



Assessment of pro- and antyangiogenic factors blood serum concentrations in patients with hormonal inactive adrenal tumors

Marzena Korzeniewska², Krzysztof Kołomecki¹, Henryk Stępień³, Maciej Naze¹, Tomasz Stępień¹, Krzysztof Kuzdak¹

¹ Department of General and Endocrinological Surgery, Medical University, Łódź

² Department of Anesthesiology and Intensive Care, Regional Specialistic Hospital, Łódź

³ Institute of Endocrinology, Medical University of Łódź

Abstract

Introduction: The growth and persistence of solid tumors and their metastases is connected with angiogenesis. This process is determined by activity of pro- and antyangiogenic factors. VEGF is the one of the most important factors having a stimulant effect on angiogenesis. Soluble forms of VEGF receptors are inhibitors of angiogenesis. The soluble forms of VEGF receptors containing extra cellular part of receptor, which binds ligand, seem to be real inhibitors of VEGF.

The aim of the study: Evaluation the value of serum VEGF and soluble forms of VEGF receptors concentration as a marker of malignancy in patients with hormonal inactive adrenal tumors.

Material and methods: Twenty seven patients (18 female, 9 male; mean age 48±4.3 years) with adrenocortical carcinoma (N=8), adrenal metastases (N=4) and adrenocortical adenoma (N=15) were included in this study. Age- and gender-matched control samples were acquired from healthy volunteers (N=10). Serum VEGF and sVEGFR levels were determined by means of ELISA assay.

Statistical analysis was performed using the Student-t test, the Pearson's test and the series test.

Results: In healthy controls mean VEGF level was 197.2 pg/ml, sVEGFR-1 43.5 pg/ml and sVEGFR-2 8976.3 pg/ml. Patients with adrenocortical carcinoma had

the levels of VEGF (1263.8 pg/ml) significantly higher and of sVEGFR-2 (5893.7 pg/ml) significantly lower in comparison to control group ($p<0.05$). On the other hand the mean VEGF (334.2 pg/ml) concentration in patients with benign adrenocortical adenoma wasn't significant different than in control group ($p>0.05$) but mean sVEGFR-1 (21.7 pg/ml) and sVEGFR-2 (7106.4 pg/ml) concentrations were significantly lower than in the control ($p<0.05$). In metastases group mean VEGF (485.9 pg/ml) level was higher and sVEGFR-2 (5455.2 pg/ml) was lower than in control group ($p<0.05$).

Conclusion: These data suggest that determination of VEGF and sVEGFR concentration in the serum of patients with hormonal inactive adrenal tumors may be applied as an additional marker of malignancy.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 39-44)

Key words: angiogenesis, VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2, adrenal tumors



M. Korzeniewska
Kopernik's Memorial Hospital
Department of Anaesthesiology and Intensive Care
ul. Pabianicka 62
93-513 Lodz, Poland



Ocena stężeń wybranych czynników pro i antyangiogennych we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy

Marzena Korzeniewska², Krzysztof Kołomecki¹, Henryk Stępień³, Maciej Naze¹, Tomasz Stępień¹, Krzysztof Kuzdak¹

¹ Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

² Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi

³ Instytut Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Wprowadzenie: Wzrost i rozwój guzów litych i ich przerzutów związany jest z procesem angiogenezy. Aktywność czynników pobudzających i hamujących ten proces decyduje o jego rozwoju. Czynnikiem wzrostu komórek śródbłonna naczyń (VEGF) jest jednym z najważniejszych czynników stymulujących angiogenezę. Do inhibitorów należą min. rozpuszczalne receptory naczyniowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1, sVEGFR-2). Rozpuszczalne receptory VEGF (sVEGFR) zawierające domenę zewnątrzkomórkową receptorów, wiążącą ligand, wydają się być naturalnym antagonistą VEGF.

Cel pracy: Ocena wartości poziomu VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 w surowicy krwi, jako markera złośliwości, u pacjentów z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy.

Materiał i metody: Badaniom zostało poddanych 27 pacjentów (18 kobiet, 9 mężczyzn: średni wiek 48±4,3 lat) z rakiem kory nadnerczy (N=8), z guzem przerzutowym do nadnerczy (N=4) i z gruczolakiem kory nadnerczy (N=15). Próba kontrolna została odpowiednio dobrana pod względem płci i wieku ze zdrowych ochotników (N=10). Poziomy VEGF i sVEGFR w surowicy krwi były oznaczane za pomocą testu ELISA. Statystyczna analiza została przeprowadzona przy użyciu testu t-Studenta, testu korelacji Pearsona i testu serii.

