



# Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) w endokrynologii i onkologii

Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endocrinology and oncology

**Dariusz Kajdaniuk, Bogdan Marek, Wanda Fołtyn, Beata Kos-Kudła**

*Katedra Patofizjologii i Endokrynologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze, Katowice*

Przedrukowano za zgodą z: Endokrynologia Polska 2011; 62 (5): 456-464

## Streszczenie

Gruczoły wewnętrznego wydzielania są dobrze unaczynione, a struktura ich naczyń ułatwia wymianę różnych substancji, w tym hormonalnych. Gruczoły te są częstym modelem doświadczalnym w badaniach nad naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (VEGF) i angiogenezą. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu uczestniczy w patogenezie cukrzycy. Nefropatia cukrzycowa jest chorobą mikronaczyniową rozwijającą się w wyniku nakładania się zaburzeń hemodynamicznych i metabolicznych. Do niedokrwienia, a co się z tym wiąże niedotlenienia tkanek i angiogenezy, dochodzi w retinopatii cukrzycowej, będącej jedną z przyczyn ślepoty. Udział angiogenezy i VEGF w patogenezie choroby nowotworowej opisano w wielu pracach. Obecność białka i mRNA VEGF stwierdzono w raku tarczycy, oskrzela, przełyku, płuc, żołądka, jelita grubego, wątroby, sutka, jajnika, macicy, nerki, pęcherza moczowego, guzach mózgu, kości. Powiązано stopień ekspresji VEGF z agresywnością guza i rokowaniem u chorych. Bogato unaczynione są hormonalnie czynne guzy przewodu pokarmowego (GEP NET). W guzach neuroendokrynnych wykazano silną ekspresję VEGF, Flt-1 i KDR w stosunku do niezmiennych tkanek otaczających. W zależności od rodzaju jednostki chorobowej bądź też stopnia jej zaawansowania podejmuje się próby zastosowania terapii angiogennej i antyangiogennej. Terapia antyangiogenna (najczęściej traktowana jako jedna z form leczenia przeciwnowotworowego) opiera się na: hamującym oddziaływaniu z proangiogennymi ligandami i ich receptorami; pobudzeniu lub dostarczeniu inhibitorów angiogenezy; bezpośrednim niszczeniu unaczynienia guza. (**Endokrynol Pol 2011; 62 (zeszyt edukacyjny III): 14-22**)

**Słowa kluczowe:** VEGF, angiogeneza, KDR, Flt-1, gruczoły endokrynnne, przysadka, tarczyca, cukrzyca, wątroba, GEP NET, nowotwór, rak wątroby, onkologia, czynnik wzrostu

## Abstract

Endocrine glands are well vascularized and the structure of their vessels facilitates the exchange of various substances, including hormones. These glands are a frequent experimental model in research on VEGF and angiogenesis. VEGF participates in the pathogenesis of diabetes. Diabetic nephropathy is in essence a microvascular disease that develops as a result of a confluence of hemodynamic and metabolic perturbations. Diabetic retinopathy is the most common microvascular complication of diabetes mellitus and is the leading cause of blindness. In diabetic retinopathy ischemic states and hence tissue hypoxia and angiogenesis takes place. Participation of angiogenesis and VEGF in pathogenesis of neoplastic disease is described in many papers. VEGF protein and mRNA were found in cancers of the thyroid, bronchus, lungs, esophagus, stomach, colon, liver, breast, ovary, uterus, kidney, urinary bladder, in malignant tumors of the brain, bone. In a series of reports connections between the degree of VEGF expression with tumor aggressiveness and prognosis in patients have been reported. Richly vascularized are GEP NET. In neuroendocrine tumors strong expression of VEGF, Flt-1 and KDR in relation to the unchanged surrounding tissues has been demonstrated. Depending on the disease entity or the degree of its severity attempts of application the angiogenic and antiangiogenic therapy are being made. Antiangiogenic therapy (usually regarded as a form of cancer therapy) is based on: inhibitory effects of proangiogenic ligands and their receptors; stimulation or delivery of angiogenesis inhibitors; direct destruction of neoplastic tumor vasculature. (**Pol J Endocrinol 2011; 62 (education supplement III): 14-22**)

**Key words:** VEGF, angiogenesis, KDR, Flt-1, endocrine glands, pituitary, thyroid, diabetes mellitus, liver, GEP NET, cancer, neoplasm, hepatocellular carcinoma, oncology, growth factor

## VEGF i angiogeneza w endokrynologii i diabetologii

Gruczoły wewnętrznego wydzielania są dobrze unaczynione, a struktura ich naczyń (fenestracje podściółki epitelium) ułatwia wymianę różnych substancji, w tym hormonalnych [1]. Gruczoły te są częstym modelem doświadczalnym w badaniach nad angiogenezą.

Ilość naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) w gruczole tarczowym jest większa w powszechnie występującym wola mięszzowym i guzkowym w porównaniu ze zdrowymi, choć różnicy między tkankami wola mięszzowego i guzkowego nie stwierdza się. Stymulacja przez hormon tyreotropowy (TSH, *thyroid-stimulating hormone*) hodowli



Dr hab. med. Dariusz Kajdaniuk, Katedra Patofizjologii i Endokrynologii, Śląski Uniwersytet Medyczny,  
Pl. Traugutta 2, 41-800 Zabrze, faks: +48 (32) 271 26 41, e-mail: patofizjozab@sum.edu.pl

