

PRACE POGLĄDOWE

Paulina Jarosz, Bartosz Woźniak

Angiogeneza w chorobach nowotworowych

Angiogenesis in cancer diseases

Z Koła Naukowego Biotechnologii Bio-Tech Uniwersytetu Rzeszowskiego

Streszczenie

Wzrost nowotworu uzależniony jest od dostępu składników odżywczych oraz tlenu. Odbywa się to za pośrednictwem sieci naczyń krwionośnych, które oprócz dostarczania komórkom nowotworowym niezbędnych substancji odżywczych odgrywają również znaczącą rolę w tworzeniu przerzutów. Komórki nowotworowe posiadają zdolność wytwarzania własnej sieci naczyń krwionośnych na drodze angiogenezy. Czynniki biorące udział w regulacji tworzenia sieci naczyń krwionośnych można sklasyfikować do dwóch grup, czynników pro- oraz antyangiogennych. Do stymulacji angiogenezy dochodzi w sytuacji, gdy ilość czynników proangiogennych przeważa. Głównym czynnikiem proangiogennym jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF, stymulujący podziały komórkowe, migrację i proliferację komórek śródbłonka. Zahamowanie aktywności VEGF, a co za tym idzie supresję angiogenezy, budzi nadzieję na poprawę wyników leczenia chorób nowotworowych. Terapia antyangiogenna budzi obecnie szerokie zainteresowanie, a wciąż prowadzone badania właściwości leków antyangiogennych dostarczają cennych informacji na temat sposobu inhibicji tego procesu.

Słowa kluczowe: nowotwór, VEGF, terapia antyangiogenna, czynniki pro- oraz antyangiogenne

Wstęp

Angiogeneza, inaczej neowaskularyzacja, to proces tworzenia nowych naczyń włosowatych na bazie istniejącej sieci naczyń krwionośnych [1]. Proces regulowany jest wieloma czynnikami, zarówno pro- jak i antyangiogennymi.

Dzięki rozległej sieci naczyń krwionośnych, przekraczającej 900 m² w ludzkim organizmie, możliwy jest rozwój komórek oraz stałość otaczającego je środowiska. Wraz z krwią wędrują do komórek substancje energetyczne, budulcowe oraz tlen [2].

Abstract

The growth of tumor depends on the access to nutrients and oxygen. This is done with the use of blood vessels. They provide essential nutrients to cancer cells and also play a significant role in the formation of metastases. Cancer cells have the ability to produce their own system of blood vessels through angiogenesis. Factors involved in the regulation of formation of a new vascular system can be classified into two groups of pro- and antiangiogenic ones. Stimulation of angiogenesis occurs when the number of proangiogenic factors predominates. The main proangiogenic factor is vascular endothelial growth factor VEGF, stimulating cell division, migration and proliferation of endothelial cells. Inhibition of VEGF and hence angiogenesis suppression raises hope for improvement of cancer treatment. Antiangiogenic therapy currently raises wide interest and tests of antiangiogenic drugs are still ongoing and provide valuable information on how to inhibit this process.

Key words: cancer, VEGF, antiangiogenic therapy, pro- and antiangiogenic factors

W prawidłowych tkankach fizjologicznych angiogeneza jest procesem samokontrolującym i samoograniczającym się. W tkankach nieprawidłowych, patologicznie zmienionych, zaburzona zostaje równowaga pomiędzy aktywnością czynników pro- oraz antyangiogennych na korzyść tych ostatnich.

Zależność tę zauważono wiele lat temu. W 1971 roku amerykański naukowiec Jugah Folkman przedstawił swoje badania dotyczące korelacji pomiędzy angiogenezą a wzrostem guza. W artykule opublikowanym dla New

England Journal of Medicine przedstawił on hipotezę, że wzrost i rozwój guzów nowotworowych zależy od wytwarzania własnej sieci naczyń krwionośnych [3]. Hipoteza ta, chociaż początkowo bardzo krytykowana, stała się obecnie podstawą terapii antyangiogennej [4].

Waskulogeneza a angiogeneza

Na uwagę zasługuje fakt, że wiele czynników zaangażowanych w regulację patologicznego procesu neoangiogenezy bierze również udział w fizjologicznym procesie waskulogenezy. W przebiegu obu mechanizmów istnieją jednak pewne różnice [5].

Fizjologiczny proces waskulogenezy cechuje udział komórek macierzystych. W procesie waskulogenezy nowe naczynia krwionośne powstają z krążących prekursorowych komórek śródbłonna (ang. *EPCs – endothelial progenitor cells*), które wywodzą się głównie ze szpiku kostnego. W wyniku stymulacji tych komórek wydostają się one do krwi obwodowej, po czym wbudowują się w powstające struktury naczyń [6]. Fizjologiczny proces waskulogenezy obserwowany jest podczas embriogenezy, doprowadzając w rozwijającym się organizmie do wytworzenia podstawowego układu naczyniowego [7].

Proces angiogenezy ma nieco inny przebieg. Angiogeneza, inaczej neowaskularyzacja lub naczyniotworzenie to proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących regulowany czynnikami pro- i antyangiogennymi. Angiogeneza jest bardzo szerokim pojęciem, które obejmuje zarówno stany fizjologiczne, jak i patologiczne. Neoangiogeneza dotyczy wytwarzania nowych naczyń w środowisku guza nowotworowego [8].

Angiogeneza fizjologiczna

Angiogeneza jest procesem fizjologicznym, niezbędnym do prawidłowego rozwoju, wzrostu i dojrzewania organizmu [9]. U osób dorosłych występuje relatywnie rzadko, m.in. w trakcie rozwoju endometrium podczas miesięcznego cyklu reprodukcyjnego kobiety oraz w procesie budowy łożyska u kobiet ciężarnych, a także podczas mechanizmu gojenia się ran i przywrócenia przepływu krwi w tkankach po urazach [10]. Proces naczyniotworzenia w zdrowym organizmie znajduje się pod ścisłą kontrolą czynników pro- oraz antyangiogennych, będących w równowadze. Badania potwierdziły, że fizjologiczny proces angiogenezy również wymaga obecności czynników proangiogennych, odpowiedniej liczby receptorów oraz obecności inhibitorów naczyniotworzenia będących w niskiej koncentracji [11].

W efekcie fizjologicznego procesu angiogenezy powstają w pełni sprawne nowe naczynia krwionośne. Cechują się one prawidłowym kształtem i rozmiarem, są regularne, a sieć naczyniowa wykazuje pełne zróżnicowanie tętniczo-żylnie.

