

**Artykuł na zaproszenie redakcji • Invited article****Czynniki układu hemostazy,  
a angiogeneza w nowotworach**

Ewa Sierko, Roman J. Zawadzki, Marek Z. Wojtukiewicz

*W przebiegu choroby nowotworowej często obserwuje się występowanie powikłań zakrzepowo-zatorowych. Istnieje wiele doniesień opisujących udział czynników układu krzepnięcia krwi i fibrynolizy w rozwoju nowotworów i tworzeniu przerzutów. Okazuje się, że aktywacja krzepnięcia krwi zachodzi nie tylko w łożysku naczyniowym, ale również w miejscu rozwoju nowotworu in loco. Niezbędnym etapem w rozwoju nowotworów jest wytworzenie nowej sieci naczyń krwionośnych w obrębie guza. Jako, że układ hemostazy jest anatomicznie i czynnościowo związany z naczyniami krwionośnymi, w niniejszej pracy podjęto próbę zebrania i usystematyzowania informacji, dotyczących wpływu czynników tego układu na proces angiogenezy w nowotworach. Czynniki układu krzepnięcia krwi (m.in. czynnik tkankowy, trombina, fibrynogen/fibryna), układu fibrynolizy (m.in. plazmina, PAs, PAI, uPAR), jak też płytki krwi poprzez wielokierunkowe interakcje z komórkami nowotworowymi, komórkami śródbłonna, komórkami jednojądrzastymi i elementami macierzy międzykomórkowej sprzyjają powstaniu sieci nowych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu. Jednocześnie układ hemostazy jest też źródłem ukrytych inhibitorów procesu angiogenezy (m.in. angiostatyny, antyangiogennej antytrombiny III).*

*Dogłębne poznanie wpływu czynników układu hemostazy na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych może w przyszłości otworzyć nowe kierunki terapii wspomagającej w leczeniu nowotworów. Wydaje się, że na uwagę zasługuje wykorzystanie naturalnych inhibitorów angiogenezy, będących składnikami układu hemostazy oraz zastosowanie leków interferujących z czynnikami układu krzepnięcia krwi i fibrynolizy.*

**Components of hemostatic system and angiogenesis in malignancy**

*Thromboembolic complications are common events during malignant progression. Also the impact of the hemostatic system on the process of tumor growth and metastatic dissemination is well recognized. The activation of blood coagulation is observed not only in the intravascular compartment, but also takes place extravascularly – at the tumor burden. There is mounting evidence that the process of new blood vessels forming is an important and necessary stage of cancer growth. As the hemostatic system is anatomically and functionally connected with blood vessels, the aim of this work was to summarize the available data on the influence of the coagulation/fibrinolytic system on angiogenesis in malignancy.*

*The components of the coagulation system (e.g. tissue factor, thrombin, fibrinogen/fibrin), as well as the fibrinolytic system (i.g. plasmin, PAs, PAI, uPAR) and blood platelets facilitate neovascularisation through multidirectional interactions with neoplastic, endothelial, mononuclear cells and extracellular matrix elements. On the other hand, the hemostatic system is the source of “hidden” inhibitors of angiogenesis (i.g. angiostatin, antiangiogenic antithrombin III).*

*Precise knowledge of the impact of components of the hemostatic system on angiogenesis may allow to introduce new therapeutic modalities as cancer adjuvant treatment. It seems that the concept of administration of natural inhibitors which are constituents of hemostatic system and drugs interfering with blood coagulation/fibrinolytic factors is of great interest.*

**Słowa kluczowe:** hemostaza, angiogeneza, nowotwory

**Key words:** hemostasis, angiogenesis, neoplasms

W przebiegu choroby nowotworowej często obserwowanymi powikłaniami są zaburzenia krzepnięcia krwi [1]. Pojawiają się one jako objawy prodromalne nowotworów, występują w okresie czynnym procesu nowotworowego,

ujawniają się w okresie remisji, bądź stanowią działanie niepożądane zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego [przegląd piśmiennictwa w 1, 2]. Nierzadko są też przyczyną śmierci chorych na nowotwory (np. DIC odpowiada za 10-20% zgonów pacjentów z ostrą białaczką). Występują one pod wieloma postaciami klinicznymi, które określić można wspólnym mianem „zespołów paraneoplastycznych” czy też „koagulopatii nowotworowej” [przegląd piśmiennictwa w 1, 2].

Patomechanizm powstawania zaburzeń zakrzepowo-zatorowych w nowotworach jest bardzo skomplikowany i nie do końca poznany. W wielu nowotworach złośliwych udokumentowano aktywację krzepnięcia krwi nie tylko w łożysku naczyniowym, ale i poza nim – w miejscu rozwoju nowotworu [1-3]. Obecnie wiadomo, iż aktywacja krzepnięcia krwi nie tylko prowadzi do powstania zaburzeń zakrzepowo-zatorowych, ale stanowi też integralny mechanizm rozwoju nowotworów *in loco* i tworzenia przerzutów [1-3]. Z uwagi na fakt, że układ hemostazy jest anatomicznie i czynnościowo związany z naczyniami krwionośnymi, interesującym wydaje się jego wpływ na proces neoangiogenezy w guzach nowotworowych.

W wielu guzach nowotworowych (m.in. w raku jelita grubego [4], piersi [5], trzustki [6], trzonu macicy [7], nerki [8], płuca [9], nowotworach mózgu [10]) obserwuje się zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych w porównaniu do tkanki prawidłowej. Ilość nowopowstałych naczyń krwionośnych często koreluje z postępem choroby i ciężkością jej przebiegu. Przykładem mogą być nowotwory mózgu, gdzie gęstość naczyń krwionośnych jest zdecydowanie większa w glejaku wielopostaciowym niż w nowotworach mózgu o niższym stopniu złośliwości histopatologicznej [10]. Z kolei w niedrobnokomórkowym raku płuca duża gęstość naczyń korelowała z wystąpieniem przerzutów odległych [9], zaś w raku żołądka gęstość naczyń uznano za czynnik prognostyczny [11]. W raku jelita grubego w czwartym stopniu zaawansowania choroby stwierdzono o 70% więcej naczyń krwionośnych niż w przypadku choroby o zaawansowaniu miejscowym [4]. U kobiet z rakiem piersi, bez przerzutów do węzłów chłonnych, mała ilość naczyń krwionośnych w obrębie guza korelowała z dłuższym przeżyciem bez objawów choroby, natomiast duża gęstość naczyń związana była z występowaniem przerzutów w węzłach chłonnych i przerzutów odległych [5].

W początkowym etapie nowotwory rozwijają się jako małe, nieunaczynione zmiany, które pozostają w stanie spoczynku („*dormancy*”) [12]. Przed trzydziestu laty Folkman sformułował aktualną do dziś hipotezę, że powstanie nowej sieci naczyniowej w obrębie nowotworu jest warunkiem koniecznym dla wzrostu guza nowotworowego powyżej 2-3 mm<sup>3</sup> i rozwoju przerzutów [12]. Bezpośrednie sąsiedztwo naczyń krwionośnych i komórek guza nowotworowego umożliwia tym ostatnim dostanie się do krwioobiegu i tworzenie przerzutów odległych, które mogą pozostać przez długi czas w stanie spoczynku, aż do momentu, gdy proces waskularyzacji będzie w nich inicjowany *de novo* [13,14].

Angiogeneza to tworzenie się nowych naczyń krwionośnych z istniejących już drobnych naczyń włosowatych poprzez „kiełkowanie” [15]. Ten wielostopniowy proces obejmuje proteolizę błony podstawnej naczyń krwionośnych i macierzy międzykomórkowej, pobudzenie pozostających w spoczynku komórek śródbłonna naczyniowego do proliferacji i migracji, oraz przebudowę nowopowstałych sznurów naczyniowych, z wytworzeniem ich światła i powstaniem połączeń (anastomoz) pomiędzy nimi [15].

