, 6), (8, 6)
14	206140_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	1e-07	0,0001	1592	2617,5	13,37	7,73	14,57	12,57	118,57	691,6	(3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (3, 8), (4, 8), (5, 8), (6, 8)
15	227614_at	HKDC1	<i>Hexokinase domain containing 1</i>	4e-07	0,0005	28,97	9,17	8,52	7,9	7,05	7,74	47,47	10,31	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (8, 1), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
16	217498_at	NA	NA	5e-07	0,0006	9,53	7,22	11,24	9,96	10,62	12,46	73,41	12,59	(1, 7), (2, 6), (2, 7), (2, 8), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)

Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatokomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych (cd.)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
17	228307_at	EMILIN3	<i>Elastin microfibril interfacer 3</i>	5e-07	0,0006	23,53	53,27	73,4	287,73	212,1	240,14	83,83	57,99	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (3, 4), (3, 6), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
18	227209_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	7e-07	0,0008	163,2	20,67	644,33	771,15	1248,0	1047,3	1676,0	243,57	(2, 1), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
19	224215_s_at	DLL1	<i>Delta-like 1 (Drosophila)</i>	8e-07	0,0009	32,48	83,36	122,89	292,53	218,29	434,72	94,15	39,24	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 6), (3, 6), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
20	232275_s_at	HS6ST3	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3</i>	1e-06	0,0011	7,1	6,64	25,25	62,18	24,87	58,96	73,76	24,63	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
21	1563480_at	NA	NA	1,3e-06	0,0013	5,54	4,81	6,51	12,08	5,43	5,26	4,83	4,82	(1, 4), (2, 4), (3, 4), (5, 4), (6, 4), (7, 4), (8, 4)
22	230720_at	RNF182	<i>Ring finger protein 182</i>	1,4e-06	0,0013	152,9	2152,7	1857,6	2167,8	1666,6	2327,4	448,02	1353,5	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 8)
23	228347_at	SIX1	<i>SIX homeobox 1</i>	1,7e-06	0,0016	16,15	697,28	12,37	7,67	11,54	6,34	5,17	49,54	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
24	238727_at	LOC440934	<i>Hypothetical LOC440934</i>	2,1e-06	0,0019	22,16	14,66	128,59	194,37	386,13	446,67	85,4	32,45	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 5), (8, 6)
25	214954_at	SUSD5	<i>Sushi domain containing 5</i>	2,2e-06	0,0019	112,2	1255,2	1206,3	2031,7	1652,7	2014,8	549,72	526,2	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 8)
26	236692_at	LOC729839	<i>Similar to DTW domain containing 2</i>	2,3e-06	0,0019	8,27	24,8	7,67	7,94	8,4	8,03	14,03	9,23	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (8, 2)
27	211219_s_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	2,5e-06	0,0020	81,14	85,02	7	4,82	4,91	5,72	27,22	50,64	(3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (3, 8), (4, 8), (5, 8), (6, 8)
28	242670_at	LGI4	<i>Leucine-rich repeat LGI family, member 4</i>	2,7e-06	0,0021	64,55	65,18	64,09	14,77	21,35	10,99	295,8	44,04	(4, 1), (5, 1), (6, 1), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (4, 3), (6, 3), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (6, 8), (8, 7)
29	208464_at	GRIA4	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4</i>	3,5e-06	0,0026	5,55	19,4	33,21	47,22	38,84	43,45	43,9	10,41	(1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (8, 3), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
30	228720_at	SORCS2	<i>Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2</i>	3,7e-06	0,0027	30,82	15,43	17,04	14,73	19,65	13,86	189,86	21,07	(2, 1), (4, 1), (6, 1), (1, 7), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
31	225666_at	TMTC4	<i>Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 4</i>	4e-06	0,0028	737,3	260,1	193,04	98,37	177,46	134,81	1023,0	364,36	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (4, 2), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (4, 8), (5, 7), (6, 7)

166 Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych (cd.)



Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
32	226743_at	SLFN11	<i>Schlafen family member 11</i>	5,9e-06	0,0040	40,39	220,31	25,19	25,43	50,07	32,8	117,69	82,37	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (3, 7), (3, 8), (4, 8)
33	229714_at	HS6ST3	<i>Heparan sulfatase 6-O-sulfo-transferase 3</i>	6,9e-06	0,0045	14,51	14,8	46,59	106,16	56,38	93,31	137,71	51,33	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
34	238878_at	ARX	<i>Aristaless related homeobox</i>	8e-06	0,0051	132,4	6,43	4,76	4,8	5,07	4,81	42,45	6,63	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (8, 1)
35	205593_s_at	PDE9A	<i>Phosphodiesterase 9A</i>	9,3e-06	0,0058	79,88	15,65	64,52	146,83	91,81	113,19	160,32	51,14	(2, 1), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
36	1554507_at	NAALAD2	<i>N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2</i>	1,01e-05	0,0061	8,95	8,04	50,97	98,85	62,94	71,33	55,97	16,4	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 4)
37	222895_s_at	BCL11B	<i>B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)</i>	1,13e-05	0,0066	13,02	13,52	20,91	57,18	51,46	62,81	7,38	8,83	(1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (7, 4), (8, 4), (7, 5), (8, 5), (7, 6), (8, 6)
38	208359_s_at	KCNJ4	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4</i>	1,34e-05	0,0077	11,1	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	21,71	4,75	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (8, 1), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
39	230960_at	IGDCC3	<i>Immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3</i>	1,45e-05	0,0079	47,24	9,69	24,72	19,04	18,22	19	80,83	19,09	(2, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (8, 1), (2, 3), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
40	222482_at	NA	NA	1,45e-05	0,0079	252,7	64,2	322,03	242,65	246,8	266,62	453,74	144,06	(2, 1), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7)
41	205817_at	SIX1	<i>SIX homeobox 1</i>	1,48e-05	0,0079	7,56	51,08	5,8	4,75	5,56	4,75	4,75	9,13	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
42	227821_at	LGI4	<i>Leucine-rich repeat LGI family, member 4</i>	1,52e-05	0,0079	116,2	83,88	91,19	19,91	25,26	17,71	363,15	86,58	(4, 1), (5, 1), (6, 1), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (4, 3), (5, 3), (6, 3), (4, 7), (4, 8), (5, 7), (6, 7), (6, 8)
43	227297_at	ITGA9	<i>Integrin, alpha 9</i>	1,58e-05	0,0080	47,44	191,45	109,94	221,6	217,39	260,19	84,31	79,35	(1, 2), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (8, 2), (8, 4), (8, 5), (8, 6)
44	229545_at	FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1 (Drosophila)</i>	1,81e-05	0,0090	15,91	13,74	29,69	65,25	31,2	175,08	49,05	13,82	(1, 4), (1, 6), (2, 4), (2, 6), (3, 6), (8, 4), (5, 6), (8, 6)
45	202834_at	AGT	<i>Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)</i>	1,9e-05	0,0091	898,0	692,69	3216,9	3413,4	4446,6	5449,3	1706,8	2316,9	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 8)
46	220595_at	PDZRN4	<i>PDZ domain containing ring finger 4</i>	1,94e-05	0,0091	11,97	23,74	58,91	171	110,44	149,97	220,25	27,28	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (8, 4), (8, 6)

Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatokomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych (cd.)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
47	235494_at	NA	NA	1,98e-05	0,0091	1128	1368,9	2737,6	2998,8	1991,5	2771,7	2643,1	2093,7	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), (2, 3), (2, 4), (2, 6)
48	225504_at	NA	NA	2,01e-05	0,0091	285,2	157,46	324,02	496,99	410,29	409,6	497,23	236,33	(2, 1), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (8, 4)
49	203820_s_at	IGF2BP3	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3</i>	2,33e-05	0,0104	22,26	379,27	8,87	16,74	27,79	23,7	25,9	34,21	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
50	241396_at	NEDD4L	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like</i>	2,38e-05	0,0104	46,39	11,8	13,1	10,98	11,64	11,09	25,06	14,75	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (8, 1)
51	214460_at	LSAMP	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>	2,47e-05	0,0106	201,1	172,83	389,34	442,51	412,26	608,05	385,55	280,97	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 6)
52	208221_s_at	SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>	2,61e-05	0,011	8,78	18,92	5,86	6,54	6,16	5,77	5,6	10,98	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2)
53	230458_at	SLC45A1	<i>Solute carrier family 45, member 1</i>	2,87e-05	0,0119	27,86	29,38	74,46	49,03	52,36	65,9	41,01	38,23	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 3)
54	1552634_a_at	ZNF101	<i>Zinc finger protein 101</i>	2,99e-05	0,0121	10,54	15,45	10,33	7,85	9,39	8,04	7,34	10,78	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
55	218974_at	SOBP	<i>Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)</i>	3,03e-05	0,0121	1459	1064,2	2369,8	2768,3	2245,9	2687,6	2943,0	1528,6	(1, 4), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (8, 4)
56	232244_at	KIAA1161	<i>KIAA1161</i>	3,31e-05	0,0125	45,09	18,44	22,48	22,17	32,66	24,38	116,87	29,24	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (1, 7), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
57	209472_at	CCBL2	<i>Cysteine conjugate-beta lyase 2</i>	3,31e-05	0,0125	562,9	475,65	355,07	263,06	375,49	295,36	309,4	506,25	(3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (7, 1), (4, 2), (6, 2), (4, 8), (6, 8)
58	226145_s_at	FRAS1	<i>Fraser syndrome 1</i>	3,32e-05	0,0125	14,43	21,32	6,18	4,83	5,91	4,75	661,17	7,15	(1, 7), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
59	213373_s_at	CASP8	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	3,48e-05	0,0129	122,7	199,69	51,71	76,19	122,62	76,17	37,94	125,75	(3, 1), (7, 1), (3, 2), (4, 2), (6, 2), (7, 2), (3, 5), (3, 8), (7, 5), (7, 8)
60	244764_at	NA	NA	3,9e-05	0,0142	104,3	203,88	86,35	69,75	71,27	75,4	95,14	160,32	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (4, 8), (5, 8), (6, 8)
61	218796_at	FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1 (Drosophila)</i>	4,05e-05	0,0144	32,47	57,26	139,64	542,92	165,93	356,41	148,63	60,57	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 6), (8, 4), (8, 6)
62	229831_at	CNTN3	<i>Contactin 3 (plasmacytoma associated)</i>	4,07e-05	0,0144	20,67	10,08	100,6	251,26	194,29	199,23	58,68	22	(1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 4), (8, 5), (8, 6)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
63	1558508_a_at	C1orf53	Chromosome 1 open reading frame 53	4,15e-05	0,0144	57,59	46,26	11,92	9,93	10,01	10,53	14,36	28,88	(3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2)
64	226487_at	C12orf34	Chromosome 12 open reading frame 34	4,54e-05	0,0155	57,84	52,46	159,01	132,21	133,89	155,85	163,77	60,37	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (8, 3), (8, 5), (8, 6)
65	1558388_a_at	LOC643763	Hypothetical LOC643763	4,78e-05	0,016	611,8	24,88	594,5	816,81	728,83	604,72	2817,9	283,9	(2, 1), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (2, 8)
66	238076_at	GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B	4,81e-05	0,016	490,2	355,22	625,17	836,96	494,05	643,96	955,84	437,19	(1, 4), (1, 7), (2, 3), (2, 4), (2, 6), (2, 7), (5, 4), (8, 4), (5, 7), (8, 7)
67	225746_at	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	5,16e-05	0,0167	32,07	9,13	13,95	12,8	13,17	9,7	75,11	15,08	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (2, 7), (3, 7), (4, 7), (5, 7), (6, 7), (8, 7)
68	208296_x_at	TNFAIP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	5,19e-05	0,0167	106,6	166,92	38,29	48,97	100,27	55,72	34,05	92,62	(3, 1), (7, 1), (3, 2), (4, 2), (6, 2), (7, 2), (3, 5), (3, 8)
69	1556627_at	DRP2	Dystrophin related protein 2	5,36e-05	0,0168	13,98	22,64	42,97	105,68	53,4	89,5	34,07	42,45	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 8), (2, 4), (2, 6)
70	207705_s_at	NINL	Ninein-like	5,37e-05	0,0168	98,56	95,71	197,06	218,2	133,55	145,8	159,74	101,18	(1, 3), (1, 4), (2, 3), (2, 4), (8, 3), (5, 4), (8, 4)
71	60474_at	FERMT1	Fermitin family homolog 1 (Drosophila)	5,57e-05	0,0172	41,61	63,02	152,01	589,46	197,4	448,46	217,26	77,18	(1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 6), (8, 4), (8, 6)
72	220979_s_at	ST6GALNACS	ST6-N-acetylgalactosaminidase alpha-2,6-sialyltransferase 5	5,84e-05	0,0176	15,78	4,75	4,75	4,76	4,75	4,78	5,69	4,97	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1), (7, 1), (8, 1)
73	219331_s_at	KLHDC8A	Kelch domain containing 8A	5,9e-05	0,0176	54,19	63,57	32,47	18,13	21,65	18,01	175,98	55,2	(4, 1), (6, 1), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (3, 7), (4, 7), (4, 8), (5, 7), (6, 7), (6, 8)
74	229437_at	MIR155HG	MIR155 host gene (non-protein coding)	6e-05	0,0176	13,83	55,23	7,1	5,86	7,5	7,8	5,63	8,8	(1, 2), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (8, 2)
75	230008_at	THSD7A	Thrombospondin, type I, domain containing 7A	6,04e-05	0,0176	53,37	68,41	199,53	451,83	228,86	372,25	167,55	106,5	(1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (8, 4)
76	210137_s_at	DCTD	dCMP deaminase	6,12e-05	0,0176	266,3	244,83	114,62	138,66	193,57	173,41	221,75	207,89	(3, 1), (4, 1), (3, 2), (4, 2), (3, 5), (3, 7), (3, 8)
77	206018_at	FOXG1	Forkhead box G1	6,53e-05	0,0183	965,5	5,94	4,75	5,59	4,75	4,75	185,23	63,1	(2, 1), (3, 1), (4, 1), (5, 1), (6, 1)
78	203570_at	LOXL1	Lysyl oxidase-like 13	0,000606	0,0504	150,8	319,1	50,02	44,54	72,85	69,2	13,99	113,26	(7, 1), (3, 2), (4, 2), (5, 2), (6, 2), (7, 2), (7, 8)

Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatokomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych (cd.)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3/R1)	4 (M3/R2)	5 (M3/R3)	6 (M3/R4)	7 (NF1)	8 (P2)	Różnicowanie pomiędzy grupami
79	203608_at	ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	0,000787	0,0557	872,3	801,43	1600,3	1698,1	1453,3	1763,9	2600,7	1318,3	(1, 4), (1, 6), (1, 7), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7)
80	204290_s_at	ALDH6A1	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0,000801	0,0561	196,6	100,35	195,76	201,24	215,97	257,46	454,85	177,54	(2, 1), (2, 3), (2, 4), (2, 5), (2, 6), (2, 7), (8, 7)

Tabela 4. Lista genów różnicujących badane gwiazdki włosowatokomórkowe w zależności od poddanych analizom cech klinicznych (cd.)

### Znaczenie biologiczne wyselekcjonowanych genów

Uzyskaną listę scharakteryzowanych genów, różnicujących gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennych cechach klinicznych, poddano analizie pod kątem ich znaczenia funkcjonalnego, w oparciu o przynależność do klas ontologii. Analizę funkcjonalną przeprowadzono na podstawie wartości ekspresji w tych grupach, które zawierały co najmniej pięć genów, dla których co najmniej dwa razy więcej genów wystąpiło na liście, niż wynikałoby to z ich procentowego udziału w całej puli genów na stosowanej mikromacierzy.

W odniesieniu do elementów strukturalnych komórek wyróżnione geny kodują między innymi białka tworzące elementy budulcowe komórki nerwowej, białka zakotwiczone w błonie komórkowej, białka tworzące kompleksy z hormonami i neuroprzekaznikami, a także te odpowiedzialne za procesy adhezji komórkowej oraz tworzenie połączeń międzykomórkowych (tabela 5).

Analiza przeprowadzona pod kątem związku z procesami molekularnymi wykazała znaczenie genów wchodzących w inter-

akcje z kinazami, witaminami i białkami oraz biorących udział w procesach transkrypcyjnych (tabela 6).

Wśród genów związanych z poszczególnymi procesami biologicznymi najsilniej reprezentowane były geny zaangażowane w embriogenezę oraz procesy rozwojowe mózgowia, różnicowanie komórek OUN, regulację odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, kontrolowanie funkcjonowania czynników transkrypcyjnych oraz procesy apoptozy, a także przekazywanie sygnału na szlaku MAPK (tabela 7).

### Analiza szlaków sygnałowych

W ramach zaplanowanej analizy przeprowadzono ocenę udziału genów o zróżnicowanej ekspresji w znanych szlakach sygnałowych i zestawach genów zdefiniowanych w oparciu o opublikowane analizy mikromacierzowe. W wyniku zastosowanych testów wykazano, że geny różnicujące gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennych cechach klinicznych znajdują się na 77 spośród 2131 analizowanych zestawów genów z listy *curated gene sets*. Poziom istotności statystycznej po zastosowaniu testów KS i LS wykazano dla 60 zestawów, natomiast w wyniku przeprowadzenia analizy GSA wymagane warunki spełniło 37 zestawów z tej listy. Wśród nich znalazły się między innymi szlaki sygnałowe kontrolujące odpowiedź immunologiczną, szlaki związane z wyciszeniem genów supresorowych poprzez metylację

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0031225 <i>anchored to membrane</i>	6	1,66	3,62
GO:0005925 <i>focal adhesion</i>	6	1,72	3,48
GO:0009897 <i>external side of plasma membrane</i>	6	1,77	3,4
GO:0005924 <i>cell-substrate adherens junction</i>	6	1,77	3,4
GO:0031253 <i>cell projection membrane</i>	5	1,52	3,28
GO:0005912 <i>adherens junction</i>	9	2,83	3,19
GO:0030055 <i>cell-substrate junction</i>	6	1,92	3,12
GO:0043235 <i>receptor complex</i>	5	1,74	2,87
GO:0044297 <i>cell body</i>	6	2,27	2,64
GO:0043025 <i>neuronal cell body</i>	6	2,27	2,64

Tabela 5. Klasy funkcjonalne genów reprezentowane w obrębie struktur komórkowych

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0019842 <i>vitamin binding</i>	6	1,84	3,26
GO:0019900 <i>kinase binding</i>	9	2,9	3,1
GO:0019901 <i>protein kinase binding</i>	7	2,3	3,05
GO:0003714 <i>transcription corepressor activity</i>	6	2,25	2,66
GO:0008234 <i>cysteine-type peptidase activity</i>	6	2,34	2,56
GO:0042277 <i>peptide binding</i>	5	2,3	2,18

Tabela 6. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy molekularne

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0032677 <i>regulation of interleukin-8 production</i>	6	0,37	16,38
GO:0032637 <i>interleukin-8 production</i>	6	0,4	15,12
GO:0003081 <i>regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin</i>	5	0,34	14,89
GO:0001990 <i>regulation of systemic arterial blood pressure by hormone</i>	5	0,43	11,7
GO:0002221 <i>pattern recognition receptor signaling pathway</i>	7	0,82	8,49
GO:0003044 <i>regulation of systemic arterial blood pressure mediated by a chemical signal</i>	5	0,61	8,19
GO:0002758 <i>innate immune response-activating signal transduction</i>	7	0,89	7,91
GO:0002218 <i>activation of innate immune response</i>	7	0,89	7,91
GO:0003073 <i>regulation of systemic arterial blood pressure</i>	5	0,64	7,8
GO:0050886 <i>endocrine proces</i>	5	0,73	6,83
GO:0021953 <i>central nervous system neuron differentiation</i>	5	0,76	6,55
GO:0050731 <i>positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation</i>	6	0,95	6,34
GO:0050729 <i>positive regulation of inflammatory response</i>	5	0,82	6,07
GO:0002768 <i>immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway</i>	7	1,19	5,88
GO:0043648 <i>dicarboxylic acid metabolic process</i>	6	1,04	5,78
GO:0050864 <i>regulation of B cell activation</i>	6	1,07	5,62
GO:0050671 <i>positive regulation of lymphocyte proliferation</i>	6	1,07	5,62
GO:0070665 <i>positive regulation of leukocyte proliferation</i>	6	1,1	5,46
GO:0050851 <i>antigen receptor-mediated signaling pathway</i>	5	0,92	5,46
GO:0048839 <i>inner ear development</i>	8	1,47	5,46

Tabela 7. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy biologiczne komórek

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0032946 <i>positive regulation of mononuclear cell proliferation</i>	6	1,1	5,46
GO:0002429 <i>immune response-activating cell surface receptor signaling pathway</i>	6	1,13	5,31
GO:0050730 <i>regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation</i>	7	1,47	4,78
GO:0050670 <i>regulation of lymphocyte proliferation</i>	8	1,71	4,68
GO:0070663 <i>regulation of leukocyte proliferation</i>	8	1,74	4,6
GO:0032944 <i>regulation of mononuclear cell proliferation</i>	8	1,74	4,6
GO:0042129 <i>regulation of T cell proliferation</i>	5	1,13	4,43
GO:0032103 <i>positive regulation of response to external stimulus</i>	7	1,62	4,33
GO:0002706 <i>regulation of lymphocyte mediated immunity</i>	5	1,19	4,2
GO:0050727 <i>regulation of inflammatory response</i>	6	1,47	4,1
GO:0043583 <i>ear development</i>	8	1,98	4,03
GO:0009310 <i>amine catabolic process</i>	8	1,98	4,03
GO:0090047 <i>positive regulation of transcription regulator activity</i>	5	1,31	3,81
GO:0051091 <i>positive regulation of transcription factor activity</i>	5	1,31	3,81
GO:0008217 <i>regulation of blood pressure</i>	7	1,86	3,76
GO:0051606 <i>detection of stimulus</i>	6	1,65	3,64
GO:0021537 <i>telencephalon development</i>	8	2,2	3,64
GO:0009064 <i>glutamine family amino acid metabolic process</i>	5	1,37	3,64
GO:0002822 <i>regulation of adaptive immune response</i>	5	1,37	3,64
GO:0002703 <i>regulation of leukocyte mediated immunity</i>	5	1,37	3,64
GO:0050870 <i>positive regulation of T cell activation</i>	7	1,95	3,58

Tabela 7. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy biologiczne komórek (cd.)