komórek tarczycy wywołuje ich proliferację [1]. Stymulowanie przez TSH i przeciwciała przeciw receptorowi dla TSH (TRAb) ludzkich tyreocytów prowadzi do wzrostu w nich ekspresji mRNA VEGF, a w badaniach *in vivo* także do wzrostu ekspresji mRNA VEGF, Flt-1 [receptora Flt-1 dla VEGF (VEGFR1; *fms-like tyrosine kinase-1*)] i KDR [receptora KDR dla VEGF (VEGFR2, KDR/Flk-1, Flk-1; *fetal liver kinase 1*)] w komórkach endotelialnych (EC, *endothelial cells*) tarczycy szczurów. Wskazuje to na udział VEGF w procesie angiogenezy zachodzącym w gruczole tarczowym również u ludzi z chorobą Gravesa-Basedowa [2, 3], w przypadku których stała stymulacja tkanki tarczycy przez TRAb nie tylko zwiększa produkcję hormonów tarczycy, ale i nasila angiogenezę [1], prowadząc do zwiększenia unaczynienia tarczycy, co od dawna jest powszechnie znanym faktem. U ludzi z chorobą Gravesa-Basedowa mRNA VEGF zlokalizowano w hiperplastycznych komórkach pęcherzykowych tarczycy, a mRNA i białko Flt-1 w EC wszystkich tkanek tego gruczołu [4]. Stwierdzono, że surowicze stężenia VEGF są podwyższone u osób z nieleczoną chorobą Gravesa-Basedowa i chorobą Hashimoto i korelują dodatnio ze stopniem unaczynienia tarczycy ocenionym za pomocą ultrasonograficznego badania dopplerowskiego z kolorowym oznakowaniem przepływu. W ludzkich tkankach wola i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy zlokalizowano również VEGF C i Flt-4 [1, 3]. Tkanki limfocytarnego zapalenia tarczycy i zróżnicowanych raków tarczycy wykazują silniejszą ekspresję VEGF niż tkanki zdrowego gruczołu [3, 5]. Większą ekspresję VEGF w guzach złośliwych tarczycy stwierdzono nie tylko w porównaniu z tkankami zdrowymi, ale i w stosunku do guzów łagodnych, chociaż nie wykazano różnicy między tkanką mikroraka brodawkowatego a tkanką zdrowej tarczycy. W rakach brodawkowatym i pęcherzykowym wzrastająca ekspresja VEGF współistnieje ze zwiększeniem proliferacji komórek nowotworowych, ocenionym z użyciem indeksu Ki-67 [1]. Komórki raków tarczycy z większą ilością mRNA i białka VEGF charakteryzowały się podwyższoną aktywnością mitotyczną [5]. Wykazano, że im większa ekspresja VEGF, tym większy jest rozmiar złośliwego guza tarczycy [1] oraz że guzy te są lepiej unaczynione niż zdrowa tkanka tarczycowa [1, 6]. Dużą liczbę małych naczyń krwionośnych wykryto w tkankach wznowy raka brodawkowatego tarczycy. Zasugerowano nawet istnienie korelacji między liczbą naczyń w tkance nowotworu a rokowaniem u chorych z rakiem brodawkowatym i rdzeniastym tarczycy [7]. U dzieci i młodych dorosłych ekspresja VEGF i Flt-1 w tkankach raka brodawkowatego tarczycy korelowała z rozmiarem guza [8]. Komórki guzów pierwotnych raka tarczycy pobrane od chorych z przerzutami wykazywały większą ekspresję VEGF w porównaniu z komórkami guzów pierwotnych pobranych od osób bez przerzutów

[5], a komórki przerzutów raka tarczycy do węzłów chłonnych wykazywały większą ekspresję VEGF niż komórki ogniska pierwotnego [1]. Zaobserwowano, że stopień ekspresji VEGF w guzie koreluje z jego agresywnością [1, 6]. Sugerowano użyteczność kliniczną tych spostrzeżeń — wyłonienie chorych z większym prawdopodobieństwem rozwoju przerzutów. Stężenia mRNA VEGF były podobne w guzach pierwotnych i przerzutach, a w komórkach raka brodawkowatego, pęcherzykowego i z komórek Hurthle'a były wyższe w porównaniu z komórkami raka rdzeniastego, guza łagodnego, tkanki hiperplastycznej (w chorobie Gravesa-Basedowa) [9]. Receptory Flt-1 i mRNA Flt-1 zidentyfikowane z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR, *polymerase chain reaction*) zlokalizowano w EC zarówno zdrowych, jak i nowotworowych tkanek tarczycy (raka brodawkowatego i pęcherzykowego) [1]. W komórkach raka rdzeniastego tarczycy zaobserwowano nadekspresję białek immunoreaktywnych VEGF A, VEGFR1 i VEGFR2, które mogą przyczyniać się do progresji nowotworu [10]. Ponadto sugerowano, że polimorfizm VEGF i ekspresja mRNA mogą być czynnikami prognostycznymi agresywności raka tarczycy [11]. Jednocześnie stężenia VEGF D w surowicy są obniżone u pacjentów z przerzutami różnych postaci raka tarczycy, niezależnie od zakresu przerzutów. Być może jakaś inna cząsteczka wydzielana przez tkankę nowotworową wpływa na VEGF D fizjologicznie produkowany przez inne tkanki, powodując zmniejszenie stężenia VEGF D we krwi pacjentów z przerzutami zróżnicowanego raka tarczycy [12]. Jednak w świetle obecnej wiedzy VEGF nie spełnia kryteriów dla markera nowotworów gruczołu tarczowego.

Z zakresu patologii przytarczyc na uwagę zasługuje informacja, że w tkance przytarczycy poddanej autotransplantacji dochodzi do angiogenezy, a parathormon (PTH) reguluje ekspresję VEGF i metaloproteinazy (MMPs, *matrix-metaloproteinases*) [6].

Pierwotne guzy przysadki, w przeciwieństwie do zmian nowotworowych innych narządów endokrynnych, z reguły są mniej unaczynione od prawidłowej tkanki przysadki i nie stwierdza się w nich zależności między nasileniem proliferacji komórek nowotworowych a gęstością małych naczyń (MVD, *microvessel density*) [1, 13]. Mechanizm tego zjawiska jest nieznanym [1]. Spostrzeżenia te dotyczą guzów hormonalnie czynnych — ekspresja mRNA VEGF szczególnie w tyreotropinoma była niższa od ekspresji w prawidłowych tkankach gruczołu. Ekspresja mRNA VEGF w nieczynnych hormonalnie guzach przysadki była natomiast wyższa od ekspresji w prawidłowych tkankach gruczołu. Ekspresja mRNA KDR we wszystkich typach guzów przysadki [nieczynnych hormonalnie oraz wydzielających hormon wzrostu (GH, *growth hormone*), prolaktynę

(PRL), hormon adrenokortykotropowy (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*), hormon tyreotropowy (TSH, *thyroid-stimulating hormone*) była wyższą od ekspresji w prawidłowych tkankach gruczołu, a szczególnie wyraźnie w tyreotropinoma. W guzach przysadki istnieje dodatnia korelacja między ekspresją mRNA VEGF i KDR a PTTG (*pituitary tumor transforming gene*) oraz między ekspresją mRNA VEGF i czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF2, *fibroblast growth factor 2*). Wydaje się, że aktywność transkrypcyjna PTTG przyczynia się do pobudzenia VEGF [14]. W liniach komórkowych przysadki transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF $\beta$ 1, *transforming growth factor beta 1*) stymuluje produkcję VEGF w sposób zależny od dawki i typu komórki docelowej [15]. U chorych z czynną akromegalią ogólnoustrojowe proangiogenne efekty działania GH i insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I, *insulin-like growth factor I*) przynajmniej w części zależą od aktywacji VEGF przez IGF-I [1, 16]. Stosowane w leczeniu czynnej akromegalii analogi somatostatyny hamują angiogenezę bezpośrednio poprzez receptory zlokalizowane na komórkach endotelium (hamowanie proliferacji EC) oraz pośrednio poprzez hamowanie sekrecji GH, IGF-I, VEGF i innych czynników wzrostu. Wynika z tego, że analogi somatostatyny bezpośrednio i poprzez hamowanie proangiogenego wpływu wywieranego przez IGF-I i VEGF na tkanki chronią organizm przed skutkami szeroko rozumianej angiogenezy (w tym wypadku patologicznej) i można przypuszczać, że zmniejszają unaczynienie guza wydzielającego GH (*somatotropinoma*) [17]. Jednocześnie oceniano ekspresję Ki-67, p53, VEGF w guzach wydzielających GH, aby ustalić, która z tych cząsteczek może być pomocna w rozróżnieniu guza inwazyjnego od nieinwazyjnego. Ekspresja Ki-67 i p53 nie korelowała z inwazyjnym charakterem gruczolaków, ale ekspresja VEGF była istotnie większa w guzach inwazyjnych porównaniu z grupą z guzem nieinwazyjnym. Wyniki badania sugerują, że VEGF jest niezależnym stymulatorem angiogenezy i progresji guzów wydzielających GH z cytoplazmatyczną immunoreaktywnością > 25%. A wartość progowa może być użyteczna w określaniu rokowania i właściwej strategii terapeutycznej. Ponadto korzystne efekty może przynieść przedoperacyjna terapia oktreotydem, jako leczenie adiuwantowe, zwłaszcza w przypadku miejscowo inwazyjnych guzów wydzielających GH [18]. Guzy wydzielające prolaktynę mają wyższą ekspresję VEGF w porównaniu z gruczolakami nieczynnymi hormonalnie i guzami wydzielającymi ACTH lub GH [13]. Duże guzy przysadki wydzielające prolaktynę (*macroprolactinoma*) są lepiej unaczynione od *microprolactinoma*, inwazyjne *prolactinoma* od guzów nieinwazyjnych, raki przysadki od guzów łagodnych. Słabe unaczynienie jest charakterystyczne dla wolno ro-

