

**Artykuły przeglądowe • Review articles****Angiostatyna – ukryty w układzie hemostazy naturalny inhibitor angiogenezy: perspektywy zastosowania w terapii przeciwnowotworowej**Ewa Sierko<sup>1</sup>, Paweł P. Sierko<sup>2</sup>, Marek Z. Wojtukiewicz<sup>1</sup>

*Czynniki krzepnięcia krwi i fibrynolizy biorą udział we wzroście wielu nowotworów i tworzeniu przerzutów. Istotną rolę w rozwoju nowotworów odgrywa proces angiogenezy. Do pobudzenia angiogenezy dochodzi w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy aktywatorami, a inhibitorami tego procesu. W obrębie układu hemostazy, oprócz czynników stymulujących angiogenezę, stwierdzono występowanie również związków hamujących powstawanie sieci nowych naczyń krwionośnych. Wśród nich najlepiej dotychczas poznanym inhibitorem angiogenezy jest fragment plazminogenu – angiostatyna. W niniejszej pracy podjęto próbę usystematyzowania wiedzy dotyczącej budowy, powstawania, mechanizmu działania i wpływu angiostatyny na rozwój nowotworów, jak również perspektyw jej zastosowania w praktyce onkologicznej.*

*Angiostatyna składa się z pierwszych czterech domen kringle cząsteczki plazminogenu. Wykazuje działanie swoiste w stosunku do komórek śródbłonna. Stymuluje apoptozę tych komórek i hamuje ich proliferację, zmniejsza wpływ czynników proangiogennych na komórki śródbłonna oraz hamuje wpływ plazminogenu na rozrost komórek śródbłonna i prawdopodobnie wpływa na zmniejszenie syntetyzowania ATP przez te komórki. W modelach eksperymentalnych wykazano, że działanie angiostatyny prowadzi do zahamowania wzrostu guza pierwotnego i zmian przerzutowych. Stosowanie angiostatyny może stanowić jedną z opcji nowego sposobu leczenia chorych na nowotwór, polegającego na utrzymaniu stanu stabilności nowotworów (dormancy therapy, terapia uspieniowa). Obecnie badania nad angiostatyną są już w trakcie I fazy prób klinicznych.*

**Angiostatin – natural inhibitor of angiogenesis hidden in hemostatic system: perspectives of application in anticancer therapy**

*Blood coagulation and fibrinolysis factors affect cancer growth and metastasis formation. Angiogenesis plays an important role in cancer progression. The disturbances in the balance between activators and inhibitors result in the stimulation of angiogenesis. Among the hemostatic factors not only angiogenesis stimulators but also substances inhibiting the formation of new blood vessels have been observed. The best known angiogenesis inhibitor among them is a fragment of plasminogen known as angiostatin. The aim of this work was to summarize the available information on the structure, generation, mechanism of action and the influence of angiostatin on cancer growth, as well as the possibilities of its introduction to oncological practice.*

*Angiostatin consists of the first four kringle domains of the plasminogen molecule. It acts specifically on the endothelial cells. Angiostatin stimulates endothelial cells apoptosis, inhibits their proliferation, decreases the influence of proangiogenic molecules on endothelial cells and, probably, influences the decrease of the ATP synthesis by these cells.*

*Experimental models have shown that angiostatin activity leads to the inhibition of growth of primary tumor and metastases. Angiostatin administration may become an option of the new modality of treatment of cancer patients, based on an inhibition of cancer progression (dormancy therapy). Currently phase I clinical studies on angiostatin are being conducted.*

**Słowa kluczowe:** angiostatyna, plazminogen, angiogeneza, nowotwory

**Key words:** angiostatin, plasminogen, angiogenesis, malignancy

Zaburzenia zakrzepowo-zatorowe są często obserwowanym powikłaniem choroby nowotworowej na różnych jej etapach [przegląd piśmiennictwa w 1]. Również dość dobrze udokumentowany jest bezpośredni i pośredni wpływ czynników krzepnięcia krwi i fibrynolizy na rozwój nowotworów i tworzenie przerzutów [1, 2].