Wydaje się, iż nabycie właściwości angiogennych (tzw. fenotypu angiogennego, *angiogenic phenotype*) przez guz nowotworowy jest złożonym procesem. Obecnie uważa się, że jest wynikiem przesunięcia równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi a hamującymi angiogenezę, pochodzącymi zarówno z komórek nowotworowych, jak i komórek gospodarza [14, 15]. Nowopowstałe naczynia nie tylko dostarczają składników odżywczych i tlenu komórkom guza, ale poprzez syntetyzowanie licznych czynników wzrostu i białek macierzy międzykomórkowej przez komórki śródbłonna w sposób parakrynnie stymulują komórki nowotworu [16]. Czynniki, które regulują angiogenezę, mogą być dodatkowo wydzielane przez naciekające nowotwór komórki jednojądrzaste, uwalniane z macierzy zewnątrzkomórkowej, bądź mogą pochodzić z osocza krwi [17]. Aktywacja angiogenezy jest wynikiem nie tylko wzrostu aktywności czynników stymulujących ten proces, ale również zmniejszenia wpływu inhibitorów angiogenezy [16], działających zarówno miejscowo (trombospondyna 1 – TSP-1, interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) [18,19], jak i układowo (angiostatyna, endostatyna, aaATIII) [20, 21].

W przypadku procesu nowotworowego zaburzenie równowagi pomiędzy aktywatorami a inhibitorami angiogenezy może być przypisane bezpośrednio i pośrednio wpływowi zmian genetycznych, stanowiących podstawę progresji nowotworów [22]. A zatem mutacje, powodujące utratę funkcji genów supresorowych w komórkach guza (np. *p53*), mogą wpływać z jednej strony na ekspresję inhibitorów angiogenezy (np. TSP-1) [22], z drugiej zaś – aktywatorów tego procesu (np. VEGF) [23]. Podobnie zmiany genetyczne, prowadzące do nabycia pewnych właściwości, jak np. aktywacja dominujących transformujących onkogenów w komórkach guza (np. *ras*, *myc*), wpływają na wiele czynników, związanych z procesem angiogenezy [24]. W obu przypadkach efekt zmian genetycznych może być wzmocniony przez działanie czynników zewnętrznych, czego przykładem może być wpływ niedotlenienia, kontaktu międzykomórkowego, parakrynnych czynników wzrostu i cytokin reakcji zapalnej, obecnych w mikrośrodku guza nowotworowego. Czynniki pochodzące z komórek, które uległy transformacji nowotworowej, mogą w sposób pośredni oddziaływać na komórki podścieliska, indukując w nich wystąpienie fenotypu angiogennego [25]. Interesujące jest, że zmiany genetyczne w obrębie komórek nowotworowych mogą w podobny sposób wpływać na zaburzenia układu hemostazy [25].

Jednym z kluczowych etapów angiogenezy w nowotworach jest przenikanie białek osocza krwi do przestrzeni zewnątrznaczyniowej [26]. Za zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych odpowiedzialny jest głównie VEGF (*vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń), który, z uwagi na wyżej wymienione właściwości, znany jest również jako czynnik przepuszczalności naczyń (*vascular permeability factor* – VPF). Powoduje on powstawanie fenestracji pomiędzy komórkami śródbłonna [17, 26]. Wpływ VEGF na przepuszczalność drobnych naczyń krwionośnych jest ok. 50 tysięcy razy silniejszy niż histaminy [26]. VEGF powoduje

przejście komórek śródbłonna ze stanu spoczynku do stanu, w którym wykazują one fenotyp angiogeny, prowadząc do proliferacji, migracji i formowania sznurów naczyniowych [17]. VEGF indukuje chemotaksję i aktywację monocytów [17]. Pełni też funkcję „czynnika przetrwania” [17]. Zwiększoną ekspresję VEGF obserwuje się w ogromnej większości guzów litych i w białaczkach [17]. Obecnie uważa się, że ekspresja VEGF zależy głównie od czynników wewnętrznych, związanych z transformacją nowotworową (np. mutacja genu *p53* [23], jak również aktywacja onkogenów *ras* [24], prowadzi do zwiększonej syntezy VEGF). W mniejszym zaś stopniu zależy ona od czynników zewnętrznych, z których najważniejszym jest niedotlenienie [17, 27].

VEGF wywiera swój biologiczny efekt poprzez łączenie się z receptorami o wysokim powinowactwie – VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR/Flk-1 – znajdującymi się głównie na powierzchni komórek śródbłonna [17, 27].

Badania ostatnich lat coraz ściślej wskazują na fakt, że synteza VEGF przez komórki guza nowotworowego i jego interakcje z receptorami komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, są ważnym elementem we wzajemnych relacjach pomiędzy nowotworem, drobnymi naczyniami krwionośnymi, a układem hemostazy.

### Czynniki układu krzepnięcia krwi a angiogeneza w nowotworach

#### Czynnik tkankowy

Obecnie przyjmuje się, że najważniejszym prokoagulantem w chorobie nowotworowej jest czynnik tkankowy (*tissue factor*, TF) [przegląd piśmiennictwa w 1, 2]. Jego ekspresję stwierdzono w wielu nowotworach złośliwych: w drobno- i niedrobnokomórkowym raku płuca, guzach mózgu, czerniaku złośliwym, raku trzustki, żołądka, szyjki i trzonu macicy, jajnika, pęcherza moczowego, raku płaskonabłonkowym okolicy głowy i szyi, a także w części raków piersi i jelita grubego [1, 28-32]. Zwiększoną aktywność TF obserwowano we krwi (zarówno związanej z komórkami nowotworowymi, jak też z krążącymi monocytami) [32] i w moczu [33] pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową.

Funkcjonalnie TF może wpływać na angiogenezę na drodze wielorakich mechanizmów w sposób bezpośredni – poprzez przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz pośredni – poprzez generację trombiny i przekazywanie komórkowe, wywoływane jej działaniem, a także poprzez udział w tworzeniu proangiogennej fibryny [19, 33-38].

Badania, opierające się na wymuszonym zmniejszeniu ekspresji TF, dostarczyły bezsprzecznych dowodów na istotną rolę tego czynnika w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych w okresie rozwoju embrionalnego, jak również w warunkach patologicznych, m.in. w chorobie nowotworowej. Mutacja genu kodującego TF u homozygotycznych myszy prowadziła do ich umierania w macicy, przy czym stwierdzano istotne nieprawidłowości naczyń krwionośnych woreczka żółtkowego [39]. Wykazano rów-

nież, że TF indukuje wzrost transkrypcji genu kodującego syntezę VEGF i obniżenie transkrypcji genu odpowiedzialnego za powstawanie inhibitora angiogenezy – TSP-1 w komórkach nowotworowych [19]. Zależność pomiędzy ekspresją TF a VEGF w komórkach guza została następnie potwierdzona w kilku badaniach: w komórkach ludzkiego czerniaka, rozwijającego się jako przeszczep ksenogeniczny u myszy o osłabionej odpowiedzi immunologicznej oraz w raku piersi, raku niedrobnokomórkowym płuca i glejakach mózgu u ludzi [29, 36, 38, 40].

Ekspresja zarówno TF, jak i VEGF regulowana jest przez hipoksję [35]. Amirhosravi i wsp. [35] wykazali, że pentoksyfilina, znana ze swoich właściwości obniżania ekspresji TF na monocytach i komórkach śródbłonna naczyń, hamuje, zależną od niedotlenienia, syntezę TF i VEGF w komórkach trzech różnych linii komórkowych nowotworów złośliwych. Czynniki transkrypcyjnego HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) przypisuje się udział w stymulowaniu syntezy VEGF [17], natomiast wzrost ekspresji TF jest niezależny od czynnika HIF-1, jako że zwiększoną ekspresję TF obserwowano w przypadku nieobecności podjednostki  $\beta$  czynnika HIF-1 [41]. Badania eksperymentalne, przeprowadzone na homozygotycznych myszach z mutacją genu kodującego czynnik *Egr-1* (*early growth response gene*), wykazały, że ten czynnik transkrypcyjny jest odpowiedzialny za zwiększoną ekspresję TF w niedotlenionej tkance płuca [42]. Poza tym udowodniono, że czynnik *Egr-1* wpływa na indukowaną przez VEGF lub TNF- $\alpha$  ekspresję TF na komórkach śródbłonna naczyń [43].