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0002819 <i>regulation of adaptive immune response</i>	5	1,4	3,56
GO:0043388 <i>positive regulation of DNA binding</i>	5	1,43	3,49
GO:0051099 <i>positive regulation of binding</i>	6	1,74	3,45
GO:0009063 <i>cellular amino acid catabolic process</i>	6	1,74	3,45
GO:0043410 <i>positive regulation of MAPKKK cascade</i>	5	1,5	3,34
GO:0090046 <i>regulation of transcription regulator activity</i>	8	2,47	3,24
GO:0051090 <i>regulation of transcription factor activity</i>	8	2,47	3,24
GO:0048562 <i>embryonic organ morphogenesis</i>	8	2,53	3,16
GO:0046651 <i>lymphocyte proliferation</i>	8	2,53	3,16
GO:0042113 <i>B cell activation</i>	8	2,53	3,16
GO:0018108 <i>peptidyl-tyrosine phosphorylation</i>	8	2,53	3,16
GO:0045927 <i>positive regulation of growth</i>	5	1,62	3,09
GO:0018212 <i>peptidyl-tyrosine modification</i>	8	2,59	3,08
GO:0070661 <i>leukocyte proliferation</i>	8	2,62	3,05
GO:0032943 <i>mononuclear cell proliferation</i>	8	2,62	3,05
GO:0007187 <i>G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger</i>	5	1,65	3,03
GO:0002237 <i>response to molecule of bacterial origin</i>	6	1,98	3,02
GO:0046395 <i>carboxylic acid catabolic process</i>	8	2,66	3,01
GO:0016054 <i>organic acid catabolic process</i>	8	2,66	3,01
GO:0042098 <i>T cell proliferation</i>	5	1,68	2,98
GO:0042445 <i>hormone metabolic process</i>	7	2,38	2,94
GO:0019935 <i>cyclic-nucleotide-mediated signaling</i>	6	2,04	2,93

Tabela 7. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy biologiczne komórek (cd.)

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0009952 <i>anterior/posterior pattern formation</i>	6	2,08	2,89
GO:0010001 <i>glial cell differentiation</i>	5	1,77	2,82
GO:0009266 <i>response to temperature stimulus</i>	5	1,77	2,82
GO:0071375 <i>cellular response to peptide hormone stimulus</i>	6	2,14	2,81
GO:0030217 <i>T cell differentiation</i>	9	3,27	2,76
GO:0045664 <i>regulation of neuron differentiation</i>	9	3,33	2,71
GO:0050863 <i>regulation of T cell activation</i>	8	2,99	2,67
GO:0001934 <i>positive regulation of protein amino acid phosphorylation</i>	6	2,29	2,62
GO:0051222 <i>positive regulation of protein transport</i>	5	1,95	2,56
GO:0002460 <i>adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains</i>	7	2,87	2,44
GO:0043408 <i>regulation of MAPKKK cascade</i>	7	2,9	2,41
GO:0042327 <i>positive regulation of phosphorylation</i>	6	2,5	2,4
GO:0034097 <i>response to cytokine stimulus</i>	6	2,5	2,4
GO:0002250 <i>adaptive immune response</i>	7	2,93	2,39
GO:0002449 <i>lymphocyte mediated immunity</i>	6	2,53	2,37
GO:0050953 <i>sensory perception of light stimulus</i>	7	3,02	2,32
GO:0007601 <i>visual perception</i>	7	3,02	2,32
GO:0045937 <i>positive regulation of phosphate metabolic process</i>	6	2,59	2,31
GO:0042063 <i>gliogenesis</i>	5	2,17	2,31
GO:0010562 <i>positive regulation of phosphorus metabolic process</i>	6	2,59	2,31
GO:0007411 <i>axon guidance</i>	5	2,17	2,31

Tabela 7. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy biologiczne komórek (cd.)

Klasa funkcjonalna	Liczba genów oczekiwanych	Liczba genów w klasie	Procent genów w klasie
GO:0043010 <i>camera-type eye development</i>	5	2,2	2,28
GO:0009617 <i>response to bacterium</i>	8	3,51	2,28
GO:0002697 <i>regulation of immune effector process</i>	5	2,2	2,28
GO:0032870 <i>cellular response to hormone stimulus</i>	8	3,54	2,26
GO:0071495 <i>cellular response to endogenous stimulus</i>	8	3,57	2,24
GO:0030855 <i>epithelial cell differentiation</i>	5	2,23	2,24
GO:0030258 <i>lipid modification</i>	5	2,23	2,24
GO:0043122 <i>regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade</i>	6	2,78	2,16
GO:0008643 <i>carbohydrate transport</i>	5	2,32	2,16
GO:0048568 <i>embryonic organ development</i>	8	3,72	2,15
GO:0051239 <i>regulation of multicellular organismal process</i>	72	33,82	2,13
GO:0008624 <i>induction of apoptosis by extracellular signals</i>	5	2,38	2,1
GO:0007399 <i>nervous system development</i>	84	41,36	2,03
GO:0002376 <i>immune system process</i>	80	39,37	2,03
GO:0003002 <i>regionalization</i>	8	3,97	2,02

Tabela 7. Klasy funkcjonalne genów w odniesieniu do zaangażowania w procesy biologiczne komórek (cd.)

histonów oraz szlaki odpowiadające za proliferację komórek i regulację cyklu komórkowego (tabela 8).

Na uwagę zasługuje obecność wśród wyselekcjonowanych zestawów genów związanych z pobudzeniem receptorów TLR (ang. *Toll-like receptor*) i aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*) mającego działanie antyapoptotyczne. Receptory TLR reprezentują grupę białek aktywnych w czasie rozwoju zarodkowego, w trakcie którego są odpowiedzialne za polaryzację grzbietowo-brzuszną. Znajdują się one również wśród czynników biorących udział w procesach zapalnych, immunologicznych i nowotworowych.

Analiza uwzględniająca 179 zestawów genów z listy *motif gene sets* wykazała zmienioną regulację na 14 spośród nich po zastosowaniu testów permutacyjnych i na pięciu po wykonaniu analizy GSA (tabela 9). Były to geny związane z czynnikami transkrypcyjnymi będące celem dla microRNA (miR-324-5p,

miR-432, miR-299-3P, miR-486, miR-499) oraz geny z obszarami promotorowymi, położonymi w okolicy miejsc przyłączenia czynników transkrypcyjnych (*NR6A1*, *POU3F2*, *CUTL1*, *PAX8*, *AHR*). Na uwagę zasługuje obecność wśród wyszczególnionych zestawów rodziny czynników transkrypcyjnych POU, której poszczególne elementy związane są ściśle z procesami rozwojowymi mózgowia, a część z nich podtrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym<sup>(138,139)</sup>.

#### Klasteryzacja prób

Następnym etapem analizy była identyfikacja głównych czynników wpływających na zmienność profilu ekspresji genów w badanych gwiazdziakach włosowatokomórkowych. Przeanalizowano ekspresję genów różnicujących istniejące w zbiorze grupy i dokonano wyboru genów, które posłużyły do przeprowadzenia hierarchicznej klasteryzacji prób (rys. 11).

W wyniku przeprowadzonej klasteryzacji najbardziej charakterystyczny wzór ekspresji uzyskano dla podzbioru zawierającego nowotwory zlokalizowane w obrębie mózdzku i komory IV oraz dla klastra zawierającego nowotwory położone w przestrzeni nadnamiotowej. Wśród nowotworów zaklasyfikowanych na podstawie profilu ekspresji do grupy nowotworów nadnamiotowych znalazł się jeden przypadek gwiazdziaka włosowatokomórkowego mózdzku.

W oparciu o klasteryzację hierarchiczną stwierdzono również, że różnica w ekspresji genów pomiędzy grupami nowotworów położonych nadnamiotowo (M1, M2) jest mniejsza niż różnica między profilem ekspresji gwiazdziaków włosowatokomórkowych o lokalizacji nadnamiotowej (M1, M2) i podnamiotowej (M3). Należy podkreślić, że skala obserwowanych zmian pozwala na różnicowanie pomiędzy nowotworami półkulowymi i zmianami położonymi w obrębie skrzyżowania wzrokowego i podwzgórza. Przy podjętej próbie analizy, na tym samym zestawie genów, przypadku nowotworu położonego w obrębie pnia mózgu stwierdzono niewielki stopień podobieństwa i niską korelację z grupą M2 (współczynnik korelacji  $R=0,4$ ).

#### PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ZALEŻNOŚCI OD LOKALIZACJI GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Na podstawie istniejących w piśmiennictwie przesłanek i uzyskanych w ramach realizacji pracy wyników wysnuto hipotezę, że głównym źródłem zmienności w analizowanym zbiorze jest lokalizacja nowotworu. W związku z tak postawioną hipotezą kolejnym etapem była ocena różnic pomiędzy trzema grupami gwiazdziaków włosowatokomórkowych o różnej lokalizacji w obrębie OUN. Analiza ta pozwoliła na poczynienie obserwacji, że przy nieskorygowanym kryterium  $p<0,001$  istotne statystycznie różnice obserwuje się w 862 genach przy 22 oczekiwanych genach fałszywie dodatnich (test Welcha). W globalnym teście istotności różnic obserwowane odchylenia również są znamienne statystycznie ( $p<0,001$ ). W analizie z uwzględnieniem testu *post-hoc* z możliwością porównywania par (test zaimplementowany w BRB-ArrayTools) jako istotne interpretowano różnice na poziomie istotności  $p<0,01$  (tabela 10).

Szlak sygnałowy/Zestaw genów	Liczba genów	Symbole genów	LS (p)	KS (p)	GSA (p)
KONDO_PROSTATE_CANCER_HCP_WITH_H3K27ME3	100	GRIA4, IRX1, IRX3, MAPT, ERBB4	0,00001	0,00001	<0,005
LI_CISPLATIN_RESISTANCE_UP	66	THSD7A, IRX3, HAPLN1, CKLF, IGF1R	0,00001	0,00019	<0,005
REACTOME_ACTIVATED_TLR4_SIGNALING	25	TLR4, SIGIRR, TLR7, TLR8, TICAM2	0,00001	0,00001	<0,005
REACTOME_TOLL_LIKE_RECEPTOR_4_CASCADE	28	TLR4, LY96, SIGIRR, LY86, TICAM2	0,00001	0,00001	<0,005
SHARMA_PILOCYTIC_ASTROCYTOMA_LOCATION_DN	7	IRX2, PAX3, IRX5, CBS, RASSF2	0,00001	0,00001	<0,005
SHARMA_PILOCYTIC_ASTROCYTOMA_LOCATION_UP	31	LHX2, GPR98, NR2E1, SIX6, SIX1, SIX3	0,00001	0,00001	<0,005
WATANABE_COLON_CANCER_MSI_VS_MSS_DN	96	CXCL14, EMILIN3, GPSM2, AMD12	0,00001	0,00041	<0,005
BIOCARTA_PTEN_PATHWAY	33	PIK3R1, MAPK1, ITGB1, PTEN, FOXO3	0,00007	0,00243	0,025 (+)
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_PR_DN	69	CNTN1, SATB1, ALCAM, SGRP3	0,00001	0,00001	<0,005
BIOCARTA_DC_PATHWAY	13	TLR7, TLR4, TLR2, CD33, CD40	0,00023	0,00079	<0,005

Tabela 8. Zestawy genów wyselekcjonowane w wyniku analizy genów o zróżnicowanej ekspresji w gwiazdziakach włosowatokomórkowych o odmiennych cechach klinicznych. LS – test permutacyjny Least Squares; KS – test permutacyjny Kolmogorowa-Smirnowa; GSA – Gene Set Analysis wg Efrona-Tibshiraniego

Listę genów uzyskanych w powyższej analizie poddano także ocenie uwzględniającej ich lokalizację w obrębie chromosomów, na podstawie porównania listy genów badanych z liczbą genów oczekiwanych. Obserwowano pewne różnice dotyczące prezentacji genów na chromosomach 7., 11., 13., 17. oraz 19. (rys. 12).

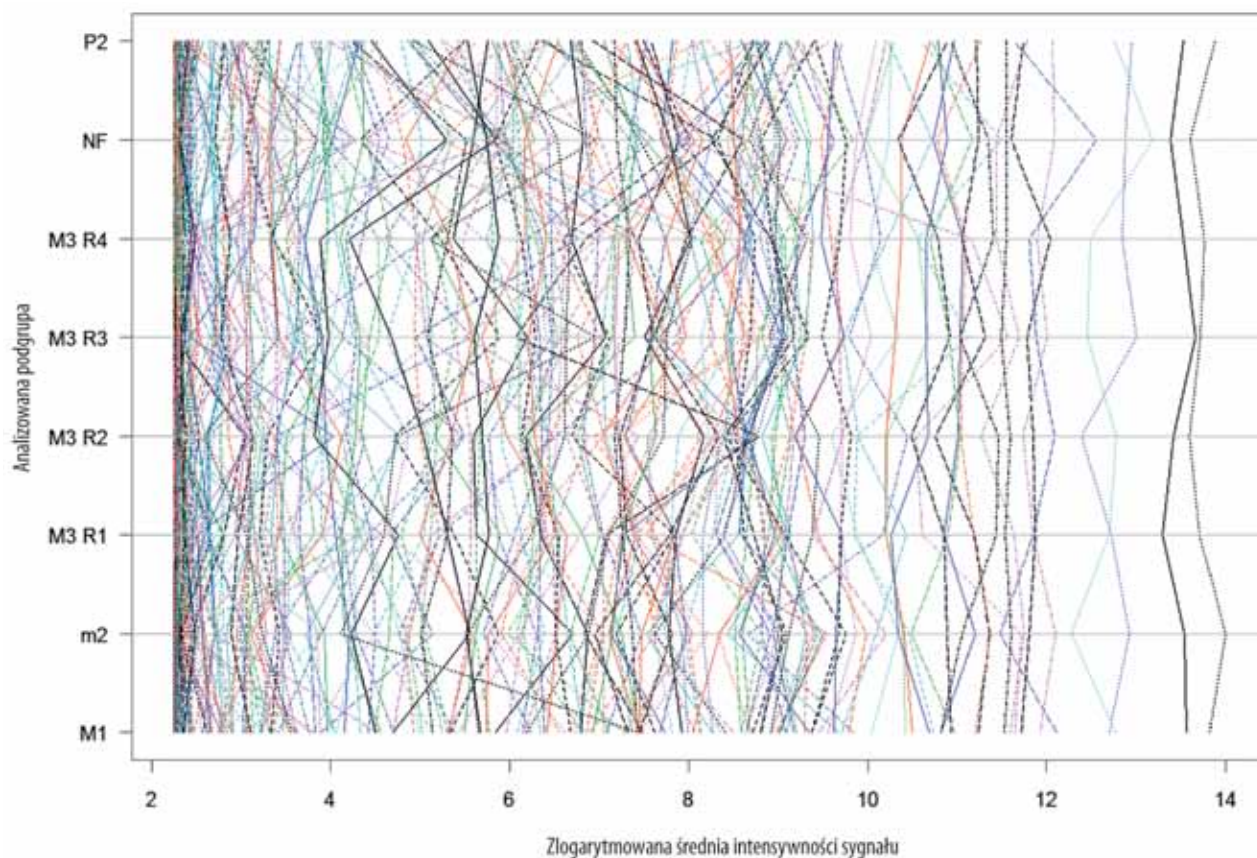
Na całym zbiorze genów dokonano klasteryzacji hierarchicznej, która jednoznacznie wykazała obecność istotnych różnic

w profilu ekspresji wszystkich trzech podgrup (rys. 13). Różnice w ekspresji dużej skali obserwowano tylko dla części genów. W badanej grupie nowotworów, zróżnicowanej pod względem lokalizacji, dokonano również porównań w parach pomiędzy grupami M1 i M3, M2 i M3 oraz M1 i M2. Dla każdego z tych porównań wykorzystano kryterium nieskorygowanej wartości  $p < 0,001$  w teście Welcha. Dla większości wyselekcjonowanych genów zanotowano istotne różnice pomiędzy grupami

Szlak sygnałowy/Zestaw genów	Liczba genów	Symbole genów	LS (p)	KS (p)	GSA (p)
CGGTGTG, MIR-220	8	LHX2, GPX1, THRB, WHSC1	0,00001	0,09215	<0,005
V\$GNCF_01	93	MCF2, BCL11A, BCL11B, NFIB, AMD1	0,00002	0,00239	0,04
GGGATGC, MIR-324-5P	72	NTRK3, ZNRF2, PBX1, ELAVL1, RUNX2	0,00003	0,01085	<0,005
CCATCCA, MIR-432	64	NTRK3, CALN1, SOX4, COL11A1, TLK2	0,00006	0,00044	0,015
V\$POU3F2_01	94	ZNF423, PDZRN4, BNC2, ITPR3, SOX4	0,00006	0,02333	0,025
V\$CDPCR3_01	39	NFIA, SIX1, SIX3, MYT1, CSMD3, ARK1	0,00028	0,02874	0,065
CCCACAT, MIR-299-3P	72	NGFR, RUNX1T1, BCL11A, TIMP3	0,00034	0,08243	0,07
V\$MYOGNF1_01	57	BCL11A, NFIA, BCL11A, GNMT2, LMO3	0,00045	0,01553	0,045
GTACAGG, MIR-486	72	IRX5, PIK3R1, FGF13, NFAT5, PTEN	0,00056	0,00176	0,01
V\$PAX8_01	49	KCND3, TCF7L2, AHCYL1, LMO3	0,00058	0,0018	<0,005
V\$AHR_01	86	BCL11A, NTRK3, TTBK2, TP53	0,00068	0,05371	0,16
AGTCTTA, MIR-499	99	RCN2, SOX5, ADAM10, SDC2, SOX6	0,02398	0,00033	0,22
CCAATNNSNNGCG_UNKNOWN	65	MEIS1, MEF2C, PAX6, TES, ELAVL3	0,00407	0,22226	<0,005
V\$MEF2_04	24	LHX2, NFAT5, ELAVL4, DGKI, ZNF238	0,03997	0,01638	<0,005

Tabela 9. Wybrane zestawy genów wyselekcjonowane w wyniku analizy genów o zróżnicowanej ekspresji w gwiazdziakach włosowatokomórkowych o odmiennych cechach klinicznych. LS – test permutacyjny Least Squares; KS – test permutacyjny Kolmogorowa-Smirnowa; GSA – Gene Set Analysis wg Efrona-Tibshiraniego





Rys. 11. Stopień zróżnicowania fluorescencji dla genów różnicujących analizowane grupy

M1 i M3 (323 geny) oraz M2 i M3 (847 genów). Ponadto wyselekcjonowano 105 genów, które można było wykorzystać zarówno do różnicowania pomiędzy grupami M1 i M3, jak i M2 i M3, natomiast do różnicowania pomiędzy grupami M1 i M2 można było wykorzystać tylko 24 geny (rys. 14).

Istotnym czynnikiem, który może mieć wpływ na obserwowane tu zależności dotyczące profilu ekspresji genów, jest jakość materiału przeznaczanego do badań z użyciem mikromacierzy. Ponieważ w analizowanym zbiorze obserwowano pewną heterogenność dotyczącą jakości uzyskanego RNA, czynnik ten został dodatkowo uwzględniony w prowadzonych analizach. W tym celu badane próby podzielono na dwie podgrupy w oparciu o niezależny od oceny mikromacierzowej parametr wyjściowy, jakim jest współczynnik RIN. Na pierwszą z nich składały się próby o wyjściowej wartości RIN > 6 (32 przypadki), na drugą próby charakteryzujące się wartością RIN < 6 (15 przypadków). Po porównaniu uwzględniającym dwie zmienne (lokalizacja anatomiczna, heterogenność materiału biologicznego) stwierdzono, że co najmniej 772 geny wykazują nadal znamiennej różnicę ekspresji. W globalnym teście istotności różnic była to różnica silnie istotna ( $p=0,003$ ) (rys. 15).

W przeprowadzonym następnie grupowaniu hierarchicznym ponownie wyodrębniono jednoznacznie grupę nowotworów podnamiotowych, a w drugim klastrze nieco mniej wyraźnie rozgraniczone dwie grupy nowotworów o odmiennej lokalizacji nadnamiotowej.

Analizę tę przeprowadzono także przy zastosowaniu bardziej restrykcyjnych kryteriów istotności statystycznej, jakim jest nie większa niż 1% obecność genów fałszywie dodatnich, przy oszacowaniu odsetka wyników fałszywie dodatnich (FDR) z wykorzystaniem testu Welcha, z uwzględnieniem korekcji porównań wielokrotnych w oparciu o test permutacyjny.

Po porównaniu dwóch grup: M3 oraz połączonych grup M1 i M2 uzyskano listę 348 zestawów sond, wśród których z prawdopodobieństwem 80% jest nie więcej niż 1% genów fałszywie dodatnich (tabela 11).

#### **PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ZALEŻNOŚCI OD OBRAZU RADIOLOGICZNO-MORFOLOGICZNEGO NOWOTWORU**

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała obecność 32 sond umożliwiających różnicowanie pomiędzy nowotworami prezentującymi odmienny obraz radiologiczno-morfologiczny ( $p<0,005$ ). Ekspresja tych genów wykazywała jednak zbyt małą amplitudę zmienności (rys. 16).

Pomimo istotnych statystycznie odchyleń w ekspresji podjęta próba grupowania hierarchicznego nie wykazała możliwości wykorzystania ich do różnicowania pomiędzy analizowanymi grupami (rys. 17).

