

Angiogeneza u malignih tumora

Angiogenesis in Malignancies

Joško Lešin, Gordana Zlopaša, Andrea Plavec,
Anastazija Aleksandrova-Stanojević, Goran Vujić

Klinika za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb
10000 Zagreb, Petrova 13

Sažetak Angiogeneza ili neovaskularizacija je proces stvaranja krvnih žila u odraslih, a eksperimenti upućuju na dva puta stvaranja novih krvnih žila: s pomoću endotelnih prekursorskih stanica iz koštane srži i iz već postojećih krvnih žila. Tumorski rast i metastaziranje ovisni su o angiogenezi. Klinička primjena istraživanja angiogeneze može biti dijagnostička i terapijska. Gustoća tumorske mikrocirkulacije (MVD, engl. microvessel density) pokazatelj je intenziteta angiogeneze - broj krvnih žila po jedinici površine. Imunohistokemijski biljezi (antitijela) upotrijebljeni za određivanje MVD-a prikazani su prema specifičnosti. Dokazana je povezanost MVD-a s ekspresijom stimulatora angiogeneze, tumorskim rastom i pojavom udaljenih metastaza, odnosno MVD je nezavisni prognostički čimbenik u predviđanju ishoda mnogih karcinoma. Angiogeneza u sklopu tumorskog rasta atraktivan je terapijski cilj koji se svodi na liječenje inhibicijom stimulatora angiogeneze i egzogeno primjenu inhibitora. Prikazan je pregled svih poznatih lijekova koji su u različitim fazama pretkliničkog i kliničkog ispitivanja, a samo su rijetki u široj primjeni.

Cljučne riječi: angiogeneza, tumorski rast, metastaze, inhibitori angiogeneze

Summary Angiogenesis or neovascularization is a process of formation of blood vessels in adults, and experiments indicate the two pathways of formation: angiogenesis by endothelial progenitor cells from the bone marrow, and angiogenesis from already existing blood vessels. Tumor growth and metastatic potential depend on angiogenesis. Angiogenesis research can have both diagnostic and therapeutic use. Microvessel density (MVD) is an indicator of angiogenesis intensity - the number of blood vessels per surface unit. Immunohistochemical markers (antibodies) used for MVD determination are presented due to their specificity. Numerous studies have shown a direct correlation between MVD and expression of factors that stimulate angiogenesis, tumor growth and metastatic potential in numerous solid tumors, i.e. MVD is an independent prognostic factor. Angiogenesis in tumor growth represents an attractive therapeutic goal consisting in the inhibition of factors that stimulate angiogenesis and the exogenous use of inhibitors. Anti-angiogenic therapy of cancer is presented, mostly drugs in various phases of investigation and the rare ones which are in widespread clinical use.

Key words: angiogenesis, tumor growth, metastatic potential, inhibitors of angiogenesis

Vaskulogeneza je proces stvaranja krvnih žila u embriju, u kojoj se krvne žile formiraju iz endotelnih staničnih prekursora koje nazivamo angioblasti. Angiogeneza ili neovaskularizacija je proces stvaranja krvnih žila u odraslih i donedavno se smatralo da je rezultat grananja i širenja već postojećih krvnih žila. Međutim, eksperimenti upućuju na dva puta stvaranja novih krvnih žila:

1. angiogeneza s pomoću endotelnih prekursorskih stanica ("endothelial progenitor cells" - EPCs) iz koštane srži;
2. angiogeneza iz već postojećih krvnih žila (1-3).

Angiogeneza je važan u nizu fizioloških, ali i patoloških procesa u ljudskom organizmu. Fiziološki se nalazi tijekom embrionalnog razvoja, cijeljenja rane, za vrijeme formiranja žutog tijela i folikula jajnika te u rastu endometrija. Patološka je znakovita za kardiovaskularne bolesti (ate-

rosklerozu), kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis, Crohnova bolest), dijabetes (dijabetička retinopatija), psorijazu, endometriozu i pretilost. Rast i razvoj te metastaziranje malignih tumora ovise o angiogenezi (1, 4, 5).

Prva istraživanja angiogeneze započela su 1962. godine u Bethesda kada su F. Becker i J. Folkman proučavali hemoglobinske otopine kao moguću zamjenu za transfuziju.

