

Прогностички значај васкуларног ендотелног фактора раста у развоју хроничне мијелоидне леукемије

Ана Видовић, Градимир Јанковић, Драгица Томин, Маја Перуничкић-Јовановић, Ирена Ђунић, Владислава Ђурашиновић, Милица Чоловић

Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Повећано стварање нових крвних судова, тзв. неангиогенеза, једна је од одлика хроничне мијелоидне леукемије (ХМЛ), која припада групи хроничних мијелопролиферативних болести с испољавањем патолошког протеина *Bcr/Abl*. Васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *vascular endothelial growth factor* – *VEGF*) је снажан и посебан регулатор ангиогенезе који утиче на многе функције ћелија ендотела, посебно на њихову способност деобе и кретања. Сам утицај експресије *VEGF* на ток ХМЛ и даље је непознат.

Циљ рада Циљ рада је био да се одреди ниво експресије *VEGF* током развоја ХМЛ.

Методе рада Испитиван је ниво експресије *VEGF* код 85 болесника са ХМЛ просечне старости од 50 година (распон 16-75 година), од којих је 29 било у хроничној фази, 25 у акцелерацији, а 31 у бластној кризи. Ниво експресије *VEGF* је одређиван имунохистохемијски, коришћењем одговарајућег моноклонског антитела, и изражаван у процентима позитивности на 1.000 анализираних ћелија. Упоредиване су вредности експресије *VEGF* с лабораторијским обележјима (вредностима хемоглобина, броја леукоцита, броја тромбоцита, процентом бласта у периферној крви и костној сржи) и клиничким показатељима напредовања болести (степеном хепатоспленомегалије, дужином сваке фазе ХМЛ посебно).

Резултати Вредности експресије *VEGF* су биле највеће у акцелерацији (*ANOVA*, $p=0,033$). Ниво експресије *VEGF* је корелирао негативно са степеном спленомегалије (*Pearson*, $r=-0,400$; $p=0,011$). Висока експресија *VEGF* је корелирала са краћим укупним преживљавањем (*log rank*, $p=0,042$).

Закључак Имунохистохемијски доказана значајна разлика у експресији *VEGF* у зависности од фазе ХМЛ могла би бити клинички значајна, имајући у виду утицај на одлуку о времену и начину лечења особа с овом болешћу. Дати подаци упућују на значај улоге *VEGF* у биолошком развоју ХМЛ, као и на потребу даљег истраживања инхибитора *VEGF*.

Кључне речи: хронична мијелоидна леукемија; *VEGF*; прогноза

УВОД

Хронична мијелоидна леукемија (ХМЛ) је клонска мијелопролиферативна болест плурипотентне хематопоетске матичне ћелије са специфичним цитогенетским поремећајем, балансираном транслокацијом између хромозома 9 и 22, названом Филаделфија хромозом (*Ph*). Та транслокација доводи до настанка химеричног гена *Bcr/Abl*, који експримира ненормални фузиони протеин с конститутивном активношћу тирозин-киназе. ХМЛ има двофазни или трофазни ток. После релативно мирне и терапијски лако контролисане хроничне фазе, која траје од три до пет година, болесници улазе у интермедијарну фазу акцелерације, која у просеку траје 6-18 месеци. Око 85% болесника затим прелази у терминалну инфаустну бластну кризу, која у просеку траје од три до девет месеци. Механизми одговорни за развој ХМЛ ка бластној кризи, међутим, још нису довољно познати [1-3]. Нестабилност генома, тј. појава нових цитогенетских поремећаја уз *Ph* хромозом, и активација неких онкогена су значајан патогенетски фактор. У овој студији је имунохистохемијски испитиван ниво експресије васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *vascular endothelial growth factor* – *VEGF*) у костној сржи болесника у различитим фазама ХМЛ, као и прогностички значај те експресије.

Ангиогенеза је формирање нових крвних судова од постојеће васкуларизације. Она обухвата деградацију ванћелијског матрикса и активацију, пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и перицита кроз вишестепену процесу. Поред физиолошке улоге током овулације, плацентације и ембриогенезе, ангиогенеза је повезана и с растом, дисеминацијом и метастазама солидних тумора. Више позитивних и негативних регулаторних молекула је укључено у процес ангиогенезе. Два најактивнија позитивна регулаторна фактора су *VEGF* и базични фибробластни фактор раста β .