Wyniki: W zdrowej próbie kontrolnej średni poziom VEGF wynosił 197,2 pg/ml, sVEGFR-1 43,5 pg/ml, a sVEGFR-2 8976,3 pg/ml. U pacjentów z rakiem

kory nadnerczy istotnie wyższe były poziomy VEGF (1263,8 pg/ml), a niższe sVEGFR-2 (5893,7 pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,05$). Z drugiej strony u pacjentów z łagodnym gruczolakiem kory nadnerczy poziom VEGF (334,2 pg/ml) nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej ($p>0,05$), natomiast poziom sVEGFR-1 (21,7 pg/ml) i sVEGFR-2 (7106,4 pg/ml) były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ($p<0,05$). W grupie z guzami przerzutowymi poziom VEGF (485,9 pg/ml) były istotnie wyższe, a sVEGFR-2 (5455,2 pg/ml) niższe w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,05$).

Wnioski: Uzyskane wyniki badań sugerują, że oznaczenie poziomu VEGF i sVEGFR w surowicy krwi u pacjentów z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy może być zastosowane jako dodatkowy marker złośliwości guzów nadnerczy.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 39-44)

Słowa kluczowe: angiogeneza, VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2, guzy nadnerczy



M. Korzeniewska
Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego
im. M. Kopernika w Łodzi
ul. Pabianicka 62
93-513 Łódź

Wstęp

Szybki rozwój nowoczesnych technik obrazowania jamy brzusznej (USG, TK, MR) spowodował wzrost liczby przypadkowo wykrytych nieczynnych hormonalnie guzów nadnerczy. Guzy o tym charakterze zwane guzami incydentaloma, mogą być zarówno zmianami łagodnymi, jak i złośliwymi. Przedoperacyjne różnicowanie tych zmian na zmiany łagodne i złośliwe jest bardzo trudne, ponieważ prawidłowe stężenie hormonów nadnerczowych i ich metabolitów nie daje żadnych wskazówek diagnostycznych. Stosowane metody obrazowe dokładnie uwidaczniając położenie guza, nie są w stanie ostatecznie określić charakteru utkania diagnozowanej zmiany [1-4].

Angiogeneza, jako proces powstawania nowych naczyń krwionośnych, leży u podstaw wzrostu i rozwoju guzów litych i ich przerzutów. Sieć nowych naczyń umożliwia odpowiednie zaopatrzenie guza w tlen i w produkty odżywcze [5, 6]. Wzajemny stosunek aktywności czynników pobudzających i hamujących angiogenezę decyduje o stopniu jej rozwoju. Jednym z najważniejszych czynników stymulujących rozwój angiogenezy jest naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Do czynników hamujących angiogenezę należą min. rozpuszczalne receptory naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1 i sVEGFR-2) [5-8]. VEGF działa stymulująco nie tylko na proliferację komórek śródbłonka, ale również na ich migrację. Wzmaga on wzrost przepuszczalności naczyń, umożliwiając przenikanie do przestrzeni pozanaczyniowej plazminogenu i fibrynogenu. Powoduje stymulację aktywatorów plazminogenu odpowiedzialnych za przekształcenie plazminogenu w plazminę, która odślania aktywne centra metaloproteinaz (MMPs) [5, 6, 9, 10]. MMPs, enzymy proteolityczne macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), jako jedyne trawią kolagen typu IV, stanowiący szkielet błony podstawnej naczyń [10, 11]. Rozpuszczalne receptory VEGF (sVEGFR) zawierające domenę zewnątrzkomórkową receptorów, wiążącą ligand, wydają się być naturalnym antagonistą VEGF. Związanie czynnika wzrostu przed jego dotarciem do receptora na powierzchni komórek śródbłonka zapobiega stymulacji tych komórek do ich proliferacji i migracji, a tym samym ogranicza tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Za powstawanie rozpuszczalnych form receptorów odpowiedzialne są dwa różne mechanizmy. Pierwszy mechanizm wymagający proteolizy, ograniczonej do zewnętrznego regionu receptora błonowego (domena zewnątrzkomórkowa wiążąca ligand), nazywany został „shedding” (zrzucenie). W drugim mechanizmie rozpuszczalny receptor (sVEGFR-1) powstaje przez przepisanie sekwencji nukleotydów na molekularne białko przy pomocy mRNA (zawiera informację z domeny wewnątrzkomórkowej) [8, 12, 13]. sVEGFR-1