Gdy w 1971 roku po raz pierwszy Folkman [3] sformułował hipotezę, że rozwój nowotworu powyżej pewnej wielkości nie jest możliwy bez wytworzenia nowych naczyń krwionośnych, niewielu było zwolenników tej teorii. Wątpliwa była zatem koncepcja wprowadzenia substancji blokujących proces angiogenezy do leczenia przeciwnowotworowego. Pomimo pierwotnie słabego zainteresowania tą tematyką, trzydzieści lat badań nad zagadnieniem powstawania nowych naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym doprowadziło do uznania tego

<sup>1</sup> Zakład Onkologii, Akademia Medyczna w Białymstoku

<sup>2</sup> Gabinet Chirurgii Stomatologicznej, Wojewódzka Poradnia Stomatologiczna w Białymstoku

zjawiska za jeden z istotnych etapów w procesie nowotworzenia, limitujący rozwój zarówno guzów litych, jak i chorób rozrostowych układu krwiotwórczego [4, 5].

Układ hemostazy jest anatomicznie i funkcjonalnie, nierozdzielnie związany z naczyniami krwionośnymi. Stąd naturalne wydaje się, że czynniki krzepnięcia krwi i fibrynolizy w sposób wielokierunkowy wpływają na powstawanie nowych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu [6, 7]. Do pobudzenia angiogenezy dochodzi w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy aktywatorami, a inhibitorami tego procesu [8]. Niektóre czynniki układu hemostazy wykazują właściwości hamujące tworzenie nowych naczyń krwionośnych:  $\alpha_2$ -antypłazmina i  $\alpha_2$ -makroglobulina, PF4 (czynnik płytkowy-4) i TSP-1 [przegląd piśmiennictwa w 7].

W ostatnich latach bardzo ciekawym odkryciem okazało się zaobserwowanie występowania ukrytych inhibitorów procesu angiogenezy w obrębie cząsteczek, będących składowymi układem hemostazy [9-15]. Cząsteczka antytrombiny III (AT III) jest źródłem antyangiogennej antytrombiny III (aaAT III); w reakcji tworzenia trombiny powstają: fragment 2 (F2) i fragment 1+2 (F1+2) protrombiny, wykazujące działanie antyangiogenne. Płytki krwi są źródłem antyangiogennych peptydów: peptyd pochodzący z C-końcowego fragmentu PF4 (zawierający reszty 47-70), pierwsza (NK1) oraz pierwsze dwie (NK2) domeny *kringle* czynnika HGF [przegląd piśmiennictwa w 7]. Interesujące jest również to, że inhibitory te pełnią różnorodne, ale odmienne funkcje, w stosunku do swych związków macierzystych.

## Angiostatyna

Pierwszym opisanym, i jak dotąd najlepiej zbadanym, „ukrytym” w układzie hemostazy, inhibitorem angiogenezy jest angiostatyna [9, 10]. Do jej odkrycia przyczyniły się obserwacje kliniczne, że u części chorych po resekcji guza pierwotnego (m.in. w przypadku raka piersi i jelita grubego) dochodzi do dynamicznego wzrostu przerzutów odległych [przegląd piśmiennictwa w 9, 16]. Sformułowana wówczas hipoteza, że wraz ze wzrostem syntetyzowania aktywatorów angiogenezy przez komórki guza pierwotnego dochodzi do zwiększenia stężenia inhibitorów angiogenezy w surowicy krwi, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania wzrostu odległych ognisk przerzutowych [9], została następnie potwierdzona na mysim modelu raka płuca Lewisa (LLC) [9]. Inhibitorem tym okazał się 38 kDa fragment plazminogenu, obecny zarówno w surowicy krwi, jak i w moczu myszy, u których wzrastał guz nowotworowy [9].