Kasnije su Folkman i suradnici spoznali da endotelne stanice bubre, ali ne mogu proliferirati u hemoglobinskim otopinama koje ne sadržavaju trombocite. To je bio jedan od najranijih eksperimentalnih modela koji je pokazao da tumorski rast može biti zakočen ako se tumor drži u "prevaskularnom stanju" iz čega autori zaključuju da su tumorski rast i metastaziranje ovisni o angiogenezi. Naime, u nastalom tumoru svakom povećanju broja tumorskih stanica prethodi povećanje broja novih krvnih kapilara (5, 6).

Angiogeneza iz endotelnih prekursorskih stanica

Formiranje hematopoetskog i vaskularnog sustava započinje tijekom embrionalnog razvoja čije su preteče dva tipa stanica (2):

hemangioblasti – stanice koje se pretvaraju u hematopoetske zametne stanice i

angioblasti – stanice koje čine osnovu vaskularnog sustava.

Angioblasti proliferiraju, migriraju u periferna tkiva i diferenciraju se u endotelne stanice koje formiraju arterije, vene i limfne žile (3, 7). Oni potiču i stvaranje pericita, glatkih mišićnih stanica te zajedno čine periendotelnu staničnu stijenku.

U novije je vrijeme otkriveno postojanje stanica sličnih angioblastima koje zovemo EPCs ("endothelial precursor cells") u koštanoj srži odraslih ljudi (8). One u određenom trenutku ulaze u krvožilni sustav, migriraju do oštećenog ili tumorski promijenjenog tkiva gdje potiču stvaranje kapilarne mreže. Priroda ovog mehanizma još je nedovoljno istražena (3, 7, 8).

Angiogeneza iz već postojećih krvnih žila

U ovom tipu angiogeneze nove kapilare izrastaju iz malih venula bez mišićnog sloja. U nazočnosti angiogenog poticaja započinje razgradnja bazalne membrane i endotelne stanice venula šire se kroz njihovu stijenku. Najbitniji dijelovi ovog procesa su:

- vazodilatacija kao odgovor na dušični oksid i izazvanu pojačanu propustljivost već postojećih krvnih žila zbog djelovanja vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF),
- proteolitička razgradnja bazalne membrane roditeljskih krvnih žila metaloproteinazama i prekid međustaničnog kontakta između endotelnih stanica krvnih žila uzrokovani aktivirajućim čimbenikom plazminogena (9),
- migracija endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru,
- proliferacija endotelnih stanica, odmah pokraj vodećeg izbojka migrirajućih stanica,
- sazrijevanje endotelnih stanica što uključuje inhibiciju rasta i remodeliranje u kapilaru (10),
- mobiliziranje periendotelnih stanica (uključujući pericite za male kapilare i glatke mišićne stanice za velike krvne žile) da bi podržavale endotelne strukture i formirale pravu krvnu žilu.

Aktivacija endotelnih stanica zbiva se pod utjecajem citokina. U angiogenezu su uključeni brojni čimbenici od kojih neki stimuliraju, a neki inhibiraju angiogenezu.

VEGF je prvi i najvažniji stimulator angiogeneze. Izlučuju ga tumorske stanice, makrofazi i druge stanice koje sudjeluju u procesu imunskog odgovora (11-16). Otkrili su ga Dvorak i suradnici, a molekularnu strukturu definirao je Ferrara. Postoji više grupa VEGF: VEGFA, VEGFB, VEGFC i VEGFD, od kojih je VEGFA najvažniji. To je multifunkcionalan glikoprotein molekularne težine 34 do 45 kD koji ima niz važnijih djelovanja na endotel krvnih žila. Djelovanje na endotelne stanice zbiva se preko dvije vrste receptora koji imaju aktivnost tirozin kinaze: flt-1 i KDR. Osim citokina, važni su i ostali mehanizmi uključeni u kontrolu angiogeneze. Primjer takvoga vanjskog čimbenika su hormoni koji svojim djelovanjem mogu potaknuti angiogenezu.

Stanice imunskog sustava kao monociti/makrofazi, limfociti i mastociti mogu mijenjati ravnotežu između stimulatora i inhibitora angiogeneze. T-limfociti su važni za aktivaciju endotelne ekspresije različitih metaloproteinaza preko interakcije CD-40/CD-40-ligandom.

Hipoksija je važan čimbenik koji potiče neovaskularizaciju.

