

Received: 2015.04.24
Accepted: 2016.06.01
Published: 2016.12.08

Mechanizmy angiogenezy w nowotworzeniu*

Mechanisms of angiogenesis in neoplasia

Anna Antonina Sobocińska^{1,2,3}, Anna M. Czarnecka¹, Cezary Szczylik¹

¹Klinika Onkologii z Laboratorium Onkologii Molekularnej, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa

²Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

³Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Streszczenie

Mechanizm formowania nowych kapilar bazujący na istniejących naczyniach krwionośnych, czyli angiogeneza, występuje w procesach fizjologicznych i patologicznych. Do inicjacji mechanizmu angiogenezy jest wymagane zachwianie stężeń czynników proangiogennych i antyangiogennych, które jest wywołane m.in. stanem niedotlenienia komórki. Angiogeneza jest procesem umożliwiającym dalszą proliferację komórek nowotworowych i powiększenia jego struktury. Wiąże się to ze zwiększeniem dotlenienia komórek nowotworowych w centralnych partiach nowotworu. Udowodniono również, że proces jest bezpośrednio powiązany ze zwiększeniem wystąpienia przerzutów, ponieważ umożliwia migrację komórek nowotworowych przez naczynia krwionośne wraz z krwią. Kapilary, które powstają w obrębie nowotworu i jego strukturze mają inną morfologię, jednak nie wykazano różnic w składzie antygenowym na ich powierzchni w stosunku do fizjologicznie prawidłowych naczyń krwionośnych. Angiogeneza od kilkunastu lat stała się ważnym celem terapii stosowanych w onkologii. Terapie antyangiogenne, które cieszą się coraz większą popularnością wśród klinicystów, dają spektakularne wyniki w leczeniu raków nerki i trzustki, a także szpiczaka mnogiego. Wśród leków, których działanie sprawdza się na wymienionych nowotworach, znajdują się Bewacyzumab, Sunitinib, Talidomid, a także Cetuximab. Główną grupą cząsteczek używanych w terapiach antyangiogennych są inhibitory kinaz tyrozynowych, które działają przez wiązanie się do enzymu i blokowanie jego centrum katalitycznego. Należy zauważyć, iż stosowanie tego typu terapii, oprócz obiecujących skutków działania, jest powiązane z wystąpieniem wielu działań niepożądanych. Terapia antyangiogenna jest jednym z najbardziej obiecujących celów dzisiejszej onkologii i w związku z tym są uzasadnione dalsze badania w tym kierunku.

Słowa kluczowe:

angiogeneza • nowowór • terapia antyangiogenna • rak nerki • rak trzustki • TKIs • inhibitor kinazy tyrozynowej • VEGF • HIF-1

Summary

Mechanism of forming new capillary from basal vessels, named angiogenesis, exist under both physiological and pathological conditions. Initiation of this process requires imbalance between proangiogenic and antiangiogenic factors, which can occur for instance under hypoxic conditions. Angiogenesis is complex process which allow tumor cells to proliferate, thus providing tumor to increase its structure. This dependence is highly connected to enhanced migration of tumor cells through blood, which often ends up being an onset of metastasis. It has been proved that capillaries that form during tumor lifetime are different in case of morphology. However, it seems that antigens spread through these blood vessel are the same as antigens produced during physiological angiogenesis. In recent years angiogenesis has become one of the most important targets in therapies used in oncology. Antiangiogenic therapies

*Opracowanie zostało przygotowane dzięki finansowaniu grantu OPUS 7, nr UMO-2014/13/B/NZ1/04010.



	<p>have proven itself to be very spectacular and promising in treatment of renal and pancreatic cancers or multiple myeloma. Bewacizumab, Sunitinib, Cetuximab and Talidomid are examples of drugs used in such therapies. Tyrosine kinase inhibitors are group that represents most of the drugs of antiangiogenic properties. It is worth mentioning that during administration of such substances spectrum of side effects is observed. However, antiangiogenic therapy is one of the most promising targets in today's oncology. Therefore, it is highly explainable to continue further research in this area.</p>
<p>Keywords:</p>	<p>angiogenesis • tumor • antiangiogenic therapy • renal cancer • pancreatic cancer • multiple myeloma • TKIs • tyrosine kinase inhibitors • VEGF • HIF-1</p>
<p>Full-text PDF:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1225950</p>
<p>Word count:</p>	<p>6082</p>
<p>Tables:</p>	<p>–</p>
<p>Figures:</p>	<p>4</p>
<p>References:</p>	<p>92</p>
<p>Adres autorki:</p> <p>Wykaz skrótów:</p>	<p>licencjat Anna Sobocińska, Laboratorium Onkologii Molekularnej, Wojskowy Instytut Medyczny, ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa; e-mail: asobocinska@wim.mil.pl</p> <p>Ang-1 – angiopoetyna-1; Ang-2 – angiopoetyna-2; bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; B-Raf/C-Raf – kinazy serynowo/treoninowe; ECM – macierz pozakomórkowa; ECs – komórki śródbłonna; EGF – naskórkowy czynnik wzrostu; EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; eNOS – syntaza tlenu azotu; EPO – gen ludzki kodujący erytropoetynę; EPS – progenitorowe komórki śródbłonna pochodzące ze szpiku kostnego; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów; GM-CSF – czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów; HER – rodzina receptorów naskórkowego czynnika wzrostu; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; HIF-1α – czynnik wzbudzany hipoksją; IL – interleukina; MM – szpiczak mnogiej; MMPs – metaloproteinazy macierzowe; MVD – gęstość naczyń krwionośnych; PDGF-B, -BB – pochodzący z płytek czynnik wzrostu typu B, typu BB; PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu; RCC – rak jasnokomórkowy nerki; TAA – antygeny związane z nowotworem; Tie-2 – receptor o aktywności tyrozynowo-kinazowej; TKIs – małe inhibitory kinaz tyrozynowych; TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α; TSP-1, -2, -3, -4, -5 – trombospondyny 1, 2, 3, 4, 5; VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; VPF – czynnik przepuszczalności błony; VW-SC – rezydentne, komórki macierzyste ścian naczyń krwionośnych; VW-PC – progenitorowe komórki macierzyste ścian naczyń krwionośnych.</p>

WSTĘP

Powstawanie właściwie funkcjonującej sieci naczyń krwionośnych jest jednym z podstawowych czynników wymaganych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mechanizm budowania sprawnie działającego układu krwionośnego zależy od dwóch procesów – waskulogenezy i angiogenezy. W czasie embriogenezy następuje stymulacja wytworzenia podstawowych naczyń krwionośnych, które podczas postępującego rozwoju mają umożliwić rozrost narządów. Stwierdzono zatem, że waskulogeneza – czyli tworzenie naczyń krwionośnych z puli komórek progenitorowych – jest jednym z podstawowych procesów determinujących prawidłowy rozwój tkanek i organów, poczynając od zarodka i łożyska [73], ponieważ przez formację kapilar do rozrastających się tkanek są dostarczane tlen i substancje odżywcze. Prawidłowy rozwój sieci naczyń

krwionośnych umożliwia również wymianę gazową i transport produktów przemiany materii zachodzących w narządach [75].

Proces formowania nowych kapilar na bazie istniejących już naczyń krwionośnych, nazwany angiogenezą, bierze udział zarówno w procesach ogólnorozwojowych, jak i w patogenezie wielu chorób. Angiogeneza umożliwia procesy gojenia, a także odgrywa znaczącą rolę w żeńskim układzie rozrodczym, gdzie stymuluje odnowę endometrium w czasie cyklu miesięcznego, bierze udział w mechanizmie dojrzewania pęcherzyków jajnikowych i ciała żółtego, a także jest jednym z głównych procesów, które umożliwiają zajście w ciążę i prawidłowy jej przebieg [3,7]. Oprócz mechanizmów ogólnorozwojowych angiogeneza występuje również w wielu stanach patologicznych, poczynając od łuszczycy [16], reumatoidalnego zapalenia stawów [89] czy otyłości [13,83,85],

a kończąc na grupie chorób onkologicznych, w których angiogeneza pełni ważną rolę. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych podlega regulacji przez różnorodne czynniki, w których jednym z aktywujących jej przebieg jest niedobór tlenu [27,43,44]. Przewlekłym stanom zapalnym towarzyszy często angiogeneza. Proces angiogenezy uaktywnia się gdy równowaga między czynnikami proangiogennymi a antyangiogennymi przesuwana jest w stronę tych pierwszych [58,60,70].

Powstawanie naczyń krwionośnych w karcynogenezie umożliwia dotlenienie guza nowotworowego i tym samym wzmocnienie proliferacji. Angiogeneza pojawia się na etapie progresji wraz z wytworzeniem się warunków hipoksji, a także przy braku substancji odżywczych niezbędnych do dalszego wzrostu guza nowotworowego. Etap, w którym zachodzi potrzeba wytworzenia przez nowotwór naczyń krwionośnych uzupełniające braki tlenu w tkance nowotworowej nazywa się przejściem angiogennym. Najnowsze badania dotyczące procesu onkogenezy skupiają się na poznaniu molekularnych mechanizmów kontrolujących angiogenezę ze względu na jej istotną rolę w procesie tworzenia przerzutów. Gęstość naczyń MVD (microvessel density) jest wskaźnikiem angiogenezy i w histopatologii sprawdza się ją tomografią komputerową z zastosowaniem jodowych środków kontrastowych. Dzięki badaniu MVD za pomocą tych technik odkryto istotną korelację między obecnością naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym, a tworzeniem przez nią przerzutów. Tak zwane „gorące pola angiogenezy” określają miejsce w strukturze nowotworu o największej gęstości naczyń krwionośnych. Istnieją dowody na bezpośrednie powiązanie procesu angiogenezy nowotworowej z szybszą progresją i pogorszeniem rokowań. Lekarze do walki z nowotworami, stosując różne typy leków, np. o charakterze antyangiogennym. W leczeniu antyangiogennym wykorzystuje się głównie dwa rodzaje leków – inhibitory angiogenne i substancje mające za zadanie wyniszczenie struktur wokół skupiska nowotworu – w tym naczyń krwionośnych [92]. Uważa się, że skuteczność terapii antyangiogennej zależy w dużej mierze od zastanego stadium rozwoju nowotworu i komórek, które tworzą jego strukturę [75]. Do opracowania lepszych metod kuracji przeciwnowotworowych potrzebna jest dokładniejsza wiedza na temat molekularnych procesów zachodzących w guzie nowotworowym. Założono tym samym, że poznanie dynamiki procesu angiogenezy dostarczyłoby przełomowych odpowiedzi, zmieniłoby kierunek myślenia o terapiach przeciwnowotworowych, czy też naprowadziło naukowców na nowy trop skutecznej terapii o mniejszej agresywności i działaniach niepożądanym niż obecnie stosowane.

MECHANIZM TWORZENIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH W NOWOTWORACH

W początkowym etapie rozwoju nowotworu guz budują skupiska komórek, których wielkość nie przekracza 1-2 mm² [76]. Etap ten może trwać miesiące bądź lata, a utrzymanie go zależy od równowagi między prolifera-

cją i śmiercią komórki [82]. Są to tzw. raki *in situ*, które nie mają w strukturze naczyń krwionośnych. Wszystkie potrzebne do rozwoju substraty, takie jak tlen i substancje odżywcze są dostarczane w procesie dyfuzji z naczyń okalających strukturę nowotworu [30]. Przejście nowotworu w następną fazę wiąże się bezpośrednio z pojawianiem się stanów niedotlenienia warunkujących nekrozę w centralnych partiach guza nowotworowego. Bez utworzenia nowych połączeń i dostarczenia większej ilości krwi do niedotlenionych miejsc raka niemożliwy byłby jego dalszy rozrost. Nabyciem fenotypu angiogennego nazywa się stan trwałych, nieodwracalnych, genetycznych modyfikacji, które prowadzą do wytwarzania czynników proangiogennych. Nazywa się to też przejściem angiogennym, a na tym etapie zwiększa się ryzyko powstawania przerzutów ze względu na szybki rozrost raka i naciekanie tkanek [42].