VEGF је димерични мултифункционални гликопротеин са 15-25% хомологије с фактором раста пореклом из тромбоцита (енгл. *platelet-derived growth factor* – *PDGF*), масе 34-42 *kDa*. Ген за хумани *VEGF* се налази на хромозому *6p21.3*. Описано је неколико изоформи *VEGF*, укључујући облике са 121, 165, 189 и 206 аминокиселина. Изоформа са 165 аминокиселина је најчешћа. *VEGF* је потенцијални митоген ендотелних ћелија изолованих из артерија, вена и лимфатика [7]. Недавно је објављено да је у сржи болесника са ХМЛ повећана густина микроваскуларизације, што указује на вероватну улогу ангиогенезе у патофизиологији хематолошких малигнитета [8]. Рагајчак (*Ratajczak*) и сарадници [9] су 1998. године показали да се *VEGF* ствара од гранулоцитног колоностимулирајућег фактора (енгл. *granulocyte colony-stimu-*

lating factor – G-CSF), хелијских колонија акумулираних интерлеукином 3 (IL-3) болесника са ХМЛ. Исти аутори су доказали заступљеност рецептора 1 VEGF информационе РНК у хелијским колонијама 15 болесника у хроничној фази ХМЛ [9].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се одреди ниво експресије VEGF у свим фазама ХМЛ (хроничној фази, акцелерацији и бластној кризи) и упореде добијене вредности, као и евентуална повезаност вредности експресије VEGF с лабораторијским и клиничким показатељима развоја ХМЛ.

МЕТОДЕ РАДА

Болесници

Истраживање је обухватило 85 болесника са ХМЛ лечених у Институту за хематологију Клиничког центра Србије у Београду у периоду 1996-2004. године. Дијагноза ХМЛ (за све три њене фазе) постављена је на основу општеприхваћених критеријума [10-12].

Материјал и методе

Цитолошки преглед костне сржи је рађен на стандардним размазима аспириата костне сржи добијених пункцијом из грудне кости или илијачног гребена и бојених методом Меј-Гринвалд-Гимза (*May-Grünwald Giemsa – MGG*). Целуларност пунктата је процењивана на основу критеријума Бернарда, одређивањем броја хелија с једром на увећању од 400 пута. Процент бласта је одређиван у костној сржи према критеријумима Француско-америчко-британске (ФАБ) кооперативне групе и критеријума предложених класификацијом Светске здравствене организације [13, 14, 15]. За одређивање цитохемијских одлика бласта примењиване су дијагностичке методе бојења: мијелопероксидаза (POX), Судан црно Б, PAS (*Periodic acid Schiff*), а код неких болесника алфа-нафтил ацетат-естераза [13, 16].

Биопсија костне сржи је обављена код свих болесника помоћу Јамшидијеве (*Jamshidi*) игле као трансилујачна биопсија. Узорци биопсије су фиксирани у десетопроцентном формалину, декалцификовани у десетопроцентној мрављој киселини шест сати и калупљени у парафину. Пресеци дебљине 4 μm су депарафинисани у складу са стандардним поступцима и обојени стандардним методама бојења: хематоксилин-еозином (HE), Гимза (*Giemsa*), ретикулин (*Gordon Sweet*) и *Perls*.

Препарати су припремљени за имунохистохемијску анализу кувањем у микроталасној пећници у цитратном пуферу од 0,01 mol/l и pH 8. Имунохистохемијска анализа је урађена применом стандардизоване методе стрептавидин-биотин АЕЦ, тј. применом

система за визуелизацију (*LSAB2, HRP, Dako Cytomation*), према процедурама за примењено примарно антитело VEGF (моноклонално, мишје IgG2a, c-1, cs-7269, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Препарати су анализирани помоћу стандардног светлосног микроскопа најпре под увећањем од 100 пута, а након препознавања репрезентативних поља, обављено је бројање позитивно обојених хелија при увећању од 400 пута. Експресија VEGF је изражена у процентима позитивних хематопоеетских хелија.

