

A U T O R Z Y Z A P R O S Z E N I

Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika

Markers and modulators of angiogenesis in ovarian cancer

Bednarek Wiesława

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii
Akademia Medyczna im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

Streszczenie

Poznanie roli angiogenezy w rozwoju raka jajnika i próba powiązania tego procesu z przebiegiem klinicznym choroby wymaga zastosowania wiarygodnych, ilościowych i jakościowych wykładników – markerów i modulatorów angiogenezy.

Są to cechy fenotypowe nowotworu, oceniane za pomocą technik immunohistochemicznych oraz immunoenzymatycznych, odzwierciedlające nasilenie angiogenezy oraz jej specyficzną nowotworową naturę. Uzupełnienie danych klinicznych i histopatologicznych o informacje na temat markerów i modulatorów angiogenezy umożliwia istotne zwiększenie trafności prognoz dotyczących przebiegu klinicznego raka jajnika.

Słowa kluczowe: **markery angiogenezy / modulatory angiogenezy / rak jajnika /**

Abstract

Understanding of the role played by angiogenesis in the growth of ovarian malignancies and an attempt to link this process with the clinical outcome of the disease call for an employment of reliable quantitative and qualitative measures – markers and modulators of angiogenesis.

These tumor phenotypic qualities can be assessed with the use of immunohistochemical and immunoenzymatic assays, what reflects angiogenesis intensity, as well as its specific neoplastic properties. Supplementing clinical and histopathological data with the information on markers and modulators of angiogenesis enables a notable increase in the prognostic accuracy of the clinical outcome in ovarian cancer.

Key words: **markers of angiogenesis / modulators of angiogenesis / ovarian cancer /**

Adres do korespondencji:

Wiesława Bednarek
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii,
Akademia Medyczna im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie,
ul. Staszica 16, 20-081 Lublin
e-mail: wbed@wp.pl

Otrzymano: 15.07.2007

Zaakceptowano do druku: 15.09.2007

Bednarek W.

Wstęp

Rak jajnika należy do grupy nowotworów o niekorzystnym rokowaniu. Prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat od momentu rozpoznania choroby nie przekracza obecnie 46% [1]. Wynika to w głównej mierze z braku możliwości rozpoznawania raka jajnika we wczesnym stadium jego rozwoju. Prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat wynosi 90%, gdy choroba wykryta zostaje w I stopniu zaawansowania klinicznego. Jeśli rozpoznaje się raka w III stopniu, prawdopodobieństwo to wynosi 15-20%, zaś w IV stopniu mniej niż 5% [2].

Niekorzystne rokowanie w raku jajnika stanowi silną motywację do poszukiwania skutecznych sposobów leczenia, które zwiększyłyby szanse uzyskania całkowitej remisji choroby, wydłużyły czas wolny od choroby oraz całkowity czas przeżycia chorych. Tego rodzaju badania wymagają bardzo precyzyjnych narzędzi prognostycznych, które umożliwiają identyfikację chorych o gorszym rokowaniu, wymagających bardziej intensywnego leczenia [3].

Każda fenotypowa cecha, odzwierciedlająca biologiczne właściwości nowotworu, może być traktowana jako potencjalny czynnik prognostyczny. Według zgodnej opinii ekspertów zajmujących się przewidywaniem przebiegu klinicznego raka jajnika [3,4,5,6], do grupy użytecznych czynników prognostycznych zalicza się: wiek chorej w chwili rozpoznania choroby, stopień zaawansowania klinicznego choroby, wielkość guza po zabiegu chirurgicznym, wysięk w jamie otrzewnej, typ histologiczny raka oraz stopień jego zróżnicowania histologicznego. Dodatkowo pewną wartość prognostyczną przypisuje się stężeniu antygenu CA125 mierzonemu w surowicy krwi chorej po zabiegu chirurgicznym [7].

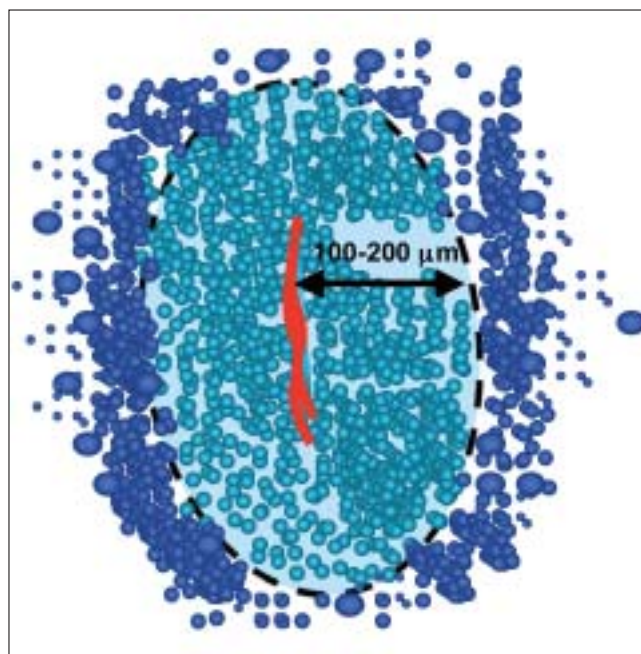
Połączenie kilku wymienionych czynników, oparte na wynikach analizy statystycznej stosowanej do tworzenia modeli prognostycznych (np. analizy proporcjonalnego hazardu Coxa), pozwala zazwyczaj na dokładniejsze przewidywanie przebiegu choroby. Wykorzystanie wszystkich wymienionych czynników prognostycznych umożliwia sformułowanie trafnych prognoz dotyczących czasu przeżycia w około 75% przypadków raka jajnika [4].

Angiogeneza

Rozwój raka jajnika zaczyna się w momencie, gdy niezdolna do realizacji programu apoptozy komórka zaczyna się dzielić w sposób niekontrolowany. Wzrost guza zatrzymuje się jednak zwykle na pewnym etapie, przy objętości około 1mm³ (106-107 komórek), co jest spowodowane stopniowym oddalaniem się komórek od najbliższego naczynia krwionośnego. Składniki potrzebne do wzrostu dyfundują z naczynia tylko na odległość 100-200mm, dlatego dalsza ekspansja nowotworu zostaje zahamowana. (Rycina 1). Stan taki może trwać nawet wiele lat [8, 9].

Zgodnie z koncepcją Folkmana, zaproponowaną w 1971 roku na łamach *New England Journal of Medicine*, dalszy wzrost nowotworu uzależniony jest od powstania nowych naczyń krwionośnych – neoangiogenezy [10]. Uznana początkowo za kontrowersyjną, koncepcja Folkmana doprowadziła do powstania nowego paradygmatu opisującego udział angiogenezy w rozwoju nowotworu.

Angiogeneza nowotworowa może odbywać się albo drogą



Rycina 1. Komórki raka zaopatrywane przez jedno naczynie włosowate zajmują ograniczony obszar (zaznaczony przerywaną linią), którego wielkość uzależniona jest od intensywności przemian metabolicznych. Komórki w promieniu 100-200mm od naczynia wykazują dużą żywotność. Komórki położone dalej ulegają martwicy.

pączkowania albo drogą powiększania średnicy, wydłużania i podziału istniejących naczyń. Ten drugi proces odbywa się za pośrednictwem proliferacji komórek śródbłonna w obrębie ściany naczyniowej. Naczynia krwionośne guza mogą mieć budowę mozaikową. Ściany wyściełane są wówczas komórkami śródbłonna i komórkami nowotworowymi. Wiadomo również, że w niektórych guzach, np. czerniakach, mogą powstawać kanały utworzone przez same komórki nowotworowe, które pełnią funkcje naczyń krwionośnych, co określono terminem mimikry naczyniowej.