W celu wykluczenia możliwości wpływu na powyższe wyniki dodatkowych zmiennych obserwowanych w badanej grupie,

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3)	Różnicowanie pomiędzy grupami
1	228462_at	IRX2	<i>Iroquois homeobox 2</i>	<1e-07	<1e-07	7,81	36,27	470,74	(1, 2), (1, 3), (2, 3)
2	231666_at	PAX3	<i>Paired box 3</i>	<1e-07	<1e-07	4,97	7,59	279,28	(1, 3), (2, 3)
3	207250_at	SIX6	<i>SIX homeobox 6</i>	<1e-07	<1e-07	7,32	246,4	4,75	(1, 2), (3, 2)
4	206140_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	<1e-07	<1e-07	1680,77	2642,73	11,02	(3, 1), (3, 2)
5	211219_s_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	<1e-07	<1e-07	80,88	93,18	5,49	(3, 1), (3, 2)
6	223582_at	GPR98	<i>G protein-coupled receptor 98</i>	<1e-07	<1e-07	50,94	146,32	15,08	(1, 2), (3, 1), (3, 2)
7	1554784_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	<1e-07	68,37	17,57	379,96	(2, 1), (1, 3), (2, 3)
8	230720_at	RNF182	<i>Ring finger protein 182</i>	<1e-07	<1e-07	171,48	1797,68	2061,29	(1, 2), (1, 3)
9	210239_at	IRX5	<i>Iroquois homeobox 5</i>	<1e-07	<1e-07	7,84	25,89	100,36	(1, 2), (1, 3), (2, 3)
10	213285_at	TMEM30B	<i>Transmembrane protein 30B</i>	<1e-07	<1e-07	7,23	26,44	5,08	(1, 2), (3, 2)
11	230472_at	IRX1	<i>Iroquois homeobox 1</i>	<1e-07	<1e-07	10,8	66,79	205,19	(1, 2), (1, 3), (2, 3)
12	227202_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	<1e-07	262,72	51,46	1717,72	(2, 1), (1, 3), (2, 3)
13	214954_at	SUSD5	<i>Sushi domain containing 5</i>	<1e-07	<1e-07	125,14	1108,04	1603,52	(1, 2), (1, 3)
14	206018_at	FOXG1	<i>Forkhead box G1</i>	<1e-07	<1e-07	1197,42	11,25	4,93	(2, 1), (3, 1)
15	208221_s_at	SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>	<1e-07	<1e-07	8,42	17,8	6	(1, 2), (3, 2)
16	238021_s_at	CRNDE	<i>Colorectal neoplasia differentially expressed (non-protein coding)</i>	<1e-07	<1e-07	51,09	382,35	1216,52	(1, 2), (1, 3), (2, 3)
17	226448_at	FAM89A	<i>Family with sequence similarity 89, member A</i>	<1e-07	<1e-07	104	625,78	808,9	(1, 2), (1, 3)
18	229831_at	CNTN3	<i>Contactin 3 (plasmacytoma associated)</i>	<1e-07	<1e-07	21,57	9,97	176,8	(1, 3), (2, 3)
19	228347_at	SIX1	<i>SIX homeobox 1</i>	<1e-07	<1e-07	13,8	421,71	9,17	(1, 2), (3, 2)
20	206634_at	SIX3	<i>SIX homeobox 3</i>	<1e-07	<1e-07	4,86	49,47	4,75	(1, 2), (3, 2)
21	238022_at	CRNDE	<i>Colorectal neoplasia differentially expressed (non-protein coding)</i>	<1e-07	<1e-07	14	51,83	134,25	(1, 2), (1, 3), (2, 3)
22	1554507_at	NAALAD2	<i>N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2</i>	<1e-07	<1e-07	10,63	8,94	69,52	(1, 3), (2, 3)
23	238878_at	ARX	<i>Aristaless related homeobox</i>	<1e-07	<1e-07	102,99	6,88	4,85	(2, 1), (3, 1)
24	227614_at	HKDC1	<i>Hexokinase domain containing 1</i>	<1e-07	<1e-07	30,54	9,56	8,08	(2, 1), (3, 1)
25	205858_at	NGFR	<i>Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)</i>	<1e-07	<1e-07	135,44	53,07	14,67	(3, 1), (3, 2)
26	227209_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	<1e-07	197,22	38,14	933,25	(2, 1), (1, 3), (2, 3)
27	203917_at	CXADR	<i>Coxsackie virus and adenovirus receptor</i>	1e-07	6,44e-05	4098,1	1363,02	1294,12	(2, 1), (3, 1)
28	205817_at	SIX1	<i>SIX homeobox 1</i>	1e-07	6,44e-05	6,82	35,96	5,16	(1, 2), (3, 2)
29	220117_at	ZNF385D	<i>Zinc finger protein 385D</i>	1e-07	6,44e-05	30,39	56,96	116,16	(1, 3), (2, 3)
30	218974_at	SOBP	<i>Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)</i>	2e-07	0,00011	1562,82	1130,96	2529,1	(1, 3), (2, 3)
31	214761_at	ZNF423	<i>Zinc finger protein 423</i>	2e-07	0,00011	309,11	558,19	1140,35	(1, 3), (2, 3)
32	207443_at	NR2E1	<i>Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1</i>	2e-07	0,00011	54,05	17,91	5,02	(3, 1), (3, 2)
33	232054_at	PCDH20	<i>Protocadherin 20</i>	3e-07	0,000143	34,26	31,94	277,59	(1, 3), (2, 3)
34	230008_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	3e-07	0,000143	62,41	70,15	294,74	(1, 3), (2, 3)
35	205593_s_at	PDE9A	<i>Phosphodiesterase 9A</i>	3e-07	0,000143	90,93	19,64	99,43	(2, 1), (2, 3)
36	1558508_a_at	C1orf53	<i>Chromosome 1 open reading frame 53</i>	3e-07	0,000143	48,7	40,48	10,9	(3, 1), (3, 2)
37	219501_at	ENOX1	<i>Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1</i>	3e-07	0,000143	78,22	37,92	122,13	(2, 1), (2, 3)
38	224215_s_at	DLL1	<i>Delta-like 1 (Drosophila)</i>	3e-07	0,000143	36,59	61,67	227,9	(1, 3), (2, 3)
39	228646_at	PPP1R1C	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1C</i>	4e-07	0,000172	122,03	64,82	17,97	(3, 1), (3, 2)
40	229034_at	SOBP	<i>Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)</i>	4e-07	0,000172	167,72	113,58	295,79	(1, 3), (2, 3)

Tabela 10. Lista genów różnicujących gwiazdziaki włosowatokomórkowe w zależności od umiejscowienia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Porównanie dla trzech grup (M1, M2, M3)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3)	Różnicowanie pomiędzy grupami
41	1553765_a_at	KLHL32	<i>Kelch-like 32 (Drosophila)</i>	4e-07	0,000172	43,27	33,44	234,02	(1, 3), (2, 3)
42	214920_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	4e-07	0,000172	90,78	101,71	404,64	(1, 3), (2, 3)
43	203300_x_at	AP1S2	<i>Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit</i>	4e-07	0,000172	1637,89	437,6	388,51	(2, 1), (3, 1)
44	1569178_at	GRIA4	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4</i>	5e-07	0,000203	14,88	51,35	82,3	(1, 2), (1, 3)
45	225782_at	MSRB3	<i>Methionine sulfoxide reductase B3</i>	5e-07	0,000203	490,39	1333,97	1269,16	(1, 2), (1, 3)
46	221030_s_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	6e-07	0,000235	32,57	45,11	15,59	(3, 1), (3, 2)
47	222484_s_at	CXCL14	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	6e-07	0,000235	1306,56	302,17	45,69	(3, 1), (3, 2)
48	213894_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	7e-07	0,00026	60,33	51,48	264,53	(1, 3), (2, 3)
49	230458_at	SLC45A1	<i>Solute carrier family 45, member 1</i>	7e-07	0,00026	28,77	31,56	58,66	(1, 3), (2, 3)
50	1558388_a_at	LOC643763	<i>Hypothetical LOC643763</i>	8e-07	0,000283	707,8	41,01	728,99	(2, 1), (2, 3)
51	229638_at	IRX3	<i>Iroquois homeobox 3</i>	8e-07	0,000283	19,67	41,79	145,48	(1, 3), (2, 3)
52	230802_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	1e-06	0,000348	28,89	43,54	13,79	(3, 1), (3, 2)
53	244694_at	IGLON5	<i>IgLON family member 5</i>	1,2e-06	0,000392	14,27	6,38	34,76	(1, 3), (2, 3)
54	225242_s_at	CCDC80	<i>Coiled-coil domain containing 80</i>	1,2e-06	0,000392	53,05	267,45	360,91	(1, 2), (1, 3)
55	221107_at	CHRNA9	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 9</i>	1,2e-06	0,000392	24,66	7,33	4,89	(2, 1), (3, 1)
56	223422_s_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	1,4e-06	0,000451	195,81	212,58	63,56	(3, 1), (3, 2)
57	229163_at	CAMK2N1	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1</i>	1,6e-06	0,000487	238,34	147,28	337,45	(2, 1), (2, 3)
58	203299_s_at	AP1S2	<i>Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit</i>	1,6e-06	0,000487	1205,88	553,12	400,77	(2, 1), (3, 1)
59	218002_s_at	CXCL14	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	1,7e-06	0,00051	1646,22	325	53,24	(3, 1), (3, 2)
60	213601_at	SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>	1,9e-06	0,000555	266,63	770,15	105,38	(3, 2)
61	205528_s_at	RUNX1T1	<i>Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)</i>	1,9e-06	0,000555	84,15	85,67	228,34	(1, 3), (2, 3)
62	228307_at	EMILIN3	<i>Elastin microfibril interfacier 3</i>	2,1e-06	0,000603	28,91	56,31	168,05	(1, 3), (2, 3)
63	1552386_at	GAPT	<i>GRB2-binding adaptor protein, transmembrane</i>	2,2e-06	0,000603	65,19	87,26	24,36	(3, 1), (3, 2)
64	224331_s_at	MRPL36	<i>Mitochondrial ribosomal protein L36</i>	2,2e-06	0,000603	2230,02	2363,95	1467,88	(3, 1), (3, 2)
65	231223_at	CSMD1	<i>CUB and Sushi multiple domains 1</i>	2,2e-06	0,000603	94,19	133,14	409,94	(1, 3), (2, 3)
66	227297_at	ITGA9	<i>Integrin, alpha 9</i>	2,3e-06	0,000622	48,87	134,98	194,98	(1, 2), (1, 3)
67	243061_at	C14orf23	<i>Chromosome 14 open reading frame 23</i>	2,4e-06	0,000641	15,5	5,29	4,75	(2, 1), (3, 1)
68	205932_s_at	MSX1	<i>Msh homeobox 1</i>	2,5e-06	0,000652	113,26	257,14	60,55	(3, 2)
69	226743_at	SLFN11	<i>Schlafen family member 11</i>	2,5e-06	0,000652	42	177,49	36,09	(1, 2), (3, 2)
70	219885_at	SLFN12	<i>Schlafen family member 12</i>	2,6e-06	0,000662	18,33	45,81	16,15	(1, 2), (3, 2)
71	225250_at	STIM2	<i>Stromal interaction molecule 2</i>	3e-06	0,000739	57,6	29,78	52,33	(2, 1), (2, 3)
72	219197_s_at	SCUBE2	<i>Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2</i>	3e-06	0,000739	45,04	43,06	180,8	(1, 3), (2, 3)
73	207231_at	DZIP3	<i>DAZ interacting protein 3, zinc finger</i>	3e-06	0,000739	116,15	84	158,2	(2, 3)
74	226487_at	C12orf34	<i>Chromosome 12 open reading frame 34</i>	3,1e-06	0,000755	61,54	56,79	141	(1, 3), (2, 3)
75	214841_at	CNIH3	<i>Cornichon homolog 3 (Drosophila)</i>	3,3e-06	0,000795	297,58	295,89	85,46	(3, 1), (3, 2)
76	220595_at	PDZRN4	<i>PDZ domain containing ring finger 4</i>	3,4e-06	0,00081	15,81	24,9	115,23	(1, 3), (2, 3)
77	221704_s_at	VPS37B	<i>Vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)</i>	3,7e-06	0,000872	270,28	144,6	100,14	(2, 1), (3, 1)
78	208017_s_at	MCF2	<i>MCF.2 cell line derived transforming sequence</i>	3,9e-06	0,00089	21,94	35,53	147,94	(1, 3), (2, 3)
79	213478_at	RP1-21018.1	<i>Kazrin</i>	3,9e-06	0,00089	264,21	198,38	482,21	(1, 3), (2, 3)
80	218901_at	PLSCR4	<i>Phospholipid scramblase 4</i>	3,9e-06	0,00089	748,82	1456,02	1803	(1, 2), (1, 3)

Tabela 10. Lista genów różnicujących gwiazdzianki włosowatokomórkowe w zależności od umiejscowienia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Porównanie dla trzech grup (M1, M2, M3) (cd.)

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Wartość FDR	1 (M1)	2 (M2)	3 (M3)	Różnicowanie pomiędzy grupami
81	238846_at	TNFRSF11A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator</i>	4,5e-06	0,00102	68,41	99,49	32,03	(3, 1), (3, 2)
82	204304_s_at	PROM1	<i>Prominin 1</i>	4,6e-06	0,00103	129,99	40,1	350,45	(2, 3)
83	225706_at	GLCC1	<i>Glucocorticoid induced transcript 1</i>	4,8e-06	0,00106	318,4	307,55	638,43	(1, 3), (2, 3)
84	238663_x_at	GRIA4	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4</i>	5e-06	0,0011	45,3	225,8	417,66	(1, 2), (1, 3)
85	234996_at	CALRL	<i>Calcitonin receptor-like</i>	5,1e-06	0,00111	75,18	105,04	281,9	(1, 3), (2, 3)

Tabela 10. Lista genów różnicujących gwiazdziaki włosatokomórkowe w zależności od umiejscowienia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Porównanie dla trzech grup (M1, M2, M3) (cd.)

analizę przeprowadzono dla gwiazdziaków włosatokomórkowych zlokalizowanych tylko w obrębie mózdzku. Analiza taka była podyktowana obecnością wśród tych nowotworów wszystkich czterech podgrup związanych z rozpatrywanymi cechami radiologiczno-morfologicznymi. Przeprowadzona ocena potwierdziła obserwacje poczynione na całej grupie. Podobnie analiza przeprowadzona przy użyciu testu globalnego nie wykazała związku pomiędzy profilem ekspresji genów a cechami radiologiczno-morfologicznymi (rys. 18).

#### PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ZALEŻNOŚCI OD PRZEBIEGU KLINICZNEGO CHOROBY

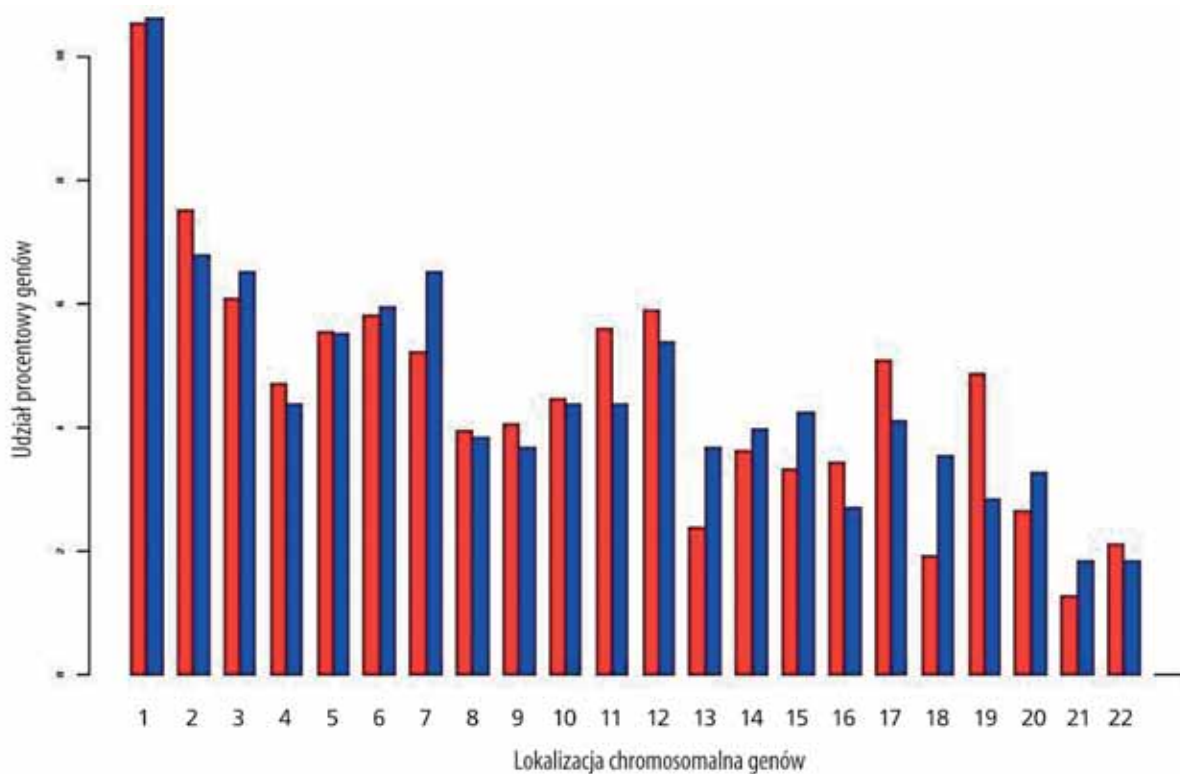
W analizie uwzględniono dwa przypadki nowotworów, które rozwinęły się u chorych z cechami nerwiakowłóknikowości

typu 1. Dla grupy tej obserwowane odchylenia ekspresji genów nie były na tyle silne, aby wpływać na klasteryzację badanych prób.

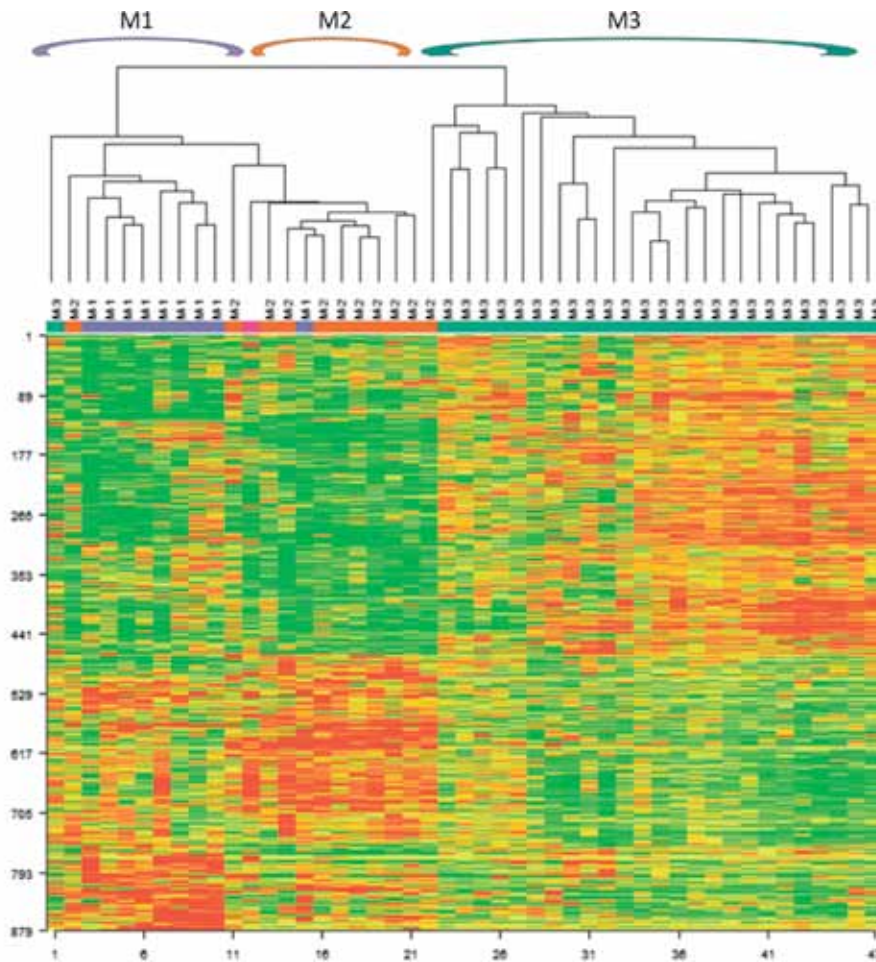
W przypadkach tych nie stwierdzono znamienych różnic w profilu ekspresji.

Porównanie przeprowadzone pomiędzy chorymi bez cech progresji choroby nowotworowej (41 przypadków) i chorymi z progresją procesu nowotworowego (5 przypadków) nie wykazało związku z całkowitym profilem ekspresji genów. Zaledwie pięć genów osiągnęło istotność statystyczną ( $p=0,001$ ) przy próbie różnicowania przypadków o odmiennym przebiegu klinicznym w oparciu o model jednozmiennowy: *SIX3*, *RGS8*, *FAM82 (RMD1)*, *KIF9*, *WDR63* (rys. 19).

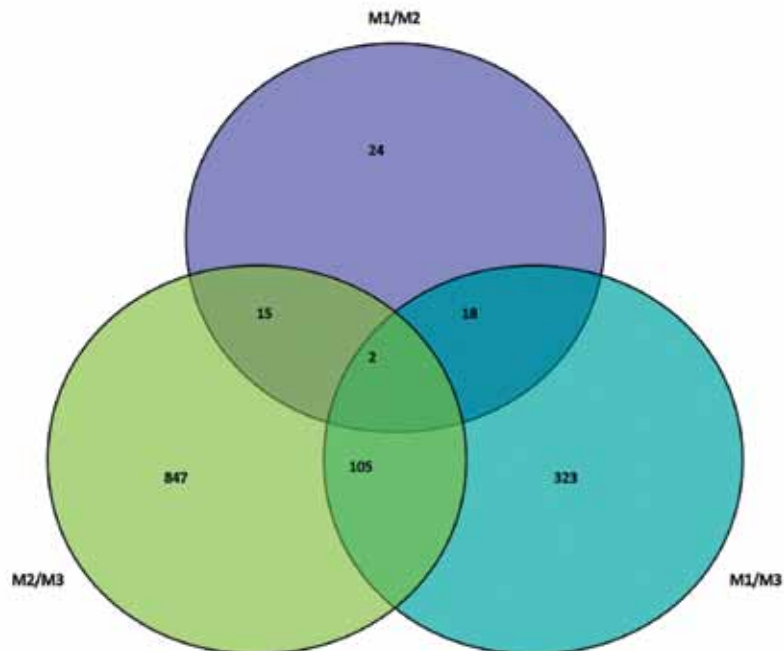
Geny charakterystyczne dla obydwu grup nie są na tyle silne, by wpływać na klasteryzację badanych prób, a stopień ich



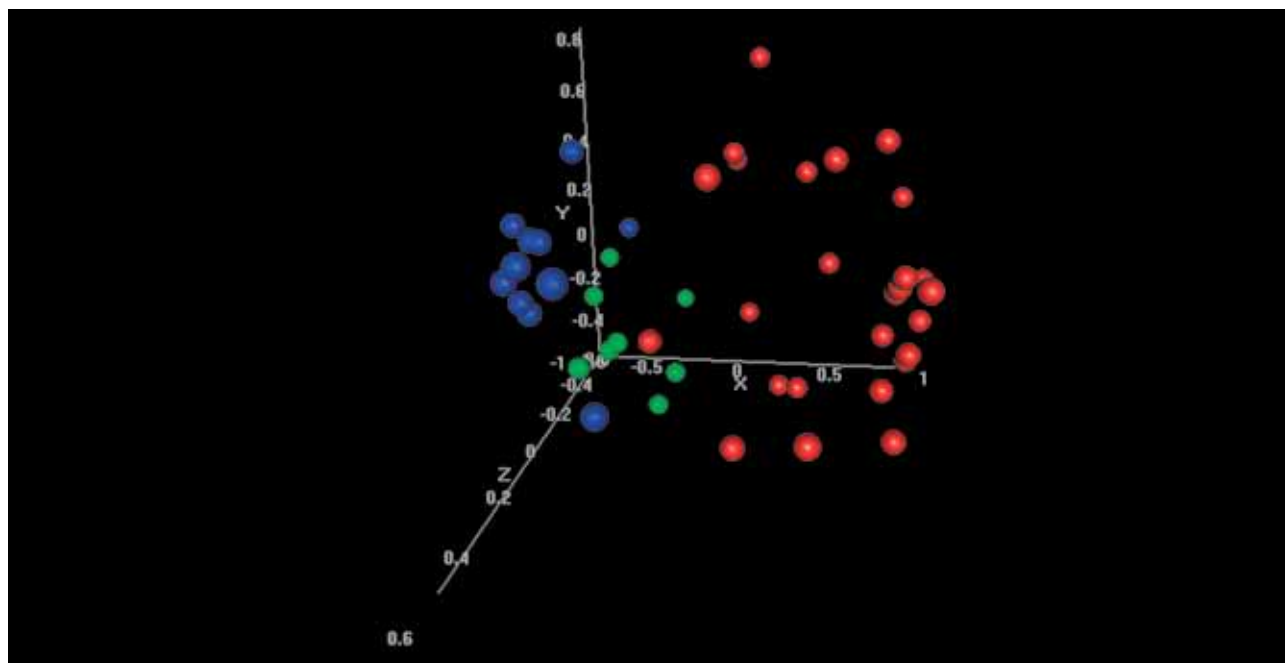
Rys. 12. Lokalizacja chromosomalna wyselekcjonowanych genów. Kolorem czerwonym oznaczono cały zestaw genów, kolorem niebieskim – geny wyselekcjonowane na podstawie analizy bioinformatycznej



