



**UNIwersYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Collegium Medicum  
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

**Bydgoszcz 2023**



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Magdalena Anna Zduńska**

**Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF-A) oraz jego  
krążące receptory (sVEGFR1 i sVEGFR2) u chorych z guzami  
śródczaszkowymi**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Promotor:**

**prof. dr hab. n. med. Danuta Rość**

**Bydgoszcz 2023**

## Spis treści

1. Wykaz najważniejszych skrótów .....	5
2. Wprowadzenie .....	7
3. Wstęp .....	8
3.1 Nowotwory śródczaszkowe.....	8
3.1.1 Epidemiologia, najczęstsze nowotwory u ludzi.....	8
3.1.2 Podział i charakterystyka.....	9
3.1.3 Pierwotne: glejaki i oponiaki .....	10
3.1.4 Guzy przerzutowe.....	11
3.2 Objawy kliniczne.....	12
3.3 Diagnostyka obrazowa .....	12
3.4 Diagnostyczne markery biochemiczne .....	14
4. Angiogeneza .....	15
4.1 Historia badań .....	15
4.2 Angiogeneza płodowa i postpłodowa .....	16
4.3 Angiogeneza fizjologiczna i patologiczna .....	16
4.4 Czynniki proangiogenne .....	18
4.5 Rodzina czynników VEGF.....	19
4.6 Receptory VEGF.....	21
4.6.1 Receptory stacjonarne .....	21
4.7 Rozpuszczalne receptory sVEGFR1 i sVEGFR2.....	23
4.8 Inne aktywatory angiogenezy .....	24
4.9 Inhibitory angiogenezy.....	26
4.10 Etapy angiogenezy.....	26
5. Cechy angiogenezy nowotworowej .....	28
6. Kierunki terapii antyangiogennej w zarysie .....	29
7. Podsumowanie.....	31
8. Cel pracy .....	32
9. Materiał kliniczny i metody .....	33
9.1 Wykonanie oznaczeń.....	34
9.1.1 Stężenie VEGF-A .....	34
9.1.2 Stężenie sVEGFR1 .....	35

9.1.3 Stężenie sVEGFR2 .....	35
9.2 Charakterystyka grupy badanej .....	36
9.3 Metody wnioskowania statystycznego .....	39
10. Wyniki.....	40
11. Dyskusja.....	72
12. Wnioski.....	89
13. Streszczenie.....	90
14. Abstract .....	92
15. Piśmiennictwo .....	94
16. Załączniki .....	112
17. Wykaz tabel .....	117
18. Wykaz rycin .....	119

## 1. Wykaz najważniejszych skrótów

**BBB** – bariera krew–mózg (*brain-blood-barrier*)

**BMECs** – komórki śródbłonka mikronaczyń mózgu (*brain microvascular endothelial cell*)

**EC** – komórki śródbłonka (*endothelial cells*)

**FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor*)

**GBM** – glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme*)

**HIF** – czynnik indukowany hipoksją (*hypoxia inducible factor*)

**IL-8** – interleukina 8 (*interleukine 8*)

**KT** – tomografia komputerowa

**MR** – rezonans magnetyczny

**M** – średnia arytmetyczna

**Maks.** – maksimum

**Me** – mediana

**Min.** – minimum

**MMP** – metaloproteinazy (*metalloproteinases*)

**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy

**PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*)

**PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor*)

**PNET** – prymitywne nowotwory neuroektodermalne (*primitive neuroectodermal tumors*)

**PET** – pozytonowa emisyjna tomografia (*positron emission tomography*)

**p** – istotność statystyczna

**RT-PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

**SD** – odchylenie standardowe

**TF** – czynnik tkankowy (*tissue factor*)

**TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy guza  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )

**TGF- $\alpha$**  – przekształcający czynnik wzrostu  $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* )

**VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor*)

**sVEGFR1** – rozpuszczalny receptor 1 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF  
(*soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*)

**sVEGFR2** – rozpuszczalny receptor 2 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF  
(*soluble vascular endothelial growth factor receptor 2*)

**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)

**Q<sub>25</sub>** – kwartył dolny

**Q<sub>75</sub>** – kwartył górny

## 2. Wprowadzenie

Angiogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych, zaobserwowanym przez M.J. Folkmana w 1971 roku, i od tego czasu jest przedmiotem licznych badań naukowych. Zachodzi w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych. Jest zaangażowana w patogenezę chorób naczyniowych, zapalnych, zwyrodnieniowych oraz chorób nowotworowych. W przypadku tych ostatnich angiogeneza odgrywa kluczową rolę we wzroście nowotworu i przerzutowaniu guza. Każdy nowotwór przekraczając objętość 1-2 mm<sup>3</sup> musi zacząć wytwarzać własne naczynia krwionośne, aby dalej móc się rozwijać. Angiogeneza jest regulowana przez czynniki pro – oraz antyangiogenne pozostające ze sobą w równowadze w warunkach fizjologicznych. Głównym czynnikiem proangiogenym jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu – VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) stymulujący rozwój nowych naczyń krwionośnych. VEGF-A staje się aktywny biologicznie poprzez złączenie z receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej: VEGFR-1/Flt-1 oraz VEGFR-2/KDR/Flk-1 znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego. VEGFR-1 i VEGFR-2 różnią się między sobą pod względem efektu biologicznego jaki wywołują na skutek ich aktywacji. We krwi stwierdza się także obecność krążących receptorów VEGF-A – sVEGFR1 i sVEGFR2.

### 3. Wstęp

#### 3.1 Nowotwory śródczaszkowe

##### 3.1.1 Epidemiologia, najczęstsze nowotwory u ludzi

Guzy mózgu stanowią ważną przyczynę zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego. Według Rejestru Nowotworów Centrum Onkologii w Warszawie liczba zachorowań na nowotwory ośrodkowego układu nerwowego w Polsce wynosi ok. 3000 przypadków rocznie [1].

Guzy mózgu występują u ludzi w każdym wieku stanowiąc 2% wszystkich nowotworów złośliwych, zapadalność rośnie wraz z wiekiem [1]. Najczęstszymi pierwotnymi złośliwymi nowotworami ośrodkowego układu nerwowego są glejaki o wysokim stopniu złośliwości, z czego prawie 60% to glejaki wielopostaciowe (GBM, *glioblastoma multiforme*) [2–5]. W USA zapadalność na glejaki wynosi 3,19 osób na 100 000 mieszkańców/rok [6]. Rocznie w Stanach Zjednoczonych diagnozuje się około 14 000 nowych przypadków glejaków złośliwych, które stanowią 60–70% wszystkich rozpoznanych pierwotnych nowotworów mózgu [7].