Proces angiogenezy rozpoczyna się zaburzeniem równowagi między czynnikami pro- i antyangiogennymi. Za pierwszy, ogólny etap angiogenezy zatem można uważać wzrost stężenia czynników proangiogennych, np. naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu - VEGF (vascular endothelial growth factor) czy zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów - bFGF (basic fibroblast growth factor) [34,76]. Drugim etapem angiogenezy jest wzmocniona aktywność enzymów – metaloproteinaz znanych pod skrótem MMPs (matrix metalloproteinases), które przed inicjacją znajdują się w postaci proenzymów [46,55]. Umiejscowione są w macierzy pozakomórkowej oraz w okolicach błony podstawnej. Do zadań metaloproteinaz, takich jak kolagenazy stromelizyny bądź żelatynazy należy rozluźnienie i degradacja struktur błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej. Po działaniu wymienionych enzymów zmienia się struktura naczyń krwionośnych wskutek czego powstaje miejsce na jego nowe odgałęzienie. Jednocześnie dochodzi do aktywacji komórek śródbłonka i rozluźnienia struktury macierzy pozakomórkowej. Następuje rozszerzenie światła naczyń i zwiększenie miejsca do napływu migrujących komórek śródbłonka. Trzecim charakterystycznym etapem angiogenezy jest proliferacja i różnicowanie komórek śródbłonka znajdujących się w powstałych wskutek poprzednich procesów zdegradowanych naczyń krwionośnych. Na komórki śródbłonka naczyniowego wpływa również ich zdolność do adhezji i komunikacji międzykomórkowej. Migracja ECs (endothelial cells), czyli komórek śródbłonka naczyniowego do tych miejsc pozwala na rozrost kapilary i przejście do ostatniego etapu angiogenezy – dojrzwania i stabilizacji nowo powstałych naczyń krwionośnych [72].

Mechanizm angiogenezy w guzach nowotworowych różni się znacznie od procesu naturalnej waskulogenezy. Przede wszystkim wywołany nie tylko zmianami stężeń czynników angiogennych, ale środowiskiem, w którym naczynia powstają. Uważa się, że angiogeneza w raku jest wywołana przewlekłymi stanami zapalnymi i silnym niedotlenieniem. Hipoksja w tkance nowotworowej pojawia się w czasie jego rozwoju. Jest to natu-



ralne zjawisko wywołane rozrostem tkanki. W związku z budowaniem struktury nowotworu i silną proliferacją, do guza dociera coraz mniej cząsteczek tlenu i równowaga czynników pro- i antyangiogennych zostaje zakłócona. Tworzy się środowisko silnie stymulujące budowę nowych naczyń krwionośnych. Jest to jeden z procesów umożliwiający dalszy rozwój guza, a także jego rozprzestrzenienie się w organizmie, m.in. nowe narządy lub węzły chłonne, które przy zbyt dużym stężeniu komórek nowotworowych nie poradzą sobie z ich eliminacją. Stan tworzenia nowych naczyń krwionośnych, nazywany również przejściem angiogennym, objawia się w komórkach w trakcie nierównowagi między czynnikami proangiogennymi, a antyangiogennymi. W związku z tym, że wytwarzanie tych substancji w komórce odbywa się nieustannie, najmniejsze zaburzenie, które wynika np. ze stanu patologicznego jakim jest rozwój tkanki nowotworowej, powoduje nadmierne bądź zmniejszone tworzenie kapilar.

Należy pamiętać, że proces angiogenezy nie jest dokładnie poznany, a omówiony ogólny schemat ulega modyfikacjom zależnie od warunków powstawania naczynia krwionośnego. Istnieje więcej niż jeden model tworzenia nowych naczyń krwionośnych w karcynogenezie i każdy z nich, mimo że efekt końcowy jest taki sam, znacznie się od siebie różni. Dzieje się tak ze względu na różne podłoże genetyczne, jak również środowisko, w którym rozpoczyna się proces angiogenezy. Niżej omówiono poznane dotychczas modele tworzenia naczyń krwionośnych kończąc rozdział omówieniem czynników stymulujących angiogenezę i przedstawieniem różnic w fenotypie pierwotnego naczynia krwionośnego, a tego znajdującego się w rozrastającym się guzie nowotworowym.

KIEŁKOWANIE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Kiełkowanie komórek śródbłonka naczyniowego (endothelial sprouting) to jeden z najlepiej poznanych mechanizmów angiogenezy. Charakteryzuje się wzrostem i rozgałęzianiem istniejących już naczyń krwionośnych w kierunku strefy awaskularnej [35]. Omawiając skomplikowany proces, jakim jest sprouting, nie można również pominąć w jaki sposób działają na niego czynniki inicjujące. Na komórkach śródbłonka znajdują się swoiste receptory, które odbierając sygnał rozpoczynają lokalną przebudowę macierzy pozakomórkowej - ECM (extracellular matrix). Czynniki łączącymi się z receptorami mogą być substancje pochodzenia endo-, para- i autokrynnego. Endokrynnne czynniki aktywujące i inicjujące kiełkowanie naczyń pochodzą z układu krążenia, parakrynnne pojawiają się wskutek obecności komórek nowotworowych, podścieliska, makrofagów obecnych w środowisku bądź macierzy pozakomórkowej. Autokrynnne czynniki inicjujące to te wydzielane przez same komórki śródbłonka, na które działają.

Do czynników, które wpływają na inicjację procesu kiełkowania komórek śródbłonka zalicza się czynnik indu-

kowany hipoksją - HIF-1 α [1,27,44]. Jego nadekspresja w organizmie pojawia się podczas pogłębiających się warunków stresu metabolicznego wywołanego rozwojem nowotworu - w czasie hipoksji - czyli stanu nierównowagi między zapotrzebowaniem na tlen, a jego ilością dostarczaną do guza nowotworowego [43]. Wśród czynników wywołujących nadekspresję HIF-1 α wymieniana jest również kwasica. HIF uruchamia kaskadę ekspresji kolejnych czynników proangiogennych. Wśród nich można wymienić: płytkowy czynnik wzrostu B - PDGF-B (platelet-derived growth factor, type B), czynnik wzrostu hepatocytów - HGF (hepatocyte growth factor), angiopoetynę 2, łożyskowy czynnik wzrostu - PlGF (placental growth factor), naskórkowy czynnik wzrostu - EGF (epidermal growth factor) oraz głównego inicjatora i stymulatora angiogenezy - naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu - VEGF/VPF (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor). HIF-1 α pobudza też ekspresję syntazy tlenu azotu - eNOS (endothelial nitric oxide synthase). Enzym ten przez rozkład argininy uwalnia cząsteczki tlenu azotu, które wyraźnie rozszerzają światło naczyń krwionośnych umożliwiając tym wzmocnienie wydajności procesu angiogenezy.

Model Ausprunk-Folkman

Pierwszym etapem kiełkowania komórek śródbłonka, według hipotezy Ausprunka i Folkmana, jest miejscowa degradacja błony podstawnej od strony rozszerzonej żyłki, która znajduje się w obrębie nowotworu i jest wystawiona na bezpośrednie działanie któregoś z czynników proangiogennych. W wyniku tego procesu, połączenia międzykomórkowe śródbłonka osłabiają się i wywołują automigrację ECs do tkanki łącznej, w kierunku działającego na nie czynnika. Tworzenie światła nowego naczynia krwionośnego następuje w trakcie łączenia się dwubiegunowo komórek. Proces przypomina zlepianie się komórek z jednoczesnym przemieszczaniem się ich w formę wykrzywającego się sznura. Angiogeneza kończy się syntezą nowej błony podstawnej z jednoczesną migracją perycytów i komórek pochodzenia nieśródnabłonkowego w miejsce nowo utworzonego naczynia krwionośnego, a tym samym stabilizacją jego struktury [5].

Model Paku-Paweletza

W latach 90 ub.w. ogłoszono zmodyfikowaną wersję modelu Ausprunka i Folkmana. Paku i Paweletz udowodnili, że w początkowym etapie sproutingu dochodzi do rozszerzenia naczynia obecnego, co powoduje zmniejszenie gęstości błony podstawnej [66].

Rozszerzenie obecnego już naczynia krwionośnego zwiększa szansę na degradację owej struktury w miejscu połączenia z komórkami śródbłonka i uwypukla ściany naczynia krwionośnego w kierunku tkanki łącznej. Komórki śródbłonka, według Paku i Paweletza, migrują równolegle zachowując polaryzację struktury

błona podstawna–światło naczyń [66]. W czasie dynamicznego procesu powstaje swoista szczelina, która jest wydłużeniem światła naczyń macierzystego. Charakteryzuje się dobrą szczelnością, która wynika z natury tego procesu – w trakcie jego zachodzenia nienaruszane są połączenia międzykomórkowe, a ECs uwalniają białka, które tworzą nową błonę podstawną. Ostatnim etapem tworzenia nowych naczyń krwionośnych jest stabilizacja naczyń. Odbywa się to w wyniku migracji proliferujących komórek przydanki macierzystego naczyń, od miejsca tzw. pączkowania w kierunku końca nowo powstałego naczyń [75].

W tym modelu angiogenezy można zaobserwować, że komórki śródbłonna nie tracą polarności podczas angiogenezy. Jak wynika z powyższej analizy model Paku i Pawełtza zakłada, że do wystąpienia angiogenezy nowotworowej nie są potrzebne żadne zewnętrznie działające na naczynie czynniki odpowiedzialne za tworzenie światła naczyń [75].

Angiogeneza wgłobieniowa

Innym z poznanych modeli tworzenia naczyń krwionośnych jest angiogeneza wgłobieniowa (intussusceptive angiogenesis), zaobserwowana po raz pierwszy w szybko rozwijającej się kapilarze w płucach [32,53]. Występuje w wielu tkankach, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Jej cechą charakterystyczną jest szybkość, ponieważ cały proces tworzenia nowych kapilar zachodzi w przedziale godzin bądź minut. Polega na wpuklaniu ściany tkanki łącznej do wnętrza już istniejących naczyń krwionośnych [24]. Wpuklaniu tkanki łącznej towarzyszy tworzenie tzw. tissue pillars – kolumn tkankowych. Badania wykazały, że angiogeneza wgłobieniowa jest procesem wydajniejszym i szybszym niż kiełkowanie śródbłonna. Można więc stwierdzić, że jest to proces oszczędniejszy energetycznie [75]. Angiogeneza wgłobieniowa nie jest zależna od proliferacji komórek śródbłonna (jak dzieje się to w modelu endothelial sprouting), błony podstawnej i jej degradacji ani od stanu i oddziaływań z tkankami przylegającymi do naczyń [24]. Jednak najważniejszą cechą tego modelu jest jego zdolność do zwiększania skomplikowania i gęstości struktury kapilar znajdujących się w nowotworze bez ścisłego powiązania z proliferacją i różnicowaniem komórek śródbłonna. Angiogeneza wgłobieniowa może zapewnić większą powierzchnię do dalszego tworzenia kapilar, co sprzyja rozrostowi guza nowotworowego [24].

Proces rozpoczyna się od zmiany struktury naczyń krwionośnego macierzystego na obszerniejsze. To wydłuża komórki śródbłonna, stają się cieńsze i gdy przyjmą symetryczne położenie na przeciwległych ścianach naczyń krwionośnego rozpoczyna się proces wpuklania. Tworzące się wpuklenia kontaktują się w miejscach nazwanych „kissing contacts”. Gdy dojdzie do styku wpukleń ECs łączą się z komórkami ściany przeciwległej. Angiogeneza wgłobieniowa kończy się rozrastaniem kolumny, a towarzyszy temu migracja

perycytów i miofibroblastów, które wytwarzają niezbędne do utrwalenia struktury włókna kolagenowe.