Streubel i wsp. przedstawili wyniki badań ukazujące złożoną i nieprzewidywalną naturę nowotworowej angiogenezy [11]. Badane przez nich komórki śródbłonna naczyń włosowatych w chłoniakach B-komórkowych wykazywały ekspresję markerów nowotworowych i genetyczne aberracje charakterystyczne dla otaczających je komórek B chłoniaka. Możliwych jest kilka sposobów wytłumaczenia tego zjawiska. Po pierwsze, wielopotencjalne komórki macierzyste są prekursorami zarówno komórek chłoniaka, jak i śródbłonna. Po drugie, komórki guza, które powstają z linii limfatycznej różnicują się do fenotypu komórek śródbłonna pod wpływem bodźców środowiska. Może dochodzić również do łączenia się komórek śródbłonna i chłoniaka. W końcu, komórki śródbłonna należące do układu siateczkowo-śródbłonkowego mogą wchłaniać na drodze fagocytozy ciała apoptotyczne zawierające informację genetyczną komórek guza [11].

Naczynia guza powstające w wyniku neoangiogenezy są nieprawidłowe pod względem strukturalnym i czynnościowym. W przeciwieństwie do prawidłowych tkanek, unaczynienie guza jest wysoce nieuporządkowane.

Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika.

Naczynia są zwykle poskręcane i rozłożone nierównomiernie w tkance nowotworowej. Rozwijając się w sposób niekontrolowany, tworzą rozległe pętle, przetoki i ślepe zakończenia.

Ultrastruktura naczyń guza jest również nieprawidłowa. Ich ściany posiadają liczne okienka endotelialne i pęcherzyki. Połączenia między komórkami są nieszczelne a błona podstawna nie jest ciągła lub może być nieobecna. Te defekty wywołują nieszczelność naczyń [12,13]. Największe nasilenie przepuszczalności występuje najczęściej w naczyniach zlokalizowanych na obwodzie i w tkance łącznej otaczającej guz, natomiast naczynia w środku guza zwykle mają mniejszą przepuszczalność [14].

Opisane właściwości naczyń powstających w guzie wywołane są zaburzeniem równowagi pomiędzy stymulatorami i inhibitorami angiogenezy. W konsekwencji przepływ krwi w takich naczyniach jest chaotyczny i zmienny. Pojawiają się obszary lokalnego niedotlenienia, w których dochodzi do obniżenia pH mikrośrodowiska. Zmiany te można obserwować w nowoczesnym obrazowaniu ultrasonograficznym, szczególnie z wykorzystaniem trójwymiarowej sonoangiografii [15, 16]. Zmiany w unaczynieniu guza mogą również obniżać skuteczność planowanej chemioterapii [17]. Neoangiogeneza jest procesem kluczowym dla wzrostu i dalszego rozwoju raka jajnika [18]. Jej tempo i nasilenie decyduje o przebiegu klinicznym choroby i wynikach zastosowanego leczenia. Jak dowodzą najnowsze osiągnięcia farmakologii, sam proces neoangiogenezy może być przedmiotem działań terapeutycznych, mających na celu zahamowanie powstawania nowych naczyń, a przez to powstrzymanie rozwoju nowotworu [19].

Markery i modulatory angiogenezy

Poznanie roli neoangiogenezy w rozwoju raka jajnika i próba powiązania tego procesu z przebiegiem klinicznym choroby wymaga zastosowania wiarygodnych ilościowych i jakościowych wykładników – markerów angiogenezy. Są to cechy fenotypowe nowotworu, oceniane za pomocą technik histopatologicznych lub immunochemicznych, odzwierciedlające nasilenie angiogenezy oraz jej specyficzną nowotworową naturę.

Markery angiogenezy umożliwiają badanie stopnia unaczynienia raka jajnika. W przypadku nieradykalnego zabiegu chirurgicznego dalszy postęp neoangiogenezy w pozostawionej tkance nowotworowej uzależniony jest od działania bodźców metabolicznych (niedobór tlenu i składników odżywczych) oraz parakrynych czynników, które wpływają na proces powstawania nowych naczyń – pro- i antyangiogennych modulatorów angiogenezy. Dla uzyskania pełnego obrazu w badaniach nad wpływem tego procesu na przebieg kliniczny choroby konieczne jest więc uwzględnienie ekspresji modulatorów angiogenezy.

Histologiczne markery angiogenezy

Obfite unaczynienie guzów nowotworowych, stwierdzane makroskopowo, opisywane było przez patologów już na początku XVII wieku [20]. Badania histologiczne, zapoczątkowane w XIX wieku dzięki opracowaniu użytecznych metod barwienia i prowadzone intensywnie w pierwszej połowie XX wieku, wykazywały obecność bogatej sieci mikronaczyń w wielu rodzajach nowotworów. Prace Goldmana, Lewisa,

Idego oraz Algire'a dowiodły, że unaczynienie tkanki nowotworowej uzależnione jest od stopniowo postępującego procesu – neoangiogenezy. Badania nad rolą neoangiogenezy w rozwoju nowotworu wymagały jednak posłużenia się obiektywną miarą nasilenia tego procesu. Histologiczna ocena ilościowa unaczynienia zmian nowotworowych wprowadzona została przez Weidnera i wsp. w roku 1991 [21].

Gęstość mikronaczyń (MVD)

Gęstość mikronaczyń (*microvascular density*, MVD) jest to średnia liczba mikronaczyń, określana przy użyciu mikroskopu wyposażonego w odpowiedni obiektowy o znanej średnicy pola widzenia. MVD obliczana jest jako średnia arytmetyczna z liczby mikronaczyń stwierdzonej w trzech lub czterech polach widzenia wybranych subiektywnie spośród pól o największym unaczynieniu (*hotspots*). Powszechnie stosowanym kryterium dla rozpoznania mikronaczynia jest stwierdzenie komórki lub grupy komórek w obrębie tkanki nowotworowej wykazujących specyficzną reakcję przeciwciał z antygenem charakterystycznym dla komórek śródbłonna.

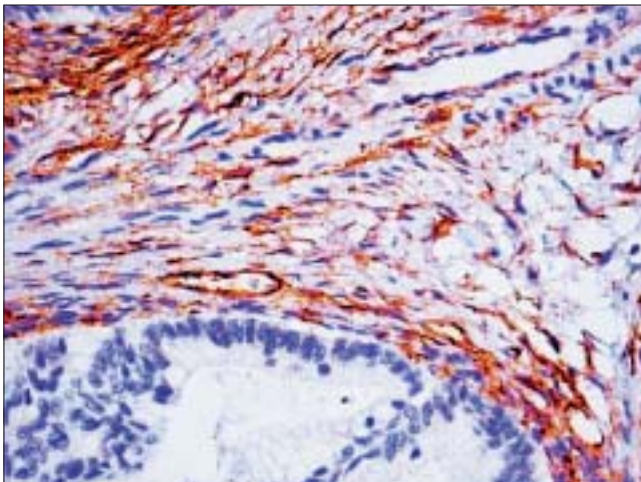
W kluczowej dla badań nad neoangiogenezą publikacji Weidner i wsp. opisali immunohistochemiczny sposób uwidocznienia mikronaczyń za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko czynnikowi VIII [21]. Technika ta umożliwiła autorom określenie liczby mikronaczyń w najlepiej unaczynionych obszarach raka gruczołu piersiowego. Uzyskana informacja ilościowa – gęstość mikronaczyń (*microvessel density*, MVD) – skorelowana była z występowaniem przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych.

Kolejna publikacja Weidnera i wsp., opisująca związek MVD z dalszym przebiegiem klinicznym choroby w badanej uprzednio grupie pacjentek, wykazała, że MVD jest niezależnym czynnikiem prognostycznym we wczesnej fazie rozwoju raka gruczołu piersiowego [22]. Obserwacja ta znalazła potwierdzenie w wynikach badań prowadzonych przez Horaka i wsp. [23]. Istnienie związku pomiędzy MVD a rokowaniem w raku gruczołu piersiowego wzbudziło duże zainteresowanie badaczy poszukujących wartościowych czynników prognostycznych w innych nowotworach.