## Budowa i powstawanie angiostatyny

Plazminogen jest jednołańcuchową glikoproteina, w której blisko N-końca znajduje się 5 domen *kringle*. Domeny te zbudowane są z około 80 aminokwasów. Ich kształt, podobny do precla, stabilizowany jest przez 3 mostki dwusiarczkowe [17]. Angiostatyna składa się z czterech pierwszych domen *kringle* cząsteczki plazminogenu (K1-4) [9].

Komórki guza nowotworowego bezpośrednio nie syntetyzują tego inhibitora [18]. Zaobserwowano jednak, że do powstawania angiostatyny prowadzi wiele pośrednich mechanizmów. Opisywano powstawanie angiostatyny w wyniku działania metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej typu-3 (MMP-3, stromelizyna-1) [19], typu-7 (MMP-7, matrylizyny) i kolagenazy typu-IV (MMP-9) [20], plazminy i reduktazy plazminy [20, 21]. Komórki raka płuca Lewisa wydzielają czynnik wzrostu, stymulujący kolonie granulocytów/makrofagów (GM-CSF) i działający chemotaktycznie w stosunku do makrofagów [22]. Makrofagi charakteryzują się ekspresją metaloelastazy typu-12 (MMP-12), która odpowiedzialna jest za powstanie angiostatyny [22]. W ostatnim czasie wykazano również, że do powstania angiostatyny dochodzi w wyniku działania metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej typu-2 (MMP-2, żelatynazy typu-2), syntetyzowanej przez komórki nowotworowe [23].

## Mechanizm działania angiostatyny

Angiostatyna wykazuje specyficzne działanie w stosunku do komórek śródbłoka naczyń [9]. W sposób bezpośredni stymuluje ona apoptozę komórek śródbłoka [26] oraz hamuje proliferację tych komórek [10].

Mimo, że cząsteczka plazminogenu również zawiera te same domeny co angiostatyna, to jednak nie wykazuje ona właściwości hamowania proliferacji komórek śródbłoka *in vitro*, angiogenezy w warunkach *in vivo* oraz powstawania przerzutów [9, 10]. Wskazuje to pośrednio na możliwość pojawienia się różnic w strukturze przestrzennej cząsteczki angiostatyny, po odszczepieniu od cząsteczki macierzystej. Zaobserwowano, że w warunkach *in vitro* poszczególne mniejsze fragmenty angiostatyny wywierają różny wpływ na proliferację komórek śródbłoka [24]. Otóż rekombinowane fragmenty ludzkiej angiostatyny, zawierające odpowiednio domenę *kringle* 1, 2 lub 3, wyraźnie hamują proliferację komórek śródbłoka w modelu BCEC (*bovine capillary endothelial cells*), natomiast domena *kringle* 4 nie wykazuje takiego działania [24]. Rekombinowany fragment, zawierający domeny 2 i 3, posiada taki sam efekt antyproliferacyjny, jak sama domena 2. Jednakże zdecydowanie zwiększone hamowanie proliferacji komórek śródbłoka obserwuje się w przypadku zastosowania samodzielnych domen 2 i 3 w stosunku do działania połączonych domen 2-3 [24], co wskazuje na znaczenie przerywania wiązania dwusiarczkowego pomiędzy domenami 2 i 3 [24].

Poszczególne rekombinowane fragmenty angiostatyny wywierają także różny wpływ na migrację komórek śródbłoka naczyń w warunkach *in vitro* [25]. W modelu BCEC (*bovine capillary endothelial cells*) wykazano, że fragment *kringle* 4, nie posiadający działania inhibitorowego w stosunku do proliferacji komórek śródbłoka, najsilniej hamuje migrację tych komórek [25]. Z kolei fragment *kringle* 1-3 w niewielkim tylko stopniu wpływa hamująco na migrację komórek śródbłoka [25]. Zastosowanie fragmentów *kringle* 1-3 i 4 w podobny sposób hamuje migrację komórek śródbłoka, co angiostatyna [25]. Nato-

miast fragment *kringle* 2-3 jest silniejszym inhibitorem migracji komórek śródbłonka niż fragment 1-3 [25].

