Angiogeneza w nowotworach – czynniki wpływające na rozwój sieci naczyniowej guza oraz ocena neoangiogenezy w preparatach histopatologicznych

ALEKSANDRA SOBCZYŃSKA-RAK, PIOTR SILMANOWICZ, IZABELA POLKOWSKA

Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 11.04.2016

Zaakceptowano 16.06.2016

Sobczyńska-Rak A., Silmanowicz P., Polkowska I.

Tumor angiogenesis – factors influencing the development of a tumor vascular network and assessment of neoangiogenesis in histopathological samples

Summary

Angiogenesis involves the formation of capillaries on the basis of already existing blood vessels. It is a multi-stage process resultant from the combined influence of pro- and anti-angiogenic factors. It begins with the stimulation of endothelial cells and degeneration of the basilemma and extracellular matrix, followed by the proliferation of endothelial cells and eventually the formation of a new vessel. The final stage involves a synthesis of the vessel's basilemma and incorporation of pericytes stabilizing the capillary tube.

Any study of angiogenesis necessitates a direct assessment of tissue vascularisation and indirect assessment of the occurrence of pro-angiogenic factors. The degree of vascularisation is determined on the basis of the number of capillaries and endothelial cell concentrations per a surface unit of a given tissue or organ. The same is achieved by staining histopathological samples with immunohistochemical methods using panendothelial antibodies: anti-FVIII, anti-CD31 and anti-CD34. The antibodies identifying proliferating endothelial cells are also specific to the evaluation of neoangiogenesis. The same include monoclonal antibodies: E9 and TEC-11. The quantitative analysis of blood vessel density in tumor tissue (MVD – microvessel density) is performed with the Weidner method. The total microvascular area (TVA) is also considered a significant angiogenic factor. The assessment of the relative surface area of capillaries within a tumor is performed using Chalkley's method, vessel branching count (VBC) and angiogenic index. Indirect methods of angiogenesis assessment involve the determination of angiogenic cytokine production and the expression of their cellular receptors. The study of modulators and assessment of angiogenesis may facilitate more efficient tumor diagnostics and therapy.

Keywords: tumor angiogenesis, pathogenesis, angiogenic factor

Proces tworzenia naczyń jest koniecznym warunkiem rozwoju i różnicowania w czasie embriogenezy. Odgrywa również kluczową rolę w licznych zjawiskach fizjologicznych i patofizjologicznych, a jej zaistnienie jest odpowiedzią na procesy metaboliczne zachodzące w tkankach (38).

Nowe naczynia krwionośne mogą powstawać w wyniku 3 procesów: waskulogenezy, arteriogenezy i angiogenezy (4, 7, 10, 23).

Waskulogeneza jest to formowanie naczyń krwionośnych z hemangioblastów, które powstają w wyspach krwionośnych woreczka żółtkowego zarodka. Proces ten doprowadza do wytworzenia podstawowego splotu naczyniowego (1, 4, 7).

W procesie waskulogenezy nowa struktura naczyniowa powstaje z komórek macierzystych tkanki

hemopoetycznej. Są one źródłem krążących we krwi progenitorowych komórek śródbłonna (EPCs). W 3. tygodniu embriogenezy komórki te rozpoczynają proliferację i migrują do obszarów pozbawionych naczyń, gdzie kumulują się i kształtują sieć naczyń krwionośnych.

Arteriogeneza polega na przekształcaniu istniejących wcześniej tętniczek kolateralnych w funkcjonalne tętnice w następstwie pogrubienia ich warstwy mięśniowej. Dzięki temu naczynia stają się elastyczne i nabywają właściwości wazomotorycznych. Podczas areteriogenezy dochodzi do aktywacji komórek śródbłonna, adhezji i migracji przez ścianę naczynia monocytów przekształcających się w makrofagi. Wytwarzają one czynniki wzrostu, które mają wpływ na transformację małych, już istniejących naczyń

kolateralnych w duże przewodzące tętnice o około 20-krotnie powiększonej średnicy (23). Arteriogeneza odgrywa istotną rolę w narządach niedotlenionych z powodu miażdżycy ograniczającej przepływ krwi przez naczynia (4, 7).

Angiogeneza fizjologiczna

W angiogenezie naczynia formowane są na bazie już istniejących naczyń, poprzez ich rozgałęzianie i wydłużanie. Proces ten ma miejsce w dojrzałych tkankach i polega na tworzeniu naczyń krwionośnych przez pączkowanie komórek śródbłónka ze ścian i końców już istniejących kapilar (10, 41). Nowe naczynia mogą tworzyć się również w wyniku formowania pomostów pomiędzy komórkami śródbłónka oraz podłużnego ich podziału i przenikania do światła komórek otaczających śródbłonek podczas „rozszczepiania” istniejących naczyń (23).

Angiogeneza jest procesem złożonym i wieloetapowym, w którym biorą udział liczne różne czynniki pobudzające lub hamujące ten proces.