Angiogeneza patologiczna

Angiogeneza stanowi również istotny element patogenezy wielu chorób. Odgrywa istotną rolę w rozwoju takich chorób jak reumatoidalne zapalenie stawów, stany zapalne naczyń krwionośnych czy łuszczyca [12]. Ponadto rolę angiogenezy potwierdzono w wielu schorzeniach gastrologicznych, takich jak zapalenie błony śluzowej żołądka, nieswoiste zapalenie jelit, schorzeniach kardiologicznych, jak na przykład choroba niedokrwienna mięśnia sercowego, miażdżycy, siniczne wady serca oraz w przypadku cukrzycy [13].

Etapy angiogenezy

Angiogeneza jest złożonym procesem dokonującym się w sześciu głównych stadiach:

1. Zwióczenie ściany naczynia, pobudzenie komórek śródbłonna wewnątrz istniejących naczyń, rozszerzenie naczyń macierzystych.
2. Degradacja błony podstawnej oraz macierzy zewnątrzkomórkowej.
3. Migracja aktywowanych komórek śródbłonna z naczyń macierzystych w kierunku stymulatorów angiogenezy (małych gniazd komórek nowotworowych).
4. Proliferacja komórek śródbłonna.
5. Wytwarzanie rurkowatych struktur, formowanie światła i pętli nowych naczyń.
6. Dojrzewanie, formowanie błony podstawnej, otoczenie nowo powstałych naczyń przez komórki mezenchymalne [14].

Komórki śródbłonna aktywowane są przez wiele czynników fizycznych oraz humoralnych, takich jak: hipoglikemia, hipoksemia, proangiogenne czynniki wzrostu, np. VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego). Aby umożliwić migrację komórek śródbłonna konieczna jest degradacja błony podstawnej oraz macierzy zewnątrzkomórkowej wywołwana przez lokalnie pobudzone enzymy proteolityczne MMP (ang. *Matrix metalloproteinases*, metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej). W wyniku proteolizy macierzy zewnątrzkomórkowej powstają produkty o działaniu chemotaktycznym. Produkty degradacji ułatwiają z kolei migrację komórek śródbłonna oraz uwalniają czynniki wzrostu związane w podścielisku [15]. Interakcja pomiędzy znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonna molekułami adhezyjnymi (integryny, avB3, a2v, E-selektyna), a specyficznymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, laminina) również w znacznym stopniu ułatwia migrację komórek śródbłonna. Migracja komórek śródbłonna przebiega równocześnie z ich proliferacją. Proliferacja prowadzi do wytworzenia błony wewnętrznej nowo powstającego naczynia krwionośnego oraz zapewnia jego ciągłość. W kolejnym etapie angiogenezy dochodzi do tworzenia światła naczyń krwionośnych. W konsekwencji tworzą się wydłużone, rurkowate struktury, które łącząc się końca-

mi, tworząc pętle kapilar. W końcowym etapie komórki śródbłonna dojrzewają, wytwarza się błona podstawna oraz wbudowywane są pericyty, których zadaniem jest stabilizacja nowo powstałych naczyń [16].

Komórki śródbłonkowe znajdujące się w nowo powstałych pętlach kapilar guza nowotworowego znacząco odbiegają strukturą oraz właściwościami od komórek prawidłowych. Różnią się przede wszystkim kształtem, rozmiarem, ponadto są nieregularne, posiadają nieszczelną błonę podstawną oraz szerokie połączenia międzykomórkowe. W wyniku tych defektów z nowo powstałych naczyń często wydostaje się plazminogen, fibrynogen i płytki krwi, co w konsekwencji prowadzi do wykrzepiania [17].

Naczynia krwionośne guza nowotworowego zdecydowanie różnią się od naczyń prawidłowych. Mają niewłaściwy kształt i rozmiar, są nieregularne, niedojrzałe, kręte, wykazują niepełne zróżnicowanie tętniczo-żylnie oraz niepełne zróżnicowanie przestrzeni okołonaczyniowej [18]. Prędkość przepływu krwi w takich naczyniach jest zmienna, często bardzo spowolniona. Ze względu na liczne pory przepuszczalność naczyń krwionośnych jest o wiele większa.

Angiogeneza nowotworowa sprzyja również przedostawaniu się komórek nowotworowych do krwiobiegu, co w konsekwencji może doprowadzić do tworzenia przerzutów.

Niektóre typy nowotworów wytwarzają własną sieć naczyń krwionośnych na drodze innej niż angiogeneza. W przypadku nowotworów płuc lub glejaków mózgu do unaczynienia komórek nowotworowych dochodzi przede wszystkim w formie koopcji naczyń krwionośnych gospodarza (ang. *vascular cooption*) [19]. Nieco innym mechanizmem cechują się komórki czerniaka. Komórki tego nowotworu wykazują zdolności do nabywania cech morfologicznych i fenotypowych śródbłonna oraz tworzenia kanałów krwionośnych połączonych z właściwym krwiobiegem na drodze tzw. naczyniowej mimikry [20, 21].

Endogenne czynniki regulujące angiogenezę

Zidentyfikowano wiele różnych czynników biorących udział w stymulacji procesu angiogenezy. Należą do nich między innymi VEGF, kwasowe i zasadowe czynniki wzrostu fibroblastów (aFGF ang. *acidic fibroblast growth factor*; bFGF ang. *basic fibroblast growth factor*), angiopoetyny 1 i 2 (Ang-1, Ang-2), interleukiny 6 i 8 (IL-6, IL-8), angiogenina, czynnik wzrostu hepatocytów (HGF ang. *hepatocyte growth factor*), czynnik martwicy nowotworów (TNF ang. *tumor necrosis factor*), transformujący czynnik wzrostu (TGF ang. *transforming growth factor*), czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (PDGF ang. *platelet-derived growth factor*). W stymulacji angiogenezy biorą również udział enzymy – metaloproteinazy macierzy międzykomórkowej MMP oraz integryny [22].

Wśród czynników hamujących proces angiogenezy znajduje się między innymi inhibitor wzrostu komórek śródbłonna (VEGI ang. *Vascular Endothelial Growth Inhibitor*), interferon α , β oraz γ , endostatyna, angiostatyna, wazostatyna, trombospondyna-1 (TSP-1), tkankowe inhibitory metaloproteazy 1, 2 i 3 [23].

Czynniki stymulujące angiogenezę nowotworową wytwarzane są zarówno przez komórki guza, jak i komórki gospodarza. Mogą one być pochodzenia autokrynnego (z komórek śródbłonna), endokrynnego (z krążenia) oraz parakrynnego (z przyległego guza, podścieliska).