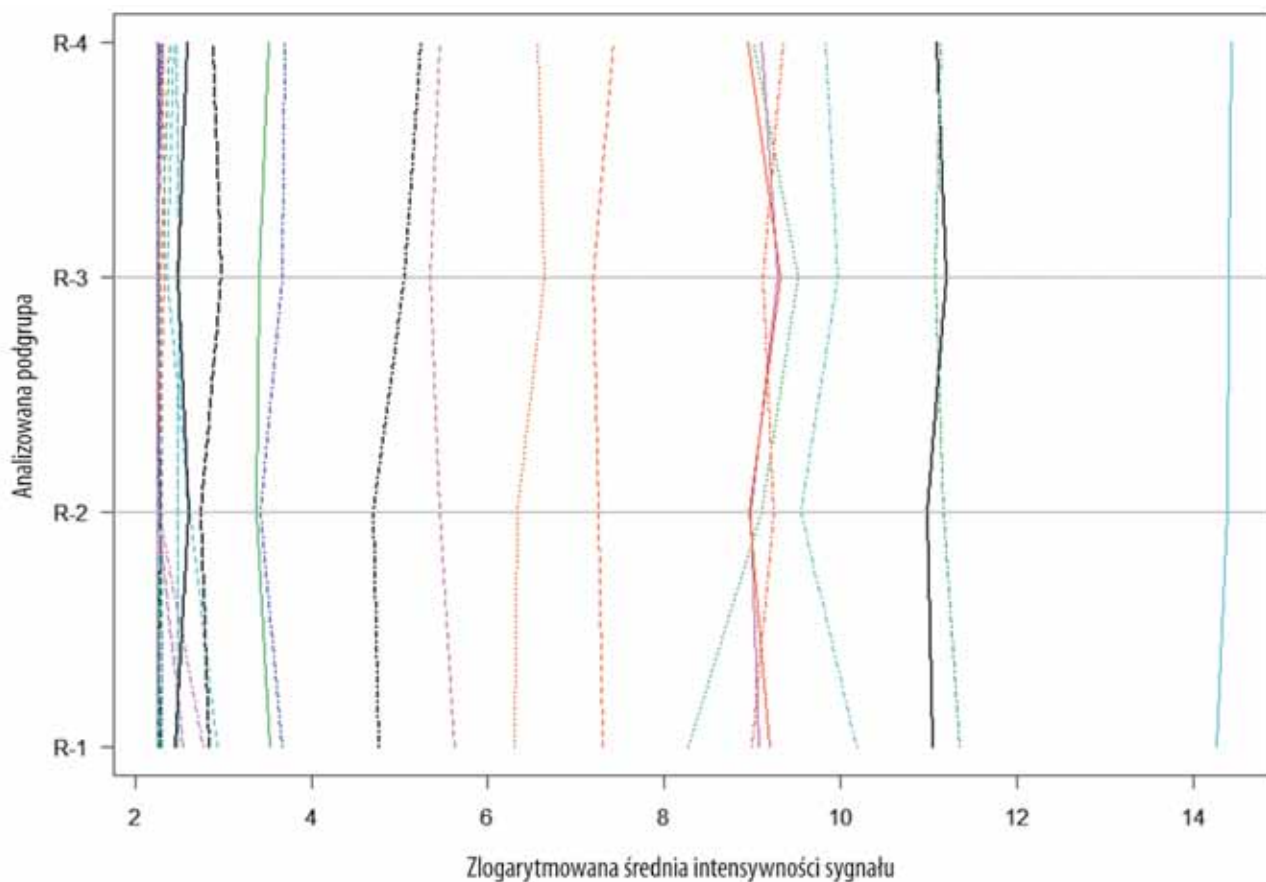
Rys. 13. Dendrogram oraz mapa termiczna obrazujące wynik grupowania hierarchicznego w zależności od lokalizacji. Kolorem czerwonym zaznaczono geny charakteryzujące się zwiększoną znormalizowaną ekspresją, kolorem zielonym – geny o obniżonym poziomie znormalizowanej ekspresji



Rys. 14. Wykres przedstawiający liczbę genów różnicujących badane gwiazdki włosatokomórkowe o odmiennej lokalizacji



Rys. 15. Analiza metodą skalowania wielowymiarowego, na osiach przedstawiono wartości dla trzech pierwszych głównych składowych. Kolorem zielonym oznaczono gwiazdki włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie półkul mózgu (M1), kolorem niebieskim – gwiazdki włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie dróg wzrokowych i podwzgórza (M2), kolorem czerwonym – gwiazdki włosowatokomórkowe zlokalizowane w obrębie mózdzku i komory IV (M3)



180 Rys. 16. Amplituda zmienności genów najlepiej różnicujących nowotwory pod względem cech radiologiczno-morfologicznych

Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Nateżenie cechy w klasie M1/M2	Nateżenie cechy w klasie M3	Krotność zmian
1	231666_at	PAX3	<i>Paired box 3</i>	<1e-07	6,28	279,28	0,022
2	228462_at	IRX2	<i>Iroquois homeobox 2</i>	<1e-07	18,18	470,74	0,039
3	206140_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	<1e-07	2155,8	11,02	195,66
4	211219_s_at	LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>	<1e-07	87,43	5,49	15,93
5	238727_at	LOC440934	<i>Hypothetical LOC440934</i>	<1e-07	18,27	258,93	0,071
6	223582_at	GPR98	<i>G protein-coupled receptor 98</i>	<1e-07	91,01	15,08	6,03
7	1554784_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	32,38	379,96	0,085
8	1554507_at	NAALAD2	<i>N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2</i>	<1e-07	9,67	69,52	0,14
9	210239_at	IRX5	<i>Iroquois homeobox 5</i>	<1e-07	15,13	100,36	0,15
10	229831_at	CNTN3	<i>Contactin 3 (plasmacytoma associated)</i>	<1e-07	14,11	176,8	0,08
11	232054_at	PCDH20	<i>Protocadherin 20</i>	<1e-07	32,97	277,59	0,12
12	227202_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	<1e-07	107,17	1717,72	0,062
13	208464_at	GRIA4	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4</i>	1e-07	10,4	41,53	0,25
14	230008_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	1e-07	66,56	294,74	0,23
15	1553765_a_at	KLHL32	<i>Kelch-like 32 (Drosophila)</i>	1e-07	37,55	234,02	0,16
16	1558508_a_at	C1orf53	<i>Chromosome 1 open reading frame 53</i>	1e-07	43,99	10,9	4,04
17	224215_s_at	DLL1	<i>Delta-like 1 (Drosophila)</i>	1e-07	48,76	227,9	0,21
18	223422_s_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	1e-07	204,86	63,56	3,22
19	214920_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	1e-07	96,64	404,64	0,24
20	230472_at	IRX1	<i>Iroquois homeobox 1</i>	1e-07	29,42	205,19	0,14
21	230458_at	SLC45A1	<i>Solute carrier family 45, member 1</i>	1e-07	30,27	58,66	0,52
22	205858_at	NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i>	2e-07	80,9	14,67	5,52
23	213894_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	2e-07	55,29	264,53	0,21
24	1552386_at	GAPT	<i>GRB2-binding adaptor protein, transmembrane</i>	2e-07	76,53	24,36	3,14
25	221030_s_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	2e-07	38,96	15,59	2,5
26	227209_at	CNTN1	<i>Contactin 1</i>	3e-07	79,89	933,25	0,086
27	228646_at	PPP1R1C	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1C</i>	3e-07	86,17	17,97	4,8
28	218974_at	SOBP	<i>Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)</i>	3e-07	1308,14	2529,1	0,52
29	224331_s_at	MRPL36	<i>Mitochondrial ribosomal protein L36</i>	4e-07	2302,71	1467,88	1,57
30	205528_s_at	RUNX1T1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>	5e-07	84,98	228,34	0,37
31	238022_at	CRNDE	<i>Colorectal neoplasia differentially expressed</i>	7e-07	28,76	134,25	0,21
32	219197_s_at	SCUBE2	<i>Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2</i>	7e-07	43,94	180,8	0,24
33	229034_at	SOBP	<i>Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)</i>	7e-07	135,35	295,79	0,46
34	220595_at	PDZRN4	<i>PDZ domain containing ring finger 4</i>	8e-07	20,3	115,23	0,18
35	220117_at	ZNF385D	<i>Zinc finger protein 385D</i>	8e-07	42,93	116,16	0,37
36	213478_at	RP1-21018.1	<i>Kazrin</i>	8e-07	225,68	482,21	0,47
37	226487_at	C12orf34	<i>Chromosome 12 open reading frame 34</i>	8e-07	58,88	141	0,42
38	227481_at	CNKSR3	<i>CNKSR family member 3</i>	9e-07	207,88	394,33	0,53

Tabela 11. Geny charakteryzujące gwiazdki włosatokomórkowe o odmiennej lokalizacji. Porównanie dla dwóch grup (M1/M2 vs M3)

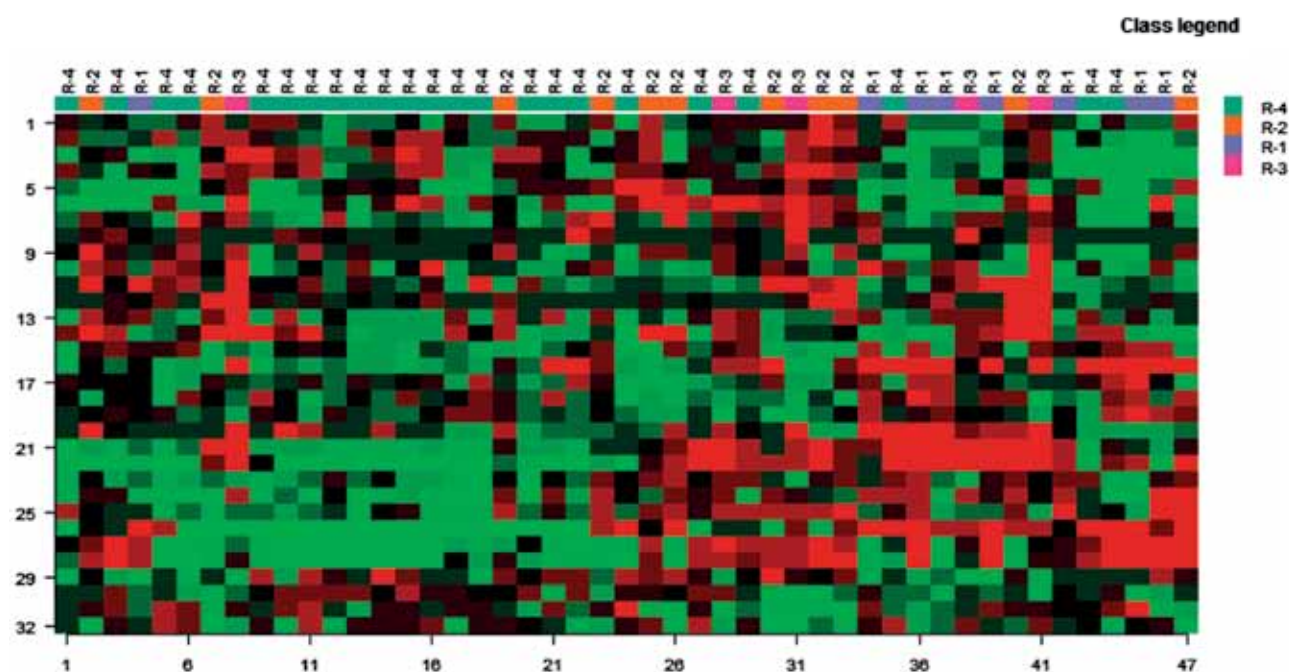
Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Natężenie cechy w klasie M1/M2	Natężenie cechy w klasie M3	Krotność zmian
39	207443_at	NR2E1	<i>Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1</i>	9e-07	29,44	5,02	5,87
40	214841_at	CNIH3	<i>Cornichon homolog 3 (Drosophila)</i>	9e-07	296,65	85,46	3,47
41	230802_at	ARHGAP24	<i>Rho GTPase activating protein 24</i>	9e-07	36,2	13,79	2,63
42	231223_at	CSMD1	<i>CUB and Sushi multiple domains 1</i>	9e-07	113,94	409,94	0,28
43	234996_at	CALCRL	<i>Calcitonin receptor-like</i>	1e-06	90,37	281,9	0,32
44	214761_at	ZNF423	<i>Zinc finger protein 423</i>	1e-06	427,84	1140,35	0,38
45	229638_at	IRX3	<i>Iroquois homeobox 3</i>	1e-06	29,77	145,48	0,2
46	222895_s_at	BCL11B	<i>B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)</i>	1,2e-06	11,45	40,03	0,29
47	219528_s_at	BCL11B	<i>B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)</i>	1,3e-06	13,19	36,89	0,36
48	225706_at	GLCC1	<i>Glucocorticoid induced transcript 1</i>	1,4e-06	312,39	638,43	0,49
49	208221_s_at	SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>	1,8e-06	12,71	6	2,12
50	238021_s_at	CRNDE	<i>Colorectal neoplasia differentially expressed</i>	1,8e-06	154,56	1216,52	0,13
51	208017_s_at	MCF2	<i>MCF.2 cell line derived transforming sequence</i>	2e-06	28,6	147,94	0,19
52	222484_s_at	CXCL14	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	2e-06	583,97	45,69	12,78
53	228307_at	EMILIN3	<i>Elastin microfibril interfacier 3</i>	2,2e-06	41,71	168,05	0,25
54	213752_at	RP1-21018.1	<i>Kazrin</i>	2,3e-06	90,9	209,82	0,43
55	239782_at	RBP1	<i>Retinol binding protein 1, cellular</i>	2,3e-06	9,28	16,36	0,57
56	235236_at	LOC100131897	<i>Uncharacterized protein LOC100131897</i>	2,8e-06	26,05	158,79	0,16
57	229159_at	THSD7A	<i>Thrombospondin, type I, domain containing 7A</i>	3e-06	19,65	71,42	0,28
58	210347_s_at	BCL11A	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)</i>	3,2e-06	25,6	6,5	3,94
59	238846_at	TNFRSF11A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a</i>	3,2e-06	84,06	32,03	2,62
60	244694_at	IGLON5	<i>IgLON family member 5</i>	3,9e-06	9,17	34,76	0,26
61	219537_x_at	DLL3	<i>Delta-like 3 (Drosophila)</i>	4,1e-06	19,88	77,64	0,26
62	207250_at	SIX6	<i>SIX homeobox 6</i>	4,4e-06	50,64	4,75	10,66
63	228728_at	C7orf58	<i>Chromosome 7 open reading frame 58</i>	4,5e-06	440,89	178,44	2,47
64	229714_at	HS6ST3	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3</i>	5e-06	20,08	75,06	0,27
65	213285_at	TMEM30B	<i>Transmembrane protein 30B</i>	5,3e-06	14,75	5,08	2,91
66	232275_s_at	HS6ST3	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3</i>	5,8e-06	9,76	39,85	0,24
67	224970_at	NFIA	<i>Nuclear factor I/A</i>	5,9e-06	1438,1	2560,05	0,56
68	1555867_at	GNG4	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein)</i>	6,2e-06	56,06	250,53	0,22
69	235591_at	SSTR1	<i>Somatostatin receptor 1</i>	6,4e-06	31,36	203,32	0,15
70	218002_s_at	CXCL14	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	6,5e-06	674,45	53,24	12,67
71	201571_s_at	DCTD	<i>dCMP deaminase</i>	6,7e-06	79,33	36,51	2,17
72	218796_at	FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1 (Drosophila)</i>	6,7e-06	49,2	241,78	0,2
73	205529_s_at	RUNX1T1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>	7,1e-06	159,4	469,32	0,34
74	227282_at	PCDH19	<i>Protocadherin 19</i>	7,2e-06	136,62	487,79	0,28
75	207705_s_at	NINL	<i>Ninein-like</i>	7,5e-06	99,2	167,77	0,59
76	1553972_a_at	CBS	<i>Cystathionine-beta-synthase</i>	7,5e-06	41,45	82,76	0,5
77	212208_at	MED13L	<i>Mediator complex subunit 13-like</i>	7,7e-06	120,82	200,65	0,6

182 Tabela 11. Geny charakteryzujące gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennej lokalizacji. Porównanie dla dwóch grup (M1/M2 vs M3) (cd.)

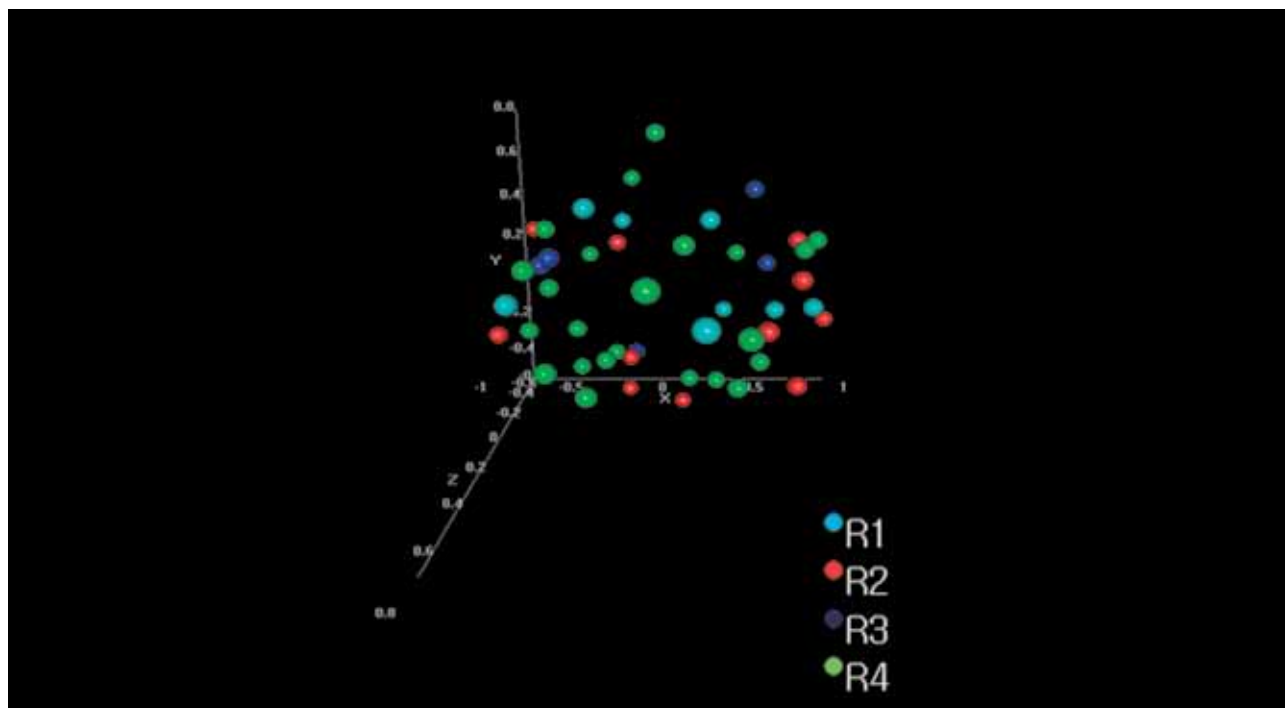


Lp.	Numer sondy	Symbol genu	Nazwa genu	Poziom istotności (p)	Natężenie cechy w klasie M1/M2	Natężenie cechy w klasie M3	Krotność zmian
78	57588_at	SLC24A3	<i>Solute carrier family 24 member 3</i>	8,5e-06	116,88	369,33	0,32
79	205240_at	GPSM2	<i>G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)</i>	8,7e-06	99,14	196,22	0,51
80	229160_at	MUM1L1	<i>Melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1</i>	8,8e-06	13,27	43,05	0,31
81	213601_at	SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>	9e-06	477,83	105,38	4,53
82	216086_at	SV2C	<i>Synaptic vesicle glycoprotein 2C</i>	9,5e-06	11,46	48,72	0,24
83	212239_at	PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	9,6e-06	2754,8	4694,65	0,59
84	226806_s_at	NFIA	<i>Nuclear factor I/A</i>	9,8e-06	2554,53	4254,38	0,6
85	209035_at	MDK	<i>Midkine (neurite growth-promoting factor 2)</i>	1,01e-05	125,63	46,6	2,7
86	219501_at	ENOX1	<i>Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1</i>	1,02e-05	52,53	122,13	0,43
87	60474_at	FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1 (Drosophila)</i>	1,03e-05	59,85	281,77	0,21
88	207231_at	DZIP3	<i>DAZ interacting protein 3, zinc finger</i>	1,07e-05	97,19	158,2	0,61
89	209815_at	PTCH1	<i>Patched homolog 1 (Drosophila)</i>	1,07e-05	527,69	1153,95	0,46
90	242319_at	DGKG	<i>Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa</i>	1,11e-05	7,01	24,9	0,28

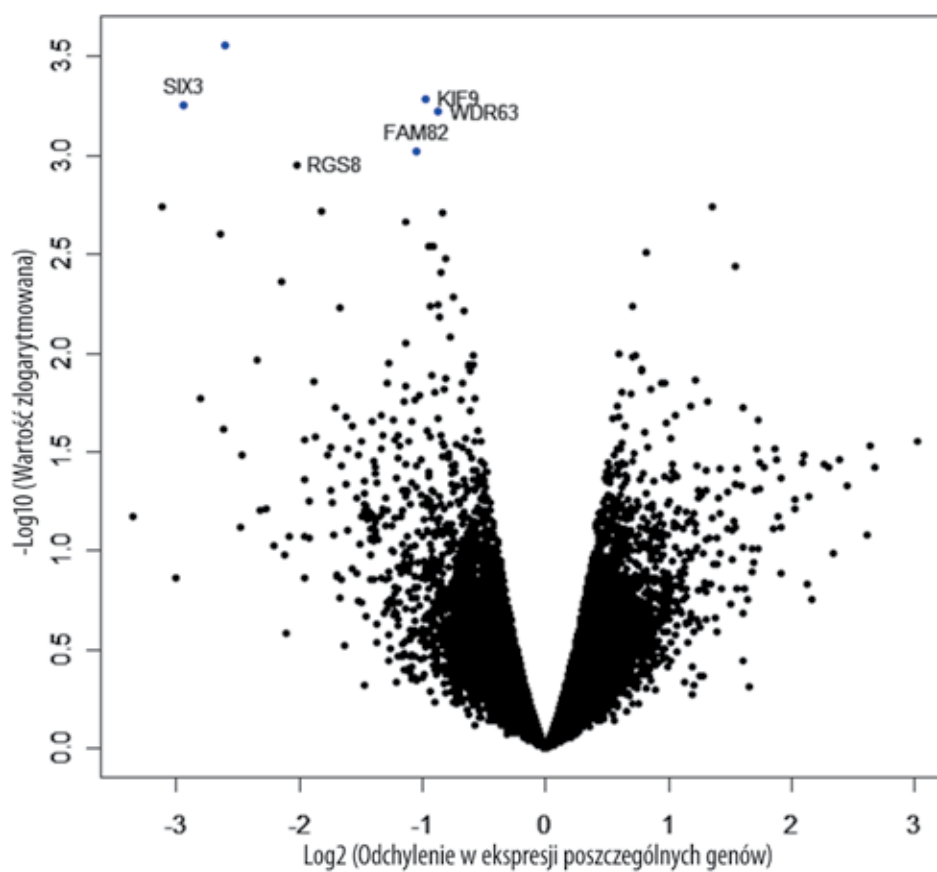
Tabela 11. Geny charakteryzujące gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennej lokalizacji. Porównanie dla dwóch grup (M1/M2 vs M3) (cd.)



