

Justyna Zygoń

Wpływ naczyniowo-śródbłonkowego czynnika  
wzrostu i jego receptora Flt-1 na angiogenezę oraz  
rokowanie w operacyjnym raku jelita grubego.

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. n. med. Wiesław Janusz Kruszewski

Gdańsk 2014

*Składam serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Wiesławowi Januszowi Kruszewskiemu za nieocenioną i wszechstronną pomoc, za wyrozumiałość i życzliwość oraz wsparcie, bez którego realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję do Pana Doktora Roberta Rzepko i Pana Doktora Mariusza Szajewskiego za pomoc w przeprowadzeniu i interpretacji badań, których wyniki analizowane były w tej pracy.*

*Praca została zrealizowana dzięki środkom finansowym pochodzącym z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na rok 2008. (Praca własna o numerze W-763).*

## Spis treści

1. Wstęp.....	6
1.1. Rak jelita grubego.....	6
1.1.1 Epidemiologia.....	6
1.1.2. Etiopatogeneza.....	6
1.1.3. Ocena zaawansowania nowotworu.....	8
1.1.4. Rokowanie.....	10
1.1.5. Ingerowanie w proces angiogenezy jako opcja terapeutyczna.....	11
1.2. Historia badań nad angiogenezą.....	11
1.3. Charakterystyka procesu angiogenezy.....	12
1.3.1. Definicja angiogenezy i waskulogenezy.....	12
1.3.2. Angiogeneza nowotworowa.....	14
1.3.3. Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę.....	17
1.3.4. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń – VEGF.....	18
1.3.5. Receptory dla VEGF.....	24
1.3.6. Flt-1 receptor dla VEGF.....	27
2.. Cel pracy.....	31
3. Materiał i metody.....	32
4. Wyniki i omówienie.....	39
4.1. Analiza badanej grupy.....	39
4.2. Średnia gęstość naczyń – (microvessel density) – MVD.....	42
4.3. Ekspresja VEGF.....	47
4.4. Ekspresja Flt-1.....	49
5. Dyskusja.....	51
5.1. Indywidualizacja leczenia raka jelita grubego i poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych.....	51
5.2. Gęstość naczyniowa.....	52
5.3. VEGF jako główny czynnik w procesie tworzenia naczyń.....	53
5.4. Receptor Flt-1.....	59
6. Wnioski.....	65
7. Streszczenie.....	66
8. Wykaz rycin i tabel.....	70
9. Piśmiennictwo.....	72

## Wykaz ważniejszych skrótów i symboli

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i> - Antygen rakowo-łódowy, karcynoembrionalny
DAB	czterochlorowodorek 3,3 diaminobenzyny
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> - Naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> - Receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i> – Przejście nabłonkowo - mezenchymalne
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i> - Rodzinna polipowatość gruczolakowata
FDA	Federal Drug Administration
bFGF	<i>Fibroblast growth factor</i> - Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
Flk-1	<i>Fetal liver kinase</i> (KDR, VEGFR - 2) – Kinaza płodowej wątroby
Flt -1	<i>Fms -like tyrosine kinase</i> (VEGFR – 1) –Kinza tyrozynowa Fms
Fms	<i>Feline Mc Donough sarcoma virus</i> – Wirus kociego mięsaka
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i> – Czynnik wzrostu kolonii granulocytarnych
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> - Czynnik wzrostu kolonii granulocytarno-makrofagowych
HIF1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor-1</i> – czynnik indukowany hipoksją
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> - Czynnik wzrostu hepatocytów
vHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposic colorectal cancer</i> - Rodzinny niepolipowaty rak jelita grubego
HPV	<i>Human papilloma virus</i> - Wirus brodawczaka ludzkiego
HSPGs	<i>Heparansulfate proteoglikans</i> - Proteoglikany siarczanu heparnu
IFN $\gamma$	Interferon gamma

ILGF	<i>Insulin-like growth factor-1</i> - Insulinopodobny czynnik wzrostu
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> – Czynn timer wzrostu keratynocytów
KDR	<i>Kinase-insert domain-containing receptor</i> , (VEGFR – 2)
kDa	KiloDaltony
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> – Czynn timer wzrostu keratynocytów
MVD	<i>Microvessel density</i> – Gęstość naczyniowa
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i> – Metaloproteinazy macierzy
eNOS	<i>Epithelial NO syntase</i> – Śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
NRP	<i>Neurophilin</i> - Neurofilina
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i> - Inhibitor aktywatorów plazminogenu
PBS	Buforowany roztwór soli fizjologicznej
PTTG1	<i>Pituitary tumor-derived transforming gene 1</i> - Przysadkowy gen transformujący
PIGF	<i>Placenta growth factor</i> – Łożyskowy czynnik wzrostu
PI3K	<i>Phosphatidyl-inositol-3-kinase</i> - Kinaza fosfatydyloinozytolu
RJG	Rak jelita grubego
SCF	<i>Stem cell factor</i> - Czynn timer wzrostu komórek macierzystych
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> - Inhibitory metaloproteaz
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> - Transformujący czynnik wzrostu - $\beta$
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Czynn timer martwicy guza
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> - Receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynn timer wzrostu
VPF	<i>Vascular permeability factor</i> - Czynn timer przepuszczalności naczyń
vWF	<i>von Willebrandt factor</i> - Czynn timer von Willebrandta

# 1. Wstęp

## 1.1 Rak jelita grubego

### 1.1.1. Epidemiologia

Rak jelita grubego (RJG) należy do najczęściej występujących nowotworów. W strukturze zachorowań zajmuje obecnie w Polsce drugie miejsce u kobiet i trzecie u mężczyzn, stanowiąc 10 % kobiecych i 12 % męskich zachorowań na nowotwory złośliwe.

Jest też drugą u mężczyzn i trzecią u kobiet przyczyną zgonów nowotworowych – 12 % u obu płci [27].

### 1.1.2 Etiopatogeneza

Wiele czynników warunkuje powstanie raka w jelicie grubym. Należą do nich przyczyny genetyczne i uwarunkowania środowiskowe.

Tabela I. Przyczyny nowotworów jelita grubego

rak sporadyczny	65–85%- około 75%
rak występujący rodzinnie	10–30%- około 20%
Rodzinny niepolipowaty rak jelita grubego- HNPCC	1–5%
Rodzinna polipowatość gruczolakowata - FAP	0,5%
inne	pozostała część

#### 1) Czynniki genetyczne

W większości, czyli w około 85% przypadków, raki występują sporadycznie. Są to gruczolakoraki, które rozwijają się na podłożu gruczolaków. Powstają wskutek kumulowania się zaburzeń genowych prowadzących początkowo do rozrostu nabłonka jelitowego, potem do powstania gruczolaka, a następnie, między innymi wskutek inaktywacji onkogenów, do przemiany złośliwej i powstania raka jelita grubego.

Genetyczne predyspozycje do powstania raka jelita grubego to wrodzone mutacje w genach skracające drogę przemiany w nowotwór. W efekcie dochodzi do rozwoju zespołów klinicznych predysponujących do powstania raka jelita grubego. Są to:

- Rodzinna polipowatość gruczolakowata z mutacją w genie APC. Jej postaci kliniczne to min. Zespół Gardnera i Zespół Turcota,
- Łagodna rodzinna polipowatość gruczolakowata,
- Polipowatość związana z genem MUTYH,
- Dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, czyli zespół Lyncha I i II, za który odpowiadają mutacje genów odpowiedzialnych za naprawę błędnie sparowanych zasad DNA,
- Zespoły polipowatości z polipami hamartomatycznymi (Zespół Peutza Jeghersa, zespół polipowatości młodzieńczej, czy Zespół Cowden),
- Zespoły polipowatości o nieustalonej przyczynie np. Zespół Cronkheite'a- Canady [10].

## 2) Czynniki środowiskowe

### A. Związane z trybem życia

- a. sposób odżywiania - dieta bogata w czerwone mięso i tłuszcze zwierzęce, uboga w naturalne witaminy, włókna roślinne, selen i wapń,
- b. palenie papierosów,
- c. mała aktywność fizyczna i otyłość,
- d. powtarzające się zaparcia.

### B. Niezależne od trybu życia:

- a. wiek- częstość zachorowania wzrasta wraz z wiekiem, osiągając szczyt w ósmej dekadzie życia
- b. czynniki demograficzno – geograficzne. Największą zachorowalność na raka jelita grubego notuje się w Europie Zachodniej i Ameryce Północnej, a najniższą w rozwijających się krajach Afryki i Azji.

### C. związane ze współistniejącymi chorobami:

- a. nieswoiste zapalenia jelit: wrzodziejące zapalenie jelita grubego i choroba Leśniowskiego-Crohna.
- b. w następstwie przebytego leczenia: ureterosigmoidostomia (z którą wiąże się 500 razy większe ryzyko RJG), cholecystektomia, radioterapia jamy brzusznej [55].

### 1.1.3. Ocena zaawansowania nowotworu

Do oceny typu i zaawansowania nowotworu, a co za tym idzie do wyboru metody leczenia oraz ustalenia rokowania, używa się następujących skal i podziałów:

- Klasyfikacja histologiczna raka jelita grubego według WHO
- Klasyfikacja makroskopowa zaawansowanego raka jelita grubego
- Klasyfikacja Dukesa
- Klasyfikacja Astlera-Collera
- Klasyfikacja TNM i stopnie zaawansowania według TNM

Tabela II. Klasyfikacja pTNM według siódmej edycji klasyfikacji Union International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) [133].

T – guz pierwotny	<p>Tx – guz pierwotny nie może być oceniony</p> <p>T0 – brak cech guza pierwotnego</p> <p>Tis – rak <i>in situ</i> – wewnątrz nabłonka lub naciek blaszki właściwej błony śluzowej</p> <p>T1 – guz nacieka warstwę podśluzówkową</p> <p>T2 – guz nacieka błonę mięśniową właściwą</p> <p>T3 – guz nacieka warstwę podsurowiczą lub niepokryte otrzewną tkanki okołookrężnicze lub okołodbytnicze</p> <p>T4 – guz bezpośrednio nacieka inne narządy lub struktury anatomiczne i/lub powoduje perforację otrzewnej trzewnej</p> <p>T4a – guz powoduje perforację otrzewnej trzewnej</p> <p>T4b – guz bezpośrednio nacieka inne narządy lub struktury anatomiczne</p>
N – regionalne węzły chłonne	<p>Nx – regionalne węzły chłonne nie mogą być ocenione</p> <p>N0 – brak przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych</p> <p>N1 – przerzuty w 1-3 regionalnych węzłach chłonnych</p> <p>N1a – przerzut w 1 regionalnym węzle chłonnym</p> <p>N1b – przerzut w 2-3 regionalnych węzłach chłonnych</p> <p>N1c – depozyt nowotworowy (depozyty nowotworowe), czyli guzek satelitarny w warstwie podsurowiczej lub niepokrytych otrzewną tkankach miękkich okołookrężniczych lub okołodbytniczych, bez przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych</p>



	N2 – przerzuty w co najmniej 4 regionalnych węzłach chłonnych N2a – przerzuty w 4-6 regionalnych węzłach chłonnych N2b – przerzuty w co najmniej 7 regionalnych węzłach chłonnych
M – przerzut odległy	M0 – przerzut odległy nieobecny M1 – przerzut odległy obecny M1a – przerzuty ograniczone do jednego narządu M1b – przerzuty w więcej niż jednym narządzie, lub przerzuty do otrzewnej.

Tabela III. Stopnie zaawansowania klinicznego według siódmej edycji klasyfikacji Union for International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) [133].

<b>0</b>		TisN0M0
<b>I</b>		T1-2N0M0
<b>II</b>	<b>A</b>	T3N0M0
	<b>B</b>	T4aN0M0
	<b>C</b>	T4bN0M0
<b>III</b>	<b>A</b>	T1-2N1M0 lub T1N2aM0
	<b>B</b>	T3-4aN1M0 lub T2-3N2aM0 lub T1-2N2bM0
	<b>C</b>	T4aN2aM0 lub T3-4aN2bM0 lub T4bN1-2M0
<b>IV</b>	<b>A</b>	każde T, każde N, M1a
	<b>B</b>	każde T, każde N, M1b

#### **1.1.4. Rokowanie**

Umieralność z powodu nowotworów jelita grubego w Polsce jest wyższa niż przeciętna dla krajów Unii Europejskiej. Wśród mężczyzn współczynnik umieralności był o około 50% wyższy niż średni dla krajów Unii Europejskiej (dane z 2009 roku). Wśród kobiet umieralność na raka jelita grubego jest nieznacznie, ale wciąż jednak wyższa niż średnia dla Europy [160].

Przeżycie 5-letnie zależy od stopnia zaawansowania i wynosi powyżej 90% u chorych w I stopniu zaawansowania w porównaniu do mniej niż 10% u chorych w stadium rozsiewu choroby.

W momencie, gdy badana grupa poddawana była leczeniu, ogólne rokowanie było gorsze niż w chwili obecnej. Okres 5-letniego przeżycia wśród pacjentów z nowotworami jelita grubego w ciągu pierwszej dekady XXI wzrósł, choć nieznacznie: wśród mężczyzn z 43,3% do 47,6%, natomiast u kobiet z 44,1% do 49,1% [27,160].

Do istotnej poprawy rokowania, doprowadziło z pewnością wprowadzenie systemu badań profilaktycznych (program badań przesiewowych dla wczesnego wykrywania raka jelita grubego Ministerstwa Zdrowia prowadzony od 2000r.) oraz poprawa techniki chirurgicznej. Chemioterapia pozwoliła na znamienne wydłużenie czasu przeżycia chorych na zaawansowanego raka jelita grubego i na nowotwór w stadium rozsiewu [153]. Pomimo znaczącego postępu w zmniejszeniu odsetka nawrotów miejscowych raka jelita grubego, wciąż u znaczącej ilości chorych dochodzi do zgonu z powodu przerzutów odległych. Nie są wykrywalne u pacjentów z pozornie mało zaawansowanym nowotworem poddanym radykalnemu leczeniu chirurgicznemu, za to w przyszłości stają podstawowym źródłem niepowodzenia w leczeniu. Dlatego obecnie przywiązuje się tak znaczącą wagę do terapii zachowawczej w raku jelita grubego oraz do poszukiwań nowych leków [159].

### **1.1.5. Ingerowanie w proces angiogenezy, jako opcja terapeutyczna**

Szczególną grupą leków są te, które mogą ingerować w naturalny cykl rozwoju guza nowotworowego. Niezbędnym czynnikiem w rozwoju jest wydolny system dostarczający tlen i składniki odżywcze i odprowadzający zbędne produkty przemiany materii. Guz musi więc wytworzyć własny, autonomiczny system naczyń krwionośnych.

Jest on nieodzownym warunkiem pozwalającym nowotworowi przekroczyć wymiar 2-3 mm, rosnąć dalej i przerzutować [115,139]. Dlatego leki antyangiogenne weszły na stałe do schematów leczenia wielu nowotworów złośliwych, w tym do leczenia raka jelita grubego [161]. Przeprowadzono wiele badań eksperymentalnych i klinicznych nad działaniem substancji powstrzymujących rozwój naczyń nowotworu. Były one poprzedzone badaniami rozpoznającymi naturę procesu angiogenezy, czyli tworzenia się naczyń krwionośnych.

## **1.2. Historia badań nad angiogenezą.**

Termin angiogeneza, pojawił się prawdopodobnie w 1787r. Użyty został przez szkockiego anatoma i chirurga Johna Huntera opisującego formowanie się nowych naczyń [135].

Badania te nabrały rozpędu wraz z wynalezieniem mikroskopu. Sam mikroskop nie pozwalał jednak na obserwację rosnących naczyń *in vivo*. Przełomem stało się wynalezienie przez małżeństwo Eleanor i Eliot Clark oraz studenta pana Clarka Calvina Sandisona komory Sandison-Clark'a, którą następnie można było wszczepiać w zranioną skórę zwierzęcia laboratoryjnego. Komora pozwalała na wykorzystanie mikroskopu do podglądania wzrostu naczyń w reakcji na uszkodzenie, do obserwacji zachowania się przeszczepionych obcych komórek a następnie do obserwacji angiogenezy w rosnących nowotworach [20,132].

Za ojca badań nad angiogenezą uważa się Judaha Folkmana. To on sformułował i w 1971 roku opublikował hipotezę, że wzrost guza jest zależny od wzrostu naczyń, a zablokowanie angiogenezy może mieć znaczenie terapeutyczne. Potwierdzenie tej hipotezy stało się fundamentem wszechstronnych badań nad angiogenezą [39]. Folkman wraz z współpracownikami wyizolował również substancję, która, wydzielana przez

nowotwór, miała stymulować wzrost naczyń. Nazwał ją TAF, czyli *Tumor Angiogenesis Factor* [110].

Identyfikacji tego samego czynnika dokonali również niezależnie od siebie Harold Dvorak w 1983r. [122] oraz Napoleone Ferrara i Jean Plouet w 1989r. Dvorak zidentyfikował VPF, czyli *Vascular Permeability Factor*, a Ferrara i Plouet VEGF, czyli *Vascular Endothelial Growth Factor* [73].

Sekwencjonowanie tego białka udało się dopiero w roku 1990 Connolly'emu, który pracując niezależnie od pozostałych również uzyskał tą samą cząsteczkę [23].

Dzięki technice klonowania cDNA wykazano, że wyżej wspomniani uczeni odkryli tę samą cząsteczkę [71]. Z czasem poznano również sposób działania czynnika wzrostu naczyń.

W 1990 roku Masabumi Shibuya izolując gen kodujący receptorową kinazę tyrozynową z siedmioma zewnątrzblonowymi domenami, zidentyfikował czynnik o nazwie *Fms-like tyrosine kinase-1* (Flt-1), czyli receptor dla VEGF (śródbłonkowego czynnika wzrostu) [130].

Badania nad mechanizmami powstawania naczyń wciąż trwają. Znamy wiele czynników uczestniczących we wzroście naczyń w różnych środowiskach tkankowych. Obserwujemy również mniej lub bardziej udane próby z lekami ingerującymi w proces powstawania naczyń w celach terapeutycznych [24,48,164].

### **1.3. Charakterystyka procesu angiogenezy**

#### **1.3.1. Definicja angiogenezy i waskulogenezy.**

W procesie rozwoju i różnicowania gatunków kręgowce wykształciły zamknięty system krwionośny jako medium służące dostarczaniu rosnącym organizmom tlenu i składników odżywczych. System ten rozwija się już w okresie wczesnej embriogenezy. Zachodzi poprzez współdziałanie dwóch mechanizmów: waskulogenezy i angiogenezy. Waskulogeneza jest to proces powstawania naczyń krwionośnych *de novo* z komórek progenitorowych pochodzenia mezenchymalnego czyli angioblastów. Angioblasty, jako komórki bipotencjalne dają początek zarówno linii hematopoetycznej jak i endotelialnej [112]. Linia endotelialna, czyli komórki prekursorowe śródbłonka (EPC - *Endothelial Precursor Cells*) ulegają różnicowaniu się, migracji i proliferacji tworząc podstawowy splot naczyńniowy (*Primary Vascular Plexus*) [111].

Aby zwiększyć wydajność podstawowego splotu naczyniowego rozrasta się on tworząc nowe odgałęzienia. Wykorzystuje przy tym naczynia już istniejące. Rozpoczyna się więc angiogeneza, która umożliwia wzrost organizmu.

Proces angiogenezy można podzielić na następujące etapy [30]:

1. Pobudzenie i proliferacja komórek śródbłonkowych.
2. Zwiótnienie ściany naczynia i miejscowe poszerzenie jego światła.
3. Wzrost przepuszczalności naczynia.
4. Zgromadzenie fibryny po zewnętrznej stronie naczynia.
5. Proteolityczny rozkład błony podstawnej.
6. Migracja aktywowanych komórek śródbłonka, a następnie układanie się ich w formę pączków naczyniowych w miejscu, gdzie ma powstać nowe naczynie.
7. Oddziaływanie z macierzą pozakomórkową.
8. Dzielenie się komórek endotelialnych w odcinku odnaczyniowym.
9. Odtworzenie błony podstawnej.

U zdrowego, dorosłego i niezbyt aktywnego fizycznie mężczyzny, komórki śródbłonka pozostają w stanie spoczynku. Są to najdłużej żyjące komórki w organizmie poza komórkami układu nerwowego. Tylko jedna na 10 000 komórek endotelialnych w organizmie wstępuje w fazę podziału.

Sytuacja jest odmienna u kobiet, nawet w warunkach fizjologicznych. Owulacyjny cykl reprodukcyjny, laktacja, czy też formowanie się łożyska wymagają stałego zaangażowania się procesów tworzenia naczyń. Podobne zjawisko obserwujemy u osób aktywnych fizycznie, budujących masę mięśniową.