Angiogeneza kłębuszkowa

Innym mechanizmem tworzenia kapilar jest angiogeneza kłębuszkowa (glomeruloid angiogenesis), którą zaobserwować można najczęściej w glejakomięsakach wielopostaciowych [81]. Wiele badań potwierdza, że tworzenie się tego typu struktur – ciałek kłębuszkowych – świadczy o złym rokowaniu, głównym stymulatorem tego procesu jest VEGF.

Angiogeneza kłębuszkowa rozpoczyna się od bezpośredniego działania VEGF na naczynie macierzyste. W czasie tego procesu zwiększa swój obszar, jego ścianki stają się tym samym cieńsze i wrażliwsze na degradację. Podczas tworzenia ciałek kłębuszkowych *in vivo* obserwuje się wyraźny rozrost naczyń już w ciągu kilku dni zarówno do wewnątrz, jak i na zewnątrz obecnej kapilary. Skupiska komórek śródbłonna, bezpośrednio zaawansowanych w ten proces, rozrastają się w stronę tkanki łącznej okalającej miejsce występowania procesu, a także w kierunku komórki wydzielającej dany czynnik wzrostu - VEGF. Migracja komórek śródbłonna jest połączona również z wydzielaniem i przemieszczaniem się białek błony podstawnej. Komórki EC w następnym etapie tworzą światło naczyń i gdy proces zachodzi prawidłowo są okalane perycytami. W trakcie całego procesu zaobserwowano także napływ makrofagów, ale zjawisko to nie jest dokładnie wyjaśnione. Wiadomo jednak, że rozpoczyna się po około 7 dniach i koncentruje na obrzeżach utworzonych struktur. Tak zbudowane naczynie zostają połączone przez perycyty, zazwyczaj nie oddalając się od siebie i tworząc strukturę skupionych kapilar. Utworzone naczynie krwionośne często są zbyt małej średnicy, co utrudnia przepływ krwi [2,50,84].

Mimikra naczyńiowa

Mimikrą nazywa się zdolność obronnego upodabniania się organizmów do innych, bardziej niebezpiecznych osobników. Takie też zjawisko zaobserwowano w czasie badań nad czerniakami. Udowodniono obecność swoistej sieci naczyń, która transportowała płyny w obrębie nowotworu. Były to pierwsze potwierdzenia obecności tzw. mimikry naczyńiowej (vascular mimicry). „Jest to unikatowa zdolność komórek nowotworów złośliwych do ekspresji fenotypu ECs i formowania struktur podobnych do naczyń” [75]. Mimikrę naczyńiową zaobserwowano dotąd w wielu nowotworach, zarówno niezłośliwych, jak złośliwych. Oprócz przyjmowania fenotypu komórek śródbłonna, komórki nowotworowe mogą upodabniać się również do angioblastów, przydanki, fibroblastów, leukocytów i makrofagów. Zapewnienie odpowiedniej podaży tlenu i substancji odżywczych do rozwijającego się nowotworu, bezpośrednio jest skorelowane z jego rozwojem i brakiem miejsc nekrotycznych w jego strukturze, dlatego też obecność takiego typu pseudonaczyń przenoszących płyny wiąże się z dużą śmiertelnością



wśród pacjentów [6,17,32].

Wbudowywanie naczyń krwionośnych gospodarza

Nowotwory często zamiast stymulacji do tworzenia nowych naczyń krwionośnych *de novo* wykorzystują system kapilar gospodarza do zaopatrywania się w substancje odżywcze. Ten rodzaj angiogenezy, nazywa się wbudowywaniem naczyń krwionośnych gospodarza (vessel co-option; ryc. 1), jest opisywany jako jeden z trzech najgroźniejszych typów tworzenia nowych kapilar w guzach nowotworowych. Razem z mimiokrą naczyniową i angiogenezą kłębuszkową opisywany typ angiogenezy świadczy zazwyczaj o dużym ryzyku wytworzenia przerzutu. Vessel co-option zaobserwowano zarówno w rakach pierwotnych, jak i wtórnych. Model wbudowywania kapilar gospodarza do tkanki nowotworowej po raz pierwszy zlokalizowano w raku mózgu, który ma najbardziej rozbudowane sieci naczyń krwionośnych w ciele ludzkim [55,56].

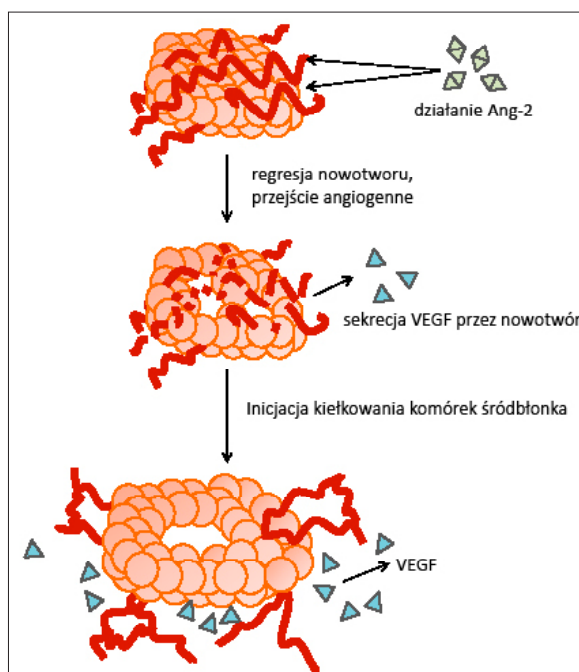
Wbudowanie naczyń krwionośnych gospodarza do nowotworu rozpoczyna się wydzielaniem angiopoetyny-2 przez pierwotne naczynia krwionośne. Substancja destabilizuje obecne naczynia i powoduje ich zanik [90]. Zaistniała przez degradację naczyń krwionośnych hipoksja stymuluje komórki nowotworowe do wytwarzania VEGF. Sygnał zapoczątkowuje proces kiełkowania komórek śródbłonna i tym samym wytwarzanie większej liczby naczyń krwionośnych w tkance nowotworowej.

CZYNNIKI STYMULUJĄCE ANGIOGENEZĘ

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu - VEGF

Jednym z głównych regulatorów procesu angiogenezy jest wytwarzany przez niedotlenione komórki czynnik wzrostu śródbłonna naczyń - VEGF [8]. Jest to cytokina działająca stymulująco zarówno na komórki śródbłonna naczyniowego, które są odpowiedzialne za budowę pierwotnego naczynia krwionośnego, jak również na naczynie macierzyste. Jest związkiem o typowym działaniu proangiogennym, jest homodimerem o masie cząsteczkowej 46-48 kDa. Występuje w postaci glikozylowanej [8,51]. Do rodziny białek VEGF oprócz głównego VEGF-A zalicza się homologi VEGF-B, -C, -D, -E, a także łożyskowy czynnik wzrostu - PlGF, który jest pierwszym opisanym czynnikiem homologicznym do VEGF mającym dwie izoformy - typu B i BB. Wymienione homologi VEGF mają podobną budowę strukturalną, jednak różnią się funkcjami biologicznymi. Rozbieżności między tymi substancjami dotyczą zazwyczaj miejsca ich ekspresji i jej intensywności, a także stopniem powinowactwa do receptorów kinaz tyrozynowych. Można przyjąć, że nakładające się funkcje homologów VEGF są związane z ich interakcjami z receptorami powierzchniowymi komórek, na które działają [90].

Głównymi receptorami zaangażowanymi w odbieranie sygnału inicjującego kaskadę zdarzeń w odpowiedzi



Ryc. 1. Działanie angiopoetyny-2 wywołuje degradację naczyń krwionośnych i tym samym pojawienie się miejsc nekrotycznych, a także stanu zapalnego w nowotworze. Uruchomione zostaje ponowne wydzielanie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), który na nowo inicjuje endothelial sprouting

na czynnik wzrostu śródbłonna są VEGFR-1 (wcześniej nazywany Flr-1), VEGFR-2 (początkowo KDR) i VEGFR-3 (wcześniej Flr-3). Wszystkie trzy z wymienionych receptorów błonowych należą do grupy kinaz tyrozynowych [90]. Podczas badań nad działaniem VEGF udowodniono, że oprócz trzech odmian receptora tyrozynowego istnieją dodatkowe zaangażowane w odbiór sygnału receptory, takie jak neuropiliny [80]. Każda postać receptora kinaz tyrozynowych spełnia odmienne funkcje w procesie odbierania sygnału VEGF [78,90].

Do zadań naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu należy zwiększenie przepuszczalności (przez zwiększenie średnicy) kapilary, pobudzenie ECs do szybszego dzielenia się, aktywacja syntazy nadtlenu azotu - eNOS (endothelial nitric oxide synthase), a także wzrost wytwarzania metaloproteinaz. VEGF ochrania również powstające naczynie krwionośne przed degradacją blokując sygnały apoptozy.

Wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonna - VEGF - jest rygorystycznie kontrolowane. Jest on tak krytycznym i znaczącym regulatorem procesów tworzenia naczyń krwionośnych, że każda jego dawka musi być kontrolowana pod względem ilościowym i czasowym, by uniknąć stałych dysfunkcji w organizmie. Każda pomyłka w wydzielaniu tego związku powoduje drastyczne zmiany w procesach kontrolujących tworzenie naczyń krwionośnych. Gen kodujący VEGF-A znajduje się na chromosomie

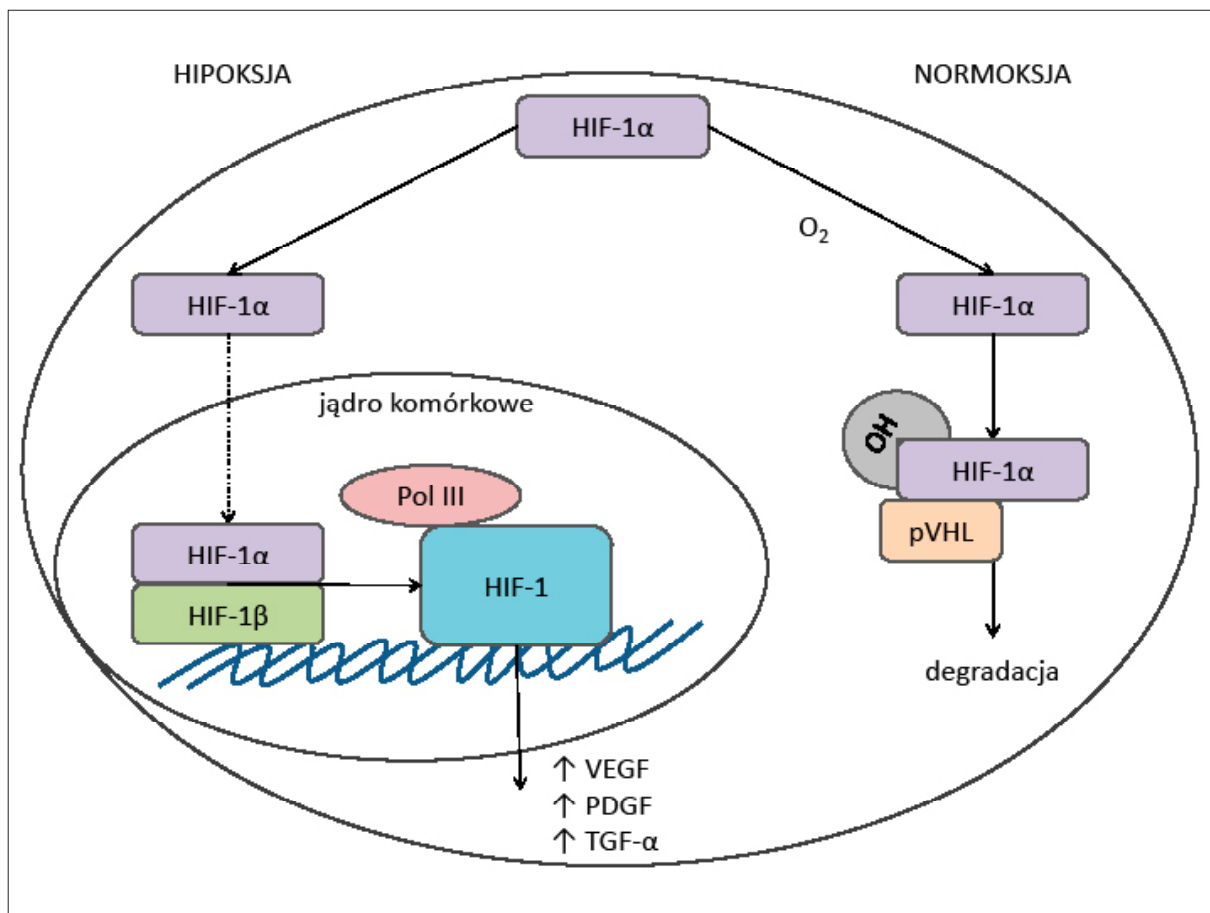
6p21.3 i składa się z ośmiu eksonów, które są oddzielone siedmioma intronami [8]. W 1995 r. zajęto się analizą genu VEGF i wykazano, że w budowie jego regionu promotorowego istnieje sekwencja o wysokiej homologii do miejsca wiążącego czynnik wzbudzany hipoksją – HIF-1 α i udowodniono, że związanie tej cząsteczki w tym miejscu stymuluje rozpoczęcie ekspresji VEGF [33]. Obniżenie ciśnienia parcjalnego w komórce jest jednym z głównych stanów, występujących w stanach fizjologicznych i patologicznych, prowadzących do stymulacji ekspresji VEGF.