snących gruczolaków przysadki. Inwazyjne gruczolaki chromochłonne okazały się lepiej unaczynione od nieinwazyjnych [17]. Skuteczność leczenia chirurgicznego słabo unaczynionych *macroprolactinoma* jest większa niż dobrze unaczynionych. Stosowanie w leczeniu *prolactinoma* agonistów dopaminy hamuje przekazywanie sygnałów VEGF — są to więc leki działające antyangiogenicznie. Również deksametazon hamuje sekrecję VEGF przez większość guzów przysadki, co sprawiło, że brano nawet pod uwagę zastosowanie niektórych glikokortykoidów w ich leczeniu [7]. W indukowanych przez estrogen guzach przysadki wydzielających prolaktynę (*PRLoma*, *prolactin-producing tumor*) u szczurów wykazano wysokie poziomy ekspresji VEGF. Przeciwciała anti-VEGF hamują karcynogenezę w indukowanych estrogenem guzach wydzielających prolaktynę. Inhibicyjny wpływ przeciwciała anti-VEGF może być związany z autokrynnym/parakrynnym działaniem VEGF na komórki guza, ponieważ VEGF i jego receptory ulegają koekspresji na komórkach guza [19]. Dane uzyskane w kolejnych doświadczeniach na zwierzętach wykazały, że leczenie przeciwiangiogenne było skuteczne w zahamowaniu wzrostu guzów wydzielających prolaktynę opornych na leczenie agonistami dopaminy. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji VEGF po leczeniu antyangiogenym (bezpośrednie podanie do guza mieszaniny Flt-a/Fc lub systemowa neutralizacja VEGF za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciała G6-31) i chociaż u myszy leczonych G6-31 stężenia VEGF były podwyższone, odnotowano słabszą aktywację przysadkową szlaku sygnałowego KDR. Powyższe wyniki wskazują, że mimo wątpliwości co do roli angiogenezy w gruczolakach przysadki, VEGF może przyczyniać się do wystarczającego unaczynienia i stanowi dodatkowy cel terapeutyczny w guzach wydzielających prolaktynę opornych na leczenie agonistami dopaminy [20]. Czynniki martwicy nowotworu alfa (TNF $\alpha$ , *tumour necrosis factor alpha*) istotnie koreluje z krwawieniami do guza w gruczolakach przysadki. Indukuje on krwawienie do guzów przysadki poprzez zwiększenie ekspresji VEGF i MMP-9. Na podstawie tych obserwacji sformułowano wnioski, że TNF- $\alpha$  może odgrywać rolę w rozwoju krwawień w obrębie gruczolaków przysadki [21].

Hormony płciowe także wpływają na angiogenezę — estrogeny mogą prowadzić zarówno do zwiększenia, jak i zmniejszenia transkrypcji genu VEGF, po kastracji obserwowano zmniejszenie się unaczynienia prostaty [1].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu uczestniczy w patogenezie cukrzycy. Nefropatia cukrzycowa jest chorobą mikronaczyniową rozwijającą się w wyniku nakładania się zaburzeń hemodynamicznych i metabolicznych. Przypuszcza się, że czynniki angiogeniczne mogą tłumaczyć zmiany naczyniowe i patomorfologiczne obserwowane w nefropatii cukrzycowej,

jednak analiza ich patofizjologii wykazała, że ich wpływ na kłębuszki nerkowe jest bardzo zróżnicowany i wykracza poza angiogenezę [22]. Wykazano podwyższenie ekspresji mRNA i białka VEGF w nerkach u chorych z nefropatią cukrzycową, co prawdopodobnie pomaga odbudować strukturę nerek i zachować ich integralność [22, 23]. Szczególnie obfitą ekspresję VEGF stwierdzono w kłębuszkach nerkowych i podocytach. Do zmian w układzie VEGF w nerkach dochodzi we wczesnym stadium cukrzycy. We wczesnym okresie cukrzycy typu 1 następuje wzrost osoczowego stężenia VEGF, czego nie obserwuje się już u chorych z proteinurią czy też z obniżoną filtracją kłębkową [17, 22]. Do niedokrwienia, a co się z tym wiąże niedotlenienia tkanek i angiogenezy, dochodzi w retinopatii cukrzycowej [7, 24], będącej jedną z przyczyn ślepoty. Na rozwój retinopatii cukrzycowej wpływa również stężenie cytokin zapalnych, takich jak interleukiny 1b (IL-1b) i 6 (IL-6), TNF $\alpha$  i VEGF [25]. Wywołanie u szczurów cukrzycy streptozotocyną współlistniało ze zwiększeniem ekspresji mRNA i białka VEGF i KDR w nerkach, przy czym KDR zwiększało się w pierwszych 3 tygodniach rozwoju cukrzycy, a później wracało do wartości wyjściowych. Natomiast *in vitro* w liniach szczurzych komórek mezangialnych dowiedziono, że glukoza w wysokim stężeniu bezpośrednio zwiększa ekspresję VEGF [17].