Mechanizmy angiogenezy zaangażowane są również w gojenie się ran, owrzodzeń, rewaskularyzację mięśnia sercowego po zawale, towarzyszą procesom zapalnym. Mogą również brać udział w procesach chorobowych, odpowiadając za agrawację objawów w retinopatii cukrzycowej, w reumatoidalnym zapaleniu stawów, w endometriozie, w miażdżycy, łuszczycy i innych. Angiogeneza jest też ważnym procesem odpowiedzialnym za wzrost i przerzutowanie nowotworów złośliwych [12,98].

### 1.3.2. Angiogeneza nowotworowa.

Wraz z progresją nowotworu złośliwego proces tworzenia naczyń ulega gwałtownej akceleracji. Komórki śródbłonkowe mnożą się szybko, podwajając swoją liczbę co 7-10 dni [125].

To przełączenie na angiogenezę nowotworową (*angiogenic switch*), pozwala guzowi nowotworowemu na:

- progresję z małego beznaczyniowego ogniska do dużego, dobrze unaczynionego guza,
- aktywację uśpionych zmian nowotworowych,
- utworzenie przerzutów,
- progresję od mikroprzerzutów do jawnych makroprzerzutów,

Komórki nowotworowe, jeżeli nie wymuszają na organizmie gospodarza neoangiogenezy, pozostają w uśpieniu. Przystają się namnażać w momencie, kiedy wzrost ich liczby oddala je od naczyń gospodarza, z których na drodze perfuzji uzyskują tlen i składniki odżywcze. Kiedy dystans ten jest większy niż 100-200  $\mu\text{m}$ , proces dyfuzji tlenu jest już znacznie utrudniony. W ten sposób nowotwór może urosnąć zaledwie do wielkości około 2-3 mm. (około milion komórek).

Aby przejść z fazy latentnej w fazę wzrostu, naciekania i przerzutowania musi nastąpić swoiste przełączenie (*angiogenic switch*). Zjawisko to polega na wzajemnej interakcji pomiędzy komórkami nowotworu a komórkami endotelium i macierzą międzykomórkową. Jest to możliwe dzięki zachwianiu równowagi między czynnikami hamującymi angiogenezę a proangiogennymi na rzecz rozwoju angiogenezy. Prowadzi to do przejścia z fazy równowagi, gdzie procesy tworzenia są równoważone przez apoptozę, w fazę dynamicznego rozwoju.

W praktyce zjawisko to zachodzi już w bardzo wczesnej fazie rozwoju guza. W modelach doświadczalnych guz indukował angiogenezę niedługo po jego implantacji do organizmu gospodarza, kiedy cała masa nowotworu wynosiła około 100-300 komórek [113]. Te komórki nabyły jednak proangiogeny fenotyp. Oznacza to, że występuje w nich nadekspresja genów kodujących czynniki stymulujące angiogenezę. Przewagę uzyskują czynniki proangiogenne, wśród których kluczową rolę pełni czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (*Vascular Endothelial Growth Factor* czyli VEGF).

Wskutek znacznej przewagi czynników proangiogennych dochodzi do szybkiego tworzenia się nowych naczyń. Naczynia te, choć liczne, są niepełnowartościowe zarówno pod względem czynnościowym, jak i strukturalnym. W warunkach normalnych, w dojrzałym, zdrowym organizmie cykl życiowy komórki śródbłonka przekracza 1000 dni, a w czasie intensywnej nowotworowej angiogenezy skraca się on do tygodnia. Skutek jest taki, że naczynia w guzie są niedojrzałe, kręte i mają chaotyczny przebieg. Często brak jest podziału na część tętniczą, żylną i kapilarną, tworzą się za to liczne przetoki i ślepe zakończenia. W ścianach takich naczyń brakuje mięśni gładkich, a błona podstawna jest nieregularna i przepuszczalna. Prowadzi to do powstawania przesięku w tkankach i ich obrzęku, widocznego niejednokrotnie w otoczeniu guza. Niepełnowartościowość naczyń, połączona z ich nadmierną ilością ma również i inny wymiar praktyczny - skłonność do krwawień. Krwawienia z guza nowotworowego są niejednokrotnie silne i trudne do opanowania. Nieprawidłowe naczynia nie obkurczają się samoistnie. Nie reagują, lub słabo reagują na ostrzykiwanie środkami wazokonstrykcyjnymi [74].

Nie znamy wyczerpującej odpowiedzi na pytanie, dlaczego naczynia w nowotworach są tak różne od naczyń w zdrowych tkankach. Wytłumaczenia upatrywać można w różnorodności strategii pozyskiwania przez guz zaopatrzenia w potrzebne do życia substancje. Strategie mogą być następujące:

1. **Kielkowanie** jako pierwszy i najważniejszy sposób. Rozpoczyna się aktywacją i proliferacją komórek śródbłonkowych, przerwaniem błony podstawnej naczynia i "wytrawieniem" tunelu w otaczającej macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie przy udziale metaloproteinaz [32,67] W utworzoną w ten sposób przestrzeń migrują aktywowane i rozmnożone komórki śródbłonka, które dzięki zachowanej polaryzacji, przyleganiu do siebie nawzajem i do macierzy komórkowej formują struktury rurowate. Do wytworzenia prawidłowego naczynia pozostaje jeszcze zsyntetyzowanie błony podstawnej przy użyciu fibronektyny, lamininy, kolagenu IV typu i proteoglikanów [11,33].
2. **Wgłabianie** jako proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych poprzez wpuklanie tkanki łącznej do wnętrza już istniejących naczyń. Jest to rozszczepienie istniejącego naczynia krwionośnego przez kolumny tkankowe (*tissue pillars*) – nowa ściana naczyniowa formuje się w świetle naczynia już istniejącego [15].

3. **Angiogeneza kłębuszkowa.** Proces charakteryzuje się wytworzeniem tzw. ciał kłębuszkowych (*glomerular bodies*), które z kolei składają się z macierzystego naczynia, do którego w miejscu ścieńczenia i częściowo pozbawionej przydanki ściany przylegają proliferujące komórki śródbłonka. Rosną one zarówno w kierunku przestrzeni otaczającej naczynie, jak i do jego światła, skutecznie utrudniając przepływ krwi. Obecność wykładników angiogenezy kłębuszkowej w badaniu histopatologicznym powoduje gorsze rokowanie u pacjenta.
4. **Wbudowanie** istniejącego już naczynia w guz. W tym przypadku guz rośnie wzdłuż istniejącego naczynia krwionośnego i wykorzystuje je na swoje potrzeby. Przykładem takiego typu nowotworu są glejaki które często wzrastają wzdłuż ścian naczyń nie formując otorebkowanego guza. Podobnie rośnie rak płuc, wtórne ogniska nowotworowe w węzłach chłonnych, czy przerzuty raka jelita grubego w wątrobie.
5. Zjawisko **mimikry** zachodzi, gdy sieć naczyniowa tworzona jest przez sam guz bez udziału komórek swoistych dla naczyń [54]. Zjawisko tego typu zaobserwowano w czerniakach o agresywnym przebiegu, w raku błony naczyniowej oka, w gwiaździaku, oraz nowotworach takich jak rak skóry i jamy ustnej, rak piersi, gruczołu krokowego, jajników, pęcherza moczowego, rak wątrobowo- komórkowy, mięśniakomięsak prążkowany i kostniakomięsak. Co ciekawe w przypadku raka jelita grubego również około 15% naczyń nie wybarwia się przy oznakowaniu markerami komórek śródbłonka. Może to sugerować fakt tworzenia naczyń na drodze mimikry [115].

Najczęściej guz nowotworowy wykorzystuje więcej niż jedną strategię pozyskiwania naczyń w zależności od zaawansowania i stopnia złośliwości. Typ mechanizmu angiogenezy jest swoisty dla danego narządu lub tkanki, a gęstość już istniejącej sieci naczyniowej również wpływa na sposoby tworzenia się nowych naczyń [115].



### 1.3.3. Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę

Proces tworzenia naczyń jest ściśle kontrolowany przez czynniki stymulujące i hamujące. Wydzielane są one w reakcji na hipoksję, hipoglikemię, uraz mechaniczny, nagromadzenie czynników zapalnych, jak również wskutek mutacji genetycznych. Cząsteczki te współwystępują obok siebie w tym samym mikrośrodowisku, pozostając w dynamicznej równowadze. Przewaga czynników proangiogennych prowadzi do powstawania nowych naczyń. Przewaga czynników antyangiogennych warunkuje zahamowanie tego procesu a nawet regresję naczyń, a niewielki nadmiar inhibitorów angiogenezy hamuje podziały komórkowe i zapewnia stabilność rozwiniętego już układu krwionośnego, czyli najprościej mówiąc jest normą w dojrzałym organizmie [167].

Endogenne czynniki proangiogenne podzielić możemy na dwie grupy:

- A) bezpośrednie, czyli naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) oraz czynnik wzrostu hepatocytów (HGF). Pobudzają one komórki do proliferacji i migracji, mobilizują pericyty, aktywują enzymy proteolityczne macierzy oraz powodują wzrost przepuszczalności naczyń.
- B) pośrednie, które spełniają swoją rolę stymulując inne komórki na drodze parakrynej do wytwarzania bezpośrednich czynników proangiogennych [76]. Pośrednio działają również mutacje aktywujące onkogeny *src* i *ras* lub inaktywujące geny supresorowe, *p53* oraz *vHL* (*von Hippel-Lindau*) [115].

Endogenne czynniki antyangiogenne również możemy podzielić na podgrupy [76]:

- A) cytokiny (interleukina-12, interleukina- 18, interferon  $\alpha/\beta$ ),
- B) inhibitory angiogenezy takie jak angiopoetyna-2, inhibitory metaloproteaz – TIMPs, inhibitor aktywatora plazminogenu – PAI, antytrombina- 1, IP-10, maspina,
- C) antagoniści czynników proangiogennych (rozpuszczalny receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu – VEGFR-1)
- D) polipeptydy antyangiogenne – proteolityczne fragmenty większych białek pełniących inne funkcje fizjologiczne (angiostatyna, endostatyna, tumstatyna, antytrombina, fragment kolagenu XV i fragment metaloproteiny 2
- E) do pośrednich inhibitorów angiogenezy zalicza się również produkt białkowy genu supresorowego *p53*, który wpływa na zahamowanie transkrypcji VEGF

działając między innymi poprzez czynnik HIF1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor-1* – czynnik indukowany hipoksją) oraz trombospondynę- 1 (TSP-1).

Inhibitory angiogenezy znaleźć można również w naszym otoczeniu: w korze drzewnej, czosnku, żeńszenu, aloesie, imbirze, chrząstce rekina i w wielu innych [116].

### **1.3.4. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF)**

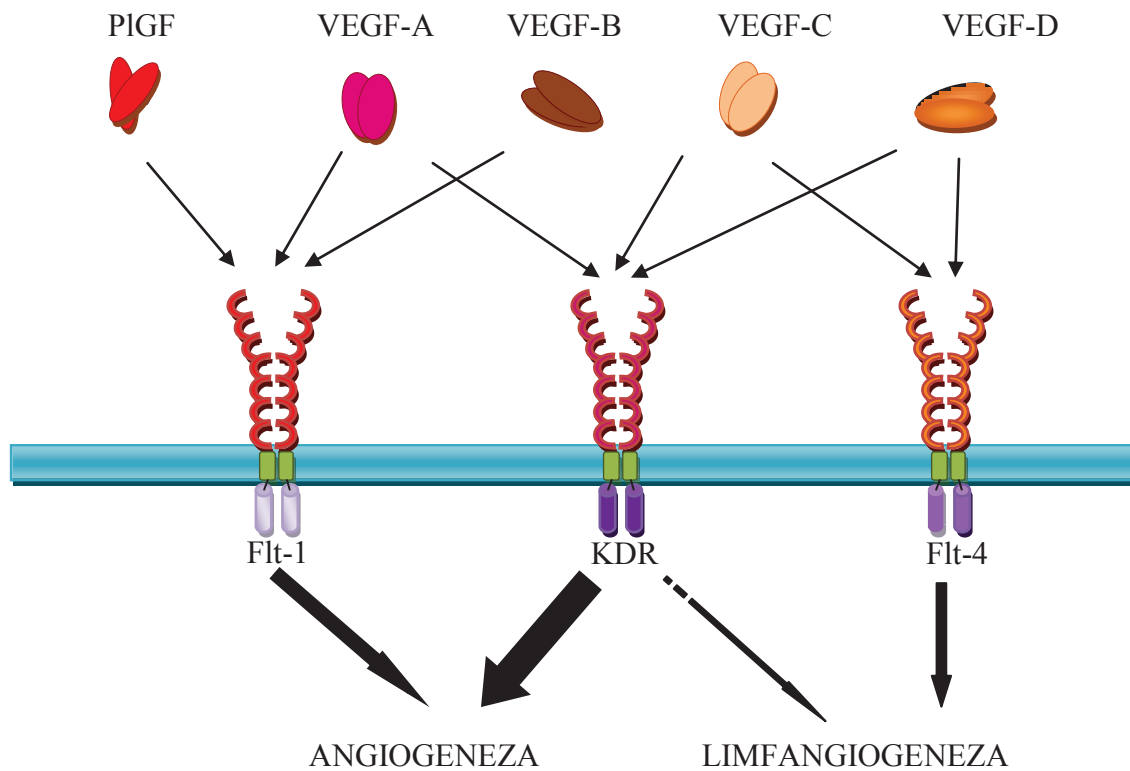
#### **1.3.4.1. informacje ogólne**

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) jest kluczowym czynnikiem regulującym waskulogenezę i angiogenezę, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych i to na każdym etapie rozwoju naczyń [131].

Należy on do rodziny płytkowych czynników wzrostu, do której obok dotychczas poznanych czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E) należy również łożyskowy czynnik wzrostu (*Placenta growth factor*) [38].

- VEGF-A jest mitogenem i czynnikiem warunkującym przeżycie komórek śródbłonna naczyniowego. Promuje zdolność do przemieszczania się komórek śródbłonna i monocytów. Ma wobec tych komórek również właściwości chemotaktyczne.
- VEGF-B ma również działanie mitogenne na komórki śródbłonkowe. Może formować heterodimery z VEGF-A, wpływając w ten sposób na powstawanie naczyń w mięśniach, w tym w mięśniu sercowym.
- VEGF-C i VEGF-D wytwarzane są z długich prekursorowych protein, które w wyniku trawienia tworzą formy, różniące się zdolnością do wiązania się z receptorem. Formy długie, nie skrócone przez proteolizę, bądź nieznacznie wytrawione mogą związać się tylko z VEGFR-3 (Flt-4). Formy dojrzałe łączą się zarówno z VEGFR-3 jak i z VEGFR-2 (KDR). Wydaje się, że zarówno VEGF-C, jak i -D oddziałują głównie na limfangiogenezę.
  - VEGF-C bierze udział w limfangiogenezie w czasie embriogenezy, lecz także w utrzymaniu już ukształtowanych naczyń limfatycznych u dorosłych.

- VEGF-D stymuluje wzrost komórek endotelialnych zarówno naczyń krwionośnych, jak i limfatycznych
- VEGF-E – wirusowy homolog VEGF aktywuje tylko VEGFR-2 (KDR)

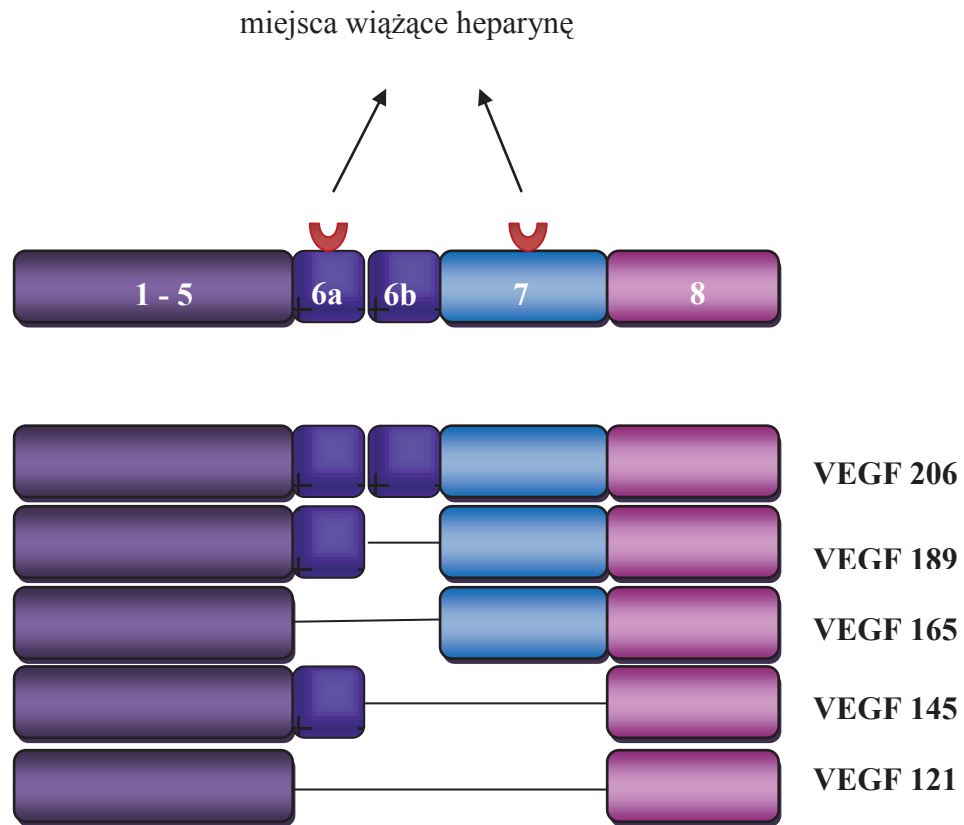


Rycina 1. VEGF i jego receptory błonowe

Głównym czynnikiem promującym powstawanie i rozwój nowych naczyń jest VEGF-A.

#### 1.3.4.2. izoformy

Gen dla VEGF znajduje się na chromosomie 6, w prążku 21.3 i składa się z 8 eksonów, przedzielonych 7 intronami. Na drodze alternatywnego dojrzewania mRNA powstaje 5 izoform różniących się ilością budujących je aminokwasów.



Rycina 2. Alternatywny podział pozwala na stworzenie poszczególnych form VEGF.

Izoformy różnią się od siebie masą cząsteczkową, częstością występowania i rozpuszczalnością, a zatem biodostępnością [8]. Odmienne są też ich właściwości biochemiczne i biologiczne, jak na przykład: zdolność do wiązania różnych receptorów, czy też neurofiliny (NRP – *neuropilin*).

Najczęściej spotykaną postacią jest VEGF 165. Jest to forma na tyle rozpowszechniona, że mówiąc o VEGF bez podania jego charakterystyki zakłada się, że mowa jest właśnie na temat VEGF165. Do tej postaci również odnosi się większość charakterystyk biochemicznych VEGF.

VEGF staje się dostępny dla komórek śródbłonna wskutek przynajmniej dwóch mechanizmów: jako wolny VEGF, lub też jako produkt proteolizy najdłuższych izoform.

W czasie badania efektów alternatywnego składania genów odkryto jednak, że *in vivo* tylko 3 izoformy (VEGF 121,145,165) mogą wyindukować proliferację

komórek śródbłonka i wywołać angiogenezę. W praktyce decydujący wpływ ma VEGF165, ze względu na najczęstsze występowanie [131].

#### 1.3.4.3. budowa

Masa cząsteczkowa VEGF wynosi pomiędzy 34 a 64 kDa podczas gdy forma dominująca, czyli VEGF-A165 ma masę 45 kDa (kiloDaltonów). Wiadomo, że podstawowa struktura VEGF-A jest homologiczna do struktury innych czynników wzrostu [131]. Jest to glikoproteina wiążąca heparynę, występująca w postaci homodimeru o charakterze zasadowym [8].

#### 1.3.4.4. czynniki stymulujące wydzielanie VEGF.

VEGF wydzielany jest przez komórki śródbłonka, makrofagi, komórki nabłonkowe siatkówki a także komórki guza nowotworowego. Głównym obszarem jego działania jest śródbłonek naczyniowy, na którego komórkach znajduje się większość receptorów dla VEGF.

Ekspresja VEGF jest regulowana poprzez szereg mechanizmów:

- 1) Czynniki środowiskowe. Najważniejszym wydaje się być hipoksja. W warunkach zmniejszonego stężenia tlenu gwałtownie zwiększa się w komórce ilość czynnika transkrypcyjnego, indukowanego niedotlenieniem, tzw. HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor*), który aktywuje promotor genu VEGF [57]. Mechanizm ten ma ogromne znaczenie w czasie rozwoju sieci naczyniowej nowotworu. Wskutek szybkiej proliferacji komórek rozrastająca się masa zaczyna odczuwać niedobór tlenu, gdyż rośnie odległość do najbliższych naczyń. W efekcie formują się regiony hipoksji. Mechanizm ten stymuluje produkcję VEGF powodując wzrost tempa transkrypcji a także wzrost stabilności mRNA dla VEGF.
- 2) Mutacje genetyczne [8].
  - a) ekspresja onkogenów, jak na przykład onkogenu *Ras*, która pociąga za sobą wzrost ekspresji VEGF [108].
  - b) utrata funkcji przez geny supresorowe: *p53*, *PTEN*.