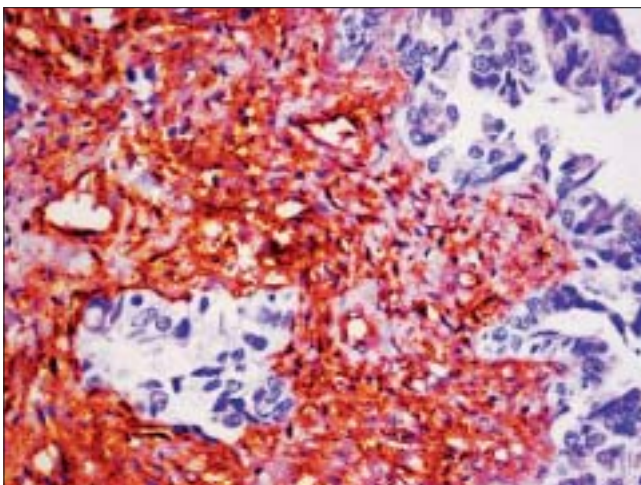
Wśród stosowanych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom występującym na komórkach śródbłonna rozróżnia się tzw. przeciwciała panendotelialne, reagujące z antygenami zlokalizowanymi na powierzchni wszystkich komórek śródbłonna, niezależnie od jego stanu czynnościowego oraz przeciwciała łączące się z antygenami obecnymi jedynie na powierzchni proliferujących komórek śródbłonna.

Do przeciwciał panendotelialnych zalicza się przeciwciała skierowane przeciwko czynnikowi VIII, antygenowi CD31 oraz antygenowi CD34. Najbardziej czułe w tej grupie przeciwciał są przeciwciała anty-CD34, które reagują z największą liczbą komórek śródbłonkowych w porównaniu z innymi stosowanymi przeciwciałami. Przeciwciała te łączą się z glikoproteiną CD34 odpowiedzialną za adhezję komórek. Glikoproteina CD34 jest antygenem występującym na powierzchni niedojrzałych komórek hemopoetycznych oraz na powierzchni komórek śródbłonna. Reakcja immunohistochemiczna przeprowadzana z użyciem przeciwciał anty CD-34 umożliwia więc uwidocznienie wewnętrznej powierzchni mikronaczyń. (Fot. 1).

Bednarek W.



Fot 1. Gęstość mikronaczyń w raku jajnika oceniana za pomocą przeciwciała anti-CD34.



Fot 2. Gęstość mikronaczyń w raku jajnika oceniana za pomocą przeciwciała anti-CD105.

Według niektórych autorów, przeciwciała anti-CD34 wchodzi także w interakcje z różnorodnymi elementami zrębu, co ogranicza ich swoistość przy określaniu MVD [20, 24]. Cechą wspólną przeciwciał panendotelialnych jest jednakowa intensywność odczynów barwnych zarówno dla małych, jak i dużych naczyń oraz ich reaktywność w przypadku skrawków mrożonych i parafinowych. Te ostatnie są szczególnie istotne dla rutynowego stosowania w praktyce klinicznej, gdyż umożliwiają badania na archiwalnym materiale. Markery panendotelialne nie pozwalają na rozróżnienie śródbłonek proliferujących od nieaktywnych.

Nowe dane wskazują, że znacznie bardziej specyficzne dla obszarów aktywnej neoangiogenezy są przeciwciała identyfikujące proliferujące komórki śródbłonek. (Fot. 2).

Trzy ostatnio zbadane przeciwciała monoklonalne – E9 i TEC-11 łączące się z antygenem CD105 oraz LM609 rozpoznające integralny alfavbeta3 – wydają się być specyficzne dla

zaktywowanych komórek śródbłonek oraz dla mniejszych mikronaczyń wewnątrz guza [25].

Posługiwanie się wynikami pomiarów gęstości mikronaczyń wymaga zrozumienia, że wielkość MVD odzwierciedla przeciętne odległości między naczyńkami włosowatymi. (Rycina 2).

Duża gęstość mikronaczyń wskazuje na to, że odległości między naczyńkami włosowatymi w tkance nowotworowej są niewielkie. Oznacza to, że przemiany metaboliczne zachodzące w tkance nowotworowej są bardzo intensywne. Zużywane są duże ilości tlenu i składników odżywczych.

Niska gęstość mikronaczyń nie oznacza, że rozwój nowotworu jest niezależny od angiogenezy. Wskazuje raczej na to, że nasilenie przemian metabolicznych i zużycie tlenu oraz składników odżywczych w komórkach jest niewielkie. Potrzebne do przeżycia składniki mogą więc dyfundować z naczyńka włosowatego na większą odległość, bez konieczności tworzenia nowych naczyń [26].

Najważniejszą zaletą MVD jest to, że marker ten wykazuje ścisły związek z intensywnością wzrostu guza i zdolnością do tworzenia przerzutów nowotworowych. Zależność ta sprawia, że MVD wykazuje istotną wartość prognostyczną w wielu rodzajach nowotworów. Ocena wartości prognostycznej MVD w raku jajnika zapoczątkowana została przez Hollingswortha i wsp. w roku 1995 [27]. Autorzy przeprowadzili retrospektywną analizę czasu przeżycia 43 chorych z zaawansowanym rakiem jajnika, stosując metodę Weidnera z przeciwciałami anti-CD34. Uzyskane wyniki wskazywały, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy wartością MVD a czasem wolnym od choroby oraz całkowitym czasem przeżycia. Opisane badanie nie uwzględniało przypadków raka jajnika o niskim stopniu zaawansowania klinicznego. W roku 1997 Abulafia i wsp. opublikowali wyniki badania MVD, określanej za pomocą przeciwciał przeciwko czynnikowi VIII, u 42 chorych z wczesnym i zaawansowanym rakiem jajnika. MVD w guzie pierwotnym nie wykazywała istotnej statystycznie korelacji z całkowitym czasem przeżycia. Jedynie wysoka wartość MVD stwierdzona w przerzutach do otrzewnej związana była z istotnie statystycznie krótszym czasem przeżycia [28].

Ograniczona ilość publikacji na temat wartości prognostycznej MVD w raku jajnika uniemożliwia wydanie jednoznacznej opinii na temat ewentualnej roli tego markera w przewidywaniu przebiegu klinicznego choroby [29, 30].

Prace własne, prowadzone w I Katedrze i Klinice Ginekologii AM w Lublinie, wskazują na brak bezpośredniego związku pomiędzy MVD badaną za pomocą przeciwciał anti-CD34 i anti-CD105 a wrażliwością na standardową chemioterapię, czasem wolnym od choroby oraz całkowitym czasem przeżycia chorych na raka jajnika.

Całkowita powierzchnia mikronaczyń (TVA)

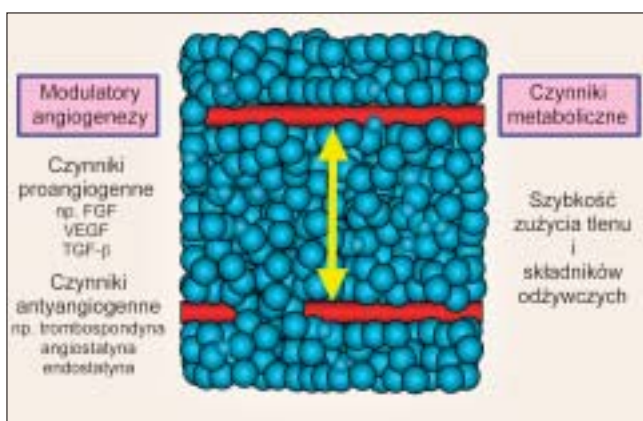
Całkowita powierzchnia mikronaczyń (*total microvascular area*, TVA) jest kolejnym markerem angiogenezy stosowanym w badaniach nad związkiem pomiędzy unaczynieniem zmiany nowotworowej a przebiegiem klinicznym choroby [31].