U dzieci i młodzieży występują głównie rdzeniaki płodowe i inne prymitywne nowotwory neuroektodermalne (PNET, *primitive neuroectodermal tumors*), gwiaździaki włosowatokomórkowe oraz wyściółczaki. U dorosłych najczęstszymi nowotworami OUN są guzy przerzutowe, które rozpoznaje się dwukrotnie częściej niż pierwotne nowotwory [9]. Pojawiają się najczęściej w przebiegu takich nowotworów jak: rak płuca, rak piersi, czerniak złośliwy, rak nerki i gruczolakoraki jelita grubego [8, 9]. Przerzuty pozaczaszkowe spotykane są w gwiaździakach o wysokim stopniu złośliwości, rdzeniakach i rozrodczakach [5, 10]. Bardzo rzadko dają przerzuty do OUN takie nowotwory jak: rak stercza, rak przełyku, raki nabłonkowe skóry [11].

Jedynym potwierdzonym etiologicznym czynnikiem zewnętrznym guzów mózgu jest promieniowanie jonizujące. Wśród czynników predysponujących do zachorowania wymienia się takie jak: zaburzenia genetyczne, narażenie na czynniki chemiczne o działaniu rakotwórczym m.in. nitrozaminy, węglowodory aromatyczne, dym tytoniowy czy infekcje wirusowe (*Epsteina-Barr*) [12-14]. Podstawą rozpoznania wszystkich nowotworów śródczaszkowych jest badanie histopatologiczne. Poniższa tabela zawiera podział pierwotnych nowotworów OUN wg. WHO z roku 2007. Oprócz tej klasyfikacji istnieją jeszcze dwie nowsze



– z 2016 r. i 2021 r., w których poza wynikami badań mikroskopowych uwzględniono także wyniki badań genetycznych.

### 3.1.2 Podział i charakterystyka

Tabela 1. Podział nowotworów OUN według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2007 roku [9].

Lp.	Typ histopatologiczny nowotworu
1	<b>Nowotwory pochodzenia neuroepitelialnego</b>
1.1	Nowotwory astrocytarne
1.2	Nowotwory skąpowypustkowe
1.3	Nowotwory wyściółkowe
1.4	Nowotwory glejowe mieszane
1.5	Nowotwory pochodzące ze splotu naczyńiówkowego
1.6	Inne nowotwory glejowe
1.7	Nowotwory neuronalne i mieszane neuronalno – glejowe
1.8	Nowotwory pochodzące z mięszu szyszynki
1.9	Nowotwory zarodkowe z tkanki neuroepitelialnej
2	<b>Nowotwory nerwów czaszkowych i rdzeniowych</b>
2.1	Nerwiaki osłonowe
2.1	Nerwiakowłókniaki
2.3	Onerwiaki
2.4	Złośliwe nowotwory osłonek nerwów obwodowych
3	<b>Nowotwory opon</b>
3.1	Nowotwory z komórek wyściółki przestrzeni międzyoponowych – oponiaki
3.2	Nowotwory mezenchymalne nie pochodzące z meningotelium
3.3	Pierwotne zmiany barwnikowe
3.4	Nowotwory o niepewnej histogenezie
4	<b>Chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego</b>
4.1	Chłoniaki złośliwe
4.2	Guz plazmatyczno komórkowy
4.3	Mięsak szpikowy granulocytarny
4.4	Inne nowotwory
5	<b>Nowotwory pochodzące z pierwotnych komórek rozrodczych</b>
5.1	Zarodczaki
5.2	Raki zarodkowe
5.3	Guzy zatoki endodermalnej Raki kosmówkowe
5.5	Potworniaki
5.6	Mieszane nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych
6	<b>Nowotwory okolicy siodła tureckiego</b>
6.1	Czaszkogardlaki
6.2	Gruzołaki przysadki
6.3	Raki przysadki
7.	<b>Nowotwory przerzutowe</b>

### 3.1.3 Pierwotne: glejaki i oponiaki

Morfologicznie wyróżnia się trzy główne rodzaje glejaków: gwiaździaki, skąpodrzewiaki, skąpogwiaździaki [15]. Wśród gwiaździaków występują wszystkie cztery stopnie zaawansowania (wg WHO: I–IV), u skąpodrzewiaków tylko II i III [16]. Stopień I zaawansowania to nowotwory w większości łagodne (gwiaździaki włosowatokomórkowe), stopień II to nowotwory naciekające o niskim stopniu zezłośliwienia (gwiaździaki rozlane), a stopień III to nowotwory naciekające, anaplastyczne, z komórkową atypią, unaczynione (gwiaździaki anaplastyczne). Stopień IV to nowotwory naciekające, wysoce złośliwe, unaczynione, z ogniskami nekrozy (glejaki wielopostaciowe) [17, 15]. Główny wielopostaciowy to złośliwa postać nowotworu glejopochodnego wywodzącego się z pnia astrocytarnego. Pod względem histopatologicznym charakteryzuje się atypią i pleomorfizmem jąder komórkowych. Wykazuje dużą aktywność proliferacyjną, posiada liczne mikronaczynia i naczynia kłębuszkowe. Tego typu nowotwory cechują się występowaniem regularnych układów komórek nowotworowych wokół ognisk nekrotycznych zwanych palisadami [18], a także obecnością struktur Scherera – satelitarnych skupisk komórek nowotworowych wokół naczyń i neuronów [19].

Glejaki wielopostaciowe mogą być tzw. glejakami pierwotnymi lub glejakami wtórnymi, które rozwijają się z glejaków o niższym stopniu zezłośliwienia. Pod względem histopatologicznym oba typy glejaków są nie do odróżnienia [7]. Mimo agresywnego leczenia glejaki są jednymi z najbardziej śmiertelnych guzów wśród dorosłych, a dwuletni okres przeżycia obserwuje się tylko u 43% pacjentów [20].

Oponiaki są to nowotwory zbudowane z komórek meningealnych o różnej szybkości wzrostu oraz zróżnicowanym stopniu zaawansowania. Są najczęściej występującymi łagodnymi nowotworami mózgu; występują częściej u kobiet. Oponiaki diagnozuje się przeważnie u chorych między 40 a 60-tym rokiem życia, a częstość występowania tych nowotworów rośnie wraz z wiekiem osiągając najwyższą zachorowalność u osób po 70-tym roku życia [21, 22]. Oponiaki są unaczynione przez tętnice oponowe, jednakże połowa z nich jest zaopatrywana przez naczynia rozprzestrzeniające się z mózgu [23, 24]. Cechy atypowości wykazuje 5–7% oponiaków. Oponiaki anaplastyczne stanowią 1–3% guzów [9]. Około 80% oponiaków zalicza się do I stopnia zaawansowania wg. klasyfikacji WHO, II stopień zaawansowania to około 15–20%, a III tylko 1–3% wszystkich oponiaków [21]. Co tysięczny

oponiak daje przerzuty do płuc, kości, wątroby, węzłów chłonnych czy nerek – najczęściej w przypadku oponiaków brodawkowatych [25,11].

Chirurgiczne usunięcie oponiaka jest jedynym i wystarczającym leczeniem u większości chorych. Całkowite usunięcie oponiaka osiąga się tylko przez usunięcie guza wraz z przyczepem i zajęłą przez nowotwór kością w okolicy przyczepu [9]. Istnieje związek między ekspozycją na radioterapię a występowaniem oponiaków [10].