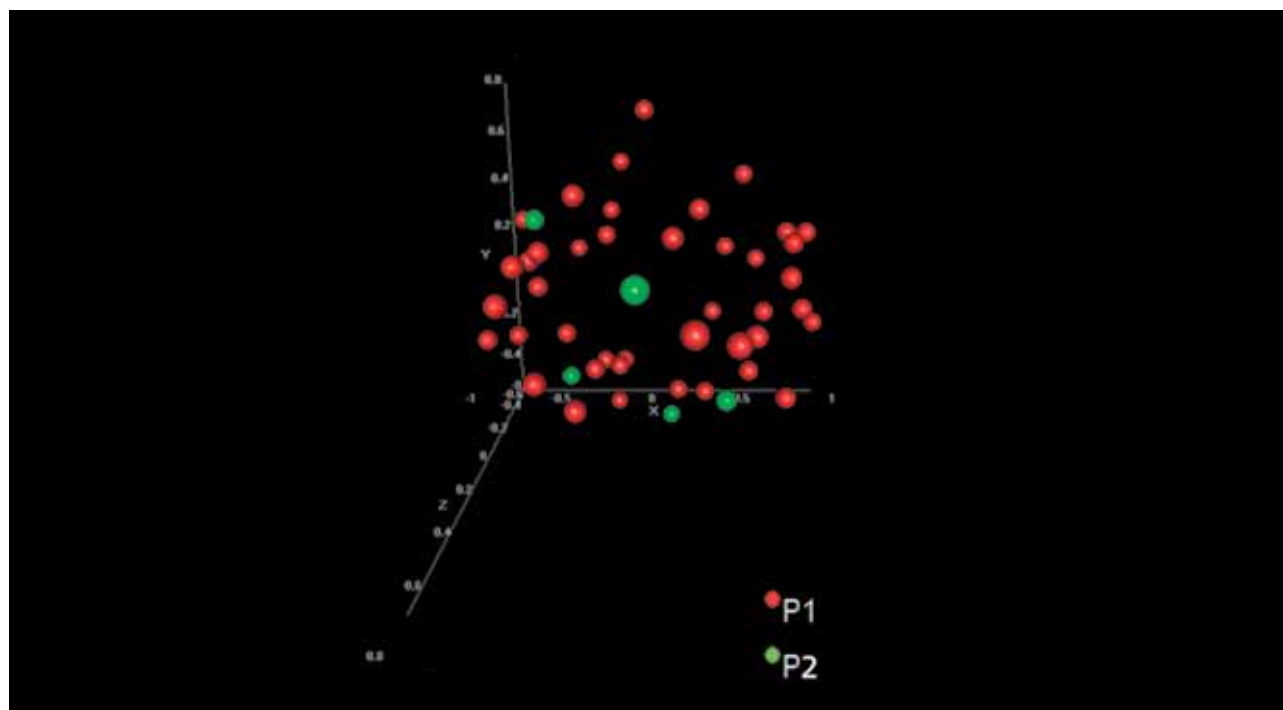
Rys. 17. Grupowanie hierarchiczne w odniesieniu do analizowanych cech radiologiczno-morfologicznych badanych nowotworów. R1 – nowotwory torbielowate z guzkiem przyściennym, w których wzmożeniu kontrastowemu ulega tylko guzek przyścienny; R2 – nowotwory torbielowate, w których wzmożeniu kontrastowemu ulegają ściana torbieli i guzek przyścienny; R3 – nowotwory łite z obecnymi cechami martwicy centralnej; R4 – nowotwory łite z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej.



Rys. 18. Analiza w oparciu o skalowanie wielowymiarowe. Brak dużego stopnia różnic pomiędzy nowotworami o zróżnicowanych cechach radiologiczno-morfologicznych. R1 – nowotwory torbielowate z guzkiem przyściennym, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulega tylko guzek przyścienny; R2 – nowotwory torbielowate, w których wzmocnieniu kontrastowemu ulegają ściana torbieli i guzek przyścienny; R3 – nowotwory lite z obecnymi cechami martwicy centralnej; R4 – nowotwory lite z brakiem lub obecnością niewielkiej części torbielowatej



184 Rys. 19. Analizowane grupy chorych o odmiennym przebiegu klinicznym choroby różnicowało pięć genów



Rys. 20. Analiza w oparciu o skalowanie wielowymiarowe nie wykazała możliwości grupowania nowotworów o odmiennym przebiegu klinicznym. P1 – przypadki bez cech progresji klinicznej; P2 – przypadki z cechami progresji klinicznej

rozproszenia nie pozwolił na ich przyporządkowanie. W analizie opartej na użyciu testu globalnego powyższe geny nie uzyskały znamienności statystycznej ( $p=0,83$ ) (rys. 20).

### WALIDACJA UZYSKANYCH WYNIKÓW

Potwierdzenie wyników analiz mikromacierzowych przeprowadzono dla wyselekcjonowanych genów różnicujących gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennym lokalizacji. Do walidacji wybrano następujące geny najlepiej różnicujące gwiazdki włosowatokomórkowe o odmiennym lokalizacji: *CXCL14*, *LHX2*, *SIX1*, *SIX6*, *IRX2*, *PAX3*, *CNTN1*. Dla wszystkich wyselekcjonowanych genów wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji o podobnym wzorze do wartości uzyskanych w wyniku analiz mikromacierzowych (rys. 21, rys. 22). Dla genów *PAX3*, *LHX2*, *CNTN1* i *CXCL14* uzyskano wyniki zbliżone z wynikami uzyskanymi w trakcie badań mikromacierzowych. Geny te najlepiej różnicowały pomiędzy sobą nowotwory o lokalizacji nadnamiotowej (M1 i M2) od zmian umiejscowionych podnamiotowo (M3). Ponadto dla genów *PAX3*, *LHX2* i *CNTN1* uzyskano graniczne wartości  $p$ , przy próbie różnicowania pomiędzy zmianami położonymi w różnych

obszarach anatomicznych przestrzeni nadnamiotowej, przy czym w analizach mikromacierzowych przy próbie różnicowania pomiędzy tymi nowotworami statystycznie istotne wartości uzyskano tylko dla genu *CNTN1*.

Dla genu *IRX2* największe różnice w ekspresji wykazano pomiędzy nowotworami zlokalizowanymi w obrębie półkul mózgu (M1) i nowotworami zlokalizowanymi podnamiotowo (M3) oraz w obrębie dróg wzrokowych i podwzgórza (M2). Genem, który wykazał istotne statystycznie odchylenia w ekspresji umożliwiające różnicowanie pomiędzy wszystkimi trzema odmiennymi lokalizacjami, był gen *SIX1* (tabela 12).

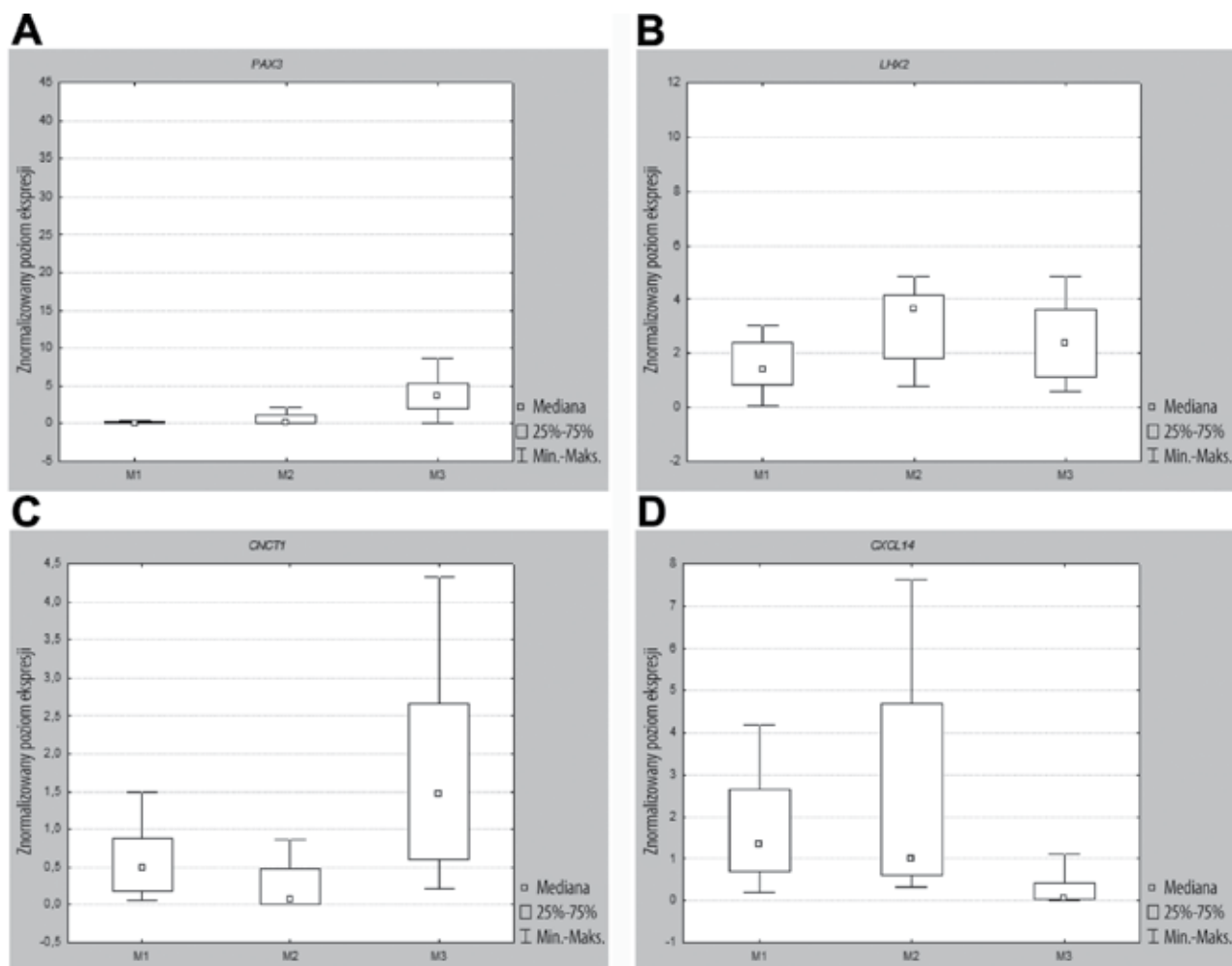
### OMÓWIENIE

#### PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ODNIESIENIU DO LOKALIZACJI GWIAZDZIAKÓW WŁOSOWATOKOMÓRKOWYCH

Gwiazdki włosowatokomórkowe występujące w populacji dziecięcej najczęściej rozwijają się w przestrzeni podnamiotowej, w obrębie mózdzku. Drugie pod względem częstości występowania miejsce to okolica skrzyżowania dróg wzrokowych

Wartość $p$	<i>PAX3</i>	<i>LHX2</i>	<i>CNTN1</i>	<i>CXCL14</i>	<i>IRX2</i>	<i>SIX6</i>	<i>SIX1</i>
M1 vs M2	0,05	0,05	0,05	0,987	0,0039	0,001	0,016
M1 vs M3	0,009	0,0003	0,043	0,0015	0,0006	0,018	0,043
M2 vs M3	0,031	0,0001	0,002	0,0025	0,22	0,059	0,0001

Tabela 12. Wartości  $p$  uzyskane dla genów poddanych walidacji, różnicujących gwiazdki włosowatokomórkowe pod względem lokalizacji

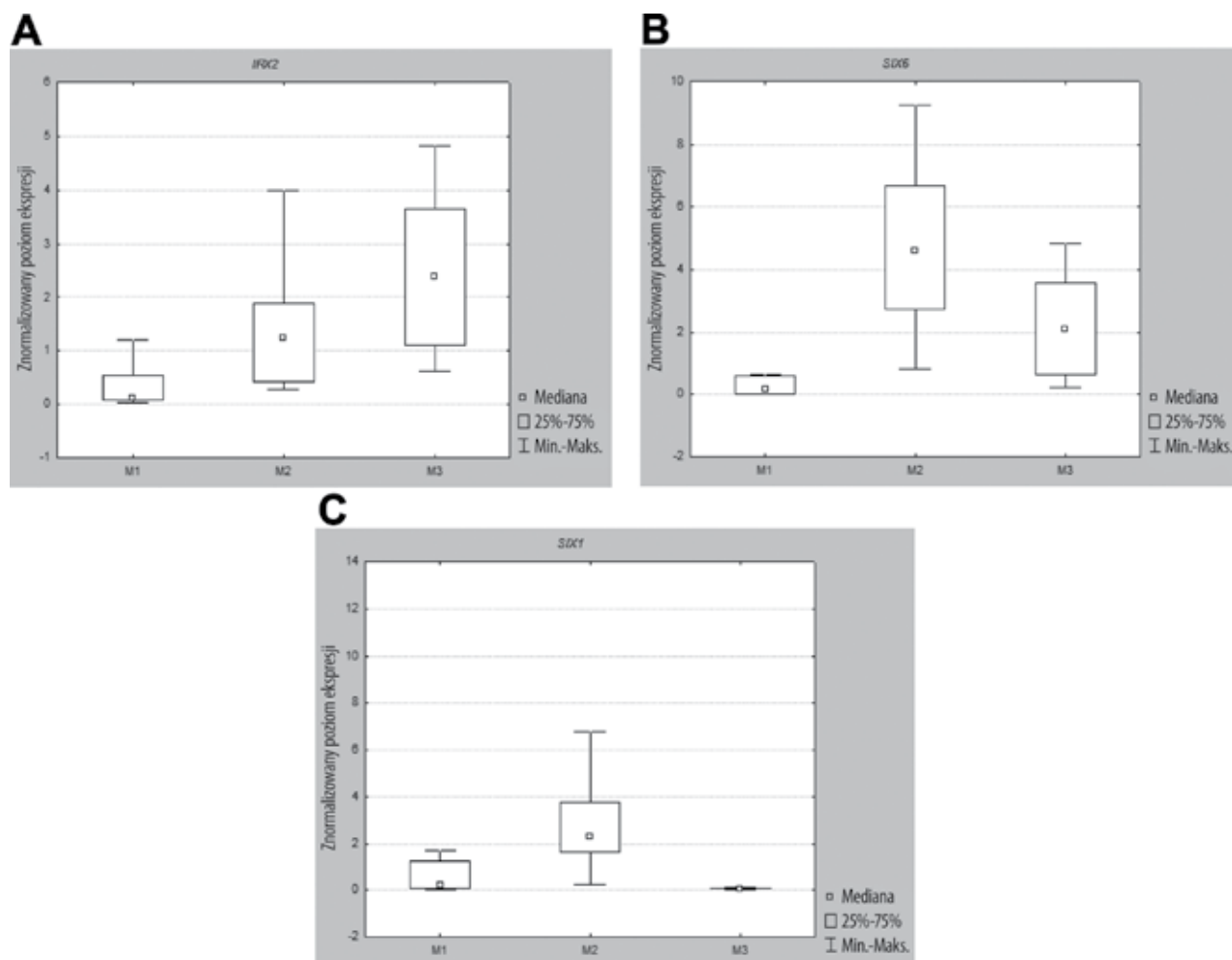


Rys. 21. Znormalizowany poziom ekspresji genów PAX3, LHX2, CNTN1 i CXCL14 najlepiej różnicujących gwiaździaki włosowatokomórkowe nadnamiotowe i podnamiotowe (wartości p podane w tabeli 13)

i podwzgórza, następnie zaś półkule mózgu. Pomimo różnej lokalizacji nowotwory te charakteryzują się podobnym, jeśli nie takim samym, obrazem komórkowym. W związku z pojawieniem się nowych możliwości oceny zmian nowotworowych na poziomie molekularnym aktualne stało się pytanie, czy nowotwory o takiej samej histopatologii, rosnące w innych obszarach anatomicznych mózgowia są rzeczywiście biologicznie identyczne.

Dotychczas ukazały się dwa opracowania dotyczące gwiaździaków włosowatokomórkowych, w których do wykazania molekularnych różnic wykorzystano metody oceny ekspresji genomu. W pierwszym Sharma i wsp. analizowali wyniki badań mikromacierzowych 41 przypadków gwiaździaków włosowatokomórkowych o różnym umiejscowieniu. Badana grupa obejmowała guzy w większości zlokalizowane w obrębie tylnego dołu czaszki (27 przypadków). Pozostałe nowotwory położone były nadnamiotowo, w półkulach mózgu (6 przypadków), w obrębie dróg wzrokowych (3 przypadki) oraz w podwzgórzu (1 przypadek). W swoich analizach zespół uwzględnił także 3 przypadki nowotworów pnia mózgu i jeden przypadek guza rozwijającego się w komorze bocznej. Analiza bioinformatyczna powyższej grupy pozwoliła autorom

na wytypowanie genów, których poziomy ekspresji odróżniały nowotwory umiejscowione w przestrzeni nadnamiotowej od zmian zlokalizowanych podnamiotowo. Dla pierwszych z nich charakterystyczna była ekspresja genów *LHX2*, *NR2E1*, *SIX3*, *TTC9*, *CASP7* i *ZNF140*. Druga grupa wyróżniała się ekspresją genów *PAX3*, *IRX2* i *RASSF2*. Funkcje znaczącej części wyselekcjonowanych przez zespół genów związane były odpowiednio z procesami rozwojowymi przodomózgowia lub mózdzku. Aby wyjaśnić wpływ, jaki na uzyskane wyniki miał wzór ekspresji genów związany z zajmowaną przestrzenią anatomiczną, dokonano kolejnych porównań. Autorzy przeprowadzili między innymi próbę grupowania hierarchicznego badanych nowotworów w oparciu o ekspresję większości znanych genów związanych z procesami rozwojowymi przodomózgowia lub mózdzku oraz analizę uwzględniającą swoistą ekspresję prawidłowych tkanek w różnych obszarach anatomicznych mózgowia. Utworzone w ten sposób profile ekspresji nie wpłynęły na grupowanie badanych nowotworów, co przemawia jednoznacznie za tym, że obserwowane zmiany w poziomach wyselekcjonowanych transkryptów należy uznać za swoiste dla określonych lokalizacji<sup>(100)</sup>.



Rys. 22. Znormalizowany poziom ekspresji genów IRX2 i SIX6 najlepiej różnicujących gwiazdziaki włosatokomórkowe półkul mózgu od nowotworów o innym umiejscowieniu. Gen SIX1 umożliwił różnicowanie pomiędzy wszystkimi trzema lokalizacjami

W kolejnym opracowaniu, uwzględniając 31 gwiazdziaaków włosatokomórkowych, Tchoghandjian i wsp. wykazali związek pomiędzy lokalizacją nowotworu a całkowitym profilem ekspresji, szczególnie w przypadku gwiazdziaaków włosatokomórkowych dróg wzrokowych. W pracy tej badania w oparciu o profilowanie genomowe wykonano dla 11 przypadków, z których 5 było umiejscowionych właśnie w okolicy skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza, a 6 pozostałych rozwijało się w przestrzeni podnamiotowej. Nienadzorowane grupowanie hierarchiczne badanych nowotworów wykazało obecność 474 genów różnicujących gwiazdziaki włosatokomórkowe rozwijające się w tych dwóch obszarach anatomicznych. Większość wyselekcjonowanych genów była związana z kontrolowaniem przebiegu cyklu komórkowego, apoptozy oraz z procesami adhezji i migracji komórek, jak również z angiogenezą. Reprezentatywną grupę, podobnie jak w opracowaniu Sharmy i wsp., stanowiły geny zaangażowane w rozwój mózgowia, wśród których szczególne znaczenie przypisano genom homeoboksovym *LHX2* i *SIX6*. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że w powyższym opracowaniu uwzględniono jeden przypadek gwiazdziaaka pilomyksoidalnego dróg wzrokowych,

który z racji swojego miejsca w klasyfikacji nowotworów mózgu i gorszego rokowania nie powinien się znaleźć w grupie gwiazdziaaków włosatokomórkowych<sup>(15)</sup>.

Podobnie jak w przypadku wyżej wymienionych publikacji badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że profil ekspresji genów pozwala na różnicowanie pomiędzy nowotworami o różnym umiejscowieniu. Na podstawie grupowania hierarchicznego 46 przypadków potwierdzono obecność charakterystycznych profili ekspresji genów dla wszystkich trzech analizowanych obszarów anatomicznych (półkule mózgu, skrzyżowanie dróg wzrokowych i podwzgórze, mózdzek i komora IV). Różnicowanie dotyczyło nie tylko przestrzeni nad- i podnamiotowej, lecz także odmiennych lokalizacji w obrębie przestrzeni nadnamiotowej. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano odmiennosć profili molekularnych gwiazdziaaków włosatokomórkowych zlokalizowanych w półkulach mózgu oraz w obrębie skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza. Obserwacja ta stanowi przyczynek do rozważań nad heterogennym pochodzeniem tego nowotworu, który niezależnie od lokalizacji prezentuje taki sam obraz histologiczny. Jednocześnie podobne spostrzeżenia skłaniają do podjęcia

analiz molekularnych tego typu nowotworów umiejscowionych w jeszcze innych obszarach mózgowia, które ze względu na zbyt małą liczebność nie zostały uwzględnione w mojej pracy. Przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy badania reprezentatywnej grupy nowotworów pozwoliły na wyselekcjonowanie grupy genów o znacząco podwyższonych poziomach ekspresji w gwiazdziakach włosowatokomórkowych rozwijających się w obrębie półkul mózgu, wśród których należy wymienić: *FOXP1*, *ARX* (ang. *aristaless-related homeobox, X-linked*), *CXCL14* (ang. *chemokine, CXC motif, ligand 14*), *NEDD4L* (ang. *ubiquitin protein ligase NEDD4-like*), *L1CAM* (ang. *L1 cell adhesion molecule*) i *LHX2*. W prowadzonych dotychczas analizach mikromacierzowych zwrócono uwagę tylko na dwa z nich: *FOXP1* i *LHX2*.