Angiostatyna aktywuje ponadto kinazy FAK (*focal adhesion kinase*), prowadząc tym samym do wzbudzenia niewłaściwych sygnałów, zaburzających prawidłowe funkcjonowanie połączeń pomiędzy komórkami śródbłonka, indukując tym samym apoptozę [26].

Angiostatyna, poprzez wzbudzenie przejściowej defosforylacji w komórkach śródbłonka drobnych naczyń krwionośnych zmniejsza wpływ proangiogennych czynników – bFGF i VEGF – na aktywację kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (*extracellular signal-regulated kinase*) (ERK-1 i ERK-2) i innych fosfoprotein [27]. Hamuje również, wywołane czynnikiem bFGF, proliferację i migrację komórek śródbłonka [27].

Poza tym angiostatyna hamuje wpływ plazminogenu na proliferację i rozprzestrzenianie się komórek śródbłonka naczyń w modelu Matrigel [28]. Odbywa się to poprzez niekompetytywne wiązanie angiostatyny z t-PA (aktywatorem plazminogenu typu tkankowego), co prowadzi do zahamowania tworzenia się trzeciorzędowego kompleksu: t-PA/plazminogen/składniki macierzy międzykomórkowej (np. laminina-1, trombospondyna) i w konsekwencji do zahamowania tworzenia plazminy [28], która ma istotne znaczenie w procesie inwazji, zarówno komórek śródbłonka, jak i nowotworowych.

Do ciekawych spostrzeżeń doprowadziły badania nad działaniem angiostatyny, przeprowadzone na linii komórkowej HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) [29]. Otóż na powierzchni komórek śródbłonka wykazano istnienie miejsc wiążących angiostatynę, które zidentyfikowano jako podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  syntazy ATP. Dodatkowo, przeciwciała, skierowane przeciwko podjednostce  $\alpha$  tego enzymu, powodowały hamowanie wiązania angiostatyny do komórek śródbłonka o 59% oraz zmniejszenie hamującego wpływu angiostatyny na proliferację komórek śródbłonka o 80% [29]. Do tej pory sądzono, że syntaza ATP występuje jedynie w mitochondriach wysokorozróżnicowanych komórek. Komórki śródbłonka, w przeciwieństwie do innych typów komórek, mogą wzrastać w warunkach niedotlenienia, takich, jakie m.in. występują w guzie nowotworowym. Odkrycie syntazy ATP na błonie zewnętrznej komórek śródbłonka wskazuje na możliwość wytwarzania przez nie większej ilości energii, potrzebnej do przeżycia tych komórek w warunkach niedotlenienia, które jest *nota bene* jednym z najsilniejszych bodźców, pobudzających angiogenezę. Wiązanie angiostatyny z podjednostkami  $\alpha$  i  $\beta$  syntazy ATP może więc pozbawiać komórki śródbłonka tego alternatywnego źródła ATP [30]. Istnieją jednakże zastrzeżenia do tej teorii, wymagające wyjaśnienia. Pierwszym jest to, że przeprowadzone badania, wskazujące na hamowanie proliferacji komórek śródbłonka przez angiostatynę, przeprowadzono w warunkach prawidłowego stężenia tlenu. Przyczyną kolejnej niejasności jest fakt, że synteza ATP przez syntazę ATP wymaga jednoczesnego wypływu protonów od strony wewnętrznej błony biologicznej w kierunku powierzchni zewnętrznej, a środowisko macierzy międzykomórkowej guza nowotworowego charakteryzuje się ob-

niżonym pH, co stwarza, na skutek gradientu stężeń, warunki do przechodzenia protonów w przeciwnym kierunku. Możliwe jednakże, że w tym przypadku proces ten reguluje ATP-aza typu błonowo-wakuolarnego, powodująca przechodzenie protonów z wnętrza komórki na zewnątrz. Zwiększoną aktywność ATP-azy typu błonowo-wakuolarnego obserwowano bowiem w obrębie komórek guzów, charakteryzujących się wysoką zdolnością do tworzenia przerzutów [31].

