

Marek Z. Wojtukiewicz^{1, 2}, Ewa Sierko^{1, 2}¹Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku²Białostockie Centrum Onkologii

Podstawy terapii antyangiogennej u chorych na nowotwory

The approach to antiangiogenic therapy in cancer patients

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz
Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku
Białostockie Centrum Onkologii
ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok
Tel.: +48 (85) 664 67 34
e-mail: onkologia@umwb.edu.pl,
ewa.sierko@iq.pl

STRESZCZENIE

Powstanie nowych naczyń krwionośnych w nowotworze umożliwia jego progresję miejscową i powstawanie przerzutów odległych. Angiogeneza jest niezwykle złożonym procesem, który wymaga skoordynowanej aktywności różnych czynników na poszczególnych jej etapach. Za pobudzenie angiogenezy odpowiada zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi ten proces na korzyść tych pierwszych. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Aktywność angiogenna zależy od obecności i działania różnych receptorów i ich ligandów, między innymi VEGFR-2, VEGFR-1, neuropiliny 1, receptora Tie2, receptorów efryn.

W badaniach doświadczalnych zahamowanie aktywności VEGF doprowadza do zmniejszenia ciśnienia śródtkankowego i poprawy penetracji cytostatyków do tkanek. W warunkach klinicznych zastosowanie strategii mających na celu interferowanie z aktywnością VEGF pozwoliło na poprawę wyników leczenia chorych na nowotwory. Pomimo zachęcających wyników terapii z wykorzystaniem leków antyangiogennych wciąż wiele pytań dotyczących tego sposobu postępowania pozostaje bez odpowiedzi, między innymi selekcja chorych do takiego leczenia, sposób monitorowania terapii czy czas trwania terapii antyangiogennej.

Słowa kluczowe: angiogeneza, nowotwory, VEGF, receptor VEGF, niedotlenienie, leki antyangiogenne

ABSTRACT

New vessel formation facilitates local tumor progression and distant metastases formation. Angiogenesis is a very complex process, which demands well-coordinated activity of various factors during consecutive steps. The balance between pro- and antiangiogenic factors shifted towards the former ones is a prerequisite for the initiation of angiogenesis. VEGF is the most important factor contributing to the new vessel formation. Its biological activity depends on the presence and activity of different receptors, eg. VEGFR-2, VEGFR-1, neuropilin 1, Tie2 receptor system, ephrin system, etc.

In experimental models blocking VEGF activity results in diminished interstitial pressure and improved cytotoxic drugs tissue penetration. In clinical settings, interfering with VEGF activity allowed for improved treatment outcomes in cancer patients. However, despite promising results, many questions remain opened, eg. the optimal selection of cancer patients for such a treatment, the way of therapy monitoring as well as the length of antiangiogenic treatment.

Key words: angiogenesis, cancer, VEGF, VEGF receptor, hypoxia, antiangiogenic agents

Onkol. Prak. Klin. 2009; 5, supl. A: A1-A14

Wstęp

Wzrost nowotworu uzależniony jest od optymalnego zaopatrzenia komórek w tlen i substancje odżywcze [1]. Ważnym elementem metabolizmu rozwijającego się guza jest też usuwanie produktów przemiany materii. Ciekawych informacji dostarczyły badania autopsyjne osób, które zginęły w wypadkach samochodowych [2]. Zaobserwowano, że u zdecydowanej większości dorosłych w wieku 50–70 lat w obrębie tarczycy wzrastał niewielki nowotwór złośliwy tego narządu, przy czym jedynie u 0,1% osób mógł być klinicznie zdiagnozowany. Ponadto, u około 40% kobiet w wieku 40–50 lat stwierdzono drobne ogniska raka piersi, podczas gdy tylko u 1% z nich mogły być klinicznie jawne [2]. Okazuje się, że większość guzów nowotworowych nie może wzrastać powyżej 2–3 mm³ bez wytworzenia sieci nowych drobnych naczyń krwionośnych (angiogenezy) [przegląd piśmiennictwa w 1, 3]. W początkowym etapie nowotwory rozwijają się jako małe, nieunaczynione zmiany, które pozostają w tak zwanym stanie spoczynku (*dormancy*). Zmiana fenotypu komórek nowotworowych, ułatwiająca powstanie nowych naczyń krwionośnych, umożliwia dalszy wzrost guza nowotworowego, a także umożliwia przedostanie się komórek nowotworowych do krwiobiegu [1]. W niektórych guzach złośliwych komórki nowotworowe wykorzystują na pewnym etapie swego rozwoju naczynia gospodarza (*vessel cooption*), namnażając się wokół nich i migrując wzdłuż ich przebiegu (np. glejaki mózgu) [przegląd piśmiennictwa w 3, 4]. Może również dochodzić do wgłębiania się ścian naczyń krwionośnych, a w konsekwencji do „rozdzielania” macierzystych naczyń krwionośnych na mniejsze (*intususception*) [przegląd piśmiennictwa w 3, 4]. Z kolei tworzenie przez komórki śródbłonna (ECs, *endothelial cells*) tak zwanych mostków, dzielących światło naczyń krwionośnych na węższe kanały, może prowadzić do powstania naczyniowych struktur kłębuszkowatych o charakterze słabo zróżnicowanych konglomeratów składających się z ECs i perycytów — tak zwanych kłębków naczyniowych (np. glejaki wielopostaciowe) [5]. Ostatnio zaobserwowano też, iż podczas angiogenezy dochodzi do wychwytywania przez nowopowstałe naczynia krążących we krwi ECs, różnicujących się z komórek macierzystych szpiku kostnego [4]. Interesującą opcją dostarczania komórkom nowotworowym składników odżywczych jest uformowanie sieci tak zwanych kanałów, przypominających swą budową naczynia krwionośne (*vascular mimicry*) — na przykład czerniak [4]. Mimo iż wzrost zdecydowanej większości nowotworów zależy od optymalnego unaczynienia, nie można pominąć faktu, iż istnieją typy histopatologiczne guzów nowotworowych (osiągających niekiedy porażające rozmiary) charakteryzujące się niezwykle skąpanością naczyń krwionośnych, których komórki odżywia-

ne są między innymi drogą dyfuzji (np. struniak, *chorodoma*). Rozwój własnego unaczynienia nowotworu sprzyja powstawaniu przerzutów nowotworowych drogą naczyń krwionośnych i chłonnych. Jednakże bogate unaczynienie nowotworów nie przesądza o nabyciu przez nowotwór zdolności tworzenia przerzutów. Istnieją bowiem nowotwory o niezwykle rozwiniętej sieci unaczynienia, które charakteryzują się jedynie wzrostem miejscowym (np. mięśniaki macicy, naczyniaki). Ogniska przerzutowe mogą również pozostać przez długi czas w stanie tak zwanego spoczynku (*dormancy*) do momentu, gdy proces angiogenezy będzie w nich inicjowany *de novo*. Warto jednak podkreślić, że stan spoczynku nowotworu nie oznacza braku jego aktywności. Komórki nowotworowe ulegają podziałom, ale ich liczba jest równoważona przez ubytek komórek w wyniku apoptozy. Dopiero gdy dojdzie do pobudzenia angiogenezy, nowotwór przejawia cechy inwazyjności [1, 3].

Charakterystyka naczyń patologicznych w guzie nowotworowym

W guzie nowotworowym nowopowstałe naczynia są rozmieszczone w sposób nierównomierny i tworzą liczne rozgałęzienia. Lokalizacja i liczba tych rozgałęzień nie zależą od rzeczywistego zapotrzebowania na składniki odżywcze komórek nowotworowych i innych, które znajdują się w obrębie guza. Nowe naczynia w nowotworze, w przeciwieństwie do naczyń prawidłowych, nie tworzą hierarchicznie zbudowanej sieci, w której z większych naczyń powstają mniejsze. Charakteryzują się zmieniającą się średnicą, są ponadto poskręcane. Istnieje wiele połączeń (anastomoz) tętniczo-żylnych i tętniczo-tętnicznych, co powoduje powstawanie nieprawidłowych przecieków krwi. Przepływ krwi w naczyniach zaopatrujących guz nowotworowy jest chaotyczny i turbulentny. Istotną cechą nowych naczyń jest ich zwiększona przepuszczalność. W ścianach tych naczyń brakuje unerwienia, części receptorów czy też otaczających śródbłonek mięśni gładkich (perycytów). Charakteryzują się brakiem regulacji przepływu krwi. Konsekwencją tego jest zwiększony opór przepływu krwi przez naczynia, zaś objętość i kierunek przepływającej przez naczynia krwi są niestale. Interesujące, że w około 85% naczyń obserwuje się różną objętość przepływającej krwi, zaś w około 8% naczyń przepływa tylko osocze krwi. Patologiczne naczynia wykazują niedojrzałość morfologiczną i nieprawidłową strukturę. Nowe naczynia są zróżnicowane pod względem budowy histologicznej ściany naczyniowej. Komórki śródbłonna mają różny kształt i są nieregularnie ułożone, niecałkowicie pokrywają ścianę naczynia od wewnątrz. Błona podstawna tych naczyń składa się z białek o odmien-

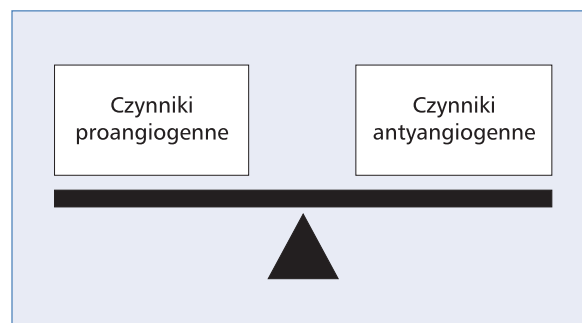
nej strukturze i rozmieszczeniu niż w naczyniach prawidłowych [3]. Ważną rolę w dojrzałych naczyniach krwionośnych odgrywiają perycyty (pełniące funkcję stabilizującą, wzmacniającą i ochronną dla naczyń), znajdujące się na powierzchni zewnętrznej prawidłowego naczynia. W przypadku naczyń powstających w obrębie nowotworu istnieje niedobór perycytów, pokrywają one naczynie w sposób nieregularny, co nie zapewnia pełnej stabilności naczynia krwionośnego [3]. W nowopowstałych naczyniach dochodzi do tworzenia się agregatów leukocytarno-płytkowych i erytrocytar-nych [3].