Do czynników proangiogennych należą: VEGF, FGF α i FGF β , TGF, PDGF, HGF, PIGF, angiogenina, 22 kDa fragment heparyny, chemokiny, G-CSF, GM-CSF, erytropoetyna, IL-8 (5, 23, 24).

Proces angiogenezy hamują: angiostatyna, endostatyna, TSP-1, TSP-2, fragment prolaktyny (o masie cząsteczkowej 16 kDa), czynnik płytkowy 4, TEMP, INF α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 (5, 23, 24, 34, 40).

Na angiogenezę mają dwójaki wpływ TGF- β i TNF- α , które w małych stężeniach wykazują aktywność proangiogenną, a w dużych – angiostatyczną oraz Ang-2, będąca pozytywnym regulatorem angiogenezy jedynie w obecności VEGF. Zestawienie czynników angiogennych przedstawia tabela 1.

Tab. 1. Czynniki wpływające na angiogenezę nowotworową

Stymulatory angiogenezy	Inhibitory angiogenezy
<ul style="list-style-type: none"> – Czynn timer wzrostu śródbłónka naczyń – VEGF – Czynn timer wzrostu fibroblastów – FGF – Czynn timer wzrostu hepatocytów – HGF – Płytkowy czynn timer wzrostu – PDGF – Insulinowy czynn timer wzrostu – IGF – Transformujący czynn timer wzrostu β – TGF-β – Łożyskowy czynn timer wzrostu – PDGF – Angiogenina – Angiopetyna-1 (Ang-1) – Erytropoetyna – Czynn timer tkankowy (TF) – Prostaglandyna E (PGE1, PGE2) – Proliferyna PLF – Heparyna i jej 22 kDa fragment – Czynn timer martwicy nowotworów TNF-α – Interleukina 8 – IL-8 – Interleukina 6 – IL-6 – Czynn timer stymulujący tworzenie kolonii granulocytów – G-CSF – Czynn timer stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów – GM-CSF – Chemokiny 	<ul style="list-style-type: none"> – Trombospondyna-1 i 2 (TSP-1, TSP-2) – Endostatyna – Wazostatyna – Angiostatyna – N-końcowy fragment plazminogenu – Troponina 1 – Angiopetyna-2 (Ang-2) – Restyna – Fragment antytrombiny III – Interferon α/β – N-końcowy fragment czynn timer płytkowego 4 – N-końcowy fragment prolaktyny – Proteina zależna od proliferyny (PRP) – Interleukiny: IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 – Tkankowy inhibitor metaloproteazy 1, 2, 3 – TIMP 1,2,3 – Produkt trawienia osteopontyny – N-końcowy fragment prolaktyny

Niezależnie od tych czynników istotne znaczenie w indukcji angiogenezy ma hipoksja komórek. Prowadzi ona do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak HIF-1 α i NK κ B, co powoduje aktywację genów kodujących białka czynników proangiogennych oraz ich receptorów (23).

W normalnych warunkach komórki śródbłónka nie dzielą się. Wzrost stężenia czynn timer angiogennego powoduje ich pobudzenie, w wyniku czego zmieniają one kształt, tworzą wypustki i ulegają podziałom. W ich cytoplazmie powstają wakuole, które łącząc się, dają początek światła nowego naczynia kapilarnego.

W życiu pozapłodowym zjawisko angiogenezy fizjologicznej jest procesem krótkotrwałym, podlegającym ścisłej kontroli i zachodzi w stanach fizjologicznego rozrostu, odnowy i regeneracji tkanek, jak np.: gojenie ran, regeneracja błony śluzowej macicy po cyklu menstruacyjnym, przerost lewej komory serca spowodowany długotrwałymi ćwiczeniami fizycznymi (43).

Powstawanie naczyń krwionośnych zależy od równowagi pomiędzy tempem syntezy stymulatorów a inhibitorami tego procesu (4, 10, 33, 41). Nasilenie syntezy czynników hamujących angiogenezę i obniżenie liczby kapilar zachodzi w stanach nadmiernego rozrostu tkanki łącznej, które cechuje zmniejszone zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze. Sytuacja taka występuje w procesie tworzenia blizny, przy marskości wątroby lub zwłóknieniu płuc.

Przesunięcie równowagi na korzyść tworzenia kapilar ma miejsce w wielu stanach patologicznych, takich jak: zaburzenia krążenia o charakterze miejscowym, niedokrwienie i uszkodzenie tkanek, przewlekłe stany zapalne, martwica oraz w chorobach układowych: cukrzycy, hemangiopatii, reumatoidalnym zapaleniu stawów, łuszczycy i nowotworach (4, 10).