Mnogi onkogeni c-myc, sis i src dokazani su kao stimulatori ekspresije mnogih molekula uključenih u angiogenezu. Mutant ras-onkogen sudjeluje u regulaciji produkcije stimulatora angiogeneze kao što su TGF- α , TGF- β i VEGF. Osim toga aktivacija onkogeni potiče proizvodnju i aktivaciju enzima koji razlažu bazalnu membranu i ekstracelularni matriks.

Tumor-supresorski geni i njihovi proteini također imaju ulogu u poticanju angiogeneze. Inaktivacija p53-gena i njegova proteina smanjuje proizvodnju trombospondina, inhibitora angiogeneze te se na taj način stimulira angiogeneza (17, 18).

Klinička primjena istraživanja angiogeneze može biti dijagnostička i terapijska.

Dijagnostička uloga angiogeneze

Gustoća tumorske mikrocirkulacije (MVD, engl. "microvessel density" ili IMD, "intratumor microvessel density") pokazatelj je intenziteta angiogeneze. Govori o broju krvnih žila po jedinici površine. Niz studija upućuje na povezanost MVD-a s ekspresijom stimulatora angiogeneze, tumorskim rastom i pojavom udaljenih metastaza.

Mnoge su studije pokazale direktnu povezanost između izlučivanja proangiogenih citokina i MVD-a. Ekspresija VEGF-a korelira s MVD-om u mnogim solidnim tumorima [prostatu (19), debelo crijevo (20), jetra (21), dojka (22)]. Toi i sur. komparirali su MVD i VEGF i PDGF kod 152 bolesnice s invazivnim duktalnim karcinomom dojke te su dokazali da u 70% slučajeva postoji pojačana ekspresija obaju stimulatora angiogeneze (23). Vrijednosti VEGF-a i PDGF-a u krvi bile su značajno povezane s vrijednošću MVD-a. Signifikantnu povezanost MVD-a s lučenjem VEGF-a nalazimo u radovima o karcinomu želuca (24) i karcinomu cerviksa (25). Objavljeni su radovi koji pokazuju povezanost MVD-a i drugih stimulatora angiogeneze kao bFGF-a (26-29).

Različite radiološke pretrage tumorskog krvožilja koreliraju s MVD-om. Magnetska rezonancija (MR), kolorni dopler i pozitronska emisijska tomografija (PET) (30) radiološke su pretrage kojima se pokazalo da i one mogu dokazati promjene u MVD-u.

Budući da je pojava metastaza najvažniji prognostički čimbenik u bolesnica s karcinomom, određivanje metastatskog potencijala primarnog tumora od velikog je značenja. Liota i sur. su još prije 20 godina na animalnome modelu dokazali povezanost MVD-a s brojem intravaskularnih tumorskih stanica i pojavom plućnih metastaza. Stupanj angiogeneze u mnogim tumorima može predvidjeti pojavu metastaza. Ovo je zapažanje najprije opisano kod melanoma. Dokazana je jasna razlika stadija bez neovaskularizacije kada su metastaze rijetke i stadija s intenzivnom neovaskularizacijom koji je povezan s čestim lokalnim i udaljenim metastazama.

Nizom je radova dokazano da je MVD nezavisni prognostički čimbenik u predviđanju ishoda mnogih karcinoma (19-22).

MVD se može odrediti upotrebom imunohistokemijskih biljega koji se vežu za različite komponente endotelne stanice. To su antitijela protiv specifičnih antigena. Postoje dvije kategorije tih antitijela, odnosno biljega. Prvu skupinu čine panendotelni stanični biljezi (CD 31, CD 34, faktor VIII) koji se vežu osim na endotelne stanice i na fibroblaste, stanice upalnog odgovora ili stromalne stanice. Drugu skupinu čine antitijela koja se vežu samo na aktivirane endotelne stanice ili endotelne stanice u proliferaciji.

Endoglin (CD 105) dio je receptorskog kompleksa za TGF- β 1 i 3 molekule koje se stvaraju u tumorskoj angiogenezi. Endoglinška antitijela preferiraju aktivirane endotelne stanice koje sudjeluju u tumorskoj angiogenezi.