Przebieg procesu angiogenezy

Naczynia krwionośne w różnych tkankach wykazują różnice fenotypowe, jednakże dla każdej tkanki określono przynajmniej jeden czynnik odpowiedzialny za pobudzenie angiogenezy. Dlatego też uważa się, że regulacja tego procesu zależy od rodzaju tkanki, w której on zachodzi [6].

Angiogeneza jest niezwykle złożonym, wielostopniowym i nie w pełni poznany procesem. Wyodrębniono kilka etapów powstawania nowych naczyń krwionośnych. Początkowo dochodzi do proteolizy błony podstawnej naczyń krwionośnych i składników przestrzeni międzykomórkowej. Następnie występujące dotychczas w spoczynku ECs zostają pobudzone do proliferacji i migracji. Powstają prymitywne struktury o charakterze sznurów naczyniowych, a następnie dochodzi do ich przebudowy, co prowadzi do wytworzenia w nich światła. Kolejnym etapem jest powstawanie połączeń między nowopowstałymi naczyniami krwionośnymi — anastomoz, zaś nowopowstałe naczynia krwionośne zostają pokryte perycytami, które zapewniają stabilizację naczyń [1, 3].

Angiogeneza zostaje pobudzona w wyniku zmian genetycznych typu *gain of function* (onkogeny) lub też *loss of function* (w przypadku genów supresorowych) [7, 8]. Niezwykle ważne są również warunki środowiska, w którym wzrasta nowotwór złośliwy, między innymi niedotlenienie, niskie pH, ale także kontakt międzykomórkowy, wpływ różnych cytokin oraz czynników wzrostu [9]. W przeciwieństwie do angiogenezy obserwowanej w warunkach prawidłowych (np. gojenie ran, cykl owulacyjny) w przypadku nowotworów nie następuje skoordynowane wyhamowanie angiogenezy, ale dochodzi do jej stałego pobudzania, wynikającego z zaburzeń genetycznych i ciągłego lub przejściowego niedotlenienia tkanek w obrębie rozwijającego się nowotworu. Wzrost ciśnienia śródtkankowego, wynikający z aktywności czynników proangiogennych, na przykład czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), an-



Rycina 1. Równowaga pomiędzy aktywnością czynników stymulujących i hamujących angiogenezę. Zaburzenie tej równowagi na korzyść aktywności czynników proangiogennych inicjuje proces angiogenezy

Figure 1. The balance between the activity of angiogenesis stimulators and inhibitors. Disturbance of this balance with the advantage of proangiogenic agents' activity initiates angiogenesis

giopoetyny 2 (Ang-2), nasila niedotlenienie panujące wewnątrz guza nowotworowego, stymulując tym samym angiogenezę na zasadzie „samonapędzającego się koła” [3, 9] (ryc. 1).

Zidentyfikowano wiele różnych czynników stymulujących angiogenezę, między innymi VEGF, angiopoetyny 1 i 2 (Ang-1, Ang-2), interleukinę 8 (IL-8), bFGF, kwasowy czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF, *acidic fibroblast growth factor*), angiogieninę, czynnik wzrostu komórek śródbłonna pochodzący z płytek krwi (PD-EGF, *platelet-derived endothelial growth factor*), czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (PDGF, *platelet-derived growth factor*), czynnik wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*), czynnik martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*) oraz transformujący czynnik wzrostu (TGF, *transforming growth factor*). Proces angiogenezy ułatwiają również enzymy proteolityczne [metaloproteiny macierzy międzykomórkowej (MMP, *matrix metalloproteinases*) [10], czynniki układu fibrylizacji [11–13] i cząsteczki adhezji komórkowej, na przykład integryna $\alpha_v\beta_3$ [14]. Wśród czynników hamujących angiogenezę opisano czynniki działające miejscowo, takie jak trombospondyna 1, 2 (TSP-1, TSP-2), interferon α oraz wykazujące działanie ogólnoustrojowe, takie jak endostatyna, wazostatyna, angiostatyna, antyangiogenna antytrombina, tumstatyna, inhibitor wzrostu komórek śródbłonna (VEGI, *vascular endothelial growth inhibitor*) [1–3, 15–17].

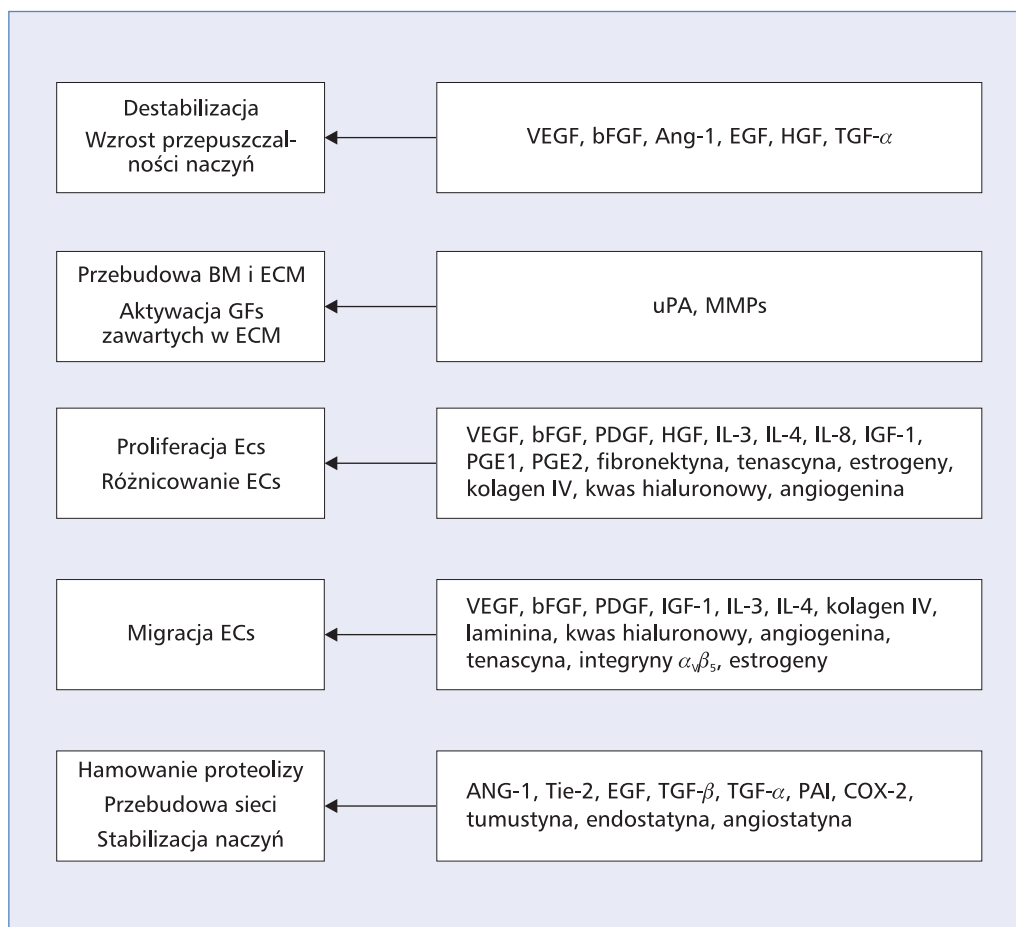
Interesujące, że wiele naturalnie występujących inhibitorów angiogenezy to drobne fragmenty powstałe w wyniku proteolizy większych cząsteczek białek, które *per se* pełnią funkcje stymulującą angiogenezę lub są składnikiem strukturalnym ścian naczyń. Do takich

inhibitorów należą między innymi angiostatyna [17, 19], endostatyna [16], antyangiogenna antytrombina (aaAT III) [18], fragment protrombiny F1+2 [20, 21] oraz fragmenty czynnika płytkowego 4 [20, 21] (ryc. 2).

Angiogeneza następuje, gdy dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi ten proces na rzecz czynników proangiogennych. Należy podkreślić, że czynniki pro- i antyangiogenne syntetyzowane są nie tylko przez komórki nowotworowe, ale również przez monocyty/makrofagi naciekające nowotwór, komórki podścieliska nowotwo-

rowego (np. fibroblasty, komórki mięśniowe) oraz płytki krwi i krwinki białe [3, 20, 21].