z dużym prawdopodobieństwem jest negatywnym regulatorem dostępności VEGF (łączy się z VEGF z takim samym powinowactwem jak pełnej długości receptor błonowy). Może też tworzyć heterodimery z receptorami VEGFR-1 i VEGFR-2 znosząc przeniesienie sygnału w komórce [12, 13].

Wydaje się, że metody oceny stopnia rozwoju angiogenezy guzów, w tym także guzów wywodzących się z gruczołów dokrewnych, mogą mieć znaczenie diagnostyczne w różnicowaniu zmian łagodnych i złośliwych [1, 2, 5, 7, 10, 14].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężeń wybranych, przeciwstawnie działających na proces angiogenezy czynników, we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy.

Materiał i metoda

Badaniami objęto grupę 27 chorych w wieku 36 – 72 lata (18 kobiet i 9 mężczyzn) operowanych w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2001 – 2003 z powodu nieczynnych hormonalnie guzów nadnerczy. U żadnego z tych chorych nie występowały kliniczne cechy nadczynności hormonalnej kory ani rdzenia nadnerczy. Guzy te zostały wykryte przypadkowo, w czasie badania USG lub TK, wykonywanych z innych powodów aniżeli podejrzenie istnienia guza nadnercza. U wszystkich chorych wykonano następujące badania hormonalne oceniające czynność hormonalną kory: stężenie ACTH, kortyzolu (profil dobowy) i aldosteronu we krwi, stężenie wolnego kortyzolu w dobowej zbiórce moczu, skrócony test Liddle'a. Celem wykluczenia nadczynności rdzenia nadnerczy u wszystkich chorych zbadano stężenie chromograniny A we krwi. Wyniki wszystkich wykonanych badań były w granicach normy. Stężenie VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 oznaczano przed zabiegiem operacyjnym, w surowicy krwi, metodą immunoenzymatyczną ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), przy użyciu zestawów Quantikine firmy R&D Systems.

Rodzaj guza określono na podstawie badania histopatologicznego usuniętej zmiany. Przypadki raka kory nadnerczy były rozpoznawane według kryteriów histologicznych ujętych w „Zasadach diagnostyki i chirurgicznego leczenia nowotworów w Polsce” [15]. Ze względu na rodzaj utkania usuniętego guza chorych podzielono na trzy grupy.

Grupę I (8 chorych) stanowili chorzy z pierwotnymi rakami kory nadnerczy (bez odległych przerzutów).

Grupę II (4 chorych) stanowili chorzy z guzami przerzutowymi do nadnerczy (3 osoby – przerzut raka płuc, 1 osoba – przerzut raka nerki).

Grupę III (15 chorych) stanowili chorzy z gruczolakami kory.

Grupę kontrolną IV stanowiło 10 zdrowych ochotników w wieku 33 – 68 lat (6 kobiet i 4 mężczyźni).

Analizę statystyczną przeprowadzono posługując się testem t-Studenta dla porównania wartości średnich badanych czynników, testem korelacji Pearsona dla oceny współczynnika korelacji pomiędzy wartościami w poszczególnych grupach badanych oraz testem serii dla porównania całych prób (badane czynniki).

Wyniki

Stężenia VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2 podane są w pg/ml. Przyjęto, że jeżeli poziom istotności jest mniejszy niż 0,05 to różnica jest istotna statystycznie.

Szczegółowe średnie wartości stężeń badanych czynników w poszczególnych grupach chorych przedstawia tabela I

Średnie stężenie VEGF było istotnie wyższe w grupie I (raki) i grupie II (guzy przerzutowe) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie różniło się natomiast istotnie pomiędzy grupą III (gruczolaki) a grupą kontrolną. Średnie stężenie VEGF było istotnie wyższe w grupie I niż w grupie II i III oraz wyższe w grupie II niż w III.