- 3) Inne czynniki także modulują produkcję VEGF. Są to cytokiny (interleukina-1, interleukina-6), hormony (estrogeny) i czynniki wzrostu (*Platelet-derived growth factor*- PDGF, *Insulin-like growth factor-1* - ILGF, *Tumor necrosis factor* -TNF, *Transforming growth factor- $\beta$*  - TGF $\beta$ , *Keratinocyte growth factor* - KGF).

Oprócz parakrynnnej stymulacji za pomocą VEGF, nowotwory posiadają również zdolność do wywołania za jego pośrednictwem efektu autokrynnego.

#### 1.3.4.5. działanie

VEGF najbardziej swoiście działa na poziomie śródbłonna. Wywiera wpływ na rozwój i utrzymanie homeostazy naczyń krwionośnych [2]. Wielopoziomowo reguluje ten proces, włączając w to następujące fazy:

1. Poszerzenie naczyń poprzez stymulację syntazy tlenku azotu (eNOS) [58].
2. Wzrost przepuszczalności naczyń. Następuje to najprawdopodobniej wskutek indukowanej przez VEGF fosforylacji białek odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową, co prowadzi do zniszczenia połączeń między komórkami [166]. VEGF zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych 50 razy silniej niż histamina.
3. Degradacja błony podstawnej. Fenestracja śródbłonna drobnych naczyń umożliwia przechodzenie białek osocza do przestrzeni pozanaczyniowej.
4. Degradacja przestrzeni pozakomórkowej. VEGF zwiększa ekspresję enzymów proteolitycznych na komórkach śródbłonna, co powoduje degradację fibryny w miejscu tworzenia nowych naczyń. W przestrzeni pozakomórkowej wytrawione zostają tunele w których powstają swoiste struktury tubularne.
5. Proliferacja komórek śródbłonna oraz ochrona ich przed apoptozą wzbudzaną czynnikami zewnątrzkomórkowymi takimi jak: czynnik martwicy nowotworu (*Tumor necrosis factor- $\alpha$*  -TNF-  $\alpha$ ) i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).
6. Migracja komórek śródbłonkowych oraz komórek zrębu w kierunku rosnącego naczynia.
7. Formowanie cew naczyniowych. VEGF jest czynnikiem zapewniającym żywotność nowopowstałym, niedojrzałym naczyniom poprzez indukcję antyapoptotycznego białka Bcl-2 [134].
8. Utrzymanie przy życiu nowopowstałych naczyń krwionośnych [2].

U osobników dorosłych, u których angiogeneza zachodzi rzadko, VEGF bierze również udział w utrzymaniu homeostazy układu naczyniowego [81], rekrutacji komórek zapalnych i prekursorowych ze szpiku [91], oraz pełni rolę neuroprotekcijną w centralnym układzie nerwowym i siatkówce [31].

### 1.3.5. Receptory dla VEGF

Biologiczny efekt wywierany jest przez VEGF za pośrednictwem receptorów o budowie kinazy tyrozynowej. Receptory dla VEGF są mediatorami pomiędzy zewnątrzkomórkową stymulacją wywieraną przez czynniki wzrostu a wewnątrzkomórkową odpowiedzią. Ta odpowiedź skutkuje zmianami w metabolizmie komórki, jej proliferacją, migracją i różnicowaniem.

W normalnych komórkach śródbłonna transkrypcja genów dla nowych receptorów zachodzi rzadko, ponieważ w warunkach fizjologicznych rzadko zachodzi konieczność rozbudowy sieci naczyniowej. Transkrypcja tych genów, a co za tym idzie ilość receptorów wyraźnie się wzmacnia w guzie nowotworowym, a także na granicy nowotworu ze zdrową tkanką [131].

Rozróżniamy około 60 receptorów o budowie kinazy tyrozynowej, a cała grupa podzielona jest na 20 rodzin. Do rodziny kinaz tyrozyny należą między innymi VEGFR-1/Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase*, gdzie *fms* odnosi się do kociego wirusa mięsaka -*Feline Mc Donough sarkoma virus*), VEGFR-2/ KDR/Flk-1 (*Fetal liver kinase*) oraz Flt-3/FLK-2 i Flt-4/VEGFR-3. Dwa ostatnie receptory, czyli Flt-3 i Flt-4 są związane z procesami limfangiogenezy i hematopoezy. Receptorami wywierającymi bezpośredni wpływ na powstanie naczyń krwionośnych są KDR oraz Flt-1 [113]. Receptor KDR, mimo tego, że później odkryty, stanowi obecnie mniejszą zagadkę biologiczną, gdyż jego rola w procesie angiogenezy jest bezpośrednia. Przekazuje on sygnał stymulujący do wnętrza komórki poprzez uruchamianie kaskady kinaz tyrozynowych. Większą zagadką pozostaje Flt-1, którego rola jest niejasna.

#### 1.3.5.1 Budowa receptorów

Flt-1 i KDR mają podobną budowę. Złożone są z 3 domen: domeny znajdującej się zewnątrzkomórkowo złożonej z 7 immunoglobulino-podobnych pętli, hydrofobowej domeny przezbłonowej i domeny cytoplazmatycznej z aktywnością kinazy tyrozynowej [131].

Zewnątrzbłonowe pętle (NH<sub>2</sub>-końcowe) o budowie podobnej do immunoglobulin zbudowane są z 50 - 60 aminokwasów. Służą one zidentyfikowaniu i związaniu ligandu.

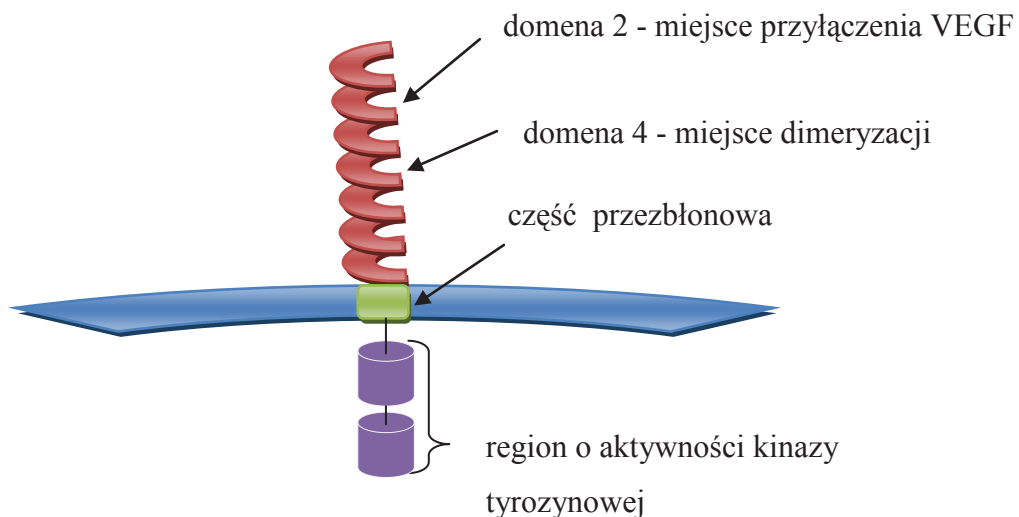
Między dwoma receptorami: Flt-1 i KDR jest w tym odcinku zaledwie 30 % homologii. VEGF (VEGF-A) jest cząstką przyłączającą się do obydwu receptorów,



jednak w różnych miejscach i z różnym powinowactwem. W przypadku VEGFR1 przyłącza się do drugiej immunoglobulinowej domeny (Flt-1 D2), a w przypadku VEGFR-2 do trzeciej. Powinowactwo Flt-1 jest około 10 razy silniejsze niż KDR [25].

Część przezbłonowa i wewnątrzkomórkowa obu receptorów ma większą homologię niż część zewnątrzbłonowa. Region o aktywności kinazy tyrozynowej jest najbardziej konserwatywny. Jest on homologiczny w około 80 % w przypadku obu receptorów [131].

Aktywność enzymatyczna polega na przeniesieniu grup fosforylowych z ATP do grupy hydroksylowej reszty tyrozynowej znajdującej się na cząsteczkach przekazujących sygnał [129].



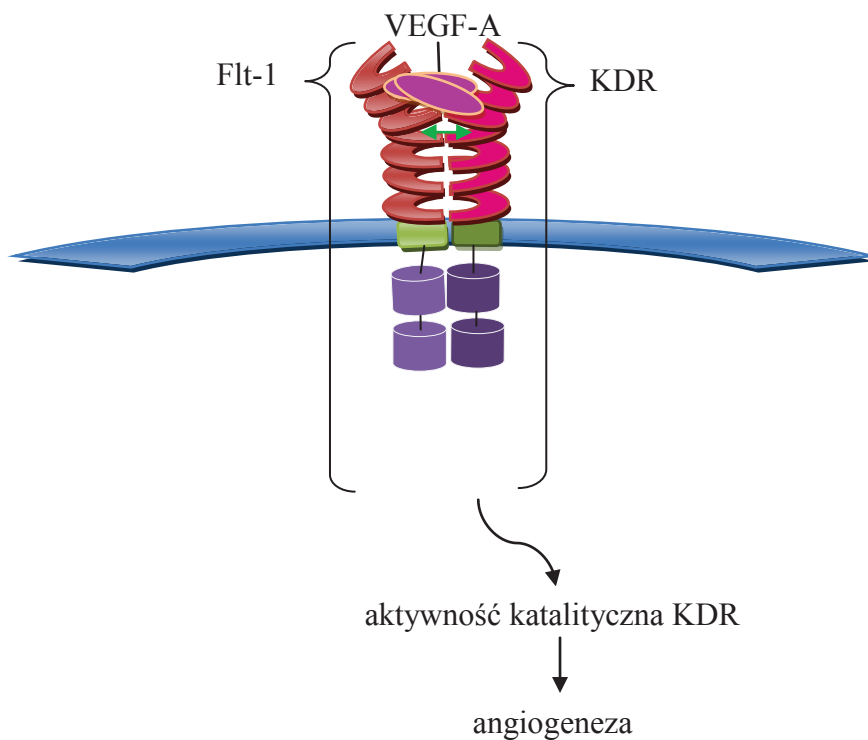
Rycina 3. Budowa receptora Flt-1.

### 1.3.5.2 Aktywność receptorów po przyłączeniu ligandu

Jak wspomniano, VEGF składa się z dwóch monomerów złożonych antyrównolegle (ogon do głowy). Aktywne receptory dla niego także złożone są z dwóch części. Aktywacja zachodzi jednak dopiero po przyłączeniu ligandu. W błonie komórkowej są więc nieaktywne dimery i monomery i to zarówno receptorów KDR, jak i Flt-1. Dobierają się one w pary w zależności od dostępności substratu (ligand), jak i produktu (czyli dostępnych monomerów). Na komórkach śródbłonna przeważają monomery i nieaktywne dimery KDR, za to na monocytach występuje już tylko Flt-1.

Przyłączenie ligandu aktywuje nieaktywny dimer, lub powoduje że monomer „szuka” drugiej części do pary, by się aktywować. W komórkach śródbłonna wskutek dołączenia VEGF, mogą wystąpić aktywowane dimery składające się z dwóch KDR, dwóch Flt-1, lub sparowane KDR i Flt-1. Takie dimery spowodują przewodzenie sygnału.

Po dimeryzacji uaktywnia się kinaza tyrozynowa i doprowadza do autofosforylacji reszt tyrozynowych w części wewnątrz błonowej [6].



Rycina 4. Heterodimeryzacja receptora Flt-1 i KDR uruchamia aktywność katalityczną KDR. Zieloną strzałką zaznaczono miejsce odpowiedzialne za dimeryzację receptora.

Po fosforylacji reszt tyrozynowych, rozpoczyna się katalityczna aktywność receptora [86]. W przypadku VEGFR-2 aktywność kinazy tyrozynowej jest podobna jak w przypadku innych receptorów tego typu. W przypadku VEGFR-1 jest ona jednak o jeden rząd wielkości, czyli 10 razy słabsza. Dimer Flt-1 nie ulega więc znaczącej fosforylacji.

### 1.3.6 Flt-1 – receptor dla VEGF

#### 1.3.6.1. Budowa i postaci Flt-1

Flt-1 zbudowany jest z 1338 aminokwasów [40]. Gen dla Flt-1 składa się z 30 egzonów. Na skutek alternatywnego splicingu, może występować w dwóch formach:

- jako wolny, rozpuszczalny receptor (sFlt-1 - *soluble Flt-1*). Pozbawiony jest części przez- i wewnątrz błonowej [136], Składa się zatem z 1-6 immunoglobulinopodobnych domen i 31 aminokwasowego ogona. Ta część powstaje z egzonów 1-13.
- jako receptor związany z błoną komórkową (m Flt-1 – *membrane-bound form*).

W tej pracy badano receptor związany z błoną komórkową.

#### 1.3.6.2. Czynniki stymulujące produkcję Flt-1

Głównym czynnikiem stymulującym ekspresję mRNA dla Flt-1 jest hipoksja. Bezpośrednio aktywuje ona element zlokalizowany w pozycji 976 do 937 promotora genu Flt-1 (*hypoxia inducible enhancer element*) [47] i wzmacnia jego produkcję dwu- do trzykrotnie (hipoksja nie zwiększa ekspresji KDR i Flt-4). Drugą przyczyną wzrostu ekspresji genu dla Flt-1 jest aktywacja makrofagów [47].

#### 1.3.6.3. Ligandy Flt-1

VEGFR-1 wiąże zarówno VEGF-A, VEGF-B jak i PlGF [129], przy czym dla VEGF-B i PlGF jest on jedynym receptorem.

PlGF wywiera szczególny wpływ na swój jedyny receptor. Działa dwojako:

- Regulacyjnie -gdyż nadmiar PlGF wiążąc się z receptorem Flt-1 powoduje biodostępność VEGF dla KDR. Co więcej, PlGF, sprzyjając heterodimeryzacji Flt-1 z KDR umożliwia uruchomienie kaskady sygnałowej receptora KDR. Efektem tego działania jest indukcja angiogenezy za pośrednictwem KDR [6].
- Bezpośrednio - PlGF łącząc się z VEGFR-1 powoduje fosforylację w miejscu Tyr 1309, aktywując kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) i ścieżki sygnałowe PI3K-Akt oraz ERK. Kaskady sygnałowe uruchamiane są przede wszystkim w makrofagach, ale działają również w komórkach śródbłonna. Flt-1

stymulowany przez PIGF, może w ten sposób promować hematopoezę, jak również patologiczną angiogenezę [121,162]. Warto dodać, że VEGF za sprawą fosforylacji homodimeru Flt-1 w miejscu Tyr 1213, nie zmienia profilu ekspresji genów komórek śródbłonka naczyniowego, nie spowoduje proliferacji komórek śródbłonka, ani ich migracji, ani apoptozy [92]. PIGF natomiast zwiększa tę ekspresję ponad 50 razy [6].

#### **1.3.6.4. Występowanie Flt-1**

Początkowo sądzono że VEGFR-1 podobnie jak VEGFR 2 i 3 występuje tylko na komórkach śródbłonkowych[13]. Obecnie wiadomo, że receptor znajduje się na wielu różnych komórkach, a pełniona w nich funkcja wciąż pozostaje zagadką.

Flt-1 występuje w normalnych i patologicznych tkankach, w procesach zapalnych i nowotworowych. Można go znaleźć na komórkach linii hematopoetycznej, monocytach i makrofagach, gdzie pełni funkcję regulacyjną. Poza tym zaobserwowano ekspresję Flt-1 na komórkach dendrytycznych, osteoklastach, pericytach, hepatocytach, na komórkach trofoblastu w łożysku [129], komórkach mięśni gładkich [162] i na komórkach nowotworów o różnym pochodzeniu [120]. Znaczenie ekspresji Flt-1 na komórkach zarówno endotelialnych, jak i nie-endotelialnych nie jest jasne, jednak receptor ten może pełnić funkcję regulacyjną w cyklu życiowym tych komórek.

#### **1.3.6.5. Rola Flt-1**

Interpretacja roli receptora Flt-1 w procesie angiogenezy od początku sprawiała problem. Wydawał się on pełnić jednocześnie dwie przeciwstawne funkcje - zarówno stymulatora jak i inhibitora angiogenezy [128]. Z pewnością jest ważnym etapem embriogenezy.

##### **1.3.6.5.1. Flt-1 jako *trap-receptor* w procesie embriogenezy**

Pierwsze doświadczenia, wykonywane na embrionach wydawały się potwierdzać negatywną, inhibitorową rolę Flt-1 w procesie angiogenezy.

Polegały na celowanej delecji genu dla całego receptora. Skutkiem była wczesna (około 9 dnia ciąży) śmierć mysiego płodu związana z nieuformowaniem się uporządkowanych, tubularnych struktur naczyniowych, mimo pojawienia się dużej ilości komórek progenitorowych dla śródbłonka [41].

Kolejnym doświadczeniem było wyeliminowanie nie całego receptora, lecz jedynie jego regionu cytoplazmatycznego zawierającego kinazę tyrozynową. W tym przypadku mysie embriony rozwinęły się zupełnie normalnie, nie wykazując żadnych aberracji w układzie naczyniowym [56].

Te dwa doświadczenia umocniły hipotezę, że Flt-1 służy jako rodzaj swoistej pułapki. Jego rola w procesie angiogenezy sprowadzać się ma do tego, że używa swojej zewnątrzkomórkowej domeny by z dużym powinowactwem wiązać krążący VEGF i w ten sposób reglamentować jego dostępność dla KDR.

Teorię tę wydaje się potwierdzać również fakt, że u modeli zwierzęcych pozbawionych receptora Flt-1, efekt nadmiernej i nieprawidłowej angiogenezy można odwrócić używając inhibitorów VEGF lub Flk-1. Po zastosowaniu SU5416 (inhibitora Flk – 1), lub wolnego Flt-1, który wylapywał nadmiar VEGF, wybujały wzrost naczyń udało się ograniczyć [114].

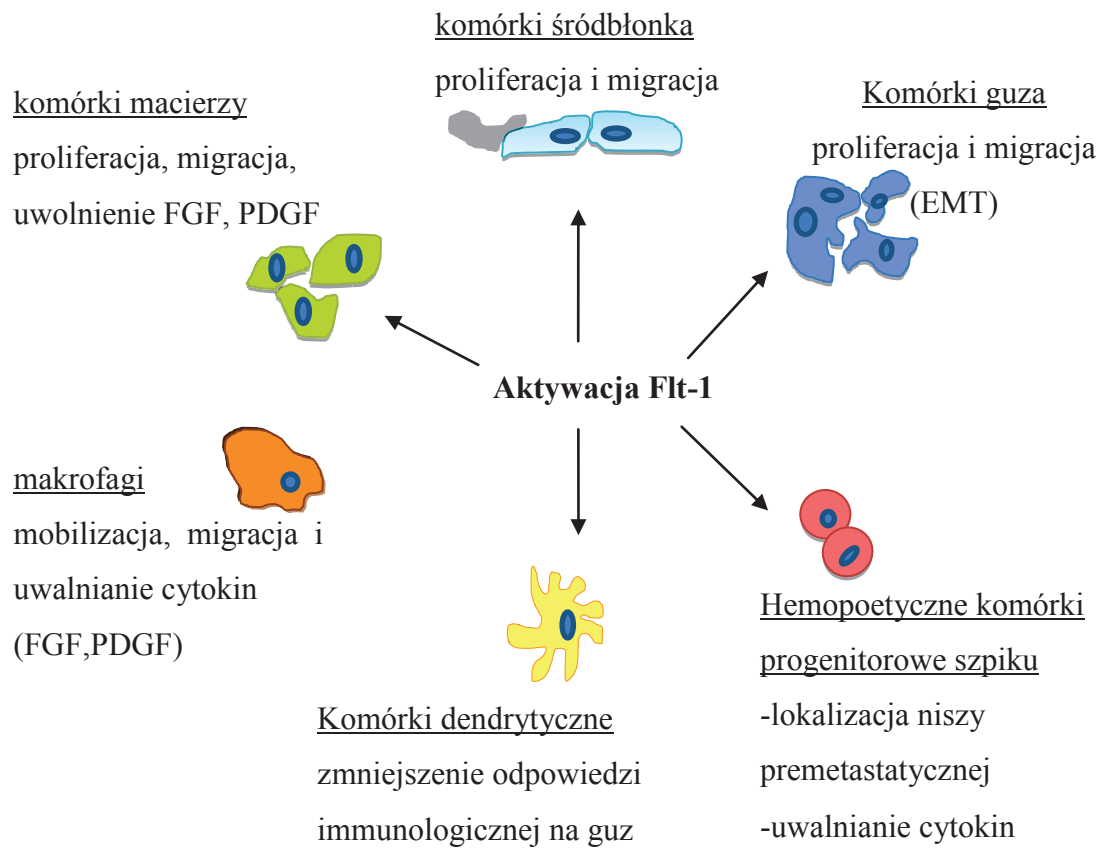
Z doświadczeń tych można wywnioskować, że w czasie embriogenezy receptor Flt-1 odgrywa głównie funkcję regulacyjną, pełniąc przede wszystkim rolę pułapki dla VEGF, chroniącego przed nadmierną stymulacją receptora KDR.