## VEGF i angiogeneza w onkologii

Obserwację, że angiogeneza występuje dookoła guza nowotworowego, poczyniono już przed 100 laty [26], a hipotezę, że guz produkuje rozpuszczalne substancje angiogenne postawiono w 1968 roku [27]. W późniejszych latach Folkman sugerował, że wzrost guza i jego przerzuty zależą od angiogenezy, a jej zablokowanie może być jedną ze strategii hamujących wzrost guza [28]. Mutacje w obrębie protoonkogenów prowadzą do niekontrolowanej produkcji czynników wzrostowych, w tym czynników o działaniu angiogennym. Przykładowo mutacje genów *ras* i *p53* zwiększają ekspresję VEGF [23]. Wykazano, że komórki tkanek w stadium przednowotworowym wymagają nabycia zdolności angiogennej, by stać się komórkami rakowymi, oraz że bez naczyń krwionośnych guzy nie mogą rosnąć i dawać przerzutów [7, 29, 30]. Naczynia guza charakteryzują się nieprawidłową strukturą i funkcją. W przeciwieństwie do prawidłowych naczyń ich rozkład jest chaotyczny, średnica nieadekwatna do potrzeb, mają nieregularny przebieg, liczne połączenia, przerwy w ścianie (fenestracje, brak ciągłości, brak błony podstawnej), są nadmiernie rozgałęzione i przepuszczalne. Jest to wynik zaburzenia równowagi pomiędzy regulatorami angiogenezy. W konsekwencji przepływ krwi przez guz jest chaotyczny, co prowadzi do niedokrwienia, a następnie

do niedotlenienia i kwasicy części obszarów guza. Takie warunki uniemożliwiają uzyskanie właściwego stężenia leków w niektórych jego obszarach, wpływają na brak skuteczności terapii, zmieniają produkcję aktywatorów i inhibitorów angiogenezy, sprzyjają przerzutowaniu [7, 29, 31]. W guzach z naczyniami o małej przepuszczalności stwierdzono nadekspresję angiopoetyny 1 (Ang-1) i/lub niską ekspresję VEGF, natomiast w guzach z wysoką przepuszczalnością naczyń nie stwierdza się ekspresji Ang-1 lub obserwuje się nadekspresję jego antagonisty Ang-2. Nasilenie przepuszczalności naczyń i angiogenezy zależą od typu guza i organu, w którym on rośnie, gdyż każdy narząd posiada odmienne środowisko otaczające guz. Niedotlenienie sprzyja ekspansji komórek monoklonalnych, które utraciły zdolność do zareagowania na niedotlenienie apoptozą [7, 29]. Hipoksja nie zawsze prowadzi do ekspresji VEGF w tkankach nowotworów, gdyż powstaje on również w warunkach od niej niezależnych [32]. Pro- i antyangiogenne molekuly są syntetyzowane także w komórkach otaczających tkankę nowotworową [33]. Naciekające guz i jego otoczenie monocyty, komórki tuczne, limfocyty są istotnym źródłem czynników angiogennych, w tym VEGF [34]. Odpowiednie ukrwienie guza i zwiększenie przepuszczalności naczyń, głównie przez VEGF, ułatwia dotarcie komórkom nowotworowym do przestrzeni pozakomórkowej i krwioobiegu [30, 35], a w konsekwencji prowadzi do zainicjowania procesu powstania przerzutów [36].

Udział angiogenezy i VEGF w patogenezie choroby nowotworowej opisano w wielu pracach [16, 30, 31, 37, 38]. Obecność VEGF stwierdzono w raku tarczycy [10, 39], oskrzela, żołądka, jelita grubego, sutka, jajnika, nerki, pęcherza moczowego [39]. Ekspresję mRNA VEGF wykazano w złośliwych guzach mózgu, przełyku, żołądka, okrężnicy, wątroby, sutka, jajnika, nerek, pęcherza moczowego [23, 40]. Wysokie stężenie tego czynnika we krwi stwierdzono u chorych z rakiem przełyku [41], jelita grubego, piersi [42], jajnika [43], macicy [44], kości [45], hormonoopornym rakiem prostaty [46], choć zaobserwowano też, że stężenie VEGF we krwi naczyń drenażujących guz nowotworowy mieści się w granicach normy [47]. Stopień ekspresji VEGF powiązano z agresywnością guza i rokowaniem u chorych z rakiem macicy, jajnika [32], sutka [1, 32, 48], żołądka [49], czerniakiem [50], nowotworami głowy i szyi [32], niedrobnokomórkowym rakiem płuca [1]. Podobnie, wysoka ekspresja VEGF współlistnieje z gorszą przeżywalnością i zwiększonym prawdopodobieństwem nawrotu złośliwych nowotworów okrężnicy, odbytnicy i nerki [32]. Z użyciem metod RT-PCR i hybrydyzacji *in situ* dowiedziono, że inwazyjne guzy okrężnicy cechuje większa ekspresja VEGF w porównaniu ze stanami przednowotworowymi [51]. Ekspresja mRNA VEGF w raku jelita

grubego koreluje z jego progresją [52]. Ponadto stwierdzono zależność ekspresji VEGF i KDR w tkankach raka okrężnicy od stopnia unaczynienia guza, obecności przerzutów i nasilenia proliferacji komórek nowotworowych [53]. W raku sutka, żołądka i pęcherza moczowego wykazano, że narastanie angiogenezy w obrębie guza (ocenione jako MVD) [17] wiąże się z rozwojem przerzutów, gorszym rokowaniem, krótszym czasem przeżycia [54]. Ekspresja mRNA VEGF w tkance raka sutka jest większa w porównaniu z ekspresją w tkance otaczającej, a jej wysokie poziomy korelują z gorszym rokowaniem niezależnie od obecności przerzutów w sąsiadujących węzłach chłonnych. Ilość białka VEGF w tkance raka przewodowego sutka wykazuje zależność od gęstości naczyń krwionośnych. Stwierdzono też cykliczną, zależną od fazy cyklu miesięcznego (modulowaną przez wpływ estrogenów na EC) zmienność ekspresji VEGF w komórkach sutka i komórkach raka sutka [48]. W przypadku raka sutka liczba przerzutów zależy od ekspresji VEGF i KDR, ale nie od Flt-1 [35]. Wykryto też obecność Flt-1 i KDR w komórkach raka jajnika [55]. U chorych z rakiem płuca (płaskokomórkowym) stwierdzono odwrotną korelację pomiędzy apoptozą i angiogenezą, czyli pomiędzy parametrami proapoptotycznymi (Fas, kaspaza-3) i angiogennymi (VEGF, MVD) [56]. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że w keratynocytach, fibroblastach i kapilarach oraz w nowotworach skóry (np. czerniak) całodobowa hipoksja zwiększa sekrecję VEGF, stymuluje Flt-1 i (przeciwnie do większości tkanek) hamuje KDR [57]. W badaniach *in vitro* ekspresja genu VEGF jest większa w wielu liniach komórkowych nowotworów i w guzach nowotworowych mózgu, przewodu pokarmowego, wątroby, nerek w porównaniu ze zdrowymi tkankami [58–61]. *In vitro* dowiedziono, że synteza VEGF indukowana przez zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) i naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) ulega zahamowaniu o 50% po podaniu analogów somatostatyny. Analogi te hamują ekspresję VEGF w guzach okrężnicy i odbytnicy, co współlistnieje ze zmniejszeniem surowiczego stężenia VEGF [17]. W najnowszych badaniach ekspresja VEGF oceniona z zastosowaniem metody mikromacierzy była większa w pierwotnych złośliwych nowotworach głowy, szyi, sutka, przelyku, okrężnicy, odbytnicy, jajnika, szyjki macicy, nerki, skóry i białych ciałek krwi w porównaniu z odpowiednimi zdrowymi tkankami. Tkanki złośliwych nowotworów płuc, jajnika i tarczycy, w których stwierdzono obecność czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ , *hypoxia-inducible factor-1 alpha*), wykazywały równocześnie wyższą ekspresję VEGF. Jednak nie w każdej zmianie nowotworowej obserwowano tę ekspresję. Badania z użyciem mikromacierzy DNA wykazały, że jest ona zmniejszona w tkankach łągodnego