Статистичка обрада података

Резултати мерења изражавани су као индивидуалне вредности, односно средње вредности уз стандардну девијацију, као меру варијабилности унутар скупа. Такође су на графиконима различитих типова представљене медијане, највеће вредности и квантили. За оцену значајности разлика измерених вредности за три параметра или више њих коришћени су анализа варијансе ANOVA и непараметријски медијана-тест. Резултати су интерпретирани на петопроцентном или нижем нивоу значајности ($p < 0,05$). За променљиве категорије (степен фиброзе костне сржи и тумачење кариотипа) примењен је Краскал-Волисов (*Kruskal-Wallis*) тест, којим се испитују разлике по фазама болести. За испитивање значајности разлика вредности параметара по фазама болести коришћен је Пирсонов (*Pearson*) χ^2 -тест облика распореда фреквенција. Анализом линеарне корелације (r) испитана је међузависност истраживаних параметара. За корелацију непараметријских обележја коришћен је Спирманов (*Spearman*) тест корелације. Утицај клиничких параметара и онкогена на преживљавање, као и на дужине појединачних фаза испитиван је Каплан-Мајеровом (*Kaplan-Meier*) методом, у оквиру које је примењен *log rank* тест за утврђивање статистичке значајности утицаја сваког фактора на преживљавање. За анализу преживљавања је примењена и мултиваријантна анализа помоћу Коксовог (*Cox*) модела пропорционалног ризика. За статистичку обраду података коришћени су статистички пакети *SPSS for Windows 13.0* и *Excel*.

РЕЗУЛТАТИ

У истраживање је укључено 85 болесника (44 женског и 41 мушког пола) просечне старости од 50 година, од којих је 29 било у хроничној фази, 25 у фази акцелерације, а 31 у бластној кризи. Међу испитаницима који су били у бластној кризи, код 16 је дијагностикован мијелобластни тип трансформације, код седам лимфобластни, код шест мегакариобластни, а код два болесника бифенотипски облик бластне кризе. Основна клиничка обележја испитаника приказана су у табели 1, где се примећује да су разлике у лабораторијским и клиничким параметрима нарочито значајне када се упореде хронична фаза и бластна криза. Резултати у фази акцелерације су између те две вредно-

Табела 1. Основна клиничка обележја болесника (средња вредност)**Table 1.** Basic clinical characteristics of patients (mean value)

Параметар Parameter	Хронична фаза* Chronic phase*	Акцелера- ција* Accele- ration*	Бластна криза* Blast crisis*
Број болесника Number of patients	29	25	31
Старост (године) Age (years)	52.83	48.20	51.23
Алкална фосфатаза леукоцита Alcaline phosphatase of leucocytes	9.24	20.79	49.58
Хемоглобин (g/l) Haemoglobin (g/l)	110.41	106.96	85.34
Леукоцити ($\times 10^9/l$) Leukocytes ($\times 10^9/l$)	141.26	123.90	61.39
Тромбоцити ($\times 10^9/l$) Platelets ($\times 10^9/l$)	453.52	485.50	196.76
Бласти периферне крви (%) Peripherar blood blasts (%)	2.25	3.96	34.48
Базофили периферне крви (%) Peripherar blood basophils (%)	1.59	4.63	3.20
LDH (U/l)	1070.29	937.71	1159.48
Слезина (cm/ЛРЛ) Spleen (cm/LCM)	4.20	4.82	8.35
Дужина фазе (месеци) Phase length (months)	35.03	22.04	5.32

* стандардни дијагностички критеријуми [2, 3, 12, 21]

* standard diagnostic criteria [2, 3, 12, 21]