TF jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 46 kDa [1]. Jest on integralnym białkiem błony komórkowej, zbudowanym z trzech domen: zewnątrzkomórkowej (odpowiedzialnej za wiązanie czynnika VIIa), śródbłonowej (kotwiczącej TF w błonie komórkowej) i krótkiego cytoplazmatycznego ogona [1]. W ostatnich latach na temat TF ukazało się wiele doniesień, będących przedmiotem dyskusji. Otóż Abe i wsp. [34] wykazali, że transfekowanie cDNA, kodującego jedynie część cytoplazmatyczną TF do komórek ludzkiego czerniaka, powodowało zwiększenie ekspresji VEGF w tych komórkach. Dodatkowo część cytoplazmatyczna TF wywołuje sygnały wewnątrzkomórkowe, prowadzące do aktywacji kinazy C, której przypisuje się udział w zwiększaniu syntezy VEGF, w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne [44]. Istnieje jednakże szereg danych poddających w wątpliwość dominującą rolę cytoplazmatycznej domeny TF [24, 37, 45, 49], a implikujących znaczący wpływ zewnątrzkomórkowej części TF w tym procesie. Przyłączenie aktywnego czynnika VII (VIIa) do TF indukuje wewnątrzkomórkową oscylację jonów wapnia [45], fosforylację tyrozyny [46], aktywację szlaku przekazywania komórkowego, zależnego od kinazy białkowej, aktywowanej mitogenem (*MAP-kinase – mitogen-activated protein kinase*) [47], głównego szlaku odpowiedzialnego za syntezę VEGF, a także innych kinaz, biorących udział w regulacji ekspresji VEGF, np. kinazy 3'OH fosfatydyloinozytolu (PI3K), czy czynników należących do rodziny białek *src* [48]. Poza tym w badaniach eksperymentalnych wykazano, że wprowadzenie genu kodujące-

go część zewnątrzłonową TF homozygotycznym myszom, pozbawionym genu odpowiedzialnego za syntezę pełnocząsteczkowego TF, przywracało zdolność syntezy domeny zewnątrzłonowej TF, co w konsekwencji zabezpieczało przed wystąpieniem anomalii naczyń i chroniło przed śmiercią embrionów takich myszy [49].

Aktywność prokoagulacyjna kompleksu TF/VIIa prowadzi do powstania aktywnego czynnika X (Xa). Czynnikiem ten, poprzez aktywację receptorów PARs (*protease-activated receptors*) na powierzchni komórek, wpływa na ekspresję różnych genów, w tym kodujących czynniki regulujące angiogenezę. Aktywność katalityczną kompleksu TF/VIIa oraz czynnika Xa inaktywuje TFPI (inhibitor zewnątrzłonowej drogi krzepnięcia krwi – *tissue factor pathway inhibitor*), który jest syntetyzowany przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych i makrofagi [50]. Aktywność inhibitorowa TFPI prowadzi do łączenia się tego czynnika z czynnikiem Xa i kompleksem TF/VIIa i powstania czwartorzędowego kompleksu, który następnie jest transportowany do błonowych pęcherzyków (*caveolae*) [51], co prowadzi do zahamowania aktywności proteolitycznej powyższych czynników, a jednocześnie umiejscawia TF w bezpośrednim sąsiedztwie elementów szlaku sygnałowego komórki, takich, jak np.: receptory wiążące białko G, kinazy tyrozynowe, czy błonowe pompy wapniowe [52]. Możliwe, że proces ten wpływa na angiogenezę, ale z pewnością wymaga to jeszcze potwierdzenia szeregiem badań.

VEGF, poprzez łączenie się z receptorem VEGFR-1 na monocytach/makrofagach, indukuje również ekspresję TF w tych komórkach oraz wywołuje ich migrację [27]. Prawdopodobnie po części odpowiada za obecność makrofagów w guzie nowotworowym, co dodatkowo sprzyja fenotypowi proangiogennemu nowotworu [27]. Również komórki śródbłonka, stymulowane przez VEGF, odpowiadają wzrostem ekspresji TF, co może prowadzić do dodatkowego zwiększenia potencjału prokoagulacyjnego, a w następstwie – proangiogennego w guzie nowotworowym [43].

VEGF, oprócz wyżej opisanego wpływu na TF, indukuje ekspresję czynników układu fibrynolizy, a mianowicie aktywatora plazminogenu typu tkankowego (t-PA), urokinazy (u-PA), inhibitora aktywatorów plazminogenu typu-1 (PAI-1), a także receptora dla urokinazy (u-PAR) na komórkach śródbłonka naczyń [53, 54]. Wydaje się, że te, z pozoru przeciwstawne efekty działania VEGF, są w rzeczywistości wykładnikiem nowej równowagi, sprzyjającej powstawaniu naczyń krwionośnych w obrębie guza, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju nowotworu i powstawania przerzutów.

## Trombina

Aktywacja, zależnej od TF drogi krzepnięcia krwi, prowadzi do powstania trombiny – czynnika stymulującego angiogenezę [38, 55, 56]. Obecność trombiny wykazano w wielu guzach nowotworowych (m.in. w drobnokomórkowym raku płuca, nerki, jajnika, krtani, żołądka, czerniaku złośliwym) [przegląd piśmiennictwa w 1]. Trombina pełni

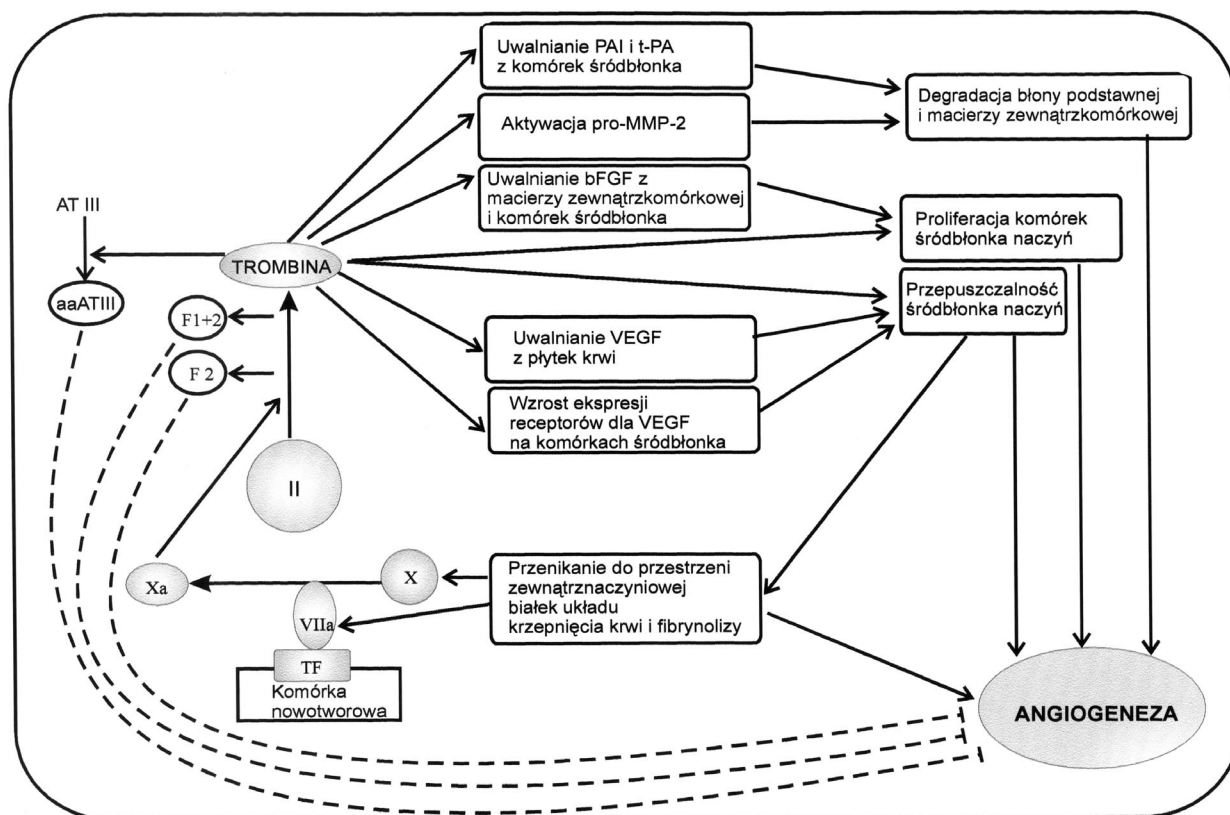
istotną funkcję w progresji nowotworów [1, 57-59]. Prowadzi do wzrostu syntezy TF w różnych komórkach, co dodatkowo eskaluje aktywację krzepnięcia krwi, obserwowaną w nowotworach [1]. Trombina *per se* wywołuje efekt mitogeny, jak również zwiększa wpływ innych mitogenów na komórki guza nowotworowego [1, 58, 59].