Angiogeneza w nowotworach

Angiogeneza odgrywa szczególną rolę w rozrostach nowotworowych, a jej znaczenie w biologii guza stanowi cel wielu rozpraw naukowych. Liderem badań nad unaczynieniem guzów jest dr Folkman, który w 1971 r. wysunął koncepcję, że angiogeneza jest warunkiem niezbędnym do wzrostu guza nowotworowego poza stadium *in situ* (stadium przedinwazyjne). W początkowej fazie nieunaczyniony guz nowotworowy ma objętość około 1-3 mm³ i składa się z około 10⁶ komórek odżywiających drogą dyfuzji (8, 33). Tkanka guza o wielkości około 1 cm³ zawiera przeciętnie 10⁸-10⁹ komórek nowotworowych, lecz także 20 $\times$ 10⁶ komórek śródbłónka. Wynika stąd, że na komórkę śródbłónka przypada około 100 komórek nowotworowych, ułożonych warstwami wokół kapilary (1). W nieunaczynionym guzie w wyniku niedotlenowania liczba komórek

ulegających rozpadowi i komórek proliferujących jest podobna (23, 44). Inwazyjny wzrost nowotworowy związany jest z pojawieniem się w guzie naczyń krwionośnych, które poprawiają utlenowanie komórek i ułatwiają zaopatrywanie w substancje odżywcze i wzrostowe (40).

Zmiany zachodzące lokalnie w układzie naczyniowym pod wpływem komórek nowotworowych zaczynają się we wczesnym etapie wzrostu guza i są bezwzględnie konieczne dla dalszego rozwoju nowotworu. Dochodzi również do lokalnego wydzielania przez komórki nowotworowe czynników angiogenicznych, które parakrynnie stymulują komórki śródbłónka do proliferacji i przestrzennej organizacji w nowe naczynie. Komórki nowotworowe zdolne są także do indukcji stanu zapalnego. Pod wpływem mediatorów zapalenia substancje proangiogenne produkowane są przez makrofagi, neutrofile, limfocyty oraz fibroblasty (4, 5, 41).

Wytworzenie nowego naczynia to proces wieloetapowy, na który składają się:

- zwiotczenie ściany naczynia oraz stymulacja komórek śródbłónka wewnątrz istniejących naczyń przez czynniki wzrostu,
- degradacja błony podstawnej i macierzy zewnątrz-naczyniowej przez enzymy proteolityczne,
- migracja aktywowanych komórek śródbłónka w kierunku stymulatorów angiogenezy,
- proliferacja i różnicowanie komórek śródbłónka,
- formowanie światła nowego naczynia z odtworzeniem błony podstawnej i oddzieleniem komórek śródbłónka od macierzy pozakomórkowej,
- stabilizacja naczynia przez perycyty (2, 13, 16, 28, 34, 44, 46).

Pierwszym etapem angiogenezy nowotworowej jest pobudzenie komórek śródbłónka przez czynniki wzrostu, czego następstwem jest miejscowe rozszerzenie naczynia oraz związany z tym wzrost przepływu krwi i wzmocnienie ich przepuszczalności. Następnie w wyniku działania enzymów proteolitycznych, pobudzanych przez lamininę, dochodzi do degradacji błony podstawnej naczynia, a pobudzone komórki śródbłónka migrują do otaczającego podścieliśka w kierunku stymulatorów angiogenezy (38). Proces ten nazywamy kiełkowaniem naczyń (sprouting) w kierunku guza nowotworowego (16) – ryc. 1. Komórki śródbłónka wydłużają się i układają w szereg jedna za drugą, tworząc w ten sposób pęczek

naczyniowy, w którym dalsze podziały zachodzą proksymalnie do wędrującego szczytu, umożliwiając wzrost pęczka naczyniowego na długość (20). Ważną rolę w tym procesie odgrywają metaloproteazy (MMP). Są one aktywowane pośrednio przez cytokiny i czynniki wzrostowe wytwarzane i uwalniane z komórek nowotworowych. Pod ich wpływem dochodzi do rozluźnienia struktury macierzy pozakomórkowej, co ułatwia migrację i proliferację komórek śródbłónka (28, 35, 46). Komórki te dzięki kontaktom między sobą, a także adhezji do białek macierzy pozakomórkowej rekonstruują przestrzenną strukturę naczynia.

W procesie powstawania światła nowych naczyń krwionośnych znaczącą rolę oprócz czynników wzrostu, cytokin i interleukin, odgrywają geny nadrzędne: Notch i Coup TFII oraz EGF-L7.