TVA jest powierzchnią zajmowaną przez naczynia włosowate w tkance guza, obliczaną przy użyciu specjalnego obiektu o znanej średnicy pola widzenia w trzech lub czterech

Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika.

polach wybranych subiektywnie w obszarach o najbogatszej sieci naczyń (*hotspots*). Wybór pól widzenia opiera się na podobnych zasadach jak w przypadku pomiaru MVD.

Przydatność prognostyczną badania TVA wykazano po raz pierwszy w przypadku czerniaka złośliwego, w którym występowanie przerzutów odległych wiązało się z dwukrotnie większą wartością TVA w pierwotnej zmianie w porównaniu z TVA stwierdzaną w czerniakach nie tworzących przerzutów odległych [32]. W raku prostaty stosunek TVA do ocenianej całkowitej powierzchni badanego guza skorelowany jest z występowaniem przerzutów do szpiku kostnego [33]. Istotną wartość prognostyczną TVA wykazano także w przypadku nowotworów mózgu [31, 34], przewlekłej białaczki szpikowej [35], białaczki włochatokomórkowej [36] oraz raka pęcherza moczowego [37]. Brakuje, jak dotąd, publikacji na temat wartości prognostycznej TVA w raku jajnika.



Rycina 2. Gęstość mikronaczyń, odzwierciedlająca odległość między naczyniami włosowatymi (żółta strzałka), uzależniona jest od działania czynników pobudzających i hamujących angiogenezę.

Metoda Chalkley'a

Metoda Chalkley'a używana jest w niektórych badaniach do pośredniej oceny względnej powierzchni naczyń włosowatych [31]. Badanie opiera się na wykorzystaniu specjalnej 25-punktowej siatki, którą nakłada się na okular mikroskopu. Po wybraniu trzech lub czterech pól o największym unaczynieniu oblicza się liczbę wybarwionych mikronaczyń, które stykają się z punktami na siatce Chalkley'a.

Średnia liczba takich naczyń jest miarą unaczynienia tkanki [31, 38]. Metoda Chalkley'a wskazywana była przez wielu autorów jako metoda przewyższająca metodę Weidnera [39, 40]. Jej przewaga wynika z lepszej odtwarzalności i większej korelacji wyników z przebiegiem klinicznym choroby. Mimo to większość badań nadal opiera się na ocenie MVD [31].

Liczba naczyń oceniana metodą Chalkley'a jest wartościowym czynnikiem prognostycznym, odwrotnie proporcjonalnym do czasu trwania remisji oraz całkowitego czasu przeżycia chorych na raka gruczołu piersiowego [38, 39]. Omawiany marker wykazuje także istotną wartość prognostyczną w raku pęcherza moczowego [40]. Metoda nie była stosowana dotychczas w celu oceny angiogenezy w raku jajnika.

Liczba rozgałęzień naczyniowych (VBC)

Liczba rozgałęzień naczyniowych (*vascular branching count*, VBC) jest to liczba rozgałęzień stwierdzana podczas oceny 100 naczyń włosowatych [31]. Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy MVD a VBC [37]. U chorych na nowotwory rozwijające się w obrębie ośrodkowego układu nerwowego VBC jest, obok wieku i stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu, niezależnym czynnikiem prognostycznym powiązanym z całkowitym czasem przeżycia [34].

Indeks angiogenezy (AI)

Oryginalnym markerem angiogenezy, łączącym w sobie informacje na temat cech histologicznych oraz aktywności czynników modulujących przebieg angiogenezy, jest zaproponowany w 2001 roku przez Mehtę i wsp. indeks angiogenezy (*angiogenesis index*, AI) [41].

Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją białka P53, świadcząca o mutacji genu supresorowego P53, a liczbą naczyń włosowatych w raku prostaty oraz ujemna korelacja pomiędzy ekspresją białka P53 a ekspresją trombospondyny-1 – inhibitora angiogenezy – to dwie zależności, które skłoniły autorów do poszukiwania sposobu połączenia tych trzech parametrów w jeden wskaźnik.

Autorzy zastosowali specyficzny system punktacji, umożliwiający przypisanie konkretnej wagi obserwowanym cechom immunohistochemicznym. (Tabela I).

Tabela I. Punktacja wykorzystywana przy obliczaniu wskaźnika angiogenezy.

Liczba punktów	Nasilenie ekspresji białka P53	Nasilenie ekspresji trombospondyny-1	Liczba naczyń włosowatych
1	0 – 29	≥ 30	0 – 29
0	30 – 59	25 – 29	30 – 69
-1	60 – 89	20 – 24	70 – 84
-2	90 – 119	15 – 19	85 – 99
-3	120 – 149	10 – 14	100 – 122
-4	≥ 150	0 – 9	≥ 123

Wskaźnik angiogenezy jest sumą punktów przydzielanych za określone nasilenie ekspresji białka P53 oraz trombospondyny-1 oraz za stwierdzoną liczbę naczyń włosowatych. Maksymalna wartość AI, związana z najlepszym rokowaniem, wynosi +3. Najgorsza rokowniczo minimalna wartość AI wynosi -12.

Badania przeprowadzone przez autorów w grupie 98 chorych na raka prostaty wykazały, że zaproponowany indeks angiogenezy jest niezależnym czynnikiem prognostycznym skorelowanym z całkowitym czasem przeżycia chorych [41].

Czynniki proangiogenne

W rozważaniach dotyczących wpływu angiogenezy na przebieg choroby nowotworowej, oprócz immunohistochemicznych markerów angiogenezy, uwzględnia się także oddziaływanie różnorodnych czynników pobudzających angiogenezę, tzw. czynników proangiogennych.

Bednarek W.

Do grupy czynników proangiogennych zalicza się w chwili obecnej kilkadziesiąt czynników o charakterze czynników wzrostu, proteaz, pierwiastków śladowych, onkogenów, enzymów uczestniczących w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, cytokin i innych endogennych modulatorów wykazujących różnie nasilone działanie. (Tabela II).

Tabela II. Czynniki proangiogenne.

Grupa	Czynnik
Czynniki wzrostu	<ul style="list-style-type: none"> • Angiogenina • Angiotropina • Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) poprzez swoisty receptor (EGFR) • Czynnik wzrostu fibroblastów kwaśny (aFGF) • Czynnik wzrostu fibroblastów zasadowy (bFGF) • Czynnik wzrostu kolonii granulocytarnych (G-CSF) • Czynnik wzrostu kolonii granulocytarnych-monocytarnych (GM-CSF) • Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) • Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) • Czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF-α) • Łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) • Śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF)
Proteazy	<ul style="list-style-type: none"> • Katepsyna • Żelatynaza A • Żelatynaza B • Stromelizyna • Aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA)
Pierwiastki śladowe	<ul style="list-style-type: none"> • Miedź
Onkogeny	<ul style="list-style-type: none"> • c-myc • ras • c-src • v-raf • c-jun
Enzymy uczestniczące w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych	<ul style="list-style-type: none"> • Fosforylaza tymidyny • Transferaza farnesyly • Transferaza geranyly
Cytokiny	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukina-1 (IL-1) • Interleukina-4 (IL-4) • Interleukina-6 (IL-6) • Interleukina-8 (IL-8)
Inne endogenne modulatory	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukina-13 (IL-13) • Integryna alfa v beta 3 • Integryna alfa v beta 5 • Angiopoetyna-1 • Angiopoetyna-2 • Angiotensyna II (poprzez receptor AT1) • Endotelina (poprzez receptor ETB) • Erytropoetyna • Trombopoetyna • Czynnik aktywujący płytki krwi • Eotaksyna • Fraktalkina • Prostaglandyna E • Syntaza tlenu azotu • Niedotlenienie

Śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF)

Do najdokładniej zbadanych czynników z tej grupy należy śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) [42].