### **3.1.4 Guzy przerzutowe**

Przerzuty do mózgu są najczęściej rozpoznawanymi guzami śródczaszkowymi. Wśród osób dorosłych stwierdza się je u około 30% pacjentów z rozsianą chorobą nowotworową, natomiast u 10% chorych na nowotwory dzieci. Stanowią bezpośrednią przyczynę śmierci u 50% pacjentów [26–28].

Przerzutowe guzy mózgu pojawiają się najczęściej w przebiegu takich nowotworów, jak rak płuca (zwłaszcza drobnokomórkowy i gruczolakorak) i rak piersi oraz dość często w przebiegu czerniaka złośliwego, raka nerki i gruczolakoraków jelita grubego [29, 30]. U pacjentów poniżej 21 r.ż. rozpoznawane są głównie w przebiegu mięsaków i guzów zarodkowych [27]. Rak stercza, rak przełyku czy raki nabłonkowe skóry charakteryzują się szczególnie rzadkim przerzutowaniem do ośrodkowego układu nerwowego [10]. Około 30% przerzutów to zmiany pojedyncze, stwierdzane częściej w przebiegu raka jelita grubego, raka piersi i raka nerki. Przerzuty mnogie są dość charakterystyczne dla czerniaka złośliwego i raka płuca [31, 8].

Wybór metody leczenia zależy od stanu ogólnego pacjenta, charakteru i stanu kontroli guza pierwotnego, czasu od zakończenia pierwotnego leczenia, obecności innych przerzutów odległych, liczby i lokalizacji przerzutów w mózgu oraz spodziewanego czasu przeżycia [9].

### **3.2 Objawy kliniczne**

Objawy kliniczne nowotworów OUN zależą głównie od umiejscowienia guza i charakteru jego wzrostu. Objawy dzieli się na ogólne i typowe dla lokalizacji guza. Objawy ogólne to oznaki podwyższonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego takie jak: bóle głowy, nudności i wymioty – najbardziej nasilone rano; osłabienie sprawności umysłowej, zaburzenia pamięci, pierwotnie uogólnione napady padaczkowe. Objawy zależne od umiejscowienia guza to: niedowład, zaburzenia czucia, zaburzenia mowy, objawy mózdkowe, uszkodzenie nerwów czaszkowych, ogniskowe napady padaczkowe [9].

Symptomatologia oponiaków jest zależna od umiejscowienia nowotworu. Oponiaki w odróżnieniu od przerzutów, które rozwijają się szybko i dają gwałtowne objawy, w związku z wolnym wzrostem mogą przez wiele lat nie dawać żadnych charakterystycznych objawów, przez co mogą osiągać olbrzymie rozmiary [32, 33].

W przypadku przerzutów do OUN objawy rozwijają się w ciągu kilku dni do kilku tygodni i zależą od wielkości guza, strefy obrzęku czy rozwoju wodogłowia.

### **3.3 Diagnostyka obrazowa**

W celu diagnostyki guzów mózgu wykorzystuje się badanie podmiotowe, przedmiotowe oraz badania dodatkowe:

- wywiad (badanie podmiotowe),
- ogólne badanie przedmiotowe
- badanie neurologiczne,
- badanie dna oka u pacjentów z objawami sugerującymi podwyższone ciśnienie wewnątrzczaszkowe [9].

Badaniem dodatkowym z wyboru w przypadku większości nowotworów OUN jest rezonans magnetyczny (MR) po dożylnym podaniu środka kontrastującego. Rezonans magnetyczny jest badaniem z wyboru w diagnostyce pierwotnych i wtórnych guzów kanału kręgowego i rdzenia kręgowego [9].

Tomografia komputerowa (KT) z kontrastem jest podstawowym badaniem w przypadku poszukiwania przerzutów do mózgu (wyjątkiem są przerzuty do opon mózgowo – rdzeniowych i kanału kręgowego) oraz w diagnostyce guzów wychodzących

z kości (struniak, mięsaki kości czaszki). W diagnostyce pierwotnych guzów wewnątrzmożgowych KT wykorzystuje się rzadko.

Angiografia MR lub KT pozwala ocenić położenie guza w stosunku do dużych naczyń, ich drożność oraz ułatwia planowanie zabiegu operacyjnego. Angiografia z podaniem kontrastu dotętnicznego wykonywana jest, gdy stwierdza się bogate unaczynienie nowotworu; wskazane jest zamknięcie naczyń przed resekcją guza.

Pozytonowa emisyjna tomografia PET (ang. *positron emission tomography*) obrazuje procesy biochemiczne zachodzące w guzach, dzięki czemu odgrywa istotną rolę w tworzeniu i ocenie skuteczności nowych terapii. Badanie to znajduje także zastosowanie w rozpoznawaniu guzów mózgu i diagnostyce różnicowej, zwłaszcza nacieku nowotworowego i zmian popromiennych.

Badania uzupełniające wykonuje się przede wszystkim w celu obiektywnego określenia stanu czynnościowego narządów zmysłów i OUN oraz stężenia substancji wydzielanych przez niektóre guzy, co ma znaczenie diagnostyczne oraz służy monitorowaniu odpowiedzi na leczenie. Do badań tych należą:

- badanie okulistyczne (ostrość wzroku, obraz dna oka, pole widzenia),
- audiometria i badanie błędników,
- elektroencefalografia (diagnostyka i monitorowanie chorych na padaczkę),
- badanie słuchowych, wzrokowych, somatosensorycznych i motorycznych potencjałów wywołanych,
- ultrasonografia (USG) w poszukiwaniu ogniska pierwotnego przerzutów do mózgu.

Inne badania dodatkowe wykonuje się w zależności od wskazań klinicznych: rentgenografia (RTG) klatki piersiowej, scyntygrafia kości, podstawowe badania krwi i moczu oraz inne [9].

W przypadku trudności diagnostycznych stosuje się rozpoznawczą biopsję mózgu – stereotaktyczną lub pod kontrolą neuronawigacji [8].

### 3.4 Diagnostyczne markery biochemiczne

Nieinwazyjna diagnostyka nowotworów OUN obejmuje oznaczenia biochemiczne stężeń markerów nowotworowych. Przydatność w tym celu mają badania wykonywane we krwi lub płynie mózgowo – rdzeniowym:

- podjednostka  $\beta$  ludzkiej gonadotropiny ( $\beta$ -HCG, *human chorionic gonadotropin*),
- $\alpha$  – fetoproteina (AFP,  *$\alpha$  fetoprotein*)
- w rdzeniaku płodowym – obecność poliamin,
- putrescyny lub spermidyny, tkanka neuronalna – enolaza,
- ocena stężenia hormonów przysadki we krwi (gruczolaki przysadki) [9],
- telomerazy – aktywność obserwuje się w oponiakach głównie II st. i oponiakach anaplastycznych [34, 35, 7].