Nazwa *notch* (ząbkowany) została nadana genowi, gdy wykryto, że jest on odpowiedzialny za występowanie charakterystycznie postrzępionych skrzydeł u muszki *Drosophila melanogaster*. Geny Notch występują u wielu gatunków zwierząt i odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju i homeostazie tkanek. Aktywacja szlaku Notch jest niezbędna do zachowania zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania przez zahamowanie procesów różnicowania (26). Podczas tworzenia naczyń system sygnałowy Notch aktywuje procesy związane z przeżyciem komórek, wpływa na przebudowę naczyń – tzw. remodeling, stabilizację ściany naczyń oraz nabywanie cech fenotypowych charakterystycznych dla tętnic. Nieprawidłowa czynność szlaku sygnałowego Notch w okresie angiogenezy prowadzi do utraty białek charakterystycznych dla tętnic i zastępowania ich przez białka występujące w naczyniach żylnych. Dochodzi również do nieprawidłowego rozmieszczania i zmniejszenia się liczby komórek w ścianie naczynia (13). W okresie kiełkowania naczyń istotną rolę odgrywa receptor Notch i jego ligand DII4. Notch wraz z czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) kontrolują relacje pomię-

Ryc. 1. Schemat angiogenezy nowotworowej – kiełkowanie naczyń (sprouting)

dzy komórkami czołowymi śródbłónka a komórkami przemieszczającymi się za nimi. Receptory Notch wpływają na zahamowanie podziałów komórek czołowych, natomiast VEGF pobudza dzielenie się komórek przemieszczających się (39).

Gen Coup TFII (Chicken ovalbumin upstream promoter – transcription factor II) jest niezbędny w trakcie fizjologicznej waskulogenezy i limfangiogenezy. Moduluje ekspresję wielu czynników proangiogennych, w tym głównie VEGF i jego receptorów oraz Ang-1, natomiast w angiogenezie patologicznej pobudza procesy wpływające na kształtowanie mikrośrodowiska guza nowotworowego. Jest genem nadrzędnym, którego włączenie w prekursorowych komórkach śródbłónka powoduje ich przekształcanie w śródbłonek żył (45).

Bardzo ważną funkcję w angiogenezie odgrywa EGF-L7 (Epidermal Growth Factor-Like Domain 7). Czynnik wykryto w komórkach endotelium podczas rozwoju zarodkowego myszy i uznano, że reguluje tubulogenezę zarodkową. EGF-L 7 odgrywa rolę zarówno w fizjologicznej (gojenie ran, ciąża), jak i patologicznej angiogenezie. Jego wysoka ekspresja występuje w naczyniach tkanek proliferujących, a obniżona w większości rozwiniętych naczyń, zaopatrujących prawidłowe, dojrzałe tkanki (22). Wydzielany jest przez komórki śródbłónka i pełni rolę regulacyjną w rekrutacji komórek mięśni gładkich oraz migracji i kielkowaniu komórek endotelium w czasie formowania światła naczynia. EGF-L7 jest obecny w środowisku macierzy zewnątrzkomórkowej, otaczającej kielkujące naczynie i wpływa na zapewnienie optymalnego mikrośrodowiska dla migrujących komórek śródbłónka (31).

Cykl życiowy komórek śródbłónka w fazie spoczynku przekracza 1000 dni, natomiast w angiogenezie średni czas cyklu komórek wynosi 5 dni (8, 38).

W ostatnim etapie angiogenezy nowotworowej komórki śródbłónka dojrzewają, dochodzi do syntezy błony podstawnej naczynia i wbudowywania pericytów stabilizujących nowo powstałe naczynie. Skład

błony podstawnej komórek śródbłónka wytworzonej w procesie angiogenezy nowotworowej różni się od naczyń prawidłowych. Występuje w niej więcej kwasu hialuronowego oraz mało proteoglikanu heparyno-siarczanowego (40). Powstałe naczynia charakteryzują się występowaniem „okienek” i „szczelin” w błonie podstawnej, niewielką liczbą mięśni gładkich lub ich brakiem i wzmożoną przepuszczalnością (10). Komórki śródbłónka mają szerokie połączenia międzykomórkowe, nieprawidłowy kształt i rozmiar. Pojawia się w nich niespotykane w śródbłónku prawidłowym białko – endoglina, biorące udział w wiązaniu TGF (41). Wzrasta też ilość perlekanu – ułatwiającego wiązanie FGF β oraz pojawiają się swoiste receptory dla niektórych czynników wzrostowych, szczególnie dla VEGF (40). W ostatecznej stabilizacji nowo powstałych naczyń istotną rolę odgrywają receptory kinazy tyrozynowej (Tie-1 i Tie-2), płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF), a także monocyty i makrofagi (41). Są one niezbędne do utworzenia połączenia komórek śródbłónka z otaczającymi je komórkami mezenchymalnymi. Receptor Tie-1 uczestniczy w utrzymaniu integralności naczynia, natomiast receptor Tie-2 odgrywa rolę w tworzeniu sieci naczyń (46).