VEGF, po przyłączeniu się do swoistego receptora, pobudza migrację i proliferację komórek endotelialnych w tętnicach, żyłach i w naczyniach włosowatych *in vitro* oraz *in vivo* [43, 44].

VEGF nasila degradację macierzy zewnątrzkomórkowej wokół rozwijającego się naczynia [45]. Zwiększając przepuszczalność ściany naczyniowej, VEGF ułatwia odkładanie się fibryny wokół naczyń, przez co dodatkowo nasila angiogenezę [46]. Poprzez zdolność do pobudzania produkcji tlenu azotu, VEGF powoduje rozszerzenie naczyń i wzrost przepływu krwi, który poprzedza angiogenezę [47].

Do czynników pobudzających produkcję VEGF należą inne czynniki wzrostu (PDGF, EGF) oraz cytokiny prozapalne (TNF- α , IL-1) [48, 49, 50]. Amplifikacja onkogeny *ras* prowadzi do wzrostu stężenia VEGF [48, 51, 52].

Silnym induktorem produkcji VEGF jest hipoksja [48, 52, 53]. Niezależnym czynnikiem prowadzącym do nasilenia produkcji VEGF jest także mutacja genu *P53* [48, 54].

Obecność VEGF stwierdzona została w wielu nowotworach, m. in. w raku: oskrzela, tarczycy, gruczołu piersiowego, żołądka, jelita grubego, nerki oraz pęcherza moczowego [49, 52, 53].

Sowter i wsp. [55] wykazali, że mRNA kodujące VEGF produkowane jest także w komórkach raka jajnika w ilościach przewyższających ilości mRNA stwierdzane w prawidłowych komórkach nabłonkowych jajnika.

Prace, które dotyczą zależności pomiędzy VEGF a czasem wolnym od choroby i całkowitym czasem przeżycia w chorobie nowotworowej, wskazują na istotną wartość prognostyczną tego proangiogenego czynnika – jego wysoka zawartość w tkance guza wiąże się niekorzystnym rokowaniem w przypadku raka gruczołu piersiowego, raka oskrzela oraz raka jelita grubego [56].

Receptory śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF-R1 i VEGF-R2)

Dużo uwagi poświęca się w ostatnich latach receptorom wiążącym VEGF - VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [51-53, 57]. Pomimo dużej strukturalnej homologii, wykazują one zupełnie odrębne właściwości biologiczne [58].

Powszechnie uważa się, że przyłączenie VEGF do swoistego receptora powoduje homo- lub heterodimeryzację i autofosforylację reszt tyrozynowych zlokalizowanych w części cytoplazmatycznej receptora. Zjawisko to wyzwała kaskadę wewnątrzkomórkowych sygnałów [59, 60].

Wiadomo obecnie, że opisany proces zachodzi po przyłączeniu VEGF do VEGF-R2 [61, 62]. Wykazano, że zachodząca po dimeryzacji VEGF-R2 fosforylacja reszt tyrozynowych prowadzi do powstania szeregu sygnałów pobudzających proliferację w komórkach śródbłonkowych [63, 64, 65].

Stwierdzono, że to właśnie VEGF-R2 odpowiada za pobudzenie angiogenezy. Fakt ten doprowadził do opracowania specyficznych inhibitorów VEGF-R2, których antyangiogenne działanie wykorzystywane jest w badaniach klinicznych [51, 66].

Znaczenie VEGF-R2 zostało wyjaśnione, czego nie można powiedzieć o VEGF-R1. Biologiczna rola tego drugiego receptora pozostaje nadal niejasna, co może być spowodowane rozbieżnymi wynikami, które uzyskuje się w różnych komórkach i tkankach [58].

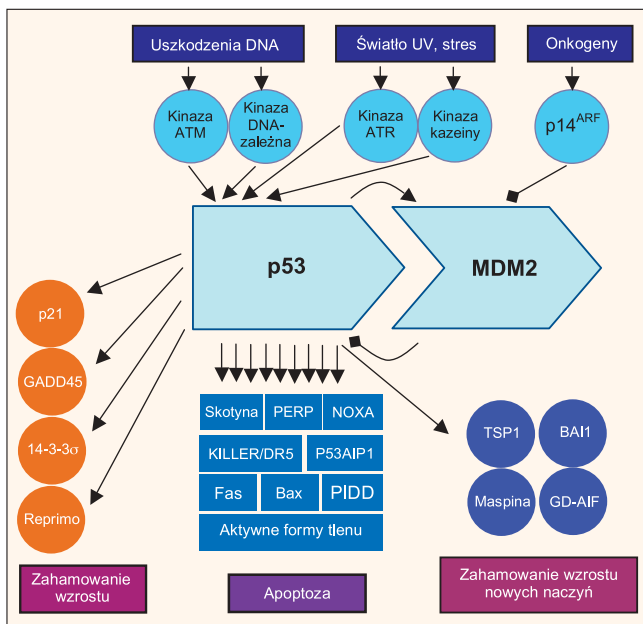
VEGF-R1 wykazuje większe powinowactwo do VEGF niż VEGF-R2 [67, 68], choć ulega on wyraźnie słabszej fosforylacji po przyłączeniu ligandu [62].

Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika.

W rzeczywistości stwierdzenie fosforylacji VEGF-R1 w odpowiedzi na VEGF jest bardzo trudnym zadaniem. Nie stwierdza się także proliferacji, ani migracji komórek śródbłonna w odpowiedzi na aktywację VEGF-R1 [69]. Z drugiej jednak strony pobudzenie tego receptora za pomocą łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF) może doprowadzać do proliferacji i aktywacji komórek endotelium [70].

Wyraźny brak odpowiedzi komórek śródbłonna na stymulację VEGF-R1 doprowadził do powstania koncepcji zakładającej, że receptor ten nie służy do przenoszenia mitogennych sygnałów, lecz jest czymś w rodzaju pułapki („*decoy*” receptor), umożliwiającej ograniczanie proangiogenego działania VEGF [71, 72]. Czynniki wzrostu, wydzielany parakrywnie w dużych ilościach przez komórki nowotworowe, wychwytywany jest przez VEGF-R1, przez co zmniejsza się aktywacja VEGF-R2 [58]. To swoiste współzawodnictwo receptorów może być najprostszym sposobem autoregulacji neoangiogenezy. Zmiany w proporcji receptorów obecnych na powierzchni komórek śródbłonna mogą przyspieszać lub zwalniać proces powstawania nowych naczyń.

Rozpuszczalna forma VEGF-R1 (sVEGF-R1) opisana została przez Kendalla i wsp. w 1993 roku [73]. Okazało się, że gen odpowiedzialny za powstawanie całej cząstki VEGF-R1 koduje także małą, rozpuszczalną formę, wykazującą duże powinowactwo do VEGF i PIGF [74].



Rycina 3. Sieć oddziaływań genu *P53*.

Kinaza ATM – kinaza wykryta w zespole ataxia-teleangiectasia powstająca w wyniku uszkodzenia DNA; kinaza ATR – kinaza związana z kinazą ATM i helikazą Rad-3; *P14^{ARF}* – gen hamujący wzrost nowotworów; *P53* – gen supresorowy; *MDM2* – gen kodujący ligazę regulującą stabilność białka *P53*; *P21*, *GADD45*, *14-3-3σ*, *Reprimo* – geny hamujące wzrost komórek; *Skotyna* – białko uczestniczące w procesie apoptozy; *PERP*, *NOXA*, *KILLER/DR5*, *Fas*, *BAX*, *PIDD* – geny uczestniczące w procesie apoptozy; *TSP1* – trombospondyna-1; *BAI1* – mózgowy inhibitor angiogenezy 1; *Maspina* – białkowy inhibitor proteazy 5 hamujący angiogenezę; *GD-AIF* – czynnik hamujący angiogenezę, wyizolowany z komórek glejaka.