## 4. Angiogeneza

### 4.1 Historia badań

Wzrost i rozwój naczyń krwionośnych zaobserwowali już konstruktorzy mikroskopów w XVII wieku. Historia angiogenezy i waskulogenezy sięga okresu co najmniej 200 lat wstecz, kiedy to John Hunter zidentyfikował rosnące naczynia krwionośne w gojącej się ranie i zaobserwował powiększenie tętnic szyjnych u jelenia [36]. Około 50 lat później Meyer opisał kiełkowanie naczyń w rosnących ogonach kijanek [37]. W 1920 roku August Krogh otrzymał Nagrodę Nobla za poszukiwania relacji między zapotrzebowaniem na tlen a gęstością naczyń, które opisał w książce „*The Anatomy and Physiology of the Capillaries*” [38]. Zainteresowanie angiogenezą wykazywał pod koniec XX wieku Judah Folkman, który jest autorem hipotezy, iż wzrost guza nowotworowego pozostaje w ścisłej korelacji z rozwojem naczyń krwionośnych. Stwierdził, że guz nowotworowy jest w stanie czerpać tlen i substancje odżywcze z otaczających tkanek tylko do momentu osiągnięcia objętości 1–2 mm<sup>3</sup>. Powyżej tej wielkości guz musi wytworzyć własne naczynia krwionośne, aby dalej móc żyć i przerzutować. Wysunął również pogląd, że inhibicja angiogenezy może być skuteczną metodą terapii antynowotworowej [39]. Ten kierunek walki z nowotworami stanowi obecnie prężnie rozwijającą się dziedzinę badań.

Historia badań VEGF-A sięga początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy w roku 1983 Senger i Dvorak wyizolowali naczyniowo–śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF określając go jako czynnik przepuszczalności naczyń VPE (ang. *vascular permeability factor*) [40]. W roku 1989 niezależnie od siebie Ferrara i Henzel zidentyfikowali białko o właściwościach angiogennych identyczne z VPE, które nazwali naczyniowo–śródbłonkowym czynnikiem wzrostu [41], natomiast Plouet i wsp. określili je mianem waskulotropiny [42]. Analiza wymienionych cząsteczek dowiodła, że określają one ten sam czynnik o właściwościach proangiogennych poprzez aktywację komórek śródbłonka naczyń [43, 44].

Kolejne lata przyniosły dość gwałtowny rozwój badań nad angiogenezą, czynnikami pro – oraz antyangiogennymi, a także poszukiwanie swoistych wskaźników określających poziom zaawansowania choroby nowotworowej. Badania biochemiczne wykorzystujące krew lub mocz pacjenta stanowią nieinwazyjne metody diagnostyki nowotworów.

Podjęmowane są coraz częściej badania określające przydatność czynników proangiogennych oraz antyangiogennych do szybkiej diagnostyki oraz oceny stopnia zaawansowania choroby.

#### **4.2 Angiogeneza płodowa i postpłodowa**

Angiogeneza czyli tworzenie naczyń krwionośnych na bazie już istniejących zachodzi zarówno w życiu płodowym jak i postpłodowym. Prawidłowe funkcje każdej żywej komórki są zapewnione dzięki dostawom tlenu oraz substancji odżywczych przez sprawnie działający system naczyń krwionośnych. Angiogeneza odgrywa ważną rolę w tworzeniu naczyń krwionośnych u zarodka, gdyż u kręgowców układ krwionośny rozwija się jako pierwszy [45]. Proces ten zależy od wielu czynników indukujących i hamujących. W zależności od tego, która grupa czynników dominuje, ma miejsce stymulacja lub hamowanie angiogenezy. Nowe naczynia krwionośne prawidłowe tworzą się w okresie postpłodowym w ściśle określonych sytuacjach, natomiast często dochodzi do ich proliferacji w stanach patologicznych.

Podczas wczesnej embriogenezy odbywa się waskulogeneza czyli tworzenie naczyń krwionośnych w oparciu o komórki macierzyste *de novo*. Efektem waskulogenezy jest wytworzenie splotu naczyniowego ok. 3 tygodnia embriogenezy [46]. W życiu płodowym naczynia krwionośne powstają zarówno na drodze angiogenezy jak i waskulogenezy [45, 47].

#### **4.3 Angiogeneza fizjologiczna i patologiczna**

Nowe naczynia krwionośne powstają na drodze kilku procesów: waskulogenezy, arteriogenezy oraz angiogenezy [48].

Waskulogeneza to proces zachodzący w początkowej fazie rozwoju embrionalnego, polegający na tworzeniu naczyń krwionośnych na bazie komórek macierzystych. W okresie postpłodowym naczynia krwionośne powstają na drodze waskulogenezy w stanach patologicznych jak choroby nowotworowe czy niedokrwienne [49–51].

Arteriogeneza jest to proces tworzenia naczyń krwionośnych, które w wyniku pogrubienia warstwy mięśniowej przekształcają się w tętnice; zachodzi zarówno w życiu płodowym jak pozapłodowym np. stany niedokrwienia mięśnia sercowego [52, 53].



Angiogeneza jest to tworzenie naczyń włosowatych na bazie już istniejących. Proces ten jest regulowany szeregiem czynników proangiogennych i antyangiogennych. Fizjologicznie zachodzi na wczesnym stadium embriogenezy, podczas tworzenia naczyń krwionośnych, natomiast w życiu pozapłodowym zdarza się w ściśle określonych stanach. Uprzywilejowane miejsce dla angiogenezy to układ rozrodczy dorosłych kobiet – angiogeneza zachodzi wówczas podczas takich procesów jak rozwój endometrium w trakcie cyklu menstruacyjnego, kiedy zapewnia regenerację śluzówki macicy, podczas tworzenia łożyska czy implantacji zarodka [54]. Inną ważną fizjologicznie okolicznością jest proces naturalnego gojenia rany poprzez stymulację powstawania ziarniny [55] oraz angiogeneza w krezce jelita [56]. W jajniku zachodzi neowaskularyzacja pęcherzyków i ciała żółtego [57]. Podczas angiogenezy fizjologicznej powstają naczynia krwionośne o prawidłowych kształtach i rozmiarach, a przepływ w nich krwi jest regularny.

Angiogeneza patologiczna ma miejsce podczas wielu stanów chorobowych przebiegających z niedotlenieniem lub niedokrwieniem np. stany niedokrwienia kończyn na tle cukrzycy lub miażdżycy czy retinopatia cukrzycowa [58, 59]. Niedotlenienie w chorobie niedokrwiennej serca, niedokrwieniu kończyn dolnych na tle cukrzycy czy miażdżycy, a także po udarze mózgu jest głównym czynnikiem inicjującym angiogenezę [58, 59]. Angiogenezę obserwowano również podczas stanów chorobowych przebiegających z zapaleniem: astma, POChP, reumatyczne zapalenie stawów, łuszczyca, przewlekłe zapalenie przewodu pokarmowego [60, 61]. Bierze także udział w powstawaniu tkanki tłuszczowej, gdzie główną substancją proangiogenną jest VEGF [62, 63]. Proces ten odgrywa także kluczową rolę podczas rozwoju endometrium [64].