Funkcje wyselekcjonowanych tu genów związane są przede wszystkim z procesami rozwojowymi mózgowia i/lub obecnością komórek prekursorowych w tym obszarze anatomicznym. Gen *FOXP1* koduje czynnik transkrypcyjny posiadający funkcję represji, odgrywający znaczącą rolę zwłaszcza w procesach różnicowania komórek neuroepitelialnych kresomózgowia w okresie embriogenezy. Analizy *in vivo* wykazały, że aktywność genu jest kluczowym elementem odpowiedzialnym za dojrzewanie obszarów podkorowych, co prawdopodobnie ma związek z utrzymywaniem subpopulacji niskozróżnicowanych komórek Cajala-Retziusa. *FOXP1* bierze udział w hamowaniu proliferacji komórek poprzez czynniki z rodziny FOXO na drodze transdukcji sygnału na szlakach SMAD i PI3/AKT. W komórkach *glioblastoma* opisano istotną rolę białka *FOXP1* w utrzymaniu oporności na transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta, TGF-β*) i jego wpływ na ograniczenie wrażliwości komórek na sygnały antyproliferacyjne<sup>(140,141)</sup>. Na podstawie analiz genu i jego produktu w rdzeniakach sugerowano, że jego nadekspresja przyczynia się do utrzymywania populacji niezróżnicowanych komórek prekursorowych i jednocześnie ułatwia ich ekspansję. Efekt ten miałby być osiągnięty, podobnie jak to ma miejsce w *glioblastoma*, poprzez represję szlaku sygnałowego TGF-β, który wydaje się istotny dla dojrzewania prekursorowych komórek neuronalnych. Jednoczesna nadekspresja genu *FOXP1* i pobudzenie szlaku PI3/AKT obserwowane w komórkach nowotworów pochodzenia glejowego mają wskazywać na ich związek z onkogennością tych guzów. Nadekspresję genu, obok zmienionych poziomów kilku innych transkryptów, opisano również jako zmianę charakterystyczną dla wyściółczaków rozwijających się w przestrzeni nadnamiotowej<sup>(140-145)</sup>.

Należy w tym miejscu zauważyć, że w bieżącym piśmiennictwie istnieją rozbieżności dotyczące wyników roli genu *FOXP1* w gwiazdziakach włosowatokomórkowych. Potter i wsp. odnotowali znacząco niższą jego ekspresję i utratę materiału genetycznego w obszarze zajmowanym przez promotor genu w 60% badanych przez siebie 14 przypadków tego nowotworu<sup>(58)</sup>. Główną przyczyną takich rozbieżności należy upatrywać, po raz kolejny, w zróżnicowaniu klinicznym badanych grup, co jednocześnie stanowi problem przy próbach porównywania uzyskiwanych wyników. W analizach cytowanego tu zespołu uwzględniono bowiem jedynie gwiazdziaki

włosowatokomórkowe zlokalizowane podnamiotowo, które w moich badaniach również wykazywały szczególnie niskie poziomy ekspresji genu *FOXP1*.

W przekazywaniu sygnałów na szlakach komórkowych odpowiedzialnych za kontrolę procesów proliferacyjnych komórek OUN z genem *FOXP1* współpracuje kolejny z wyróżnionych w bieżącej analizie – gen *NEDD4L* (*ubiquitin protein ligase NEDD4-like*). Główną jego funkcją jest ograniczanie zakresu półtrwania białek SMAD2 i SMAD3, które są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez TGF-β będący cytokiną o udowodnionym związku z procesami nowotworowymi<sup>(140,141)</sup>. Również funkcja kolejnych dwóch genów wyselekcjonowanych w trakcie przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz związana jest z obecnością komórek prekursorowych i ma ścisły związek z procesami rozwojowymi mózgowia. Gen *ARX* (*aristaless-related homeobox, X-linked*) należy do grupy czynników transkrypcyjnych, których główna rola polega na utrzymaniu różnych podtypów neuronów w OUN i regulacji proliferacji komórek neuroepitelialnych. Ekspresja białka homeoboksowego *ARX* zachodzi głównie w okresie embriogenezy i odgrywa kluczową rolę w rozwoju przodomózgowia, natomiast w dojrzałym mózgowiu pozostaje na niskim poziomie. Z mutacjami w genie wiąże się występowanie wad rozwojowych OUN, między innymi rozwój wodogłowia, lizencefalii i agenezji ciała modzelowatego, współistniejące z nieprawidłowościami zewnętrżnych narządów płciowych i niepełnosprawnością intelektualną. Produkt drugiego genu, *L1CAM* (*L1 cell adhesion molecule*), to glikoproteina, której główna rola w warunkach fizjologicznych związana jest z migracją i przeżywaniem komórek, w tym także komórek prekursorowych. Część ta, pierwotnie opisana jako molekula adhezyjna, odgrywa istotną rolę podczas rozwoju OUN poprzez udział w procesach transdukcji sygnałów, regulację przylegania komórkowego oraz kontrolę migracji i wzrostu komórek. Mutacje w genie *L1CAM* odpowiadają również za występowanie wad OUN, w tym wodogłowia sprzężonego z chromosomem X i agenezji ciała modzelowatego. Dotychczas opisano związek aktywności genu z onkogennością wielu typów nowotworów, w tym także ze stopniem złośliwości zmiany<sup>(144,146,147)</sup>.

Sugestie dotyczące znaczenia wyróżnionych tu genów dla procesów kancerogenezy w nowotworach gleju gwiazdzistego wysunięto również w odniesieniu do genu *CXCL14* (*chemokine, CXC motif, ligand 14*). W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych nowotworów pochodzenia glejowego opisano podwyższone poziomy jego ekspresji w komórkach podścieliska, co wiązało się z tendencją do naciekania. Obserwacja taka sugeruje związek genu z procesami kancerogenezy wybranych nowotworów OUN pomimo jego nadal niejasnej roli w warunkach fizjologicznych<sup>(148,149)</sup>.

Ostatni gen, *LHX2*, w opracowaniu Sharmy i wsp. znajdował się wśród genów, których podwyższona ekspresja identyfikowała grupę nadnamiotowych gwiazdziaków włosowatokomórkowych. Z kolei u Tchoghandjian i wsp. koekspresja genów *LHX2* i *SIX6* była obserwowana w nowotworach skrzyżowania dróg wzrokowych<sup>(15,100)</sup>. Tego typu rozbieżności łatwo wytłumaczyć charakterystyką kliniczną nowotworów stanowiących

przedmiot badań w poszczególnych opracowaniach. W analizach przedstawionych przez Sharmę i wsp. badaniom poddano zbyt heterogenną grupę nowotworów nadnamiotowych, co nie pozwoliło na zauważenie specyficznych zależności pomiędzy profilem ekspresji a dokładną lokalizacją guza. Natomiast Tchoghandjian i wsp. nie uwzględnili w swoim opracowaniu zmian rozwijających się w obrębie półkul mózgu. Uzyskane przeze mnie wyniki ujawniły związek pomiędzy podwyższoną ekspresją genu *LHX2* a lokalizacją nadnamiotową nowotworu, przy czym szczególnie wysokie poziomy ekspresji genu odnotowano dla nowotworów umiejscowionych w okolicy skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza. Podobnie jak w obu cytowanych powyżej opracowaniach najniższe wartości ekspresji tego genu dotyczyły zmian rozwijających się podnamiotowo. W badaniach własnych gwiazdziaki włosowatokomórkowe okolicy skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza także charakteryzowała nadekspresja genów ściśle związanych z procesami rozwojowymi mózgowia. Nadreprezentowane były w tej grupie geny z rodziny homeoboksowych czynników transkrypcyjnych *SIX* (*SIX1*, *SIX3*, *SIX6*) i wspomniany powyżej gen *LHX2*. Geny te pojawiły się wśród transkryptów charakterystycznych dla gwiazdzików włosowatokomórkowych o różnej lokalizacji w dwóch poprzednich opracowaniach, w których podjęto próbę ustalenia zależności pomiędzy profilem ekspresji genów a umiejscowieniem nowotworu. U Sharmy i wsp. ekspresja genu *LHX2* została opisana jako zmiana charakterystyczna dla nowotworów położonych nadnamiotowo. Natomiast wyniki prezentowane przez Tchoghandjian i wsp., które uwzględniały nowotwory skrzyżowania dróg wzrokowych i podwzgórza, wskazały na ścisły związek genów *LHX2* i *SIX6* z tą właśnie lokalizacją. Zdefiniowany w ramach niniejszej pracy unikatowy wzór ekspresji gwiazdzików włosowatokomórkowych umiejscowionych w okolicy podwzgórza i dróg wzrokowych można zinterpretować jako zestaw wyselekcjonowanych genów specyficznych dla danego obszaru anatomicznego i odpowiedzialnych za rozwój gwiazdzików włosowatokomórkowych o tym umiejscowieniu.

Gen *LHX2* ulega ekspresji przede wszystkim w obrębie proliferujących komórek przodomózgowia we wczesnych okresach embriogenezy, gdzie działa jako typowy gen selekcyjny, który jest nieodłącznym elementem regulującym dojrzewanie obszarów korowych poprzez wpływ na różnicowanie komórek macierzystych neuroepitelium<sup>(150)</sup>. Badania prowadzone na organizmach zwierzęcych pozwoliły wykazać funkcjonalny związek pomiędzy genem *LHX2* i jednym z genów z rodziny *SIX* – *SIX3*. Geny te, poprzez działanie na tym samym szlaku sygnałowym, biorą udział w kontroli procesów rozwojowych przodomózgowia<sup>(151)</sup>. Produkty genów z rodziny *SIX* zaangażowane są ponadto w różnicowanie komórkowe, a także w procesy kancerogenezy w wielu schorzeniach nowotworowych (nowotwory gruczołu piersiowego, płuc, jelita grubego, wątroby, jajnika, układu krwiotwórczego). W nowotworach pochodzenia mezenchymalnego przyczyniają się, poprzez aktywację czynnika TGF- $\beta$ , do promocji rozrostu nowotworowego na drodze pobudzania tranzykcji epitelialno-mezenchymalnej, stymulują też powstawanie przerzutów<sup>(152-154)</sup>.

Przeprowadzona w niniejszej pracy próba identyfikacji genów związanych z umiejscowieniem gwiazdziaka włosowatokomórkowego w obrębie mózdzku i komory IV pozwoliła również na wytypowanie genów charakterystycznych dla tej lokalizacji. Wśród wyselekcjonowanych genów dominowała grupa homeotycznych czynników transkrypcyjnych Iroquois (*IRX1*, *IRX2*, *IRX3*, *IRX5*). Wśród transkryptów o znamienne podwyższonych poziomach ekspresji obecne były ponadto: *PAX3*, *RUNX1T1*, *PROM1*, *CNTN1* i *CNTN3*.

Geny homeoboksowe z rodziny *IRX* i gen *PAX3* pełnią istotne funkcje w procesach rozwojowych, takich jak tworzenie osi przednio-tylnej i grzbietowo-brzuszej wybranych obszarów mózgowia, zwłaszcza na wczesnych etapach kształtowania się cewy nerwowej<sup>(155-157)</sup>. Nadekspresja homologicznych genów występujących u organizmów niższych powoduje tworzenie ektopowych obszarów tkanki neuralnej i hamuje różnicowanie neuronów. Geny *PAX3*, *IRX2* i *IRX5* wykazywały nadmierną ekspresję także w badaniu przeprowadzonym przez Sharmę i wsp., w którym uwzględniono 27 przypadków gwiazdzików włosowatokomórkowych umiejscowionych podnamiotowo.

Neuronowe białka adhezyjne kodowane przez *CNTN1* i *CNTN3* są zaangażowane we wzrost i naprowadzanie neuronów, tworzenie sieci neuronowych, a także przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami. Rolę białek podkreślano zwłaszcza w kontekście prawidłowej morfogenezy mózdzku, w której biorą udział przede wszystkim poprzez regulację procesów proliferacyjnych<sup>(73,158)</sup>. Kolejne dwa geny: *PROM1* i *RUNX1T1* są z kolei związane z obecnością komórek o właściwościach komórek progenitorowych. Należy zwrócić uwagę, że produkt genu *RUNX1T1* był jednym z transkryptów regulatorowych wyselekcjonowanych przez zespół Deshmukha i wsp. w oparciu o zaproponowaną przez ten zespół nowatorską metodę analizy sieci transkrypcyjnych<sup>(159,160)</sup>.

Niniejsze opracowanie dostarczyło nowych informacji dotyczących różnic molekularnych pomiędzy gwiazdzikami włosowatokomórkowymi o odmiennym umiejscowieniu, uznawanymi dotychczas za biologicznie homogenną grupę (tabela 13). Jest to pierwsze opracowanie, którego efektem jest wyselekcjonowanie transkryptów charakterystycznych dla każdej z trzech najczęstszych przestrzeni anatomicznych zajmowanych przez ten nowotwór, i stanowi dopełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej biologii gwiazdzików włosowatokomórkowych wieku dziecięcego. Poczynione obserwacje pozwalają przypuszczać, że głównym elementem wpływającym na genomową różnorodność tego nowotworu są komórki progenitorowe będące jego źródłem. Komórki prekursorowe gwiazdziaka włosowatokomórkowego nie zostały dotąd zdefiniowane, a uzyskiwane wyniki przemawiają za obecnością wielu ich rodzajów, będących głównie pochodną okolicy mózgowia, w której doszło do rozwoju nowotworu. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że podobne obserwacje poczyniono dotychczas dla grupy nowotworów wywodzących się z gleju wyściółkowego. Obraz histologiczny wyściółczaków, podobnie jak analizowanych tu gwiazdzików włosowatokomórkowych, niezależnie od zajętego obszaru jest identyczny. Na tej podstawie zakładano jednakowe podłoże biologiczne tych zmian.




	Półkula mózgu	Drogi wzrokowe i podwzgórze	Mózdżek i komora IV
Umiejscowienie nowotworu			
Rodzina genów	FOXO	LHX SIX	IRX POU
Szlak sygnałowy	TLR	PI3/AKT MAPK TGFB	
			PTEN
MicroRNA	miR-299-3p		miR-486 miR-324-5p

Tabela 13. Zestawienie charakterystycznych zmian molekularnych związanych z gwiazdziakami włosatokomórkowymi o różnym umiejscowieniu

Jednak dla wyściółczaków umiejscowionych nadnamiotowo, podnamiotowo i tych umiejscowionych w kanale kręgowym wykazano obecność specyficznych zmian genomowych związanych głównie z zaburzeniami w funkcjonowaniu genów regulujących dojrzewanie i proliferację neuralnych komórek prekursorowych<sup>(100,142-144,159,161-164)</sup>.

#### **PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ODNIESIENIU DO OBRAZU RADIOLOGICZNO-MORFOLOGICZNEGO GWIAZDZIAKÓW WŁOSATOKOMÓRKOWYCH**

Badania przeprowadzone w trakcie realizacji niniejszej pracy są pierwszą tego typu analizą dotyczącą porównania obrazu radiologiczno-morfologicznego gwiazdziazków włosatokomórkowych z profilem ekspresji genów. Uzyskane wyniki wskazywały na obecność dyskretnych zmian w ekspresji niewielkiej liczby sond. Zmiany te cechowały się niską amplitudą zmienności i granicznymi wartościami znamienności statystycznej, co nie pozwoliło na identyfikację wiarygodnych czynników molekularnych związanych z cechami gwiazdziazków włosatokomórkowych stwierdzanymi w badaniach obrazowych.

W bieżącym piśmiennictwie można znaleźć publikacje, w których analizowano związek pomiędzy przedoperacyjnym obrazem radiologicznym a cechami molekularnymi ocenianymi na podstawie analizy pobranego śródoperacyjnie materiału tkankowego w innych nowotworach OUN. Zależności takie opisywano przede wszystkim dla skąpodrzewiaków z utratą materiału genetycznego na chromosomach 1p i 19q i dla glioblastoma ze zmianami aktywności genów *TP53* i *MGMT*. Obserwacje te dotyczyły zatem nowotworów posiadających wzór zmian molekularnych o znaczącym wpływie na przebieg

kliniczny choroby, będący między innymi pochodną tempa wzrostu guza.

Obecność tego typu zależności rodzi pytanie, czy i w jakim stopniu konkretne zmiany genomowe mają wpływ na cechy radiologiczno-morfologiczne nowotworów.

Dotychczasowe analizy cech radiologicznych gwiazdziazków włosatokomórkowych wskazują raczej na związek typu wzrostu nowotworu z zajmowaną przestrzenią anatomiczną. Poparciem tego rodzaju założeń mogą być obserwacje potwierdzające częstsze występowanie gwiazdziazków włosatokomórkowych pod postacią zmiany litej w obrębie pnia mózgu oraz rzadkie występowanie elementów torbielowatych w nowotworach zajmujących okolicę skrzyżowania dróg wzrokowych<sup>(102,104,106-108,165)</sup>.

Z tego względu, jak również z powodu zaobserwowanych w niniejszych badaniach znaczących zmian w ekspresji genów w odniesieniu do lokalizacji badanych nowotworów, zaplanowaną analizę poszerzono o ocenę ekspresji genów gwiazdziazków włosatokomórkowych o zróżnicowanych cechach radiologicznych zlokalizowanych podnamiotowo. Głównym celem zastosowanego podejścia było zlikwidowanie potencjalnego wpływu lokalizacji guza na jego wzór ekspresji. W podgrupie tej nie zaobserwowano jednak istotnych zmian. Różnice nie były także widoczne po porównaniu dwóch grup: nowotworów z przeważającą częścią torbielowatą i tych z przeważającą częścią litą.

Poczynione obserwacje pozwalają przypuszczać, że potwierdzenie zależności pomiędzy profilem molekularnym a obrazem radiologiczno-morfologicznym w przypadku nowotworów o niskim stopniu złośliwości, w oparciu o ocenę całościowego profilu ekspresji genów, może okazać się niemożliwe. Być może odpowiednim postępowaniem i właściwą kontynuacją tego typu badań powinna być analiza porównawcza kilku



fragmentów tego samego nowotworu reagujących różnie na podanie środków cieniujących, tak jak to próbowano robić w *glioblastoma*<sup>(120)</sup>. Uzyskane wyniki są zatem w dużym stopniu pochodną braku charakterystycznych zmian molekularnych występujących wcześniej w procesie ewolucji nowotworu i mogących odcisnąć piętno na jego morfologii. Obserwacja taka nie niepokoi zwłaszcza w świetle niejednoznacznych wyników dotyczących tego typu zależności obserwowanych w skąpodrzewiakach czy *glioblastoma*.

Jednocześnie należy podkreślić, że zaobserwowane w niniejszej pracy charakterystyczne wzory ekspresji genów związane z lokalizacją badanych nowotworów mogą sugerować przeważający wpływ na ich cechy radiologiczno-morfologiczne wzoru molekularnego komórek będących źródłem ich pochodzenia w poszczególnych obszarach anatomicznych.

### **PROFIL EKSPRESJI GENÓW W ODNIESIENIU DO PRZEBIEGU CHOROBY NOWOTWOROWEJ**

Przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy analizy nie wykazały zależności pomiędzy całkowitym profilem ekspresji genów a przebiegiem klinicznym choroby u dzieci z gwiaździkiem włosowatokomórkowym. Dla genów, które w analizach przeprowadzonych w oparciu o model jednozmiennowy, uzyskały graniczną istotność statystyczną, w analizach z użyciem testu globalnego nie wykazano znamiennej zależności z aktywnością procesu chorobowego czy też obecnością nerwiakowłóknikowości typu I. Całkowity profil ekspresji nie miał również wpływu na stworzenie ewentualnych podgrup w grupowaniu hierarchicznym.

Pierwsze skromne informacje dotyczące związku pomiędzy całkowitym profilem ekspresji genów a rokowaniem przedstawili Rickman i wsp. w oparciu o analizę porównawczą uwzględniającą 19 przypadków gwiaździka włosowatokomórkowego, 5 przypadków gwiaździka o II stopniu złośliwości histologicznej i 21 przypadków *glioblastoma*. Powołując się na tę pracę, należy podkreślić, że obecnie, gdy zróżnicowanie molekularne w obrębie tych samych jednostek histopatologicznych stało się oczywiste, unika się wspólnych analiz tak złożonych morfologicznie grup nowotworów OUN<sup>(97)</sup>.

W powyższej analizie autorzy skupili się przede wszystkim na identyfikacji genów różnicujących gwiaździki o poszczególnych stopniach złośliwości i wytypowali 167 genów o wyższych poziomach ekspresji w *glioblastoma* niż w gwiaździku włosowatokomórkowym oraz 193 geny, których ekspresja była znamienne niższa w *glioblastoma*. W manuskrypcie tym zawarto także ciekawą dla niniejszej dyskusji obserwację sugerującą możliwość identyfikacji genów związanych ze złośliwą transformacją gwiaździka włosowatokomórkowego w oparciu o profilowanie genomowe. Jeden z uwzględnionych w opracowaniu nowotworów tego typu, w wyniku grupowania hierarchicznego, znalazł się w podgrupie z *glioblastoma*. Przypadek ten charakteryzowały wysoka, w porównaniu z pozostałymi gwiaździkami włosowatokomórkowymi, ekspresja genu i białka FLN1 oraz obecność cech morfologicznych typowych dla gwiaździków o wyższych stopniach złośliwości. Zgodnie

z sugestią autorów pracy wytłumaczeniem takiej molekularnej mimikry może być obecność wśród gwiaździków włosowatokomórkowych nielicznych przypadków ulegających przemianie w kierunku nowotworów o wyższych stopniach złośliwości. Jednak pewien cień na słuszność zaproponowanego wnioskowania rzuca brak prezentacji danych klinicznych dotyczących dalszego przebiegu choroby. Zastanawiające jest również całkowite pominięcie przez autorów obecności kilku przypadków *glioblastoma* w obrębie klastra zawierającego gwiaździki włosowatokomórkowe.

Zmian dotyczących ekspresji genu *FLN1* nie odnotowano wśród nowotworów uwzględnionych w analizach będących celem niniejszej pracy. Nie były one również przedmiotem pozostałych opublikowanych dotychczas doniesień opisujących profil ekspresji gwiaździków włosowatokomórkowych. Najbardziej prawdopodobne jest, że przypadek, który zwrócił uwagę zespołu Davida Rickmana, na podstawie opisanych cech histopatologicznych i immunoreaktywności wobec białka FLN1 powinien zostać zaliczony do gwiaździków o wyższym stopniu złośliwości.

Pracą, której wyniki sugerowały możliwość identyfikacji genów odpowiedzialnych za przebieg kliniczny choroby u dzieci z gwiaździkami włosowatokomórkowymi w oparciu o profilowanie genomowe, jest doniesienie Wonga i wsp.<sup>(98)</sup> Opracowanie obejmuje 21 nowotworów o histologicznie potwierdzonym fenotypie gwiaździka włosowatokomórkowego, w większości zlokalizowanych podnamiotowo (19 przypadków).

Autorzy na podstawie grupowania hierarchicznego wykazali obecność dwóch podgrup gwiaździków włosowatokomórkowych o odmiennym profilu genetycznym. W jednej z nich znalazły się dwa przypadki związane z progresją procesu chorobowego, do której doszło po niecałkowitej resekcji chirurgicznej nowotworu. Na tej podstawie zespół zasugerował zależność pomiędzy profilem ekspresji wybranych genów a przebiegiem klinicznym choroby. W grupie o niekorzystnym rokowaniu zmiany ekspresji dotyczyły genów: *FN1*, *POSTN*, *LAMB1*, *IL8*, *MBP*, *ARHE*, *COL9A1*, *LOXL2*, *CDH5*, *ESM1*, *SOCS3*, *IGFBP3*, *PTGS2*, *CTGF*, *PLP1* i *VEGF*, których produkty były zaangażowane głównie w procesy związane ze wzrostem i adhezją komórek oraz neoangiogenezą.