Czynnik indukowany hipoksją – HIF

Badania nad naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu – VEGF – udowodniły niezaprzeczną korelację ekspresji VEGF zależnej od stanu hipoksji. Podczas niedotlenienia komórek, zarówno w stanach fizjologicznych i patologicznych, komórki produkują związek zwanym czynnikiem indukowanym hipoksją (ryc. 2).

HIF-1 jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek – HIF-1 α (o masie 120 kDa) i HIF-1 β (o masie 91, 93 bądź 94 kDa). Połączenie dwóch jednostek powoduje aktywację związku i prowadzi to do włączenia funkcji

regulacyjnej HIF. HIF kontroluje około 40 genów, które można sklasyfikować jako geny kontroli dostarczenia tlenu, metabolizmu glukozy czy przeżycia komórki [77]. HIF-1 to białko o aktywności czynnika transkrypcyjnego wiążący się do DNA i regulujący ekspresję genów [43]. Związanie następuje z cis-aktywnym elementem HRE (hypoxia response element) znajdującym się w regionie ludzkiego genu EPO – kodującego erytropoetynę. Kontrola ekspresji czynnika indukowanego hipoksją jest jednym z najlepiej poznanych molekularnie procesów zależnych od stężenia tlenu cząsteczkowego. Podjednostka HIF-1 β jest konstytutywnie poddawana ekspresji i nie jest zależna od żadnych czynników. Tymczasem akumulacja podjednostki HIF-1 α charakteryzuje się wykładniczym wzrostem w czasie obniżania się stężenia tlenu w komórce. Synteza podjednostki HIF-1 α zachodzi nieustannie w warunkach normoksji. W czasie prawidłowego wysycenia tlenem komórki HIF-1 α poddawane są procesowi ubiquitynacji i degradacji. Ciągła synteza pozwala zatem na szybką i skoncentrowaną reakcję na pojawienie się stanu hipoksji. W warunkach niedotlenienia degradacja podjednostki zostaje zahamowana, co powoduje nagromadzenie się tego czynnika w komórce. W takich warunkach zachodzi dimeryzacja dwóch obec-



Ryc. 2. Podjednostka HIF-1 α syntezowana jest w warunkach tlenowych. Hydroksylaza, która odpowiedzialna jest za przyłączenie cząsteczki OH⁻, a tym samym czynnika von Hippel-Lindaua przekierowuje podjednostkę α na drogę degradacji przez naznaczenie jej struktury ubiquityną. W warunkach niedotlenienia następuje akumulacja podjednostki α , co powoduje jej translokację do jądra komórkowego. Łączenie się HIF-1 α i HIF-1 β prowadzi do stworzenia pełnoprawnego heterodimeru czynnika wzbudzanego hipoksją – HIF-1. Reguluje on około 40 genów odpowiedzialnych między innymi za tworzenie VEGF, PDGF, TGF- α



nych w komórce czynników – HIF-1 α i HIF-1 β – łączenia się ich do miejsca HRE i aktywacją transkrypcji.

Czynnik wzbudzany hipoksją jest jednym z najważniejszych czynników proangiogennych, działa zarówno na komórki śródbłonna, jak i na komórki go wytwarzające, w tym komórki nowotworowe. Jest o tyle znaczącym proangiogenem, ponieważ jego pojawienie się stymuluje nadekspresję innych czynników proangiogennych. Do nich zalicza się m.in. omawiany wcześniej naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF i jego homolog łożyskowy czynnik wzrostu – PlGF, naskórkowy czynnik wzrostu – EGF, czynnik wzrostu hepatocytów – HGF, pochodzącego z płytek czynnika wzrostu B – PDGF-B i angiopoetynę-1 [15,28,37].

Angiopoetyna-1 – Ang-1

Angiopoetyna-1 – Ang-1 (angiopietin-1) należy do rodziny angiopoetyn – związków bezpośrednio zaangażowanych w kontrolę stabilizacji nowo utworzonych naczyń krwionośnych. Jest związkiem o masie cząsteczkowej 70 kDa [22] i jest czynnikiem o działaniu proangiogenym. Wszystkie angiopoetyny są zbudowane z dwóch domen, które objawiają różne funkcje – wiążącą i aminokońcową. Domena wiążąca, karboksykońcowa jest odpowiedzialna za łączenie się struktury angiopoetyny z receptorem, a aminokońcowa umożliwia aktywację receptora i rozpoczęcie przeniesienia sygnału. Ang-1 jest ligandem receptora o aktywności tyrozynowo kinazowej typu Tie-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1), który jest eksponowany przeważnie na komórkach śródbłonna naczyniowego. Angiopoetyna ulega ekspresji zazwyczaj na komórkach układu krwionośnego, takich jak perycyty, ECs, a także innych np. fibroblasty, komórki mięśni gładkich. Ekspresja angiopoetyny-1 jest regulowana pojawieniem się czynnika HIF-1 w środowisku. Gen angiopoetyny znajduje się na chromosomie 8 i jego transkrypcja jest regulowana wymienionym czynnikiem wzbudzany hipoksją. Połączenie Ang-1 z receptorem Tie-2 powoduje jego autofosforylację, która stymuluje komórki śródbłonna naczyniowego do proliferacji i udziału w stabilizacji naczynia krwionośnego [61,74,91].

Czynniki hamujące angiogenezę

Poznano ponad 20 rodzajów czynników antyangiogennych. Ze względu na rodzaj ich działania podzielono je na podgrupy: cytokin, inhibitorów angiogenezy, antagonistów czynników proangiogennych oraz polipeptydy antyangiogenne. Czynniki antyangiogenne można również podzielić ze względu na miejsce ich powstawania – na egzogenne i endogenne. Najważniejszymi z czynników antyangiogennych są angiopoetyna-2, która jest naturalnie występującym antagonistą angiopoetyny-1, angiostatyna, endostatyna, a także trombospodyna.

Angiopoetyna-2 – Ang-2

Angiopoetyna-2 należy do rodziny angiopoetyn, liczącej 4 czynniki bezpośrednio zaangażowane w tworzenie

naczyń krwionośnych, a właściwie w stabilizację nowo utworzonej kapilary. Jest związkiem o wielkości podobnej do Ang-1 - 70 kDa. Wszystkie czynniki z tej rodziny wiążą się do receptora Tie-2 i kontrolują sygnały stabilizacji naczyń krwionośnych. Ang-2 jest antagonistą działania Ang-1 z receptorem Tie-2 [10,31,63,64]. Mimo udowodnionego działania antyangiogennego zaobserwowano zmianę profilu jej działania w obecności czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF [8]. Angiopoetyna-2 powoduje uplastycznienie obecnych naczyń krwionośnych, a do skutków jej działania zalicza się zarówno regresję naczynia, jak i inicjację przebudowy obecnego naczynia. Angiopoetyna-2 w obecności VEGF jest czynnikiem inicjującym apoptozę w komórkach śródbłonna naczyniowego, powoduje tym samym regresję obecnych naczyń krwionośnych [69].

CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORU – TNF- α

Czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor), nazwany również kachektyną, TNF - jest białkiem błonowym w postaci homotrimeru o wielkości 17 kDa, gen tego białka znajduje się na chromosomie 6. Do nadrodziny cząsteczek TNF zalicza się aż 22 cząsteczki, w czym najważniejsze to TNF- α i TNF- β . Rodzinę białek TNFRSF (tumor necrosis factor superfamily) umiejscawia się w niemal wszystkich komórkach ciała człowieka, co wskazuje na ich ważność i dużą liczbę procesów, w których biorą udział. Receptorami tych cząsteczek jest grupa TNFRSF znajdujących się na większości komórek w organizmie ludzkim.

Do odkrycia czynnika martwicy nowotworu przyczynił się bezpośrednio William Bradley Colley – nowojorski chirurg, który u pacjentów z *sarcomas* zauważył bardzo ważną korelację między przebyciem ostrych zakażeń bakteryjnych, a remisją nowotworu. Rozpoczęły się badania, dzięki którym odkryto pierwsze właściwości tej cząsteczki. Podawane pacjentom toksyny Coleya – wywoływały reakcję immunologiczną, która oprócz typowych objawów walki organizmu z antygenami bakteryjnymi, objawiała się także wzmożonym wytwarzaniem interleukin i TNF- α . Pozwoliło to na stwierdzenie, że wydzielanie TNF- α powoduje regresję nowotworu przez uszkodzenie naczyń krwionośnych w jego strukturze.

Jednak mimo działania antyangiogennego istnieją dowody, że kachektyna może być również czynnikiem stymulującym tworzenie naczyń krwionośnych. Doświadczenia przeprowadzane na myszach wskazały, że czynnik martwicy nowotworu ma przeciwstawne działanie angiogenne zależne od podanej dawki [29].

Trombospodyny - TSP

Rodzinę genów białek trombospodyn (thrombospondins) dzieli się według ich molekularnych właściwości na podrodzinę typu A i B. Podrodzina A to trimery TSP-1 i TSP-2, TSP-3, TSP-4 i TSP-5 nazwaną również jako COMP (cartilage oligomeric matrix protein) zalicza

się do grupy B i charakteryzuje jako pentamery. Ekspresja danej podrodziny i danego typu trombospondyn jest zależna od typu tkanki.

Trombospondyny działają antyangiogenne, które udowodniono w wielu pracach naukowych [48,49]. Rodzina TSP działa w dwojaki sposób – bezpośrednio bądź pośrednio. W działaniu bezpośrednim unicestwiają komórki śródbłonna naczyniowego, skutecznie blokując tworzenie się nowych naczyń krwionośnych, a w działaniu pośrednim obserwuje się ich inhibicję angiogenezy przez dezaktywację receptorów czynników proangiogennych. Udowodniono również, że TSP-2 i TSP-1 bezpośrednio blokują transkrypcję genów metaloproteinaz – enzymów degradujących naczynia krwionośne. Rodzina czynników TSP wiąże się do receptorów typu TSP/CD36 znajdujących się na błonie zewnętrznej komórek uruchamiając szlak sygnalizacyjny powodujący degradację komórek ECs [47,67].