Szczególną rolę VEGF odgrywa w procesie nowotworzenia [51]. W chorobie nowotworowej naczynia krwionośne powstają na drodze angiogenezy, a także waskulogenezy. Nowotwory awaskularne nie mogą się rozwijać dopóki równowaga pomiędzy czynnikami pro – i antyangiogennymi nie zostanie zaburzona. Wzrost nowotworu uzależniony jest od gęstości naczyń krwionośnych. Naczynia nowotworowe o nieprawidłowych kształtach i rozmiarach powstają na drodze: angiogenezy nowotworowej, wgłobienia, czyli rozpadu dużego naczynia na mniejsze, waskulogennej mimikry, czyli tworzenia struktur naczyniopodobnych [65].

Naczynia te wykazują zwiększoną przepuszczalność. Nieprawidłowy przepływ krwi jest przyczyną hipoksji, co jest kompensowane wydzielaniem przez komórki nowotworowe czynników proangiogennych, przyczyniającym się do wzmożonego powstawania nowych naczyń [66].

Kluczową rolę w angiogenezie nowotworowej odgrywa tzw. przełom angiogeny (ang. *angiogenic switch*) czyli przejście nowotworu z fazy awaskularnej do fazy unaczynienia. Patologiczne powstawanie naczyń krwionośnych różni się od angiogenezy fizjologicznej także tym, że podczas prawidłowego rozwoju naczyń głównym czynnikiem proangiogenym jest VEGF, natomiast w angiogenezie nowotworowej oprócz VEGF bierze udział dużo innych czynników wytwarzanych przez komórki guza [67].

#### **4.4 Czynniki proangiogenne**

W zdrowym organizmie angiogeneza zachodzi w ściśle określonych warunkach. Dzieje się tak na skutek równowagi pomiędzy czynnikami pobudzającymi angiogenezę a hamującymi, z lekką przewagą hamujących [68]. Większość czynników proangiogennych występuje w przestrzeni pozakomórkowej, natomiast czynniki hamujące oddziałują na komórki krążące po całym organizmie, po to aby kontrolować neowaskularyzację i utrzymać ją w stanie uśpienia. W momencie obniżenia ekspresji czynników hamujących angiogenezę dochodzi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych, co następuje pod wpływem niedotlenienia lub obniżenia pH. Tlenek azotu (NO) uwalniany z niedotlenionych komórek śródbłónka powoduje zwiotczenie naczyń krwionośnych, co warunkuje uruchomienie procesu angiogenezy. Komórki śródbłónka stają się bardziej wrażliwe na mitogeny [51].

Do czynników proangiogennych zalicza się czynniki wpływające na proliferację, dojrzewanie i wzrost komórek śródbłónka takie jak: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF ang. *fibroblast growth factor*), naczyniowo-śródbłónkowy czynnik wzrostu (VEGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF ang. *platelet derived growth factor*), angiopoetyna (ang. *angiopoietin*) oraz degradujące macierz pozakomórkową takie jak: metaloproteiny (MMP ang. *metalloproteinase*), czynnik tkankowy (TF ang. *tissue factor*), interleukina 8 (IL-8 ang. *interleukine 8*), a także wpływające na dojrzewanie naczyń krwionośnych: PDGF, FGF-1, Tie-1, Tie-2 [69].

#### 4.5 Rodzina czynników VEGF

Główną cytokiną promującą rozwój nowych naczyń krwionośnych jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF. Jest najlepiej poznanym dotychczas czynnikiem proangiogennym [70]. VEGF zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, w wyniku czego białka osocza takie jak fibrynogen czy plazminogen przedostają się do środowiska zewnątrznaczyniowego i dochodzi do zwiększenia ciśnienia tkankowego. Płyn uciska na komórki guza oraz naczynia krwionośne, co utrudnia przedostawanie się leków do komórek nowotworowych [71]. Jak ważny jest VEGF świadczy fakt, że mysie zarodki pozbawione genu dla VEGF umierały już około 10 dnia ciąży, ze względu na nieprawidłowe tworzenie systemu krwionośnego [41].

VEGF jest również silnym mitogenem dla komórek śródbłonka, stymulując ich proliferację i migrację. Uszkadza błonę podstawną naczyń krwionośnych oraz degraduje kolagen typu IV. Hamuje odpowiedź immunologiczną ustroju poprzez hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych [72, 73–75]. VEGF aktywuje szlaki antyapoptotyczne wywierając ochronne działanie na komórki śródbłonka [71].

W skład rodziny VEGF wchodzi: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF ang. *placental growth factor*), VEGF-E oraz VEGF-F obecny w jadzie niektórych węży. Wszystkie cząsteczki, mimo iż tworzą jedną rodzinę, charakteryzują się innym działaniem biologicznym [44, 72].

VEGF bierze udział w angiogenezie fizjologicznej, patologicznej, a także w procesie rozwoju naczyń limfatycznych – uczestnicząc we wszystkich fazach angiogenezy [44]. Gen odpowiedzialny za syntezę VEGF jest umiejscowiony na ramieniu krótkim chromosomu 6 (6p21.3) i zawiera 8 eksonów i 7 intronów [76, 77]. W wyniku alternatywnego składania powstaje 10 izoform VEGF-A różniących się budową i funkcją: 121, 138, 145, 148, 162, 162b, 165, 183, 189, 206 [70]. W większości tkanek występują izoformy: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub> i VEGF-A<sub>189</sub>; natomiast najmniej jest izoformy VEGF-A<sub>189</sub> [78]. Właściwości biologiczne VEGF są zależne od powinowactwa jakie poszczególne izoformy VEGF-A wykazują w stosunku do heparyny. Izofорма VEGF<sub>121</sub> wykazuje mniejszą zdolność wiązania heparyny, dlatego jej biodostępność jest lepsza niż izoformy 189, która przylega do

powierzchni komórki poprzez złączenie z fragmentem przypominającym cząsteczkę heparyny [73].

Egzony od 1 do 5 kodują N-końcowy fragment peptydu, w którym znajdują się domeny PS – peptyd sygnałowy oraz domeny A i B – odpowiedzialne za wiązanie się z receptorami [79]. VEGF występuje w postaci glikozylowanego homodimeru o masie cząsteczkowej 46–48 kDa. W warunkach redukujących dysocjuje na dwie jednakowe podjednostki o masie 24 kDa, które są połączone wiązaniami disiarczkowymi [80, 81, 41].

Zdolność syntezy VEGF mają komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, makrofagi, monocyty, eozynofile, limfocyty T, fibroblasty, płytki krwi, komórki śródbłona i komórki nowotworowe [70]. Najsilniejszym induktorem produkcji VEGF-A jest stan hipoksji. Do najbardziej istotnych czynników silnie stymulujących syntezę VEGF w komórce obok stanu hipoksji należą niektóre cytokiny takie jak: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , czynniki wzrostowe (PDGF czy TGF- $\alpha$  i  $\beta$ ), hormony (ACTH, LH, estrogeny), tlenek azotu (NO) czy jony metali ciężkich. Udział w aktywacji VEGF mają także mutacje w genie supresorowym p53 czy onkogenach: src, raf, ras, erb [70].