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF

Wśród wielu czynników stymulujących proces angiogenezy kluczową rolę odgrywa naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF-A, powszechnie nazywany VEGF [24]. Reguluje on zarówno fizjologiczną, jak i patologiczną angiogenezę. VEGF jest mitogenem dla komórek śródbłonna naczyń oraz stymuluje ich proliferację [25]. Niewątpliwie bierze on udział w powstawaniu nowych struktur naczyniowych, co potwierdzono na badaniach zwierzęcych [26]. Zaobserwowano, że zarodki myszy pozbawione jednego allelu genu VEGF ginęły już w dziesiątej dobie życia płodowego, co spowodowane było zupełnym brakiem struktur naczyniowych [27].

VEGF zwiększa przede wszystkim przepuszczalność naczyń krwionośnych [28]. Efektywność tego procesu znacznie przewyższa działanie histaminy i innych czynników proangiogennych, takich jak bFGF oraz Ang-2. W związku z powstawaniem licznych porów w ścianach naczyń krwionośnych oraz zwiększeniem ich przepuszczalności wiele białek osocza przedostaje się z krwi do środowiska zewnątrznaczyniowego, co powoduje gromadzenie się płynu w tym obszarze i zwiększenie ciśnienia śródtkankowego w guzie nowotworowym. W konsekwencji płyn uciska na komórki guza oraz naczynia krwionośne okalające guz i zaopatrujące go w niezbędne składniki odżywcze. Poprzez naczynia krwionośne odbywa się również transport cytostatyków do komórek nowotworu. Wzrost ciśnienia śródtkankowego w guzie nowotworowym znacznie upośledza i utrudnia przedostawanie się leków do komórek docelowych [29].

Czynnik VEGF wywiera działanie mitogenne na komórki śródbłonna. Pobudzona zostaje ich migracja i proliferacja, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia nowych naczyń krwionośnych [30].

VEGF nazywany jest również czynnikiem przetrwania (ang. *survival factor*) dla komórek śródbłonna oraz samych komórek nowotworowych. Bierze udział w mobilizacji komórek macierzystych śródbłonna naczyń ze szpiku kostnego, co ma bardzo istotne znaczenie, gdyż stanowią one około 15% komórek nowo powstałych naczyń krwionośnych w obszarze nowotworu.

Tabela 1. Endogenne stymulatory i inhibitory angiogenezy
Table 1. Endogenic stimulators and inhibitors of angiogenesis

Endogenne stymulatory angiogenezy	Endogenne inhibitory angiogenezy
<ul style="list-style-type: none"> - VEGF - aFGF – kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów - bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów - Ang-1 – angiopoetyna 1 - Ang-2 – angiopoetyna 2 - TGF-β – transformujący czynnik wzrostu b - PDGF – płytkowy czynnik wzrostu - TNF-α – czynnik martwicy guza a - HGF – czynnik wzrostu hepatocytów - PlGF – łożyskowy czynnik wzrostu - IL-8 – interleukina 8 - IL-6 – interleukina 6 - G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów - GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów - Angiogenina - PLF – proliferyna - PGE₁ – prostaglandyna E1 - PGE₂ – prostaglandyna E2 - NO – tlenek azotu (II) - Eph A – efryta A - Eph B – efryta B - Chemokina SDF-1 – czynnik zrębu 	<ul style="list-style-type: none"> - TSP-1 – trombospodyna-1 - Angiostatyna – N-końcowy fragment plazminogenu - Endostatyna – C-końcowy fragment kolagenu XVII - Troponina 1 - Czynn timer płytkowy 4 - IL-12 – interleukina 12 - INF-α – interferon a - INF-β – interferon b - INF-γ – interferon g - TIMPs 1 – tkankowy inhibitor metaloproteazy 1 - TIMPs 2 – tkankowy inhibitor metaloproteazy 2 - TIMPs 3 – tkankowy inhibitor metaloproteazy 3 - Wazostatyna - Restyna - N-końcowy fragment prolaktyny

Ponadto, czynnik VEGF uczestniczy w aktywacji krzepnięcia krwi poprzez pobudzenie ekspresji czynn timer tkankowego (TF ang. *tissue factor*) w komórkach śródbłonna oraz monocytach. VEGF z jednej strony bierze udział w aktywacji monocytów i indukcji chemotaksji, a jednocześnie w znacznym stopniu upośledza funkcje immunologiczne ustroju, gdyż hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, zaangażowanych w prezentację antygeny.

Niemniej ważną funkcją VEGF jest zwiększanie ekspresji składowych układu fibrynolizy w komórkach śródbłonkowych i macierzy pozakomórkowej, przez co proteoliza otaczających tkanek podczas angiogenezy jest znacznie ułatwiona [31].

W wyniku alternatywnego splicingu genu kodującego syntezę VEGF powstają cztery izoformy tego czynn timer. Różnica między nimi dotyczy ilości aminokwasów budujących poszczególne cząsteczki. Powstają cząsteczki zbudowane odpowiednio ze 121, 165, 189 oraz 206 aminokwasów.

W przebiegu procesu angiogenezy najważniejszą rolę odgrywa najczęściej występująca izoforma VEGF, którą jest VEGF₁₆₅ [32]. Na skutek działania metaloproteinaz oraz plazminy może zostać odszczepiony fragment izoformy VEGF₁₆₅ znajdujący się na jej C-końcowym odcinku. Wynikiem tego działania jest powstanie dwóch fragmentów, VEGF₁₁₀ oraz VEGF₁₁₃, aktywnych biologicznie [33]. Poszczególne formy naczyniowo-śródbłonkowego czynn timer wzrostu wykazują zróżnicowane właściwości fizykochemiczne. VEGF₁₂₁ nie wiąże się z heparyną i występuje w stanie wolnym. Cząsteczki VEGF₁₆₅ oraz

VEGF₁₈₉ wiążą się natomiast z heparyną i charakteryzują się znacznie większym ładunkiem ujemnym. Izofomy VEGF-A są wypierane z połączenia z proteoglikanami macierzy międzykomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) przez heparynę, siarczan heparyny i heparynazę. Aktywność plazminy również prowadzi do aktywacji VEGF₁₆₅ i VEGF₁₈₉ powodując odłączenie naczyniowo-śródbłonkowych czynn timer wzrostu od powierzchni komórek i macierzy międzykomórkowej.

Czynn timer regulujące syntezę i ekspresję VEGF

Czynn timer regulujące syntezę i ekspresję VEGF można zaklasyfikować do dwóch głównych grup, czynn timer zewnętrznych i wewnętrznych.