Interesującym zagadnieniem jest zdolność nowotworowych komórek macierzystych do pobudzania angiogenezy. Mianowicie, w guzie nowotworowym znajdują się nowotworowe komórki klonogenne, stanowiące niewielki odsetek komórek nowotworowych, które charakteryzują się między innymi zdolnością nieograniczonego rozplemu, możliwością pozostawania w fazie spoczynku przez nawet około rok, względną opornością na czynniki wzrostu [22]. Istnieją rozbieżności w wy-



Rycina 2. Czynniki regulujące poszczególne etapy angiogenezy. BM (*basement membrane*) — błona podstawna; ECM (*extracellular matrix*) — macierz zewnątrzkomórkowa; GFs (*growth factors*) — czynniki wzrostu; ECs (*endothelial cells*) — komórki śródbłonna naczyń; VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyń; bFGF (*basic fibroblast growth factor*) — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; Ang-1 — angiopoetyna typu 1; Tie2 — receptor angiopoetyny; EGF (*epidermal growth factor*) — czynnik wzrostu naskórka; HGF (*hepatocyte growth factor*) — czynnik wzrostu hepatocytów; TGF- α/β (*transforming growth factor*) — transformujący czynnik wzrostu α lub β ; uPA (*urokinase plasminogen activator*) — urokinaza; PAI (*plasminogen activator inhibitor*) — inhibitor aktywatora plazminogenu; MMPs (*matrix metalloproteinases*) — metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej; PDGF (*platelet-derived growth factor*) — czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego; IL-3, -4, -8 — interleukina 3, 4, 8; IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) — czynnik wzrostu podobny do insuliny typu-1; PGE1, PGE2 — prostaglandyna odpowiednio: E1, E2; COX-2 — cyklooksigenaza typu 2

Figure 2. Factors regulating particular phases of angiogenesis

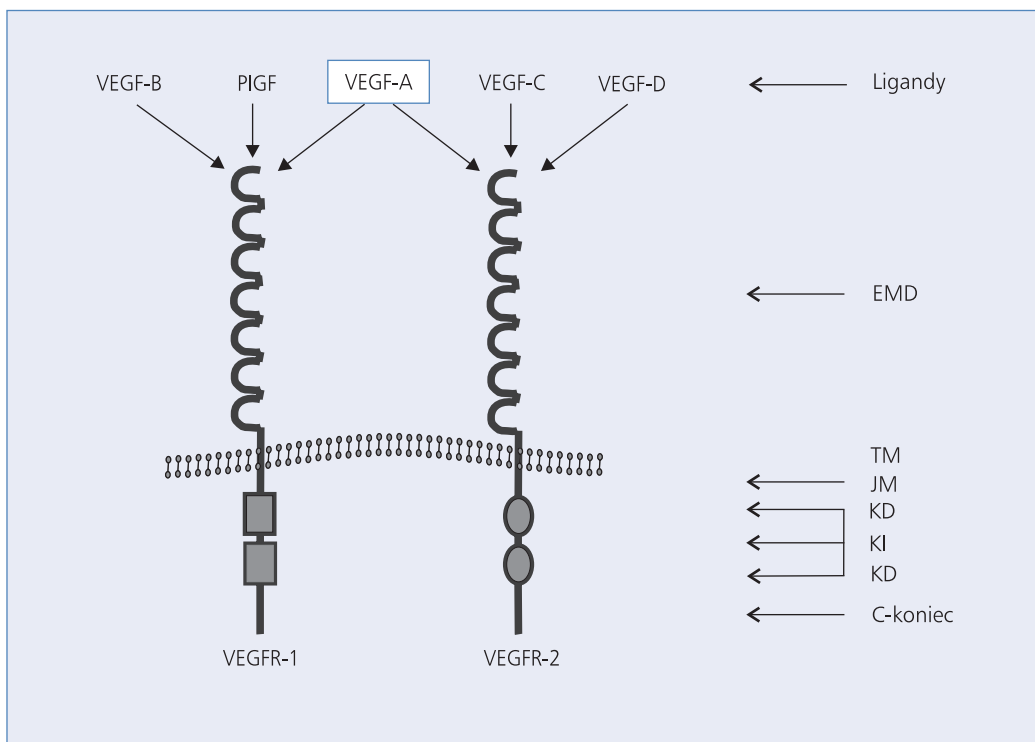
kach badań eksperymentalnych dotyczące roli tych komórek w efekcie proangiogennym. Wiadomo bowiem, iż komórki takie mogą przez długi czas pozostawać w stadium tak zwanego uśpienia, nie wykazując fenotypu angiogennego, zaś w innych badaniach wykazano, że komórki klonogenne pobudzają angiogenezę znacznie bardziej niż pozostałe komórki nowotworowe [23].

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Najważniejszym i dotychczas najlepiej poznanym czynnikiem proangiogennym jest VEGF-A (powszechnie nazywany VEGF). Do tej rodziny glikoprotein zalicza się także VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E oraz czynnik wzrostu łożyska (PIGF, *placental growth factor*) [24, 25].

Produktem alternatywnego splicingu genu kodującego syntezę VEGF są cztery izoformy tego czynnika, których cząsteczka zbudowana jest z różnej liczby ami-

nokwasów, czyli 121, 165, 189, 206 [przegląd piśmiennictwa w 3, 24]. Najczęściej występującą izoformą VEGF, jak też odgrywającą najistotniejszą rolę w angiogenezie w nowotworach jest VEGF₁₆₅ [24]. Z izoformy tej, wskutek działania plazminy lub metaloproteinaz, może zostać odszczepiony fragment zlokalizowany na jej C-końcowym odcinku, przez co powstają dwa aktywne biologicznie fragmenty: VEGF₁₁₀ i VEGF₁₁₃ [25]. Poszczególne izoformy VEGF różnią się właściwościami fizykochemicznymi: VEGF₁₂₁ występuje w stanie wolnym i nie łączy się z heparyną, w przeciwieństwie do niego cząsteczki VEGF₁₆₅ i VEGF₁₈₉ charakteryzują się znacznie większym ładunkiem ujemnym i wiążą się z heparyną. Siarczan heparyny, heparyna i heparynaza wypierają większe izoformy VEGF-A z połączenia z proteoglikanami macierzy międzykomórkowej (ECM, *extracellular matrix*). Ponadto aktywność plazminy również prowadzi do aktywacji VEGF₁₆₅ i VEGF₁₈₉ poprzez odłączenie tych czynników od powierzchni komórek i składników ECM [26]. W niektórych nowotworach (np. wywodzą-



Rycina 3. Schematyczna budowa receptorów kinazy tyrozynowej VEGF (VEGFR-1 i VEGFR-2) oraz ich ligandów z rodziny VEGF. VEGF-A, -B, -C, -D (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (odpowiednio poszczególni członkowie rodziny VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D); PIGF (*placental growth factor*) — czynnik wzrostu łożyska; VEGFR-1, VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor*) — receptory VEGF odpowiednio: typu 1 i typu 2, EMD (*extramembrane domain*) — domena zewnątrz błonowa VEGFR; TM (*transmembrane domain*) — część przez błonową VEGFR; JM (*juxtamembrane domain*) — część okołobłonowa VEGFR; KD (*kinase domain*) — domena kinazy tyrozynowej; KI (*kinase interaction domain*) — część VEGFR znajdująca się pomiędzy domenami KD

Figure 3. Scheme of VEGF tyrosine kinase receptors structure (VEGFR-1 and VEGFR-2) and their VEGF family ligands

cych się z komórek wysepek trzustki) aktywność metaloproteinaz, uwalniająca ze składników ECM i przez to aktywująca VEGF-A, jest wręcz niezbędna dla pobudzenia angiogenezy [27] (ryc. 3).

Czynniki regulujące syntezę i ekspresję VEGF:

I. Czynniki zewnętrzne:

- niedotlenienie jest głównym czynnikiem zewnętrznym pobudzającym transkrypcję mRNA kodującą syntezę VEGF i stabilizację jego cząsteczki [1, 9, 28, 29]. Efekt ten jest regulowany poprzez aktywność czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*). Mianowicie, HIF-1 α w warunkach niedostatecznej podaży tlenu ulega stabilizacji, asocjuje z HIF-1 β i w postaci dimeru przechodzi do jądra komórkowego i łączy się z promotorem genu odpowiedzialnego za syntezę VEGF [29]. Ponadto niedotlenienie zwiększa ekspresję receptorów dla VEGF w mechanizmie niezależnym od syntezy VEGF [28];
- liczne czynniki wzrostu i cytokiny pobudzają syntezę VEGF w różnych nowotworach. Należą do nich między innymi: czynnik wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*), TGF- β , TGF- α , czynnik wzrostu keratynocytów (KGF, *keratinocyte growth factor*), FGF-2, TNF, IL-1 i IL-6, czynnik wzrostu podobny do insuliny 1 (IGF1, *insulin-like growth factor 1*) HGF, prostaglandyny E1 i E2 (PGE1, PGE2) [przegląd piśmiennictwa w 30]. W części przypadków nowotworów dochodzi do autokrynej regulacji, ponieważ obecności VEGF towarzyszy obecność zarówno wymienionych cytokin, jak i ich receptorów [30];
- hormony;
- różne białka i związki chemiczne, na przykład czynnik tkankowy (TF, *tissue factor*), trombina, adenylna;
- różne procesy, na przykład agregacja płytek krwi, *shear stress* [30].