CD 105 ima mnoge prednosti pred panendotelnim biljezima. Različite su studije dokazale da je mnogo osjetljiviji i specifičniji od svih dosad upotrijebljenih. Dokazano je da se anti CD 105-antitijela vežu na sve novostvorene endotelne stanice i krvne žile te samo na 20% prethodno formiranih krvnih žila (neneoplastične). Ne veže se na upalne i stromalne stanice. To smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata (30).

U našoj studiji iz 2006. analizirane su 102 bolesnice liječene od 1996. do 2002. godine zbog karcinoma vrata maternice kliničkog stadija IB-IIB. Dijagnoza raka vrata maternice postavljena je prema klasičnome dijagnostičkom protokolu: klinički pregled, PAPA-test, PHD-analiza uzorka biopsije, pregled parametrija. Osim klasičnih parametara (histološki tip tumora, stupanj zrelosti, dubina invazije, zahvaćenost limfokapilarnih prostora) iz uzorka biopsije određen je i MVD (broj krvnih žila po jedinici površine). U vremenu praćenja od 5 do 98 mjeseci umrle su 23 bolesnice (22,5%) zbog raka vrata maternice. Prosječna vrijednost MVD-a u naših ispitanica bila je $17,02 \pm 6,48$ (5-40), u preživjelih bolesnica $15,04 \pm 4,35$ (5-30), a u umrlim bila je $23,83 \pm 7,95$ (10-40). Vrijednost MVD-a koja najbolje razgraničava preživljenje je 20. Čimbenici lošije životne prognoze prema univarijantnoj analizi za bolesnice s rakom vrata maternice pokazali su se: dob iznad 60 godina

života, klinički stadij, zahvaćenost limfokapilarnih prostora, liječenje samo zračenjem, miješana infekcija HPV-om te $MVD \geq 20$. Coxovom regresijom formiran je model za preživljenje bolesnica s karcinomom vrata maternice visoke predikcije ($\chi^2=74,222$, $df=7$, $p<0,0001$).

Najvažniji prognostički čimbenik lošeg ishoda bolesti bio je $MVD \geq 20$. Ovi rezultati sugeriraju da $MVD \geq 20$ znači lošiju prognozu, što kod ovih bolesnica upućuje na potrebu za intenzivnijim i agresivnijim liječenjem (31).

Angiogeneza i liječenje malignih tumora

Angiogeneza ima centralnu ulogu u tumorskom rastu te je atraktivan terapijski cilj (posebno kod bolesnica rezistentnih na kemoterapiju). Budući da je ona rezultat međudjelovanja stimulatora i inhibitora, postavljena su dva strateška cilja:

- liječenje inhibicijom stimulatora angiogeneze
- egzogena primjena inhibitora.

Poznati su i publicirani lijekovi koji su u različitim fazama pretkliničkog i kliničkog ispitivanja, a samo su rijetki u široj primjeni. Slijedi pregled svih prema mehanizmu djelovanja.

Anti-VEGF neutralizirajuća antitijela

Bevacizumab

To je prvi inhibitor angiogeneze odobren od FDA (Food and Drug Administration, SAD) za liječenje uznapredovaloga kolorektalnog karcinoma. Lijek je monoklonsko antitijelo koje neutralizira VEGF te sprječava njegovo vezanje za receptore (flk-1 i KDR).

Odobren je za liječenje metastatskoga kolorektalnog karcinoma, metastatskog karcinoma dojke (HER-2-negativan) te karcinoma pluća. Primjenjuje se u obliku monoterapije ili kombinacija s polikemoterapijom. U kliničkoj je fazi ispitivanja za karcinom jajnika – rani stadij, za karcinom bubrega te karcinom cerviksa. Lijek se primjenjuje intraveniski 10 mg/kg svaka dva tjedna, a poluvrijeme eliminacije je 17-21 dan nakon intravenske primjene.

Najčešće nuspojave su hipertenzija i proteinurija, dok su zabilježene i one ozbiljnije kao plućna hemoragija i gastrointestinalne fistule (32).

Inhibitori tirozin kinaze

To su monoklonska antitijela koja se vežu za ATP-vežuću stranu VEGF-receptora KDR/Flk-1. Prednost im je obećavajuća aktivnost u kombinaciji s mogućnošću oralne primjene. Djeluje inhibirajuće i na tirozin kinazu receptora za PDGF, EGF, FGF.

Sorafenib

Odobren je od FDA za liječenje metastatskog karcinoma bubrega, a i za uznapredovali karcinom jetre (33).