Średnie stężenie sVEGFR-1 było istotnie wyższe w grupie kontrolnej i w obu grupach badanych z guzami złośliwymi (grupa I i II) w porównaniu z grupą III, nie stwierdzono różnicy średnich stężeń sVEGFR-1 pomiędzy grupami chorych I i II. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy średnimi

stężeniami sVEGFR-1 w grupach chorych z guzami złośliwymi (grupa I i II) a grupą kontrolną.

Średnie stężenie sVEGFR-2 nie wykazywało różnic pomiędzy grupami I i II, natomiast było istotnie wyższe w grupie III w stosunku do grupy I i II. We wszystkich grupach badanych tzn. I, II, III stwierdzono istotnie niższą wartość średniego stężenia sVEGFR-2 w stosunku do grupy kontrolnej.

W przypadku stężeń VEGF istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy I do II, III, IV oraz grupę II do IV.

W przypadku stężeń sVEGFR-1 istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy chorych z guzami złośliwymi (grupa I i II) do grupy III (zmiany łagodne).

W przypadku stężeń sVEGFR-2 istotną statystycznie różnicę między próbami stwierdzono porównując testem serii grupy II do IV.

Nie stwierdzono żadnej istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartościami stężenia VEGF i sVEGFR we krwi u chorych z grup badanych ani u osób z grupy kontrolnej.

Dyskusja

W wielu pracach podnosi się znaczenie roli VEGF w rozwoju guzów litych. W procesie angiogenezy dowiedziono udział endogennych inhibitorów, takich jak: angiostatyna, endostatyna, rozpuszczalne receptory naczyniowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1, sVEGFR-2). Zaobserwowano występowanie podwyższonego stężenia VEGF we krwi u chorych z guzami złośliwymi, w tym z rakami nadnerczy [9, 16]. Podwyższone stężenie endostatyny we krwi stwierdzono u chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową np. w przebiegu raka jelita grubego [17]. Wielu autorów obserwoowało podwyższone stężenie zarówno VEGF, jak i endostatyny u chorych z różnymi guzami złośliwymi [9, 16-20]. Ostatnio wielu autorów bada wpływ rozpuszczalnych form receptorów na angiogenezę. Pierwsze doniesienia o formach rozpuszczalnych sVEGFR-1 pochodziły od autorów badających surowice lub płyn owodniowy ciężarnych kobiet [8, 12, 13, 21, 22]. Kendall i Thomas w 1993 roku znaleźli „zbiór” cDNA z komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVECs) odpowiedzialny za powstawanie sVEGFR-1 [21]. Barleon i wsp. donieśli o obecności endogennych rozpuszczalnych form receptora VEGF (sVEGFR-1, sVEGFR-2) w surowicy niezależnie od płci i wieku u zdrowych dawców [12].

Kasperlik-Zaluska i wsp. nie potwierdzili istnienia zależności pomiędzy złośliwymi guzami nadnerczy a stężeniem VEGF we krwi u chorych z tymi guzami, wskazując na konieczność dalszych

Tabela I Średnie wartości stężeń VEGF, sVEGFR-1 i sVEGFR-2

Table I VEGF, sVEGFR-1 and sVEGFR-2 mean blood serum levels

	VEGF	sVEGFR-1	sVEGFR-2
Grupa I (raki kory) n=8	1263,8 (SD=897,8) p<0,05	53,8 (SD=21,4) p>0,05	5893,7 (SD=1043,6) p<0,05
Grupa II (guzy przerzutowe) n=4	485,9 (SD=101,2) p<0,05	51,7 (SD=9,5) p>0,05	5455,2 (SD=1014,8) p<0,05
Grupa III (gruczolaki) n=15	334,2 (SD=305,3) p>0,05	21,7 (SD=7,2) p<0,05	7106,4 (SD=1263,6) p<0,05
Grupa IV (kontrolna) n=10	197,2 (SD=103,6)	43,5 (SD=21,5)	8976,3 (SD=1456,3)

Group I (cortex carcinoma)

Group II (adrenal metastases)

Group III (cortex adenoma)

Control group

SD-odchylenie standardowe / standard deviation

p-poziom istotności: pomiędzy grupą kontrolną a poszczególnymi grupami

p-significance level: between the control group and each group studied

badania na większej grupie chorych [23]. W naszej pracy potwierdziliśmy obserwację, publikowaną w poprzednich doniesieniach, że średnie stężenie VEGF we krwi chorych z guzami złośliwymi nadnerczy jest istotnie wyższe w porównaniu z chorymi z łagodnymi gruczolakami i z osobami z grupy kontrolnej [9, 16]. Teraz wykazaliśmy dodatkowo, że średnie stężenie tej cytokiny jest istotnie wyższe we krwi u chorych z rakami pierwotnymi kory nadnerczy (bez przerzutów odległych), aniżeli u chorych z guzami przerzutowymi do nadnerczy.