II. Czynniki wewnętrzne:

- mutacje genów supresorowych, między innymi genu *p53*, *p73*, *VHL* (*von Hippel-Lindau*). Produkt białkowy genu *VHL* jest częścią kompleksu łączącego się z różnymi białkami (m.in. HIF-1 α) przeznaczonymi do ubiquitynacji i degradacji. W przypadku braku białka *VHL* lub jego inaktywacji (np. w raku jasnokomórkowym nerki) cząsteczka HIF-1 α jest stabilna nawet w warunkach prawidłowego utleniania komórek, co skutkuje stałą aktywacją syntezy czynników proangiogennych, między innymi VEGF [31, 32]. Z kolei produkty białkowe genów *p53* i *p73* regulują angiogenezę poprzez hamowanie transkrypcji VEGF, jednak w licznych nowotworach dochodzi do mutacji tych genów, co sprzyja pobudzeniu angiogenezy [30];
- aktywacja onkogenów, na przykład *Src*, *RAS* [3, 7, 33].

Aktywność biologiczna VEGF

Czynnik VEGF — pierwotnie nazwany czynnikiem przepuszczalności naczyń (VPF, *vascular permeability factor*) — zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych. Interesujące, że aktywność tego czynnika w tym względzie jest około 50 tysięcy razy silniejsza niż histaminy i wielokrotnie większa niż innych czynników proangiogennych, na przykład bFGF czy Ang-2 [24]. W wyniku zwiększonej przepuszczalności ściany naczyń białka osocza krwi przedostają się do środowiska zewnątrznaczyniowego, co przyczynia się do gromadzenia płynu w tej okolicy i zwiększenia ciśnienia śródtkankowego w guzie nowotworowym. Konsekwencją biologiczną aktywności VEGF jest ucisk płynu na komórki guza, a także na naczynia krwionośne zaopatrujące guz nowotworowy w składniki odżywcze. Ponieważ naczynia krwionośne stanowią drogę dostarczania cytostatyków do komórek nowotworu, wzrost ciśnienia śródtkankowego utrudnia przedostawanie się tych leków do komórek docelowych [34]. Czynnikiem VEGF jest silnym mitogenem dla ECs, doprowadza bowiem do „przeprogramowania” genów w tych komórkach. Nabierają one wówczas tak zwanego fenotypu angiogenego, pobudzona zostaje proliferacja i migracja ECs, tworzą się nowe naczynia krwionośne. Czynnikiem VEGF jest również czynnikiem przetrwania (*survival factor*) dla ECs i komórek nowotworowych. Uczestniczy w mobilizacji komórek macierzystych śródbłonna naczyń ze szpiku kostnego, które stanowią około 15% komórek nowopowstałych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu [7]. Ponadto, VEGF pobudza ekspresję czynnika tkankowego (TF) zarówno w ECs i monocytach, co sprzyja aktywacji krzepnięcia krwi. Czynnikiem VEGF indukuje chemotaksję i aktywację monocytów, a jednocześnie upośledza funkcje immunologiczne ustroju poprzez hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych, które odpowiadają za prezentację antygenów. Ważna funkcja VEGF polega na zwiększaniu ekspresji składowych układu fibrynolizy w ECs i ECM, co ułatwia proteolizę otaczających tkanek podczas procesu angiogenezy [2, 12, 13].

Receptory VEGF

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń wywiera swoje efekty biologiczne poprzez połączenie się z receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej: VEGFR-1/Flt-1 oraz VEGFR-2/KDR/Flk-1 [1, 3, 35, 36]. Łączy się również z koreceptorem — neuropiliną 1 (NP-1). Zidentyfikowano również VEGFR-3/Flt-4, przy czym jest to receptor dla VEGF-C i VEGF-D i odgrywa on rolę w limfangiogenezie i hematopoezie [30, 35].

Do powstania dimerów receptorów VEGFR są potrzebne dwie cząsteczki ligandu. Właściwości recep-

torów VEGFR-1 i -2 różnią się między sobą między innymi pod względem efektu biologicznego wywołanego ich aktywacją. Warto podkreślić, że VEGFR-1 wiąże się z VEGF z przynajmniej 10-krotnie większym powinowactwem niż VEGFR-2. Jednak wskutek tego nie dochodzi do jego pełnej aktywacji. Natomiast na komórkach wykazujących ekspresję VEGF stwierdza się obecność jedynie około 3000 kopii VEGFR-1 przy około 40 000 kopii VEGFR-2 [30]. Aktywacja VEGFR zależy od dostępności i wiązania z ligandem oraz od rodzaju liganda łączącego się z danym receptorem. Takie połączenie skutkuje homo- lub heterodimeryzacją receptorów. Dimeryzacja receptorów i w konsekwencji ich aktywacja prowadzi do autofosforylacji określonych reszt tyrozynowych, które aktywują odpowiednie szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego [22]. Aktywacja receptorów poprzez łączenie specyficznego (np. PlGF łączy się wyłącznie z VEGFR-1) lub takiego samego liganda (np. VEGF łączy się z VEGFR-1, -2 i -3) oraz tworzenie homo- lub heterodimerów skutkuje pobudzeniem odmiennych szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Ponadto, należy podkreślić, że mimo iż cząsteczki tych receptorów wykazują ponad 40% homologii, to wskutek ich aktywacji dochodzi do pobudzenia innych szlaków przekazywania komórkowego [35]. Struktura zarówno VEGFR-1, jak i VEGFR-2 jest podobna. Część zewnątrzkomórkowa tych receptorów składa się z siedmiu motywów o budowie podobnej do cząsteczki immunoglobuliny (*Ig-like domain*). Po nich następuje pojedyncza część przezłonowa receptora, za nią zaś — część okołobłonowa. Fragment wewnątrzkomórkowy VEGFR, utworzony przez domenę kinazy tyrozynowej, zakończony jest C-końcem łańcucha polipeptydowego [30, 35]. Receptor VEGFR-2 jest głównym receptorem, poprzez który VEGF wywiera całe spektrum swego działania, czyli efekt mitogeny, angiogeny i zwiększający przepuszczalność naczyń krwionośnych. Natomiast VEGFR-1 może wywierać efekt zarówno hamujący, jak i pobudzający w odniesieniu do angiogenezy [35].

Receptor VEGFR-1

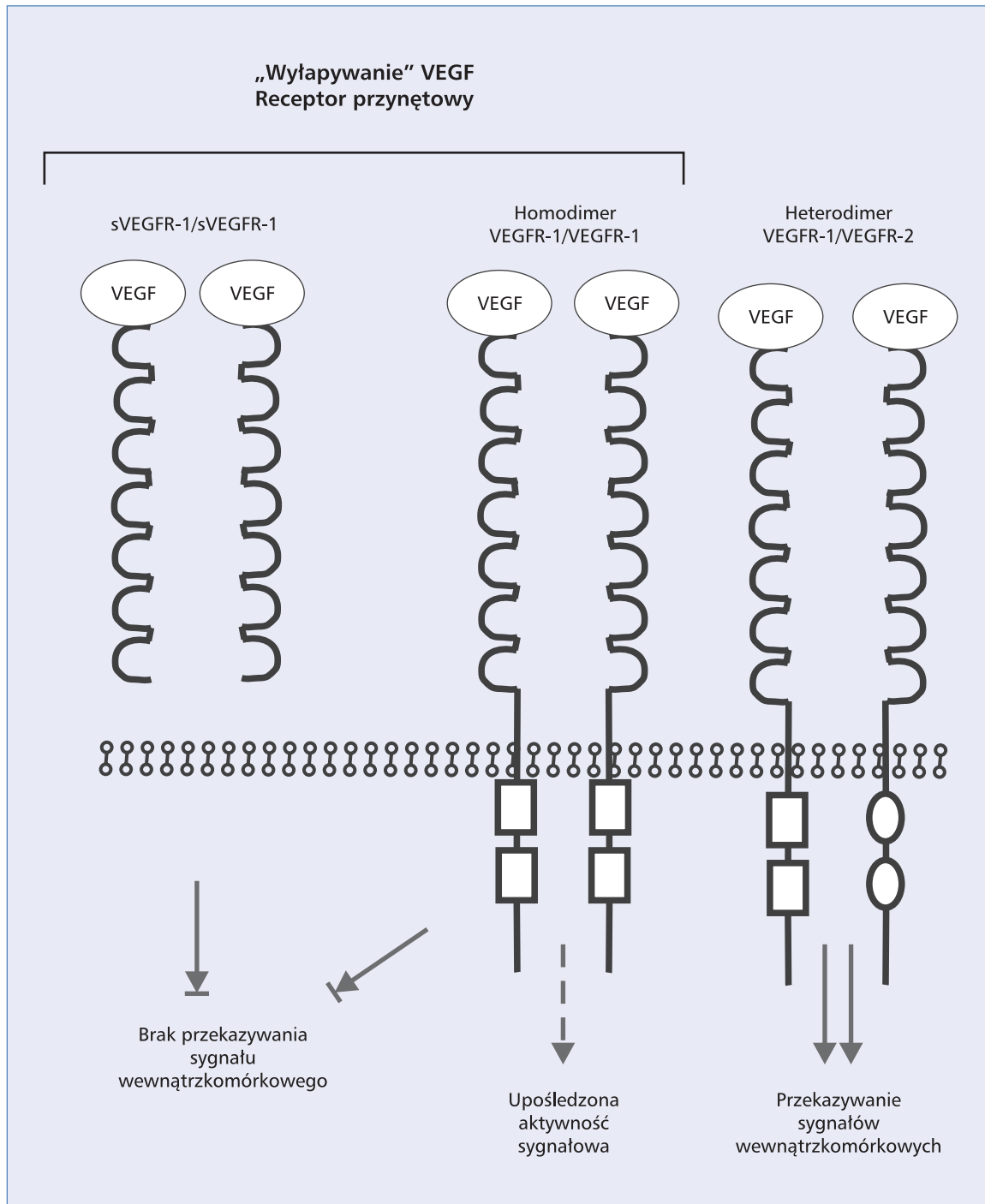
Funkcja tego receptora wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji. Występuje on na błonie ECs, monocytów, makrofagów, macierzystych komórek szeregu hematopoetycznego oraz komórek nowotworowych guzów litych i nowotworów układu krwiotwórczego [36]. Ligandami VEGFR-1 są VEGF, VEGF-B oraz PlGF.