Trombina wywiera efekt proangiogeny, który w pewnej mierze jest spowodowany jej działaniem na wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Proces ten jest wynikiem indukcji kadheryn, obecnych na powierzchni komórek śródbłonka i aktywacji mechanizmu zależnego od fosfatazy tyrozynowej SHP2 [60]. Trombina wpływa na angiogenezę, niezależnie od tworzenia fibryny [56]. Tsopanoglou i wsp. wykazali na modelu CAM (*chorion allantoinic membrane*), że zarówno  $\alpha$ -trombina (zawierająca w swej cząsteczce część katalityczną i koniec anionowy), jak i  $\gamma$ -trombina (wykazująca aktywność katalityczną, lecz nie posiadająca końca anionowego, koniecznego dla jej aktywności prokoagulacyjnej) promują angiogenezę *in vivo* [56]. Trombina, poprzez łączenie się ze swoistym receptorem (PAR-1) na powierzchni komórek śródbłonka lub przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki, niezależne od swojej aktywności proteolitycznej (poprzez sekwencję aminokwasów łańcucha  $\alpha$ -trombiny), wywiera efekt mitogeny w stosunku do komórek śródbłonka [61]. Trombina zwiększa ekspresję receptorów dla VEGF na komórkach śródbłonka (tj. Flt-1 i KDR) [55], powoduje uwalnianie VEGF z płytek krwi, bFGF z komórek śródbłonka i obu tych czynników z zasobów macierzy zewnątrzkomórkowej [27]. Dodatkowo zwiększa ekspresję t-PA i PAI-1 [62]. Tylko zrównoważone działanie aktywatorów i inhibitorów plazminogenu zapewnia internalizację kompleksu u-PAR/PA/PAI-1 i w konsekwencji redystrybucję u-PAR w błonie komórek śródbłonka, w miejscu inwazji nowotworu, która – lokalizując aktywność plazminy – reguluje proces proteolizy elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Poza tym trombina aktywuje prozelatynazę A (MMP-2), dodatkowo zwiększając nasilenie degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, niezbędnej dla migracji komórek śródbłonka [62], a także prowadzi do degradacji inhibitora angiogenezy – TSP-1. Podczas, gdy trombina uważana jest za czynnik stymulujący neowaskularyzację, w obrębie cząsteczki jej proenzymu – protrombiny znajdują się ukryte inhibitory tego procesu – fragment F1+2 i fragment 2 [63]. Dodatkowo cząsteczka antytrombiny III (AT III) ulega degradacji pod wpływem działania trombiny oraz elastazy neutrofilii, dostarczając kolejnego inhibitora angiogenezy – antyangiogennej antytrombiny III (aaAT III) [21].

Rycina 1 przedstawia w skrócie wpływ trombiny na angiogenezę w nowotworach.

## Fibrynogen/fibryna

Prokoagulacyjna aktywność trombiny prowadzi do przekształcenia fibrynogenu w fibrynę. U chorych na nowotwory często stwierdza się zwiększony obrót fibrynogenu oraz skrócony okres jego półtrwania w osoczu krwi [przegląd piśmiennictwa w 1]. Obecność fibryny w przestrzeni



Ryc. 1. Proponowany schemat wpływu trombiny na angiogenezę w nowotworach.

Użyte skróty: VEGF-czynnik wzrostu śródbłonną naczyń, bFGF-zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, TF-czynnik tkankowy, II-protrombina, X-czynnik X krzepnięcia krwi, VIIa, Xa-aktywne formy odpowiednich czynników krzepnięcia krwi, F2-fragment 2 protrombiny, F1+2-fragment 1+2 protrombiny, AT III-antytrombina III, aaATIII-antyangienna antytrombina III, pro-MMP-2-proenzym metaloproteinazy-2, tPA-aktywator plazminogenu typu tkankowego, PAI-inhibitor aktywatorów plazminogenu.

pozanaczyniowej, potwierdzająca zachodzącą tam aktywację krzepnięcia krwi, została udokumentowana w szeregu nowotworów złośliwych [1, 3, 26, 38].

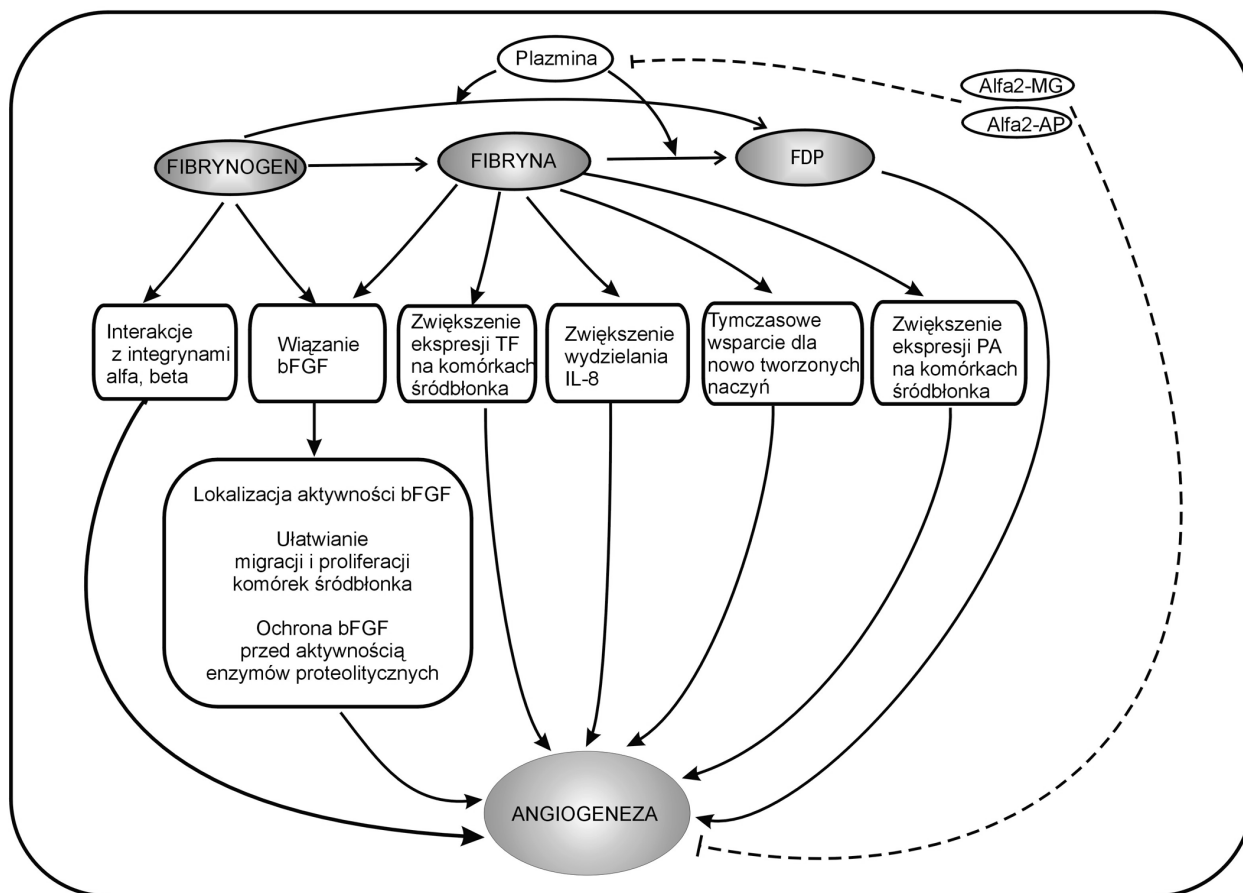
Sieć fibryny, podobnie jak w przypadku komórek nowotworowych, stanowi mechaniczne wsparcie dla migrujących komórek śródbłonną naczyń. Fibryna i fibrynogen indukują ekspresję TF, co – przy stwierdzanej często w nowotworach nadmiernej aktywności prokoagulacyjnej, zależnej od TF, prowadzącej w konsekwencji do nadprodukcji fibryny, doprowadza do wytworzenia dodatniego sprzężenia zwrotnego typu samonapędzającego się „błędne koło”. Fibrynogen, poprzez łączenie się odcinka 572-574 łańcucha  $\alpha$  fibrynogenu z integrzynami  $\alpha_v\beta_3$ , powoduje przekazywanie komórkom śródbłonną „sygnałów przeżycia” [26, 64]. Również stabilizujący fibrynę – czynnik XIII, może być ligandem dla antyapoptycznej integryny  $\alpha_v\beta_3$  [65]. Poza tym fibryna i fibrynogen zwiększają ekspresję proangiogenicznej IL-8 i aktywatorów plazminogenu w komórkach śródbłonną [36]. Odszczepienie fibrynopeptydu B od cząsteczki fibrynogenu i odśnięcie fragmentu  $\alpha_{15-42}$  fibryny stymuluje proliferację i migrację komórek śródbłonną [66]. Ponadto produkty degradacji fibryny – głównie fragment E, nasilają angiogenezę [67]. Dodatkowo fibryna i fibrynogen ułatwiają aktywację i utrzymanie stabilności bFGF oraz prawdopodobnie innych czynników proangiogenicznych. Zasadowy FGF wpływa na migrację i proliferację komórek śródbłonną, a także reguluje proteolizę macierzy zewnątrz-