Po okresie intensywnej angiogenezy, u osobników dojrzałych rola ta się zmienia, a receptor Flt-1 wydaje się pełnić bardziej skomplikowane funkcje.

#### **1.3.6.5.2. Flt-1 jako wielofunkcyjny receptor u osobników dorosłych**

U osobników dorosłych receptorowi Flt-1 przypisujemy wiele funkcji. Poniżej podjęto próbę usystematyzowania poglądów na jego rolę.

- I. Angiogeneza. Receptor Flt-1 wciąż może pełnić rolę negatywnego regulatora procesu. Może również stymulować powstawanie naczyń formując heterodimery z KDR, lub uruchamiać kaskady sygnałowe wskutek stymulacji przez PlGF [168]. Dodatkowo warunkuje mobilność nowopowstałych komórek śródbłonkowych [85].
- II. Modulacja działania komórek zapalnych. Flt-1 warunkuje rekrutację monocytów ze szpiku kostnego [53], sprzyja mobilności makrofagów [9,22], ale też może upośledzać działanie komórek dendrytycznych [94].
- III. W przypadku nowotworów może sprzyjać powstawaniu przerzutów poprzez stymulację przejścia mezenchymalno - nabłonkowego (*Epithelial-mesenchymal transition* EMT) oraz powstawania nisz premetastatycznej.



Rycina 5. Aktywacja receptora Flt-1 wielopłaszczyznowo wpływa na rozwój guza nowotworowego [120]

## 2. Cel pracy

Wobec tak znaczącej roli VEGF we wzroście nowotworów i wciąż mało poznanej roli Flt-1 w biologii raka jelita grubego, rodzi się pytanie, czy ekspresja tych czynników określona w guzie pierwotnym przekłada się jednoznacznie na złośliwość raka? Czy można dzięki tym oznaczeniom określić potencjalnie wzmożoną agresywność procesu nowotworowego?

Wiemy, że podobnie zaawansowane raki wykazują bardzo zróżnicowane rokowanie. Posiadanie wiedzy o wzmożonej agresywności raka może determinować bardziej intensywny nadzór onkologiczny nad pacjentem czy dobór terapii uzupełniającej.

Czy uda się zaobserwować związek pomiędzy nasileniem procesu angiogenezy w guzie mierzonym gęstością sieci naczyniowej a poziomem VEGF i jego receptora Flt1, oraz czy istnieje powiązanie pośrednie lub bezpośrednie pomiędzy ekspresją VEGF i/lub jego receptora a rokowaniem chorego?

Wciąż nie mamy jednoznacznej odpowiedzi na te pytania, ponieważ wyniki badań naukowych w tym zakresie są niejednoznaczne, lub wzajemnie się wykluczają. To zainspirowało mnie do przeprowadzenia własnych badań o celu określonym jak poniżej.

1. Ocena gęstości naczyń oraz ekspresji VEGF i Flt-1 w guzach pierwotnych raka jelita grubego.
2. Poznanie zależności pomiędzy VEGF i Flt-1, oraz między VEGF i Flt-1 a gęstością naczyń.
3. Określenie związku pomiędzy gęstością naczyń, ekspresją VEGF i Flt-1, a wybranymi cechami patoklinicznymi o potencjalnym znaczeniu rokowniczym.
4. Ocena zależności pomiędzy gęstością naczyń, ekspresją VEGF i Flt-1 a wynikiem odległym leczenia raka jelita grubego.

### **3. Materiał i metody**

#### **3.1 Charakterystyka pacjentów**

Badanie przeprowadzono retrospektywnie. Grupa objęta badaniem to 139 chorych z rakiem jelita grubego, operowanych zabiegiem resekcyjnym w Klinice Chirurgii Onkologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie: Gdański Uniwersytet Medyczny) w latach 1998-2002. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Badań Naukowych o numerze NKEBN/4/005. Charakterystykę patokliniczną badanej grupy przedstawiono w tabeli 4.

Przed leczeniem chirurgicznym chorzy nie byli poddawani leczeniu onkologicznemu. Operacja spełniała kryteria resekcji R0, czyli miejscowo była onkologicznie radykalna. Stopień zaawansowania choroby nowotworowej określono według klasyfikacji pTNM według siódmej edycji klasyfikacji Union International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) [133]. Podział histologiczny oparto o klasyfikację WHO. We wszystkich przypadkach rozpoznano raka gruczołowego. Wyróżniono nowotwory dobrze (G1), średnio (G2) i nisko (G3) zróżnicowane.

Obserwację pacjentów ukończono 30 sierpnia 2006r.



Tabela IV. Charakterystyka pacjentów.

Badany parametr		Liczba chorych	Procent
Stopień zawansowania klinicznego	I	15	10,8
	II	47	33,8
	III	48	34,5
	IV	29	20,9
Cecha pT według TNM	1	2	1,58
	2	21	15,1
	3	96	69,0
	4	20	14,4
Cecha pN według TNM	0	68	48,9
	1	43	30,9
	2	28	20,2
Cecha M według TNM	0	110	79,1
	1	29	20,9
Stopień zróżnicowania histologicznego	G1	21	15,1
	G2	106	76,3
	G3	12	8,6
5 letnie przeżycie	TAK	85	61,1
	NIE	54	38,9
1 roczne przeżycie	TAK	123	88,5
	NIE	16	11,5
Lokalizacja	Odbytnica	61	43,9
	Okreźnica	78	56,1
Płeć	Kobiety	61	43,9
	Mężczyźni	78	56,1
Wiek mediana =66 lat	<mediany	61	44
	≥ mediany	78	56

### 3.2 Badania histopatologiczne

Badania histopatologiczne i oznaczenia immunohistochemiczne wykonane zostały w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do badań immunohistochemicznych wykorzystano materiał tkankowy pochodzący z guzów pierwotnych raka jelita grubego, pozyskanych podczas zabiegów operacyjnych. Materiał ten utrwalony został w 4% roztworze formaldehydu, odwodniony za pomocą alkoholu etylowego i zatopiony w niskotopliwej parafinie. Bloki parafinowe zostały następnie opracowane. Skrojono je na mikrotomie saneczkowym na skrawki grubości 4 mikronów. Skrawki rutynowo wybarwiono hematoksyliną i eozyną. Do badań wybierano fragmenty guza bez ognisk martwicy.

Reprezentatywne skrawki nanoszono na szkiełka podstawowe pokryte 2 % roztworem silanu (APES -sigma A3648). Skrawki podawano inkubacji w cieplarni w temperaturze 36°C przez 24 godziny, odparafinowano, uwodniono i wykonywano oznaczenie ekspresji antygenów, według instrukcji producenta przeciwciał.

Do oznaczeń użyte zostały następujące przeciwciała:

- przeciwciało poliklonalne anty Flt-1 (c-17); firmy Santa Cruz Biotechnology,
- przeciwciało monoklonalne anty VEGF (A-20) firmy Santa Cruz Biotechnology,
- przeciwciało poliklonalne anty CD 34 firmy DAKO.

Procedury dla poszczególnych oznaczeń opisane zostały poniżej.

### **3.2.1. Oznaczenie gęstości naczyniowej przy użyciu przeciwciał CD 34 Class I. Clone SI-CS.**

Preparaty poddane zostały obróbce termicznej w łaźni wodnej w roztworze Target Retrieve 1 Solution (nr kat. S-1700, pH 6,0) w temperaturze 99,9 stopni Celsjusza przez 20 minut. Następnie studzono je w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Płukano je dwukrotnie w roztworze PBS przez 10 minut, a następnie zanurzono w 3% roztworze wody utlenionej przez kolejne 10 minut i ponownie dwukrotnie płukano przez 10 minut w roztworze PBS (buforowany roztwór soli).

Na tak przygotowany preparat nałożono pierwotne przeciwciała CD 34 (Class I Clone B 1-3C5 nr kod M 7187 DAKO) w rozcieńczeniu 1:25. Całość inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po inkubacji znów dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 minut.

Na preparat inkubowany z przeciwciałami CD34 nałożono przeciwciała wiążące - biotynylowane przeciwciała anty-mysie i anty-królicze (nr kod K-675 DAKO) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie wypłukano w roztworze PBS przez 10 minut i nałożono streptawidynę połączoną z peroksydazą chrzanową (nr kod K675 DAKO). Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 minut a następnie zanurzono w roztworze substratu, czyli roztworu diaminobenzydyny -DAB (nr kod K 3468 DAKO). Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Preparat płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut, barwiono w hematoksylinie Meyera przez 5 minut i znów płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut. Procedurę kończyło odwodnienie preparatu, prześwietlenie i zamknięcie go w balsamie kanadyjskim.

W celu oceny gęstości naczyniowej, w preparatach barwionych CD34 poszukiwano pól o wzmożonym unaczynieniu („hot spots”) pod powiększeniem 40 i 100 razy według procedury opisanej przez Weidnera [158].

Obliczenie gęstości naczyniowej wykonywano pod powiększeniem 200 - krotnym w polu o powierzchni  $0,785\text{mm}^2$ .

### 3.2.2. Oznaczanie ekspresji VEGF przy użyciu przeciwciała anty VEGF (A-20) sc 152.

Preparaty poddane zostały obróbce termicznej w łaźni wodnej w roztworze Target Retrieve 1 Solution (nr kat. S-1700, pH 6,0) w temperaturze 99,9 stopni Celsjusza przez 30 minut. Następnie studzono je w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

Płukano je dwukrotnie w roztworze PBS przez 10 minut, a następnie zanurzono w 3% roztworze wody utlenionej przez kolejne 10 minut i ponownie dwukrotnie płukano przez 10 minut w roztworze PBS. Na tak przygotowany preparat nałożono pierwotne przeciwciała VEGF A 20 S.C. 152 - Santa Cruz Biotechnology w roztworze 1:100. Całość inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji znów dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 minut.

Na preparat inkubowany z przeciwciałami anty- VEGF-A nałożono przeciwciała wiążące - biotynylowane przeciwciała anty-mysie i anty-królicze (nr kod K-675 DAKO) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie wypłukano w roztworze PBS przez 10 minut i nałożono streptawidynę połączoną z peroksydazą chrzanową (nr. kod. K675 DAKO). Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 min a następnie zanurzono w roztworze substratu, czyli roztworu diaminobenzyny - DAB (nr. kod. K 3468 DAKO). Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Preparat płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut, barwiono w hematoksylinie Meyera przez 5 minut i znów płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut.

Procedurę kończyło odwodnienie preparatu, prześwietlenie i zamknięcie go w balsamie kanadyjskim.

Ekspresję VEGF w komórkach guza oceniono w 2 stopniowej skali intensywności odczynu w zależności od uzyskanej reakcji barwnej:

- 0- brak odczynu, lub odczyn słaby - brak ekspresji VEGF
- 1- intensywny odczyn - nadekspresja VEGF

### 3.2.3. Oznaczanie ekspresji Flt-1 przy użyciu przeciwciała anty - Flt-1 c17sc.

Preparaty poddane zostały obróbce termicznej w łaźni wodnej w roztworze Target Retrieve1 Solution (nr kat. S-1700, pH 6,0) w temperaturze 99,9 stopni Celsjusza przez 30 minut. Następnie studzono je w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Płukano je dwukrotnie w roztworze PBS przez 10 minut, a następnie zanurzono w 3% roztworze wody utlenionej przez kolejne 10 minut i ponownie dwukrotnie płukano przez 10 minut w roztworze PBS.

Na tak przygotowany preparat nałożono pierwotne przeciwciała Flt-1 c17sc Santa Cruz Biotechnology w rozcieńczeniu 1:300. Całość inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji znów dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 minut.

Na preparat inkubowany z przeciwciałami anty - Flt-1 nałożono przeciwciała wiążące - biotynylowane przeciwciała anty-mysie i anty-królicze (nr. kod. K-675 DAKO) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie wypłukano w roztworze PBS przez 10 minut i nałożono streptawidynę połączoną z peroksydazą chrzanową (nr kod K675 DAKO). Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Dwukrotnie płukano w roztworze PBS przez 10 min a następnie zanurzono w roztworze substratu, czyli roztworu diaminobenzzydiny - DAB (nr. kod. K 3468 DAKO). Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Preparat płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut, barwiono w hematoksylinie Meyera przez 5 minut i znów płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut.

Procedurę kończyło odwodnienie preparatu, prześwietlenie i zamknięcie go w balsamie kanadyjskim.

Ekspresję Flt -1 w guzie oceniono w stopniowej skali intensywności odczynu w zależności od uzyskanej reakcji barwnej:

- 0- brak odczynu – brak ekspresji Flt -1
- 1- odczyn obecny – obecna ekspresja Flt -1

Uzyskane wyniki oznaczeń odniesiono do:

- 1) czasu przeżycia chorych w miesiącach,
- 2) mediany wieku,
- 3) płci,
- 4) lokalizacji nowotworu: okrężnica vs odbytnica,
- 5) zakresu naciekania guza (pT 1-4), stanu okolicznych węzłów chłonnych (pN 1-2), istnienia przerzutów odległych (cecha pM 0-1),
- 6) stopnia zaawansowania wg. pTNM (I–IV stopień),
- 7) zróżnicowania histologicznego guza nowotworowego (G1 – G3).

### 3.3 Obliczenia statystyczne

Analizy statystycznej dokonano z wykorzystaniem narzędzi pakietu Statistica 10. Do oceny zależności między gęstością mikronaczyń w podścielisku guza, a nasileniem ekspresji czynników odpowiadających za ich wzrost, oraz zależności między gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi nowotworu użyto testu U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa. Oceny zależności między nasileniem ekspresji czynników powodujących wzrost naczyń w podścielisku guza a parametrami patoklinicznymi nowotworu dokonano stosując test  $\chi^2$  Paersona. Analizy przeżyć dokonano metodą Kaplana-Meiera. Różnice między czasem przeżycia w badanych grupach weryfikowano testem log-rank. Dla wszystkich obliczeń przyjęto poziom istotności 0,05.

W niektórych przypadkach, na potrzeby analizy statystycznej, łączono grupy ocenianych parametrów patoklinicznych, ze względu na ich małą liczebność: T1+T2 vs T3+T4, stopnie zaawansowania klinicznego I+II vs III+IV.

## 4. Wyniki i omówienie

### 4.1 Analiza badanej grupy pacjentów

#### 4.1.1. wiek pacjentów

W badanej przeze mnie grupie średnia wieku wynosiła 64,4 a mediana 66,3 lat. Odchylenie standardowe 11,9. Najmłodszy badany chory miał 31 lat, najstarsza - 90,4. Rozkład wieku pacjentów jest zbliżony do danych w Krajowym Rejestrze Nowotworów [160], według którego większość zachorowań na nowotwory złośliwe jelita grubego występuje po 50 roku życia (94%), przy czym ponad 75% zachorowań u obu płci przypada na populację osób starszych (po 60 roku życia). Ryzyko zachorowania na raka jelita grubego wzrasta z wiekiem. Zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet najwyższe ryzyko zachorowania przypada na przełom 8 i 9 dekad życia. W badanej przeze mnie grupie najwięcej jest jednak chorych w 7 i 8 dekadzie życia. Wiąże się to najprawdopodobniej z tym, że badana populacja dotyczyła jedynie chorych kwalifikujących się do operacji i to operacji wiążących się z resekcją guza.

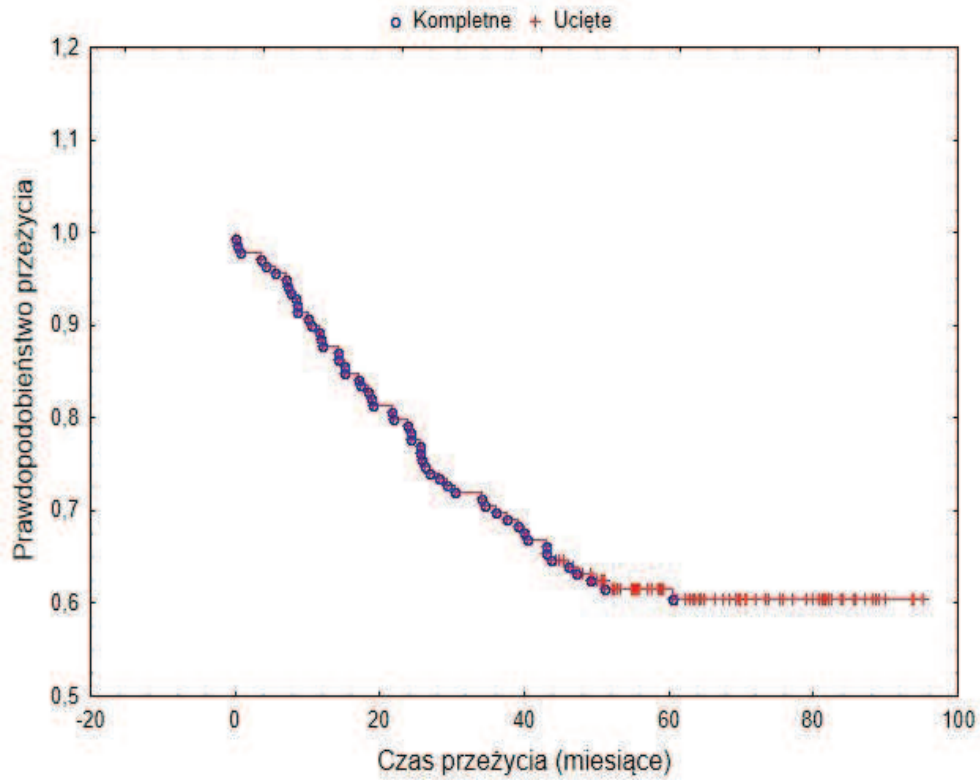
#### 4.1.2. długość życia

Wśród pacjentów, u których zdiagnozowano raka jelita grubego w latach 1998-2002, 1 - roczne wskaźniki przeżyć wynosiły 70,1% u mężczyzn i 68,6% u kobiet. W badanej przeze mnie grupie 85,9% u mężczyzn i 92% u kobiet.

Przeżycia 5 letnie w grupie polskich mężczyzn chorych na raka jelita grubego wynosiły w tamtym okresie 43,3% a wśród kobiet 44,1%. W grupie badanych przeze mnie chorych 5 letnie przeżycie u mężczyzn wynosiło 61,5%, u kobiet 60,6%.

Lepsze rokowanie chorych operowanych w Klinice Chirurgii Onkologicznej wiązało się najprawdopodobniej z faktem, że włączeni do analizy byli tylko ci chorzy, którzy kwalifikowali się do leczenia operacyjnego, a wśród nich tylko tacy, u których można było wykonać zabieg resekcyjny.

Na rycinie 6 przedstawiono krzywą przeżycia Kaplana-Meiera dla badanej grupy  $n=139$ . Prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat po operacji wynosi 61%, prawdopodobieństwo przeżycia 1 roku – 89%.



Rycina 6 Krzywa Kaplana-Meiera dla analizowanej grupy chorych  $n=139$ .



Wpływ analizowanych parametrów na przeżycia przedstawiono w tabeli V.

Tabela V. Czynniki patokliniczne badanej grupy a czas przeżycia całkowitego, n=139.

Parametr		Log-rank wartość p
Płeć	Kobieta (K)	ns
	Mężczyzna (M)	
Wiek (mediana 66 lat)	< mediany	ns
	≥ mediany	
Lokalizacja	okreźnica odbytnica	<b>0,03</b>
Cecha pT	T1 + T2	ns
	T3 + T4	
Cecha pN	N0	<b>0,03</b>
	N+	
Cecha pM	M0	<b>0,00004</b>
	M+	
Stopień zaawansowania klinicznego	I + II	<b>0,01</b>
	III + IV	
Stopień zróżnicowania histologicznego	G1	ns
	G2	
	G3	
Flt-1	ekspresja	ns
	brak ekspresji	
VEGF	nadekspresja	ns
	bez nadekspresji	
Gęstość naczyń/pole widzenia	< mediany	ns
	≥ mediany	

ns - nieznamienne statystycznie

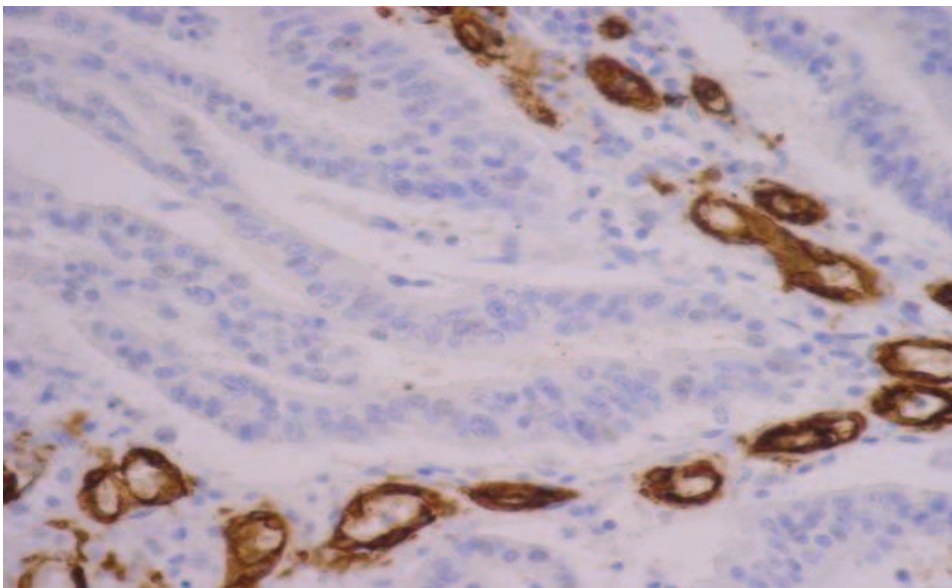
Lepiej rokowali pacjenci z rakiem okrężnicy. Obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych jak i obecność przerzutów odległych to czynniki pogarszające rokowanie pośród badanych pacjentów.