Porównanie średnich stężeń sVEGFR-1 i sVEGFR-2 może świadczyć o korelacji stężeń sVEGFR we krwi z rozwojem złośliwych guzów nadnerczy. W grupie chorych z guzami złośliwymi stwierdziliśmy, że średnie stężenie sVEGFR-2 we krwi jest istotnie niższe w porównaniu z grupą chorych ze zmianami łagodnymi i grupą kontrolną. Średnie stężenie sVEGFR-1 we krwi w tej grupie chorych jest istotnie wyższe w stosunku do chorych z gruczolakami kory nadnerczy i nie różni się istotnie w stosunku do grupy kontrolnej.

Na podstawie naszych poprzednich badań, ciekawą obserwacją było stwierdzenie obniżenia wartości średniego stężenia endostatyny u chorych z łagodnymi gruczolakami, w porównaniu nie tylko z chorymi z guzami złośliwymi, ale również z osobami z grupy kontrolnej [16]. Oceniając wartości stężeń sVEGFR-1 uzyskaliśmy podobne zależności jak w przypadku endostatyny. Stwierdziliśmy, że średnie stężenie sVEGFR-1 we krwi u chorych z gruczolakami jest istotnie niższe w porównaniu z grupą chorych ze zmianami złośliwymi i z grupą kontrolną. Wydaje się, że u chorych z gruczolakami nadnerczy, ze względu na wolniejszy metabolizm w zmianach łagodnych (mniejsze zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze), dochodzi do słabszej stymulacji wytwarzania inhibitorów angiogenezy, w tym i braku stymulacji genu wpływającego na produkcję sVEGFR-1. Niski poziom stężenia sVEGFR-1 w stosunku do grupy kontrolnej możemy tłumaczyć „związaniem” wcześniej wytworzonego sVEGFR-1 przez VEGF i jego receptory, VEGFR-1 i VEGFR-2.

Brak korelacji pomiędzy wartościami stężeń we krwi VEGF i sVEGFR może świadczyć o tym, że nie ma bezpośredniego związku pomiędzy wzajemnym oddziaływaniem tych czynników. Równoczesne występowanie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi może świadczyć, że czynniki te biorą udział, poprzez regulację procesu angiogenezy, w rozwoju nowotworów złośliwych. Wydaje się jednak, że zjawiska stymulowania i hamowania angiogenezy są związane z bardziej skomplikowanym wzajemnym oddziaływaniem czynników pro- i antyangiogennych. Można sądzić, że o rozwoju angiogenezy, a pośrednio i rozwoju guza, decyduje indywidualnie występujący u każdego

chorego wzajemny stosunek aktywności czynników pro- i antyangiogennych. Wielu autorów podkreśla, że ten „balans” pomiędzy oddziaływaniem tych czynników decyduje o rozwoju guza [9, 16, 18, 24].

Kluczowe zjawiska w procesie angiogenezy następują poprzez pobudzenie receptorów dla VEGF. Związanie VEGF z receptorem VEGFR-2 na komórkach śródbłonna może wiązać się z obniżeniem jego form rozpuszczalnych w surowicy krwi (mechanizm shedding powstawania rozpuszczalnej formy receptora). Istotnie wyższe stężenie sVEGFR-1 w guzach złośliwych w stosunku do zmian łagodnych może wiązać się z pobudzeniem genu dla flt-1 i wzrostem produkcji sVEGFR-1 w tych zmianach. Kendall donosił o wysokim powinowactwie sVEGFR-1 do VEGF i jego receptorów [21]. Hornig i wsp badając stężenia rozpuszczalnych form receptora VEGFR-1 w różnych płynach ustrojowych (surowica, płyn owodniowy) stwierdzili dominujące działanie sVEGFR-1 jako „negatywnego” receptora w stosunku do VEGFR-1 i VEGFR-2 [22]. Zablokowaniem receptorów VEGFR-2 można też tłumaczyć uzyskane istotnie niższe wartości średniego stężenia sVEGFR-2 we krwi w grupie chorych z gruczolakami kory nadnerczy w stosunku do osób z grupy kontrolnej.