NACZYNNIA KRWIONOŚNE W NOWOTWORZE

Naczynia krwionośne, które powstają w sposób prawidłowy w warunkach fizjologicznych, mają trójwarstwową strukturę, na którą składa się błona zewnętrzna, środkowa i wewnętrzna. Błony środkowa i wewnętrzna są zbudowane z komórek mięśni gładkich i włókien elastycznych. Błona wewnętrzna składa się z komórek śródbłonna, które tworzą jednowarstwową, spolaryzowaną wyściółkę, często mając rozbudowaną strukturę glikokaliksu na powierzchni od strony światła naczynia [86]. Natomiast naczynia krwionośne w nowotworze są zbudowane z innych komponentów. Zmiany dotyczą głównie błony zewnątrzkomórkowej, gdzie obserwuje się większą zawartość kwasu hialuronowego, a także mniejszą zawartość usiarczanowanych proteoglikanów niż w prawidłowym naczyniu krwionośnym. Podczas powstawania naczyń krwionośnych stymulowanych przez nowotwory pojawia się dużo błędów, co wiąże się bezpośrednio z mniejszą precyzją budowania struktury. Wskutek szybkiego budowania naczynia obserwuje się zmiany strukturalne, wśród których charakterystycznymi są poszerzenie światła naczynia, krętość struktury, a także większe rozgałęzienie sieci i większą liczbę połączeń tętniczo-żylnych, co ułatwia komórkom nowotworowym metastazę. Naczynia dysfunkcyjne nie są unerwione i ich błona podstawa jest lepiej przepuszczalna. Zmiany warunkują również zmniejszone dostarczanie tlenu i pojawienie się warunków do hipoksji.

Jednak, mimo że naczynia krwionośne pod względem morfologicznym różnią się od powstających w warunkach fizjologicznych, jak dotąd nie udowodniono, by na ich powierzchni prezentowane były inne antygeny [38,39,40,68]. Do antygenów występujących zarówno na kapilarach dysfunkcyjnych - nowotworowych, jak i prawidłowych, należą czynnik von Willebranda, CD31, CD34 i Ulex I [40, 68]. W związku z tym można stwierdzić, że brak odpowiedzi układu immunologicznego w stosunku

do nowo tworzących się naczyń krwionośnych jest uzasadniony. Nie istnieje bowiem żaden bodziec, który alarmowałby komórki układu immunologicznego do obrony.

KLINICZNE ZNACZENIE ANGIOGENEZY

Metody, takie jak radioterapia bądź chemioterapia są najczęstszymi terapiami przeciwnowotworowymi. Mają jednak dużo wad, głównie dotyczących działania na cały organizm. W związku z tym rozpoczęto opracowanie leków o działaniu celowanym na komórki nowotworowe zmniejszając tym samym pojawianie się działań niepożądanych typowych w chemioterapii. Obecnie wiele badań skupia się na procesie angiogenezy, który niezaprzeczalnie promuje powstawanie przerzutów w większości typów nowotworów. Stosowanie leków zawierających czynniki antyangiogenne skutecznie obniża tworzenie się naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych i powodowało obniżenie ryzyka wznowy nowotworu i tworzenia przerzutów.

SZPICZAK MNOGI

Pierwszym z omawianych przykładów klinicznych nowotworów jest szpiczak mnogi charakteryzujący się klonalnym rozrostem komórek plazmatycznych w szpiku kostnym o dużym odsetku śmiertelności [23]. Etiologia MM (multipły myeloma) jest nieznaną, a średnia wieku, w którym rozpoznaje się chorobę to 60-70 lat. Szpiczak stanowi 1% wszystkich nowotworów, a do czynników ryzyka zalicza się głównie narażenie zawodowe na substancje chemiczne oraz promieniowanie jonizujące [79]. Oprócz charakterystycznej zmiany plazmacytów, do objawów występujących w MM zaliczono: obecność gammaglobuliny (IgG lub IgA) w surowicy bądź w moczu, zmniejszenie się liczby immunoglobulin, wydzielanie cytokin proangiogennych i prozapalnych oraz występowanie chorób litycznych kości [79]. Czynniki proangiogenne, pojawiające się w szpiku i w surowicy chorego, są wytwarzane z komórki szpiczaka – czyli komórki plazmatyczne z obecną już mutacją, a także komórki występujące w szpiku kostnym. Angiogeneza jest stałym objawem patomorfologicznym w karcynogenezie szpiczaka mnogiego, a doświadczenia nad blokowaniem bądź unieszkodliwianiem czynników stymulujących, takich jak VEGF, bFGF czy HGF podniosłyby skuteczność opracowywania przyszłych terapii przeciwnowotworowych.

W związku z istnieniem dwóch postaci szpiczaka mnogiego – przewaskularnej i waskularnej – można wnioskować, że do rozwinięcia się pełnoobjawowego MM potrzebny jest proces angiogenezy [23]. Do czynników regulujących przejście fazy awaskularnej w waskularną pełnoobjawową szpiczaka mnogiego zalicza się VEGF, HIF-1 α , bFGF, PDGF, cytokiny hemopoetyczne, takie jak GM-CSF i G-CSF, a także przez sekrecję immunoglobulin, takich jak IL-1, -6, -8 bądź IL-17.

Lekiem o charakterze antyangiogennym, którego działanie udowodniono w terapii szpiczaka mnogiego, jest



talidomid [18,23,25]. Jest to lek najczęściej stosowany do walki z pełnoobjawowym MM, odpowiedź na jego działanie obserwuje się u około 80% pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym nowotworem. Tak wysoki współczynnik odpowiedzi na leczenie jest spowodowany wielokierunkowością, którą wykazuje Talidomid. Udowodniono jego działanie hamujące w stosunku do cytokin proangiogennych – objawiające się inhibicją ich sekrecji przez komórki szpiczaka oraz komórki podścieliska [18]. Współdziałanie między komórkami szpiczaka a komórkami stromalnymi odbywa się za pomocą cząsteczek adhezyjnych o charakterze międzykomórkowym oraz naczyniowym i przyczynia się to do stymulacji procesu angiogenezy. Talidomid zmniejsza ich ekspresję osłabiając współdziałania komórek szpiczakowych ze stromalnymi. Zmienia także profil sekrecji cytokin, stymuluje wydzielanie IL-2 przez obecne w środowisku limfocyty Th1. Przez to działanie dochodzi również do napływu komórek NK do miejsca działania i limfocytów CD8+. Oprócz działania stymulującego odpowiedź układu immunologicznego wpływa również na komórki nowotworowe indukując w nich proces apoptozy.

RAK JASNOKOMÓRKOWY NERKI

Jednym z przykładów nowotworu, w walce z którym wykorzystuje się leczenie antyangiogenne jest rak jasnokomórkowy nerki – RCC (renal cell carcinoma). Jest najczęściej występującym rakiem nerki spośród poznanych dotychczas typów histologicznych – aż 70-75% zachorowań przypada na ten typ nowotworu [21]. Średni wiek wykrycia raka nerki wynosi 64 lata, a ryzyko wystąpienia choroby jest większe u płci męskiej. Do czynników ryzyka zalicza się niezdrowy styl życia, w tym palenie tytoniu i otyłość, a także wysokie ciśnienie krwi. Udowodniono również, że wpływ substancji, takich jak kadm, herbicydy i inne o pochodzeniu organicznym np. trichloroetylen stymuluje rozwój raka nerki. Oprócz czynników środowiskowych wyróżniono czynniki genetyczne, które zwiększają ryzyko zachorowania. Z powstawaniem nowotworów, w tym nowotworów nerki, niezaprzeczalnie łączy się inaktywacja genu supresorowego von Hippel-Lindau (VHL) [19,87].

Leczenie chorych z nowotworem nerki obejmuje przede wszystkim metody chirurgiczne, głównie radykalną nefrektomię, usunięcie zmienionej nowotworowo nerki wraz z poblisko ulokowanymi węzłami chłonnyymi [45]. W związku z tym, że leczenie polega głównie na nefrektomii, niezbędnym zdaje się opracowanie skutecznej terapii uzupełniającej w celu zmniejszenia ryzyka, zwłaszcza biorąc pod uwagę pojawianie się częstych nawrotów choroby po zabiegu chirurgicznym. Przerzuty występują u 30% pacjentów poddanych nefrektomii i dotyczą głównie węzłów chłonnych, płuc i wątroby. Włączenie leczenia farmakologicznego, immunoterapii, następuje po ocenie prognostycznej nowotworu. Udowodniono jednak, że immunoterapia cytokinami polegająca na stosowaniu m.in. IL-2 czy interferonu- α (IFN- α), jest mniej skuteczna niż terapia lekami ukierunkowanymi molekularnie [26,92].

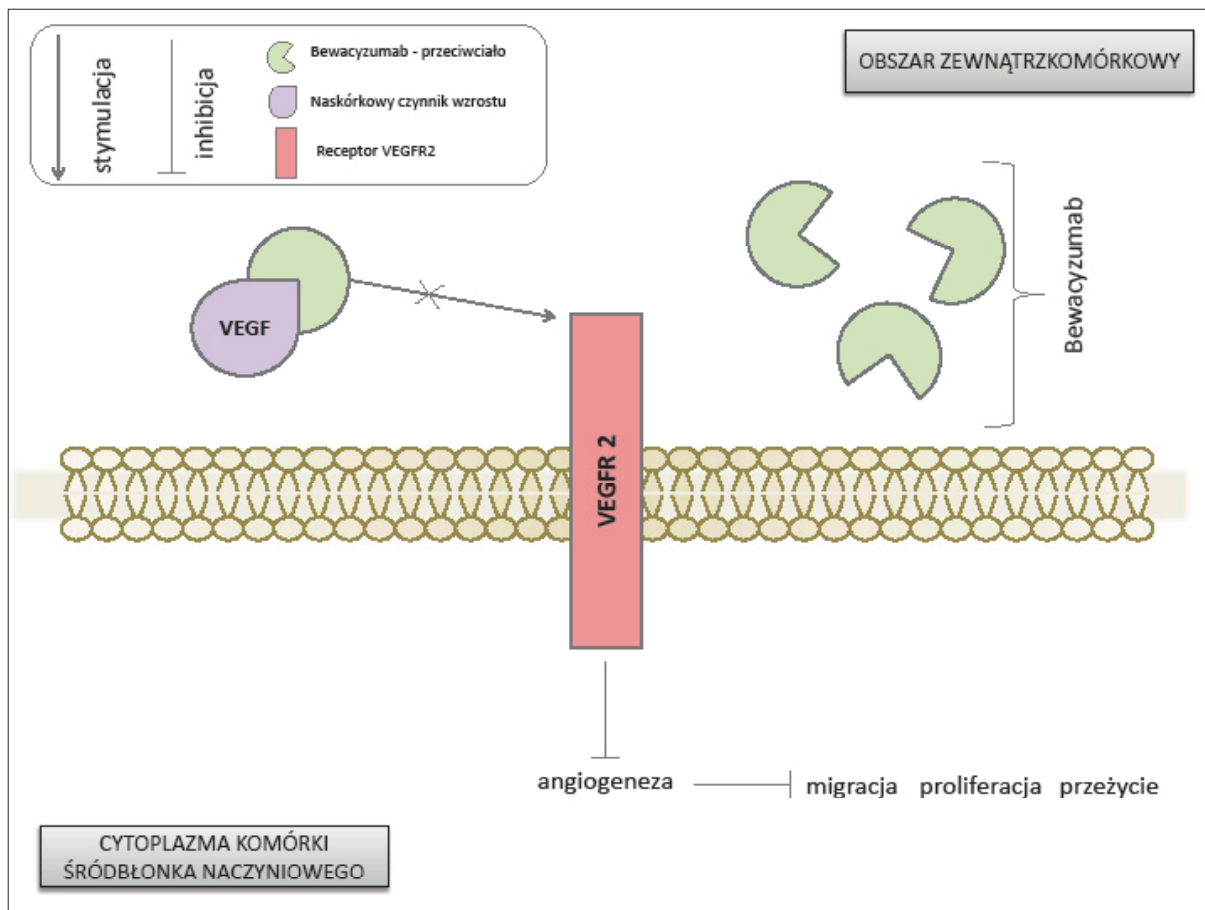
Obecnie w celowanej terapii antyangiogennej jasnokomórkowego raka nerki stosuje się Sorafenib, Sunitinib, Bewacyzumab, Ewerolimus i Temezirolimus [11,21,92]. Stosowanie tych molekularnie ukierunkowanych leków jest uzależnione od stanu pacjenta, rokowań i wyników poprzednio stosowanych terapii. Sunitinib i Sorafenib polegają na inhibicji aktywności receptorów kinaz tyrozynowych, a także receptorów kinaz serynowo/treoninowych – C-Raf i B-Raf. Blokują selektywnie receptory, takie jak PDGF-R i VEGFR, a także FLT-3 i Kit. Stosowane są zazwyczaj po nieudanej terapii cytokinami i są lekami podawanymi doustnie.