Tabela 2. Rodzina VEGF – rola biologiczna [44, 82, 83, 84, 85].

VEGF-A	Zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, zwiększa ciśnienie śródtkankowe w guzie nowotworowym, stymuluje migrację i proliferację komórek śródbłona naczyń, hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych
VEGF-B	Promuje progresję nowotworów niezależną od angiogenezy
VEGF-C	Stymuluje proces limfangiogenezy
VEGF-D	Stymuluje proces limfangiogenezy
PlGF	Odpowiada za wzrost komórek śródbłona i naczyń mięśni gładkich
VEGF-E	Wirusowy homolog VEGF
VEGF-F	Obecny w jadzie niektórych węży

W powyższej tabeli przedstawiono poznane funkcje poszczególnych odmian VEGF.

## 4.6 Receptory VEGF

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń wywiera swoją aktywność biologiczną poprzez połączenie z receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej: VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR/Flk-1 oraz VEGFR3/Flt-4. Aktywność VEGF-A jest wspomagana przez czynniki modulujące, pełniące funkcje koreceptorów, takie jak neuropilina 1 i neuropilina 2 (NRP-1 i NRP-2) [44]. Neuropilina 1 wzmacnia wiązanie VEGF-A<sub>165</sub> z receptorem VEGFR2 [86], natomiast neuropilina 2 wiąże VEGF-C [87].

Receptory VEGFR1 i VEGFR2 oraz VEGFR3 są błonowymi glikoproteinami składającymi się z trzech części: domeny zewnątrzkomórkowej, części transbłonowej oraz części zewnątrzkomórkowej.

### 4.6.1 Receptory stacjonarne

Do receptorów stacjonarnych należą:

VEGFR-1 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 1*) receptor naczyńno-śródbłonkowego czynnika wzrostu, zwany również Flt-1 (ang. *fms-like tyrosine kinase 1*) o masie cząsteczkowej 180 kDa,

VEGFR-2 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 2*) receptor naczyńno-śródbłonkowego czynnika wzrostu, zwany również KDR (ang. *kinase domain region*) myszy homolog Flk-1 (ang. *foetal liver kinase 1*); wykazuje 85% podobieństwo do ludzkiego receptora KDR, o masie cząsteczkowej 230 kDa,

VEGFR-3 zwany również Flt-4 (ang. *fms-like tyrosine kinase 4*) o masie ok. 120 kDa [69, 87].

Receptory stacjonarne VEGF: VEGFR1, VEGFR2 oraz VEGFR3 wykazują strukturalne podobieństwo do rodziny receptorów czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (klasa III receptorowych kinaz tyrozynowych). Jak wcześniej wspomniano składają się one z cytoplazmatycznej domeny o aktywności kinazy tyrozynowej, która jest przedzielona fragmentem niekatalitycznym, krótkiej domeny błonowej oraz regionu zewnątrzkomórkowego. Region zewnątrzkomórkowy zbudowany jest z siedmiu domen

homologicznych do immunoglobuliny. Druga i trzecia domena zewnątrzkomórkowa są odpowiedzialne za wiązanie liganda. Receptory wiążą różne typy VEGF z różnym powinowactwem do liganda. Sekwencje aminokwasowe receptorów VEGFR1 i VEGFR2 wykazują około 44% homologii. Receptory aktywują się po związaniu liganda oraz uruchamiają ścieżki sygnałowe [89, 90, 91].

#### 4.6.1.1 VEGFR-1

Funkcja tego receptora pozostaje nadal nie do końca poznana. VEGFR1 ma najwyższe powinowactwo do liganda, jednak fosforylacja VEGF jest słaba. Ma zdolność wiązania VEGF z 10 krotnie większym powinowactwem niż VEGFR2, jednakże nie dochodzi do jego całościowej aktywacji [92]. VEGFR1 odgrywa istotną rolę w tworzeniu i utrzymaniu prawidłowej morfologii naczyń krwionośnych. Może wpływać hamująco, a także pobudzająco na angiogenezę [71]. Występuje na komórkach śródbłonna, na powierzchni makrofagów i monocytów. Ekspresja receptora na komórkach dzielących się oraz uśpionych jest stała. Pozbawienie receptorów VEGFR1 ich domen wewnątrzkomórkowych nie prowadzi do zaburzeń w rozwoju embrionów i nie wpływa na zahamowanie angiogenezy [93]. Receptor ten funkcjonuje głównie jako cząsteczka wiążąca ligand, bez krytycznej roli domeny kinazowej. VEGFR1 jako jedyny wiąże łożyskowy czynnik wzrostu PlGF i VEGF-B z dużym powinowactwem [94]. Poprzez złączenie z VEGF-A stymuluje migrację monocytów oraz ekspresję czynnika tkankowego TF, reguluje tworzenie struktur kapilaropodobnych [95], a także aktywuje szlaki antyapoptotyczne (za pomocą białka antyapoptotycznego Bcl-2) i kinazę PI3 [96]. Receptorowi VEGFR1 przypisuje się rolę receptora przynętowego (ang. *decoy receptor*) – wychwytuje on cząsteczki VEGF i nie dopuszcza do ich połączenia z receptorem VEGFR2, co powoduje zahamowanie angiogenezy [97]. Aktywne działanie VEGFR1 hamuje proliferację komórek śródbłonna, zależną od przyłączenia VEGF [98]. Efekt działania VEGFR1 zależy także od stężenia PlGF, ponieważ cząsteczki PlGF mają większe powinowactwo do łączenia się z receptorem VEGFR1 i wypierają wówczas cząsteczki VEGF z połączenia z receptorem, a to stymuluje proces naczyniotworzenia [99, 108].

#### **4.6.1.2 VEGFR-2**

Głównym receptorem poprzez który VEGF-A uzyskuje swoje działanie jest VEGFR2. Receptor ten stymuluje angiogenezę i waskulogenezę zachodzącą podczas życia płodowego. Ulega ekspresji na komórkach śródbłonna oraz megakariocytach, płytkach krwi i komórkach hematopoetycznych [100]. Ekspresja VEGFR2 zachodząca podczas embriogenezy odgrywa istotną rolę w różnicowaniu i dojrzewaniu komórek śródbłonna, ich proliferacji i migracji. Ilość VEGFR2 jest mniejsza w organizmach dorosłych. Myszy pozbawione genu VEGFR2 nie posiadają sprawnie wykształconej sieci naczyń krwionośnych [89]. Receptor ten wykazuje mniejsze powinowactwo do liganda niż VEGFR1 [85].

#### **4.6.1.3 VEGFR-3**

Receptor VEGFR3 bierze udział w limfoangiogenezie, ponieważ obecny jest przede wszystkim na śródbłonku naczyń limfatycznych, wykrywany jest również we wszystkich embrionalnych komórkach śródbłonna. Wiąże on formy VEGF-C i VEGF-D z dużo wyższym powinowactwem niż receptor VEGFR2. Brak genu dla receptora VEGFR3 powoduje powstanie nieprawidłowego strukturalnie limfatycznego układu naczyniowego [89].