#### 4.1.3. płeć

W badanej przeze mnie grupie znalazło się 61 kobiet i 79 mężczyzn. Według Krajowego Rejestru Nowotworów, ryzyko zachorowania na raka jelita grubego u mężczyzn jest około 1,5-2 razy wyższe niż u kobiet. Co ciekawe, zachorowalność na nowotwory złośliwe jelita grubego u mężczyzn do końca XX wieku charakteryzowała się szybkim wzrostem. Tendencja ta uległa osłabieniu dopiero w XXI wieku. Badana przeze mnie grupa mężczyzn pochodziła z okresu, gdy tempo wzrostu liczby zachorowań u mężczyzn właśnie ulegało obniżeniu. W populacji kobiet natomiast, do połowy lat 90-tych XX wieku obserwowano szybki wzrost zachorowalności na raka jelita grubego, po czym tempo zachorowań zaczęło się osłabiać. Grupa kobiet objęta badaniem zachorowała w momencie, kiedy tempo wzrostu zachorowalności statystycznie również wyhamowało[27,160].

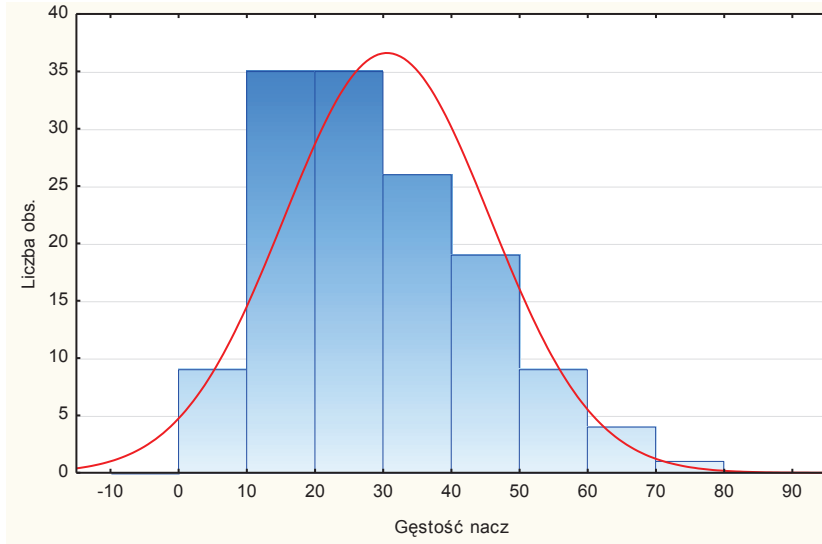
#### 4.2. Średnia gęstość naczyniowa (MVD – *microvessel density*)

Średnia gęstość naczyniowa wynosiła 30,33, a mediana 27,5 naczyń w polu widzenia. Zakres wartości mieścił się w przedziale 5-80 naczyń, odchylenie standardowe 15. Rycina 7 przedstawia obraz mikroskopowy komórek śródbłonkowych oznaczonych za pomocą przeciwciała anty CD-34.



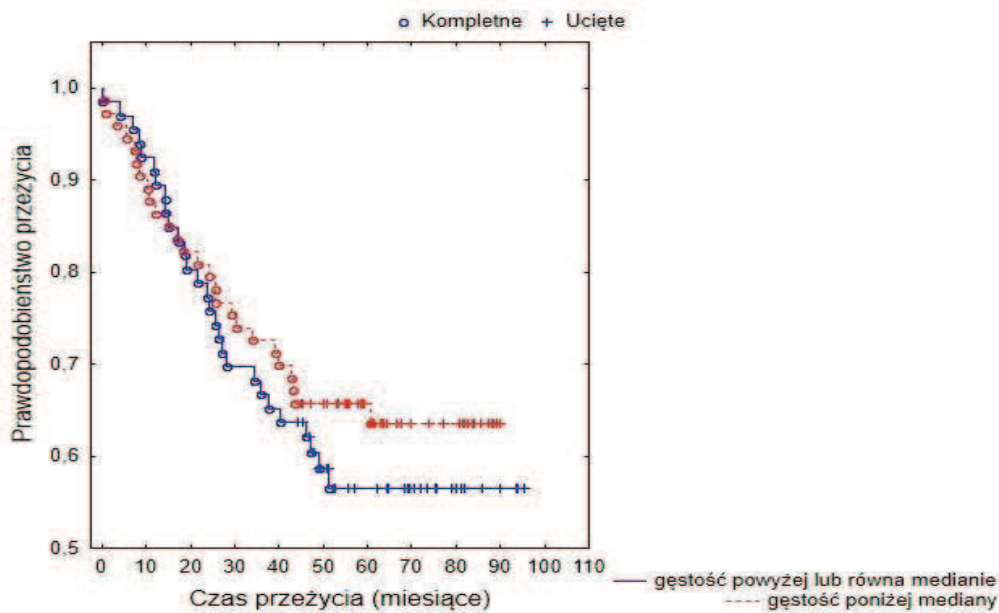
Rycina 7. Gęstość naczyniowa. Komórki śródbłonkowe oznaczone przy pomocy przeciwciała anty CD34.

Rycina 8 przedstawia histogram analizujący rozkład gęstości naczyniowej u badanych pacjentów. Normalność rozkładu testowano za pomocą testu Shapiro- Wilka  $W=0,9$ ,  $p=0,001$ . Wobec braku normalności rozkładu do analiz związanych z oceną gęstości naczyniowej stosowano testy nieparametryczne.



Rycina 8 Rozkład gęstości naczyniowej w preparatach.

Na rycinie 9 przedstawiono krzywe ilustrujące długość życia pacjentów z guzami charakteryzującymi się dużą (powyżej mediany) i małą (poniżej mediany) gęstością naczyniową. Prawdopodobieństwo 5 letniego przeżycia jest większe w przypadku guzów z małą gęstością naczyniową, ale różnica ta nie jest znamienne statystycznie.



Rycina 9. Zależność pomiędzy medianą gęstości naczyń a prawdopodobieństwem przeżycia.

W tabeli VI przedstawiono wyniki zależności pomiędzy gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego. Nie wykazano statystycznie znamiennej zależności między badanymi parametrami.

Tabela VI. Zależność pomiędzy MVD gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego (n=139, test U Manna-Whitneya, \*test Kruskala-Wallis).

<b>Parametr</b>		<b>Gęstość naczyń / pole widzenia wartość p</b>
<b>Płeć</b>	Kobieta (K) Mężczyzna (M)	ns
<b>Wiek (mediana 66 lat)</b>	< mediany ≥ mediany	ns
<b>Lokalizacja</b>	okreźnica odbytnica	ns
<b>Cecha pT</b>	T1 + T2 T3 + T4	ns
<b>Cecha pN</b>	N0 N+	ns
<b>Cecha pM</b>	M0 M+	ns
<b>Stopień zaawansowania klinicznego</b>	I + II III + IV	ns
<b>Stopień zróżnicowania histologicznego</b>	G1 G2 G3	*ns

ns-nieznamiennie statystycznie

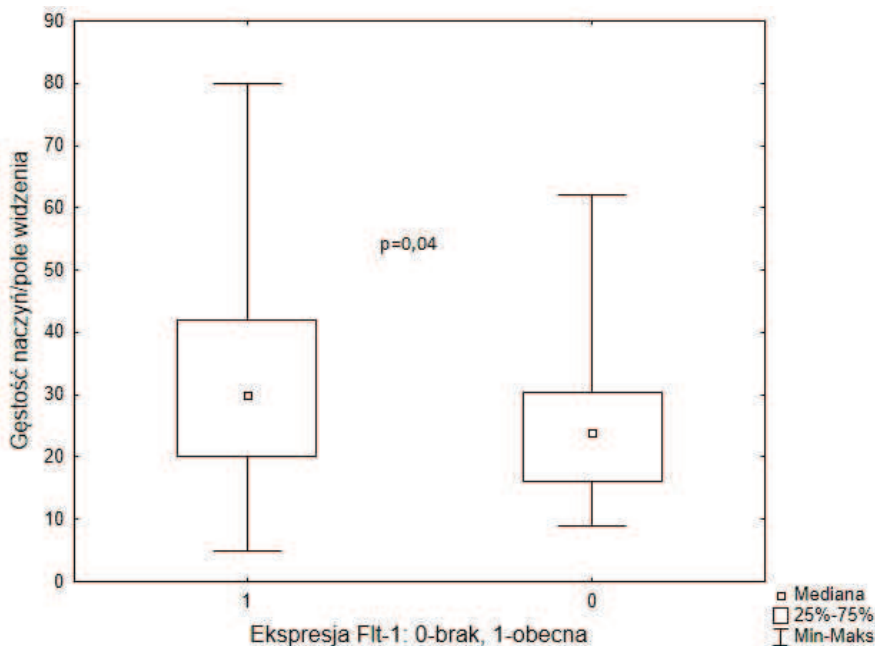
Obliczono zależności pomiędzy gęstością naczyniową w guzie pierwotnym, a nadekspresją VEGF i jego receptora. Wyniki przedstawiono w tabeli VII.

Tabela VII. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 i nadekspresją VEGF, a gęstością naczyniową w grupie n=139 (test U Manna-Whitneya).

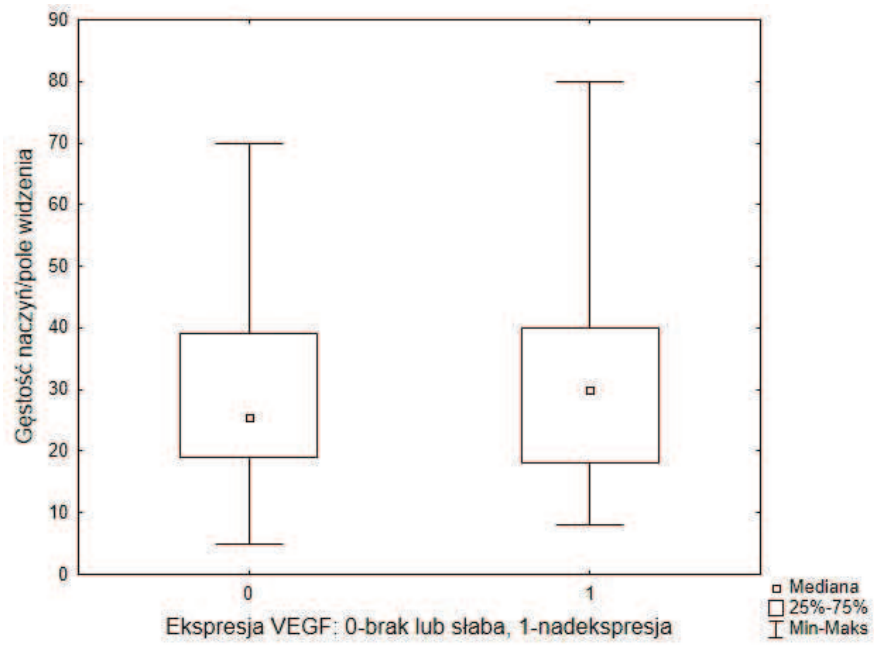
Parametr		Gęstość naczyń - mediana	wartość p
<b>Receptor Flt-1</b>	obecna ekspresja	30	<b>0,04</b>
	brak ekspresji	24	
<b>VEGF</b>	nadekspresja	30	ns
	brak lub słaba ekspresja	25,5	

ns- nieznamienne statystycznie

Zaobserwowano wyższą gęstość naczyniową w guzach o wyższej ekspresji Flt-1 (zależność znamienna statystycznie  $p=0,04$ ). Ponadto, stwierdzono wyższą gęstość naczyń w podścielisku guza w przypadku nadekspresji VEGF. Zależność ta jest nieznamienna statystycznie ( $p>0,05$ ). Powyższe zależności obrazują ryciny 10-11.



Rycina 10. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a gęstością naczyń w grupie n=139.

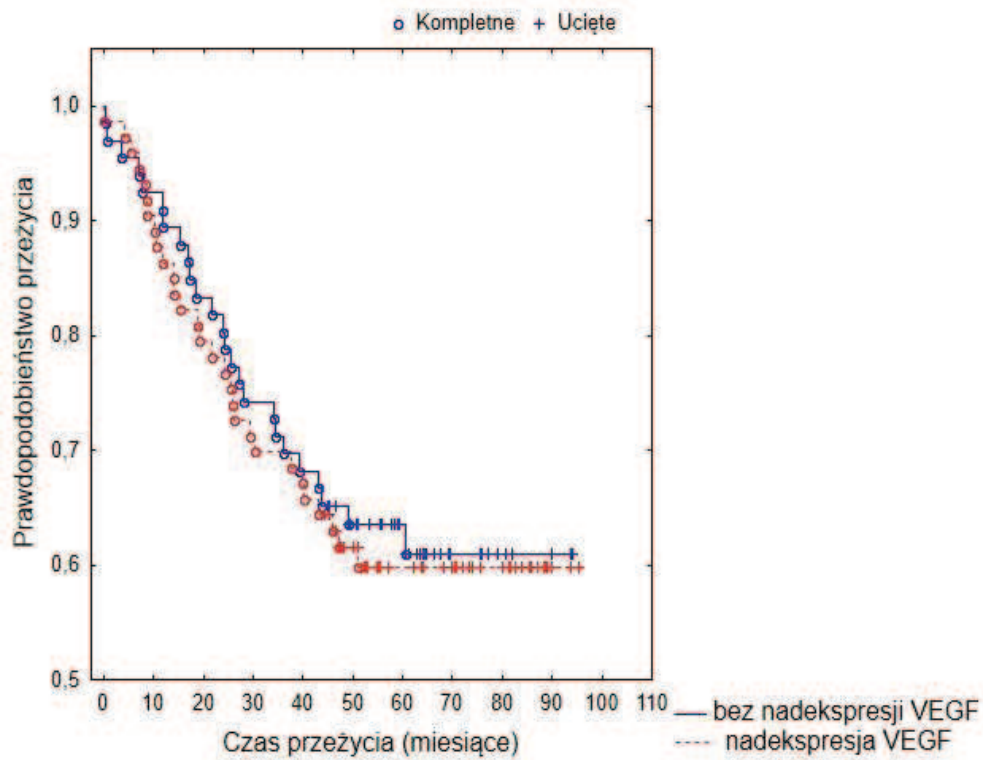


Rycina 11. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a gęstością naczyń w grupie n=139 ( $p>0.05$ ).

### 4.3. Ekspresja VEGF

Nadekspresję VEGF (bardzo silny odczyn w komórkach raka) stwierdzono w 73 przypadkach (52,5%). W pozostałych guzach odczyn był ujemny - 66 przypadków (47,5%) .

Rycina 12 przedstawia krzywą Kaplana-Meiera dla chorych z niską i wysoką ekspresją VEGF. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w prawdopodobieństwie przeżycia u chorych różniących się ekspresją VEGF.



Rycina 12. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a prawdopodobieństwem przeżycia.

W tabeli VIII przedstawiono zależności pomiędzy ekspresją VEGF, a parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej zależności między parametrami klinicznymi takimi jak wiek, płeć, lokalizacja, zaawansowanie, czy zróżnicowanie nowotworu a ekspresją VEGF.

Tabela VIII. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a wybranymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego w badanej grupie n=139 (test  $\chi^2$  Paersona).

<b>Parametr</b>		<b>VEGF (+) % pacjentów</b>	<b>VEGF (-) % pacjentów</b>	<b>wartość p</b>
<b>Płeć</b>	Kobieta (K)	48	39	ns
	Mężczyzna (M)	52	61	
<b>Wiek (mediana 66 lat)</b>	< mediany	44	44	ns
	≥ mediany	56	56	
<b>Lokalizacja</b>	okreźnica	56	56	ns
	odbytnica	44	44	
<b>Cecha pT</b>	T1 + T2	18	15	ns
	T3 + T4	82	85	
<b>Cecha pN</b>	N0	47	52	ns
	N+	53	48	
<b>Cecha pM</b>	M0	81	77	ns
	M+	19	23	
<b>Stopień zaawansowania klinicznego</b>	I + II	44	45	ns
	III + IV	56	55	
<b>Stopień zróżnicowania histologicznego</b>	G1	16	14	ns
	G2	73	80	
	G3	11	6	

ns-nieznamiennie statystycznie

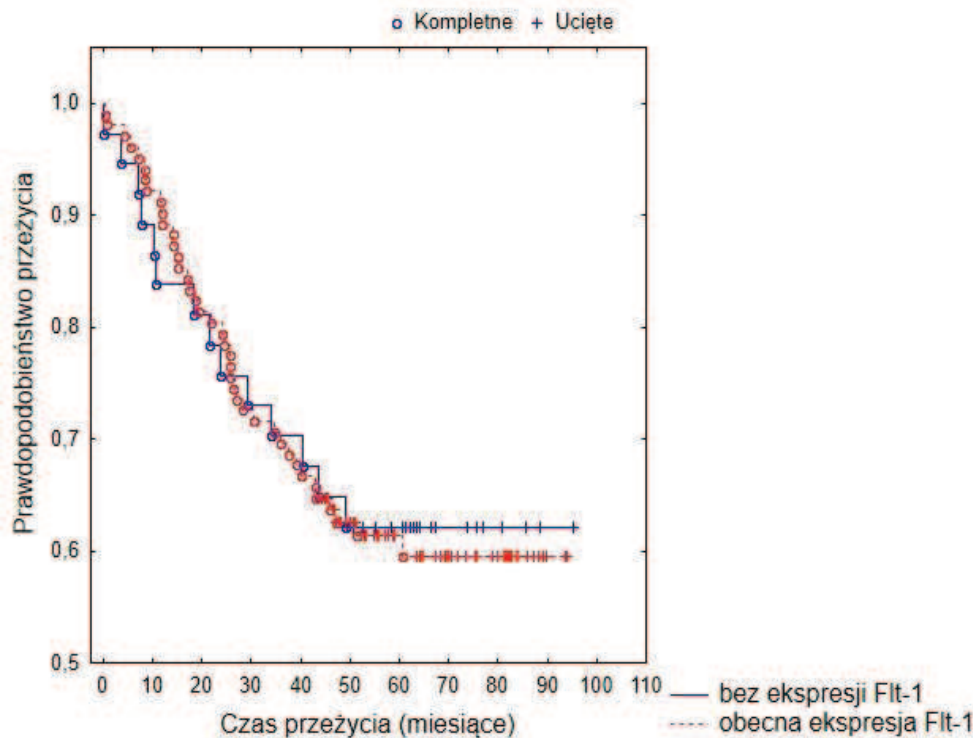


#### 4.4. Flt 1

Ekspresję Flt-1 oceniano w obrębie guza nowotworowego uwzględniając odczyn w komórkach nowotworowych.

Ekspresję Flt-1 stwierdzono w 102 (73%) przypadkach, w pozostałych przypadkach odczyn uznano za ujemny (37 chorych - 27%).

Na rycinie 13 przedstawiono krzywą Kaplana-Meiera dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją Flt-1. Nie uwidoczniło się statystycznie znaczącej różnicy w prawdopodobieństwie przeżycia u chorych z guzami bez ekspresji Flt1, w porównaniu z chorymi, których guzy wykazywały ekspresję receptora.



Rycina 13. Zależność pomiędzy ekspresją Flt-1 a prawdopodobieństwem przeżycia.

W tabeli IX przedstawiono zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a wybranymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego w badanej grupie. Tu również nie stwierdzono statystycznie znaczących zależności między parametrami klinicznymi takimi jak wiek, płeć, lokalizacja, zaawansowanie, czy zróżnicowanie nowotworu a ekspresją receptora Flt-1.

Tabela IX. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a wybranymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego w badanej grupie n=139 (test  $\chi^2$  Paersona).