Funkcja kinaz w cząsteczce VEGFR-1 jest upośledzona (tzw. *kinase-impaired receptor*). Pomimo przyłączenia liganda dochodzi jedynie do słabej fosforylacji kinaz, co ogranicza możliwość aktywacji cząsteczek efektorowych. Cząsteczce VEGFR-1 przypisuje się funkcję

receptora przynętowego (tzw. *decoy receptor*): wychwytuje on VEGF i w ten sposób nie dopuszcza do jego połączenia z VEGFR-2, co doprowadza do hamowania aktywności VEGF [22]. Istnieje również rozpuszczalna forma VEGFR-1, będąca produktem alternatywnego splicingu genu odpowiedzialnego za jego syntezę, czyli sVEGFR-1 (Salt-1) [22]. Zaobserwowano, że forma ta zachowuje również zdolność przyłączania VEGF i wykazuje działanie hamujące aktywność VEGF [22].

W cząsteczce VEGFR-1 zidentyfikowano też fragment (*repressor motif*) interferujący z aktywacją kinazy PI3 (*phosphatidylinositol 3'-kinase*), co nie dopuszcza do migracji ECs wywołanej przyłączeniem się VEGF do VEGFR-1 [37]. Wykazano również, że aktywność VEGFR-1 skutkuje hamowaniem proliferacji ECs zależnej od przyłączenia VEGF [38].

Ciekawe obserwacje dotyczą potencjalizacji aktywności VEGF w obecności PlGF, co tłumaczy się między innymi „wypieraniem” VEGF z miejsca wiązania w VEGFR-1 przez PlGF [39]. Ponadto, PlGF wpływa na regulację wzajemnych oddziaływań pomiędzy składowymi szlakami przekazywania wewnątrzkomórkowego receptorów VEGF (zjawisko *cross-talk*) [40]. Aktywacja VEGFR-1, poprzez przyłączenie PlGF (ale nie VEGF), prowadzi do powstania heterodimerów VEGFR-1/VEGFR-2 i następnie do transfosforylacji kinazy tyrozynowej VEGFR-2, a w konsekwencji do pobudzenia angiogenezy [40]. Warunki środowiska, szczególnie współwystępowanie z innymi receptorami (VEGFR-2, VEGFR-3, NP-1), mogą więc wpływać na rodzaj efektu biologicznego wywołanego aktywnością tego receptora. Ponadto, rodzaj liganda łączącego się z VEGFR-1 definiuje rodzaj odpowiedzi komórki. Zaobserwowano jednak, że VEGFR-1 zlokalizowany w komórkach innych niż ECs bierze udział w pobudzaniu sygnału wewnątrzkomórkowego, co sugeruje odmienną rolę szlaków sygnałowych w różnych typach komórek. Przykładem takiej aktywności VEGFR-1 jest chemotaksja monocytów po przyłączeniu VEGF lub PlGF do VEGFR-1 czy też migracja i proliferacja monocytów wywołana związaniem PlGF z VEGFR-1 [41, 42]. Szczególnie ciekawe obserwacje pochodzą z badań eksperymentalnych nad biologią nowotworów. Wykazano pobudzenie proliferacji, migracji, zwiększenia zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych (m.in. raka płuca, piersi, jelita grubego czy też trzustki) w wyniku aktywacji VEGFR-1 [43–45]. Podnosi się także udział VEGFR-1 w hematopoezie i rekrutacji progenitorowych ECs ze szpiku kostnego [28]. Wybiórcza aktywność sygnałowa VEGFR-1 prowadzi do aktywacji fosfolipazy C γ 85/kinaza PI3, fosfatazy-2 homologicznej z Src (*Src homology phosphatase 2*), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) i Nck [46] (ryc. 4).



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie aktywności receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyń typu 1 (VEGFR-1) w angiogenezie. VEGFR-1 i sVEGFR-1 wychwytyują VEGF i nie dopuszczają do łączenia się tego czynnika z VEGFR-2, co prowadzi do hamowania angiogenezy. Homodimeryzacja VEGFR-1 (jest to receptor o upośledzonej funkcji kinazy tyrozynowej) prowadzi jedynie do słabej fosforylacji kinaz (hamowanie lub pobudzenie angiogenezy). VEGFR-1 może pobudzać angiogenezę poprzez heterodimeryzację z VEGFR-2. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyń; VEGFR-1, -2 (*vascular endothelial growth factor receptor*) — receptory VEGF typu 1, 2, sVEGFR-1 (*soluble VEGFR-1*) — forma rozpuszczalna VEGFR-1

Figure 4. Scheme of VEGFR-1 activity in angiogenesis. The VEGF uptake by VEGFR-1 and sVEGFR-1 enables its connection to VEGFR-2 and inhibits angiogenesis. Homodimerization VEGFR-1 (kinase-impaired receptor tyrosine kinase) leads to weak phosphorylation of kinases. VEGFR-1 can activate angiogenesis by heterodimerization with VEGFR-2

Receptor VEGFR-2

Aktywowany jest on przede wszystkim przez VEGF, ale też przez fragmenty powstałe wskutek proteolizy VEGF-C i VEGF-D [36]. Receptor VEGFR-2 występuje na błonie ECs, komórek szeregu hematopoetycznego i niektórych nowotworów układu krwiotwórczego i nowotworów litych [36].

Główne miejsce autofosforylacji VEGFR-2 (Y1175) znajduje się na C-końcu łańcucha polipeptydowego tworzącego receptor i odpowiedzialne jest za aktywację fosfolipazy $C\gamma$ odgrywającą główną rolę w efektach subkomórkowych będących następstwem aktywacji VEGFR-2. Pośrednio aktywuje ona szlak kinaz aktywowanych mioginem (MAKP-kinase pathway), co prowadzi do pobudzenia cyklu komórkowego, proliferacji komórek i ich różnicowania. Fosforylacja kinazy w powyższej lokalizacji prowadzi również do aktywacji innych cząsteczek adaptorowych, czyli Shb (*Src homology 2 and β cells*) [47]. Interakcja pomiędzy Shb i miejscem fosforylacji Y1175 na receptorze VEGFR-2 jest warunkiem koniecznym dla aktywacji kinazy PI3, która prowadzi do migracji, proliferacji i przetrwania komórek oraz do pobudzenia angiogenezy [47]. Interesujące, że nadmierna ekspresja, a w konsekwencji aktywność PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), skutkuje defosforylacją kinazy PI3, co hamuje proliferację ECs indukowaną przez VEGF. Jednak w komórkach wielu nowotworów występuje forma zmutowana PTEN, która jest niewydolna w zakresie hamowania tego procesu, a przez to sprzyja pobudzeniu angiogenezy [48]. Ponadto, kinaza PI3 reguluje angiogenezę poprzez wpływ na ekspresję receptora Tie-2 (rolę tego receptora omówiono poniżej) [49]. Aktywacja kinazy Src prowadzi do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych, zahamowania apoptozy ECs i nasilenia syntezy VEGF w ECs [35].