Poza tym wykazano, że obniżenie pH macierzy międzykomórkowej guza prowadzi do zwiększenia wpływu angiostatyny na komórki śródbłonka [32]. Zaobserwowano mianowicie, że obniżeniu pH środowiska międzykomórkowego w obecności angiostatyny, towarzyszy zmniejszenie pH wewnątrz komórek śródbłonka i wzmożona apoptoza tych komórek [32]. Świadczy to jednocześnie o tym, że środowisko nowotworu, charakteryzujące się niskim pH, przyczynia się do specyficznego wpływu angiostatyny w stosunku do komórek śródbłonka w obrębie nowotworu.

Opisywano również zwolnienie wzrostu guza nowotworowego w wyniku zahamowania proliferacji komórek śródbłonka po zastosowaniu angiostatyny, co spowodowane było zablokowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M [33].

#### Działanie antyangiogenne i przeciwnowotworowe angiostatyny

Angiostatyna w sposób swoisty i odwracalny hamuje proliferację komórek śródbłonka (BCEC – *bovine capillary endothelial cells*, BAEC – *bovine aorta endothelial cells*, HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*, EOMAC – *malignant mouse hemangioendothelioma cells*) [10]. Inhibitor ten nie wpływa bezpośrednio na proliferację, ani na apoptozę komórek nowotworowych, czy też komórek innych niż komórki śródbłonka [9]. Angiostatyna podawana systemowo, poprzez wpływ na śródbłonek naczyń, prowadzi do zmniejszenia gęstości naczyń krwionośnych w obrębie badanych guzów [16, 17, 34, 35], a także do zahamowania wzrostu nowotworów na skutek wzrostu indeksu apoptozy (nawet pięciokrotnego), przy niezmiennym indeksie proliferacyjnym komórek nowotworowych [16].

W trakcie stosowania angiostatyny wykazano zahamowanie wzrostu ludzkiego raka piersi o 95%, komórek raka jelita grubego o 97% i komórek raka stercza o prawie 100%, rosnących po przeszczepieniu u myszy o upośledzonej odpowiedzi immunologicznej [10]. Guzy te, po zaprzestaniu leczenia angiostatyną, odrastały w przeciągu 2 tygodni [10].

Podobnie, inhibitor ten wpływa na zahamowanie wzrostu przerzutów [9, 10]. Otóż u myszy, u których rozwił się rak płuca Lewisa po wszczepieniu podskórnym, obserwowano obecność tylko mikroprzerzutów, otaczających drobne naczynia krwionośne w przestrzeni okołonaczyniowej w tkance płucnej lub tworzących dwuwarstwowe kolonie przerzutowych komórek nowotworowych na powierzchni opłucnej, przy czym nie wykazano w tych

okolicach pobudzenia angiogenezy. Stwierdzono natomiast obecność angiostatyny w osoczu krwi i w moczu. Przeciwnie, usunięcie guza pierwotnego, prowadzące do obniżenia stężenia angiostatyny, wiązało się z pojawieniem się w płucach masywnych, bardzo dobrze unaczynionych przerzutów [9].