Obecna w tkance nowotworowej sVEGF-R1 wykazuje działanie antyangiogenne [75].

Rozpuszczalną formę receptora wykryto także w osoczu krwi krążącej [76]. Wydaje się, że interesujących wyników może dostarczyć badanie wartości prognostycznej sVEGFR-1 obecnej w surowicy krwi chorych na raka jajnika. Badania własne, prowadzone w I Katedrze i Klinice Ginekologii AM w Lublinie, wskazują na istotny związek pomiędzy stężeniem sVEGF-R1 a wrażliwością na standardową chemioterapię, czasem wolnym od choroby oraz całkowitym czasem przeżycia chorych na raka jajnika.

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR)

Ważnym czynnikiem komórkowym, decydującym o dynamice wzrostu raka jajnika, zaangażowanym w procesie neoangiogenezy, jest zlokalizowany na powierzchni komórki raka jajnika receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) [77].

EGFR występuje w większości prawidłowych komórek organizmu człowieka [78]. Do ligandów aktywujących EGFR należą: naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF), transformujący czynnik wzrostu alfa (*transforming growth factor alpha*, TGF- α), amfiregulina (*amphiregulin*), betacelulina (*betacellulin*), naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (*heparin-binding epidermal growth factor*, HB-EGF) oraz epiregulina (*epiregulin*) [79].

Wg Thompsona [80], aktywacja EGFR obejmuje trzy następujące po sobie zjawiska:

- przyłączenie ligandu do domeny zewnątrzkomórkowej (*extracellular domain*, ECD) receptora,
- utworzenie dimeru przy udziale drugiego EGFR (homodimeryzacja) lub innego receptora z rodziny ludzkich receptorów naskórkowych (*human epidermal receptor*, HER), np. *HER2/neu* (heterodimeryzacja),
- aktywację kinazy tyrozynowej wchodzącej w skład EGFR.

Aktywowana kinaza tyrozynowa katalizuje fosforylację białek cytoplazmatycznych, wyzwalając kaskadę reakcji wewnątrzkomórkowych powodujących wzrost i różnicowanie komórki [80]. Wzmoczona ekspresja i nadmierna aktywacja EGFR są zaburzeniami sprzyjającymi proliferacji komórek, zahamowaniu apoptozy i nasileniu angiogenezy [81]. Zaburzenia regulacji EGFR stwierdzane są w nowotworach litych, takich jak rak: gruczołu piersiowego, jelita grubego, pęcherza i jajnika [82].

Przejawem aktywacji EGFR jest fosforylacja reszt tyrozynowych C-końcowego fragmentu receptora, zwanego obszarem autofosforylacji [83]. Wykrywanie fosfotyrozyny w EGFR jest istotą immunochemicznych metod służących do jakościowej i ilościowej oceny aktywnej formy EGFR w tkankach i w płynach ustrojowych.

W badaniach *in vitro* wykazano związek pomiędzy nadmierną ekspresją tych receptorów a aktywacją kaskady wewnątrzkomórkowych sygnałów prowadzącą do zahamowania apoptozy [84, 85].

Niektóre z badań klinicznych wskazują na istotny statystycznie związek pomiędzy ekspresją EGFR a przebiegiem choroby nowotworowej po zakończeniu chemioterapii pierwszego rzutu [86, 87, 88].

Bednarek W.

Związek ten wynikać może m. in. z udziału tych receptorów w rozwoju oporności na cytostatyki poprzez hamowanie apoptozy.

Coraz więcej obserwacji potwierdza, że receptor EGFR odgrywać może istotną rolę w angiogenezie zachodzącej w wielu typach nowotworów [82]. Stwierdzono, że oprócz komórek nowotworowych ekspresja receptora EGFR występuje także na powierzchni komórek endotelialnych w obrębie guza [89]. Ligandy EGFR – czynniki EGF i TGF- α wykazują działanie proangiogenne [56, 90]. Ekspresja EGFR skorelowana jest w przypadku niektórych nowotworów z gęstością mikro naczyń (MVD) [91]. Udział EGFR w procesie angiogenezy może odbywać się poprzez wpływ na produkcję VEGFR i innych modulatorów angiogenezy [92].

W badaniach własnych stwierdzono, że ekspresja EGFR, oceniana w raku jajnika, może być wykorzystana jako niezależny czynnik prognostyczny w przewidywaniu czasu wolnego od choroby, może zwiększać trafność prognoz dotyczących całkowitego czasu przeżycia, ale nie ma znaczenia dla prognozowania wystąpienia oporności na standardową chemioterapię, z użyciem cisplatyny i paklitakselu [93, 94].

Czynniki antyangiogenne

Działanie czynników proangiogennych, takich jak VEGF czy PlGF, modyfikowane jest przez endogenne inhibitory angiogenezy, do których zalicza się w chwili obecnej kilkadziesiąt czynników o różnej budowie i funkcji fizjologicznej. (Tabela III) [75].

Szczególne zainteresowanie endogennymi czynnikami antyangiogennymi wynika z możliwości wykorzystania ich syntetycznych odpowiedników lub pochodnych jako leków spowalniających rozwój nowotworów [75,95]. Także w przypadku raka jajnika prowadzone są badania kliniczne, mające na celu określenie skutków chemioterapii uzupełniającej wzbogaconej o środki antyangiogenne [96,97].

Trombospondyny

Trombospondyna-1 (TSP-1) była pierwszym naturalnie występującym czynnikiem antyangiogennym, którego działanie opisane zostało w 1990 roku [98]. Jest to glikoproteina o dużej masie cząsteczkowej obecna w macierzy międzykomórkowej, wykazująca różnorodne funkcje fizjologiczne. Uczestniczy w adhezji międzykomórkowej, proliferacji komórek, aktywacji cytokin i proteaz oraz w angiogenezie [99].

Niektóre z publikacji na temat udziału trombospondyny w angiogenezie sugerują, że może ona spełniać dwojaką rolę: czynnika pro- i antyangiogenne. Nadmierna ekspresja TSP-1 hamuje gojenie się ran oraz powstawanie nowotworów. Brak TSP-1 prowadzi do nadmiernego rozwoju naczyń włosowatych [100].

Ekspresja TSP-1 wykazuje związek z progresją zmian nowotworowych w przypadku raka gruczołu piersiowego, raka oskrzela oraz czerniaka złośliwego [101].

Trombospondyna-2 (TSP-2) wykazuje także działanie antyangiogenne [102]. Prawdopodobny mechanizm działania antyangiogenne TSP-2 polega na zahamowaniu wywołanej przez VEGF migracji komórek śródbłonkowych i tworzenia się nowego naczynia oraz na nasileniu apoptozy zachodzącej w komórkach śródbłonka [103].

Tabela III. Czynniki antyangiogenne.

Grupa	Czynnik
Czynniki wzrostu	• Czynniki wzrostu nablonka barwnikowego (PEGF)
Inhibitory proteaz	• Tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1 (TIMP-1) • Tkankowy inhibitor metaloproteinazy 2 (TIMP-2) • Tkankowy inhibitor metaloproteinazy 3 (TIMP-3) • Tkankowy inhibitor metaloproteinazy 4 (TIMP-4) • Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) • Inhibitor aktywatora plazminogenu 2 (PAI-2)
Pierwiastki śladowe	• Cynk
Geny supresorowe	• P53
Cytokiny	• Interleukina-10 (IL-10) • Interleukina-12 (IL-12) • Interferon alfa (IFN- α) • Interferon beta (IFN- β) • Interferon gamma (IFN- γ)
Inne endogenne modulatory	• Angiostatyna • Anastellina • Arresten • Endostatyna • Fragmenty kolagenu typu 15 • Fragmenty antytrombiny III • Fibuliny • Chondromodulina-1 • Czynniki płytkowy 4 (PF-4) • Trombospondyna-1 • Trombospondyna-2 • Tumstatyna • Waskulostatyna • Wazostatyna • Inhibitor wzrostu śródbłonka naczyń (VEGI) • Konstatayna • Fragmenty prolaktyny (16 kDa) • 2-metoksyestradiol • Izoflawonoidy • Troponina I • Tlenek azotu

Gen P53

Gen supresorowy P53 odpowiedzialny za hamowanie wzrostu i aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy, zapewniający terapeutyczne działanie cisplatyny i karboplatyny, jest określany mianem „strażnika genomu” [104].