Drugim głównym miejscem fosforylacji VEGFR-2 jest Y1214 (zlokalizowane również na C-końcu cząsteczki receptora). Bierze ono udział w aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mioginem — Cdc42 i p38. Szlak ten reguluje przemieszczanie się komórek [50]. Ponadto w ECs wyścielających naczynia guza nowotworowego białko adaptorowe TSAd (*T-cell specific adapter*) łączy się z miejscem fosforylacji Y951, co umożliwia utworzenie kompleksu TSAd z Src, zaś w konsekwencji pobudza migrację komórek [51]. Również kilka innych białek sygnałowych aktywowanych jest w wyniku aktywacji VEGFR-2: kinaza przylegania miejscowego (*focal adhesion kinase*), paksylina oraz IQGAP1 [36]. Aktywacja szlaków zależnych od Src i Akt prowadzi do zwiększonej syntezy tlenu azotu, co wpływa regulując na napięcie i przepuszczalność ścian naczyń [52]. Aktywacja VEGFR-2 prowadzi nie tylko do pobudzenia przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych,

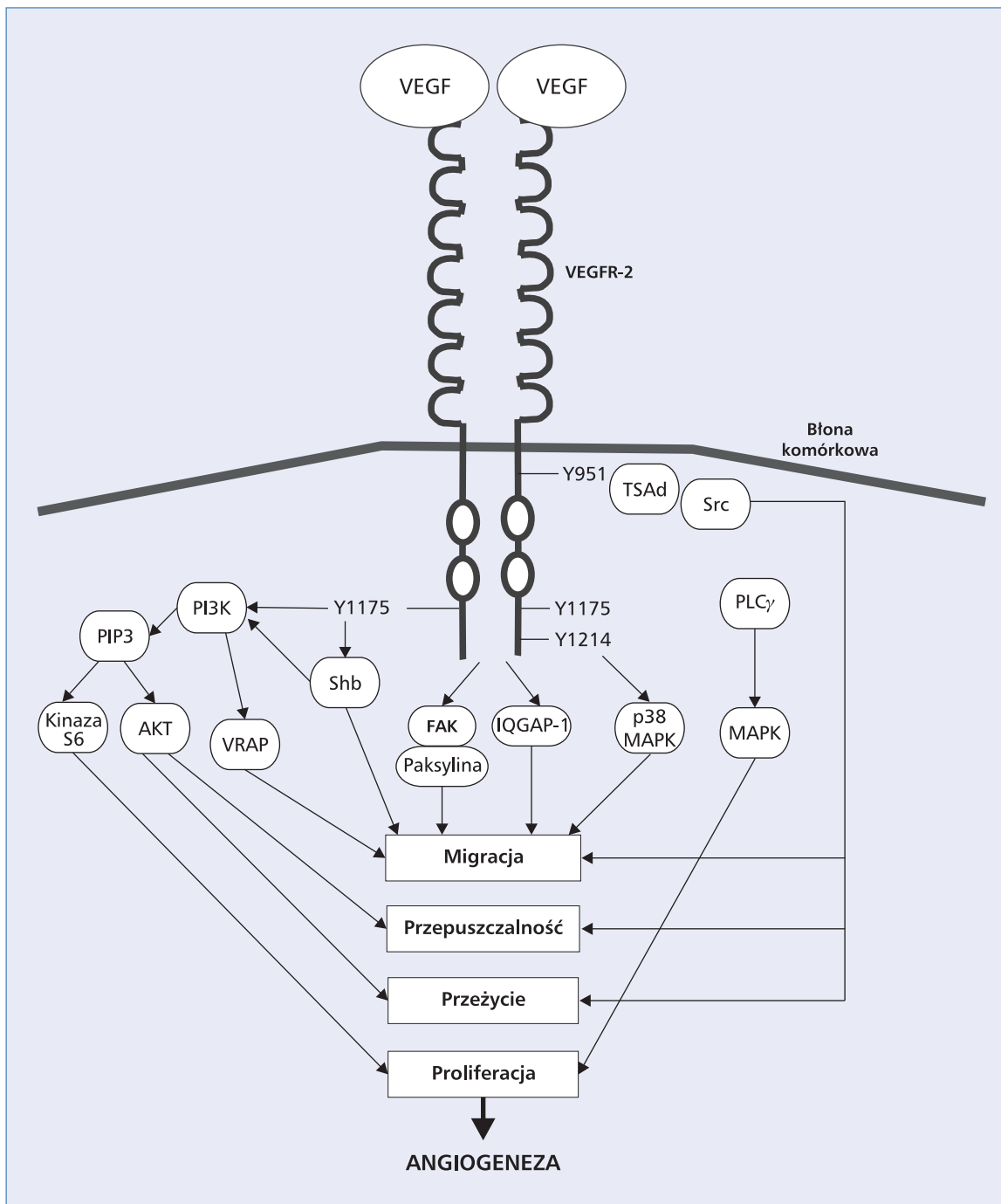
ale też do wyhamowania aktywności receptora. Po przyłączeniu się liganda do VEGFR-2 dochodzi do wysycenia całej puli receptora w komórce (tzw. *downregulation*). Ponadto, następuje autofosforylacja kinaz serynowych cząsteczki VEGFR-2, co skutkuje przyłączeniem do niej ligazy E3, ubikwitynylacją i degradacją receptora [53].

Neuropilina 1 i 2

Komórki niektórych nowotworów i ECs posiadają na swej błonie komórkowej receptory wiążące VEGF, które mają odmienną w budowę i powinowactwo od VEGFR. Określono je mianem neuropiliny 1 (NP-1). Białko to znane było uprzednio ze swej funkcji kierowania wzrostem neuronów. Poza VEGF ligandami dla NP-1 są składowe rodziny kolapsyn/semaforyn [54]. Wykazaano, że współwystępowanie w błonie komórkowej NP-1 z VEGFR-2 prowadzi do zwiększonego wiązania tego ostatniego receptora z VEGF₁₆₅, a w konsekwencji do nasilenia chemotaksji komórek. Neuropilina 1, poprzez przyłączenie VEGF₁₆₅, prezentuje ten ligand receptorowi VEGFR-2, przez co zwiększa efektywność transdukcji sygnałów wywołanych aktywacją tego ostatniego [55]. Co ciekawe jednak, NP-1 może bezpośrednio wiązać się z VEGFR-1, co wskazuje na możliwość istnienia kolejnego mechanizmu, poprzez który VEGFR-1 zmniejsza aktywność VEGF (konkurencja o łączenie się z NP-1). Warto również wspomnieć, że VEGF₁₂₅ nie łączy się z NP-1, co może częściowo tłumaczyć mniejszą aktywność mitogenną VEGF₁₂₅ w porównaniu z VEGF₁₆₅ [55]. Dotychczas brakuje jakichkolwiek danych, by samo przyłączenie VEGF do NP-1 czy NP-2 prowadziło do pobudzenia przekazywania wewnątrzkomórkowego [56, 57]. Jednak wykazano, iż NP-1 reguluje przyleganie ludzkich ECs niezależnie od aktywności VEGFR-2 [36] (ryc. 5).

Układ Tie2/angiopoetyny

Do innych istotnych układów działających w powiązaniu z ECs, których aktywność determinuje powstawanie naczyń krwionośnych, zalicza się receptor kinazy tyrozynowej Tie (najlepiej poznanym jest Tie2) i jego ligandy — angiopoetyny 1–4 (Ang-1, -2, -3, -4), spośród których najlepiej scharakteryzowane są Ang-1 i Ang-2 [59]. Angiopoetyny 1 i 2 łączą się z tym samym miejscem na zewnątrzkomórkowej domeny receptora Tie2 z podobnym powinowactwem. Angiopoetyna 1 jest agonistą receptora Tie2, a efektem jej działania (poprzez autofosforylację Tie2, aktywację kinazy białkowej B i szlaku Akt) jest migracja i „przetrwanie” ECs, co w konsekwencji prowadzi do dojrzewania i stabi-



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych i efektów biologicznych wywołanych aktywnością VEGFR-2. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonka naczyń; VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor*) — receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń typu 2; Y951, Y1175, Y1214 — najważniejsze miejsca autofosforylacji VEGFR-2; PI3K (*phosphatidylinozitol 3' kinase*) — kinaza 3' fosfatydylinozytolu; AKT (*phospholipase B*) — fosfolipaza B; VRAP (*VEGF-associated protein*) — białko związane z receptorem VEGF; Shb (*Src homology 2 and B cells*) — cząsteczka adaptorowa; FAK (*focal adhesion kinase*) — kinaza przylegania miejscowego; IQGAP-1 (*IQ motif containing GTPase activating protein 1*) — białko sygnałowe — substrat FAK; p38 — białko p38 (jedna z kinaz białkowych aktywowanych mitogenem); MAPK (*mitogen activated pathway kinase*) — szlak kinaz aktywowanych miogenem; TSAd (*T-cell specific adapter*) — białko adaptorowe; PLC γ (*phospholipase C γ*) — fosfolipaza C gamma

Figure 5. Schematic VEGFR-2 activity effects: intracellular signal transduction and biological effects

zacji naczyń krwionośnych [60, 61]. Angiopoetyna 1 zmniejsza ekspresję cząsteczek adhezyjnych, cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*) oraz cząsteczka adhezji komórek ściany naczyniowej 1 (VCAM-1, *vascular adhesion molecule 1*) — i przepuszczalność ścian naczyń w warunkach eksperymentalnych. U ludzi dorosłych stwierdza się stałą konstytutywną aktywność Tie2, co sprzyja utrzymaniu „spoczynkowego fenotypu” naczyń krwionośnych. Przeciwnie Ang-2, który jest antagonistą receptora Tie2 — pomimo łączenia się w tym samym miejscu z Tie2 co Ang-1 nie prowadzi do autofosforylacji tego receptora [60, 61]. Wraz z rozwojem guza nowotworowego wzrasta ilość syntezowanej Ang-2, co prowadzi do destabilizacji ściany drobnych naczyń krwionośnych i przerywania połączeń pomiędzy ECs a komórkami przydanki/komórkami mięśni gładkich oraz zwiększenia przepuszczalności ściany naczyń [61]. Czynniki VEGF wpływa na interakcje pomiędzy Ang a Tie2 zlokalizowanym na powierzchni ECs. Przy braku VEGF dochodzi do regresji naczyń krwionośnych i powstania ognisk martwicy w centrum guza nowotworowego. Jednak w obecności VEGF (a wzrost ekspresji VEGF następuje później niż Ang-2) zwiększenie ekspresji Ang-2 prowadzi do intensywnej angiogenezy obserwowanej zwłaszcza na obrzeżach guza nowotworowego [60, 61].