Opisywana jest również angiogeneza wgłobieniowa (intussusceptive angiogenesis), polegająca na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych poprzez wpuklanie tkanki śródmiąższowej do wnętrza już istniejących naczyń – tworzone są tzw. kolumny tkankowe – *tissue pillars* (12, 47). Proces wgłobienia trwa krótko (od kilku minut do kilku godzin), ponieważ nie wymaga proliferacji komórek śródbłónka. Rozpoczyna się zwiększeniem rozmiarów naczynia macierzystego. Następnie komórki śródbłónka położone symetrycznie na przeciwległych ścianach naczynia tworzą wpuklenia do światła naczynia, które z czasem ulegają połączeniu. Pomiędzy dwoma warstwami komórek śródbłónka dochodzi do odkładania tkanki śródmiąższowej. Tworzeniu kolumn towarzyszy przemieszczanie pericytów i mikroblastów, które tworzą włókna kolagenowe – stabilizujące naczynia (27, 35) ryc. 2.

Ryc. 2. Schemat angiogenezy nowotworowej wgłobieniowej

Indukcja angiogenezy nowotworów może przebiegać w dwojaki sposób:

- w warunkach niedotlenienia komórki nowotworowe wydzielają VEGF, który działa stymulująco na migrację i podziały komórek śródbłónka,
- mutacje genów i zmiany epigenetyczne prowadzą do powstania tzw. fenotypu angiogenego.

Mechanizm pierwszy w niewielkich nowotworach indukuje syntezę VEGF i apoptozę. Przypuszcza się, że rozwój guzów i przerzutów ma miejsce wówczas, kiedy zostanie zniesiona aktywność inhibitorów angiogenezy.

Drugi mechanizm jest związany z powstaniem fenotypu angiogenego (tzw. angiogenic switch), który polega na pojawieniu się trwałych modyfikacji genetycznych w komórkach nowotworowych aktywujących geny kodujące czynniki angiogenne (30, 33, 34, 40).

Spowolnienie przepływu krwi w nieprawidłowych nowotworowych naczyniach krwionośnych powoduje powstanie niedotlenienia w komórkach i indukcję HIF-1a i HIF-2a, które aktywują geny kodujące białka odpowiedzialne za progresję nowotworową (40).

Czynniki regulujące neoangiogenezę mogą być pochodzenia endokrynnego (z krążenia), parakrynnego (z guza, podścieliska, macierzy zewnątrzkomórkowej lub komórek zapalnych) oraz autokrynnego (z samych komórek śródbłónka).

Wśród czynników angiogenych wyróżnia się czynniki pro- i antyangiogenne, a zachwianie równowagi między nimi prowadzi do stymulacji lub do zahamowania angiogenezy (2, 14, 16, 40, 43) tab. 1. Wykazano, że przewaga aktywatorów angiogenezy warunkuje powstawanie nowych naczyń, podczas gdy przewaga inhibitorów powoduje „ciszę angiogenną”, a nawet regresję naczyń. Brak aktywatorów angiogenezy, podobnie jak brak kontaktu z pozanaczyniową macierzą wprowadza komórki śródbłónka na szlak apoptozy (44).

Czynniki stymulujące angiogenezę mają dość szerokie spektrum działania. Wyróżniono trzy istotne cechy czynników proangiogenych:

- swoiste działanie na komórki śródbłónka, tzn. ich pojawienie się powinno indukować angiogenezę,
- posiadanie swoistych receptorów na komórkach śródbłónka,
- ich zanik powinien hamować angiogenezę (40).

Najsilniejszym i najbardziej swoistym czynnikiem spełniającym wszystkie powyższe warunki jest VEGF, pozostałe czynniki mają działanie wielokierunkowe i nie są tak swoiste (25, 30, 35).

Metody ilościowe oznaczania angiogenezy nowotworowej

W badaniach nad angiogenezą konieczne jest dokonywanie oceny unaczynienia tkanek – metody bezpośrednie oraz ocena aktywności czynników proangiogenych – metody pośrednie (16, 43).

Stopień unaczynienia określa liczba kapilar lub skupisk komórek śródbłónka przypadająca na jed-

nostkę powierzchni tkanki lub narządu. Umożliwiają to barwienia preparatów histopatologicznych metodami immunohistochemicznymi.

Komórki śródbłónka naczyniowego prezentują kilka markerów, rozpoznawanych w reakcjach immunohistochemicznych za pomocą przeciwciał. Należą do nich tzw. przeciwciała panendotelialne, reagujące z antygenami zlokalizowanymi na powierzchni wszystkich komórek śródbłónka oraz przeciwciała łączące się z antygenami obecnymi jedynie na powierzchni proliferujących komórek śródbłónka. Do przeciwciał panendotelialnych zalicza się przeciwciała skierowane przeciwko czynnikowi Willebranta (VIII), antygenowi CD31 oraz antygenowi CD34. Najbardziej czułymi przeciwciałami w tkankach ludzkich są anti-CD-31 i anti-CD-34 (3, 18, 19), natomiast w tkankach zwierzęcych do uwidocznienia komórek śródbłónka najlepszą reakcję wykazano po zastosowaniu przeciwciała monoklonalnego anti FVIII i anti-CD-31 (34, 36, 37) – ryc. 3, 4. Przeciwciała anti-CD34 umożliwiają

Ryc. 3. Barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem anti FVIII (200 ×)

Ryc. 4. Barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem anti FVIII (400 ×)

uwidocznienie wewnętrznej powierzchni mikronaczyń, ale także wchodzi w interakcję z elementami zrębu, ograniczając swoistość przy określaniu gęstości naczyń (9).