<b>Parametr</b>		<b>Flt-1 (+)</b> <b>% pacjentów</b>	<b>Flt-1 (-)</b> <b>% pacjentów</b>	<b>wartość</b> <b>p</b>
<b>Płeć</b>	Kobieta (K)	42	49	ns
	Męczyzna (M)	58	51	
<b>Wiek</b> <b>(mediana 66 lat)</b>	< mediany	45	40	ns
	≥ mediany	55	60	
<b>Lokalizacja</b>	okrężnica	58	51	ns
	odbytnica	42	49	
<b>Cecha pT</b>	T1 + T2	15	22	ns
	T3 + T4	85	78	
<b>Cecha pN</b>	N0	49	49	ns
	N+	51	51	
<b>Cecha pM</b>	M0	78	81	ns
	M+	22	19	
<b>Stopień</b> <b>zaawansowania</b> <b>klinicznego</b>	I + II	43	49	ns
	III + IV	57	51	
<b>Stopień</b> <b>zróżnicowania</b> <b>histologicznego</b>	G1	15	16	ns
	G2	73	84	
	G3	12	0	

ns-nieznamiennie statystycznie

Dodatkowo wykazano zależność pomiędzy nadekspresją czynnika VEGF, a obecnością ekspresji receptora Flt-1. W grupie guzów, w których wykazano ekspresję receptora Flt-1, u 59 (58%) stwierdzono nadekspresję VEGF. Nie wykazano nadekspresji w 43 (42%) guzów, w których stwierdzono ekspresję receptora ( $p=0,03$ , test  $\chi^2$  Paersona).

## 5. Dyskusja

### 5.1. Indywidualizacja leczenia raka jelita grubego (RJG) i poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych.

Niezadawalające wyniki leczenia, oraz zróżnicowany przebieg choroby i odmienne rokowanie u pacjentów z pozornie tak samo zaawansowanym i podobnym histologicznie RJG, skłaniają do poszukiwania nowych narzędzi umożliwiających ustalenie prawidłowej diagnozy co do rodzaju nowotworu i jego rzeczywistej agresywności. To powinno się następowo przekładać na indywidualny dobór schematu obserwacji i odpowiednio dobranej terapii. Postęp multidyscyplinarnych badań nad nowotworami uświadomił nam, że przebieg choroby i rokowanie nie są prostymi pochodnymi rodzaju nowotworu i stopnia jego zaawansowania. Ten fakt skłania do poszukiwania nowych cech opisujących dany nowotwór, a co za tym idzie poszukiwania jego potencjalnych „słabych punktów”. Skutkiem tych badań jest coraz bardziej celowane i indywidualizowane leczenie, co wydaje się być dobrą drogą do poprawy jego wyników. Wciąż dokłada się starań, aby określić rolę poszczególnych czynników, receptorów, cytokin i genów w procesie nowotworzenia. Odkrywanie nowych parametrów opisujących nowotwór próbuje się następnie wykorzystać jako cel dla nowych strategii terapeutycznych, starając się jednocześnie, aby strategia ta, niszcząc nowotwór, była jak najmniej szkodliwa dla samego pacjenta.

Jedną ze ścieżek badań, które zmodyfikowały strategię leczenia nowotworów, w tym RJG, są badania nad angiogenezą. W wyniku tych badań do schematów leczenia raka jelita grubego trafiły leki antyangiogenne.

Poprawa wyników leczenia uzyskana przy ich użyciu zachęca do zgłębiania tej dziedziny i kontynuowania bardziej szczegółowych badań, mając nadzieję, że nie tylko sam VEGF może być użyteczny jako cel strategii przeciwnowotworowych, ale również jego receptory. Celem niniejszej rozprawy stało się ustalenie, na ile identyfikacja i badanie obecności poszczególnych czynników uczestniczących w procesie angiogenezy może ułatwić poznanie biologii raka jelita grubego i przybliżyć nas do ustalenia indywidualnego rokowania.

## 5.2 Gęstość naczyniowa

Gęstość naczyniowa (*microvessel density* - MVD) określa pośrednio ilość naczyń w tkance nowotworowej i obrazuje efekt angiogenezy.

W badanej przez mnie dość licznej grupie 139 pacjentów zbadano gęstość naczyniową w guzach posługując się przeciwciałami anti-CD 34 (Class I. Clone SI-CS). Nie wykazano znamiennej statystycznie korelacji między parametrami patoklinicznymi opisującymi guz, a gęstością naczyń. Nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic między gęstością naczyniową w grupach pacjentów różniących się w zakresie cech T, N i M, a także, jeśli chodzi o zróżnicowanie guza. Nie znaleziono również różnic w gęstości naczyniowej w guzie pierwotnym w odniesieniu do takich cech, jak wiek, płeć chorych i lokalizacja guza.

Należy dodać, że w innych pracach próbujących odnaleźć związki między gęstością naczyń a parametrami opisującymi guz nowotworowy trudno jest odnaleźć jednoznaczną odpowiedź na pytanie jak ten parametr wpływa na rokowanie pacjentów. Wyjątkiem jest szpiczak mnogi, w którym zarówno zwiększona gęstość naczyniowa, jak i ekspresja czynników proangiogennych korelują z gorszym rokowaniem [66,109,138].

Wśród guzów litych, nawet zawężając grupę poszukiwań do nowotworów przewodu pokarmowego trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski.

W rakach przełyku autorzy japońscy donosili o pozytywnej korelacji między MVD w guzie pierwotnym, a złym rokowaniem i szybką wznową miejscową [59,75,97]. Badania przeprowadzone były w grupach liczących 119 [49], 93 [59] i 102 [97] pacjentów z użyciem CD 34 [59,75] lub vWF [97]. Ta korelacja nie potwierdziła się w pracy autorów europejskich [151], gdzie badana grupa była mniej liczna (67 osób), a jako markera użyto CD 31.

W raku żołądka doszukiwano się korelacji MVD z poszczególnymi typami histologicznymi, przerzutami do węzłów chłonnych i zaawansowaniem. Tu znów przodowali autorzy japońscy [87,88,147,148]. Jedną tylko z badanych grup była nieliczna (57 osób [36]), pozostałe liczyły ponad 100 osób (od 108 do 192 badanych). Używany w badaniach markerem śródbłonna był CD34 [64,147,148], oraz vWF (czynnik von Willebrandta) [36,89,90]. Wysoka gęstość naczyniowa oznaczała gorsze rokowanie zarówno we wczesnych [17,163], jak i zaawansowanych rakach żołądka

[64], wydawała się również sprzyjać występowaniu przerzutów do węzłów chłonnych [17,163].

W rakach trzustki również wysoka MVD wydawała się sprzyjać gorszej prognozie, choć i tu doniesienia nie były jednoznaczne [60,70]. Może to wynikać z badań na nielicznych grupach. W przypadku raka trzustki grupy badane wynosiły od 22 do 40 osób. Największa i jedyna duża grupa liczyła 104 osoby. Do jej badania również użyto CD34 i potwierdzono związek zwiększonej gęstości naczyniowej w guzie pierwotnym z gorszym rokowaniem [44]. Do oznaczeń w pozostałych grupach użyto tego samego przeciwciała, lub też vWF. Przeciwciała przeciw vWF użyto w najmniejszej badanej grupie w której nie potwierdzono wpływu MVD na rokowanie [33].

W raku wątrobowokomórkowym [107,137] badane grupy liczyły od 43 do 100 osób a oznaczenia immunohistochemiczne, z jednym wyjątkiem, również prowadzone były z użyciem CD34, potwierdzając, że im większa gęstość naczyniowa tym gorsze rokowanie.

Również jeśli chodzi o nowotwory jelita grubego, trudno na podstawie dostępnych prac wysnuć jednoznaczne wnioski dotyczące wpływu zwiększonej gęstości naczyń w guzie na rokowanie, choć był to nowotwór dość intensywnie badany. Już w 1995 roku pojawiły się pierwsze doniesienia [42], o negatywnym wpływie MVD na rokowanie w grupie 105 osób. We wczesnych pracach, do wyznakowania śródbłonna używano przeciwciała przeciw vWF [42,143,146]. W następnych latach pojawiają się publikacje wyników badań w których znacznikiem był CD 31 [1,19,35,45,63,78,106,154]. Przeciwciała przeciw CD34, którego użyłam w swoich badaniach, nie cieszyło się wśród badaczy nowotworów jelita grubego takim powodzeniem, jak w innych nowotworach.

Wyniki również nie były spójne. Część prac donosiła, że duża gęstość naczyniowa ogólnie negatywnie wpływała na rokowanie [35,146]. Inni udowadniali, że owszem, negatywnie, ale tylko u pacjentów N0 [42,144], lub, że ilość naczyń krwionośnych w guzie pozytywnie koreluje z cechą M [143]. Dla równowagi są również doniesienia podobne do wyników mojego badania, o braku wpływu gęstości naczyniowej na rokowanie w tym nowotworze [7]. Cytowane badanie dotyczyło jednakże niewielkiej grupy 22 wyselekcjonowanych pacjentów T3 N0 M0. Nie brak też prac donoszących o lepszym rokowaniu dla chorych z nowotworami z dużą ilością naczyń. Takie wyniki badań osiągnięto w grupie 111 pacjentów [1].

Te rozbieżności w wynikach badań, dotyczące zresztą także innych nowotworów świadczą o niedoskonałości metodologii oznaczania MVD.

Najważniejszą wydaje się trudność w standaryzacji metody, co może być przyczyną rozbieżność wyników podawanych w różnych pracach.

Używany przez większość autorów sposób oceny MVD został opracowany przez Weidnera w 1991 [158]. Najważniejsze jest odnalezienie tak zwanych *hot spots*, czyli pól, gdzie unaczynienie guza jest największe. Pola wybierane są przy 100-krotnym powiększeniu i znajdują się z reguły na obwodzie guza, gdzie najwięcej jest żywych komórek nowotworowych, a najmniej martwicy i włóknienia. Niestety w praktyce, miejsce oznaczania MVD jest często subiektywnie wytypowane przez badacza.

Samo liczenie odbywa się przy dwustu, lub czterystukrotnym powiększeniu. W starszych pracach badacze często liczyli sami wyznakowane naczynia. W nowszych, w tym mojej, liczenie odbywa się automatycznie przy użyciu komputera, co poprawia dokładność badania. Trudniej jest za to porównać uzyskane wyniki do starszych oznaczeń, liczonych bez pomocy technicznej.

Najwięcej rozbieżności jest przy wyborze przeciwciał używanych do wyznakowania naczyń. W tej pracy użyto przeciwciała anty CD34, ze względu na jego dużą czułość i powtarzalność uzyskiwanych wyników [154]. Należy jednak pamiętać, że CD34 reaguje z aktywnymi, jak i nieaktywnymi komórkami śródbłonka naczyniowego. Oznacza to, że nie jest markerem proliferacji komórek śródbłonkowych i wykrywa też komórki endotelialne, które mogą być tylko „uwięzione” w komórkach guza. Używa się również innych znaczników do oznaczenia gęstości naczyń, jak wyżej wspomniane przeciwciała skierowane przeciw czynnikowi von Willebrandta [157]. Wadą znacznika jest fakt, że antygen ten nie jest obecny na wszystkich komórkach śródbłonkowych, występuje za to na płytkach krwi.

W wielu cytowanych wyżej pracach używano również przeciwciała anty CD31. Ten antygen identyfikuje komórki śródbłonkowe, ale występuje też na niektórych liniach leukocytów.

Tych wad nie ma z kolei przeciwciała przeciw glikoproteinie CD105 (endoglina). Anty-CD105 reaguje jedynie z pobudzonymi, aktywnymi komórkami śródbłonkowymi, jest więc markerem związanym z proliferacją.

Niektórzy wykorzystywali przeciwciała przeciw nestynie (nestin), białku obecnemu na neuroepitelialnych komórkach macierzystych i na komórkach nerwowych, gleju.

Nestyna oznaczana na komórkach śródbłonkowych, jest również markerem procesu angiogenezy [72].

Odkryciem ostatnich lat jest przeciwciało przeciw integrynie  $\alpha_v\beta_3$  [46], molekule adhezyjnej śródbłonka, umożliwiającej oznaczanie aktywowanych komórek śródbłonkowych, co oznacza nie tylko możliwość wykrycia komórek śródbłonka, ale także komórek, które ulegają EMT.

Oprócz różnorodności i niedoskonałości markerów (w tym użytego przeze mnie CD34), kolejnym potencjalnym słabym punktem metody oznaczania MVD w guzie, jest podnoszona w piśmiennictwie obserwacja, że w najbardziej zaawansowanych, czyli najgorzej rokujących przypadkach występuje również angiogeneza na drodze mimikry. Skutkuje to brakiem w tak utworzonych naczyniach komórek endotelialnych. Nie pokazują się one więc po wyznakowaniu CD34. Komórki tworzące takie naczynia niekiedy można jednak wykryć, dzięki temu, że ulegają transróżnicowaniu do komórek śródbłonka i czasem wykazują obecność CD31 i CD105 [141].

Oznaczenia dokonane dla potrzeb niniejszej rozprawy wykonano dochowując staranności w doborze skrawków z obrzeża guza pozbawionych ognisk martwicy i używając szeroko stosowanego markera w postaci przeciwciał przeciwko CD34. Program komputerowy zliczał naczynia obiektywizując metodę. Oznaczeń dokonano w stosunkowo licznym materiale 139 pacjentów. Nie pozwoliło to jednak uzyskać statystycznie znamiennej korelacji między MVD a rokowaniem pacjentów, czy też parametrami kliniczno-patologicznymi opisującymi guz.

Ze względu na rozbieżności zarówno metody oznaczania jak i obliczeń, oznaczanie gęstości naczyniowej straciło znaczenie na korzyść pośrednich metod oceniających angiogenezę takich jak pomiar ilości substancji proangiogennych w surowicy krwi lub w guzie [24]. Najważniejszą substancją sprzyjającą angiogenezie jest VEGF [38].

### 5.3. VEGF jako główny czynnik w procesie tworzenia naczyń

Mechanizmy regulacji angiogenezy na poziomie molekularnym nie są do końca wyjaśnione. Wiadomo, że najważniejszym czynnikiem jest VEGF, zaś poziom jego ekspresji warunkuje prawidłowy przebieg całego procesu. Dlatego w licznych badaniach próbowano zbadać zależność pomiędzy ekspresją VEGF a gęstością naczyniową, zaawansowaniem i rokowaniem nowotworu.

W przeprowadzonym przeze mnie badaniu nie wykazano znamiennej statystycznie korelacji między ekspresją VEGF a gęstością naczyniową w guzie pierwotnym. Zaobserwowano jedynie tendencję do występowania większej ilości naczyń przy nadekspresji VEGF. Ta zależność zaobserwowana została też w dużej grupie pacjentów z rakiem przełyku [75] - 119 chorych, żołądka - 163 chorych [147] oraz u 259 pacjentów z rakiem jelita grubego [52]. Ekspresja VEGF oznaczona była, podobnie jak w moim badaniu, metodą immunohistochemiczną. Markerami śródbłonna dwóch badań był CD34, którego również użyłam, a w jednym z badań - vWF.

Badano także związki podwyższonej ekspresji VEGF ze złym rokowaniem. Wykazano je zarówno w raku piersi [149], jajnika [104], jak i w raku płuc [155]. Podwyższony poziom tej glikoproteiny wykazano również w surowicy krwi osób z rozsianą chorobą nowotworową [28,118].

U chorych z rakiem przełyku, w badaniach japońskich autorów przeprowadzonych na dużych grupach pacjentów (od 75 do 102 osób) opisano pozytywną korelację podwyższonej ekspresji VEGF w guzie z gorszym rokowaniem [61,83,152]. Wykazano także dodatnią zależność z faktem powstawania przerzutów drogą krwionośną [75].

Podobnych obserwacji dokonano w badaniach nad rakiem żołądka. Tu również wyższa ekspresja VEGF w guzie korelowała ze złym rokowaniem [89,90,117]. Oznaczenia przeprowadzane były metodą immunohistochemiczną w dużych grupach chorych liczących nawet do 365 osób [117].

Niejednoznaczne spostrzeżenia w tym zakresie dotyczą podobnych badań w grupie chorych z rakiem trzustki. Pojawiły się zarówno prace dowodzące, że nasiloną ekspresją VEGF pogarsza rokowanie [60,77,93,123], jak i negujące taki związek [4,43,65]. Równie niejednoznaczne wyniki odnotowano u chorych z rakiem wtrobowokomórkowym. W tym przypadku u podłoża choroby nowotworowej często leży marskość wątroby. Marskość jest związana z nasiloną angiogenezą, a co



ważniejsze, sama wywiera wpływ na rokowanie u chorych po resekcji wątroby. Trudno więc wykazać jednoznaczny związek między zwiększoną ekspresją VEGF a rokowaniem [4,34].

W odniesieniu do badań na materiale raka jelita grubego nadekspresja VEGF w większości doniesień oznaczała złe rokowanie dla pacjenta [3,16,62,80,150]. Wyniki te były spójne zarówno w grupach gdzie badano tylko nowotwory okrężnicy [16,150], jak i tych, gdzie łącznie rozpatrywano pacjentów z guzami odbytnicy i okrężnicy [3,62,80].

Materiał badawczy oscylował ilościowo od 27 do 259 pacjentów. Do badania ekspresji VEGF używano podobnie jak w przeprowadzonym przeze mnie badaniu metod immunohistochemicznych. Jedynie w dwóch badaniach analizowano gen dla VEGFR metodą RT-PCR [150] oraz Northern blot [62]. Były to jednak grupy nieliczne – 61 i 60 chorych. Nie zawsze jednak analiza ekspresji genu dla VEGF dawała takie same rezultaty. Badanie wykonanym metodą RT-PCR i Southern blot 78 raków okrężnicy i próbek zdrowej błony śluzowej wykazało, że ekspresja genu dla VEGF jest większa w rakach, niż w zdrowej śluzówce, natomiast nie wykazano różnic w ekspresji genu w poszczególnych stopniach zaawansowania klinicznego, zróżnicowania histologicznego, czy rokowania [5].

W badanej przeze mnie grupie, podobnie jak w ostatnim cytowanym badaniu, również nie udało się wykazać zależności pomiędzy ekspresją VEGF, a parametrami patoklinicznymi opisującymi chorych z rakiem jelita grubego. Podobnie jak w badaniu gęstości naczyniowej, nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic między ekspresją VEGF w grupach pacjentów różniących się w zakresie cech T, N i M, a także jeśli chodzi o zróżnicowanie guza. Nie znaleziono różnic w ekspresji VEGF w guzie pierwotnym w odniesieniu do takich cech, jak wiek i płeć chorych oraz lokalizacja raka w jelicie. Dodatnia ekspresja VEGF wyrażona silnym odczynem w ocenie immunohistochemicznej, nie wpływała na czas przeżycia całkowitego pacjentów. Nie odnaleziono również statystycznie znamienych korelacji między ekspresją VEGF a gęstością naczyniową, choć nadekspresja VEGF sprzyjała większej ilości naczyń w guzie.

Wyniki te nie są sprzeczne z badaniami przeprowadzonymi w innych nowotworach, ale różne od wyników większości autorów opisujących nowotwory jelita grubego. Przy interpretacji wyników należy jednakże pamiętać, że w badaniu oznaczano VEGF w guzie pierwotnym, w którym w czasie dynamicznego wzrostu nie obowiązuje tylko jeden i klasyczny model angiogenezy (poprzez kiełkowanie nowych naczyń).

Wciąż nie wiemy jaką rolę odgrywa VEGF np. w mechanizmie mimikry zachodzącej w najdynamiczniej rosnących i najgorzej rokujących nowotworach. Wybór miejsca w preparacie na przeprowadzenie reakcji barwnej również pozostaje w sferze subiektywnego wyboru. Dokładano wszelkich starań, żeby wybrać miejsca dobrze unaczynione, pozbawione martwicy i reprezentatywne dla guza, jednak nie można założyć, że guz jest homogenny i to zarówno, jeśli chodzi o budowę, jak i ogniskową ilość badanych markerów. Wiemy też, że ekspresja VEGF nie jest parametrem prostym do oznaczenia i całkowicie powtarzalnym. Do identyfikacji cząsteczki stosuje się z reguły metody immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał. W tej pracy użyto w tym celu poliklonalne przeciwciało królicze anty - VEGF A 20 S.C. 152. Obecność reakcji antygen- przeciwciało wykrywano następnie za pomocą chromogenu, którym jest diaminobenzzydina – DAB. Obecność VEGF mierzono zatem jako natężenie reakcji barwnej. Zawsze ocenie tej towarzyszy ryzyko, że może ona być niemiarodajna ponieważ zachodzi możliwość silnego wybarwienia się np. komórek uszkodzonych [147]. Niektórzy autorzy podkreślają w tej sytuacji wyższość metody radioimmunologicznej [101], inni badają obecność genu dla VEGF zamiast jego ekspresji na komórce [62,150].