Sunitinib

Godine 2006. FDA ga je odobrila za liječenje bolesnika s GISTOM (gastrointestinalni stromalni tumor), ali i za uznapredovali karcinom bubrega kada je razvijena rezistencija ili netolerancija na druge inhibitore (34, 35).

Još je niz VEGF-inhibitora u različitim fazama istraživanja i evaluacije: **aksitinib** za liječenje bolesnika s karcinomom bubrega, **XL999**, **AZD2171**, **vandetinib** i **motesanib** (36).

Ostali inhibitori angiogeneze

To su lijekovi koji ne djeluju na VEGF i njegove receptore, a od kojih ćemo navesti samo one koji su u kliničkim istraživanjima.

Angiostatin

Ovaj sistemski inhibitor angiogeneze je 38kD-fragment plazminogena nastao proteolitičkim djelovanjem elastaze, a inhibira proliferaciju endotelnih stanica nepoznatim mehanizmom.

Endostatin

Ovaj sistemski inhibitor angiogeneze je proteolitički fragment kolagena XVIII, dio perivaskularnog ekstracelularnog matriksa, inhibira proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu nepoznatim mehanizmom.

Neki su istraživači pokazali da se i angiostatin i endostatin nakupljaju u primarnom tumoru, što bi moglo imati za posljedicu supresiju rasta tumora (37-40).

Fumagilin (TNP-470 AG)

Sintetski analog fumagilina je gljivični inhibitor proliferacije endotelnih stanica i angiogeneze. Nalazi se u kliničkim istraživanjima koja su još u tijeku kao antiangiogeni čimbenik.

Talidomid

Ovaj je lijek prethodno upotrebljavan kao sedativ pa povučen s tržišta zbog izuzetno teratogenog i antiangiogenog djelovanja. U kliničkim istraživanjima korišten je kao antiangiogeni čimbenik u multiplom mijelomu, idiopatskoj mijeloidnoj metaplaziji i Kaposijevu sarkomu (41).

COX-2-inhibitori – COX-2

Rabi se pretežno u istraživanjima karcinoma pluća ("non-small cell lung cancer") iako pravi mehanizam djelovanja još nije posve poznat. Prostaglandin E2, produkt COX-2 može pojačati tumorski rast i invaziju stimulacijom VEGF-a, inhibirajući imunostanu obranu. Široka dostupnost COX-2 inhibitora, kao i potencijalna uloga u pojačanoj ekspresiji u ovoj vrsti karcinoma pluća čini COX-2 racionalnom terapijskom metodom u liječenju ove bolesti (42, 43).

Zaključak

Eksperimentalno dokazana ovisnost rasta malignih tumora o intenzitetu angiogeneze daje nam atraktivnu opciju za liječenje malignih bolesti. Obećavajući rezultati zasad su dobiveni istraživanjem monoklonskih anti-VEGF-antitijela ili malih molekula VEGF-inhibitora kod kolorektalnog karcinoma, karcinoma bubrega, karcinoma dojke, karcinoma pluća ("non-small cell lung cancer") i gastrointestinalnoga stromalnog karcinoma uz potvrdu njihove djelotvornosti u strogo provedenim randomiziranim kliničkim studijama.