Wspólną cechą przeciwciał panendotelialnych jest intensywność barwnych odczynów zarówno dla małych, jak i dużych naczyń (3). Wadą tych markerów jest to, że nie pozwalają na rozróżnienie śródbłonnków proliferujących od nieaktywnych (3).

Wykazano, że bardziej specyficzne do oceny neoangiogenezy są przeciwciała identyfikujące proliferujące komórki śródbłonka. Należą do nich przeciwciała monoklonalne – E9 oraz TEC-11 reagujące z antygenem CD105 oraz LM609 rozpoznające integrynę α v β 3. Zbadano, że są one specyficzne dla zaktywowanych komórek śródbłonka (6, 19, 29), mają jednak ograniczone możliwości zastosowania ze względu na konieczność barwienia wyłącznie mrożonych skrawków tkanek (36).

Do ilościowej analizy gęstości naczyń krwionośnych w tkance nowotworowej (MVD – microvessel density) wykorzystuje się metodę Weidnera (19, 30, 36, 42). Liczenie przeprowadza się przy pomocy mikroskopu świetlnego, w trzech lub czterech obszarach najbardziej intensywnego unaczynienia (tzw. hotspot – gorącym polu) w polu mikroskopowym 0,74 mm². Według Weidnera definicją naczynia jest zarówno uformowane naczynie, jak i pojedyncza komórka śródbłonka (42). Inni badacze określają naczynie jako strukturę z wyształconym światłem.

Wskaźnikiem angiogenezy, mającym zastosowanie w badaniach nad unaczynieniem guza, jest całkowita powierzchnia mikronaczyń (total microvascular area, TVA). TVA obliczana jest za pomocą specjalnego obiektu o znanej średnicy widzenia w trzech lub czterech polach najbardziej intensywnego unaczynienia. Dane pozwalają na określenie powierzchni zajmowanej przez naczynia włosowate w tkance guza (3, 19, 32).

Do pośredniej oceny względnej powierzchni naczyń włosowatych w guzie stosowana jest także metoda Chalkleya (32). W badaniu wykorzystuje się nakładaną na okular specjalną 25-punktową siatkę. Po wybraniu trzech lub czterech obszarów o najbogatszej sieci naczyń (hotspots), oblicza się ilość wybarwionych naczyń stykających się z punktami na siatce Chalkleya. Średnia liczba naczyń jest miarą angiogenezy guza (15, 21).

Metoda MVD dotyczy oceny profilu gęstości mikronaczyń, natomiast metoda Chalkleya pozwala na ocenę powierzchni lub objętości zajmowanej przez naczynia (43). Niektórzy uważają, że jest ona bardziej precyzyjna niż metoda Weidnera (11).

Tab. 2. Punktacja wykorzystana przy obliczaniu AI

Liczba punktów	Ekspresja trombospondyny-1	Ekspresja białka p53	Liczba naczyń włosowatych
1	≥ 30	0-29	0-29
0	25-29	30-59	20-69
-1	20-24	60-89	70-84
-2	15-19	90-119	85-99
-3	10-14	120-149	100-122
-4	0-9	≥ 150	≥ 123

Metodą oceniającą unaczynienie guza jest także liczba rozgałęzień naczyniowych (VBC) – określająca liczbę rozgałęzień w 100 naczyniach włosowatych tkanki nowotworowej.

Innym, cennym i oryginalnym markerem angiogenezy jest zaproponowany przez Mehtë i wsp. index angiogeniczny (angiogenesis indeks – AI). Dostarcza on informacji na temat cech histologicznych oraz aktywności czynników modulujących przebieg angiogenezy (17). W obliczeniach zastosowano specyficzny system punktacji cech immunohistochemicznych (tab. 2). Wskaźnik angiogenezy jest sumą punktów przydzielonych za ekspresję trombospondyny-1, białka p53 oraz liczbę naczyń. Najlepsze rokowanie występuje przy AI wynoszącym [+3], najgorsze przy [-12]. Autorzy tej metody wykazali, że indeks angiogenezy jest niezależnym czynnikiem prognostycznym skorelowanym z całkowitym przeżyciem chorych (17).

Stosowanie różnych przeciwciał, a także sama interpretacja definicji naczynia mogą być przyczyną rozbieżnych wyników badań. Obecnie w celu uniknięcia błędów coraz częściej używa się systemów automatycznych liczenia naczyń z zastosowaniem systemów komputerowo wspomaganą analizy obrazu mikroskopowego (18).