Nie można wykluczyć, że na uzyskane przez Wonga i wsp. wyniki miało wpływ uwzględnienie w powyższej analizie jednego gwiaździka pilomyksoidnego, w którym obserwowano cechy progresji po subtotalnej resekcji. W wyniku grupowania hierarchicznego nowotwór ten został przyporządkowany do grupy nowotworów charakteryzujących się tendencją do obecności choroby nawrotowej i miał prawdopodobnie istotny wpływ na uzyskane wyniki<sup>(6,98)</sup>.

W niniejszej pracy nie odnotowano znaczących odchyleń w ekspresji genów mających różnicować gwiaździki włosowatokomórkowe o odmiennym rokowaniu, na które zwrócili uwagę autorzy powyższej pracy. Z kolei na liście genów wpływających na zróżnicowanie całkowitego profilu ekspresji znalazł się gen *LOXL1*, należący do rodziny genów kodujących oksydazy lizylowe (ang. *lysyl oxidase*, *LOX*), których przedstawiciel *LOXL2* znajdował się wśród genów wyselekcjonowanych przez zespół

Wonga i wsp. Geny z tej rodziny odgrywają znaczącą rolę w procesach związanych z rozwojem i starzeniem się organizmu. Proenzymy będące produktami genów należących do rodziny LOX (*LOXL1-LOXL4*) wpływają na aktywność enzymów odpowiedzialnych za produkcję i dojrzewanie kolagenu i elastyny, tym samym są zaangażowane w procesy tworzenia macierzy pozakomórkowej i adhezji komórek. *LOXL1* ulega ekspresji przede wszystkim w tkankach narządu wzroku (z wyjątkiem siatkówki), a obecność polimorfizmów w genie wiąże się z występowaniem zespołu ekfoliacji obarczonego podwyższonym ryzykiem rozwinięcia się jaskry i/lub zaćmy. Ekspresję genu *LOXL2* stwierdza się w większości tkanek organizmu człowieka. Nadmierną ekspresję mRNA genu wykazano również w wielu guzach litych. Białko *LOXL2* przypisuje się funkcję aktywatora przekazywania sygnałów za pośrednictwem TGF- $\beta$ . W warunkach hipoksji ekspresja genu podlega regulacji przez czynnik indukowany hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor*, HIF). W nowotworach głowy i szyi oraz gruczołu piersiowego opisano związek nadekspresji białek LOX z gorszym rokowaniem oraz tendencją do tworzenia ognisk przerzutowych<sup>(166-168)</sup>.

Zaobserwowane w niniejszym opracowaniu różnice w ekspresji genu *LOXL1* dotyczyły głównie zróżnicowania poziomu transkryptu pomiędzy nowotworami umiejscowionymi w obrębie dróg wzrokowych i nowotworami rozwijającymi się podnamiotowo. Nieznacznie podwyższoną ekspresję mRNA w gwiaździakach włosowatokomórkowych dróg wzrokowych należy zinterpretować jako fizjologiczną i swoistą ekspresję genu w tym obszarze anatomicznym.

Kolejne opisane dotychczas potencjalne molekularne markery rokownicze związane z przebiegiem choroby nowotworowej u chorych z gwiaździakiem włosowatokomórkowym, pomimo że były wyselekcjonowane w oparciu o wyniki badań mikromacierzowych, nie wykazywały silnej korelacji z całkowitym profilem ekspresji genów. W doniesieniach Sharmy i wsp. oraz Rodrigueza i wsp. zasugerowano znaczenie prognostyczne genów *MATN2* i *ALDH1L1*. Przedstawione tam wyniki były efektem analiz ekspresji genów prowadzonych na tej samej grupie 41 gwiaździaków włosowatokomórkowych występujących sporadycznie bądź w przebiegu NF1, których wyniki dotyczące całkowitego profilu ekspresji przedstawili jako pierwszy Gutmann i wsp.<sup>(99,128,169)</sup>

Gen *MATN2* został wyodrębniony jako transkrypt charakteryzujący się nadmierną ekspresją na podstawie wyników uzyskanych w trakcie analizy wykorzystującej mikromacierz HGU95A (Affymetrix). Poziomy ekspresji genu w tkankach nowotworowych porównywano z ekspresją genów w istocie białej mózgu oraz prawidłowymi astrocytami pozyskanymi komercyjnie<sup>(128,169)</sup>. Białko *MATN2* wchodzi w skład rodziny czterech niekolagenowych białek zawierających domeny A dla czynnika von Willebranda oraz naskórkowego czynnika wzrostu. Białkom tym przypisuje się udział w indukowaniu patologicznych reakcji immunologicznych i zapalnych związanych z wytwarzaniem autoreaktywnych przeciwciał. Mają one być również zaangażowane we wzrost komórek i kancerogenezę. Matrilina-2 ulega ekspresji już we wczesnych okresach embriogenezy, jak również w dojrzałym organizmie,

gdzie w wielu tkankach i narządach jest nieodłącznym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej<sup>(170,171)</sup>. W opracowaniu Sharmy i wsp. podwyższone poziomy genu i białka obecne były w gwiaździakach włosowatokomórkowych występujących sporadycznie, charakteryzujących się gorszym przebiegiem klinicznym oraz w nowotworach nawrotowych. Zmiana ta nie dotyczyła guzów występujących w przebiegu NF1, nie miała związku z płcią i wiekiem chorych, natomiast częściej była obserwowana w nowotworach położonych nadnamiotowo. Zmianom ekspresji nie ulegały inne analizowane przez zespół geny z tej rodziny (*MATN1*, *MATN3*). Autorzy podkreślili także fakt, że zmiany dotyczące *MATN2* są charakterystyczne dla tego typu histologicznego nowotworu; odchyłeń w ekspresji genu nie stwierdzili bowiem w guzach o wyższych stopniach złośliwości (*glioblastoma*).

Uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy dane nie potwierdziły obecności odchyłeń w ekspresji genów z rodziny *MATN*. Taki wynik może być efektem zastosowania odmiennych założeń będących podstawą zastosowanej analizy statystycznej. W pracy Sharmy i wsp. ekspresję genów w badanych gwiaździakach włosowatokomórkowych porównywano do istoty białej mózgu i prawidłowych astrocytów, rozumianych jako tkanki prawidłowe. W prezentowanych tu wynikach analizie porównawczej poddano całkowite profile ekspresji w dwóch grupach nowotworów o odmiennym przebiegu klinicznym. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że opisywana przez autorów cytowanego tu manuskryptu wartość *MATN2* jako molekularnego czynnika ryzyka nie została dotąd potwierdzona przez żaden inny zespół badawczy. Z kolei najbardziej zastanawiający jest fakt, że w kolejnej publikacji, opisującej wyniki analizy tej samej grupy gwiaździaków włosowatokomórkowych, zespół autorów, również pod kierownictwem Sharmy i wsp., nie wykazał związku pomiędzy profilem ekspresji genów a rokowaniem. Najwłaściwszym wytłumaczeniem podobnych rozbieżności może być funkcja, jaką tego typu geny pełnią w komórce. Zarówno geny z rodziny *MATN*, jak i opisywane powyżej geny *LOXL* kodują białka będące składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, której przypisuje się istotną rolę w promocji onkogenezy. Aktywność tego typu białek sprzyja tworzeniu specyficznej niszy dla komórek nowotworowych, będąc dla nich z jednej strony konieczną podporą, z drugiej zaś źródłem pozytywnych czynników indukujących wzrost i różnicowanie. Rozbieżności dotyczące ich aktywności są zatem pochodną miejsca, jakie owe zmiany, nieposiadające kluczowych funkcji onkogennych i/lub supresorowych, zajmują w onkogenezie gwiaździaków włosowatokomórkowych. Zmiany w obrębie tego rodzaju genów należy zatem rozumieć jako serię towarzyszących nieswoistych zmian w obrębie genomu, które nie noszą znamion alteracji powtarzalnych, możliwych do wykorzystania w praktyce klinicznej.

Podobny problem dotyczy kolejnego potencjalnego prognostycznego markera molekularnego – genu *ALDH1L1*. Przeprowadzona przez zespół Rodrigueza i wsp. w oparciu o nowszą wersję macierzy HG U133plus 2.0 (Affymetrix) ponowna analiza grupy chorych opisanych przez Sharmę i wsp., wzbogacana o kolejnych sześć przypadków, nie wykazała znamienych

odchyleń na poziomie ekspresji genów pomiędzy nowotworami o odmiennym rokowaniu ocenionym w oparciu o grupowanie hierarchiczne. Niemniej jednak autorzy na podstawie szczegółowej analizy poziomu transkryptów wyróżnili geny, których ekspresja była znacząco obniżona w podgrupie siedmiu nowotworów o agresywnym przebiegu klinicznym: *ALDH1L1*, *CDGAP* i *SOX8*. Badania przy użyciu QRT-PCR przeprowadzone na niezależnej grupie guzów (5 gwiazdziałków włosowatokomórkowych o agresywnym przebiegu, 5 gwiazdziałków włosowatokomórkowych o typowym przebiegu, 4 przypadki ksenograftów z *glioblastoma*) wykazały jedynie stopniowe obniżanie się ekspresji *ALDH1L1* wraz ze wzrostem złośliwości guza, bez znamienych statystycznie różnic pomiędzy gwiazdziałkami włosowatokomórkowymi o odmiennym przebiegu klinicznym.

*ALDH1L1* to duże białko cytozolowe, które poprzez wpływ na przemiany enzymatyczne folianów i biosyntezę puryn związane jest z podstawowymi procesami metabolicznymi komórki. Na podstawie poczynionych dotychczas obserwacji opisujących niskie poziomy białka w wybranych schorzeniach nie ustalono jednak, czy jego zmiany ilościowe są przyczyną czy też skutkiem nadmiernej proliferacji komórek. I chociaż dokładna rola białka w OUN nie została wyjaśniona, podkreślano jego możliwy udział w procesach rozwojowych mózgowia oraz potencjalną możliwość jego wykorzystania jako specyficznego markera astrocytów<sup>(14,172,173)</sup>.

Wśród genów wyselekcjonowanych na podstawie oceny całkowitego profilu ekspresji analizowanych w niniejszej pracy gwiazdziałków włosowatokomórkowych znalazły się trzy geny z rodziny dehydrogenaz aldehydowych [ang. *aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily*]: *ALDH1A2*, *ALDH5A1* i *ALDH6A1*. Geny te po porównaniu podgrup o odmiennym przebiegu klinicznym nie osiągnęły istotnych statystycznie odchyleń w ekspresji. Pierwszy z nich odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie retinoidów na wczesnych etapach embriogenezy. U myszy transgenicznym, pozbawionych prawidłowej kopii genu, obserwowano skłonność do nieprawidłowego rozwoju przodomózgowia, sugerowano także możliwy związek pomiędzy obecnością polimorfizmów w genie a występowaniem wad cewy nerwowej. Obniżona ekspresja genu, obserwowana w nowotworach gruczołu krokowego, sugeruje jego funkcję supresorową<sup>(174-176)</sup>.

Gen *ALDH5A1* koduje enzym mitochondrialny zaangażowany w katabolizm kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Obniżone poziomy białka lub powstające w wyniku mutacji jego formy niefunkcjonalne są przyczyną akumulacji tego neuroprzekaźnika, co jest związane z występowaniem zaburzeń neurologicznych, takich jak: ataksja, opóźnienie psychomotoryczne i napady padaczkowe<sup>(177,178)</sup>. Ostatni ze wspomnianych genów z rodziny ALDH, *ALDH6A1*, również koduje enzym mitochondrialny odpowiedzialny za reakcje katalityczne malonianów, a zmiany w jego aktywności wiąże się z zaburzeniami rozwojowymi<sup>(179)</sup>. Istotne informacje dotyczą również genu *ALDH1A1*, którego produkt odpowiada za wewnątrzkomórkową oksydację aldehydów. Jego wysoką aktywność wykazano w nowotworowych neuralnych

i hematopoetycznych komórkach macierzystych. Sugeruje się także rolę genu w transformacji nowotworowej oraz jego związek z lekoopornością<sup>(180-183)</sup>.

Obecność wyżej wymienionych genów wśród transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w badanych tu gwiazdziałkach włosowatokomórkowych sugeruje konieczność wzięcia ich pod uwagę także jako potencjalnie istotnych elementów biologii tego nowotworu. Analiza znaczenia zmian molekularnych w genach uczestniczących w procesach metabolizmu podstawowego dostarczyć może nowych informacji dotyczących onkogenezy tego nowotworu, jednak możliwość ich wykorzystania w praktyce klinicznej jest wątpliwa. W najświeższym opracowaniu tego rodzaju Potter i wsp. nie wykazali różnic pomiędzy nowotworami o odmiennym rokowaniu, chociaż zastrzegli, że poczyniona przez nich negatywa obserwacja wymaga potwierdzenia na większej grupie przypadków<sup>(58)</sup>.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę mikromacierzową 50 przypadków gwiazdziałków włosowatokomórkowych, z których 5 było związanych z niekorzystnym przebiegiem klinicznym. Otrzymane wyniki wykluczyły możliwość wyróżnienia wiarygodnych molekularnych czynników ryzyka dla tego nowotworu, co prawdopodobnie wiąże się z jego generalnie łagodnym przebiegiem. I jakkolwiek wznowy guza w miejscu jego pierwotnej lokalizacji się zdarzają, to jego złośliwa transformacja jest niezwykle rzadka. Poparciem tego wniosku jest również brak dowodów na kliniczną użyteczność opisanych dotychczas molekularnych markerów prognostycznych (*MATN2*, *ALDH1L1*) i brak powtarzalności powyższych obserwacji w kolejnych opracowaniach opierających się na analizach ekspresji genów<sup>(128,100)</sup>.

## WNIOSKI

Wnioski wynikające z przeprowadzenia niniejszych badań przedstawiają się następująco:

1. Gwiazdziałki włosowatokomórkowe zlokalizowane w trzech analizowanych umiejscowieniach w obrębie mózgowia posiadają charakterystyczny profil ekspresji genów, możliwy do oceny przy użyciu mikromacierzy o wysokiej gęstości.
2. Różnice w ekspresji genów pomiędzy badanymi nowotworami są pochodną ich złożonego podłoża molekularnego i sugerują zróżnicowane pochodzenie komórkowe gwiazdziałków włosowatokomórkowych.
3. Analizowane cechy radiologiczno-morfologiczne nie wykazują związku z całkowitym profilem ekspresji genów.
4. W badanej grupie chorych przebieg kliniczny choroby nie jest związany z całkowitym profilem ekspresji genów i wskazuje na trudności w poszukiwaniu molekularnych czynników ryzyka w tym typie nowotworów w oparciu o metody oceny ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy.

## PODZIĘKOWANIA

Panu prof. dr. n. med. Pawłowi P. Liberskiemu, Kierownikowi Zakładu Patologii Molekularnej i Neuropatologii UM w Łodzi, serdecznie dziękuję za życzliwość i cenne wskazówki.

## PIŚMIENNICTWO:

## BIBLIOGRAPHY:

1. Pomeroy S.L., Tamayo P., Gaasenbeek M. i wsp.: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002; 415: 436-442.
2. Eszlinger M., Wiench M., Jarzab B. i wsp.: Meta- and reanalysis of gene expression profiles of hot and cold thyroid nodules and papillary thyroid carcinoma for gene groups. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 1934-1942.
3. Stępnik P., Handschuh L., Figlerowicz M.: Mikromacierz DNA – analiza danych. *Biotechnologia* 2008; 4: 68-87.
4. Turkheimer F.E., Roncaroli F., Henny B. i wsp.: Chromosomal patterns of gene expression from microarray data: methodology, validation and clinical relevance in gliomas. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 526.
5. Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M.: Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej. *Biotechnologia* 2008; 4: 39-53.
6. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (red.): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2007.
7. Burger P.C., Scheithauer B.W.: Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Central Nervous System. 3<sup>rd</sup> series. Armed Forces Institute of Pathology, Bethesda 1994.
8. Liberski P.P., Kozubski W., Biernat W., Kordek R. (red.): Neuroonkologia kliniczna. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin 2011.
9. Otero-Rodríguez A., Sarabia-Herrero R., García-Tejero M., Zamora-Martínez T.: Spontaneous malignant transformation of a supratentorial pilocytic astrocytoma. *Neurochirurgia (Austr.)* 2010; 21: 245-252.
10. Parsa C.F., Givrad S.: Pilocytic astrocytomas as hamartomas: implications for treatment. *Br. J. Ophthalmol.* 2008; 92: 3-6.
11. Payton J.E., Schmidt J., Yu J. i wsp.: Genome-wide polymorphism analysis demonstrates a monoclonal origin of pilocytic astrocytoma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2011; 37: 321-325.
12. Figarella-Branger D., Daniel L., André P. i wsp.: The PEN5 epitope identifies an oligodendrocyte precursor cell population and pilocytic astrocytomas. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1261-1269.
13. Landry C.F., Verity M.A., Cherman L. i wsp.: Expression of oligodendrocytic mRNAs in glial tumors: changes associated with tumor grade and extent of neoplastic infiltration. *Cancer Res.* 1997; 57: 4098-4104.
14. Takei H., Yogeswaren S.T., Wong K.K. i wsp.: Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. *J. Neurooncol.* 2008; 86: 183-190.
15. Tchoghandjian A., Fernandez C., Colin C. i wsp.: Pilocytic astrocytoma of the optic pathway: a tumour deriving from radial glia cells with a specific gene signature. *Brain* 2009; 132: 1523-1535.
16. Cheng Y.C., Lee C.J., Badge R.M. i wsp.: *Sox8* gene expression identifies immature glial cells in developing cerebellum and cerebellar tumours. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001; 92: 193-200.
17. Eiraku M., Tohgo A., Ono K. i wsp.: DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 873-880.
18. Bellil S., Limaïem F., Mahfoudhi H. i wsp.: Descriptive epidemiology of childhood central nervous system tumours in Tunisia. Experience of a single institution over a 15-year period (1990-2004). *Pediatr. Neurosurg.* 2008; 44: 382-387.
19. Larjavaara S., Mäntylä R., Salminen T. i wsp.: Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol.* 2007; 9: 319-325.
20. Schmidt L.S., Schmiegelow K., Lahteenmaki P. i wsp.: Incidence of childhood central nervous system tumors in the Nordic countries. *Pediatr. Blood Cancer.* 2011; 56: 65-69.
21. Ahn Y., Cho B.K., Kim S.K. i wsp.: Optic pathway glioma: outcome and prognostic factors in a surgical series. *Childs Nerv. Syst.* 2006; 22: 1136-1142.
22. Burkhard C., Di Patre P.L., Schüller D. i wsp.: A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J. Neurosurg.* 2003; 98: 1170-1174.
23. Crabtree K.L., Arnold P.M.: Spinal seeding of a pilocytic astrocytoma in an adult, initially diagnosed 18 years previously. *Pediatr. Neurosurg.* 2010; 46: 66-70.
24. Czyżyk E., Józwiak S., Roszkowski M., Schwartz R.A.: Optic pathway gliomas in children with and without neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* 2003; 18: 471-478.
25. Makino K., Nakamura H., Yano S., Kuratsu J.: Population-based epidemiological study of primary intracranial tumors in childhood. *Childs Nerv. Syst.* 2010; 26: 1029-1034.
26. Ohgaki H., Kleihues P.: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64: 479-489.
27. Roonprapunt C., Abbott R.: Surgical treatment of brainstem gliomas in children. *Neurosurgery Quarterly* 2002; 12: 160-170.
28. Piccirilli M., Lenzi J., Delfinis C. i wsp.: Spontaneous regression of optic pathways gliomas in three patients with neurofibromatosis type I and critical review of the literature. *Childs Nerv. Syst.* 2006; 22: 1332-1337.
29. Rozen W.M., Joseph S., Lo P.A.: Spontaneous regression of low-grade gliomas in pediatric patients without neurofibromatosis. *Pediatr. Neurosurg.* 2008; 44: 324-328.
30. Dunn I.F., Agarwalla P.K., Papanastassiou A.M. i wsp.: Multiple pilocytic astrocytomas of the cerebellum in a 17-year-old patient with neurofibromatosis type I. *Childs Nerv. Syst.* 2007; 23: 1191-1194.
31. Tada K., Kochi M., Saya H. i wsp.: Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol.* 2003; 5: 228-234.
32. Schuettpeiz L.G., McDonald S., Whitesell K. i wsp.: Pilocytic astrocytoma in a child with Noonan syndrome. *Pediatr. Blood Cancer* 2009; 53: 1147-1149.
33. Subbiah V., Huff V., Wolff J.E. i wsp.: Bilateral gonadoblastoma with dysgerminoma and pilocytic astrocytoma with *WT1* GT-IVS9 mutation: a 46 XY phenotypic female with Frasier syndrome. *Pediatr. Blood Cancer* 2009; 53: 1349-1351.
34. Zakrzewski K., Fiks T., Liberski P.P. i wsp.: Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego u dzieci i młodzieży. *Pediatr. Pol.* 2005; 80: 17-22.
35. Bowers D.C., Krause T.P., Aronson L.J. i wsp.: Second surgery for recurrent pilocytic astrocytoma in children. *Pediatr. Neurosurg.* 2001; 34: 229-234.
36. Fisher P.G., Tihan T., Goldthwaite P.T. i wsp.: Outcome analysis of childhood low-grade astrocytomas. *Pediatr. Blood Cancer* 2008; 51: 245-250.
37. Komotar R.J., Burger P.C., Carson B.S. i wsp.: Pilocytic and pilomyxoid hypothalamic/chiasmatic astrocytomas. *Neurosurgery* 2004; 54: 72-80.
38. Dirks P.B., Jay V., Becker L.E. i wsp.: Development of anaplastic changes in low-grade astrocytomas of childhood. *Neurosurgery* 1994; 34: 68-78.
39. Krieger M.D., Gonzalez-Gomez I., Levy M.L., McComb J.G.: Recurrence patterns and anaplastic change in a long-term study of pilocytic astrocytomas. *Pediatr. Neurosurg.* 1997; 27: 1-11.
40. Jeon Y.K., Cheon J.E., Kim S.K. i wsp.: Clinicopathological features and global genomic copy number alterations of pilomyxoid astrocytoma in the hypothalamus/optic pathway: comparative analysis with pilocytic astrocytoma using array-based comparative genomic hybridization. *Mod. Pathol.* 2008; 21: 1345-1356.
41. Jones D.T., Ichimura K., Liu L. i wsp.: Genomic analysis of pilocytic astrocytomas at 0.97 Mb resolution shows an increasing tendency toward chromosomal copy number