Receptory efryn/efryny

Kolejny, ważny układ receptorowy, odgrywający rolę w angiogenezie, tworzą ligandy — efryny i ich receptory [59]. Są one istotne w migracji ECs w kierunku komórek nowotworowych i kontrolują adhezję komórek, pełniąc znaczącą funkcję w tworzeniu sieci naczyniowej i jej modelowaniu (liczba naczyń, ich kaliber) [59]. Niewłaściwe funkcjonowanie tego układu uniemożliwia powstawanie prawidłowej sieci naczyń krwionośnych, między innymi tworzenie optymalnych rozgałęzień naczyń, przepływu krwi z tętnic do żył itp. [59].

Podstawy kojarzenia leczenia antyangiogennego z chemioterapią

Podczas stosowania chemioterapii często dochodzi do powstawania mutacji genetycznych w komórkach nowotworowych. Stanowi to przyczynę wytworzenia się zjawiska wielolekowej chemiooporności komórek nowotworowych na stosowane leki cytostatyczne. Nierównomierne rozłożenie i uciśnięcie naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu prowadzi do nieoptymalnej dystrybucji leku w guzie. Innym utrudnieniem chemioterapii jest nieprawidłowy przepływ krwi przez naczynia oraz wzmożone ciśnienie śródtkankowe, które jest przy-

czyną niedostatecznego przenikania cytostatyków do komórek nowotworowych. Większa przepuszczalność ścian naczyń patologicznych ułatwia komórkom nowotworowym przedostawanie się do naczyń krwionośnych (intrawazację) oraz ekstrawazację w miejscach tworzenia ognisk przerzutowych. Materiał genetyczny komórek nowotworowych ulega kolejnym zmianom, podczas gdy ECs są stabilne genetycznie. Ponadto, leki interferujące z funkcją ECs podane drogą dożylną docierają do nich bez przeszkód. Komórki śródbłonna naczyń są więc nowym punktem uchwytu (tzw. *target*) leczenia przeciwnowotworowego. Nowe naczynia nie tylko dostarczają tlen komórkom nowotworowym i innym znajdującym się w obrębie rozwijającego się nowotworu, ale też usuwają produkty ich metabolizmu. Pełnią też bardzo istotną funkcję parakrynną w stosunku do komórek nowotworowych, ponieważ ECs syntetyzują czynniki wzrostu, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, liczne proteazy, co wspomaga wzrost guza nowotworowego [1, 3, 9]. Związki uwalniane przez ECs dostarczają sygnałów przeżycia komórkom nowotworowym, ułatwiają im inwazję tkanek otaczających i sprzyjają tworzeniu odległych przerzutów nowotworowych.

Od wielu lat hamowanie angiogenezy (terapia antyangiogenna) czy też niszczenie już istniejących naczyń krwionośnych w nowotworze (terapia waskulotoksyczna) stanowią interesujące koncepcje badań nad możliwościami leczenia chorych na nowotwory [62]. Niezwykle istotnym spostrzeżeniem w badaniach eksperymentalnych było wykazanie, że zastosowanie leków blokujących angiogenezę prowadzi do zmniejszenia ciśnienia śródmiąższowego w guzie oraz normalizacji układu sieci naczyń krwionośnych zaopatrujących nowotwór. Owocuje to poprawą penetracji cytostatyków do komórek nowotworowych [63]. W warunkach eksperymentalnych z dobrym skutkiem zastosowano przeciwciała przeciw VEGF tydzień przed rozpoczęciem leczenia cytostatycznego. Zaobserwowano wówczas nie tylko zwiększoną perfuzję w obrębie guza nowotworowego, ale uzyskano też zwiększenie stężenia irynotekanu w komórkach nowotworowych [63].

Normalizacja przepływu krwi w guzie nowotworowym prowadzi do lepszego utlenowania tworzących go komórek, co również zwiększa wrażliwość guza na napromienienie [zagadnienie to obszernie omówiono w innym artykule bieżącego suplementu — Sierko, Wojtukiewicz: *Podstawy skojarzenia leczenia antyangiogennego z radioterapią*].

Niezwykle istotnymi i wciąż nurtującymi klinicystów problemami jest czas trwania terapii antyangiogennej i jej kontynuacja po zakończeniu leczenia cytostatycznego (chemioterapii uzupełniającej bądź paliatywnej). Angiogeneza w nowotworze jest stale pobudzana, stąd zasadne wydawałoby się kontynuowanie stosowania leków antyangiogennych nawet pomimo progresji no-

wotworu podczas leczenia cytoredukcyjnego (po ewentualnej zmianie programu chemioterapii czy po zakończeniu leczenia cytostatycznego). W tym względzie interesujące są obserwacje pochodzące z badań przedklinicznych wskazujące, że odstawienie leku antyangiogenego skutkuje odrostem naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym [64]. Pierwsze dane kliniczne zdają się potwierdzać tę obserwację, należy jednak dążyć do ostatecznej weryfikacji tej hipotezy w warunkach klinicznych (aktualnie trwają liczne badania poświęcone tej kwestii).

Sposoby interferowania z procesem angiogenezy w nowotworach

Inhibitory angiogenezy dzieli się na bezpośrednie (np. angiostatyna i endostatyna) oraz pośrednie [62, 65]. Pierwsze z nich działają układowo i hamują wpływ różnych czynników proangiogenych na ECs [62], nie prowadząc do wystąpienia oporności w ECs. Jednak krótki okres ich półtrwania determinuje konieczność częstego podawania tych leków. Inhibitory pośrednie hamują aktywność czynników proangiogenych poprzez zahamowanie ich syntezy, neutralizowanie ich aktywności lub blokowanie receptorów, poprzez które czynniki stymulujące angiogenezę wywierają swoje działanie biologiczne. Niestety w przypadku tych leków efekt działania zależy od typu histopatologicznego nowotworu. Obserwuje się też wytwarzanie oporności na ich stosowane [1, 63, 65].

Istotna rola VEGF w pobudzaniu procesu angiogenezy sprawiła, że czynnik ten stał się głównym celem terapii antyangiogennej. Istnieją różnorodne możliwości interferowania z aktywnością VEGF. Wśród nich wyróżnia się przeciwciała przeciwko VEGF (np. bewacyzumab); przeciwciała skierowane przeciwko receptorom dla VEGF, czyli VEGFR-2; rozpuszczalne receptory dla VEGF — VEGF *Trap*, które „wyłapują” wolne cząsteczki VEGF; inhibitory kinazy tyrozynowej VEGFR; a także rybozomy, które, rozszczepiając mRNA dla VEGFR, nie dopuszczają do syntezy tych receptorów.

Warto podkreślić, że istnieje ścisła zależność pomiędzy funkcjonowaniem układu hemostazy i procesu angiogenezy. Oba układy działają w nierozdzielnej łączności z naczyniami krwionośnymi. Istnieje wiele powiązań pomiędzy elementami układu hemostazy a czynnikami biorącymi udział w procesie angiogenezy [przegląd piśmiennictwa w 20, 21, 65, 66]. Wskutek działania różnych czynników patologicznych dochodzi do uaktywnienia zarówno układu hemostazy, jak i mechanizmów pro- i antyangiogenych, które mogą na siebie wzajemnie wpływać [przegląd piśmiennictwa w 20, 21, 65, 66]. Dlatego też, zastosowanie leków interferujących

z aktywnością składowych układu hemostazy może w sposób pośredni hamować angiogenezę [65].

Dotychczas najlepiej poznanym spośród leków antyangiogenych jest przeciwciało humanizowane przeciwko VEGF — bewacyzumab [24, 25, 30]. Hamuje aktywność wszystkich izoform VEGF. Okres półtrwania wynosi 14–21 dni, co wskazuje na konieczność podawania tego leku co 2–3 tygodnie.