trzymórkowej. VEGF i bFGF wykazują synergizm w pobudzaniu angiogenezy [68]. Zasadowy FGF jest wtórną, działającą autokrynnie lub intrakrynnie cytokiną, której synteza jest kontrolowana m.in. przez VEGF [69]. Dodatkowo bFGF, pod wpływem trombiny, zwiększa ilość receptorów dla VEGF – KDR/VEGFR-2 na komórkach śródbłonną [55]. TF, stymulując syntezę VEGF, czy prowadząc do generacji trombiny i formowania fibryny, w sposób pośredni wpływa na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych – regulując aktywność bFGF i prawdopodobnie innych czynników proangiogenicznych.

Rycina 2 w sposób uproszczony przedstawia wpływ fibrynogenu, fibryny i produktów ich rozpadu na angiogenezę w nowotworach.

#### Czynniki układu fibrynolizy a angiogeneza w nowotworach

W licznych badaniach (m.in. w raku piersi, żołądka, płuca, jajnika, czerniaku złośliwym i w nowotworach mózgu) zaobserwowano korelację pomiędzy silną ekspresją u-PA, a wysokim stopniem złośliwości histopatologicznej, dużym zaawansowaniem procesu nowotworowego i złym rokowaniem [70-74]. Również wysoka ekspresja t-PA, w raku piersi [75] i czerniaku złośliwym [76], czy też podwyższone stężenie PAI-1 w różnych nowotworach [70, 73, 74], korelowały z niekorzystnym rokowaniem. Bajou i wsp. [77] sformułowali hipotezę, że do agresywnego wzrostu



Ryc. 2. Proponowany schemat wpływu fibrynowego układu na angiogenezę w nowotworach.

Użyte skróty: bFGF-zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, IL-8-interleukina, TF-czynnik tkankowy, PA-aktywatory plazminogenu, alfa2-MG – alfa 2 makroglobulina, alfa2-AP – alfa 2-antypłazmina.

nowotworu prowadzi zrównoważona aktywacja poszczególnych czynników układu fibrynolizy, a nie zaburzenie tego układu, dotyczące jednego z jego czynników.

Czynniki proangiogenne, takie jak: VEGF i bFGF, powodują wzrost ekspresji aktywatorów plazminogenu (PAs), ich receptorów (u-PAR) i inhibitorów (PAI-1) w komórkach śródbłonna [26, 53, 54, 69]. Wykazano, że działają one synergistycznie w indukowaniu zarówno angiogenezy [68], jak i w regulowaniu ekspresji u-PA i u-PAR w komórkach BME (*bovine adrenal cortex-derived microvascular endothelial cells*) [78]. Dodatkowo zaobserwowano ko-lokalizację u-PA, t-PA, PAI-1 i VEGF w gwiazdziakach mózgu u szczurów [79], a także – u-PA i VEGF w raku jelita grubego u ludzi [80].

Powstała zewnętrznie fibryna z jednej strony dostarcza „rusztowania”, sprzyjającego wzrostowi nowych naczyń krwionośnych, z drugiej zaś stanowi barierę dla migracji komórek śródbłonna. Proteolityczna aktywność komórek śródbłonna w głównej mierze jest wynikiem działania plazminogenu, a także t-PA i u-PA [81]. Aktywatory plazminogenu powodują przekształcenie plazminogenu do plazminy, która posiada właściwości degradacji większości białek macierzy międzykomórkowej w sposób bezpośredni oraz pośredni (poprzez aktywację innych zymogenów, w tym nieaktywnych form metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej) [81, 82]. Istotnym etapem w regulacji aktywności układu fibrynolizy jest wiązanie

się u-PA z jego błonowym receptorem, u-PAR [53, 82, 83]. Połączenie to przyspiesza aktywację u-PA, który związany z receptorem wykazuje wyższą aktywność, ale jednocześnie ta aktywna forma u-PA jest bardzo szybko inaktywowana przez PAI-1 [82, 83]. Powstały kompleks u-PA/PAI-1 w połączeniu z u-PAR jest następnie internalizowany, przy czym kompleks u-PA/PAI-1 jest degradowany w lizosomach, a u-PAR jest ponownie transportowany na powierzchnię komórki [82, 83], gdzie może pojawiać się w różnej lokalizacji. Dodatkowo wiązanie u-PA z u-PAR indukuje mobilizację tych receptorów w miejscu łączenia się z ligandem [53]. Interesujące jest, że ekspresję u-PAR w migrujących monocytach i komórkach nowotworu obserwowano w części błony komórkowej określonej jako tzw. „*invasion front*” [53]. Aktywatory plazminogenu i plazmina biorą więc udział w degradacji macierzy międzykomórkowej, sprzyjając w ten sposób angiogenezie. Z kolei inhibitory fibrynolizy, tj.  $\alpha_2$ -antypłazmina i  $\alpha_2$ -makroglobulina, blokują ten proces poprzez hamowanie inwazji komórek śródbłonna naczyń [84].

Czynniki układu fibrynolizy wywierają też wpływ na adhezję komórek i przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki. Połączenie obecnego na powierzchni komórek śródbłonna u-PAR z witronektyną hamuje adhezję komórek, co w rezultacie może ułatwiać angiogenezę [85]. Reakcję tę blokuje PAI-1 [85]. Z drugiej strony, domena 2/3 u-PAR komórek śródbłonna jest receptorem wielkoczą-

steczkowego kininogenu (HK) [86], a połączenie to jest z kolei blokowane przez witronektynę [86]. Powstanie kompleksu HK/kalikeina powoduje dalszą aktywację plazminogenu i nasilenie fibrylizacji w hodowli komórek śródbłonka naczyń [86]. Dodatkowo domena 5 HK (kininostatyna) hamuje proliferację i migrację komórek śródbłonka, hamując tym samym angiogenezę [87]. Poza tym przyłączenie u-PA do receptora u-PAR wywołuje powstawanie sygnałów wewnątrzkomórkowych, mogących wpływać na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych [83, 88].

Kolejnym istotnym mechanizmem neowaskularyzacji jest udział czynników układu fibrylizacji w proteolitycznej aktywacji czynników proangiogennych i cytokin: u-PA aktywuje pro-HGF (czynnik wzrostu hepatocytów), natomiast plazmina – bFGF i TGF- $\beta$  (transformujący czynnik wzrostu-beta) [89, 90]. HGF jest czynnikiem proangiogennym, stymuluje syntezę VEGF, zwiększa ruchomość i ułatwia inwazję komórek śródbłonka [91, 92]. TGF- $\beta$  natomiast, mimo, że wykazuje właściwości antyangiogenne *in vitro*, stymuluje angiogenezę *in vivo* poprzez wpływ na proteolizę [70], dojrzewanie nowopowstałych naczyń krwionośnych [93], uwalnianie VEGF [94] oraz hamowanie powstawania inhibitora angiogenezy – angiostatyny [95].