### **4.7 Rozpuszczalne receptory sVEGFR1 i sVEGFR2**

Obecnie zidentyfikowano dwa naturalnie występujące rozpuszczalne receptory: sVEGFR1 i sVEGFR2. W celu zbadania miejsc wiążących ligand konstruowano różne typy rozpuszczalnych receptorów VEGF, sprawdzając równocześnie ich zdolność do wywołania odpowiedzi biologicznej [93]. Oba receptory różnią się mechanizmem transdukcji sygnału, jednakże oba są niezbędne do prawidłowego przebiegu angiogenezy.

sVEGFR1 powstaje na skutek różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu VEGFR1 i zawiera tylko domeny homologiczne do immunoglobulin, dlatego nie wykazuje aktywności kinazowej [56]. Wiąże on z wysokim powinowactwem wszystkie izoformy naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu, a także PlGF i VEGF-B. Wysoki poziom

sVEGFR1 występuje w surowicy kobiet ciężarnych [101]. Jest naturalnym inhibitorem angiogenezy [101]. Poza tym, jak dotąd, jego rola biologiczna pozostaje nie do końca jasna. Przypuszcza się, że może on wiązać VEGF-A, przez co zapobiega stymulacji komórek śródbłonna [88].

Receptor sVEGFR2 został zidentyfikowany przez Eboś'a i in. [101] w ludzkim i mysim osoczu. Budowa sVEGFR2 i jego powinowactwo do VEGF pozostają nadal nieznanymi, jak również rola biologiczna krótszych form receptorów nie jest do końca poznana [101].

Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że ekspresja sVEGFR2 jest niezależna od warunków hipoksji [94]. Aktywacja receptora prowadzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz zahamowania apoptozy komórek śródbłonna i nasilenia angiogenezy [102]. W życiu płodowym jest niezbędny do rozwoju płodu, embriony pozbawione genu dla receptora sVEGFR2 umierały w 9 dniu życia płodowego ze względu na brak waskulogenezy [103].

#### **4.8 Inne aktywatory angiogenezy**

##### **Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF)**

Czynniki te są silnymi mitogenami dla fibroblastów, komórek śródbłonna naczyń krwionośnych i komórek mięśni gładkich. Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *acidic fibroblast growth factor*, a-FGF/FGF-1) – stymuluje proliferację miocytów i komórek śródbłonna. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, bFGF/FGF-2) – uważany jest za jeden z najsilniejszych czynników pobudzających proces naczyniotworzenia [69].

##### **Angiopoetyny**

Angiopoetyny (Ang-1, Ang-2) są ligandami dla receptorów kinazy tyrozyny (Tie-1, Tie-2) obecnych na powierzchni śródbłonna. Angiopoetyna 1 jest ligandem dla Tie-2, ligand dla Tie-1 jest nadal nieznanymi. Angiopoetyna 1 stymuluje tworzenie pączka naczyniowego i podtrzymuje przeżycie komórek śródbłonna, natomiast angiopoetyna 2 nie



pobudza ani Tie-1 ani Tie-2. Uważa się, że jest ona blokerem angiopoetyny 1 i inhibitorem angiogenezy [69].

### **Transformujący czynnik wzrostu $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )**

Transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (TGF- $\alpha$  ang. *transforming growth factor  $\alpha$* ) jest mitogenem w stosunku do fibroblastów, komórek śródbłonka i nabłonka. Czynniki te działają w dwojaki sposób: w warunkach *in vivo* pośrednio stymuluje angiogenezę, natomiast w warunkach *in vitro* bezpośrednio hamuje wzrost fibroblastów, komórek śródbłonka i nabłonka, w małych ilościach działa stymulująco na proliferację tych komórek [69].

### **Integryny**

Integryny są to przezbłonowe białka zbudowane z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Dwie najważniejsze integryny dla procesu angiogenezy są integryny  $\alpha_v$  i  $\beta_3$  oraz  $\alpha_v$  i  $\beta_5$ . Integryny chronią proliferujące komórki przed apoptozą [69].

### **Czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF)**

Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF ang. *platelet derived growth factor*) uwalniany przez pobudzone płytki jest silnym mitogenem dla komórek przydanki i mięśni gładkich. PDGF stabilizuje nowopowstałe naczynie krwionośne [69].

### **Czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) jest cytokiną wytwarzaną przez komórki nowotworowe oraz pobudzone makrofagi. W warunkach *in vitro* pobudza angiogenezę, *in vivo* zwiększa migrację i różnicowanie komórek śródbłonka [69].

### **Tlenek azotu (NO)**

Tlenek azotu pobudza angiogenezę wpływając na migrację i proliferację komórek śródbłonka w naczyniach włosowatych, odpowiada za rozszerzenie naczyń i wzrost przepuszczalności naczyń (błon komórkowych śródbłonka) [69].

### **Interleukina 8 (IL-8)**

Interleukina 8 produkowana przez monocyty, limfocyty, fibroblasty i komórki śródbłonka stymuluje chemotaksję, proliferację i migrację komórek śródbłonka [69].

## 4.9 Inhibitory angiogenezy

### Trombospondyna-1

Trombospondyna wpływa na adhezję komórek śródbłonna. Czynniki te pobudzają lub hamują wzrost i migrację komórek śródbłonna oraz komórek zapalnych [69]

### Angiostatyna

Angiostatyna to wewnętrzny fragment plazminogenu, który utrzymuje w uśpieniu przerzuty nowotworowe poprzez zwiększenie apoptozy komórek nowotworu [69].

### Endostatyna

Endostatyna jest końcowym fragmentem kolagenu XVIII. Hamuje proliferację komórek śródbłonna *in vitro* oraz wzrost nowotworu i przerzutów [69].

### Interleukiny (IL-10, IL-12, IL-18)

Interleukina 10 jest cytokiną przeciwzapalną, hamuje wzrost guza wpływając na zmniejszenie syntezy VEGF, TNF $\alpha$  i MMP-9. Produkowana jest przez makrofagi oraz limfocyty T pomocnicze. Interleukina 12 jest syntetyzowana przez komórki prezentujące antygen oraz wiąże się z receptorami na komórkach T i NK. W hodowlach komórkowych IL-12 powoduje wzrost ekspresji INF- $\gamma$  oraz IP-10 (ang. *interferon- $\gamma$ -inducible protein*), które wykazują działanie antyangiogenne. IL-18 również wzmacnia produkcję INF- $\gamma$  [69].