Przyczyny wystąpienia oporności na leczenie antyangiogenne

U zwierząt eksperymentalnych zastosowanie bewacyzumabu wywierało spektakularny efekt przeciwnowotworowy. Istniejące odrębności pomiędzy modelami eksperymentalnymi a organizmem człowieka są jednak przyczyną tego, że translacja danych z przedklinicznych badań doświadczalnych na ustrój człowieka chorego na nowotwór jest niezwykle trudna. Wśród licznych ograniczeń ważnym elementem jest to, że naczynia u zwierząt eksperymentalnych są młode, zaś ich wzrost uzależniony jest od jednego głównego czynnika proangiogenego, jakim jest VEGF. Naczynia te wzrastają zaledwie przez kilka dni do kilku tygodni (po czym zwierzęta te są uśmiercane), stąd są one bardziej wrażliwe na leczenie antyangiogenne. Z kolei w guzie nowotworowym, który rośnie w ustroju człowieka przez lata, naczynia krwionośne są przynajmniej w pewnej części pokryte perycytami, które stabilizują ich strukturę. Ponadto, część komórek nowotworowych może być niezależna od wytworzenia nowych naczyń krwionośnych, ponieważ wykorzystuje wcześniej już istniejące naczynia gospodarza (wspomniane wcześniej zjawisko koopcji) czy też jest zaopatrywana przez krew dostającą się przez utworzone przez komórki nowotworowe kanały (*vascular mimicry*). Poza tym wraz ze zwiększeniem objętości i czasu rozwoju nowotworu ECs stają się uzależnione od różnych czynników proangiogenych. W związku z tym hamowanie aktywności wyłącznie VEGF może okazać się niewystarczające dla zahamowania rozwoju nowotworu. Podczas leczenia antyangiogenego może dochodzić także do selekcji komórek, które uniezależniają się od tego jednego czynnika proangiogenego. Coraz bardziej podkreśla się więc potrzebę wielokierunkowego hamowania procesu angiogenezy w celu poprawy wyników leczenia chorych na nowotwory [przegląd piśmiennictwa w 63, 65]. Należy także pamiętać, że hamowanie angiogenezy wywołuje efekt cytostatyczny (zahamowanie wzrostu nowotworu), nie zaś cytotoksyczny (regresja guza), co sprawia, że klasyczne metody oceny odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe (np. kryteria RECIST) nie w pełni odzwierciedlają efekt terapeutyczny postępowania antyangiogenego.

Podsumowanie

W ostatnich latach opublikowano wyniki badań klinicznych, które potwierdzają skuteczność leczenia antyangiogennego u chorych cierpiących z powodu różnych nowotworów [67–69]. Nadal istnieje jednak konieczność określenia grupy chorych na nowotwory, u których terapia antyangiogenna mogłoby przynieść największą korzyść (efekt takiego sposobu postępowania stwierdza się przecież u części chorych, ale leczenie jest drogie i wiąże się z występowaniem działań niepożądanych). Istotnym problemem jest też optymalizacja sposobu podawania, dawkowania leków hamujących angiogenezę oraz długość czasu trwania tego leczenia. Wciąż nurtującym problemem jest określenie obiektywnych wykładników skuteczności klinicznej skojarzenia jednego/kilku leków interferujących z procesem tworzenia naczyń w obrębie nowotworu.

Piśmiennictwo

- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.* 1995; 1: 27–31.
- Black W.C., Welch H.G. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N. Eng. J. Med.* 1993; 328: 1237–1243.
- Dvorak H.F. Angiogenesis: update 2005. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 1835–1842.
- Döme B., Hendrix M.J.C., Paku S. i wsp. Alternative vascularization mechanisms in cancer pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 2007; 170: 1–15.
- Sundberg C., Nagy J.A., Brown L.F. i wsp. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 1145–1160.
- LeCouter J., Lin R., Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat. Med.* 2002; 8: 913–917.
- Wojtukiewicz M.Z., Sierko E. Zahamowanie angiogenezy — nowe podejście do leczenia chorych na nowotwory. *Onkologia Info* 2006; 3: 24–28.
- Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004; 30: 5–20.
- Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 2004; 14: 198–206.
- Hiroaka N., Allen E., Apel I.J. i wsp. Matrix metalloproteinases regulate neovascularisation by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365–377.
- Blasi F. Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 298–304.
- Carroll V.A., Binder B.R. The role of the plasminogen activation system in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999; 25: 183–197.
- Kroon M.E., Koolwijk P., van Goor H. i wsp. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 1731–1742.
- Polverini P.J. Cellular adhesion molecules: newly identified mediators of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1996; 148: 1023–1029.
- Zhai Y., Ni J., Jiang G.W. i wsp. VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas *in vivo*. *FASEB J* 1999; 13: 181–189.
- O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y. i wsp. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277–285.
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Chen C. i wsp. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 1996; 2: 689–692.
- O'Reilly M.S., Pirie-Shepherd S., Lane W.S. i wsp. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999; 285: 1926–1928.
- Sierko E., Sierko P.P., Wojtukiewicz M.Z. Angiostatyna — ukryty w układzie hemostazy naturalny inhibitor angiogenezy: perspektywy zastosowania w leczeniu przeciwnowotworowym. *Nowotwory* 2002; 52: 144–149.
- Sierko E., Zawadzki R.J., Wojtukiewicz M.Z. Czynniki układu hemostazy a angiogeneza w nowotworach. *Nowotwory* 2001; 4: 399–409.
- Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Klement P. i wsp. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001; 3: 371–384.
- Scadden D.T. Cancer stem cells refined. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 701–703.
- Narazaki M., Tosano G. Tumor cell populations differ in angiogenic activity: a model system for spontaneous angiogenic switch can tell us why. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 294–295.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Rev.* 2004; 25: 581–611.
- Ferrara N., Mass R.D., Campa C. i wsp. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. *Ann. Rev. Med.* 2006; 58: 491–504.
- Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M. i wsp. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 26031–2607.
- Bergers G., Brekken R., McMahon G. i wsp. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Natl. Cell Biol.* 2000; 2: 737–744.
- Gerber H.P., Condorelli F., Park J. i wsp. Differential transcriptional regulation of the two vascular growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23659–23667.
- Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V. i wsp. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16: 4604–4613.
- Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 4368–4380.
- Ohh M., Kaelin W.G. Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives. *Mol. Med. Today* 1999; 5: 257–263.
- Pal S., Claffey K.P., Dvorak H.F. i wsp. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 227509–227512.
- Rak J., Kerbel R.S. Ras regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Methods Enzymol.* 2001; 333: 267–283.
- Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.
- Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp. Eye Res.* 2006; 83: 1005–1016.
- Kowanetz M., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5018–5022.
- Gille H., Kowalski J., Yu L. i wsp. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits VEGF-dependent PI3 kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J.* 2000; 19: 4064–4073.
- Zeng H., Dvorak H.F., 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.
- Park J.E., Chen H.H., Winer J. i wsp. Placenta growth factor. Potentialization of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25646–25654.
- Autiero M., Waltenberger J., Communi D. i wsp. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003; 9: 936–943.
- Barleon B., Sozzani S., Zhou D. i wsp. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336–3343.
- Dikov M.M., Ohm J.E., 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.
- Hitsuaka 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. Lessile D.P., Summy J.M., Parkih N.U. i wsp. Vascular endothelial growth receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br. J. Cancer* 2006; 94: 1710–1717.
 45. Wu Y., Hooper A.T., Zhong Z. i wsp. The vascular endothelial growth receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 1519–1529.
 46. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. i wsp. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 359–371.
 47. Holmqvist K., Cross M.J., 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.
 48. Huang J., Kontos C.D. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 10760–10766.
 49. Lelievre E., Bourbon P.M., Duan L.J. i wsp. Deficiency in the p110 γ subunit of PI3-kinase results in diminished Tie-2 expression and Tie2-/- like vascular defects in mice. *Blood* 2005; 105: 3935–3938.
 50. Lamalice L., Houle F., Jourdan G. i wsp. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 2004; 23: 434–445.
 51. Matsumoto T., Bohman S., Dixelius J. i wsp. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA α in tumor angiogenesis. *EMBO J.* 2005; 24: 2342–2353.
 52. Cross M.J., Dixelius J., Matsumoto T. i wsp. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 2003; 28: 488–494.
 53. Singh A.J., Meyer R.D., Band H. i wsp. The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Mol. Biol. Cell* 2005; 16: 2106–2118.
 54. Neufeld G., Cohen T., Shraga N. i wsp. The neuropilins: the multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002; 12: 13–19.
 55. Soker S., Takashima S., Miao H.Q. i wsp. Neropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92: 735–745.
 56. Tamagone L., Artigiani S., Chen H. i wsp. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999; 99: 71–80.
 57. Bagri A., Tessier-Lavigne M. Neuropilins as semaphorin receptors: *in vivo* functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 515: 13–31.
 58. Murga M., Fernandez-Capelito O., Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 2005; 105: 1992–1999.
 59. Pfaff D., Fiedler U., Augustin H.G. Emerging roles of angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80: 719–726.
 60. Davis S., Yancopoulos G.D. The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 237: 173–185.
 61. Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D. i wsp. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994–1998.
 62. Eskens F.A. Angiogenesis inhibitors in clinical development, where are we now and where are we going? *Br. J. Cancer* 2004; 90: 1–7.
 63. Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.
 64. Manusco M.R., Davis R., Norberg S.M. i wsp. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 2610–2621.
 65. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Zacharski L.R. Interfering with hemostatic system components: possible new approaches to antiangiogenic therapy. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004; 30: 145–156.
 66. Sierko E., Wojtukiewicz M.Z. Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004; 30: 95–108.
 67. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E. Leczenie celowane u chorych na raka jelita grubego. *Onkol. Prakt. Klin.* 2008; 3: 286–295.
 68. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E. Leczenie ukierunkowane na cele molekularne u chorych na raka jelita grubego — stan obecny i perspektywy. *Nowotwory J. Oncol.* 2008; 58: 31–42.
 69. Sierko E., Wojtukiewicz M.Z. Leczenie antyangiogenne chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. *Nowotwory J. Oncol.* 2008; 58: 491–504.