przerostu prostaty, a spośród pierwotnych nowotworów złośliwych w tkankach układu limfatycznego, prostaty, żołądka, jądra. Autorzy tych spostrzeżeń zwrócili uwagę na sposób dobierania tkanek kontrolnych. Zauważyli, że tkanki kontrolne pochodzące z marginesu zmiany nowotworowej mogą uczestniczyć w mechanizmach parakrynnego oddziaływania, np. tkanka otaczająca tkankę raka jądra często wykazuje zmiany histopatologiczne. Nie stwierdzono natomiast różnicy w ekspresji VEGF pomiędzy tkanką zdrową a tkanką otaczającą raka okrężnicy, jajnika, sutka, płuc, szyjki macicy [32]. Częstym modelem doświadczalnym i równocześnie jednym z nowotworów, na których rozwój i przerzutowanie wpływają angiogeneza i VEGF, jest pierwotny rak wątroby, powstający na podłożu przewlekłego zapalenia, a następnie marskości wątroby [30, 40, 62, 63]. Pierwotny rak wątroby (HCC, *hepatocellular carcinoma*) jest guzem dobrze unaczynionym [30, 31], a unaczynienie to prawdopodobnie zależy od rozmiaru guza i od stopnia zróżnicowania histologicznego. W HCC o średnicy powyżej 2 cm naczynia tętnicze i sieć naczyń włosowatych są dobrze rozwinięte, a guz jest widoczny w badaniu angiograficznym w przeciwieństwie do małych guzów [40]. Istnieją też opinie, że nadmierne unaczynienie jest charakterystyczne dla HCC bez względu na stopień jego zróżnicowania [64], a MVD jest podobne w guzach mniejszych niż 5 cm i większych, jednak większe w tych, które współlistnieją z przerzutami [65]. Ekspresję VEGF w tkankach HCC i przerzutach innych nowotworów do wątroby widać zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [30, 31, 40, 62, 65–67]. Yamaguchi i wsp. [40], stosując technikę RT-PCR, wykazali, że ekspresja VEGF w HCC ściśle wiąże się ze stopniem zróżnicowania histologicznego guza — w dobrze zróżnicowanych guzach była najwyższa (w 100% komórek guza) w porównaniu z guzami umiarkowanie zróżnicowanymi (88%) i słabo zróżnicowanymi (67%). Przeciwną zależność zanotowali Yao i wsp. [65]. Stwierdzono nadekspresję mRNA [67] i białka VEGF [67, 68] w tkankach HCC w porównaniu ze zdrowymi. W niektórych pracach opisywano wyższą ekspresję VEGF w HCC w porównaniu z tkanką marską wątroby [65, 67], a w innych pracach niższą [69]. Ekspresja VEGF koreluje dodatnio z MVD, wielkością guza [65], ze wzrostem komórek HCC, zwiększaniem objętości guza i formowaniem jego torebki [23], naciekiem na torebkę [69], powstawaniem wewnątrzwątrobowych przerzutów [65, 69]. Ekspresja ta wykazuje zależność od indeksu mitotycznego HCC, a nie koreluje z profilem biochemicznym, stężeniem  $\alpha$ -fetoproteiny, zaawansowaniem stanu zapalnego, płcią i stopniem klinicznym marskości wątroby [23]. Wysoka ekspresja mRNA i białka VEGF w bioptowanych i resekowanych tkankach HCC współlistniała natomiast z gorszym rokowaniem [69–71]. Surowicze stężenie VEGF koreluje ze stężeniem białka VEGF w cy-

tozolu guza i ekspresją mRNA VEGF w guzie, wartości te były wyższe w bardziej zaawansowanym stadium rozwoju HCC [72]. Dostarczenie genu VEGF do HCC szczurów w badaniach *in vivo* skutkowało nadekspresją VEGF, wzrostem guza, nasileniem angiogenezy, a ograniczenie ekspresji VEGF prowadziło do zahamowania wzrostu guza [73]. *In vitro* w linii komórek raka wątroby (HepG2) stwierdzono ekspresję VEGF<sub>121</sub> i nadekspresję VEGF<sub>165</sub> [74]. W kolejnym badaniu zanotowano wysoką ekspresję mRNA VEGF w 52% HCC. Wykazano również ekspresję mRNA Flt-1 w 68% HCC, jej różnicę w stosunku do tkanek niezmiennych oraz dodatnią korelację między ilością mRNA Flt-1 a mRNA VEGF. Ze względu na fakt ujemnej korelacji MVD ocenionej immunohistochemicznie z użyciem przeciwciał CD34) z wielkością guza uznano, że ocena angiogenezy przez pomiar MVD i ekspresji VEGF ma prawdopodobnie większe znaczenie w odniesieniu do mniejszych rozmiarów HCC i jego przerzutów [75]. Wydaje się jednak, że taka sytuacja może wynikać z wolniejszego, w stosunku do progresji wielkości guza, rozwoju jego unaczynienia (MVD). Ekspresję mRNA KDR i mRNA Flt-1 wykryto odpowiednio w 100% i 79% tkanek HCC oraz w 29% i 36% tkanek sąsiednich i stwierdzono różnicę w ilości KDR mRNA w HCC w stosunku do tkanki nienowotworowej [76]. Ilość mRNA VEGF była 3,1 raza większa od ilości mRNA bFGF w komórkach HCC szczurów, a indukowany przez bFGF wzrost guza zlikwidowano z użyciem przeciwciał neutralizujących KDR, co wskazuje, że bFGF wpływa na rozwój HCC i angiogenezę synergicznie z VEGF i jest mediatorem jego działania [77]. Możliwe, że bFGF uczestniczy w inwazji HCC do tkanek otaczających guz [23]. U chorych z HCC stwierdzano bardzo wysokie stężenia VEGF we krwi w porównaniu z ludźmi zdrowymi, z przewlekłym zapaleniem wątroby i marskością wątroby [65, 78]. U osób z wtórnym rakiem wątroby (z przerzutami do wątroby) surowicze stężenia VEGF były wyższe (średnio 503 pg/ml) niż w grupie z chorobą nowotworową bez przerzutów do wątroby (średnio 205 pg/ml) i u ludzi zdrowych (średnio 201 pg/ml) [79]. Przedoperacyjne stężenia VEGF w surowicy były wyższe u tych chorych z HCC, u których po zabiegu doszło do nawrotu choroby [80]. Angiogeneza wiąże się ściśle z przerzutowaniem i nawrotem HCC. W modelu doświadczalnym porównanie wysoce metastatycznego ludzkiego HCC (LCI-D20) z HCC rzadko dającym przerzuty (LCI-D35) wykazało, że w tym pierwszym przypadku dochodzi do rozwoju naczyń w guzie. Stwierdzono, że surowicze stężenia VEGF, międzykomórkowej molekule adhezyjnej 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*), tkankowego aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*) korelowały dodatnio z inwazyjnością i zdolnością do przerzutowania HCC [81]. Pewną rolę w progresji HCC może odgrywać czynnik