Głównym czynn timer zewnętrznym pobudzającym transkrypcję genu kodującego syntezę VEGF i stabilizację jego cząsteczki jest niedotlenienie, inaczej hipoksja [34]. W regulacji bierze udział czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1, ang. *hypoxia-inducible factor 1*). W warunkach niedostatecznej ilości tlenu w środowisku czynnik HIF-1 α ulega stabilizacji, a następnie asocjacji z czynn timer HIF-1 β . Następnie w postaci dimeru przedostaje się do jądra komórkowego, po czym łączy się z promotorem genu odpowiedzialnego za syntezę VEGF. Niedotlenienie zwiększa również ekspresję receptorów dla VEGF w kaskadzie zdarzeń niezależnej od syntezy VEGF.

Synteza czynn timer VEGF w różnych typach nowotworów stymulowana jest również licznymi czynn timer wzrostu i cytokinami. Należą do nich między innymi TGF- α , TGF- β , czynnik wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*), IL-1, IL-6, TNF, HGF, pro-

staglandyny E1 i E2, czynnik wzrostu keratynocytów (KGF, ang. *keratinocyte growth factor*), czynnik wzrostu podobny do insuliny (IGF1, ang. *insulin-like growth factor*). W niektórych przypadkach nowotworów dochodzi do autokrynej regulacji syntezy VEGF w wyniku bliskiej obecności cytokin i ich receptorów.

Stymulację syntezy i ekspresji VEGF może również odbywać się za pośrednictwem różnych hormonów, białek i związków chemicznych, takich jak trombina, adenozyne lub czynnik tkankowy (TF) oraz niektórych procesów fizjologicznych, jak na przykład agregacja płytek krwi [34].

Odrębną grupę czynników zaangażowanych w syntezę i ekspresję czynnika VEGF stanowią czynniki wewnętrzne. Zalicza się do nich między innymi mutacje niektórych genów supresorowych oraz aktywację onkogenów [35].

Mutacje dotyczą głównie takich genów jak p53, p73, VHL (von Hippel Lindau). Prawidłowy, niezmutowany produkt białkowy genu VHL łączy się z różnymi białkami (np. HIF-1 α) tworząc kompleksy przeznaczone do degradacji. W wyniku mutacji genu VHL produkt białkowy jest inaktywowany lub w ogóle nie występuje. Część cząsteczki HIF-1 α jest stabilna zarówno w warunkach hipoksji, jak i prawidłowego utlenowania komórek, przez co następuje ciągła aktywacja syntezy czynników proangiogennych, między innymi VEGF. Produkty białkowe niezmutowanych form genów p53 i p73 hamują transkrypcję VEGF. W wyniku mutacji tych genów powstałe białka stymulują transkrypcję VEGF, przez co pobudzają proces angiogenezy nowotworowej.

Aktywacja onkogenów, takich jak Src oraz RAS również bierze udział w syntezie i ekspresji VEGF [18].

Receptory VEGF

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF łączy się z receptorami o wysokim powinowactwie, należącymi do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej, przez co wywołuje swoje efekty biologiczne [37]. Znane są dwa główne receptory VEGF, określane jako VEGFR-1 (Flt, ang. *fms-like tyrosine kinase*) oraz VEGFR-2 (KDR, ang. *kinase insert domen-containing receptor*). Czynnik VEGF łączy się również z neuropiliną-1 (NP-1). Zidentyfikowano również receptor VEGFR-3 (Flt-4), jednak wiąże on cząsteczki VEGF-C i VEGF-D, a jego ekspresja ograniczona jest do śródbłonka naczyń limfatycznych. W związku z tym VEGFR-3 odgrywa rolę w limfangiogenezie i hematopoezie. Stwierdzono również występowanie formy rozpuszczalnej receptora sVEGFR-1 o wysokim powinowactwie do czynnika VEGF. Łącząc się z VEGF receptor sVEGFR-1 może hamować mitogenezę wywołaną przez VEGF i fizjologicznie hamować jego działanie [38].

Receptory VEGFR-1 oraz VEGFR-2 różnią się między sobą właściwościami. VEGFR-1 wykazuje co najmniej 10-krotnie większe powinowactwo do VEGF

niz VEGFR-2, jednak nie dochodzi do pełnej jego aktywacji. Na powierzchni błon komórkowych wykazujących ekspresję VEGF stwierdza się obecność zaledwie 3000 kopii receptora VEGFR-1, przy jednoczesnej obecności około 40000 kopii receptora VEGFR-2 [36]. Aktywacja VEGF zależy od rodzaju, dostępności oraz wiązania liganda z danym receptorem. Częsteczki VEGF, łącząc się z odpowiednimi receptorami powodują ich homo- lub heterodimeryzację. Dimeryzacja receptorów prowadzi do ich aktywacji, a w konsekwencji autofosforylacji określonych reszt tyrozynowych i aktywacji odpowiednich szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Receptory mogą być aktywowane poprzez łączenie specyficznego lub takiego samego liganda. Przykładem łączenia specyficznego liganda jest interakcja pomiędzy PIGF a receptorem VEGFR-1. Z kolei VEGF łączy się zarówno z receptorami VEGFR-1, VEGFR-2 jak i VEGFR-3. W wyniku tego tworzą się homo- lub heterodimery stymulujące odmienne szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego. Mimo iż cząsteczki receptorów wykazują podobieństwo strukturalne i homologię przekraczającą 40%, to na skutek ich aktywacji pobudzane są inne szlaki przekazywania komórkowego. Struktura receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2 na ogół jest podobna. Na część zewnątrzkomórkową receptorów składa się siedem motywów budową przypominających cząsteczkę immunoglobuliny (ang. *Ig-like domain*). Za częścią zewnątrzkomórkową znajdują się pojedyncza część przezbłonowa receptora, za którą z kolei znajduje się część okołobłonowa. Fragment wewnątrzkomórkowy receptorów VEGFR utworzony jest przez domenę kinazy tyrozynowej oraz zakończony C-końcem łańcucha polipeptydowego [34].

Czynnik VEGF wykazuje najszersze spektrum swego działania, łącząc się z receptorem VEGFR-2. W wyniku tego połączenia wywiera on efekt mitogenny na komórki śródbłonka, stymulujący angiogenezę i zwiększający przepuszczalność naczyń krwionośnych. VEGF łącząc się z receptorem VEGFR-1 może wywierać dwojaki efekt, zarówno hamujący, jak i pobudzający proces angiogenezy.