Liczne, przeprowadzone w ostatnim czasie badania [34, 36] zwróciły uwagę na korzystne efekty terapeutyczne, uzyskiwane poprzez zastosowanie angiostatyny w połączeniu z czynnikami cytotoksycznymi. Otóż zastosowanie angiostatyny i radioterapii konwencjonalnej wywołuje efekt synergistyczny w stosunku do zahamowania wzrostu guza nowotworowego [34]. Sama radioterapia (promieniowanie X, dawka 40 Gy podana w 2 frakcjach) prowadziła do zmniejszenia wielkości raka płuca Lewisa u myszy o 62%; podanie ludzkiej angiostatyny (25 mg/kg/14 dni) powodowało zmniejszenie wielkości tego nowotworu o 31%, natomiast zastosowanie tych obu metod jednocześnie dawało 89% redukcję wielkości nowotworu [34]. Podobne wyniki osiągnięto, poddając badaniu ludzkie nowotwory (glejak wielopostaciowy – D54, rak płaskonabłonkowy krtani – SQ-20B, rak gruczołowy stercza – PC3), wzrastające jako ksenogeniczne przeszczepy u myszy. Badane myszy poddano radioterapii w warunkach promieniowania X: w przypadku myszy z przeszczepionymi komórkami nowotworowymi linii D54 podano dawkę 30 Gy w 5 frakcjach, linii SQ-20B – dawkę 50 Gy w 10 frakcjach, natomiast linii PC3 – dawkę 40 Gy w 8 frakcjach. Angiostatynę podawano dootrzewnowo w dawce 25 mg/kg przed napromienianiem lub w dwóch dawkach dziennych (w przypadku linii SQ-20B). W tych przypadkach, po zastosowaniu leczenia złożonego (angiostatyny i radioterapii), obserwowano większą redukcję wielkości guzów nowotworowych (odpowiednio o 96%, 82% i 96%), niż przewidywano (odpowiednio o 90%, 34% i 77%) [34]. W modelu raka płuca Lewisa, wzrastającego po przeszczepieniu u myszy o osłabionej odpowiedzi immunologicznej, wykazano również, że korzyści terapeutyczne przynosi tylko jednoczesowe podawanie angiostatyny i stosowanie leczenia energią promienistą (radioterapia w warunkach promieniowania X, dawka 40 Gy podana w dwóch frakcjach i angiostatyna 25 mg/kg/dobę, stosowana w dwóch dziennych dawkach przez 2 dni), nie zaś stosowanie tych procedur w sposób sekwencyjny, tj. podawanie angiostatyny w dawce jw. przez 12 dni po zakończeniu radioterapii lub stosowanie obu metod jednocześnie przez 2 dni, a następnie angiostatyny przez 12 dni [36]. Poza tym, stosowanie angiostatyny (w dawce odpowiednio 1, 10 i 100 mg/kg) we wlewie ciągłym, poprawia efekt antyangiogeny (hamowanie angiogenezy w rogowce u myszy) w stosunku do podawania tego inhibitora w jednorazowej dawce dziennej (24%, 68% i 93% vs 14%, 34% i 71%) [cytowane za 37].

Niestety, konieczność długotrwałego podawania angiostatyny, wykonywania codziennych wklęć i potrzebne wysokie dawki leku powodują, że w praktyce klinicznej angiostatyna stanowiłaby niezbyt atrakcyjną formę leczenia. Stąd pojawiły się wielokierunkowe próby terapii genowej, mającej na celu zastosowanie genu kodującego synte-

zę angiostatyny jako alternatywnej formy terapii. Wprowadzenie liposomów połączonych z cDNA, kodującym syntezę angiostatyny, prowadziło do hamowania tworzenia się przerzutów w płucach, jak i wzrostu guza pierwotnego u myszy [38, 39]. Również zastosowanie wektorów wirusowych (opartych na adenowirusach i retrowirusach), zawierających gen odpowiedzialny za syntezę angiostatyny, wiodło do zahamowania wzrostu wielu guzów pierwotnych w modelach zwierzęcych i proliferacji komórek śródbłonka w warunkach *in vitro* [18, 33, 40, 41].

### Inne inhibitory pochodzące z plazminogenu

#### Fragment *kringle 5* plazminogenu

Fragment plazminogenu zawierający domenę *kringle 5* również charakteryzuje się działaniem inhibitorowym w stosunku do proliferacji komórek śródbłonka naczyń w modelu BCEC (*bovine capillary endothelial cells*) [42]. Mimo wysokiej aktywności antyangiogennej, jest on słabszym inhibitorem angiogenezy w warunkach *in vivo*, z uwagi na krótki okres półtrwania jego cząsteczki [cytowane za 18].