tkankowy (TF, *tissue factor*) [82], gdyż w stanach hipoksji zwiększa się stężenie TF i VEGF [83], a TF zwiększa ekspresję VEGF [82]. Ocena MVD oraz ekspresji VEGF w HCC może pomóc w prognozowaniu jego przebiegu klinicznego. Trwają poszukiwania innych markerów prognostycznych. W mikromacierzy z materiałem HCC oceniono 153 geny i zaobserwowano bardzo wyraźną ekspresję osteopontyny w HCC dającym przerzuty. Układa się to w logiczną całość ze spostrzeżeniem, że przeciwciała przeciw osteopontynie *in vitro* hamowały inwazję komórek HCC, a *in vivo* u myszy hamowały przerzutowanie do płuc [81].

Bogato unaczynione są hormonalnie czynne guzy przewodu pokarmowego (GEP NET, *gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*) [84, 85]. W guzach neuroendokrynych wykazano silną ekspresję VEGF, Flt-1 i KDR w stosunku do niezmiennych tkanek otaczających [86].

## Terapia angiogenna i antyangiogenna

W zależności od rodzaju jednostki chorobowej bądź też stopnia jej zaawansowania podejmuje się próby zastosowania terapii angiogennej i antyangiogennej.

Terapia angiogenna opiera się na metodach dostarczenia VEGF do niedokrwionych i niedotlenionych tkanek — wstrzyknięciu rekombinowanego białka VEGF do tętnicy odżywiającej niedotlenioną tkankę oraz podaniu cDNA VEGF do obszaru niedokrwienia w celu pobudzenia powstawania nowych naczyń krwionośnych. Nowe naczynia mogą jednak być bardziej przepuszczalne, mieć niejednorodną strukturę i chaotyczny przebieg. Nie ma pewności, czy tak zmieniona morfologia naczyń prowadzi do poprawy mikrokrążenia. W terapii genowej znajdują zastosowanie m.in. wektory wirusowe lub plazmidy [29, 87]. Z podawaniem egzogenego VEGF [także w połączeniu z czynnikiem wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*)] wiąże się nadzieje w leczeniu chorych z uszkodzeniem wątroby w przebiegu jej ciężkich zapaleń [88] i marskości. Wykazano, że dostarczenie plazmidu z VEGF do marskiej wątroby szczurów indukuje w niej formowanie fenestracji i obniża ciśnienie w żyłę wrotnej [87].

Terapia antyangiogenna (najczęściej traktowana jako jedna z form terapii przeciwnowotworowej) opiera się na:

- hamującym oddziaływaniu z proangiogennymi ligandami i ich receptorami;
- pobudzeniu lub dostarczeniu inhibitorów angiogenezy;
- bezpośrednim niszczeniu unaczynienia guza [20, 29–31, 36, 63, 89–94].

Podanie *in vivo* VEGF zwiększyło formowanie nowych kapilar o 236%, a zastosowanie antysensownych

oligonukleotydów Flt-1 lub KDR przed podaniem VEGF zwiększyło formowanie nowych kapilar zaledwie o 85% [95]. Rekombinowane rozpuszczalne receptory sFlt-1 i sKDR hamują *in vivo* angiogenezę w siatkówce, ciałku żółtym i guzach nowotworowych, a transfekcja (z użyciem retrowirusa) zmutowanego receptora KDR hamuje transdukcję sygnału VEGF i wzrost wielopostaciowego glejaka. Ekspresja sFlt-4 hamuje limfangiogenezę u embrionów myszy. Trwają próby kliniczne terapii antyangiogennej u osób z chorobą von Hippel-Lindau [1] i naczyniakami wątroby (bewacyzumab) [89]. Eksperymentalna ocena substancji antyangiogennych, jak suramin, TNP-470, endostatyna, interferon alfa (IFN $\alpha$ ), wykazała ich skuteczność w hamowaniu przerzutów ludzkiego HCC [81], jednak stwierdzono też, że przeciwciała anti-KDR w nieznanym stopniu ograniczają regenerację wątroby [96]. Zakończone niedawno badania kliniczne nad sorafenibem — inhibitorem kinazy VEGF — potwierdziły jego przydatność w leczeniu nawet zaawansowanych postaci HCC [31, 63]. Praktyczne zastosowanie znalazły już monoklonalne przeciwciała anti-VEGF (bewacyzumab, ranibizumab) [30, 36, 89, 90, 92–94], np. u chorych przerzutami raka jelita grubego do wątroby [89, 90]. Wprawdzie istniały wcześniej wątpliwości, czy ich podawanie (w połączeniu z chemioterapią) nie zmniejszy zdolności regeneracyjnych wątroby po leczeniu operacyjnym (embolizacji) przerzutów, jednak zostały one rozwiane [90]. Bewacyzumab jest rekombinowanym ludzkim monoklonalnym przeciwciałem, którego celem jest VEGF. Dołączenie bewacyzumabu do chemioterapii poprawiło przeżycie wolne od progresji w pierwszo- i drugoliniowej terapii u chorych w zaawansowanym stadium raka piersi. Badania kliniczne mające na celu ocenę użyteczności bewacyzumabu w leczeniu choroby przerzutowej nadal trwają [36]. Alternatywną strategię leczenia włóknienia wątroby i HCC mogą stanowić często stosowane w praktyce klinicznej i niedające istotnych objawów niepożądanych inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE, *angiotensin-converting enzyme*) i blokery receptora angiotensynowego 1. Układ renina–angiotensyna często ulega aktywacji u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby, a angiotensyna II wykazuje działanie proangiogenne i indukuje VEGF. Inhibitory ACE będące jednocześnie inhibitorami angiogenezy i wzrostu eksperymentalnego HCC wywołują supresję syntezy/wydzielania VEGF [97]. Ponadto w procesie włóknienia wątroby angiotensyna II stymuluje produkcję tkankowych inhibitorów metaloproteinaz 1 (TIMP-1, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) w aktywowanych komórkach gwiazdzistych, komórkach Ito (HSC, *hepatic stellate cells*) i proliferację HSC, a inhibitory ACE (enalapryl, peryndopryl) działają przeciwnie [97–99]. Antyangiogenne właściwości wykazuje IFN $\alpha$ , który hamuje migrację komórek endotelialnych *in vitro* [100] i *in vivo*