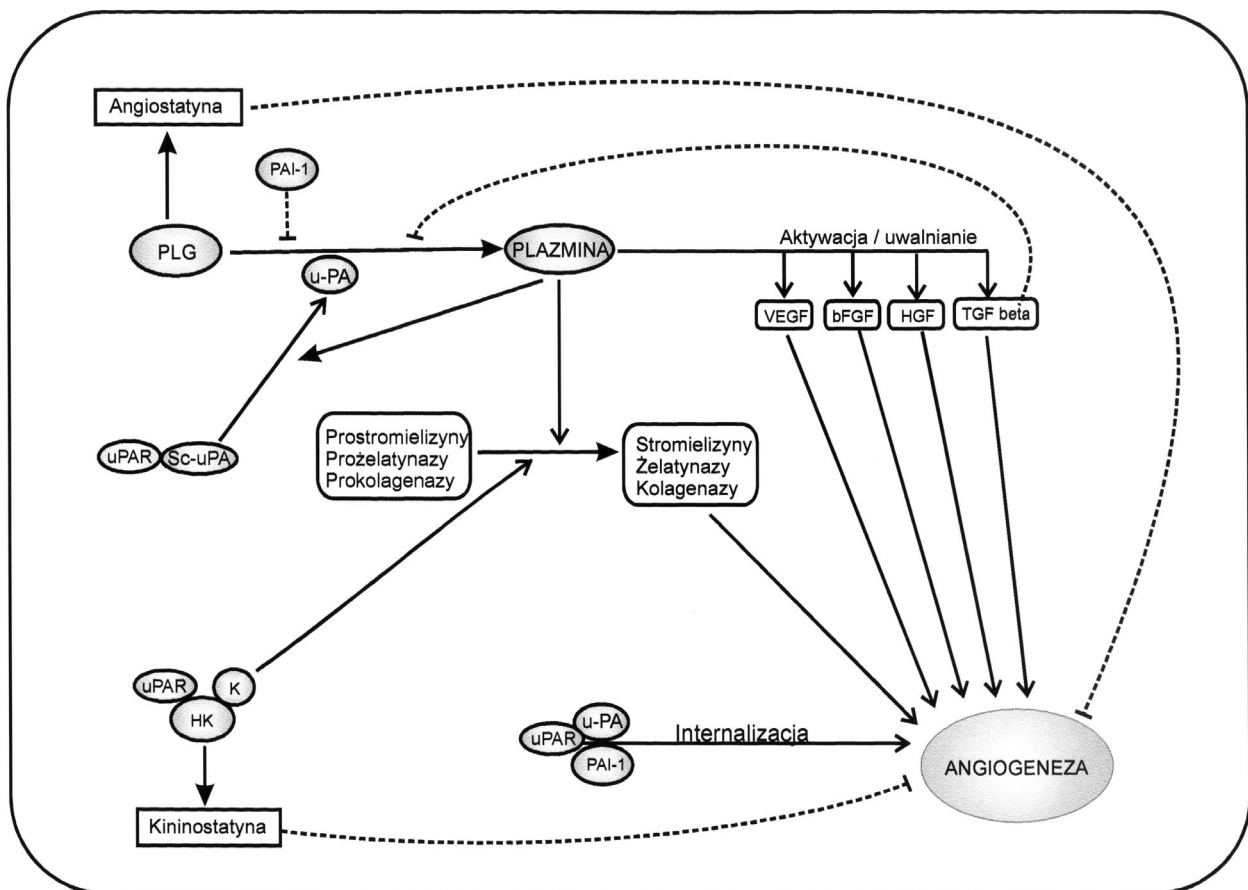
Interesującym wydaje się wykrycie obecności inhibitora neoangiogenezy w obrębie cząsteczki plazminoge-

nu – angiostatyny [20]. Inhibitor ten, działający układowo, jest 38 kD fragmentem plazminogenu, powstałym w wyniku działania metaloelastaz, uwolnionych z makrofagów, naciekających guz nowotworowy lub proteaz serynowych, pochodzących z komórek nowotworowych [20].

Rycina 3 przedstawia w uproszczeniu pro- i antyangiogenny wpływ czynników układu fibrylizacji.

### Płytki krwi a angiogeneza w nowotworach

W przebiegu choroby nowotworowej często obserwuje się zaburzenia jakościowe i ilościowe płytek krwi [96, 97]. Istotną rolę przypisuje się też płytkom krwi w procesie angiogenezy. Komórki śródbłonka pod wpływem działania VEGF ułatwiają aktywację płytek krwi [98], które ulegają następnie adhezji, agregacji i reakcji uwalniania (głównie z ziarnistości  $\alpha$ ). Wśród uwalnianych substancji występują m.in. czynniki regulujące angiogenezę, takie jak: VEGF-A, VEGF-C, bFGF, HGF (*hepatocyte growth factor*, czynnik wzrostu hepatocytów), IGF-1 i IGF-2 (*insulin-like growth factor type-1, -2*, insulinopodobne czynniki wzrostu typu pierwszego i drugiego), EGF (*epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu), PD-ECGF (*platelet-derived endothelial cell growth factor*, czynnik wzrostu komórek śródbłonka pochodzenia płytkowego) [przegląd piśmiennictwa w 99]. Płytki krwi, oprócz aktywa-



Ryc. 3. Proponowany schemat pro- i antyangiogennego udziału czynników układu fibrylizacji w angiogenezie w nowotworach.

Użyte skróty: PLG-plazminogen, PAI-1-inhibitor aktywatorów plazminogenu typu-1, u-PA-urokinaza, uPAR-receptor urokinazy, Sc-uPA-jednołańcuchowa urokinaza, VEGF-czynnik wzrostu śródbłonka naczyń, bFGF-zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, HGF-czynnik wzrostu hepatocytów, TGFbeta-transformujący czynnik wzrostu-beta, K-kalikeina, HK-kininogen o dużej masie cząsteczkowej.

torów angiogenezy, są również źródłem inhibitorów tego procesu. Należą do nich m.in: PF4 (czynnik płytkowy-4), TSP-1, pierwsza (NK1) oraz pierwsze dwie (NK2) domeny *kringle* czynnika HGF [przegląd piśmiennictwa w 99].

PF4, łącząc się z heparynopodobnymi glikozaminoglikanami, występującymi na powierzchni komórek śródbłonna, blokuje miejsca wiązania dla czynników wzrostu śródbłonna, wymagających takich interakcji do swej aktywności [100]. PF4 hamuje też bezpośrednio dimeryzację i aktywność bFGF [101]. Jednocześnie PF4, poprzez mechanizm niezależny od łączenia się z powierzchniowymi glikozaminoglikanami, blokuje stymulujący wpływ bFGF, EGF i VEGF w stosunku do komórek śródbłonna [100]. Również peptyd, pochodzący z C-końca PF4 (zawierający reszty 47-70), wpływa hamująco na aktywność zarówno bFGF, jak i VEGF w stosunku do komórek śródbłonna [102].

TSP-1 hamuje angiogenezę poprzez łączenie się z receptorem CD36 na komórkach śródbłonna [103]. Jednakże bardzo wysokie stężenia TSP-1 mogą stymulować angiogenezę w wyniku oddziaływania z białkiem aktywującym integryny (IAP/CD37) [103]. Poza tym TSP-1 uczestniczy w aktywacji TGF- $\beta$  [104].

Aktywacja płytek krwi, niezależnie od wystąpienia reakcji uwalniania, prowadzi do zwiększenia ekspresji TF na komórkach śródbłonna [105] i tworzenia sieci naczyń w badaniach *in vitro* z użyciem Matrigel [106]. Przypuszcza się, że w tym przypadku istotną rolę może odgrywać adhezja płytek krwi do komórek śródbłonna poprzez glikoproteiny [103].