#### Fragment *kringle 1-5* plazminogenu

W wyniku proteolizy cząsteczki plazminogenu, pod wpływem plazminy aktywowanej urokinazą, uzyskano fragment plazminogenu zawierający pełne domeny *kringle 1-4* i prawie całą domenę *kringle 5* [18]. Wywiera on działanie inhibitorowe w stosunku do proliferacji komórek śródbłonka w warunkach *in vitro*, 50-krotnie silniejsze od angiostatyny. W trakcie ko-inkubacji domeny *kringle 5* i angiostatyny z komórkami śródbłonka naczyń w warunkach *in vitro* obserwowano efekt synergistyczny, podobny do tego, jaki wywołuje *kringle 1-5*, co wskazuje na to, że angiostatyna i domena *kringle 5* oddziałują na komórki śródbłonka na drodze różnych mechanizmów [18].

### Podsumowanie

Ciągle niezadowalające efekty konwencjonalnego leczenia nowotworów stwarzają wyzwanie dla współczesnej medycyny i implikują konieczność prób wprowadzania nowych sposobów leczenia tej choroby. Jedną z opcji postępowania może być dążenie do utrzymania stanu stabilnego (*dormancy therapy*, terapia uspieniowa), polegającego na tym, że nasilenie apoptozy równoważyłoby wysoki indeks proliferacji komórek śródbłonka, niedopuszczając tym samym do powstania nowej sieci naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu. W konsekwencji uniemożliwiłoby to wzrost nowotworu powyżej wielkości wymagającej indukcji angiogenezy, tj. 2-3 mm<sup>3</sup> [10]. Postępowanie takie mogło by stanowić alternatywę dla terapii cytotoksycznej, mającej na celu zniszczenie komórek guza. Ta forma leczenia może dać szansę chorym na nowotwór na wydłużenie przeżyć całkowitych i przeżyć bez objawów choroby nowotworowej. Odkrycie ukrytych inhibitorów angiogenezy w cząsteczkach będących składo-

wymi układu hemostazy może dać podstawę do opracowania metod wykorzystujących te naturalne inhibitory angiogenezy. Niewątpliwie najlepiej poznanym z nich jest angiostatyna, której przydatność jako leku antyangiogenego, wpływającego zarówno na zmianę pierwotną, jak i przerzuty odległe, wykazano już wielokrotnie w hodowlach komórkowych i na modelach zwierzęcych. Na podstawie badań na modelach eksperymentalnych należy przypuszczać, że będzie ona lekiem nietoksycznym i dobrze tolerowanym. Obecnie trwają badania I fazy, mające na celu ocenę bezpieczeństwa stosowania angiostatyny, jak również właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych tego preparatu, podawanego dożylnie (w dawce nawet 240 mg/m<sup>2</sup>) u osób z zaawansowaną chorobą nowotworową [37, 43]. Rozpoczęto również I fazę badań, dotyczącą stosowania angiostatyny podskórnie [43]. Inne badanie I fazy zostało opracowane celem oceny zasadności użycia rekombinowanej formy angiostatyny w połączeniu z leczeniem energią promienistą, w terapii chorych z guzami litymi [33, 34]. Wstępne, interesujące obserwacje przedkliniczne wskazują, że angiostatyna w tym przypadku, oprócz swoich właściwości hamujących angiogenezę, wzrost guzów pierwotnych i przerzutów odległych, może działać jako radiouczulacz [34].

**Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz**

Zakład Onkologii  
Akademia Medyczna w Białymstoku  
ul. Ogrodowa 12  
15-027 Białystok  
e-mail mwojtuk@polbox.com