Receptor VEGFR-1

Funkcja receptora VEGFR-1 wciąż nie jest do końca poznana i pozostaje przedmiotem dyskusji. Receptory VEGFR-1 zlokalizowane są na błonach wielu komórek, między innymi na błonach monocytów, makrofagów, komórek śródbłonka, komórek nowotworowych guzów litych i nowotworów układu krwiotwórczego czy macierzystych komórek szeregu hematopoetycznego [39]. Ligandami dla receptora VEGFR-1 są VEGF, VEGF-B oraz PIGF. W cząsteczce VEGFR-1 funkcja kinaz jest w pewien sposób upośledzona i mimo przyłączenia liganda do receptora fosforylacja kinaz zachodzi jedynie w niewielkim stopniu. W wyniku tego możliwość aktywacji cząsteczek efektorowych jest znacznie ograniczona. Cząsteczki VEGFR-1 i sVEGFR-1 pełnią funkcje tzw. receptorów

przynętowych wychwytyjących cząsteczki VEGF. W ten sposób nie dopuszczają do połączenia VEGF z receptorem VEGFR-2, prowadząc do zahamowania aktywności VEGF [40]. Wykazano również, że połączenie VEGF z VEGFR-1 hamuje proliferację komórek śródbłonna [41].

Zaobserwowano także, że aktywność VEGF zależy od obecności w środowisku cząsteczek PIGF. Cząsteczki PIGF mają większe powinowactwo do receptora VEGFR-1, w wyniku czego wypierają cząsteczki VEGF z tych połączeń. Przyłączenie PIGF do VEGF-1 aktywuje receptory i prowadzi do powstania heterodimerów VEGFR-1/VEGFR-2, a następnie transfosforylacji kinazy tyrozynowej VEGFR-2, co w konsekwencji stymuluje proces angiogenezy. Na aktywność receptora VEGFR-1 wpływa wiele innych czynników środowiska, na przykład współwystępowanie z innymi receptorami (VEGFR-2, VEGFR-3, NP-1). Rodzaj liganda łączącego się z receptorem VEGFR-1 również determinuje rodzaj odpowiedzi komórki. Lokalizacja receptora VEGFR-1 w różnych typach komórek, innych niż komórki śródbłonna, indukuje odmienne szlaki sygnałowe. Przykładem odmiennej aktywności VEGFR-1 jest migracja i proliferacja monocytów wywołana połączeniem PIGF z receptorem VEGFR-1 lub chemotaksja monocytów wywołana związaniem VEGF lub PIGF z VEGFR-1 [42].

Na podstawie badań eksperymentalnych nad biologią nowotworów wykazano, że w wyniku aktywacji VEGFR-1 następuje pobudzenie proliferacji, migracji i zwiększenie zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych (m.in. komórek raka piersi, płuc czy jelita grubego) [43].

Receptor VEGFR-2

Głównym czynnikiem aktywującym receptor VEGFR-2 jest VEGF. Aktywacja VEGFR-2 zachodzi również w wyniku połączenia receptora z fragmentami powstałymi na skutek proteolizy VEGF-C i VEGF-D. Receptor VEGFR-2 zlokalizowany jest na błonie komórek śródbłonna, komórek szeregu hematopoetycznego oraz niektórych nowotworów litych i nowotworów układu krwiotwórczego [44].

Główne miejsce autofosforylacji receptora VEGFR-2 (Y1175) zlokalizowane jest na C-końcu łańcucha polipeptydowego tworzącego receptor. Miejsce autofosforylacji odpowiada za aktywację fosfolipazy C γ odgrywającej znaczącą rolę w efektach komórkowych będących efektem aktywacji VEGFR-2. Fosfolipaza C γ w sposób pośredni aktywuje szlak kinaz aktywowanych mitogenem (ang. *MAPK-kinase pathway*). Prowadzi to do pobudzenia cyklu komórkowego, proliferacji i różnicowania komórek. Fosforylacja kinazy aktywuje też inne cząsteczki adaptorowe, jak Shb (ang. *Src homology 2 and β cells*). Cząsteczki Shb reagują z miejscem fosforylacji Y1175 zlokalizowanym na receptorze VEGFR-2, co jest warunkiem niezbędnym do aktywacji kinazy P13. Aktywacja kinazy P13 prowadzi do przetrwania komórek, migracji,

prolifracji oraz stymulacji procesu angiogenezy [45]. Aktywność kinazy P13 reguluje białko PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). Wykazano, że nadmierna ekspresja genu, a w konsekwencji aktywność białka PTEN, prowadzi do defosforylacji kinazy P13. Prowadzi to do zahamowania proliferacji komórek śródbłonna indukowanej przez czynnik VEGF. W wielu komórkach nowotworowych występuje zmutowana forma PTEN, która nie jest w stanie hamować proliferację komórek śródbłonna, co sprzyja pobudzeniu procesu angiogenezy [46]. Kinaza P13 wpływa również na ekspresję receptora kinazy tyrozynowej Tie-2, regulując w ten sposób angiogenezę [47].

Drugim miejscem fosforylacji receptora VEGFR-2 jest Y1214, które zlokalizowane jest również na C-końcu cząsteczki VEGFR-2. Uczestniczy ono w aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenem, takich jak Cdc42 oraz p38, regulując w ten sposób przemieszczanie się komórek. Migracja komórek stymulowana jest również tworzeniem kompleksu przez białko adaptorowe TSA δ (ang. *T-cell specific adapter*) z Src. Poprzedzone jest to łączeniem się TSA δ znajdującego się w komórkach śródbłonna wyścielającego naczynia guza nowotworowego z miejscem fosforylacji Y951 [48]. Aktywacja szlaków zależnych od Src prowadzi do wzmożonej syntezy tlenu azotu (II), regulującego napięcie oraz przepuszczalność ścian naczyń. Aktywacja receptora VEGFR-2, oprócz funkcji pobudzającej może również hamować i ograniczać aktywność receptora. W następstwie przyłączenia się liganda do receptora VEGFR-2 następuje wysycenie całej puli receptora w komórce (ang. *downregulation*). Ponadto dochodzi do autofosforylacji kinaz serynowych VEGFR-2, czego skutkiem jest przyłączenie ligazy E3 do cząsteczki receptora, jej ubiquitynacja i degradacja [49].

Terapia antyangiogenna

Badania angiogenezy na poziomie molekularnym wykazały, że wzrost nowotworów zależy od tworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych, więc efektywne zahamowanie powstawania tej sieci, uszkodzenie lub całkowite jej zniszczenie powinny skutecznie hamować wzrost nowotworów. W ten sposób narodził się nowy rodzaj terapii przeciwnowotworowej, jaką jest terapia antyangiogenna [50].

Wyróżniamy dwa kierunki terapii antyangiogennej – bezpośredni oraz pośredni. W metodzie bezpośredniej zaangażowane są inhibitory migracji i proliferacji komórek endotelialnych oraz tworzenia nowych rurek endotelialnych prowadzących do powstania nowych naczyń. Dzieje się tak na skutek indukcji w komórkach apoptozy, czyli sprowadzania ich na drogę zaprogramowanej śmierci. W metodzie pośredniej stosowane są inhibitory czynników angiogennych oraz ich receptorów w komórkach nowotworowych guza oraz śródbłonna nowo powstających naczyń [51].