Metody pośredniej oceny angiogenezy polegają na oznaczeniu produkcji cytokin angiogennych, tj. VEGF oraz bFGF – ich ekspresji tkankowej, stężeniu w surowicy krwi i ekspresji receptorów (37, 43). Do określenia ekspresji czynników wykorzystuje się testy immunoenzymatyczne Elisa. Wykorzystując techniki biologii molekularnej ocenia się także ekspresję receptorów czynników stymulujących neoangiogenezę, np. flt-1 (receptor VEGF) w tkance nowotworowej (16).

Badanie modulatorów angiogenezy i ocena nasilenia angiogenezy stwarzają szanse na lepsze poznanie patologii nowotworów, pomagają w prognozowaniu rozwoju procesu nowotworowego, a w szczególności przewidywaniu progresji. Ocena angiogenezy w wielu nowotworach staje się potencjalnym czynnikiem decydującym o wyborze terapii onkologicznej, a w szczególności zastosowania leczenia antyangiogennego. Obecnie w III fazie badań klinicznych są leki hamujące poszczególne etapy angiogenezy, np. inhibitory metaloproteaz – hamujące rozkład błony podstawnej, czy antagoniści czynników angiogennych, tj. VEGF. Leki te dzielimy na dwie grupy: leki działające pośrednio, któ-

rych celem jest neutralizacja czynnika angiogenego, np. przeciwciała skierowane przeciwko rodzinie VEGF oraz leki działające bezpośrednio – hamujące proliferację, migrację i różnicowanie komórek śródbłonna. Mimo wielu sukcesów związanych z zastosowaniem terapii antyangiogennej obserwuje się także efekty uboczne. Leki te mogą upośledzać wiele procesów fizjologicznych związanych z powstawaniem komórek szpikowych lub hemopoetę. Obecnie na szeroką skalę prowadzone są badania, w których dąży się do uzyskania optymalnych dawek leków antyangiogennych, sposobu ich podawania i czasu trwania terapii (14).