Reasumując, należy podkreślić, że udział czynników układu hemostazy w procesie angiogenezy jest niezwykle istotny, a oddziaływania poszczególnych elementów tego układu na komórki nowotworowe i śródbłonna naczyniowego są wielokierunkowe. Dogłębne poznanie tych skomplikowanych interakcji może w przyszłości otworzyć nowe kierunki terapii wspomagającej w leczeniu nowotworów. Rysują się wstępnie dwa nurty ewentualnej terapii, wykorzystującej znajomość tych interakcji. Pierwszy z nich to zastosowanie naturalnych inhibitorów angiogenezy, będących składowymi układu hemostazy. Istnieją doniesienia o próbach zastosowania angiostatyny [107], czy PF4 [108] w terapii antyangiogennej nowotworów. Drugi – to zastosowanie leków interferujących z czynnikami układu hemostazy. Z uwagi na przypisywaną czynnikowi tkankowemu rolę w procesie angiogenezy, leczenie polegające na blokowaniu tego czynnika mogłoby przynieść korzystne wyniki. Jedną z opcji mogłoby być zastosowanie monoklonalnych przeciwciał przeciwko TF. Skuteczność takiego leczenia wykazano już na modelach zwierzęcych w leczeniu innych jednostek chorobowych, w których stwierdza się zależność od TF aktywację krzepnięcia krwi [109], a także w guzach nowotworowych, gdzie obserwowano regresję nowotworu spowodowaną zamknięciem naczyń [110].

Innym sposobem interferowania z aktywnością TF byłoby zastosowanie związków hamujących ekspresję TF. Jednym z nich są retinoidy, które hamują ekspresję TF w monocytach i komórkach białaczek różnego typu [111].

Taką hipotezę można by testować też w próbach klinicznych z zastosowaniem pentoksyfiliny, która – oprócz działania hamującego na TF – wywiera efekt blokujący w stosunku do syntezy VEGF w hodowli komórek nowotworowych czerniaka, raka piersi i raka płuca [35]. Statyny – związki obniżające stężenie lipidów, a dodatkowo hamujące aktywność TF obecnego w makrofagach [112] mogłyby być również stosowane, ale wymagałoby to jeszcze szeregu badań, gdyż donoszono o działaniu proangiogennym tych leków [113].

Inną możliwością blokowania aktywności TF w nowotworach byłoby zastosowanie rekombinowanego inhibitora zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia krwi (rTFPI). Donoszono o zachęcających wynikach badań na modelach zwierzęcych w leczeniu chorób nienowotworowych, związanych z aktywnością TF, a aktualnie trwają próby kliniczne z zastosowaniem rTFPI u chorych z rozpoznąną posocznicą, zespołem wykrzepiania śródnaczyniowego i u pacjentów poddanych mikrochirurgii [114].

VEGF zwiększa ekspresję TF w monocytach/makrofagach i komórkach śródbłonna naczyń. Stąd antyangiogenne strategie postępowania, wykorzystujące blokowanie receptora dla VEGF (np. SU5416, SU6668, PTK787/ZK22584), hamowanie syntezy VEGF (np. interferon alfa), czy neutralizowanie jego funkcji poprzez zastosowanie monoklonalnego przeciwciała przeciwko VEGF [115], będące w trakcie I i II fazy badań klinicznych, w wielu nowotworach stwarzają możliwość zmniejszenia wpływu TF na powstawanie nowych naczyń krwionośnych.

Donoszono także o skuteczności w modelach zwierzęcych immunoterapii, polegającej na wprowadzeniu w obręb guza nowotworowego wektora wirusowego, kodującego immunokoniugaty, składające się z czynnika VII (o zmutowanym miejscu aktywnym, nie dopuszczającym do aktywacji układu krzepnięcia krwi), wiążącego się z TF, obecnym na komórkach nowotworowych i śródbłonkach naczyń w obrębie guza nowotworowego oraz z fragmentu Fc IgG. Takie postępowanie wywoływało odpowiedź organizmu typu komórkowego przeciwko elementom guza nowotworowego, do którego został wprowadzony wektor, jak również w stosunku do przerzutów nowotworowych, charakteryzujących się ekspresją TF na komórkach guza i śródbłonkach naczyń [116].

Ekspresja TF prowadzi do generacji trombin w podścielisku nowotworów, a w następstwie do tworzenia sieci fibryny wokół ognisk komórek nowotworowych i na pograniczu guz/gospodarz, ułatwiających dodatkowo angiogenezę. W procesie nowotworzenia trombina wywiera szereg efektów poprzez proteolityczną aktywację receptora PAR-1, obecnego na komórkach nowotworowych, komórkach śródbłonna i płytkach krwi. Wobec tego zastosowanie związków blokujących ten receptor może przynieść pewne korzyści. Również zastosowanie inhibitorów trombin (np. hirudyny), czy przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko trombinie, stanowi obiecującą



opcję postępowania wspomagającego w leczeniu nowotworów [109].

**Prof. dr hab. med. Marek Z. Wojtukiewicz**  
Zakład Onkologii, Akademia Medyczna  
15-029 Białystok, ul. Ogrodowa 12  
e-mail: mwojtuk@polbox.com

## Piśmiennictwo

1. Wojtukiewicz MZ. Kliniczne aspekty aktywacji krzepnięcia krwi w chorobie nowotworowej. *Acta Haematol Pol* 1997; 28 Supl. 1: 79-93.
2. Baron JA, Gridley G, Weiderpass E, Nyren O i wsp. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* 1998; 351: 1077-1080.
3. Wojtukiewicz MZ, Rucińska M, Zimnoch L i wsp. Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation. *Thromb Res* 2000; 97: 335-342.
4. Takahashi Y, Kitadi Y, Bucana CD i wsp. 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.
5. Weidner N, Semple JP, Welch WR i wsp. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
6. Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M i wsp. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-2245.
7. Lee CN, Cheng WF, Chen CA i wsp. Angiogenesis of endometrial carcinomas assessed by measurement of intratumoral blood flow, microvessel density, and vascular endothelial growth factor levels. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 615-621.
8. Nativ O, Sabo E, Reiss A i wsp. Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology* 1998; 51: 693-696.
9. O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromonolaki A i wsp. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1427-1432.
10. Wesseling P, van der Laak JA, Teepen HL i wsp. Quantitative analysis of microvascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy. *Hum Pathol* 1998; 29: 352-358.
11. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M. i wsp. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 826-832.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
13. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
14. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-153.
15. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
16. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
17. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 1-30.
18. Fidler IJ, Bielenberg D, Slaton J i wsp. Interferon-mediated antiangiogenic therapy. W: 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology Educational Book. Perry MC (red.). American Society of Clinical Oncology. Alexandria VA, USA. 2000. s. 4-12.
19. Zhang Y, Deng Y, Luther T i wsp. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 1320-1327.
20. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C i wsp. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996; 2: 689-692.
21. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS i wsp. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999; 285: 1926-1928.
22. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-174.
23. Kieser A, Weich HA, Brandner G i wsp. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969.
24. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C i wsp. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 490-498.
25. Rak J, Klement G. Impact of oncogenes and tumor suppressor genes on deregulation of hemostasis and angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 93-96.
26. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M. i wsp. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular permeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
27. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 5: 561-569.
28. Callendar NS, Varki N, Rao LV. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992; 70: 1194-1201.
29. Takano S, Tsuboi K, Tomono Y i wsp. Tissue factor, osteopontin,  $\alpha_v \beta_3$  integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer* 2000; 82: 1967-1973.
30. Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA i wsp. Malignant melanoma. Interaction with coagulation and fibrinolysis pathways in situ. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 516-521.
31. Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Jaromin J i wsp. Immunohistochemical demonstration of fibrin II in gastric cancer tissue. *Pol J Pharmacol* 1996; 48: 229-232.
32. Ueno T, Toi M, Koike M i wsp. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000; 83: 164-170.
33. Lwaleed BA, Bass PS, Francis JL. Urinary tissue factor: a potent marker of disease. *J Pathol* 1999; 188: 3-8.
34. Abe K, Shoji M, Chen J i wsp. Regulation of vascular endothelial growth production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8663-8668.
35. Amirhosravi A, Meyer T, Warnes G i wsp. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998; 80: 598-602.
36. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL i wsp. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2: 209-215.
37. Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J i wsp. Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 1998; 91: 2698-2703.
38. Shoji M, Hancock WW, Abe K i wsp. Activation of blood coagulation and angiogenesis in cancer. *Am J Pathol* 1998; 152: 399-411.
39. Carmeliet P, Mackman N, Moons L i wsp. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383: 73-75.
40. Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998; 79: 19-22.
41. O'Rourke J, Pugh C, Bartlett SM i wsp. Identification of hypoxically inducible mRNA in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur J Biochem* 1996; 241: 403-410.
42. Yan SF, Zou YS, Gao Y i wsp. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8298-8303.
43. Machtscheriakova D, Wlachs A, Holzmuller H i wsp. Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* 1999; 93: 3811-3823.
44. Zioncheck TF, Roy S., Vehar GA. The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C mechanism. *J Biol Chem* 1992; 267: 3561-3564.
45. Camerer E, Rottingen JA, Iversen J i wsp. Coagulation factors VII and X induce Ca<sup>2+</sup> oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem* 1996; 271: 29034-29042.
46. Masuda DL, Nakamura S, Murakami T i wsp. Association of tissue factor with  $\alpha$ -chain homodimer of the IgE receptor type I in cultured human monocytes. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2529-2532.
47. Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB i wsp. Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 6228-6232.
48. Versteeg HH, Hoedmaeker I, Diks S i wsp. Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J Biol Chem* 2000; 275: 28750-28756.
49. Parry GC, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest* 2000; 105: 1547-1554.
50. Novotny WF. Tissue factor pathway inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 1994; 20: 101-108.