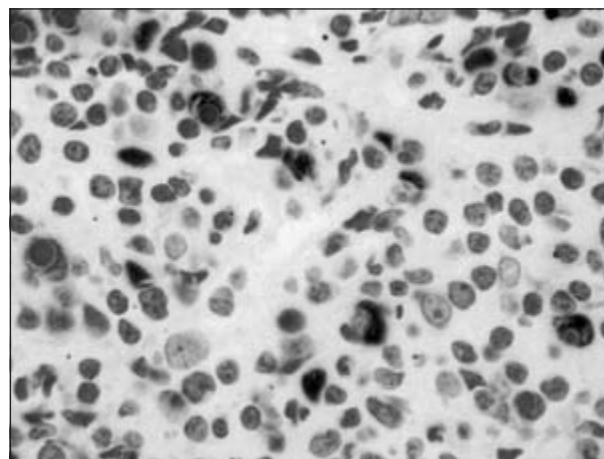
сти, због чега се ова фаза понекад назива и интермедијарна фаза. Вредности алкалне фосфатазе леукоцита (*APL*) се повећавају с напредовањем болести, тако да је просечна вредност *APL* у хроничној фази најмања и износи око девет јединица (нормалан опсег вредности је 20-80), у фази акцелерације око 20, а у бластној кризи скоро 50 јединица. Као што је добро познато, у хроничној фази *APL* је најчешће 0, док се у каснијим фазама ХМЛ повећава, често и преко нормалних вредности. Болесници у бластној кризи су изразито анемични, што показује средња вредност хемоглобина од око 85 g/l, док је хемоглобин само незнатно снижен у хроничној фази (око 110 g/l). Леукоцитоза је најизраженија у хроничној фази, а то су вредности измерене приликом постављања дијагнозе болести, пре почетка било каквог лечења, што објашњава највише вредности броја леукоцита управо у овој фази ($141 \times 10^9/l$). У фази акцелерације број леукоцита је био нижи ($123 \times 10^9/l$), али су ови болесници били на неком облику циторедуктивне терапије. Код испитаника у бластној кризи број леукоцита је био просечно $61 \times 10^9/l$, али је зато у леукоцитарној формули уочен значајно већи проценат бласта – 35%. У хроничној фази бласта је било 2%, а у фази акцелерације 4%. Највећа спленомегалија је измерена код испитаника у бластној кризи, а слезина се углавном палпирала 8 cm испод левог ребарног лука; у акцелерацији палпирала се 5 cm, а у хроничној фази 4 cm испод левог ребарног лука. Просечно трајање појединих фаза ХМЛ се међусобно значајно разликовало, тако да је хронична фаза трајала 35 месеци, акцелерација 22 месеца, а бластна криза само 5,3 месеца.

Експресија VEGF

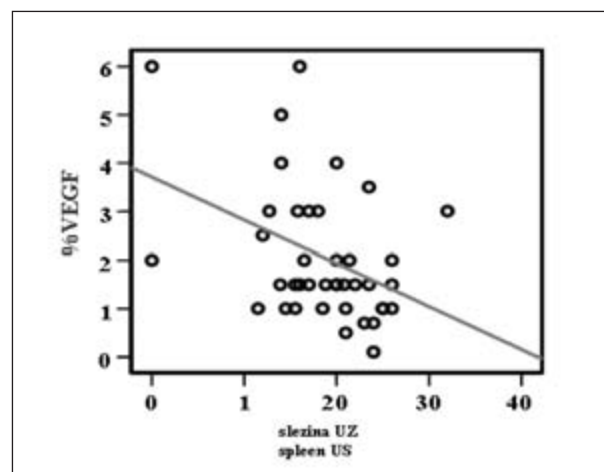
Средња вредност експресије *VEGF* одређена имунохистохемијски за све испитанике била је $18,65 \pm 12,23\%$ (опсег 1-60%). У хроничној фази ХМЛ просечна вредност *VEGF* била је $17,41 \pm 9,32\%$, у фази акцелерације $23,84 \pm 11,76\%$, а у бластној кризи $15,61 \pm 13,93\%$. На слици 1 приказана је висока експресија *VEGF* у бластној кризи.

Поредећи експресију *VEGF* са параметрима као што су вредности хемоглобина, броја леукоцита и тромбоцита, процента бласта и базофилних гранулоцита у периферној крви, као и са вредностима *APL* и *LDH*, није доказана значајна корелација ни са једним параметром сем са величином слезине (Спирманов тест корелације, $p=0,011$), што је приказано на графикану 1.

Поредећи вредности *VEGF* у различитим фазама ХМЛ, није уочена значајна корелација вредности *VEGF* и фазе ХМЛ. Међутим, већа експресија *VEGF* је значајно корелирала са краћим укупним преживљавањем болесника. На графикану 2 је приказано укупно преживљавање болесника у зависности од нивоа експресије *VEGF* (*log rank* тест, $p=0,0421$).

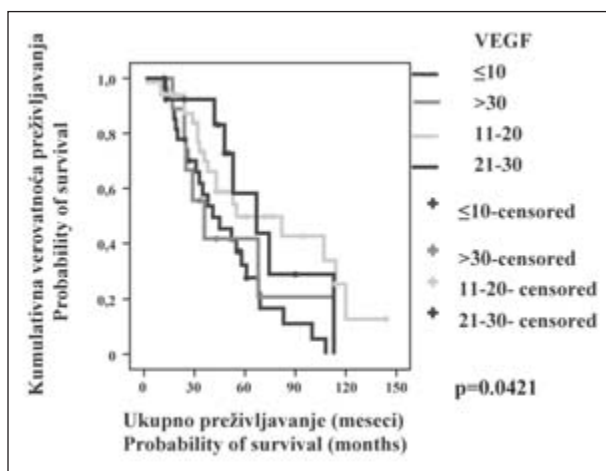


Слика 1. Висока експресија *VEGF* у бластној кризи ($\times 1000$)
Figure 1. High expression of VEGF in blast crisis ($\times 1000$)