## Piśmiennictwo

- Wojtukiewicz MZ, Rucińska M. Aktywacja krzepnięcia krwi u chorych na nowotwory: implikacje kliniczne. *Nowotwory* 1999; 49: 381-391.
- Wojtukiewicz MZ. Zakrzepy a nowotwory. W: *Zakrzepy i zatory*. Łopaciuk S. (red.). Wyd. II. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2001, 105-124.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
- Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001; 86: 23-33.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P i wsp. The hemostatic system and angiogenesis in neoplasms. *Neoplasia* 2001; 51: 93-103.
- Sierko E, Zawadzki RJ, Wojtukiewicz MZ. Czynniki układu hemostazy a angiogeneza w nowotworach. *Nowotwory* 2001; 51: 93-103.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y i wsp. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
- O'Reilly MS, 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 MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS i wsp. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999; 285: 1926-1928.
- Colman RW, Jameson BA, Lin Y i wsp. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cells proliferation and cell migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 2000; 15: 543-550.
- Perollet C, Han ZC, Savona C i wsp. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998; 91: 3289-3299.
- Jouan BV, Canron X, Alemany M i wsp. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4 – derived peptides and mechanism of action. *Blood* 1999; 94: 984-993.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE i wsp. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000; 6: 41-48.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-153.
- Kopeć M. Hemostaza fizjologiczna. W: *Zakrzepy i zatory*. Łopaciuk S. (red.). Wyd. I Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1996, 15-43.
- Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999; 84: 643-650.
- Lijnen HR, Ugwu F, Bini A i wsp. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 1998; 37: 4699-4702.
- Patterson BC, Sang QA, Stathakis P i wsp. Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J Biol Chem* 1999; 274: 8910-8916.
- Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997; 272: 28823-28825.
- Dong Z, Kumar R, Yang X i wsp. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88: 801-810.
- O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG i wsp. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 1999; 274: 29568-29571.
- Cao Y, Ji RW, Dawidson D i wsp. Kringle domains of human plasminogen: characterization of the anti-proliferative activity of endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 29461-29467.
- Ji WR, Castellino FJ, Chang Y i wsp. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB J* 1998; 12: 1731-1738.
- Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N i wsp. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5579-5583.
- Redlitz A, Daum G, Sage EH. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 1999; 36: 28-34.
- Stack MS, Gately S, Bafetti LM i wsp. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999; 340: 77-84.
- Moser TL, Stact MS, Asplin I, Enghild JJ i wsp. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2811-2816.
- Barinaga M. A surprising partner for angiostatin. *Science* 1999; 283: 183
- Martinez-Zaguilan R. Angiostatin's partners. *Science* 1999; 284: 433-434.
- Wahl M., Grant D. Intracellular acidosis and apoptosis are enhanced in endothelial cells exposed to angiostatin particularly at low (tumor-like) extracellular pH. Abstract Book. 6<sup>th</sup> *Biannual International Meeting*. Angiogenesis: basic science and clinical developments. Crete, Greece 2001; 46.
- Griscellini F, Li H, Bennaucuer-Griscellini A i wsp. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockade of endothelial cell proliferation associated with mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6367-6372.
- Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA i wsp. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature* 1998; 394: 287-291.
- Bergers G, Javaherian K, Lo KM i wsp. Effect of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999; 284: 808-12.
- Gorski DH, Mauceri HJ, Salloum RM i wsp. Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res* 1998; 58: 5686-5689.
- Sim BKL, MacDonald, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 181-190.
- Chen QR, Kumar D, Stass SA i wsp. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3308-3312.
- Sacco MG, Caniatti M, Cato EM i wsp. Liposome-derived angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastazation in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2660-2665.
- Tanaka T, Manome Y, Wen P i wsp. Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997; 3: 437-442.

41. Noonan DM, Indraccolo S, Carozzino F i wsp. Inhibition of endothelial cell invasion in vitro and tumor growth in vivo by angiostatin gene transfer. Abstract Book. *6<sup>th</sup> Biannual International Meeting. Angiogenesis: basic science and clinical developments*. Crete, Greece 2001; 54.
42. Cao Y, Chen A, An SSA i wsp. Kringle 5 of plasminogen: a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem* 1997; 272: 22924-22928.
43. Gubish ER, Fogler WE, Sidor CF. Developmental strategies for endogenous angiogenesis inhibitors in cancer intervention. Abstract Book. *6<sup>th</sup> Biannual International Meeting. Angiogenesis: basic science and clinical developments*. Crete, Greece 2001; 48.

*Otrzymano: 9 listopada 2001 r.*

*Przyjęto do druku: 21 stycznia 2002 r.*