[101], ogranicza aktywność molekuł zaangażowanych w odpowiedź angiogenną (np. bFGF, IL-8 i MMP-3) [86], obniża ekspresję VEGF w wielu typach ludzkich komórek nowotworowych [86, 102], wywołuje apoptozę w komórkach endotelialnych naczyń przerzutów raka okrężnicy do wątroby, w następstwie czego obserwuje się zahamowanie podziałów komórek guza [103]. Interferon  $\alpha$  wykazuje pewną skuteczność u chorych z naczyniakami krwionośnymi [104, 105], mięsakiem Kaposiego [104], HCC [106] oraz guzami GEP NET [84, 86]. Zastosowanie IFN u chorych z GEP NET doprowadziło do obniżenia stężenia VEGF w osoczu oraz redukcji poziomów mRNA VEGF i gęstości naczyń krwionośnych w materiale uzyskanym podczas biopsji przerzutów tych guzów do wątroby. Również *in vitro* na kilkunastu liniach komórkowych guzów neuroendokrynych wykazano, że IFN $\alpha$  hamuje aktywność transkrypcyjną genu VEGF. Jest on jednym z nielicznych dotąd poznanych czynników skutecznie hamujących transkrypcję genu VEGF. Stwierdzono nawet, że surowicze stężenia VEGF mogą być markerem pomocnym w optymalizacji terapii IFN $\alpha$  — przewidującym odpowiedź na leczenie, czas jego trwania i stosowane dawki IFN $\alpha$  [86].

Wandetanib jest doustnym aktywnym antagonistą VEGFR2, receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1 lub ErbB1) i kinazy RET. Lek ten jest obecnie zarejestrowany w Stanach Zjednoczonych do leczenia przerzutów raka rdzeniastego tarczycy [91]. Zmiany stężeń rozpuszczalnego VEGFR2 po rozpoczęciu terapii prognozowały odpowiedź na notesanib u chorych zaawansowanym zróżnicowanym rakiem tarczycy lub z przerzutowym rdzeniastym rakiem tarczycy. Niższe wyjściowe stężenie VEGF były związane z dłuższym przeżyciem wolnym od progresji [107]. Wyniki najnowszych badań klinicznych sugerują rolę blokerów układu renina–angiotensyna–aldosteron (inhibitorów ACE i antagonistów receptora angiotensyny II) i fenofibratu w ograniczaniu progresji i/lub indukowaniu regresji łagodnej lub umiarkowanej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. Doszkliskowe podawanie leków hamujących VEGF ma działanie ochronne przed utratą wzroku w bardziej zaawansowanych stadiach retinopatii cukrzycowej, zwłaszcza w obręku płamki [94]. Należy rozważyć stosowanie ranibizumabu (wiąże się i hamuje wiele podtypów VEGF A) u pacjentów z cukrzycowym obrzękiem płamki [92, 93].

## Podziękowania

W pracy wykorzystano informacje i materiały zgromadzone podczas realizacji grantów sfinansowanych przez: Komitet Badań Naukowych (KBN; Polska): 3P05B03123, 3P05B05322 i Śląski Uniwersytet Medyczny:

NN2-193/07, NN2-121/08 i opublikowane w rozprawie habilitacyjnej autorstwa Dariusza Kajdaniuka: ISBN 978-83-7509-108-3, ISSN 1689-6262.

## Piśmiennictwo

- Turner HE, Harris AL, Melmed S et al. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 2003; 24: 600–632.
- Sato K, Yamazaki K, Shizume K et al. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest* 1995; 96: 1295–1302.
- Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol* 2000; 166: 475–480.
- Nagura S, Katoh R, Miyagi E et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-1 (Flt-1) in Graves disease possibly correlated with increased vascular density. *Hum Pathol* 2001; 32: 10–7.
- Klein M, Picard E, Vignaud JM et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 1999; 161: 41–49.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.
- Goth MI, Hubina E, Raptis S et al. Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 98–106.
- Fenton C, Patel A, Dinan C et al. The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid* 2000; 10: 349–357.
- Soh EY, Duh QY, Sobhi SA et al. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3741–3747.
- Capp C, Wajner SM, Siqueira DR et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20: 863–871.
- Salajegheh A, Smith RA, Kasem K et al. Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression of VEGF-A in papillary thyroid carcinoma: potential markers for aggressive phenotypes. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 93–99.
- Nersita R, Matrone A, Klain M et al. Decreased serum vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) levels in metastatic patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04183.x
- Cristina C, Perez-Millan MI, Luque G et al. VEGF and CD31 association in pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2010; 21: 154–160.
- McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4238–4244.
- Renner U, Lohrer P, Schaaf L et al. Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3759–3765.
- Marek B, Kajdaniuk D, Kos-Kudła B et al. Acromegaly and the risk of cancer. *Pathophysiology* 2001; 8: 69–75.
- Garcia de la Torre N, Wass JAH, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogs. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57: 425–441.
- Yarman S, Kurtulmus N, Canbolat A et al. Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth hormone-secreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior? *Neuro Endocrinol Lett* 2010; 31: 823–828.
- Miyajima K, Takekoshi S, Itoh J et al. Inhibitory effects of anti-VEGF antibody on the growth and angiogenesis of estrogen-induced pituitary prolactinoma in Fischer 344 rats: animal model of VEGF-targeted therapy for human endocrine tumors. *Acta Histochem Cytochem* 2010; 43: 33–44.
- Luque GM, Perez-Millán MI, Ornstein AM et al. Inhibitory effects of antivascular endothelial growth factor strategies in experimental dopamine-resistant prolactinomas. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 766–774.
- Xiao Z, Liu Q, Mao F et al. TNF- $\alpha$ -induced VEGF and MMP-9 expression promotes hemorrhagic transformation in pituitary adenomas. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 4165–4179.
- Khoury CC, Ziyadeh FN. Angiogenic factors. *Contrib Nephrol* 2011; 170: 83–92.
- Shi B, Wang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factors and liver diseases. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1145–1148.
- Paleolog EM, Young S, Stark AC et al. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1258–1265.
- Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med (Plovdiv)* 2011; 53: 44–50.
- Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907; 2: 1236–1240.
- Ehrmann RL, Knott M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 1329–1341.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27–31.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature* 2000; 407: 249–257.
- Pircher A, Medinger M, Dreves J. Liver cancer: Targeted future options. *World J Hepatol* 2011; 3: 38–44.
- Zhu AX, Duda DG, Sahani DV et al. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 292–301.
- Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM et al. Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ , and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* 2004; 57: 504–512.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94: 715–725.
- Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E et al. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor  $\beta$ -1. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 271–278.
- Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 165–176.
- Goldfarb SB, Hudis C, Dickler MN. Bevacizumab in metastatic breast cancer: when may it be used? *Ther Adv Med Oncol* 2011; 3: 85–93.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442–447.
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 385–392.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4–25.
- Yamaguchi R, Yano H, Iemura A et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 68–77.
- Shimada H, Takeda A, Nabeya Y et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663–669.
- Broll R, Erdmann H, Duchrow M et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) — a valuable serum tumor marker in patients with colorectal cancer? *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 37–42.
- Oehler MK, Caffier H. Prognostic relevance of serum vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 5109–5112.
- Gornall RJ, Anthony FW, Coombes EJ et al. Investigation of women with endometrial carcinoma using serum vascular endothelial growth factor (VEGF) measurement. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 164–166.
- Holzer G, Obermair A, Koschat M et al. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 601–604.
- George DJ, Halabi S, Shepard TF et al. Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1932–1936.
- Salgado R, Benoy I, Weytjens R et al. Arteriovenous gradients of IL-6, plasma and serum VEGF and D-dimers in human cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 1437–1444.
- Dabrosin C. Variability of vascular endothelial growth factor in normal human breast tissue in vivo during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2695–2698.
- Maeda K, Chung YS, Ogawa Y et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858–863.
- Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 1997; 76: 930–934.
- Wong MP, Cheung N, Yuen ST et al. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumor progression. *Int J Cancer* 1999; 81: 845–850.
- Ishigami SI, Arai S, Furutani M et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379–1384.
- Takahashi Y, Kitada Y, Bucana CD et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964–3968.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1–8.
- Boock CA, Chermock-Jones DS, Sharkey AM et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 506–516.