Innym działającym preparatem jest Bewacyzumab (ryc. 3), który jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1. Jego działanie polega na swoistym wiązaniu się z cząsteczką naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu i tym samym działając zapobiegawczo przed wiązaniem się go do receptorów kinaz tyrozynowych. Neutralizuje izoformy VEGF, głównie występującą najczęściej - VEGF-A. Jest preparatem podawanym dożylnie, często łączonym w terapii z IFN- α [87,92].

RAK TRZUSTKI

Ostatnim z omawianych rodzajów nowotworów jest rak trzustki, jeden z najzłośliwszych guzów nowotworowych o bardzo wysokiej śmiertelności [36]. Według badań statystycznych prowadzonych wśród chorych na raka nerki wynika, że częściej chorują na nie mężczyźni, a większość przypadków występuje powyżej 65 roku życia [62]. Etiologia raków trzustki nie jest znana, wiadomo jednak, że na powstawanie zmian o tym charakterze wpływa wiele czynników genetycznych i środowiskowych. Do pierwszej grupy zalicza się zespoły chorób objawiających się przewlekłymi zapaleniami tego narządu, m.in. dziedziczne zapalenie trzustki (hereditary pancreatitis) bądź chorobami dotyczącymi mutacji w obrębie genów supresorowych, np. zespół Peutza-Jeghersa, FAMMM (familia atypical multiple mole melanoma syndrome) bądź zespół HBOC (hereditary Breast and ovarian cancer). Do czynników środowiskowych zaliczono palenie tytoniu, otyłość i nieodpowiednią dietę, cukrzycę, a także należące do ryzyka zawodowego substancje, takie jak pochodne ropy i węglowodory.

Leczenie chorych z nowotworem trzustki obejmuje głównie metody chirurgiczne. Wśród mniej popularnych znajdują się metody ablacyjne, a także chemioterapie i immunoterapie. Do leków o charakterze antyangiogennym, które znajdują się obecnie w fazie badań klinicznych zalicza się Bevacizumab, Sunitinib, Sorafenib, Temezirolimus, a także Cetuximab [62]. Przeważnie skupiają się na blokowaniu działania VEGF i receptorów VEGF-A. W terapiach antyangiogennych pojawiły się też leki o działaniu inhibicyjnym w stosunku do receptora EGFR (epidermal growth factor receptor). Receptor naskórkowego czynnika wzrostu należy do rodziny receptorów HER (human epidermal growth factor receptors) i ma aktywność kinaz tyrozynowych. Połączeniu się liganda z receptorem



Ryc. 3. Łączenie się przeciwciała - Bewacyzumabu - do naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu uniemożliwia jego wiązanie z domeną zewnętrzną kinazy tyrozynowej. Aktywacja nie następuje, co równoznaczne jest z zablokowaniem jego aktywności

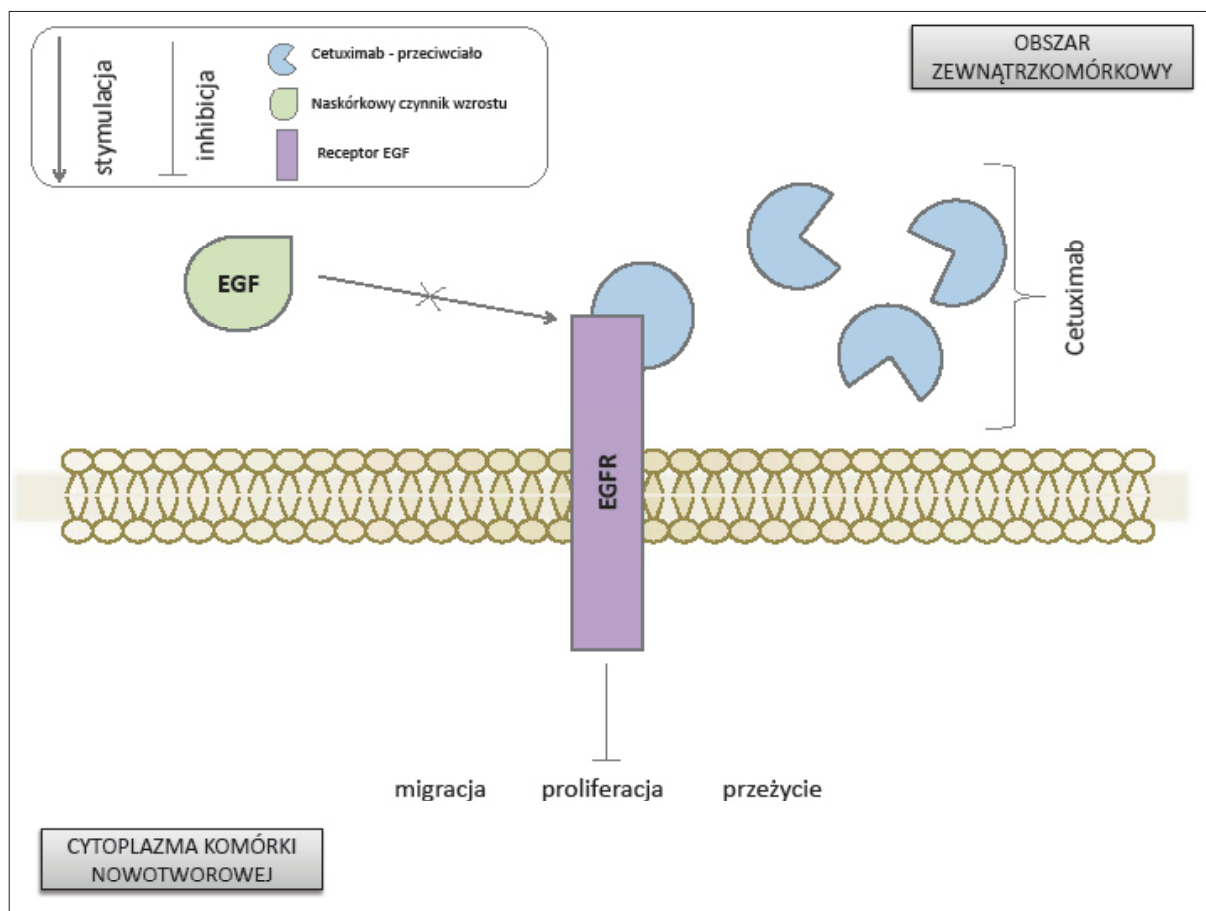
towarzyszy homodimeryzacja bądź heterodimeryzacja z innym receptorem tej rodziny występującym na błonie zewnętrznej komórki, ich aktywacją przez fosforylację, a tym samym uruchomienie kaskady sygnałowej promującej proliferację komórek nowotworowych [59].

Opracowano dwie metody blokowania aktywności receptora naskórkowego czynnika wzrostu – EGFR (ryc. 4). Pierwsza polega na blokowaniu łączenia się liganda EGF z EGFR za pomocą przeciwciał w stosunku do EGFR, druga na hamowaniu fosforylacji receptorów za pomocą małych inhibitorów kinaz tyrozynowych – TKIs (small molecular tyrosine kinase inhibitors). Rak trzustki jest jednym z wielu raków ujawniających się nadekspresją EGFR, w związku z tym opracowane techniki blokowania sygnału EGF będzie zapewne skuteczne. Lekami skierowanymi bezpośrednio na rodzinę HER i tym samym na receptory EGF są Cetuximab i Gemcitabine, które w 2004 r. połączono, by sprawdzić ich wielokierunkowe działanie w raku trzustki [88]. Cetuximab jest chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym stworzonym dzięki fuzji mysiego zmiennego regionu przeciwciała M225 o działaniu anti-EGFR z częścią stałą ludzkiej immunoglobuliny IgG1 [88]. W wyniku fuzji powstałe przeciwciało ma duże powinowactwo i swoistość do EGFR i tym samym obniża immunogenność [88].

ZALETY I WADY TERAPII ANTYANGIOGENNYCH

Terapie antyangiogenne cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na wiele zalet, a także dobrze prognozującymi badaniami klinicznymi. Opracowanie personalnej, wybranej specjalnie pod kątem pacjenta terapii przeciwnowotworowej jest obecnie celem terapii stosowanych w klinice. Dzieje się tak ze względu na unikalność każdego z nowotworu wynikającej z jego heterogenności, częstych mutacji. Coraz częściej lekarze starają się ograniczać metody inwazyjne wprowadzając dodatkowe, uzupełniające terapie, takie jak immunoterapia bądź terapie hormonalne, poznając coraz lepiej molekularne podłoże choroby. Jednak, by zaprojektować lek, który byłby skierowany w obrębie nowotworu, jednocześnie hamując namnażanie komórek nowotworowych, stymulowałby składowe układy immunologicznego do pracy, a także kierował komórki nowotworowe na proces apoptozy – jest wyjątkowo trudne. Jednak, celowane terapie antyangiogenne wydają się osiągać część z tych wyników i coraz częściej wybierane są do leczenia uzupełniającego w chorobach onkologicznych. Do ich niezaprzeczalnych zalet należy działanie bezpośrednie na strukturę nowotworu. Nie skupiają się na innych komórkach eliminując tym samym ogólne osła-





Ryc. 4. Łączenie się cząsteczki Cetuximabu bezpośrednio do receptora kinaz tyrozynowych; EGFR - powoduje zablokowanie cząsteczki EGF i ustanie proliferacji, a także migracji komórki nowotworowej

bień organizmu, jak np. w czasie chemioterapii. Często leki antyangiogenne są łączone z chemioterapią by obniżyć maksymalną tolerowaną dawkę chemioterapeutyku, obniżając tym samym działania niepożądane i podnosząc wydajność terapii. Istnieje jednak wiele dowodów na toksyczność leków antyangiogennych, często łączących się z ich budową, zazwyczaj obcogatunkowym fragmentem białka [4]. Do niezaprzeczalnych zalet terapii antyangiogennych zalicza się również wielokierunkowość, ponieważ oprócz działania aktywującego komórki układu immunologicznego pacjenta taki lek działa również bezpośrednio na komórki nowotworowe, indukując w nich apoptozę. Tak działa m.in. Talidomid, który znalazł zastosowanie w leczeniu szpiczaka mnogiego. Mniej ważną, natomiast wartą nadmienienia zaletą jest sposób podania leku – zazwyczaj jest to tabletkę doustną bądź wlew dożylny [92].