- change with age. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 1049-1058.
42. Roberts P., Chumas P.D., Picton S. i wsp.: A review of the cytogenetics of 58 pediatric brain tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2001; 131: 1-12.
  43. Sanoudou D., Tingby O., Ferguson-Smith M.A. i wsp.: Analysis of pilocytic astrocytoma by comparative genomic hybridization. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 1218-1222.
  44. Zattara-Cannoni H., Gambarelli D., Lena G. i wsp.: Are juvenile pilocytic astrocytomas benign tumors? A cytogenetic study in 24 cases. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1998; 104: 157-160.
  45. Kimmel D.W., O'Fallon J.R., Scheithauer B.W. i wsp.: Prognostic value of cytogenetic analysis in human cerebral astrocytomas. *Ann. Neurol.* 1992; 31: 534-542.
  46. Orr L.C., Fleitz J., McGavran L. i wsp.: Cytogenetics in pediatric low-grade astrocytomas. *Med. Pediatr. Oncol.* 2002; 38: 173-177.
  47. Pfister S., Janzarik W.G., Remke M. i wsp.: *BRAF* gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 1739-1749.
  48. Sievert A.J., Jackson E.M., Gai X. i wsp.: Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel *BRAF* fusion gene. *Brain Pathol.* 2009; 19: 449-458.
  49. Bar E.E., Lin A., Tihan T. i wsp.: Frequent gains at chromosome 7q34 involving *BRAF* in pilocytic astrocytoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67: 878-887.
  50. Forsshew T., Tatevossian R.G., Lawson A.R. i wsp.: Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J. Pathol.* 2009; 218: 172-181.
  51. Jones D.T., Kocialkowski S., Liu L. i wsp.: Tandem duplication producing a novel oncogenic *BRAF* fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008; 68: 8673-8677.
  52. Jones D.T., Kocialkowski S., Liu L. i wsp.: Oncogenic *RAF1* rearrangement and a novel *BRAF* mutation as alternatives to *KIAA1549:BRAF* fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 2009; 28: 2119-2123.
  53. Eisenhardt A.E., Olbrich H., Röring M. i wsp.: Functional characterization of a *BRAF* insertion mutant associated with pilocytic astrocytoma. *Int. J. Cancer* 2011; 129: 2297-2303.
  54. Korshunov A., Meyer J., Capper D. i wsp.: Combined molecular analysis of *BRAF* and *IDH1* distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 401-405.
  55. Jacob K., Albrecht S., Sollier C. i wsp.: Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br. J. Cancer* 2009; 101: 722-733.
  56. Tatevossian R.G., Lawson A.R., Forsshew T. i wsp.: MAPK pathway activation and the origins of pediatric low-grade astrocytomas. *J. Cell. Physiol.* 2010; 222: 509-514.
  57. Janzarik W.G., Kratz C.P., Loges N.T. i wsp.: Further evidence for a somatic *KRAS* mutation in a pilocytic astrocytoma. *Neuropediatrics* 2007; 38: 61-63.
  58. Potter N., Karakoula A., Phipps K.P. i wsp.: Genomic deletions correlate with underexpression of novel candidate genes at six loci in pediatric pilocytic astrocytoma. *Neoplasia* 2008; 10: 757-772.
  59. Sharma M.K., Zehnbauser B.A., Watson M.A., Gutmann D.H.: RAS pathway activation and an oncogenic RAS mutation in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology* 2005; 65: 1335-1336.
  60. Huang H., Hara A., Homma T. i wsp.: Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64: 891-901.
  61. Addo-Yobo S.O., Straessle J., Anwar A. i wsp.: Paired over-expression of ErbB3 and Sox10 in pilocytic astrocytoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 769-775.
  62. Zeng N., Liu L., McCabe M.G. i wsp.: Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes reveals differential expression of the four *ERBB4* juxtamembrane region variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2009; 35: 353-366.
  63. Puputti M., Tynninen O., Pernilä P. i wsp.: Expression of KIT receptor tyrosine kinase in endothelial cells of juvenile brain tumors. *Brain Pathol.* 2010; 20: 763-770.
  64. Ball D.W., Jin N., Rosen D.M. i wsp.: Selective growth inhibition in *BRAF* mutant thyroid cancer by the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 4712-4718.
  65. Shannon A.M., Telfer B.A., Smith P.D. i wsp.: The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) enhances the radiation responsiveness of lung and colorectal tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 6619-6629.
  66. Foreman N.K., Gore L., Wells D. i wsp.: Gefitinib is effective against juvenile pilocytic astrocytoma in vitro. *Pediatr. Blood Cancer* 2006; 47: 293-298.
  67. McLaughlin M.E., Robson C.D., Kieran M.W. i wsp.: Marked regression of metastatic pilocytic astrocytoma during treatment with imatinib mesylate (STI-571, Gleevec): a case report and laboratory investigation. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2003; 25: 644-648.
  68. Pollack I.F., Jakacki R.I., Blaney S.M. i wsp.: Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. *Neuro Oncol.* 2007; 9: 145-160.
  69. Qaddoumi I., Sultan I., Broniscer A.: Pediatric low-grade gliomas and the need for new options for therapy: why and how? *Cancer Biol. Ther.* 2009; 8: 4-10.
  70. Kolb E.A., Gorlick R., Houghton P.J. i wsp.: Initial testing (stage 1) of AZD6244 (ARRY-142886) by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr. Blood Cancer* 2010; 55: 668-677.
  71. Rush S.Z., Abel T.W., Valadez J.G. i wsp.: Activation of the Hedgehog pathway in pilocytic astrocytomas. *Neuro Oncol.* 2010; 12: 790-798.
  72. Pfister S.M., Korshunov A., Kool M. i wsp.: Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 553-566.
  73. Xenaki D., Martin I.B., Yoshida L. i wsp.: F3/contactin and TAG1 play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation. *Development* 2011; 138: 519-529.
  74. Riobo N.A., Lu K., Emerson C.P. Jr: Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell Cycle* 2006; 5: 1612-1615.
  75. Seto M., Ohta M., Asaoka Y. i wsp.: Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol. Carcinog.* 2009; 48: 703-712.
  76. Deshmukh H., Yeh T.H., Yu J. i wsp.: High-resolution, dual-platform aCGH analysis reveals frequent HIPK2 amplification and increased expression in pilocytic astrocytomas. *Oncogene* 2008; 27: 4745-4751.
  77. Di Stefano V., Blandino G., Sacchi A. i wsp.: HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene* 2004; 23: 5185-5192.
  78. Cheng Y., Pang J.C., Ng H.K. i wsp.: Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. *Histopathology* 2000; 37: 437-444.
  79. Broniscer A., Baker S.J., West A.N. i wsp.: Clinical and molecular characteristics of malignant transformation of low-grade glioma in children. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 682-689.

80. Facoetti A., Ranza E., Nano R.: Proliferation and programmed cell death: role of p53 protein in high and low grade astrocytoma. *Anticancer Res.* 2008; 28: 15-19.
81. Gottfried Y., Voldavsky E., Yodko L. i wsp.: Expression of the pro-apoptotic protein ARTS in astrocytic tumors: correlation with malignancy grade and survival rate. *Cancer* 2004; 101: 2614-2621.
82. Horbinski C., Hamilton R.L., Lovell C. i wsp.: Impact of morphology, MIB-1, p53 and *MGMT* on outcome in pilocytic astrocytomas. *Brain Pathol.* 2010; 20: 581-588.
83. Ishii N., Sawamura Y., Tada M. i wsp.: Absence of *p53* gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. *Int. J. Cancer* 1998; 76: 797-800.
84. Nakamizo A., Inamura T., Ikezaki K. i wsp.: Enhanced apoptosis in pilocytic astrocytoma: a comparative study of apoptosis and proliferation in astrocytic tumors. *J. Neurooncol.* 2002; 57: 105-114.
85. Patt S., Gries H., Giraldo M. i wsp.: p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Hum. Pathol.* 1996; 27: 586-589.
86. Rodriguez F.J., Scheithauer B.W., Burger P.C. i wsp.: Anaplasia in pilocytic astrocytoma predicts aggressive behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 34: 147-160.
87. Tibbetts K.M., Emmett R.J., Gao F. i wsp.: Histopathologic predictors of pilocytic astrocytoma event-free survival. *Acta Neuropathol.* 2009; 117: 657-665.
88. Duerr E.M., Rollbrocker B., Hayashi Y. i wsp.: *PTEN* mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 1998; 16: 2259-2264.
89. El Ayachi I., Baeza N., Fernandez C. i wsp.: KIAA0510, the 3'-untranslated region of the *tenascin-R* gene, and tenascin-R are overexpressed in pilocytic astrocytomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2010; 36: 399-410.
90. Tatevossian R.G., Tang B., Dalton J. i wsp.: MYB upregulation and genetic aberrations in a subset of pediatric low-grade gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 731-743.
91. Costello J.F., Plass C., Cavenee W.K.: Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas. *Brain Tumor Pathol.* 2000; 17: 49-56.
92. Gonzalez-Gomez P., Bello M.J., Lomas J. i wsp.: Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. *Int. J. Mol. Med.* 2003; 11: 655-660.
93. Lorente A., Mueller W., Urdangarin E. i wsp.: *RASSF1A*, *BLU*, *NORE1A*, *PTEN* and *MGMT* expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of *de novo DNMTs*. *Brain Pathol.* 2009; 19: 279-292.
94. Uhlmann K., Brinckmann A., Toliat M.R. i wsp.: Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 2002; 23: 4072-4079.
95. Uhlmann K., Rohde K., Zeller C. i wsp.: Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 52-59.
96. Vladimirova V., Mikeska T., Waha A. i wsp.: Aberrant methylation and reduced expression of LHX9 in malignant gliomas of childhood. *Neoplasia* 2009; 11: 700-711.
97. Rickman D.S., Bobek M.P., Misk D.E. i wsp.: Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 2001; 61: 6885-6891.
98. Wong K.K., Chang Y.M., Tsang Y.T. i wsp.: Expression analysis of juvenile pilocytic astrocytomas by oligonucleotide microarray reveals two potential subgroups. *Cancer Res.* 2005; 65: 76-84.
99. Sharma M.K., Watson M.A., Lyman M. i wsp.: Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. *Neurology* 2006; 66: 127-130.
100. Sharma M.K., Mansur D.B., Reifenberger G. i wsp.: Distinct genetic signatures among pilocytic astrocytomas relate to their brain region origin. *Cancer Res.* 2007; 67: 890-900.
101. Rorive S., Maris C., Debeir O. i wsp.: Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 794-807.
102. Koeller K.K., Rushing E.J.: From the archives of the AFIP: pilocytic astrocytoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2004; 24: 1693-1708.
103. Zakrzewski K.: Neuro-imaging for diagnosis of brain neoplasms in children. *Pol. J. Pathol.* 2001; 52: 213-229.
104. Pencanalet P., Maixner W., Sainte-Rose C. i wsp.: Benign cerebellar astrocytomas in children. *J. Neurosurg.* 1999; 90: 265-273.
105. Zakrzewski K., Fiks T., Polis L., Liberski P.P.: Posterior fossa tumours in children and adolescents. A clinicopathological study of 216 cases. *Folia Neuropathol.* 2003; 41: 251-252.
106. Fernandez C., Figarella-Branger D., Girard N. i wsp.: Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors – a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 2003; 53: 544-553.
107. Strong J.A., Hatten H.P. Jr, Brown M.T. i wsp.: Pilocytic astrocytoma: correlation between the initial imaging features and clinical aggressiveness. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1993; 161: 369-372.
108. Villarejo F., de Diego J.M., de la Riva A.G.: Prognosis of cerebellar astrocytomas in children. *Childs Nerv. Syst.* 2008; 24: 203-210.
109. Beni-Adani L., Gomori M., Spektor S., Constantini S.: Cyst wall enhancement in pilocytic astrocytoma: neoplastic or reactive phenomena. *Pediatr. Neurosurg.* 2000; 32: 234-239.
110. Dorward I.G., Luo J., Perry A. i wsp.: Postoperative imaging surveillance in pediatric pilocytic astrocytomas. *J. Neurosurg. Pediatr.* 2010; 6: 346-352.
111. Listernick R., Ferner R.E., Liu G.T., Gutmann D.H.: Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: controversies and recommendations. *Ann. Neurol.* 2007; 61: 189-198.
112. Megyesi J.F., Kachur E., Lee D.H. i wsp.: Imaging correlates of molecular signatures in oligodendrogliomas. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 4303-4306.
113. Jenkinson M.D., du Plessis D.G., Smith T.S. i wsp.: Histological growth patterns and genotype in oligodendroglial tumours: correlation with MRI features. *Brain* 2006; 129: 1884-1891.
114. Walker C., du Plessis D.G., Fildes D. i wsp.: Correlation of molecular genetics with molecular and morphological imaging in gliomas with an oligodendroglial component. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7182-7191.
115. Mut M., Turba U.C., Botella A.C. i wsp.: Neuroimaging characteristics in subgroup of GBMs with p53 overexpression. *J. Neuroimaging* 2007; 17: 168-174.
116. Warshawsky I., Shadrach B., Commene M. i wsp.: Correlation of TP53 immunohistochemistry with TP53 mutations on gliomas. *Mod. Pathol.* 2004; 17 (supl. 1): 320A.
117. Levner I., Drabycz S., Roldan G. i wsp.: Predicting *MGMT* methylation status of glioblastomas from MRI texture. *Med. Image Comput. Assist. Interv.* 2009; 12: 522-530.
118. Eoli M., Menghi F., Bruzzone M.G. i wsp.: Methylation of *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 2606-2613.
119. Maris C., Rorive S., Sandras F. i wsp.: Tenascin-C expression relates to clinicopathological features in pilocytic and diffuse astrocytomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008; 34: 316-329.
120. Pope W.B., Chen J.H., Dong J. i wsp.: Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* 2008; 249: 268-277.

121. Barajas R.F. Jr, Hodgson J.G., Chang J.S. i wsp.: Glioblastoma multiforme regional genetic and cellular expression patterns: influence on anatomic and physiologic MR imaging. *Radiology* 2010; 254: 564-576.
122. Smoots D.W., Geyer J.R., Lieberman D.M., Berger M.S.: Predicting disease progression in childhood cerebellar astrocytoma. *Childs Nerv. Syst.* 1998; 14: 636-648.
123. Porto L., Kieslich M., Franz K. i wsp.: Spectroscopy of untreated pilocytic astrocytomas: do children and adults share some metabolic features in addition to their morphologic similarities? *Childs Nerv. Syst.* 2010; 26: 801-806.
124. Paixão Becker A., de Oliveira R.S., Saggiaro F.P. i wsp.: In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv. Syst.* 2010; 26: 19-28.
125. Rosser T., Packer R.J.: Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* 2002; 17: 630-637; discussion: 646-651.
126. Stüer C., Vilz B., Majores M. i wsp.: Frequent recurrence and progression in pilocytic astrocytoma in adults. *Cancer* 2007; 110: 2799-2808.
127. Bowers D.C., Gargan L., Kapur P. i wsp.: Study of the MIB-1 labeling index as a predictor of tumor progression in pilocytic astrocytomas in children and adolescents. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 2968-2973.
128. Rodriguez F.J., Giannini C., Asmann Y.W. i wsp.: Gene expression profiling of NF-1-associated and sporadic pilocytic astrocytoma identifies aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1) as an underexpressed candidate biomarker in aggressive subtypes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67: 1194-1204.
129. MacDonald T.J., Pollack I.F., Okada H. i wsp.: Progression-associated genes in astrocytoma identified by novel microarray gene expression data reanalysis. *Methods Mol. Biol.* 2007; 377: 203-222.
130. Marko N.F., Prayson R.A., Barnett G.H., Weil R.J.: Integrated molecular analysis suggests a three-class model for low-grade gliomas: a proof-of-concept study. *Genomics* 2010; 95: 16-24.
131. Rodriguez E.F., Scheithauer B.W., Giannini C. i wsp.: PI3K/AKT pathway alterations are associated with clinically aggressive and histologically anaplastic subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011; 121: 407-420.
132. Tomlinson F.H., Scheithauer B.W., Hayostek C.J. i wsp.: The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *J. Child Neurol.* 1994; 9: 301-310.
133. Horbinski C., Hamilton R.L., Nikiforov Y., Pollack I.F.: Association of molecular alterations, including *BRAF*, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 641-649.
134. Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.
135. Efron B., Tibshirani R.: On testing the significance of sets of genes. *The Annals of Applied Statistics* 2007; 1: 107-129.
136. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. i wsp.: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; 102: 15545-15550.
137. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e36.
138. Hussain S.F., Yang D., Suki D. i wsp.: The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating anti-tumor immune responses. *Neuro Oncol.* 2006; 8: 261-279.
139. McEvilly R.J., de Diaz M.O., Schonemann M.D. i wsp.: Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science* 2002; 295: 1528-1532.
140. Adesina A.M., Nguyen Y., Mehta V. i wsp.: *FOXG1* dysregulation is a frequent event in medulloblastoma. *J. Neurooncol.* 2007; 85: 111-122.
141. Seoane J., Le H.V., Shen L. i wsp.: Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 2004; 117: 211-223.
142. Andreiulo F., Puget S., Peyre M. i wsp.: Neuronal differentiation distinguishes supratentorial and infratentorial childhood ependymomas. *Neuro Oncol.* 2010; 12: 1126-1134.
143. Korshunov A., Neben K., Wrobel G. i wsp.: Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 1721-1727.
144. Mack S.C., Taylor M.D.: The genetic and epigenetic basis of ependymoma. *Childs Nerv. Syst.* 2009; 25: 1195-1201.
145. Shibata M., Kurokawa D., Nakao H. i wsp.: MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing *Foxg1* expression in mouse medial pallium. *J. Neurosci.* 2008; 28: 10415-10421.
146. Cheng L., Wu Q., Guryanova O.A. i wsp.: Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 406: 643-648.
147. Huang Z., Cheng L., Guryanova O.A. i wsp.: Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010; 1: 638-655.
148. Augsten M., Hägglöf C., Olsson E. i wsp.: CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multimodal stimulator of prostate tumor growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009; 106: 3414-3419.
149. Gabrusiewicz K., Ellert-Miklaszewska A., Lipko M. i wsp.: Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One* 2011; 6: e23902.
150. Mangale V.S., Hirokawa K.E., Satyaki P.R. i wsp.: Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science* 2008; 319: 304-309.
151. Ando H., Kobayashi M., Tsubokawa T. i wsp.: Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. *Dev. Biol.* 2005; 287: 456-468.
152. Ikeda K., Kageyama R., Suzuki Y., Kawakami K.: Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development. *Int. J. Dev. Biol.* 2010; 54: 1453-1464.
153. Kumar J.P.: The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 565-583.
154. Micalizzi D.S., Christensen K.L., Jedlicka P. i wsp.: The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF- $\beta$  signaling. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 2678-2690.
155. Holland P.W., Booth H.A., Bruford E.A.: Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* 2007; 5: 47.
156. Peters T., Dildrop R., Ausmeier K., Rütter U.: Organization of mouse *Iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* 2000; 10: 1453-1462.
157. Weinmann A., Galle P.R., Teufel A.: In silico characterization of an Iroquois family-related homeodomain protein. *Int. J. Mol. Med.* 2005; 16: 443-448.
158. Bizzoca A., Virgintino D., Lorusso L. i wsp.: Transgenic mice expressing F3/contactin from the TAG-1 promoter exhibit developmentally regulated changes in the differentiation of cerebellar neurons. *Development* 2003; 130: 29-43.
159. Deshmukh H., Yu J., Shaik J. i wsp.: Identification of transcriptional regulatory networks specific to pilocytic astrocytoma. *BMC Med. Genomics* 2011; 4: 57.
160. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. i wsp.: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
161. Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A. i wsp.: A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 2008; 28: 264-278.

162. Horiguchi S., Takahashi J., Kishi Y. i wsp.: Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J. Neurosci. Res.* 2004; 75: 817-824.
163. Otero J.J., Rowitch D., Vandenberg S.: OLIG2 is differentially expressed in pediatric astrocytic and in ependymal neoplasms. *J. Neurooncol.* 2011; 104: 423-438.
164. Taylor M.D., Poppleton H., Fuller C. i wsp.: Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 2005; 8: 323-335.
165. Hirst D.G., Robson T.: Molecular biology: the key to personalised treatment in radiation oncology? *Br. J. Radiol.* 2010; 83: 723-728.
166. Barker H.E., Chang J., Cox T.R. i wsp.: LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res.* 2011; 71: 1561-1572.
167. Erler J.T., Bennewith K.L., Nicolau M. i wsp.: Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440: 1222-1226.
168. Erler J.T., Giaccia A.J.: Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66: 10238-10241.
169. Gutmann D.H., Hedrick N.M., Li J. i wsp.: Comparative gene expression profile analysis of neurofibromatosis 1-associated and sporadic pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2002; 62: 2085-2091.
170. Szabó E., Korpos E., Batmunkh E. i wsp.: Expression of matrilin-2 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 2008; 14: 15-22.
171. Wagener R., Ehlen H.W., Ko Y.P. i wsp.: The matrilins – adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3323-3329.
172. Anthony T.E., Heintz N.: The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J. Comp. Neurol.* 2007; 500: 368-383.
173. Krupenko S.A., Oleinik N.V.: 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth Differ.* 2002; 13: 227-236.
174. Deak K.L., Dickerson M.E., Linney E. i wsp.: Analysis of *ALDH1A2*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, *CRABP1*, and *CRABP2* in human neural tube defects suggests a possible association with alleles in *ALDH1A2*. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2005; 73: 868-875.
175. Kim H., Lapointe J., Kaygusuz G. i wsp.: The retinoic acid synthesis gene *ALDH1a2* is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 8118-8124.
176. Niederreither K., Fraulob V., Garnier J.M. i wsp.: Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech. Dev.* 2002; 110: 165-171.
177. Barcelo-Coblijn G., Murphy E.J., Mills K. i wsp.: Lipid abnormalities in succinate semialdehyde dehydrogenase (*Aldh5a1*<sup>-/-</sup>) deficient mouse brain provide additional evidence for myelin alterations. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1772: 556-562.
178. Hogema B.M., Gupta M., Senephansiri H. i wsp.: Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nat. Genet.* 2001; 29: 212-216.
179. Vasiliou V., Pappa A.: Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* 2000; 61: 192-198.
180. Carpentino J.E., Hynes M.J., Appelman H.D. i wsp.: Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 8208-8215.
181. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E. i wsp.: ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567.
182. Mukhopadhyay K.D., Bandyopadhyay A., Chang T.T. i wsp.: Isolation and characterization of a metastatic hybrid cell line generated by ER negative and ER positive breast cancer cells in mouse bone marrow. *PLoS One* 2011; 6: e20473.
183. Penumatsa K., Edassery S.L., Barua A. i wsp.: Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors. *J. Ovarian Res.* 2010; 3: 28.

## Zasady prenumeraty kwartalnika „Aktualności Neurologiczne”

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 25 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 80 zł.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 25 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
  - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na pocztę. Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
  - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto:  
Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa  
Deutsche Bank PBC SA  
42 1910 1048 2215 9954 5473 0001  
W tytule przelewu proszę wpisać: „Prenumerata AN”.
  - Drogą mailową: redakcja@neurologia.com.pl.
  - Telefonicznie lub faksem: tel.: 22 651 97 83, faks: 22 842 53 63.
  - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie www.neurologia.com.pl.
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.