56. Volm M, Mattern J, Koomagi R. Inverse between apoptotic (Fas ligand, caspase-3) and angiogenic (VEGF, microvessel density) in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res*. 1999; 19: 1669–1671.
57. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br J Cancer* 1998; 77: 897–902.
58. Plate KH, Breier G, Weich HA et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845–848.
59. Brown LF, Berse B, Jackman RW et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 4727–4735.
60. Brown LF, Berse B, Jackman RW et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255–1262.
61. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3004–3009.
62. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhosis liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554–1562.
63. Zender L, Kubicka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Onkologie* 2008; 31: 550–555.
64. Sugimachi K, Tanaka S, Terashi T et al. The mechanism of angiogenesis in hepatocellular carcinoma: angiogenic switch during tumor progression. *Surgery* 2002; 131 (Suppl 1): S135–S141.
65. Yao DF, Wu XH, Zhu Y et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220–226.
66. Nanashima A, Ito M, Sekine I et al. Significance of angiogenic factors in liver metastatic tumors originating from colorectal cancers. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2634–2640.
67. Marschall Z, Cramer T, Hocker M et al. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001; 48: 87–96.
68. Brodsky SV, Mendeleev N, Melamed M et al. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 373–377.
69. Deli G, Jin CH, Mu R et al. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 960–963.
70. Claudio PP, Russo G, Kumar CACY et al. pRb2/p130, vascular endothelial growth factor, p27(KIP1), and proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3509–3517.
71. Jeng KS, Sheen IS, Wang YC et al. Is the vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in resectable hepatocellular carcinoma of prognostic value after resection? *World J Gastroenterol* 2004; 10: 676–681.
72. Poon RTP, Lau CPY, Cheung ST et al. Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63: 3121–3126.
73. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J et al. Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1998; 28: 1489–1496.
74. Sawant S, Aparicio S, Tink AR et al. Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 408–413.
75. Ng IO, Poon RT, Lee JM et al. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 838–845.
76. Shimamura T, Saito S, Morita K et al. Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 640–646.
77. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 834–842.
78. Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I et al. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1998; 33: 376–382.
79. Miyashita M, Tajiri T, Yanagi K et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and endostatin in human metastatic liver tumors. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 308–309.
80. Chao Y, Li CP, King KL et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 355–362.
81. Ye SL. Research on recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 (suppl): S264–S265.
82. Dupuy E, Hainaud P, Villemain A et al. Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in transgenic mouse model. *J Hepatol* 2003; 38: 793–802.
83. Fang J, Yan L, Swing Y et al. HIF-1 alpha-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 5731–5735.
84. Oberg K. Interferon in the management of neuroendocrine GEP-tumors: a review. *Digestion*. 2000; 62 (suppl 1): 92–99.
85. Blicharz-Dorniak J, Kos-Kudła B, Kudła M et al. Polypeptide growth factors in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endokrynol Pol* 2007; 58: 42–50.
86. Marschall Z, Scholz A, Cramer T et al. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 437–448.
87. Xu H, Shi BM, Lu XF et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2349–2357.
88. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K et al. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 121–130.
89. Mahajan D, Miller C, Hirose K et al. Incidental reduction in the size of liver hemangioma following use of VEGF inhibitor bevacizumab. *J Hepatol* 2008; 49: 867–870.
90. Zorzi D, Chun YS, Madoff DC et al. Chemotherapy with bevacizumab does not affect liver regeneration after portal vein embolization in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 2765–2772.
91. Commander H, Whiteside G, Perry C. Vandetanib: first global approval. *Drugs* 2011; 71: 1355–1365.
92. Elman MJ, Bressler NM, Qin H et al. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011; 118: 609–614.
93. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011; 118: 615–625.
94. Porta M, Maldari P, Mazzaglia F. New approaches to the treatment of diabetic retinopathy. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 784–790.
95. Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF et al. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol* 2002; 282: H194–H204.
96. Van Buren G 2nd, Yang AD, Dallas NA et al. Effect of molecular therapeutics on liver regeneration in a murine model. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1836–1842.
97. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y et al. Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2749–2754.
98. Moreno M, Ramalho LN, Sancho-Bru P et al. Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; doi: 00462.2007v1.
99. Turkyay C, Yonem O, Arici S et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 789–793.
100. Brouty-Boye D, Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 1980; 208: 516–518.
101. Sidky YA, Borden E. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 1987; 47: 5155–5161.
102. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K et al. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2726–2734.
103. Ozawa S, Shinohara H, Kanayama HO et al. Suppression of angiogenesis and therapy of human colon cancer liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. *Neoplasia* 2001; 3: 154–164.
104. Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon-alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1198–1205.
105. Palmieri G, Montella L, Martignetti A et al. Interferon alpha-2b at low doses as long-term antiangiogenic treatment of a metastatic intracranial hemangioendothelioma: a case report. *Oncol Rep* 2000; 7: 145–149.
106. Patt S, Sampaolo S, Theallier-Janko A et al. Cerebral angiogenesis triggered by severe chronic hypoxia displays regional differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 801–806.
107. Bass MB, Sherman SI, Schlumberger MJ et al. Biomarkers as predictors of response to treatment with motesanib in patients with progressive advanced thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 5018–5027.