Literatura

1. CARMELIT P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60.
2. CONWAY EM, COLLEN D, CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001 Feb 16;49(3):507-21.
3. KUBO H, ALITALO K. The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev* 2003;17:322-9.
4. HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP i sur. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
5. FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
6. FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285, 1182-6.
7. RAFII S, MEEUS S, DIAS S i sur. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002 Feb;13(1):61-7.
8. REYES M, DUDEK A, JAHAGIRDAR B i sur. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002 Feb;109(3):337-46.
9. BLASI F, CARMELIET P uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 Dec;3(12):932-43.
10. JAIN RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):685-93.
11. FAVARD C, MOUKADIN H, DOREY C i sur. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell* 1991. 73:1-6.
12. PEPPER MS, FERRARA N, ORCI L, MONTESANO R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 181:902-6.
13. UNEMORI EN, FERRARA N, BAUER EA, AMENTO EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992, 153: 557-62.
14. LEUNG DW, CACHIANESE G, KUANG W-J i sur. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989, 246:1306-9.
15. WILTING J, CRIST B, WEICH HA. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anat and Embryol* 1992; 186:251-7.
16. FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992. 267: 10931-4.
17. BOUCK N, STOLER A, POLVERINI PJ. Coordinate control of anchorage independence, actin cytoskeleton and angiogenesis by human chromosome 1 in hamster-human hybrids. *Cancer Res* 1986, 46:5101-5.
18. RASTINEJAD F, POLVERINI PF, BOUCK NP. Regulation of the activity of new inhibitors of angiogenesis by cancer suppressor gene. *Cell*. 1989, 56:345-55.
19. SUGAMOTO T, TANJI N, SATO K i sur. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. *Anticancer Res* 2001, 21:77-88.
20. TAKAHASHI Y, KITADAI Y, BUCANA CD i sur. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer* 1995, 55:3964-8.
21. MATTERN J, KOOMAGI R, VOLM M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996, 73:931-4.
22. LINDERHOLM B, TAVELIN B, GRANKAVIST K i sur. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relaps and survival in radiotherapy treated local node negative breast cancer? *Br J Cancer* 1999, 81:727-32.
23. TOI M, INADA K, SUZUKI H i sur. Tumour angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat*. 1995, 36:193-04.
24. BROGI E, WU T, NAMIKI A i sur. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994, 90:649-52.
25. BROWN LF, YEO K-T, BERSE B i sur. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*. 1992, 176:1375-9.
26. LI VW, FOLKERT RD, WATANABE H i sur. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. *Lancet* 1994, 344:82-86.
27. RIEDEL F, GOTTE K, SCHWALB J i sur. Coexpression of VEGF and bFGF is associated with increased vascular density in head and neck carcinomas. *Laryngorhinootologic* 2000, 79:730-5.
28. SUGAMOTO T, TANJI N, SATO K i sur. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. *Anticancer Res* 2001, 21:77-88.
29. ANDERSON H, PRICE P, BLOMLEY M i sur. Measuring changes in human tumour vasculature in response to therapy using functional imaging techniques. *Br J Cancer*. 2001, 85:1085-93.
30. SALVESEN HB, GULLUOGLU MG, STEFANSSON I i sur. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognostic in endometrial carcinomas. *APMIS*. 2003; 111:1011-8.
31. LEŠIN J. Značenje angiogeneze i tipa HPV-a za terapiju i prognozu invazivnog karcinoma vrata maternice. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006. Doktorska disertacija
32. VERHEUL HM, LOLKEMA MP, QIAN DZ i sur. Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5341-7.
33. ESCUDIER B, EISEN T, STADLER WM i sur. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007 Jan 11;356(2):125-34.
34. DEMETRI GD, VAN OOSTEROM AT, GARRETT CR i sur. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006 Oct 14;368(9544):1329-38.
35. MOTZER RJ, HUTSON E, TOMCZAK P i sur. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007 Jan 11;356(2):115-24.

36. BERGERS G, SONG S, MEYER-MORSE N, BERGLAND E. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003 May;111(9):1287-95.
37. KISKER O, ONIZUKA S, BANYARD J i sur. Generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001 Oct 1;61(19):7298-304.
38. HERBST RS, HESS KR, TRAN HT i sur. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2002 Sep 15;20(18):3792-803.
39. EDER JP JR., SUPKO JG, CLARK i sur. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol* 2002 Sep 15;20(18):3772-84.
40. BEEREPOOT LV, WITTEVEEN EO, GROENEWEGEN G i sur. Recombinant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: a pharmacokinetic and long-term safety study. *Clin Cancer Res* 2003 Sep 15;9(11):4025-33.
41. RAJE N, ANDERSON KC. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2002 Nov;14(6):635-40.
42. COLLINS TS, HURWITZ HI. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005 Feb;32(1):61.
43. SANBORN R, BLANKE CD. Cyclooxygenase-2 inhibition in colorectal cancer: boom or bust? *Semin Oncol* 2005 Feb;32(1):69-75.

Adresa za dopisivanje / Corresponding Address

Dr. sc. Joško Lešin, dr. med.

Klinika za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu

10000 Zagreb, Petrova 13

e-mail adresa: josko.lesin.zg@gmail.com

Primljeno / Received

13. 1. 2009.

January 13, 2009

Prihvaćeno / Accepted

20. 1. 2009.

January 20, 2009