Sposób przedstawienia stopnia ekspresji białka również nie jest do końca wystandaryzowany. Natężenie reakcji barwnej, będące miarą ekspresji VEGF można przedstawić w różnych skalach. W tej pracy pierwotnie zastosowano skalę trójstopniową gdzie 0 oznacza sytuację, gdy zanotowano brak odczynu, 1 - odczyn dodatni, 2 - odczyn silnie dodatni. Ostatecznie wyniki oznaczeń uproszczono i ustalono, że brak odczynu lub odczyn słabo dodatni to brak ekspresji VEGF, a w przypadku odczynu silnie dodatniego stwierdza się ekspresję VEGF. W celu poprawienia jakości danych, można dodatkowo zbadać odsetek komórek, które ulegają wybarwieniu i dopiero na tej podstawie wyliczyć faktyczną ekspresję VEGF. W tej pracy odsetka komórek nie badano.

Niektórzy autorzy podkreślają rolę oznaczania stężenia VEGF w surowicy, zamiast w guzie nowotworowym. Prognostyczna rola tych badań jednak wciąż jest przedmiotem dyskusji w związku z niejednoznacznymi, a często sprzecznymi wynikami badań [24].

## 5.4. Receptor Flt-1

W powstawaniu nowych naczyń ważnym etapem jest przewodnictwo sygnałów stymulujących tempo i jakość angiogenezy. Odbywa się to przy udziale receptorów dla VEGF. Do istotnych receptorów w tym procesie zaliczamy Flt-1 [126].

### 5.4.1. Flt-1 w angiogenezie

Podobnie jak w wieku płodowym Flt-1, pomimo wysokiego powinowactwa do VEGF, nie wydaje się pełnić roli bezpośredniego przekaźnika sygnału w procesie angiogenezy. Wpływa zaś na nią w bardziej złożony sposób. Wciąż może pełnić rolę negatywnego regulatora procesu angiogenezy, czyli działać jako receptor - pułapka [21]. Wiążąc się z dużym powinowactwem z VEGF-A, ogranicza jego biodostępność dla KDR. W badanej przez mnie grupie receptor Flt-1 występował głównie u chorych z nadekspresją VEGF, co mogłoby uwierzytelniać jego funkcję regulacyjną.

Oprócz roli negatywnego regulatora, Flt-1 ma jeszcze inne funkcje, które wydają się świadczyć o jego stymulującej funkcji w procesie powstawania naczyń. Pobudza aktywność KDR formując z nim heterodimery. Heterodimer uruchamia zaś kaskadę kinaz receptora KDR. Dodatkowo, Flt-1 sam uruchamia fosforylację i kaskadę kinaz w odpowiedzi na stymulację swoistym ligandem, czyli PlGF. Poza tym, stymuluje komórki progenitorowe szpiku do wydzielania substancji proangiogennych takich jak VEGF, angiopietyna, PDGF (*Platelet-derived growth factor*) wpływając w ten sposób na powstawanie nowych naczyń i ich stabilność [29,145].

Wiemy także, że Flt-1 warunkuje powstawanie komórek śródbłonkowych. Za pośrednictwem PlGF, czyli swoistego dla siebie ligandu, Flt-1 powoduje rekrutację i mobilizację i komórek progenitorowych śródbłonka ze szpiku kostnego [85]. Dodatkowo wzmacnia mobilność komórek śródbłonkowych poprzez reorganizację aktyny za sprawą aktywacji kinazy MAP p38 [68], a zablokowanie receptora Flt-1 w nowotworze zapobiega migracji komórek śródbłonkowych [85]. Co więcej, stymulacja monocytów i makrofagów za pośrednictwem Flt-1 powoduje migrację tych komórek w ogniska zapalne i nowotworowe i produkcję przez nie substancji proangiogennych w bezpośrednim sąsiedztwie guza. [142]. Reasumując, receptor Flt-1, choć nie wpływa bezpośrednio na powstawanie naczyń, oddziałuje wielokierunkowo i skutecznie zwiększa gęstość naczyń w guzie.

Wyniki moich badań to potwierdzają. W badanej przeze mnie grupie ekspresja Flt-1 występowała statystycznie znamienne częściej u chorych z większą gęstością naczyńniową.

Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad szpiczakiem mnogim [14], w guzie Wilmsa [168] i w raku prostaty [105]. Rolę stymulującą w procesie angiogenezy nowotworowej wydają się także potwierdzać doświadczenia *in vitro* i na modelach zwierzęcych, polegających na blokowaniu receptora Flt-1. Zablockowanie aktywności tego receptora skutkowało zahamowaniem migracji komórek śródbłónka i formowania się struktur tubularnych [79,84].

#### **5.4.2. Flt-1 a rokowanie w nowotworach**

W ostatnich latach pojawiły się przypuszczenia, receptor Flt-1 bierze także udział w złożonych procesach regulujących powstanie i rozwój nowotworu [126].

Jego działanie wiąże się ze zwiększoną tolerancją immunologiczną wobec guza nowotworowego oraz formowaniem przerzutów, czyli indukcją EMT i rolą w tworzeniu niszy premetastatycznej.

Flt-1 jest regulatorem odpowiedzi zapalnej. Wiemy, że przewlekły stan zapalny w jelicie zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego. Flt-1 jest regulatorem aktywności komórek zapalnych [119]. W już utworzonym guzie stan zapalny nie wygasa nigdy, a komórki zapalne pełnią ważną rolę w tworzeniu mikrośrodowiska nowotworu. Tworzą również masę guza (mogą stanowić nawet do 50% jego wagi) [95], ale co najistotniejsze, biorą udział w tworzeniu przerzutów oraz powstawaniu tolerancji immunologicznej, czyli dwóch kluczowych czynników pozwalających na rozwój choroby nowotworowej.

Receptor Flt-1 znajduje się zarówno na powierzchni monocytów, makrofagów, jak i komórek dendrytycznych [140].

W komórkach dendrytycznych sygnał przekazywany przez Flt-1 znajdujący się na błonie komórkowej, hamuje ich dojrzewanie i uniemożliwia prezentowanie antygenów. Sprzyja w ten sposób zjawisku tolerancji immunologicznej [94].

Z kolei monocyty, czyli komórki prekursorowe makrofagów za pośrednictwem sygnału przekazywanego przez Flt-1 są mobilizowane ze szpiku kostnego i krwioobiegu [53]. Dalej, ten sam Flt-1 stymuluje i warunkuje proces ich migracji [9,22]. Odpowiedzialna jest za to najprawdopodobniej część wewnątrz błonowa receptora, bo w modelu

doświadczalnym prawidłowo rozwinięte myszy bez wewnątrzblonowej kinazy Flt-1 wykazywały upośledzony mechanizm migracji makrofagów w odpowiedzi na VEGF [56]. Dodatkowo Flt-1 zwiększa zdolności adhezyjne komórek NK (natural killer cells) [18].

Flt-1 wpływa także na zdolność nowotworu do tworzenia przerzutów. Zjawisko to jest złożone. Polega na zmianie fenotypu komórek nowotworowych w jednostki mobilne i zdolne do migracji. Co więcej, receptor Flt-1 wspomaga również przygotowanie tak zwanej niszy premetastatycznej, czyli przyjaznego przerzutowi środowiska, w którym przerzut ma się zagnieździć. Poniżej opisano bardziej szczegółowo wymienione zjawiska.

**Przejście mezenchymalno-nabłonkowe** (*Epithelial-mesenchymal transition* EMT) pozwala na zmianę fenotypu komórek nabłonkowych, które wymagają ciągłej adhezji do innych, w fenotyp komórki mezenchymalnej. Komórki takie tracą polarność i nie wymagają już stałego kontaktu z innymi. Stają podobne do fibroblastów, mobilne. Jest to zjawisko ważne i pożądane w procesie embriogenezy, morfogenezy i w gojeniu się ran, jednak niepożądane w przypadku nowotworu. Komórki nowotworowe po przejściu procesu EMT mogą oderwać się od guza i przeżyć w układzie krwionośnym, lub limfatycznym, a następnie osiedlić w miejscu gdzie powstaje przerzut. Zjawisko to jest uwarunkowane wieloczynnikowo. Kluczową sprawą jest zmiana ekspresji białek adhezyjnych - zmniejszenie ekspresji E-kadheryny, a zwiększenie ekspresji N-kadheryny. Jedną z kluczowych funkcji regulacyjnych pełni PIGF wraz ze swoim receptorem Flt-1 [50], poprzez aktywację cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych Src [82]. Zablockowanie funkcji receptora Flt-1 spowoduje zahamowanie EMT lub apoptozę komórek, które przeszły proces EMT. Wykazano to na modelach raka trzustki i raka piersi [26,99].

Drugim, nie mniej istotnym zjawiskiem w szerzeniu się nowotworu w organizmie jest powstanie **niszy premetastatycznej**. W miejscu gdzie powstanie przerzut tworzy się rodzaj łoża wyindukowanej przez guz i czekającej na przybycie komórek nowotworowych. W pierwszym etapie powstawania niszy, fibroblasty produkują i wydzielają fibronektynę, która jest celem dla migracji uwalnianych ze szpiku, hemopoetycznych komórek prekursorowych (głównie dla monocytów i makrofagów) zawierających właśnie receptor Flt-1. Te komórki mobilizują do powstałej niszy komórki nowotworowe [140]. Okazało się, że blokując szpikowe komórki

prekursorowe mające receptor VEGFR-1, można zablokować powstanie niszy premetastatycznej, a co za tym idzie przerzutów [69].

Podsumowując: teoretycznie, w sytuacjach, gdy komórki obecne w guzie wykazują ekspresję Flt-1, zablokowanie go mogłoby być ostrzem obosiecznym: zablokować zarówno migrację komórek, jak i powstanie niszy na nie oczekującej. Co więcej, skutkiem ubocznym takiego działania mogłoby być dodatkowo zmniejszenie tolerancji immunologicznej na guz.

Teorię dotyczącą roli Flt-1 w tworzeniu przerzutów testowano więc w badaniach *in vitro*, oraz w badaniach na modelach zwierzęcych.

W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych raka jelita grubego skojarzono ekspresję Flt-1 z większą mobilnością komórek i skłonnością do naciekania [156]. Mobilność komórek nowotworu skutecznie można było zablokować za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko Flt-1 [37]. Prześlędzono też, że zablokowanie Flt-1 przeciwciałami, powoduje zahamowanie wzrostu guza najprawdopodobniej wskutek redukcji aktywności kinaz MAPK, lub Akt co skutkowało zmniejszoną proliferacją i zwiększoną apoptozą [162].

W badaniach na zwierzętach wykorzystano napromieniowane myszy, wskutek czego uzyskano depresję szpiku i podzielono na trzy grupy. Następnie, poszczególnym grupom wszczepiono komórki progenitorowe zawierające normalny szpik, czyste komórki Flt-1 (+) i komórki pozbawione receptora. Po dobie myszom implantowano nowotwór. Stwierdzono: bardzo liczne przerzuty w grupie myszy z implantowanymi komórkami Flt-1(+), pojedyncze u myszy z normalnym szpikiem, i brak przerzutów u myszy pozbawionych receptora [69]. Podobny rezultat uzyskano u myszy, które selektywnie pozbawiono jedynie części wewnątrzblonowej receptora Flt-1 [127].

Opublikowano teorię, że za pośrednictwem Flt-1 komórki guza instruuja komórki szpikowe, aby te osiedliły się w miejscu, gdzie ma powstać przerzut i stworzyły dla niego miejsce [103].

Spodziewać się więc można, że ekspresja Flt-1 w guzie powinna sprzyjać wystąpieniu przerzutów oraz gorszemu rokowaniu. W grupie badanych przeze mnie chorych takich związków nie odnaleziono. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a parametrami patoklinicznymi takimi jak zróżnicowanie, zaawansowanie czy lokalizacja guza nowotworowego, wiek i płeć chorych. Nie

stwierdzono również statystycznie znamiennej zależności między ekspresją Flt-1 a markerami złego rokowania u pacjentów - występowaniem przerzutów odległych czy krótszym okresem przeżycia po operacji.

Uzyskane przeze mnie rezultaty warto porównać z wynikami badań już opublikowanych, w których zwiększona ekspresja Flt-1 została wykryta. Były to rak piersi, niedrobnokomórkowy rak płuca, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, rak prostaty, trzustki, jajnika, pęcherza moczowego i nowotwory hematologiczne, a także rak jelita grubego [120].

W raku gruczołu piersiowego ekspresja receptora Flt-1 była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [162], korelując z dużym ryzykiem przerzutów i wznowy miejscowej [26,96]. Podobnie w czerniaku [14], guzie Wilmsa [49] oraz w raku żołądka, gdzie wyższa ekspresja Flt-1 współistniała z krótszym przeżyciem odległym i gorszą odpowiedzią na chemioterapię adiuwantową [51]. W raku wątrobowokomórkowym ekspresja VEGFR-1 na komórkach nowotworowych związana była z bardziej agresywnym zachowaniem nowotworu [165]. Jedynie w raku płuca nie wykryto bezpośredniej korelacji między Flt-1 a rokowaniem [124].

W części publikacji dotyczących raka jelita grubego silna ekspresja Flt-1 była markerem złego rokowania u pacjentów [102]. W jednej z badanych grup liczącej 91 pacjentów z rakiem okrężnicy i odbytnicy wysoka ekspresja Flt-1 korelowała z krótszym okresem przeżycia pooperacyjnego u chorych z II i III stopniem zaawansowania klinicznego. W innej grupie 140 chorych z rakiem okrężnicy pozwalała przewidzieć szybką wznowę miejscową [100]. Nie wszystkie doniesienia były jednak podobne. W grupie badającej 58 chorych z rakiem okrężnicy i 10 chorych z gruczolakiem jelita nie znaleziono różnic w ekspresji receptora ani między gruczolakiem a rakiem, ani, podobnie jak u mnie, pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania nowotworu [143].

Powstaje pytanie dlaczego, pomimo faktu, że teoria dotycząca roli Flt-1 w rozwoju nowotworu sprawdza się w badaniach *in vitro* wykonywanych na komórkach RJG[37] i badaniach przedklinicznych (95, 60,116), nie widać wpływu tego receptora w wykonanym przeze mnie badaniu klinicznym?

Może się to wiązać ze zbyt małą grupą badanych osób (n=139), lub z niedoskonałością metody oznaczeń immunohistochemicznych. Badanie ekspresji Flt-1 budzi podobne wątpliwości, jak te dotyczące oznaczeń VEGF. Przede wszystkim wiążą się one z niehomogennością guza, ale też z metodyką oznaczeń immunohistochemicznych.

Dodatkowo, należy pamiętać o tym, że wprawdzie zjawisko EMT zachodzi w samym guzie nowotworowym i dotyczy badanych przeze mnie komórek, to zjawisko powstania niszy premetastatycznej zachodzi gdzie indziej. Nisza powstaje w miejscu, gdzie następnie rozwinię się przerzut. Tworzona jest przez migrujące ze szpiku komórki prekursorowe. Komórek z receptorem Flt-1 należałoby w takiej sytuacji szukać w wątrobie bądź płucach, a także w szpiku lub krwi [78], nie zaś w guzie pierwotnym. Podobnie rozproszone są komórki zapalne z receptorem na powierzchni, które sprzyjają tolerancji immunologicznej na nowotwór.

Wobec tak dużego rozproszenia receptora w organizmie i jego skomplikowanej i niejednoznacznej funkcji w procesie nowotworzenia istnieje ryzyko, że oznaczenie jego ekspresji w samym tylko guzie nie daje obrazu faktycznej roli, którą spełnia.

W podsumowaniu stwierdzam, że choć nie udało mi się wykazać zależności pomiędzy rokowaniem u pacjentów z resekcyjnym rakiem jelita grubego a ekspresją VEGF i Flt-1 oraz gęstością naczyniową w guzie pierwotnym, osiągnięte dużym nakładem pracy wyniki być może pozwolą innym na bardziej krytyczną ocenę stosowanych w pracy metod badawczych i wpłyną na inne potraktowanie ich materiału badawczego w dążeniu do poznania kolejnych tajemnic związanych z biologią raka jelita grubego oraz samej angiogenezy w chorobie nowotworowej.



## 6. Wnioski

1. Ekspresja receptora Flt-1 wywiera dodatni wpływ na gęstość sieci naczyniowej w guzie pierwotnym resekcyjnego raka jelita grubego.
2. Nadekspresja VEGF wydaje się sprzyjać wzmożonej gęstości naczyniowej w guzie pierwotnym resekcyjnego raka jelita grubego.
3. Ekspresja VEGF w guzie pierwotnym nie jest czynnikiem o znaczeniu rokowniczym w analizowanym materiale resekcyjnego raka jelita grubego.
4. Ekspresja Flt-1 w guzie pierwotnym nie jest czynnikiem o znaczeniu rokowniczym w analizowanym materiale resekcyjnego raka jelita grubego.
5. Gęstość naczyniowa w guzie pierwotnym oznaczona za pomocą CD34 w analizowanym materiale nie wykazuje związku z rokowaniem w resekcyjnym raku jelita grubego.

## 7. Streszczenie

### **Wstęp.**

Rak jelita grubego należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych, o wciąż niezadawalających wynikach leczenia. Kluczem do ich poprawy jest wcześniejsze rozpoznawanie choroby i wybór leczenia celowanego, dobranego indywidualnie do pacjenta. Badanie procesu angiogenezy pozwala na pełniejsze poznanie biologii raka w jelicie grubym, a leczenie celowane może być ukierunkowane na proces tworzenia naczyń w guzie. VEGF jest podstawowym mediatorem powstawania naczyń w nowotworach. Działa za pośrednictwem receptorów, spośród których wyróżnia się Flt-1. Dzięki aktywności tych czynników nowotwór wytwarza własną sieć naczyniową, oraz system sprzyjający szerzeniu się choroby w całym organizmie. To sugeruje, że zarówno VEGF, jego receptor Flt-1, jak i gęstość tworzonej przy ich udziale sieci naczyniowej to ważne elementy składające się na indywidualny charakter danego nowotworu. Określają one stopień jego agresywności i skłonność do określonego rokowania. Doniesienia na temat wartości oznaczeń wymienionych wyżej parametrów wciąż pozostają niejednoznaczne, co stało się inspiracją do podjęcia własnych badań.

### **Cel pracy.**

W pracy postanowiono ocenić ekspresję VEGF i jego receptora Flt-1 w guzie pierwotnym raka jelita grubego i odnieść te oznaczenia do gęstości naczyniowej w guzie oraz do ważnych rokowniczo parametrów patoklinicznych związanych z chorobą nowotworową, w tym do całkowitego czasu przeżycia pacjentów.

### **Material i metody**

Pracę przeprowadzono retrospektywnie. Materiał do badań pozyskano podczas zabiegów resekcyjnych przeprowadzonych u 139 kolejnych chorych z rakiem okrężnicy i odbytnicy. Chorzy operowani byli w Klinice Chirurgii Onkologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1998-2002. Do badań immunohistochemicznych użyto przeciwciał przeciwko VEGF i Flt-1. Oceny gęstości naczyniowej zliczanej programem komputerowym, dokonano z użyciem przeciwciał anty CD 34 metodą wg Weidnera. Zbadano zależności pomiędzy oznaczonymi czynnikami, oraz odniesiono je do parametrów o znaczeniu rokowniczym jak zaawansowanie choroby, zróżnicowanie

histologiczne guza, jego umiejscowienia w jelicie, a także do czasu przeżycia odległego. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując narzędzia pakietu Statistica 10.

### **Wyniki**

Wykazano znamiennej zależność pomiędzy zwiększoną gęstością sieci naczyń w guzie a ekspresją receptora Flt1. Wykazano także skłonność do większej gęstości naczyń w przypadku nadekspresji VEGF. Nie wykazano zależności między ekspresją VEGF i receptora Flt-1, ani wpływu ekspresji tych czynników na stopień klinicznego zaawansowania choroby wg pTNM, zróżnicowania histologicznego guza, lokalizacji raka w jelicie. Nie stwierdzono związku oznaczeń ekspresji VEGF, Flt-1 czy gęstości naczyń w analizowanym materiale, a czasem przeżycia chorych po operacji wycięcia nowotworu.

### **Wnioski.**

- 1) Ekspresja receptora Flt-1 wywiera dodatni wpływ na gęstość sieci naczyń w guzie pierwotnym resekcyjnego raka jelita grubego.
- 2) Nadekspresja VEGF wydaje się sprzyjać wzmożonej gęstości naczyń w guzie pierwotnym resekcyjnego raka jelita grubego.
- 3) Ekspresja VEGF w guzie pierwotnym nie jest czynnikiem o znaczeniu rokowniczym w analizowanym materiale resekcyjnego raka jelita grubego.
- 4) Ekspresja Flt-1 w guzie pierwotnym nie jest czynnikiem o znaczeniu rokowniczym w analizowanym materiale resekcyjnego raka jelita grubego.
- 5) Gęstość naczyń w guzie pierwotnym oznaczona za pomocą CD34 w analizowanym materiale nie wykazuje związku z rokowaniem w resekcyjnym raku jelita grubego.