Графикон 1. Негативна корелација између вредности експресије *VEGF* и величине слезине измерене ултразвуком ($r=-0,400$; $p=0,011$)

Graph 1. Negative correlation of VEGF expression and spleen size measured by ultrasound ($r=-0.400$; $p=0.011$)



Графикон 2. Корелација експресије *VEGF* с укупним преживљавањем болесника ($p=0,0421$)

Graph 2. Correlation of *VEGF* expression and overall survival ($p=0.0421$)

ДИСКУСИЈА

Ангиогенеза има велику улогу у расту, дисеминацији и метастазирању солидних тумора. Такође је доказано повећање густине микроваскуларизације у акутној лимфобластној леукемији код деце, као и у акутним мијелобластним леукемијама, мијелодисплазном синдрому и хроничној гранулоцитној леукемији код одраслих [17, 18, 19]. У овој студији је утврђена значајна разлика у нивоу експресије ћелијског протеина *VEGF* у односу на фазе ХМЛ (*ANOVA*, $p=0,033$). Највише вредности *VEGF* су измерене у фази акцелерације, а не у бластној кризи, како се очекивало. За овакав налаз засада нема објашњења, што се уклапа у још недовољно разјашњене механизме развоја ХМЛ од хроничне фазе, као одмаклим фазама болести [20]. Такође, у фази акцелерације долази до кључних промена у леукемијским ћелијама, које постају неосетљиве на све регулаторне процесе раста и диференцијације, добијајући све особине малигне ћелије, неконтролисану пролиферацију и имортализацију. Вертовсек (*Vertovsek*) и сарадници [7] у свом раду нису доказали разлику у нивоу *VEGF* у односу на фазе ХМЛ; међутим, између нивоа експресије *VEGF* и величине слезине до-

казана је значајна, негативна корелација, тј. веће вредности *VEGF* су корелирале с мањом слезином. Исти аутори су, мерећи ниво *VEGF* у костној сржи болесника са ХМЛ техником радиоимуноесеја (*RIA* техника), забележили негативну корелацију с величином слезине ($p=0,004$), али су утврдили и корелацију *VEGF* са старијом животном доби болесника ($p=0,01$), већим бројем тромбоцита ($p=0,003$), мањим бројем леукоцита ($p=0,0006$) и мањим процентом бласта у периферној крви ($p=0,04$) [7], што није могло да се докаже у нашем истраживању. Ниво експресије *VEGF* се у овом истраживању показао и као одличан предиктор укупног преживљавања болесника, јер су краће преживљавали болесници са већим вредностима експресије *VEGF* ($p=0,0421$). Применом Коксовог пропорционалног хазардног модела и *VEGF* као континуиране варијабле, исти аутори су закључили да виши ниво *VEGF* корелира с краћим преживљавањем болесника у хроничној фази болести [7]. Легрос (*Legros*) и сарадници [8] су испитивали потенцијални прогностички значај концентрације *VEGF* у периферној крви болесника са ХМЛ лечених иматинибом. Показали су да иматиниб не блокира само активност *Bcr-Abl*, *PDGF* и *c-kit*, већ и способност стромалних и нормалних хематопоеетских ћелија да луче *VEGF*. Однедавно се спекулише могућност да ХМЛ прогениторне ћелије настају од хемангиобластних прогениторних ћелија, чијом пролиферацијом затим настају малигне ћелије крви и клоналне ендотелне ћелије. Ако је то тачно, онда малигне ендотелне ћелије могу играти улогу у повећању густине васкуларизације у ХМЛ, а *VEGF* би патофизиолошки био повезан с развојем ХМЛ [7].

ЗАКЉУЧАК

Јасно је да *VEGF* има важну улогу у биолошком развоју ХМЛ, па има смисла даље усавршавати инхибиторе *VEGF*. Може се очекивати да би смањење синтезе *VEGF* блокадом клоналне селекције могло да предупреди леукемијски преображај ХМЛ и поред постојања патолошког протеина *Bcr/Abl*. Даља клиничка истраживања су неопходна ради дефинисања прогностичког значаја експресије *VEGF* и његовог утицаја на развој болести.