51. Sevinsky JR, Rao LVM, Ruf W. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol* 1996; 133: 293-304.
52. Ruf W, Mueller BM. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol* 1996; 3: 379-384.
53. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD i wsp. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9709-9716.
54. Pepper MS, Ferrara N, Orci L i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-906.
55. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 23969-23976.
56. Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol* 1993; 264: 1302-1307.
57. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Ben-Josef E i wsp. Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor. *Cancer Res* 1995; 55: 698-704.
58. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Ciarelli JJ i wsp. Thrombin increases the metastatic potential of tumor cell. *Int J Cancer* 1993; 54: 793-806.
59. Wojtukiewicz MZ, Tang TG, Nelson KK i wsp. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression on the cell surface. *Thromb Res* 1992; 68: 233-245.
60. Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM i wsp. SPH2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem* 2000; 275: 5983-5986.
61. Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC i wsp. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J* 1994; 303: 227-231.
62. Zucker S, Conner C, DiMassmo BI i wsp. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 23730-23738.
63. Rhim TH, Park ChS, Kim E i wsp. Human prothrombin fragment 1+2 inhibits bFGF-induced BCE cell growth. *Bioch Bioph Res Commun* 1998; 252: 513-516.
64. Thiagarajan P, Rippon AJ, Farrell DH. Alternative adhesion sites in human fibrinogen for vascular endothelial cells. *Biochemistry* 1996; 35: 4169-4175.
65. Dallabrida SM, Falls LA, Farrell DH. Factor XIIIa supports microvascular endothelial cell adhesion and inhibits capillary tube formation in fibrin. *Blood* 2000; 95: 2586-2592.
66. Bunce LA, Sporn LA, Francis CW. Endothelial cell spreading on fibrin requires fibrinopeptide B cleavage and aminoacid residues 15-42 of the  $\beta$  chain. *J Clin Invest* 1992; 89: 842-850.
67. Thompson WD, Smith EB, Stirk CM i wsp. Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. *J Pathol* 1992; 168: 47-53.
68. Asahara T, Bauters C, Zheng LP i wsp. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92 Suppl. II: II365-II371.
69. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G i wsp. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Rev* 1997; 18: 26-45.
70. Foekens JA, Peters HA, Look MP i wsp. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 636-643.
71. Okusa Y, Ichikura t, Mochizuki H. Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1033-1038.
72. Harvey SR, Sait SN, Xu Y. Demonstration of urokinase expression in cancer cells of colon adenocarcinomas by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1999; 155: 1115-1120.
73. Oka T, Ishida T, Nishino T i wsp. Immunohistochemical evidence of urokinase-type plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 3522-3525.
74. Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U i wsp. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 1999; 79: 1746-1751.
75. de Witte JH, Sweep CG, Klijn JG i wsp. Prognostic value of tissue-type plasminogen activator (tPA) and its complex with type-1 inhibitor (PAI-1) in breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 286-294.
76. Franks AJ, Ellis E. Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator in human brain tumors. *Br J Cancer* 1989; 59: 462-466.
77. Bajou K, Noel A, Gerard RD i wsp. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularisation. *Nature Med* 1998; 4: 923-928.
78. Pepper MS, Mandriota SJ. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 241: 414-425.
79. Sandstrom M, Johansson M, Sandstrom J i wsp. Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17: 473-481.
80. Nakata S, Ito K, Fujimori M i wsp. Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvascular invasion in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1998; 79: 179-186.
81. Schleaf RR, Loskutoff DJ. Fibrinolytic system of vascular endothelial cells. Role of plasminogen activator inhibitors. *Haemostasis* 1988; 18: 328-341.
82. Blasi F. Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost* 1999; 82: 298-304.
83. Kroon ME, Koolwijk P, van Goor H i wsp. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Am J Pathol* 1999; 154: 1731-1742.
84. Fukao H, Ueshima S, Pkada K i wsp. The role of the pericellular fibrinolytic system in angiogenesis. *Jpn J Physiol* 1997; 47: 161-171.
85. Deng G, Curriden SA, Wang S i wsp. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 1996; 134: 1-9.
86. Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S i wsp. Binding of high molecular weight kininogen to endothelial cells via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1481-1487.
87. Colman RW, Jameson BA, Lin Y i wsp. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cells proliferation and cell migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 2000; 15: 543-550.
88. Koshelnick Y, Ehart M, Stockinger H i wsp. Mechanisms of signaling through urokinase receptor and the cellular response. *Thromb Haemost* 1999; 82: 305-311.
89. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E i wsp. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992; 11: 4825-4833.
90. Sato Y, Tsuboi R, Lyons R i wsp. Characterisation of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of pericytes and smooth muscle cells: a self regulating system. *J Cell Biol* 1990; 111: 757-763.
91. Gille J, Khalik M, Konig V i wsp. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor expression by cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1160-1165.
92. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S i wsp. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 1994; 9: 2683-2690.
93. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
94. Petrovara L, Kaipainen A, Mustonen T i wsp. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 6271-6274.
95. O'Mahony CA, Albo D, Tuszynsky GP i wsp. Transforming growth factor-beta 1 inhibits generation of angiostatin by human pancreatic cancer cells. *Surgery* 1998; 124: 388-393.
96. Pinedo HM, Verheul HM, D'Aato RJ i wsp. Involvement of platelets in tumor angiogenesis? *Lancet* 1998; 352: 1775-1777.
97. Olas B, Mielicki WP, Wachowicz B i wsp. Cancer procoagulant stimulates platelets adhesion. *Thromb Res* 1999; 94: 199-203.
98. Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K i wsp. Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* 2000; 96: 4216-4221.
99. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-1524.
100. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T i wsp. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF-121 and VEGF-165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 15059-15065.
101. Perollet C, Han ZC, Savona C i wsp. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998; 91: 3289-3299.
102. Jouan BV, Canron X, Alemany M i wsp. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4 - derived peptides and mechanism of action. *Blood* 1999; 94: 984-993.
103. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE i wsp. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularisation by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000; 6: 41-48.
104. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE i wsp. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-1170.

105. Slupsky JR, Kalbas M., Willuweit A i wsp. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1008-1014.
106. Pipili-Synetos E, Papadimitriou E, Maragoudakis ME. Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1252-1257.
107. Chen QR, Kumar D, Stass SA i wsp. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3308-3312.
108. Tanaka T, Manome Y, Wen P i wsp. Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997; 3: 437-442.
109. Bromberg ME, Capello M. Cancer and blood coagulation: molecular aspects. *Cancer J* 1999; 5:132-138.
110. Preissner KT. Hemostatic protease receptors and endothelial cell function: insights from gene targeting in mice. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 451-461.
111. Falanga A, Rickles FR. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25: 173-182.
112. Fenton II JW, Shen GX, Minnear FL i wsp. Statins induce hypofibrinolytic states? *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2000; 6: 18-21.
113. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I i wsp. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase AKT and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med* 2000; 6: 1004-1010.
114. Bajaj MS, Bajaj SP. Tissue factor pathway inhibitor: potential therapeutic applications. *Thromb Haemost* 1997; 78: 471-477.
115. Rosen L. Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *Oncologist* 2000; 5 Supl.1: 20-27.
116. Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9221-9225.

Przyjęto do druku: 27 lipca 2001 r.