## **Abstract**

### **Introduction**

Colorectal cancer is one of the most frequent malignant neoplasms. The treatment results however remain unsatisfactory. Early diagnosis and targeted treatment, chosen individually for each patient, are the key to improve results. The study of angiogenesis allows for a deeper understanding of colorectal cancer biology and aids focus the targeted therapy on the development of blood microvessels in the tumour stroma. VEGF is a key mediator of tumour angiogenesis - the process of microvascular network formation which enables the spread of disease throughout the body. VEGF action is mediated and modulated by its specific receptors, such as Flt-1. These actions suggest that VEGF, its receptor Flt-1 and the density of the vascular network are the most important elements responsible for the individual nature of each tumour. They determine the disease aggressiveness and patient prognosis. Reports from studies evaluating the validity of VEGF and Flt-1 assessments remain ambiguous, and this lack of certainty has inspired me to conduct my own research.

### **Aim of the study**

The purpose of this study was to evaluate the expression of VEGF and its receptor Flt -1 in primary tumour of colorectal cancer. These values were compared with the tumor microvessel density and important pathoclinical parameters related to the disease and affecting the prognosis, including overall survival rate.

### **Materials and methods**

The study was carried out retrospectively. Study material was obtained from resections performed in 139 consecutive patients with colorectal cancer operated in the Surgical Oncology Clinic of the Medical Academy in Gdańsk between 1998 and 2002. Antibodies against VEGF and Flt-1 were used for immunohistochemical stainings. Microvessel density was assessed with the help of a computer programme using antibodies against CD34, according to the method described by Weidner

The results were compared against pathoclinical parameters such as pTNM stage, histological differentiation of the tumour, its location in the bowel and overall survival rate. Statistical analyses were performed using tools from Statistica 10 software.

### **Results**

The study revealed statistically significant relationship between the increased microvessel density and the expression of Flt-1 receptor. In addition in case of VEGF overexpression the tumour blood vessel density tended to be higher. No relationships were found between VEGF or Flt-1 expressions and pTNM stage, tumour grade, its localisation in the bowel and overall survival rate.

### **Conclusions**

- 1) Flt-1 expression has a positive effect on microvessel density in primary resectable tumour of colorectal cancer.
- 2) Overexpression of VEGF promotes increased microvessel density in primary resectable tumor of colorectal cancer.
- 3) Expression of VEGF was not a prognostic factor in the analysed group of patients with colorectal cancer.
- 4) Expression of Flt-1 was not a prognostic factor in the analysed group of patients with colorectal cancer.
- 5) Microvessel density, assessed by staining with antibodies against CD34, was not a prognostic factor in the analysed group of patients with colorectal cancer.

## 8. Spis rycin i tabel

### 8.1. Spis Rycin

	Numer strony
1. VEGF i jego receptory błonowe.	19
2. Alternatywny podział pozwala na stworzenie poszczególnych form VEGF.	20
3. Budowa receptora Flt-1.	25
4. Heterodimeryzacja receptora Flt-1 i KDR uruchamia aktywność katalityczną KDR. Zieloną strzałką zaznaczono miejsce odpowiedzialne za dimeryzację receptora.	26
5. Aktywacja receptora Flt-1 wielopłaszczyznowo wpływa na rozwój guza nowotworowego [120].	30
6. Krzywa Kaplana-Meiera dla analizowanej grupy chorych n=139.	40
7. Gęstość naczyniowa. Komórki śródbłonkowe oznaczone przy pomocy przeciwciała anty CD34.	42
8. Rozkład gęstości naczyniowej w preparatach.	43
9. Zależność pomiędzy medianą gęstości naczyń a prawdopodobieństwem przeżycia.	43
10. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a gęstością naczyń w grupie n=139.	45
11. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a gęstością naczyń w grupie n=139 ( $p>0.05$ ).	46
12. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a prawdopodobieństwem przeżycia.	47
13. Zależność pomiędzy ekspresją Flt-1 a prawdopodobieństwem przeżycia.	49

## 8.2. Spis tabel

	Numer strony
I. Przyczyny nowotworów jelita grubego.	6
II. Klasyfikacja pTNM według siódmej edycji klasyfikacji Union International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) [133].	8
III. Stopnie zaawansowania klinicznego według siódmej edycji klasyfikacji Union for International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) [133].	9
IV. Charakterystyka pacjentów.	33
V. Czynniki patokliniczne badanej grupy a czas przeżycia całkowitego, n=139.	41
VI. Zależność pomiędzy gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego (n=139, test U Manna-Whitneya, *test Kruskala-Wallisa).	44
VII. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 i nadekspresją VEGF, a gęstością naczyń w grupie n=139 (test U Manna-Whitneya).	45
VIII. Zależność pomiędzy nadekspresją VEGF a wybranymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego w badanej grupie n=139 (test $\chi^2$ Paersona).	48
IX. Zależność pomiędzy ekspresją receptora Flt-1 a wybranymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego w badanej grupie n=139 (test $\chi^2$ Paersona).	50

## 9. Piśmiennictwo

1. Abdalla S, Behzad F, Bsharah S et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncology reports* 1999; 6: 839-881
2. Alon T, Hemo I, Itin A et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine* 1995; 1: 1024-1028
3. Amaya H, Tanigawa N, Lu C et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. *Cancer letters* 1997; 119: 227-235
4. An FQ, Matsuda M, Fujii H et al. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2000; 126: 153-160
5. André T, Kotelevets L, Vaillant JC et al. Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *International journal of cancer* 2000; 86: 174-181
6. Autiero M, Waltenberger J, Communi D et al. Role of PlGF in the intra-and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature Medicine* 2003; 9: 936-943
7. Banner BF, Whitehouse R, Baker SP et al. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma: association with survival. *American journal of clinical pathology* 1998; 109: 733-737
8. Barańska P, Jerczyńska H, Pawłowska Z. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń - budowa i funkcje. *Post Bioch* 2005; 51: 13-21
9. Barleon B, Sozzani S, Zhou D et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-3343
10. Bartnik W. Polipy i nowotwory jelita grubego. In: Dąbrowski A ed, *Wielka Interna-Gastroenterologiacz II*; 2011
11. Beckner ME. Factors Promoting Tumor Angiogenesis: Special Article. *Cancer investigation* 1999; 17: 594-623



12. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 401-410
13. Brown LF, Berse B, Jackman RW et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Research* 1993; 53: 4727-4735
14. Bruce D, Tan PH. Vascular endothelial growth factor receptors and the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer: where do we go from here? *Cell Communication & Adhesion* 2011; 18: 85-103
15. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics* 2004; 231: 474-488
16. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 2803-2807
17. Che X, Hokita S, Natsugoe S et al. Tumor angiogenesis related to growth pattern and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Chinese medical journal* 1998; 111: 1090-1093
18. Chen W, Kitson R, Goldfarb R. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In vivo (Athens, Greece)* 2001; 16: 439-445
19. Cianchi F, Palomba A, Messerini L et al. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Annals of surgical oncology* 2002; 9: 20-26
20. Cimpean A-M, Ribatti D, Raica M. A brief history of angiogenesis assays. *International Journal of Developmental Biology* 2011; 55: 377
21. Clauss M. Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends In Cardiovascular Medicine* 1998; 8: 241-245
22. Clauss M, Weich H, Breier G et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 17629-17634
23. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 20017-20024

24. Custodio A, Barriuso J, de Castro J et al. Molecular markers to predict outcome to antiangiogenic therapies in colorectal cancer: Current evidence and future perspectives. *Cancer treatment reviews* 2013; 39: 908-924
25. DavisSmyth 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 JOURNAL* 1996; 15: 4919-4927
26. Dhakal HP, Naume B, Synnestvedt M et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in invasive breast carcinoma: prognostic significance and relationship with markers for aggressiveness. *Histopathology* 2012; 61: 350-364
27. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W et al. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2000 roku. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa, 2003.–2. Natural products for cancer prevention: a global perspective *Pharmacol Therapeut* 2003; 99: 1-13
28. Dirix L, Vermeulen P, Pawinski A et al. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *British journal of cancer* 1997; 76: 238
29. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 2000; 127: 4531-4540
30. Dziekiewicz M, Lisiak E, Maruszynski M et al. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia. *Acta Angiologica* 2006; 12: 43
31. D'Amore PA. Vascular endothelial cell growth factor-a: not just for endothelial cells anymore. *The American journal of pathology* 2007; 171: 14
32. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 161-174
33. Ellis L, Fidler I. Angiogenesis and metastasis. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 2451-2460
34. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562

35. Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF et al. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *The American journal of surgical pathology* 1996; 20: 1260-1265
36. Erenoglu C, Akin ML, Uluutku H et al. Angiogenesis predicts poor prognosis in gastric carcinoma. *Digestive surgery* 2001; 17: 581-586
37. Fan F, Wey JS, McCarty MF et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2647-2653
38. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 2004; 25: 581-611
39. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 1971; 285: 1182-1186
40. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447
41. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. 1995:
42. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Annals of surgery* 1995; 222: 695
43. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M et al. Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis. *European Journal of Cancer* 1998; 34: 1439-1447
44. Fujioka S, Yoshida K, Yanagisawa S et al. Angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1788-1797
45. Galindo-Gallego M, Fernandez-Acenero M, Sanz-Ortega J et al. Prognostic significance of microvascular counts in rectal carcinoma. *Pathology-Research and Practice* 2000; 196: 607-612
46. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E et al. Vascular integrin alpha (v) beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 1998; 4: 2625-2634
47. Gerber H-P, Condorelli F, Park J et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 23659-23667

48. Gerwins P, Claesson-Welsh L. Anti-Vascular endothelial growth factor-based angiostatics. 2002:
49. Ghanem M, Van Steenbrugge G, Sudaryo M et al. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *Journal of clinical pathology* 2003; 56: 107-113
50. Gos M, Miloszevska J, Przybyszewska M. Rola przejścia epithelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu. *Postępy Biochemii* 2009; 55:
51. Gray RT, O'Donnell ME, Spence GM et al. Long-term follow-up of immunocytochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF), and its two receptors, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (Flk-1/KDR), in oesophagogastric cancer. *International Journal of Biological Markers* 2013; 28: 63-70
52. Harada Y, Ogata Y, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR (kinase domain-containing receptor)/Flk-1 (fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer. *International journal of clinical oncology* 2001; 6: 221-228
53. Hattori K, Heissig B, Wu Y et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine* 2002; 8: 841-849
54. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 411-421
55. Herman R, Wałęga J, Sobocki j et al. Nowotwory jelita grubego i odbytu. In: *Podstawy Chirurgii*; 2010
56. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95: 9349-9354
57. Hofstaetter JG, Saad FA, Samuel RE et al. Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 324: 667-672
58. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M et al. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1998; 274: H1054-H1058

59. Igarashi M, Dhar DK, Kubota H et al. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1998; 82: 1225-1232
60. Ikeda N, Adachi M, Taki T et al. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *British journal of cancer* 1999; 79: 1553
61. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T et al. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 206-213
62. Ishigami S, Arii S, Furutani M et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *British journal of cancer* 1998; 78: 1379-1384
63. Ishikawa H, Fujii H, Yamamoto K et al. Tumor angiogenesis predicts recurrence with normal serum carcinoembryonic antigen in advanced rectal carcinoma patients. *Surgery today* 1999; 29: 983-991
64. Isozaki H, Okajima K, Kawashima Y et al. Prognostic value of the number of metastatic lymph nodes in gastric cancer with radical surgery. *Journal of surgical oncology* 1993; 53: 247-251
65. Itakura J, Ishiwata T, Friess H et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clinical Cancer Research* 1997; 3: 1309-1316
66. Jakob C, Sterz J, Zavrski I et al. Angiogenesis in multiple myeloma. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 1581-1590
67. Johansson N, Ahonen M, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2000; 57: 5-15
68. Kanno S, Oda N, Abe M et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000; 19: 2138-2146
69. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-827
70. Karademir S, Sökmen S, Terzi C et al. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 2000; 7: 489-495

71. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312
72. Kim H-S, Kang H-S, Messam CA et al. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2002; 10: 121-127
73. Kim LA, D'Amore PA. A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *The American Journal Of Pathology* 2012; 181: 376-379
74. Kim Y-I, Choi IJ, Cho S-J et al. Outcome of endoscopic therapy for cancer bleeding in patients with unresectable gastric cancer. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2013; 28: 1489-1495
75. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clinical cancer research* 1998; 4: 2195-2200
76. Klasa-Mazurkiewicz D. Wartość kliniczna wybranych modulatorów i markerów procesu angiogenezy oraz limfangiogenezy u chorych leczonych z powodu nowotworów jajnika. *Gdański Uniwersytet Medyczny*; 2010:
77. Knoll MR, Rudnitzki D, Sturm J et al. Correlation of postoperative survival and angiogenic growth factors in pancreatic carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2000; 48: 1162-1165
78. Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T et al. Identification of the high-risk group for metastasis of gastric cancer cases by vascular endothelial growth factor receptor-1 overexpression in peripheral blood. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 2007; 96: 1723-1728
79. Lacal PM, Morea V, Ruffini F et al. Inhibition of endothelial cell migration and angiogenesis by a vascular endothelial growth factor receptor-1 derived peptide. *European Journal of Cancer* 2008; 44: 1914-1921
80. Lee J-C, Chow N-H, Wang S-T et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer* 2000; 36: 748-753
81. Lee S, Chen TT, Barber CL et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007; 130: 691-703
82. Lesslie D, Summy J, Parikh N et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *British journal of cancer* 2006; 94: 1710-1717

83. Li Z, Shimada Y, Uchida S et al. TGF- $\alpha$  as well as VEGF, PD-ECGF and bFGF contribute to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 2000; 17: 453-513
84. Luttun A, Tjwa M, Moons L et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature medicine* 2002; 8: 831-840
85. Lyden D, Hattori K, Dias S et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine* 2001; 7: 1194-1201
86. Mac Gabhann F, Popel AS. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophysical chemistry* 2007; 128: 125-139
87. Maeda K, Chung Y, Takatsuka S et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *British journal of cancer* 1995; 72: 319
88. Maeda K, Chung Y, Takatsuka S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *Journal of clinical oncology* 1995; 13: 477-481
89. Maeda K, Chung Ys, Ogawa Y et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863
90. Maeda K, Kang SM, Onoda N et al. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 566-571
91. Maharaj AS, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvascular research* 2007; 74: 100-113
92. Meyer RD, Singh A, Majnoun F et al. Substitution of C-terminus of VEGFR-2 with VEGFR-1 promotes VEGFR-1 activation and endothelial cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 5523-5531
93. Miura H, Miyazaki T, Kuroda M et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 1997; 27: 854-861
94. Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 613-625

95. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224-2234
96. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2007; 104: 557-563
97. Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T et al. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery* 2001; 129: 302-308
98. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell cycle* 2006; 5: 1779-1787
99. Ning Q, Liu C, Hou L et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-11
100. Ning Y, Lurje G, Danenberg K et al. VEGF and VEGFR1 gene expression levels and tumor recurrence in adjuvant colon cancer. In, *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2009: 4040
101. Och W, Mariak Z, Smółka M et al. Vascular endothelial growth factor expression in cerebral neoplasms. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2001; 35: 1071-1079
102. Okita NT, Yamada Y, Takahari D et al. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. *Japanese Journal Of Clinical Oncology* 2009; 39: 595-600
103. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta histochemica* 2006; 108: 327-334
104. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 98-106
105. Pallares J, Rojo F, Iriarte J et al. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. 2006:
106. Pietra N, Sarli L, Caruana P et al. Is tumour angiogenesis a prognostic factor in patients with colorectal cancer and no involved nodes? *European Journal of Surgery* 2000; 166: 552-556



107. Poon RT-P, Ng IO-L, Lau C et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 1775-1785
108. Rak J. Oncogenes as modifiers of vascular processes associated with cancer. *Nowotwory* 2006; 56: 57-79
109. Rana C, Sharma S, Agrawal V et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma and its correlation with clinicopathological factors. *Annals Of Hematology* 2010; 89: 789-794
110. Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* 2008; 11: 3-10
111. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674
112. Risau W, Flamme I. *Vasculogenesis*; 1995
113. Rmali K, Puntis M, Jiang W. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Disease* 2007; 9: 3-14
114. Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology* 2004; 164: 1531-1535
115. Sacewicz I, Wiktorska M, Wysocki T et al. Mechanizmy angiogenezy nowotworowej Mechanisms of cancer angiogenesis. *Journal cover* 2014; 68:
116. Sagar SM, Yance D, Wong R. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer—Part 1. *Current Oncology* 2006; 13: 14
117. Saito H, Tsujitani S, Kondo A et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery* 1999; 125: 195-201
118. Salven P, Mänpää H, Orpana A et al. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clinical Cancer Research* 1997; 3: 647-651
119. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97: 785-791
120. Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer. *Cancer* 2010; 116: 1027-1032

121. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N et al. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* 2003; 102: 1515-1524
122. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985
123. Seo Y, Baba H, Fukuda T et al. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-2245
124. Seto T, Ichinose Y, Higashiyama M et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53: 91-96
125. Shepherd FA, Sridhar SS. Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41: 63-72
126. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *BMB Reports* 2006; 39: 469-478
127. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006; 9: 225-230
128. Shibuya M. Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 2011; 87: 167
129. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research* 2006; 312: 549-560
130. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5: 519-524
131. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2003; 3: 95-117
132. Shubik P. Vascularization of tumors: a review. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1982; 103: 211-226
133. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours: John Wiley & Sons; 2011

134. Sousa Moreira I, Alexandrino Fernandes P, Joao Ramos M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 2007; 7: 223-245
135. Stephenson JA, Goddard JC, Al-Taani O et al. Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. *Journal of Cancer Research* 2013; 2013:
136. Strizzi L, Catalano A, Vianale G et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *The Journal of pathology* 2001; 193: 468-475
137. Sun H-C, Tang Z-Y, Li X-M et al. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1999; 125: 419-426
138. Swelam WM, Al Tamimi DM. Biological impact of vascular endothelial growth factor on vessel density and survival in multiple myeloma and plasmacytoma. *Pathology Research and Practice* 2010; 206: 753-759
139. Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. Angiogeneza i neoangiogeneza-znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonologia i Alergologia Polska* 2006; 74: 414-420
140. Szala S. Cells forming tumor environment: A target for anticancer therapy? *Nowotwory* 2007; 57: 633-645
141. Szala S, Jarosz M. Nowotworowe naczynia krwionośne\* Tumor blood vessels. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011; 65: 437-446
142. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2011; 34: 1785-1788
143. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research* 1995; 55: 3964-3968
144. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Archives of Surgery* 1997; 132: 541-546
145. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; 102: 199-209

146. Takebayashi Y, Akiyama Si, Yamada K et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 226-231
147. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *Journal of clinical oncology* 1997; 15: 826-832
148. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer research* 1996; 56: 2671-2676
149. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Cancer Science* 1994; 85: 1045-1049
150. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *British journal of cancer* 1998; 77: 998
151. Torres C, Wang H, Turner J et al. Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human pathology* 1999; 30: 753-758
152. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *British journal of cancer* 1998; 77: 1704
153. Utracka-Hutka B. Leczenie celowane chorych na raka jelita grubego–aktualny stan wiedzy. *Współczesna onkologia*,2006;3:121-127
154. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 2474-2484
155. Volm M, Koomägi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *International journal of cancer* 1997; 74: 64-68
156. Wei S-C, Tsao P-N, Weng M-T et al. Flt-1 in colorectal cancer cells is required for the tumor invasive effect of placental growth factor through a p38-MMP9 pathway. *J Biomed Sci* 2013; 20: 392013
157. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *The American journal of pathology* 1995; 147: 9

158. Weidner N, Semple JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal of Medicine* 1991; 324: 1-8
159. Willaert W, Mareel M, Van De Putte D et al. Lymphatic spread, nodal count and the extent of lymphadenectomy in cancer of the colon. *CANCER TREATMENT REVIEWS* 2014; 40: 405-413
160. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010 roku. Centrum Onkologii–Instytut, Warszawa 2012: 1-108
161. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Szambora P. Leczenie antyangiogenne chorych na raka jelita grubego. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2009; 5: 15-14
162. Wu Y, Hooper AT, Zhong Z et al. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *International journal of cancer* 2006; 119: 1519-1529
163. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S et al. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Annals of surgical oncology* 1998; 5: 585-589
164. Yamaguchi T, Bando H, Mori T et al. Overexpression of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in colorectal cancer: association with progression and prognosis. *Cancer science* 2007; 98: 405-410
165. Yi ZY, Feng LJ, Xiang Z et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Journal Of Investigative Surgery: The Official Journal Of The Academy Of Surgical Research* 2011; 24: 67-76
166. Zachary I, Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research* 2001; 49: 568-581
167. ZIELONKA TM. Angiogeneza–Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Aler Ast Immunol* 2003; 8: 169-174