ЛИТЕРАТУРА

- Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. A concise update. *Blood*. 1993; 82:691-703.
- Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*. 1987; 83:445-54.
- Kantarjian HM, Talpaz M. Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1988; 6:180-1.
- Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94(11):3713-21.
- Aguayo A, Kantarjian H, Manshouki T, et al. Angiogenesis in acute chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000; 96(6):2240-5.
- Di Raimondo F, Palumbo GA, Molica S, Giustolisi R. Angiogenesis in chronic myeloproliferative disease. *Acta Haematologica*. 2001; 106(4):177-83.
- Vertovsek S, Kantarjian H, Manshouki T, et al. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99(6):2265-7.
- Legros L, Bourcier C, Jacquel A, et al. Imatinib mesylate (STI571) decrease the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 104(2):495-501.
- Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PIGF) in regulating human haemopoietic cell growth. *Br J Haematol*. 1998; 103:969-79.
- Canellos G. Diagnosis and treatment of chronic granulocytic leukemia. In: Wiernik PH, Canellos GP, Kyle RA, et al, editors. *Neoplastic Disease of the Blood*. New York: Churchill Livingstone; 1991. p.61-76.
- Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Ferrer A, Cid J, Montserrat E. The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival. *Haematologica*. 1999; 84:324-7.
- Cervantes F, Lopez-Guillermo A, Bosch F, et al. An assessment of the clinico-hematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Eur J Hematol*. 1996; 57:286-91.
- Benett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985; 103:620-9.
- Brunning RD, Matutes E, Harris NL, et al. Acute myeloid leukemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *World Health Organisation (WHO) classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of hematoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001. p.75-109.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organisation classification of hematological malignancies. Report of the clinical advisory committee meeting. Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol*. 2000; 13:193-207.
- Scott CS, Der Ottolander GK, Swisky D, et al for International Council for Standardisation in Haematology (ICSN). Recommended procedures for the classification of acute leukemias. *Leukemia Lymphoma*. 1993; 11:37-50.
- Parez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 1997; 150:815.
- Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 95:309.
- Pruner G, Bertolini F, Soligo D, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999; 81:1398.
- Vidović A, Janković G, Čolović M, et al. The proto-oncogene expression varies over the course of chronic myeloid leukemia. *Hematol*. 2008; 13:34.
- Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004; 103:4010.

Prognostic Significance of Cellular Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Course of Chronic Myeloid Leukaemia

Ana Vidović, Gradimir Janković, Dragica Tomin, Maja Peruničić-Jovanović, Irena Djunić, Vladislava Djurašinić, Milica Čolović

Institute of Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Increased angiogenesis in bone marrow is one of the characteristics of chronic myeloid leukaemia (CML), a clonal myeloproliferative disorder that expresses a chimeric bcr/abl protein. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent and a specific regulator of angiogenesis which principally targets endothelial cells and regulates several of their functions, including mitogenesis, permeability and migration. The impact of elevated VEGF expression on the course of chronic myeloid leukaemia is unknown.

Objective The aim of this study was the follow-up of VEGF expression during the course of CML.

Methods We studied VEGF expression of 85 CML patients (median age 50 years, range 16-75 years). At the commencement of the study, 29 patients were in chronic phase (CP), 25 in an accelerated phase (AP), and 31 in the blast crisis (BC). The temporal expression (percentage positivity per 1000 analysed

cells) VEGF proteins over the course of CML were studied using the immunohistochemical technique utilizing relevant monoclonal antibodies. It was correlated with the laboratory (Hb, WBC and platelet counts, and the percentage of blasts) and clinical parameters (organomegaly, duration of CP, AP, and BC) of disease progression.

Results The expression of VEGF protein was most pronounced in AP (ANOVA, $p=0.033$). The level of VEGF expression correlated inversely with the degree of splenomegaly (Pearson, $r=-0.400$, $p=0.011$). High expression of VEGF correlated with a shorter overall survival (log rank, $p=0.042$).

Conclusion Immunohistochemically confirmed significance of the expression of VEGF in dependence of the CML stage could be of clinical importance in deciding on the timing therapy. These data suggest that VEGF plays a role in the biology of CML and that VEGF inhibitors should be investigated in CML.

Keywords: chronic myeloid leukaemia; VEGF; prognosis