Tabela 2. Główne grupy leków antyangiogennych

Table 2. Main groups of antiangiogenic drugs

Grupa leków antyangiogennych	Przykłady
Antagoniści czynników antyangiogennych	- przeciwciała anty VEGF (Avastin, Bevacizumab) - rozpuszczalne receptory VEGF (sFlt-1, sFlk-1)
Blokery receptorów czynników angiogennych	- anty VEGF-R2 (Semaxanib) - anty PDGF-R (Gleevec)
Białkowe inhibitory angiogenezy	- angiostatyna - endostatyna
Antagoniści integryn	- anty α V β 3 (Vitaxin, Cilengitide)
Leki przeciwzapalne	- niesterydowe leki przeciwzapalne (aspiryna, indometacyna) - inhibitory COX-2 (Celecoxib, Cortisol) - inhibitory komórek tucznych (Talidomid)
Inhibitory proteinaz	- inhibitory metaloproteinaz (Batimastat)
Inne	- INF α - analogi kwasu retinoinowego

Terapia antyangiogenna napotyka na swej drodze niestety wiele trudności. Wiązą się one przede wszystkim z tym, że wyniki badań przedklinicznych prowadzonych na myszach nie odzwierciedlają wyników uzyskanych w badaniach klinicznych [52]. Przyczyn tego zjawiska może być kilka. Jedną z nich jest na przykład większa podatność mysich naczyń krwionośnych w guzie pochodzenia ludzkiego na terapię antyangiogenną niż ludzkich naczyń krwionośnych.

Różnice w wynikach mogą być również spowodowane różnicami w budowie pomiędzy nowotworami ludzkimi a nowotworami doświadczalnymi. Tkanki zmienione nowotworowo przeszczepiane zwierzętom zbudowane są z jednakowych komórek, czyli klonów i charakteryzują się szybkim wzrostem. Ludzkie nowotwory z kolei rosną wolniej i składają się z komórek niejednorodnych pod względem genetycznym, które mogą wytwarzać różne czynniki proangiogenne. Genom komórki nowotworowej cechuje się niestabilnością i podlega licznym mutacjom, które w efekcie prowadzą do zaburzenia ekspresji genów. Ekspresja czynników angiogennych może zatem ulegać zmianie w miarę rozwoju guza. Na podstawie badań udowodniono, że w początkowych stadiach kancerogenezy mogą być produkowane nieliczne czynniki angiogenne, jeden lub dwa, natomiast w zaawansowanym stadium choroby produkowanych jest wiele czynników [53]. Strategia terapeutyczna polegająca na zahamowaniu tylko jednego z czynników angiogennych zazwyczaj jest nieskuteczna z uwagi na fakt, iż jest to kompensowane nadekspresją innych, podobnie działających substancji, co w konsekwencji może prowadzić do wytworzenia oporności na dany czynnik angiogeny [4]. Biorąc pod uwagę ten fakt, coraz większe nadzieje pokłada się w zastosowaniu preparatów działających bezpośrednio na komórki śródbłonna, gdyż mają one bardziej stabilny materiał genetyczny.

Leki antyangiogenne

Leki antyangiogenne stanowią różnorodną grupę związków, dla których docelową strukturą kluczową dla procesu angiogenezy jest komórka śródbłonna. Zasadniczo terapeutyki te dzielimy na dwie podstawowe grupy – leki działające bezpośrednio lub pośrednio na komórki śródbłonna.

Celem leków antyangiogennych działających pośrednio jest neutralizacja czynnika angiogennego i zablokowanie jego produkcji. Najczęściej stosowane są przeciwciała skierowane przeciwko rodzinie VEGF. Leki antyangiogenne działające bezpośrednio hamują z kolei proliferację, migrację i różnicowanie komórek śródbłonna. W przypadku zastosowania leków działających bezpośrednio sprowadza się do minimum ryzyko wystąpienia oporności na dany lek, gdyż genom komórek śródbłonna jest stabilny [54].

Zastosowanie leków hamujących proces angiogenezy budzi wiele nadziei. Podstawowe zalety tego typu terapii, to:

- działanie niezależne od lokalizacji nowotworu oraz jego typu,
- wysoce swoisty efekt terapeutyczny,
- penetracja leków do komórek docelowych po podaniu systemowym jest niezaburzona przez procesy dyfuzji tkankowej,
- eliminacja komórek śródbłonna prowadzi w konsekwencji do eliminacji komórek nowotworowych,
- komórki śródbłonna charakteryzują się stabilnością genetyczną, więc zjawisko nabycia lekooporności zostaje sprowadzone do minimum [55].

Obecnie w badaniach klinicznych wykorzystuje się wiele leków hamujących proces angiogenezy na różnych jego etapach. Należą do nich m.in. antagoniści czynników angiogennych, receptory cytokin proangiogennych, naturalne inhibitory angiogenezy, inhibitory metaloproteinaz czy inhibitory integryn. Wciąż trwają badania leków przeciwzapalnych, do których należą głównie inhibitory

komórek tucznych, np. talidomid oraz inhibitory COX-2 (cyklooksyzgenaza-2) [4, 56].

Na szczególne zainteresowanie zasługuje bewacizumab (Avastin) [57, 58]. Jest on lekiem zatwierdzonym przez FDA (Agencja do spraw Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*) jako lek pierwszej linii w leczeniu przerzutowego raka jelita grubego (we współdziałaniu z cytostatykami) oraz raka piersi [59]. Jest on rekombinowanym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko VEGF [60, 61].

Do związków hamujących proces angiogenezy należą również metabolity drobnoustrojów, jak na przykład:

- CM 101 – toksyna produkowana przez paciorkowce beta-hemolizujące, nieimmunogeny polisacharyd, uszkadzający tylko młode rozwijające się naczynia,
- Taxol – alkaloid pochodzący z *Taxus brevifolia*, hamujący angiogenezę indukowaną bFGF i VEGF,
- Erbstatyna – produkowana przez *Streptomyces* sp., będąca inhibitorem kinazy tyrozynowej [62].

W terapii antyangiogennej znalazło zastosowanie również wiele związków występujących w produktach naturalnych, takich jak: owoce, warzywa, zielona herbata. Najważniejszą grupę stanowią polifenole występujące m.in. w winie. Flavopiridol będący syntetycznym analogiem polifenoli jest obecnie w II fazie badań klinicznych. Działanie antyangiogenne wykazuje również genisteina występująca w roślinach bobowatych, głównie w soi [63].