Reasumując, można wnioskować na podstawie przedstawionych wyników badań, że zarówno VEGF, jak i rozpuszczalne formy receptora VEGF odgrywają rolę w rozwoju guzów złośliwych nadnerczy, a ocena ich stężeń we krwi może mieć znaczenie diagnostyczne.

Wnioski:

1. U chorych z pierwotnymi rakami kory nadnerczy i z guzami przerzutowymi do nadnerczy stwierdzono wyższe niż u ludzi zdrowych stężenia czynników pobudzających (VEGF) mechanizmy angiogenezy.
2. U chorych z gruczolakami kory nadnerczy stwierdzono niższe niż u ludzi zdrowych stężenia czynników o charakterze antyangiogennym (sVEGFR-1, sVEGFR-2) oraz prawidłowe stężenia VEGF.
3. Ocena stężenia VEGF i sVEGFR-2 we krwi u chorych z nieczynnymi hormonalnie guzami nadnerczy może mieć znaczenie diagnostyczne w różnicowaniu zmian złośliwych i łagodnych.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami badanych czynników angiogennych we krwi w żadnej z analizowanych grup chorych.

Piśmiennictwo

1. Babińska A, Linde J, Sworczak K. Incidental discovered adrenal mass (incidentaloma) – contemporary opinion. *Pol Arch Med Wew* 2000; 104(1): 391-400
2. Stajgis P, Drews M, Stawny B et al. Incidental adrenal tumors – should we operate? *Pol Prz Chir* 1999; 71(10): 1003-1008

3. Billbey JH, Mc Loughin RF, Kurkijan PS et al. MR imaging of adrenal masses: value of chemical-shift imaging for distinguishing adenomas from the other tumors. *AJR* 1995; 164: 637-644
4. Barzon L, Boscaro M. Diagnosis localization and management of adrenal incidentalomas. *J Urology* 2000; 163: 398-403
5. Bałan BJ. Angiogenesis – problem of XXI century. *Nowa Med Pulmonologia* 2000; 100(4)
6. Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757
7. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factor. *Nat Rev Can* 2002; 2: 795-803
8. Barleon B, Simeister G, Martiny-Baron G et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1997; 57: 5421-5425
9. Kołomecki K, Stępień H, Bartos M, Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumors. *Endoc Regul* 2001; 35:9-16
10. Szala S, Radzikowski C. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997; 47: 1-19
11. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7: 2062-2072
12. Barleon B, Reusch P, Totzke F et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001; 4: 143-154.
13. Röckl W, Hecht D, Sztajer H et al. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble forms of KDR and Flt-1. *J Exp Cell Res* 1998; 241: 161-170
14. Herbst RS, Lee AT, Tran HT, Abbruzzese JL. Clinical studies of angiogenesis inhibitors: the University of Texas MD Anderson Center Trial of Human Endostatin. *Curr Oncol Rep* 2001; 3:131-140
15. Tołłoczko T, Cichońska A, Górnicka B et al. Nowotwory nadnercza. In: *Zasady diagnostyki i chirurgicznego leczenia nowotworów w Polsce*. (Szawłowska AW, Szmidt J) Fundacja-Polski Przegląd Chirurgiczny 2003:143-151
16. Korzeniewska M, Hedayati M, Kołomecki K. Ocena stężeń śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i endostatyny we krwi u chorych z guzami nadnercza „incidentaloma”. *Onkol Pol* 2003; 6,3:99-102
17. Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Circulating levels of endostatin in cancer patients. *Oncol Rep* 2001; 8:405-409
18. Feldman AL, Alexander HR, Bartlett DL. Prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:741-745
19. Feldman AL, Alexander HR, Yang JC et al. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95, 8:1637-1643
20. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1:27-31
21. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10705-10709
22. Hornig C, Behn T, Bartsch W et al. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immun Meth* 1999; 226: 169-17
23. Kasperlik-Zaluska A, Czarnocka B, Pastuszka D et al. Is vascular endothelial growth factor (VEGF) a marker of malignancy in adrenal tumors? *Pol J Endocrinol*. 2000; 51; (2): 285-289
24. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana SD 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