Gen P53 odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju komórki. Jego oddziaływanie jest wielokierunkowe. Vogelstein i wsp. [105] przedstawiają sposoby i skutki aktywacji genu P53 w formie swoistej sieci sygnałów molekularnych. (Rycina 3).

Aktywacja genu P53 powoduje zahamowanie powstawania nowych naczyń krwionośnych. Antyangiogenne działanie genu P53 odbywa się za pośrednictwem trombospondyny-1 [106, 107]. Prawidłowa ekspresja genu i produkcja w pełni funkcjonalnego białka P53 indukuje produkcję TSP-1.

Mutacja genu P53, obserwowana w ponad połowie wszystkich rodzajów nowotworów, należy do najwcześniejszych zmian genetycznych zachodzących w trakcie onkogenezy. Konsekwencją tej mutacji jest powstawanie białka P53 wykazującego zmienione właściwości i akumulującego się w jądrze komórkowym. Opisany stan wiąże się z ponad dwudziestokrotnym spadkiem produkcji trombospondyny-1, co doprowadza do nasilenia neoangiogenezy [107, 108, 109].

Antyangiogenne działanie genu może wynikać z zależności od P53 aktywacji innych genów odpowiedzialnych za produkcję inhibitorów angiogenezy takich, jak na przykład mózgowy

Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika.

inhibitor angiogenezy 1 (*brain-specific angiogenesis inhibitor 1*, BAI 1), maspina – inhibitor aktywatora urokinazy plazminogenu oraz czynnik hamujący angiogenezę wytwarzany przez komórki glejaka (*glioma derived angiogenesis inhibitory factor*, GD-AIF) [105, 110].

Mukhopadhyay i wsp. stwierdzili, że czynnik transkrypcyjny, powstający w wyniku aktywacji genu *P53*, powoduje obniżenie endogennej produkcji VEGF [111]. Według Kiesera i wsp. mutacja genu *P53* wiąże się z nasileniem produkcji VEGF [112].

Podsumowanie

Wyniki prowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że prognozowanie w raku jajnika jest złożonym problemem klinicznym.

Stosowanie uznanych czynników prognostycznych związane jest wciąż ze zbyt dużym odsetkiem błędnych przewidywań. Sytuacja ta jest skutkiem ograniczonej wiedzy na temat czynników, które modyfikują przebieg choroby, a które można by wykorzystywać jako czynniki prognostyczne.

Badanie markerów i modulatorów angiogenezy, procesu ściśle związanego z rozwojem nowotworu, stwarza szansę poznania czynników wpływających na dynamikę choroby.

Coraz więcej obserwacji przemawia za tym, że cechy fenotypowe związane z angiogenezą, badane w tkance guza lub we krwi chorej, mogą zwiększać trafność formułowanych prognoz dotyczących przebiegu klinicznego raka jajnika.

Piśmiennictwo

- Guppy A, Nathan P, Rustin P. Epithelial ovarian cancer: a review of current management. *Clin Oncol*. 2005, 17, 399-411.
- Yancik R. Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer*. 1993, 71, 517-523.
- Agarwal R, Kaye S. Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? *Ann Oncol*. 2005, 16, 4-6.
- Clark T, Bradburn M, Love S, [et al.]. Survival analysis: part I: basic concepts and first analyses. *Br J Cancer*. 2003, 89, 232-238.
- Eisenhauer E, Gore M, Neijt J. Ovarian cancer: should we be managing patients with good and bad prognostic factors in the same manner? *Ann Oncol*. 1999, 1, suppl 10, 9-15.
- Polverino G, Parazzini F, Stellato G, [et al.]. Survival and prognostic factors of women with advanced ovarian cancer and complete response after a carboplatin-paclitaxel chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2005, 99, 343-347.
- Meyer T, Rustin G. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2000, 82, 1535-1538.
- Fidler I, Ellis L. Neoplastic angiogenesis – not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med*. 2004, 351, 215-216.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis M. Tumour angiogenesis: vascular growth and survival. *APMIS*. 2004, 112, 431-440.
- Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971, 285, 1182-1186.
- Streubel B, Chott A, Huber D, [et al.]. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2004, 351, 250-259.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, [et al.]. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000, 156, 1363-1380.
- Pettersson A, Nagy J, Brown L, [et al.]. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2000, 80, 99-115.
- Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005, 69, suppl 3, 4-10.
- Czekierdowski A, Smoleń A, Bednarek W, [et al.]. Współczesna ultrasonografia w diagnostyce guzów jajnika: porównanie wartości predykcyjnych oceny morfologicznej, badania przepływu dopplerowskiego i obrazowania trójwymiarowego 3D. *Ginekol Pol*. 2002, 76, 1061-1070.
- Czekierdowski A, Stachowicz N, Smoleń A, [et al.]. Zastosowanie ultrasonografii dopplerowskiej i sonoangiografii trójwymiarowej w badaniu unaczynienia i przepływu krwi w guzach przydatków macicy u kobiet. *Ginekol Pol*. 2006, 77, 296-306.
- Fox S, Gasparini G, Harris A. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*. 2001, 2, 278-289.
- Czekierdowski A. Diagnostyka ultrasonograficzna w raku jajnika. W: Ginekologia onkologiczna. Pod red. Markowska J. Wrocław: Urban&Partner, 2006, 819-833.
- Ramakrishnan S, Subramanian I, Yokoyama Y, [et al.]. Angiogenesis in normal and neoplastic ovaries. *Angiogenesis*. 2005, 8, 169-182.
- Fox S, Harris A. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS*. 2004, 112, 413-430.
- Weidner N, Semple J, Welch W, [et al.]. Tumour angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991, 324, 1-8.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, [et al.]. Tumour angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1992, 84, 1875-1887.
- Horak E, Leek R, Klenk N, [et al.]. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*. 1992, 340, 1120-1124.
- Fox S, Gatter K, Harris A. Tumour angiogenesis. *J Pathol*. 1996, 179, 232-237.
- Salvesen H, Gulluoglu M, Stefansson I, [et al.]. Significance of CD105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *APMIS*. 2003, 111, 1011-1018.
- Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002, 94, 883-893.
- Hollingsworth H, Kohn E, Steinberg S, [et al.]. Tumour angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol*. 1995, 147, 33-41.
- Abulafia O, Triest W, Sherer D. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 1997, 177, 541-547.
- Orre M, Rogers P. Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*. 1999, 73, 47-50.
- Ueda M, Terai Y, Kanda K, [et al.]. Tumour angiogenesis and molecular target therapy in ovarian carcinomas. *Hum Cell*. 2005, 18, 1-16.
- Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005, 46, 481-489.
- Srivastava A, Laidler P, Davies P, [et al.]. The prognostic significance of tumour vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative study. *Am J Pathol*. 1988, 133, 419-423.
- Wakui S, Furusato M, Itoh T, [et al.]. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol*. 1992; 168, 257-262.
- Korkolopoulou P, Patsouris E, Kavantzias N, [et al.]. Prognostic implications of microvessel morphometry in diffuse astrocytic neoplasms. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002, 28, 57-66.
- Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzias N, [et al.]. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. *Leukemia*. 2003, 17, 89-97.
- Korkolopoulou P, Gribabis D, Kavantzias N, [et al.]. A morphometric study of bone marrow angiogenesis in hairy cell leukaemia with clinicopathological correlations. *Br J Haematol*. 2003, 122, 900-910.
- Korkolopoulou P, Konstantinidou A, Kavantzias N, [et al.]. Morphometric microvascular characteristics predict prognosis in superficial and invasive bladder cancer. *Virchows Arch*. 2001, 438, 603-611.
- Hansen S, Grabau D, Sørensen F, [et al.]. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000, 6, 139-146.
- Hansen S, Sørensen F, Vach W, [et al.]. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology*. 2004, 44, 428-436.
- Offersen B, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer*. 2003, 39, 881-890.
- Mehta R, Kyshtobayeva A, Kurosaki T, [et al.]. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2001, 7, 81-88.
- Nicosia R. What is the role of vascular endothelial growth factor – related molecules in tumour angiogenesis? *Am J Pathol*. 1998, 153, 11-16.
- Leung D, Cachianes G, Kuang W, [et al.]. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989, 246, 1306-1309.
- Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AT20 cells. *EMBO J*. 1989, 8, 3801-3806.
- Unemori E, Ferrara N, Bauer E, [et al.]. Vascular endothelial growth factor induces intrastrial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992, 153, 557-562.
- Dvorak H, Brown L, Detmar M, [et al.]. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular permeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995, 146, 1029-1039.
- Ku D, Jaleski J, Liu S, [et al.]. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*. 1993, 265, 586-592.
- Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997, 14, 2475-2483.
- McCull B, Stacker S, Achen M. Molecular regulation of the VEGF family – inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*. 2004, 112, 463-480.
- Ristimäki A, Narko K, Enholm B. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem*. 1998, 273, 8413-8418.