Zalety substancji antyangiogennej występujących w produktach naturalnych, to m.in.:

- ogólna dostępność, gdyż wiele z tych substancji obecnych jest w naszym codziennym pożywieniu,
- niska cena produktów w porównaniu z innymi lekami,
- są efektywnie absorbowane z przewodu pokarmowego,
- wykazują długotrwałe działanie, przez co mogą znaleźć zastosowanie w długotrwałej profilaktyce oraz leczeniu,
- rzadko wykazują działanie uboczne.

Badania wykazały, że terapia antyangiogenna wykazuje większą skuteczność w skojarzeniu inhibitorów angiogenezy z radioterapią lub chemioterapią [64].

Negatywne skutki terapii antyangiogennej

Pomimo wielu sukcesów, jakie niesie za sobą terapia antyangiogenna, związane są z nią pewne niebezpieczeństwa. Terapia antyangiogenna może prowadzić do systemowej, ogólnej angiosupresji, co w konsekwencji zaburza proces gojenia się ran, zrostania złamań oraz zaburza prawidłowe funkcjonowanie narządów rozrodczych kobiety. Antyangiogenna terapia celowana na receptory VEGFR może w konsekwencji doprowadzić nawet do rozwoju cukrzycy, gdyż receptory VEGFR odgrywają rolę w utrzymaniu endotelium wysepek trzustkowych [65].

Innym ograniczeniem stosowania leków antyangiogennej jest ich toksyczność. W efekcie hamowania szeregu szlaków sygnałowych w komórkach, leki te mogą uszkadzać wiele procesów fizjologicznych związanych z powstawaniem komórek szpikowych, hemopoetą czy przeżyciem komórek śródbłonkowych. Do często obserwowanych, negatywnych skutków terapii antyangiogennej należy perforacja naczyń krwionośnych i krwotoki, co w konsekwencji prowadzi do niedokrwienia i niedotlenienia różnych narządów w organizmie. Sytuacja taka ma miejsce na przykład w niedokrwiennej chorobie serca.

Długotrwała terapia antyangiogenna może doprowadzić do niszczenia sieci naczyń krwionośnych oraz powstawania w ich obrębie słabo utlenowanych komórek nowotworowych. Obniżenie pH środowiska oraz niedotlenienie stymuluje w konsekwencji wzrost inwazyjności przeżywających komórek nowotworowych oraz obniża skuteczność penetracji leków antynowotworowych w obręb zmienionej tkanki [66].

Podsumowanie

Terapia antyangiogenna prowadząca do upośledzenia bądź zniszczenia sieci naczyń krwionośnych okalającej guz nowotworowy budzi wielkie nadzieje. Zahamowanie transportu składników odżywczych i tlenu do komórek nowotworowych upośledza ich prawidłowe funkcjonowanie, hamuje wzrost guza nowotworowego oraz tworzenie przez niego przerzutów. Obecnie prowadzone są badania nad optymalizacją sposobu podawania i dawkowania leków hamujących proces angiogenezy oraz czasem trwania terapii w celu uzyskania największej skuteczności.

Piśmiennictwo / References

1. Zielonka TM. *Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych*. *Alergia Astma Immunologia* 2003; 8: 169-174.
2. Grosicki S, Grosicka A, Hołowiecki J. *Kliniczne znaczenie angiogenezy i czynników ją modyfikujących w onkohematologii*. *Wiadomości lekarskie* 2007; 60: 39-41.
3. Griffioen AW, Molema G. *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic Inflammation*. *Pharmacology Reviews* 2000; 52: 237-268.
4. Olbryt M, Szala S. *Białkowe inhibitory angiogenezy w terapii nowotworów*. *Współczesna Onkologia* 2005; 9: 48-52.
5. Patel-Hett S, D'Amore PA. *Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis*. *Int J Dev Biol*. 2011; 55(4-5): 353-363.
6. Wiśniewski T, Makarewicz R, Ziółkowska E, Rystok D, Żekanowska E. *Angiogeneza nowotworowa – mechanizmy, czynniki regulatorowe, leki*. *Onkologia Info* 2009; 5: 172-178.
7. Wnuczko K, Szczepański M. *Śródbłonek – charakterystyka i funkcje*. *Pol. Merk. Lek.* 2007; XXIII, 133: 60-65.