Podawanie leków antyangiogennych, takich jak opisane wyżej, wiąże się z działaniami niepożądanymi. Do głównych należą krwotoki o różnych nasileniach, białkomocz, nudności, powikłania w gojeniu się ran, kardiotoxyczność, niewydolność mięśnia sercowego [4]. Jednak wystąpienie powikłań zazwyczaj koreluje ze zbyt dużą dawką leku. Regulować to można dobierając odpo-

wiednio długi, zoptymalizowany okres terapii. Jednym z głównych ograniczeń stosowania tego typu terapii jest cięża. Wiąże się to bezpośrednio z teratogennym działaniem niektórych z nich. Do wad zalicza się również nabywanie oporności w czasie tego typu terapii [11,92]. Ponadto, jednym z czynników ograniczających stosowanie tego typu terapii są wysokie koszty. W Polsce, stosowanie leków antyangiogennych limitowane jest właśnie przez ten czynnik, bo miesiąc terapii jest wyceniony na kilkanaście tysięcy złotych, pacjent pokrywa koszty leczenia. Do tego również dochodzą kwestie prawne, wystąpienie do Narodowego Funduszu Zdrowia z wnioskiem o refundację leczenia. Niestety, szanse na refundowaną terapię antyangiogenną są małe.

Szlak sygnałowy mTOR

Kinaza serynowo-treoninowa (mTOR – mammalian target of rapamycin) jest białkiem o właściwości przełącznika między reakcjami anabolicznymi komórek, a katabolicznymi. Kinaza, należąca także do rodziny kinaz fosfotydylo-3-inozytolowych - PI3K, regulowana jest przez rapamycynę, antybiotyk o antyproliferacyjnych właściwościach wytwarzany przez *Streptomyces hygroscopicus*. Łączenie się kinazy mTOR z różnymi biał-

kami aktywującymi prowadzi do powstania dwóch różnych kompleksów mTORC1 i mTORC2, zawierających nie tylko inne składniki budowy i inną wrażliwość na cząsteczkę rapamycyny, ale także inne cząsteczki regulujące je. Do cząsteczek przyczyniających się do aktywacji mTORC1 należy kompleks rapamycyna-FKBP12, inhibujący szlak sygnałowy. Aktywacja kompleksu mTORC1 powoduje syntezę białek i lipidów, a także zmianą metabolizmu energii komórki – dzięki syntezie podjednostki α kompleksu HIF-1. Reguluje tym samym zarządzanie genami metabolizmu glukozy i mitochondrialnego metabolizmu oksydacyjnego. mTORC2 to mniej poznany kompleks, jednak wiadomo, że jego aktywacja promuje nie tylko zmiany w metabolizmie komórki (tak jak w mTORC1), ale także w rearanżacji i organizacji cytoszkieletu komórki.

Stwierdzono, że szlak sygnałowy kinazy serynowo-treoninowej jest istotny w komórkach nowotworowych. Wiele onkogenów, takich jak komponenty szlaku PI3K, Ras/Raf, RTK czy Akt, a także jednoczesna inaktywacja supresorów nowotworowych np. utrata p53, powoduje aktywację kompleksów mTORC1 i mTORC2. Wywołuje to wiele zdarzeń promujących kancerogenezę i metastazę [54], które są wywoływane zwiększeniem wysyłania sygnałów proliferacyjnych i zwiększoną podażą tlenu – w wyniku inicjacji angiogenezy, syntezy rybosomów i wzmożonej lipogenezy, a także powiększeniem zapasów energii przez zwiększenie glikolizy. Obserwuje się również inhibicję autofagii komórki nowotworowej przez blokowanie sygnałów cząsteczek, takich jak ULK1, ATG13 czy FIP200 [14,57].

W związku z tym, że szlak mTOR ma ogromny wpływ na metabolizm komórki nowotworowej jedna z terapii przeciwnowotworowej skupia się na jego inhibicji. Do cząsteczek, które są zarejestrowane jako inhibitory szlaku mTOR należą Temsirolimus [52,71], stosowany w terapii jasnokomórkowego raka nerki, a także Ewero-
limus [9,12,20,41] zaakceptowany w terapii raków nerki czy raków trzustki.

PODSUMOWANIE

Angiogeneza zachodzi w procesach fizjologicznych, np. odnowa endometrium, a także patologicznych, takich jak cukrzyca, reumatoidalne zapalenia stawów bądź choroby onkologiczne. Do jednego z głównych wniosków nasuwających się po analizie mechanizmu angiogenezy jest to, że powstawanie naczyń krwionośnych w strukturze guza nowotworowego przyczynia się bezpośrednio do jego rozrostu, a także zwiększenia szansy wytworzenia się przerzutu i tym samym pogarsza rokowania. Naczynia krwionośne są potrzebne tkance nowotworowej do postępowego zwiększania objętości, kolonizacji większej przestrzeni w organizmie. Dzieje się tak, aby dostarczyć tkance większej ilości tlenu, a także substan-

cji odżywczych potrzebnych do rozbudowy struktury. Tkanka nowotworowa w różny sposób reguluje powstawanie naczyń krwionośnych, zazwyczaj używając obecnych już naczyń gospodarza bądź stymulując do pracy komórki śródbłonna naczyniowego. Aktywność ECs jest potrzebna do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Dzięki badaniom gęstości naczyń krwionośnych MVD możliwe jest ocenienie pod tym względem struktury nowotworu i określenie rokowań. Ryzyko wytworzenia przerzutu zwiększa się, gdy komórki nowotworowe mają bezpośredni dostęp do naczynia krwionośnego, czyli gdy dojdzie do angiogeneza.

Proces angiogenezy rozpoczyna się, gdy w środowisku istnieje większe stężenie czynników proangiogennych w stosunku do antyangiogennych. Do głównych stymulatorów tego procesu zalicza się VEGF, bFGF, angiopoetynę-1. Wiele terapii antyangiogennych opiera się na blokowaniu działania tych czynników bądź receptorów odpowiedzialnych za odbiór ich sygnałów. Do czynników biorących udział w inhibicji procesu angiogenezy nowotworowej zalicza się m.in. angiopoetynę-2 i trombospondyny.

Głównym stymulatorem angiogenezy jest niedotlenienie komórek nowotworowych. Wraz z powiększaniem się struktury nowotworu, wewnętrzne rejony guza stają się nekrotyczne. Jest to związane z brakiem tlenu i substancji odżywczych w rozwijającej się masie. Hipoksja, czyli stan niedotlenienia, reguluje wytwarzanie się czynnika wzbudzanego hipoksją – HIF-1 α , odpowiedzialnego za tworzenie następných czynników proangiogennych, takich jak VEGF, a także PIGF, HGF, czy też Ang-1. Guzy nowotworowe nie są więc strukturami, których zwalczanie mogłoby polegać na regulacji dostarczania tlenu do ich struktur, ponieważ udowodniono, że pozostają obojętne wobec braku tlenu, a przede wszystkim mają mechanizmy, które umożliwiają im przeżycie w takich warunkach. Hipoksja znacznie zwiększa gęstość naczyń krwionośnych w ich strukturach, co bezpośrednio łączy się z rozbudową guza i wpływa na powstawanie przerzutów.

Dogłębna analiza i badania kliniczne, poszerzają wiedzę na temat angiogenezy nowotworowej. Uważa się, że dokładne poznanie molekularnych procesów nowotworzenia, a także angiogenezy w strukturach nowotworów pozwoliłoby na zaprojektowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej i tym samym polepszyły się komfort pacjentów. Obecne terapie nowotworowe coraz częściej wykorzystują leczenie czynnikami antyangiogennymi, co jest spowodowane większym odsetkiem powodzeń w próbach klinicznych. Należy jednak uwzględnić zarówno wady i ograniczenia, jak i zalety tego typu terapii.



PIŚMIENICTWO

- [1] Ahluwalia A., Tarnawski A.S.: Critical role of hypoxia sensor - HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr. Med. Chem.*, 2012; 19: 90-97
- [2] Akslen L.A., Straume O., Geisler S., Sorlie T., Chi J.T., Aas T., Borresen-Dale A.L., Lonning P.E.: Glomeruloid microvascular proliferation is associated with lack of response to chemotherapy in breast cancer. *Br. J. Cancer.*, 2011; 105: 9-12
- [3] Alfaiay N., Hoffmann P., Bouffetta H., Samouh N., Aboussaouira T., Benharouga M., Feige J.J., Brouillet S.: The multiple roles of EG-VEGF/PROK1 in normal and pathological placental angiogenesis. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 451906
- [4] Antoniuk K., Nowak J.Z.: Bewacizumab – postępowanie w leczeniu nowotworów z przerzutami i nadzieja pacjentów z retinopatią proliferacyjną. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 320-330
- [5] Ausprunk D.H., Folkman J.: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.*, 1977; 14: 53-65
- [6] Baeten C.I., Hillen F., Pauwels P., de Bruine A.P., Baeten C.G.: Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis. Colon. Rectum*, 2009; 52: 2028-2035
- [7] Bagheri A., Chianeh Y., Rao P.: Role of angiogenic factors in recurrent pregnancy loss. *Int. J. Reproduction, Contraception, Obstetrics Gynecology*, 2013; 2: 497
- [8] Barańska P., Jerczyńska H., Pawłowska Z.: Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń - budowa i funkcje. *Postępy Biochem.*, 2005; 51: 12-21
- [9] Bianco R., Garofalo S., Rosa R., Damiano V., Gelardi T., Daniele G., Marciano R., Ciardiello F., Tortora G.: Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *Br. J. Cancer.*, 2008; 98: 923-930
- [10] Biedka M., Makarewicz R., Kopczyńska E., Marszałek A., Goralewska A., Kardymowicz H.: Angiogenesis and lymphangiogenesis as prognostic factors after therapy in patients with cervical cancer. *Contemp. Oncol.*, 2012; 16: 6-11
- [11] Bielecka Z.F., Czarnecka A.M., Solarek W., Kornakiewicz A., Szczylik C.: Mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear - cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Curr. Signal Transduct. Ther.*, 2014; 8: 218-228
- [12] Cai Y., Xia Q., Su Q., Luo R., Sun Y., Shi Y., Jiang W.: mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces apoptotic, not autophagic cell death, in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2013; 31: 904-912
- [13] Cao Y.: Angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Chem. Immunol. Allergy*, 2014; 99: 170-179
- [14] Cargnello M., Tcherkezian J., Roux P.P.: The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis*, 2015; 30: 169-176
- [15] Chouaib S., Messai Y., Couve S., Escudier B., Hasmim M., Noman M.Z.: Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front. Immunol.*, 2012; 3: 21
- [16] Chua R.A., Arbiser J.L.: The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity*, 2009; 42: 574-579
- [17] Chung H.J., Mahalingam M.: Angiogenesis, vasculogenic mimicry and vascular invasion in cutaneous malignant melanoma - implications for therapeutic strategies and targeted therapies. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 2014; 14: 621-639
- [18] Cibeira M.T., Rozman M., Segarra M., Lozano E., Rosinol L., Cid M.C., Filella X., Bladé J.: Bone marrow angiogenesis and angiogenic factors in multiple myeloma treated with novel agents. *Cytokine*, 2008; 41: 244-253
- [19] Cybulski C., Krzystolik K., Murgia A., Górski B., Debnik T., Jakubowska A., Martella M., Kurzawski G., Prost M., Kojder I., Limon J., Nowacki P., Sagan L., Białas B., Kaluza J. i wsp.: Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J. Med. Genet.*, 2002; 39: E38
- [20] Czarnecka A.M., Kornakiewicz A., Lian F., Szczylik C.: Future perspectives for mTOR inhibitors in renal cell cancer treatment. *Future Oncol.*, 2015; 11: 801-817
- [21] Czarnecka A.M., Szczylik C., Rini B.: The use of sunitinib in renal cell carcinoma: where are we now? *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 2014; 14: 983-999
- [22] Davis S., Aldrich T.H., Jones P.F., Acheson A., Compton D.L., Jain V., Ryan T.E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D.: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 1996; 87: 1161-1169
- [23] Dmoszyńska A.: Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2008; 118: 563-566
- [24] Döme B., Hendrix M.J., Paku S., Tóvári J., Timár J.: Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 1-15
- [25] Downs L.S. Jr., Rogers L.M., Yokoyama Y., Ramakrishnan S.: Thalidomide and angiostatin inhibit tumor growth in a murine xenograft model of human cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2005; 98: 203-210
- [26] Dudek A.Z., Zolnierok J., Dham A., Lindgren B.R., Szczylik C.: Sequential therapy with sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer*, 2009; 115: 61-67
- [27] Dusseau J.W., Hutchins P.M.: Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: a role for adenosine. *Respir. Physiol.*, 1988; 71: 33-44
- [28] Facciabene A., Peng X., Hagemann I.S., Balint K., Barchetti A., Wang L.P., Gimotty P.A., Gilks C.B., Lal P., Zhang L., Coukos G.: Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, 2011; 475: 226-230
- [29] Fajardo L.F., Kwan H.H., Kowalski J., Prionas S.D., Allison A.C.: Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1992; 140: 539-544
- [30] Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat. Med.*, 2010; 16: 1107-1111
- [31] Fiedler U., Krissl T., Koidl S., Weiss C., Koblizek T., Deutsch U., Martiny-Baron G., Marmé D., Augustin H.G.: Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 1721-1727
- [32] Folberg R., Hendrix M.J., Maniotis A.J.: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2000; 156: 361-381
- [33] Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 4604-4613
- [34] Gerhardt H.: VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*, 2008; 4: 241-246
- [35] Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D., Betsholtz C.: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell. Biol.*, 2003; 161: 1163-1177
- [36] Ghaneh P., Costello E., Neoptolemos J.P.: Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, 2007; 56: 1134-1152