Bednarek W.

51. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997, 18, 4-25.
52. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002, 29, 10-14.
53. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004, 25, 581-611.
54. Kieser A, Weich H, Brandner G. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene.* 1994, 9, 963-969.
55. Sowter H, Corps A, Evans A. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab Invest.* 1997, 77, 607-614.
56. Fox S, Gatter K, Harris A. Tumour angiogenesis. *J Pathol.* 1996, 179, 232-237.
57. Pradeep C, Sunila E, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Int Cancer Ther.* 2005, 4, 315-321.
58. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMS.* 2004, 112, 402-412.
59. Davis-Smyth T, Chen H, Park J, [et al.]. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J.* 1996, 15, 4919-4927.
60. Fuh G, Li B, Crowley C, [et al.]. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998, 273, 11197-11204.
61. Guo D, Jia Q, Song H, [et al.]. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 1995, 270, 6729-6733.
62. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, [et al.]. Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994, 269, 26988-26995.
63. Gerber H, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998, 273, 13313-13316.
64. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, [et al.]. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001, 20, 2768-2778.
65. Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, [et al.]. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p24/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 1997, 420, 28-32.
66. Brekken R, Overholser J, Stastny V, [et al.]. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2000, 60, 5117-5124.
67. De Vries C, Escobedo J, Ueno H, [et al.]. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992, 255, 989-991.
68. Terman B, Dougher-Vermazen M, Carrion M, [et al.]. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, 187, 1579-1586.
69. Park C, Park J, Shim S, [et al.]. An elevated maternal plasma, but not amniotic fluid, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193, 984-989.
70. Landgren E, Schiller P, Cao Y, [et al.]. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene.* 1998, 16, 359-367.
71. Fong G, Rossant J, Gertsenstein M, [et al.]. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995, 376, 66-70.
72. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, [et al.]. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001, 61, 1207-1213.
73. Kendall R, Thomas K. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 90, 10705-10709.
74. Kendall R, Wang G, Thomas K. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 226, 324-328.
75. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005, 65, 3967-3979.
76. 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.
77. Giaccone G, Rodriguez JA. EGFR inhibitors: what have we learned from the treatment of lung cancer? *Nat Clin Pract Oncol.* 2005, 2, 554-561.
78. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem.* 1987, 56, 881-914.
79. Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, [et al.]. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995, 19, 183-232.
80. Thompson D, Gill G. The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv.* 1985, 4, 767-788.
81. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001, 37, suppl 4, 3-8.
82. Ellis L. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004, 18, 1007-1021.
83. Gamou S, Shimizu N. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* 1995, 357, 161-164.
84. Marth C, Widschwendter M, Kaern J, [et al.]. Cisplatin resistance is associated with reduced interferon-gamma-sensitivity and increased HER-2 expression in cultured ovarian carcinoma cells. *Br J Cancer.* 1997, 76, 1328-1332.
85. Pegram M, Finn S, Arzoo K. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene.* 1997, 15, 537-547.
86. Montgomery R, Guzman J, O'Rourke D, [et al.]. Expression of oncogenic epidermal growth factor receptor family kinases induces paclitaxel resistance and alters beta-tubulin isotype expression. *J Biol Chem.* 2000, 275, 17358-17363.
87. Neijt J, Engelholm S, Tuxen M, [et al.]. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2000, 18, 3084-3092.
88. Bednarek W. Rola wybranych markerów i modulatorów angiogenezy w prognozowaniu wyników skojarzonego leczenia raka jajnika. *Rozprawa habilitacyjna.* Lublin: Akademia Medyczna, 2006
89. Kim S, Uehara H, Karashima T, [et al.]. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 1200-1210.
90. Schreiber A, Winkler M, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science.* 1986, 232, 1250-1253.
91. De Jong J, van Diest P, van der Valk P [et al.]. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol.* 1998, 184, 53-57.
92. Bednarek W, Barczyński B, Kotarski J. Wartość prognostyczna sVEGFR-1 w przewidywaniu oporności na cisplatinę i paclitaxel u chorych na raka jajnika. *Prz Menopauz.* 2005, 5, 65-71.
93. Bednarek W, Mazurkiewicz M, Kotarski J. Ocena angiogenezy w tkance guza w prognozowaniu efektów chemioterapii pierwszorazowej. W: *Kontrowersje w ginekologii onkologicznej.* Pod red. Kotarski J. Lublin, 2005, 119-124.
94. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMS.* 2004, 112, 496-507.
95. Rasila K, Burger R, Smith H, [et al.]. Angiogenesis in gynecological oncology – mechanism of tumor progression and therapeutic targets. *Int J Gynecol Cancer.* 2005, 15, 710-726.
96. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer Control.* 1999, 6, 436-458.
97. Dupont J, Aghajanian C, Sabbatini P, [et al.]. New agents for treatment of ovarian cancer: the next generation. *Int J Gynecol Cancer.* 2005, 15, suppl 3, 252-257.
98. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 727-739.
99. Good D, Polverini P, Rastinejad F, [et al.]. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87, 6624-6628.
100. Chen H, Herndon M, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000, 19, 597-614.
101. Iruela-Arispe M, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004, 36, 1070-1078.
102. Zabrenetzky V, Harris C, Steeg P, [et al.]. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 1994, 59, 191-195.
103. Streit M, Riccardi L, Velasco P, [et al.]. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96, 14888-14893.
104. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, [et al.]. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* 2001, 20, 2631-2640.
105. Lane D. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature.* 1992, 358, 15-16.
106. Vogelstein B, Lane D, Levine A. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000, 408, 307-310.
107. Lawler J, Miao WM, Duquette M, [et al.]. Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice. *Am J Pathol.* 2001, 159, 1949-1956.
108. Stellmach V, Volpert O, Crawford S, [et al.]. Tumour suppressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in fibroblasts. *Eur J Cancer.* 1996, 32, 2394-2400.
109. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer Control.* 1999, 6, 436-458.
110. Dameron K, Volpert O, Tainsky M, [et al.]. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994, 265, 1582-1584.
111. Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, [et al.]. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene.* 1997, 15, 2145-2150.
112. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme V. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.* 1995, 55, 6161-6165.
113. Kieser A, Weich H, Brandner G. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene.* 1994, 9, 963-969.