Piśmiennictwo

- Balan B. J.: Angiogeneza – problem na miarę XXI wieku. *Nowa Medycyna* 2000, 4, 8-14.
- Banyś A., Bulaś L., Długosz E., Szulc-Musiał B., Jankowski A.: Angiogeneza w chorobie nowotworowej. *Patofizjologia* 2009, 65, 247-250.
- Bednarek W.: Markery i modulatory angiogenezy w raku jajnika. *Ginekolog. Pol.* 2007, 78, 754-763.
- Carmeliet P., Jain R.: Angiogenesis in health and diseases. *Nat. Med.* 2003, 9, 653-660.
- Chechlińska M.: Rola cytokin w procesach nowotworzenia. *Nowotwory* 2003, 6, 648-659.
- Davey K. J., Perrier S., Ohe G., Gilbert A. D., Bankfalvi A., Saunders W. P., Schor S. L., Schor A. M.: Assessment of vascularity as an index of angiogenesis in periradicular granulomas. Comparison with oral carcinomas and normal tissue counterparts. *Int. Endod. J.* 2008, 41, 987-996.
- Dulak J.: Molekularne mechanizmy angiogenezy. *J. Biotechnologia* 2000, 48, 135-146.
- Folkman J.: Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995, 1, 27-31.
- Fox S., Harris A.: Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS* 2004, 112, 413-430.
- Gacko M.: Angiogeneza i metody jej oceny. *Diagn. Lab.* 1997, 33, 375-394.
- Hansen S., Sorensen F., Vach W., Grabau D. A., Bak M., Rose C.: Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology* 2004, 44, 428-436.
- Hillen F., Griffioen A. W.: Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26, 489-502.
- Hofmann J. J., Iruela-Arispe M. L.: Notch signaling in blood vessels. Who is taking to whom about what? *Circ. Res.* 2007, 100, 1556-1568.
- Jarosz P., Woźniak B.: Angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Prz. Med. Uniw. Rzesz. Inst. Leków* 2012, 4, 498-507.
- Karslıoğlu Y., Yiğit N., Öngürü Ö.: Chalkley method in the angiogenesis research and its automation via computer simulation. *Pathol. Res. Pract.* 2014, 210, 161-168.
- Kurzyk A.: Angiogeneza – możliwości, problem, perspektywy. *Postępy Biochemii* 2015, 61, 25-34.
- Mehta R., Kyshtoobayeva A., Kurosaki T., Small E. J., Kim H., Stroup R., McLaren C. E., Li K. T., Fruehauf J. P.: Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7, 81-88.
- Mikalsen L. T. G., Dhakal H. P., Bruland Ø. S., Nesland J. M., Olsen D. R.: Quantification of Angiogenesis in Breast Cancer by Automated Vessel Identification in CD34 Immunohistochemical Sections. *Anticancer Res.* 2011, 31, 4053-4060.
- Nico B., Benagiano V., Mangieri D., Maruotti N., Vacca A., Ribatti D.: Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol. Histopathol.* 2008, 23, 601-607.
- Olszewski E., Miodoński A. J.: Badania nad unaczynieniem guzów – angiogeneza – zagadnienie nadal aktualne. *Terapia* 2000, 9, 94-99.
- Park J. S., Kim H. K., Hong S. W., Kim J. K., Yoon D. S.: Prognostic Significance of Angiogenesis by Chalkley Counting in Node Negative Cancer of the Ampulla of Vater. *J. Korean Med. Sci.* 2012, 27, 495-499.
- Parker L. H., Schmidt M., Jin S. W., Gray A. M., Beis D., Pham T., Frantz G., Palmieri S., Hillan K., Stainier D. Y., De Sauvage F. J.: The endothelial-cell-derived secreted factor Egr1 regulates vascular tube formation. *Nature* 2004, 428, 754-758.
- Pawlak J., Klim B., Szkudlarek M., Dzieciol J.: Formowanie naczyń krwionośnych w chorobie wieńcowej – gdzie jesteśmy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2004, 58, 358-363.
- Pepetti M., Herman I. M.: Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002, 282, 947-970.
- Prager G. W., Poettler M., Unseld M., Zielinski C. C.: Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *TLCR* 2012, 1, 5-13.
- Roszek K., Komasyński M.: Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2008, 62, 660-667.
- Sacewicz I., Wiktorska M., Wysocki T., Niewiarowska J.: Mechanizmy angiogenezy nowotworowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2009, 63, 159-168.
- Sadlecki P., Walentowicz-Sadlecka M., Grabiec M.: Rola angiogenezy w rozwoju nowotworów. *Przegląd Menopauzalny* 2010, 1, 28-31.
- Salvesen H., Gulluoglu M., Stefansson L., Akslen L. A.: Significance of CD105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *APMIS* 2003, 111, 1011-1018.
- Saponaro C., Malfettone A., Ranieri G., Danza K., Simone G., Paradiso A., Mang A.: VEGF, HIF-1α expression and MVD as an angiogenic network in familial breast cancer. *PLoS One* 2013, 8, 1-17.
- Schmidt M., Paes K., De Maziere A., Smyczek T., Yang S., Gray A., French D., Kasman I., Klumperman J., Rice D. S., Ye W.: EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development* 2007, 134, 2913-2923.
- Sharma S., Sharma M., Sarkar C.: Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprosthetic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005, 46, 481-489.
- Sierko E., Zawadzki R. J., Wojtkiewicz M. Z.: Czynniki układu homeostazy a angiogeneza w nowotworach. *Nowotwory* 2001, 4, 399-409.
- Skrzypczak M.: Znaczenie angiogenezy w przebiegu chorób nowotworowych i nienowotworowych. *Magazyn Wet.* 2005, 14, 20-22.
- Skóra J., Biegus J., Pupka A., Barć P., Sikora J., Szyber P.: Molekularne podstawy angiogenezy. *Postępy Hig. Dośw.* 2006, 60, 410-415.
- Ślodzińska J.: Ilościowa ocena angiogenezy raka płuca i jej wartość prognostyczna, we współczesnych badaniach. *Pneumol. Alergol. Pol.* 2002, 70, 318-325.
- Sobczyńska-Rak A.: Angiogeneza w nowotworach u psów. Praca dokt. Wyd. Medycyny Weter. UP, Lublin 2006.
- Swidzińska E., Naumnik W., Chyczewska E.: Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006, 74, 414-420.
- Szala S.: Angiogeneza i immunosupresja. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2009, 63, 598-612.
- Szala S., Jarosz M.: Nowotworowe naczynia krwionośne. *Postępy Med. Dośw.* 2011, 65, 437-446.
- Thielemann A., Kopczyńska Z.: Udział wybranych wskaźników angiogenezy w patogenie choroby nowotworowej. *Diagn. Lab.* 2007, 43, 695-706.
- Weidner N., Sample J. P., Welch W. R., Folkman J.: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324, 1-8.
- Woszytł A., Korycka-Wołowiec A.: Angiogeneza i limfangiogeneza oraz ich znaczenie w nieziarniczych chłoniakach złośliwych. *Acta Hematol. Pol.* 2010, 41, 21-23.
- Wróbel T.: Angiogeneza w nowotworach hematologicznych. *Acta Hematol. Pol.* 2004, 35, 493-504.
- Xu M., Qin J., Tsai S. Y., Tsai M.: The role of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in tumorigenesis. *Acta Pharmacol. Sin.* 2015, 36, 32-36.
- Zielonka T. M.: Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2003, 8, 169-174.
- Ziyad S., Iruela-Arispe M. L.: Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer* 2011, 2, 1085-1096.

Adres autora: dr Aleksandra Sobczyńska-Rak, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: olsob2@gmail.com