- [37] Goudar R.K., Vlahovic G.: Hypoxia, angiogenesis, and lung cancer. *Curr. Oncol. Rep.*, 2008; 10: 277-282
- [38] Gryczynski M., Kobos J., Murlewska A., Pietruszewska W.: Przewidywalność chorych na raka krtani a wybrane czynniki rokownicze. *Otolaryngol. Pol.*, 2003; 57: 329-340
- [39] Gryczynski M., Kobos J., Niewiadomska H., Pietruszewska W.: Assessment of cell proliferation antigen Ki-67, protein p53 related to apoptosis and angiogenesis in laryngeal cancer. *Otolaryngol. Pol.*, 2000; 54, Suppl. 31: 191-195
- [40] Gryczynski M., Papierz W., Niewiadomska H., Kobos J., Pietruszewska W.: Ocena ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD44, produktu genu nm23 i intensywności angiogenezy u chorych z rakiem krtani. *Otolaryngol. Pol.*, 2000; 54: 669-674
- [41] Guglielmelli P., Barosi G., Rambaldi A., Marchioli R., Masciulli A., Tozzi L., Biamonte F., Bartalucci N., Gattoni E., Lupo M.L., Finazzi G., Pancrazzi A., Antonioli E., Susini M.C., Pieri L. i wsp.: Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood*, 2011; 118: 2069-2076
- [42] Hefler L.A., Zeillinger R., Grimm C., Sood A.K., Cheng W.F., Gadducci A., Tempfer C.B., Reinthaller A.: Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2006; 103: 512-517
- [43] Hirota K., Semenza G.L.: Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006; 59: 15-26
- [44] Hlatky L., Tsiou C., Hahnfeldt P., Coleman C.N.: Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res.*, 1994; 54: 6083-6086
- [45] Hrab M., Olek-Hrab K., Antczak A., Kwias Z., Milecki T.: Interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) concentration prior to total nephrectomy are prognostic factors in localized renal cell carcinoma (RCC). *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, 2013; 18: 304-309
- [46] Hua H., Li M., Luo T., Yin Y., Jiang Y.: Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2011; 68: 3853-3868
- [47] Ioachim E., Damala K., Tsanou E., Briasoulis E., Papadiotis E., Mitselou A., Charhanti A., Doukas M., Lampri L., Arvanitis D.L.: Thrombospondin-1 expression in breast cancer: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *Histol. Histopathol.*, 2012; 27: 209-216
- [48] Iruela-Arispe M.L., Lombardo M., Krutzsch H.C., Lawler J., Roberts D.D.: Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation*, 1999; 100: 1423-1431
- [49] Jimenez Cuenca B.: Mechanism of inhibition of tumoral angiogenesis by thrombospondin-1. *Nefrologia*, 2003; 23, Suppl. 3: 49-53
- [50] Kandemir N.O., Narli Z.I., Kalayci M., Ozdamar S.O.: A rare pattern of angiogenesis in meningiomas: glomeruloid microvascular proliferation. *Turk. Neurosurg.*, 2014; 24: 765-769
- [51] Komorowski J., Jerczyńska H., Siejka A., Barańska P., Ławnicka H., Pawłowska Z., Stepień H.: Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. *Life Sci.*, 2006; 78: 2558-2563
- [52] Kornakiewicz A., Solarek W., Bielecka Z.F., Lian F., Szczylik C., Czarnecka A.M.: Mammalian target of rapamycin inhibitors resistance mechanisms in clear cell renal cell carcinoma. *Curr. Signal Transduct. Ther.*, 2014; 8: 210-218
- [53] Kurz H., Burri P.H., Djonov V.G.: Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol. Sci.*, 2003; 18: 65-70
- [54] Laplante M., Sabatini D.M.: mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012; 149: 274-293
- [55] Leenders W.P., Küsters B., de Waal R.M.: Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothelium*, 2002; 9: 83-87
- [56] Leenders W.P., Küsters B., Verrijp K., Maass C., Wesseling P., Heerschap A., Ruiter D., Ryan A., de Waal R.: Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 6222-6230
- [57] Lionello M., Lovato A., Staffieri A., Blandamura S., Turato C., Giacomelli L., Staffieri C., Marioni G.: The EGFR-mTOR pathway and laryngeal cancer angiogenesis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2014; 271: 757-764
- [58] Liotta L.A., Steeg P.S., Stetler-Stevenson W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991; 64: 327-336
- [59] Lockhart A.C., Rothenberg M.L., Berlin J.D.: Treatment for pancreatic cancer: current therapy and continued progress. *Gastroenterology*, 2005; 128: 1642-1654
- [60] Mariscalco G., Lorusso R., Sessa F., Bruno V.D., Piffaretti G., Banach M., Cattaneo P., Cozzi G.P., Sala A.: Imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors in rheumatic and mixomatous mitral valves. *Int. J. Cardiol.*, 2011; 152: 337-344
- [61] Morisada T., Kubota Y., Urano T., Suda T., Oike Y.: Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium*, 2006; 13: 71-79
- [62] Mysliwiec P., Dadan J.: Znaczenie angiogenezy w raku trzustki. *Przegl. Lek.*, 2009; 66: 155-158
- [63] Naumnik W., Chyczewska E., Ossolinska M.: Serum levels of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and their receptor tie-2 in patients with nonsmall cell lung cancer during chemotherapy. *Cancer Invest.*, 2009; 27: 741-746
- [64] Niedźwiecki S., Stepień T., Kopec K., Kuzdak K., Komorowski J., Krupiński R., Stepień H.: Angiopoietin 1 (Ang-1), angiopoietin 2 (Ang-2) and Tie-2 (a receptor tyrosine kinase) concentrations in peripheral blood of patients with thyroid cancers. *Cytokine*, 2006; 36: 291-295
- [65] Otrock Z.K., Mahfouz R.A., Makarem J.A., Shamseddine A.I.: Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2007; 39: 212-220
- [66] Paku S., Paweletz N.: First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab. Invest.*, 1991; 65: 334-346
- [67] Park Y.W., Kang Y.M., Butterfield J., Detmar M., Goronzy J.J., Weyand C.M.: Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.*, 2004; 165: 2087-2098
- [68] Pietruszewska W., Niewiadomska H., Kobos J., Józefowicz-Korczyńska M., Gryczyński M.: Significance of angiogenesis in laryngeal cancer. *Otolaryngol. Pol.*, 2000; 54, Suppl. 31: 167-170
- [69] Plank M.J., Sleeman B.D., Jones P.F.: The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis. *Growth Factors*, 2004; 22: 1-11
- [70] Ramanujan S., Koenig G.C., Padera T.P., Stoll B.R., Jain R.K.: Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1442-1448
- [71] Ravaud A., Gross-Goupil M.: Overcoming resistance to tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer Treat. Rev.*, 2012; 38: 996-1003
- [72] Reginato S., Gianni-Barrera R., Banfi A.: Taming of the wild vessel: promoting vessel stabilization for safe therapeutic angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011; 39: 1654-1658
- [73] Reisinger K., Baal N., McKinnon T., Münstedt K., Zygmunt M.: The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007; 269: 65-80
- [74] Reiss Y., Machein M.R., Plate K.H.: The role of angiopoietins dur-



ing angiogenesis in gliomas. *Brain Pathol.*, 2005; 15: 311-317

[75] Sacewicz I., Wiktorska M., Wysocki T., Niewiarowska J.: Mechanizmy angiogenezy nowotworowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 159-168

[76] Sadlecki P., Walentowicz-Sadlecka M., Szymański W., Grabiec M.: Porównanie stężeń VEGF, IL-8 oraz β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika. *Ginekol. Pol.*, 2011; 82: 498-502

[77] Semenza G.L.: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 721-732

[78] Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., Schuh A.C.: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995; 376: 62-66

[79] Skotnicki A.B., Wolska-Smoleń T., Jurczyszyn A.: Multiple myeloma - new therapeutic perspectives. *Przegl. Lek.*, 1999; 56, Suppl. 1: 67-72

[80] Soker S.: Neuropilin in the midst of cell migration and retraction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2001; 33: 433-437

[81] Sundberg C., Nagy J.A., Brown L.F., Feng D., Eckelhoefer I.A., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am. J. Pathol.*, 2001; 158: 1145-1160

[82] Swidzińska E., Naumnik W., Chyczewska E.: Angiogeneza i neoangiogeneza - znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2006; 74: 414-420

[83] Tahergorabi Z., Khazaei M.: The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA Atheroscler.*, 2013; 9: 247-253

[84] Tanaka F., Oyanagi H., Takenaka K., Ishikawa S., Yanagihara K., Miyahara R., Kawano Y., Li M., Otake Y., Wada H.: Glomeruloid mi-

crovascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 2003; 63: 6791-6794

[85] Voros G., Maquoi E., Demeulemeester D., Clerx N., Collen D., Lijnen H.R.: Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology*, 2005; 146: 4545-4554

[86] Walski M., Frontczak-Baniewicz M.: Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłonna naczyń krwionośnych. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2007; 117, Suppl.: 46-49

[87] Wysocki P.J., Zolnierek J., Szczylik C., Mackiewicz A.: Targeted therapy of renal cell cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2008; 9: 570-575

[88] Xiong H.Q., Rosenberg A., LoBuglio A., Schmidt W., Wolff R.A., Deutsch J., Needle M., Abbruzzese J.L.: Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 2610-2616

[89] Yamanaka H.: Rheumatoid arthritis and angiogenesis. *Intern. Med.*, 2003; 42: 297-299

[90] Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J.: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000; 407: 242-248

[91] Yu Q.: The dynamic roles of angiopoietins in tumor angiogenesis. *Future Oncol.*, 2005; 1: 475-484

[92] Żolnierek J., Nurzyński P., Langiewicz P., Oborska S., Waśko-Grabowska A., Kuszatal E., Obrocka B., Szczylik C.: Efficacy of targeted therapy in patients with renal cell carcinoma with pre-existing or new bone metastases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010; 136: 371-378

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.