8. Napoli C, Giordano A, Casamassimi A, Pentimalli F, Ignarro LJ, De Nigris F. *Directed in vivo angiogenesis assay and the study of systemic neoangiogenesis in cancer*. Int J Cancer. 2011; 128(7): 1505-8.
9. Mizia-Malarz A, Sobol G, Woś H. *Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych*. Pol. Merk. Lek. 2008; XXIV: 185-189.
10. Szostakiewicz B, Dziadziuszko R, Jassem J. *Perspektywy zastosowania inhibitorów angiogenezy w leczeniu nie drobnokomórkowego raka płuca*. Współczesna Onkologia 2003; 7: 668-674.
11. Carmeliet P. *Angiogenesis in health and disease*. Nat. Med. 2003; 9(6): 653-660.
12. Cierniewski CS. *Regulacja angiogenezy – nowa broń w onkologii*. Biol. Molek. 2006; 1(5): 20-22.
13. Xu L, Kanasaki K, Kitada M, Koya D. *Diabetic angiopathy and angiogenic defects*. Fibrogenesis Tissue Repair 2012; 5(1): 13
14. Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med 2000; 63: 89-95.
15. Giordano FJ. *Angiogenesis: mechanisms, modulation and target imaging*. J Nucl Cardiol 1999; 6: 664-671.
16. Juczevska M i wps. *Udział komórek tucznych w angiogenezie*. Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 343-358.
17. Denekamp J. *The tumor microcirculation as a target in cancer therapy: a clear perspective*. Eur J Clin Invest 1999; 29: 733-736.
18. Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. *Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach*. Pneumonol. Alergol. Pol. 2006; 74: 414-420.
19. Lirdprapamongkol K, Chiablaem K, Sila-Asna M, Surarit R, Bunyaratvej A, Svasti J. *Exploring stemness gene expression and vasculogenic mimicry capacity in well- and poorly-differentiated hepatocellular carcinoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 422(3): 429-435.
20. Hendrix MJ, Sefter EA, Hess AR i wsp. *Vasculogenic mimicry and tumour cell plasticity: lessons from melanoma*. Nat Rev Cancer 2003; 3: 411-421.
21. Wong ML, Prawira A, Kaye AH, Hovens CM. *Tumor angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas*. J Clin Neurosci. 2009; 16(9): 1119-1130.
22. Cox G i wsp. *Angiogenesis and non-small cell lung cancer*. Lung Cancer 2000; 27: 81-100.
23. Gaitskell K, Martinek I, Bryant A, Kehoe S, Nicum S, Morrison J. *Angiogenesis inhibitors for the treatment of ovarian cancer*. Cochrane Database Syst Rev. 2011; 9.
24. Wagner AD, Thomssen C, Haerting J, Unverzagt S. *Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) targeting therapies for endocrine refractory or resistant metastatic breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev. 2012; 7.
25. Gerber HP, Ferrara N. *The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis*. J Mol Med 2003; 81: 20-31.
26. Martens T, Laabs Y, Günther HS, Kemming D, Zhu Z, Witte L, Hagel C, Westphal M, Lamszus K. *Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2*. Clin Cancer Res. 2008; 14(17): 5447-5458.
27. Ferrara N. *Molecular and Biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med 1999; 77: 527-543.
28. Zhang Y, Zhang N, Dai B, Liu M, Sawaya R, Xie K, Huang S. *FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells*. Cancer Res. 2008; 68(21): 8733-8742.
29. Jain RK. *Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy*. Science 2005; 307: 58-62.
30. Kamat A, Rajoria S, George A, Suriano R, Shanmugam A, Megwalu U, Prakash PB, Tiwari R, Schantz S. *Estrogen-mediated angiogenesis in thyroid tumor microenvironment is mediated through VEGF signaling pathways*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011; 137(11): 1146-1153.
31. Carrol VA, Binder BR. *The role of the plasminogen activation system in cancer*. Semin. Thromb. Hemost. 1999; 25: 183-197.
32. Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocrine Rev. 2004; 25: 581-611.
33. Ferrara N, Mass RD, Campa C i wsp. *Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration*. Ann. Rev. Med. 2006; 58: 491-504.
34. Dvorak HF. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol 2002; 20: 4368-4380.
35. Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF. *Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy*. Clin Cancer Res. 2009; 15(14): 4589-4599.
36. Dvorak HF. *Angiogenesis: update 2005*. J. Thromb. Haemost. 2005; 3: 1835-1842.
37. Verpelli C, Bertani G, Cea V, Patti M, Bikfalvi A, Bello L, Sala C. *Anti-angiogenic therapy induces integrin-linked kinase 1 up-regulation in a mouse model of glioblastoma*. PLoS One. 2010; 5(10):e13710.
38. Rahimi N. *Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials*. Exp. Eye Res. 2006; 83: 1005-1016.
39. Li C, Liu B, Dai Z, Tao Y. *Knockdown of VEGF receptor-1 (VEGFR-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (CRCC)*. Cancer Biol Ther. 2011; 12(10): 872-880.
40. Scadden DT. *Cancer stem cells refined*. Nat. Immunol. 2004; 5: 701-703.
41. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 downregulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase- dependent pathways*. J. Biol. Chem. 2001; 276: 26969-26979.
42. Dikov MM, Ohm JE, Ray N i wsp. *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation*. J. Immunol. 2005; 174: 215-222.

43. Hitsuka S, Maru Y, Okada A i wsp. *Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth receptor-1) in pathological angiogenesis*. *Cancer Res.* 2001; 61: 1207–1213.
44. Kowanz M, Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective*. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5018–5022.
45. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C i wsp. *The adapter protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22267–22275.
46. Huang J, Kontos CD. *PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects*. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 10760–10766.
47. Lelievre E, Bourbon PM, Duan LJ i wsp. *Deficiency in the p110 a subunit of PI3-kinase results in diminished Tie-2 expression and Tie2-/- like vascular defects in mice*. *Blood* 2005; 105: 3935–3938.
48. Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J i wsp. *VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis*. *EMBO J.* 2005; 24: 2342–2353.
49. Singh AJ, Meyer RD, Band H i wsp. *The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation*. *Mol. Biol. Cell* 2005; 16: 2106–2118.
50. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP. *Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(9): 3749–3754.
51. Banyś A, Bułaś L, Długosz E, Szulc-Musiał B, Jankowski A. *Angiogeneza w chorobie nowotworowej*. *Patofizjologia* 2009; 65: 247–250.
52. Bareschino MA, Schettino C, Colantuoni G, Rossi E, Rossi A, Maione P, Ciardiello F, Gridelli C. *The role of antiangiogenic agents in the treatment of breast cancer*. *Curr Med Chem.* 2011; 18(33): 5022–5032.
53. Rak J. *Onkogeny jako modyfikatory procesów naczyniowych w nowotworach*. *Nowotwory* 2006; 56: 57–79.
54. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. *Angiogenesis and invasion in glioma*. *Brain Tumor Pathol.* 2011; 28(1): 13–24.
55. Cea V, Sala C, Verpelli C. *Antiangiogenic Therapy for Glioma*. *Journal of Signal Transduction* 2012; 10.1155/2012/483040.
56. Gately S, Li WW. *Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy*. *Semin. Oncol.* 2004; 31: 2–11.
57. Adamkiewicz-Drożyńska E, Balcerska A, Stefanowicz J, Bień E. *Wczoraj, dziś i jutro terapii antyangiogennej*. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 2008; XII, 4, cz. II: 995–1000.
58. Small AC, Oh WK. *Bevacizumab treatment of prostate cancer*. *Expert Opin Biol Ther.* 2012.
59. Croom KF, Dhillon S. *Bevacizumab: a review of its use in combination with paclitaxel or capecitabine as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer*. *Drugs* 2011; 71(16): 2213–2229.
60. Dobrek Ł, Szcześniak P, Thor P i wsp. *Aktualne kierunki w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych*. *Geriatrics* 2008; 2: 37–46.
61. Lorusso V. *Bevacizumab in the treatment of HER2-negative breast cancer*. *Biologics* 2008; 2(4): 813–821.
62. Bałań BJ. *Angiogeneza – problem na miarę XXI wieku*. *Nowa Medycyna* 2000; 4.
63. Lamy S, Akla N, Ouanouki A, Lord-Dufour S, Béliveau R. *Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway*. *Exp. Cell Res.* 2012; 318(13): 1586–1596.
64. Albin A, Tosetti F, Li VW, Noonan DM, Li WW. *Cancer prevention by targeting angiogenesis*. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012; 120.
65. Kubota Y. *Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy*. *Keio J Med.* 2012; 61(2): 47–56.
66. Szala S. *Rola leków antyangiogennych w wielolekowej terapii nowotworów*. *Onkol. Prak. Klin.* 2008; 4:1–7.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Paulina Jarosz
Krzątna 323
36-110 Majdan Królewski
607-076-570
paulina.jarosz@urz.pl