## 4.10 Etapy angiogenezy

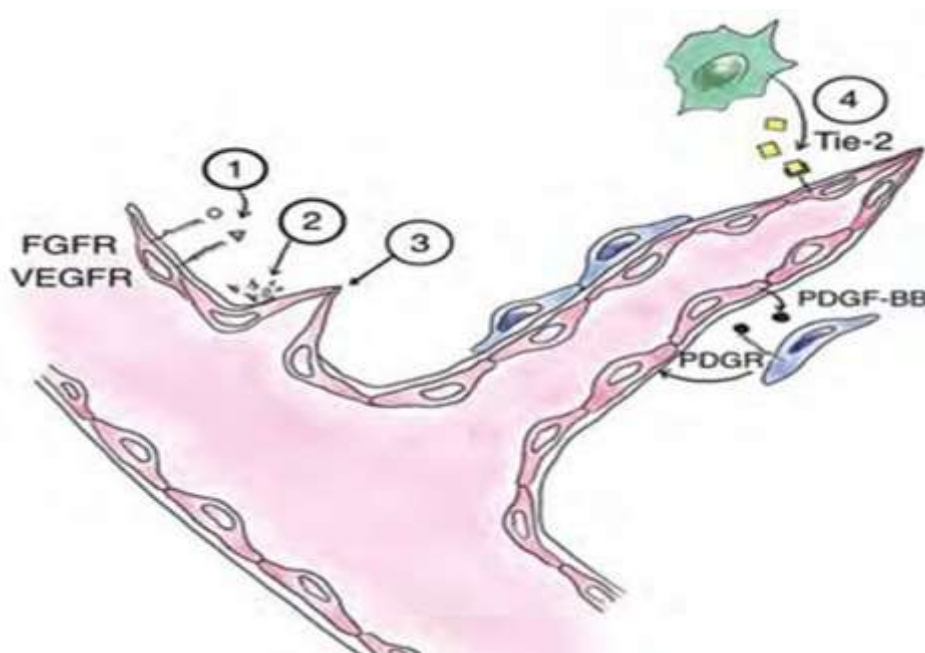
Proces angiogenezy jest złożony i przebiega w kilku etapach. Dużą rolę odgrywa śródbłonek naczyń, który reguluje ekspresję czynników pro – i antyangiogennych. Aby doszło do zapoczątkowania tworzenia naczyń krwionośnych muszą zaistnieć wspomniane już warunki niedotlenienia czy niedokrwienia, co stymuluje wytwarzanie czynników pobudzających angiogenezę [51].

Kluczowym regulatorem procesu angiogenezy jest VEGF powodujący wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Jego produkcja pobudzana jest w środowisku

niedotlenienia, które jest głównym czynnikiem stymulującym ekspresję VEGF poprzez aktywację czynnika indukowanego hipoksją HIF [94, 73, 104, 105]. HIF składa się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  [106]. W warunkach prawidłowego stężenia tlenu w tkance HIF1 $\alpha$  podlega rozkładowi. Hipoksja blokuje degradację i następuje gromadzenie HIF1 $\alpha$ , co skutkuje stymulacją genów odpowiedzialnych za syntezę wielu czynników wzrostu, w tym także VEGF.

Pierwszym etapem angiogenezy jest zwiotczenie naczynia (do czego przyczyniają się tlenek azotu i VEGF) i pobudzenie komórek śródbłónka. Czynniki proangiogenne takie jak VEGF oraz FGF wiążą się ze swoimi receptorami (VEGFR i FGFR). W kolejnym etapie dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz (MMP), które degradują błonę podstawną i macierz pozakomórkową, dzięki czemu możliwa jest migracja komórek śródbłónka. W pobudzonym śródbłónku znacząco wzrasta ekspresja integryn, które chronią proliferujące komórki przed apoptozą, dzięki czemu odbywa się migracja i adhezja komórek śródbłónka. Pod wpływem MMP następuje transformacja plazminogenu w plazminę, która trawiąc macierz zewnątrzkomórkową doprowadza do uwolnienia zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów 2 (bFGF).

W ostatnim etapie dochodzi do powstania błony podstawnej dzięki angiopoetynie 1 wiążącej się z receptorem Tie-2 oraz rekrutacja komórek przydanki pod wpływem PDGF-BB wiązanej z odpowiednim receptorem PDGFR, co powoduje stabilizację nowopowstałego naczynia [51, 107].



Rycina 1. Powstawanie nowego naczynia krwionośnego [48].

## 5. Cechy angiogenezy nowotworowej

Wzrost nowotworu uzależniony jest od stałych dostaw tlenu i substancji odżywczych. Komórki nowotworowe są w stanie czerpać związki im potrzebne z zaatakowanego narządu tylko do momentu, kiedy guz osiągnie wielkość ok. 1–2 mm<sup>3</sup>. Od tej chwili dostawy tlenu i substancji odżywczych drogą dyfuzji są niewystarczające, dlatego wewnątrz masy guza dochodzi do nekrozy komórek na skutek niedokrwienia i niedotlenienia, czyli głównych przyczyn indukujących angiogenezę. Komórki nowotworu wydzielają substancje proangiogenne, co powoduje aktywację angiogenezy.

Zdolność do tworzenia własnych naczyń nowotworowych uważana jest za jedną z podstawowych cech nowotworów. Komórki nowotworowe wydzielają czynniki proangiogenne, które stymulują swoiste „kiełkowanie” i chemotaktyczny wzrost komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych w kierunku źródła sygnałów (tzn. komórek wydzielających czynniki proangiogenne).

Przepływ krwi w nowopowstałych naczyniach nowotworu jest jednakże chaotyczny i turbulentny. Naczynia krwionośne są nieregularne, często ślepo zakończone, co spowalnia przepływ krwi i prowadzi do powstawania zakrzepów. Patologiczne naczynia są niedojrzałe morfologicznie wykazując defekty w budowie ich ścian.

Obecnie wiadomo, że wzrost nowotworu uzależniony jest od sprawnie przebiegającej angiogenezy uważanej za podstawowy mechanizm powstawania nowotworowych naczyń krwionośnych. Angiogeneza nowotworowa różni się jednak od angiogenezy występującej w tkankach prawidłowych. Angiogeneza prawidłowa stymulowana jest głównie przez VEGF i kontrolowana przez swoiste inhibitory, np. trombospondynę. Natomiast w angiogenezie nowotworowej bierze udział wiele różnych czynników wzrostowych, oprócz VEGF, także m.in. PDGF, TNF- $\alpha$ , FGF, HGF, IL-8, IL-6, TGF – obok bardzo ograniczonej ilości inhibitorów angiogenezy [39].

## 6. Kierunki terapii antyangiogennej w zarysie

W ostatnim czasie dokonał się znaczny postęp w poznaniu procesu angiogenezy na poziomie molekularnym, co doprowadziło do wytworzenia leków antyangiogennych stosowanych w leczeniu niektórych typów nowotworów. Duże zdolności adaptacyjne komórek nowotworowych do niedotlenowanego mikrośrodowiska zmniejszają jednakże skuteczność terapii przeciwnowotworowej.

Zahamowanie aktywności VEGF – głównego czynnika proangiogennej budzi ogromną nadzieję na poprawę rokowania w chorobach nowotworowych. Inhibicja angiogenezy skutkuje bowiem zahamowaniem powstawania nowych naczyń włosowatych, co skutecznie hamuje wzrost guza i uniemożliwia powstawanie przerzutów odległych.

Najczęściej stosowana jest terapia z wykorzystaniem: przeciwciał anti-VEGFR2 i anti-VEGF, peptydów hamujących aktywność receptora VEGFR2, niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych receptorów VEGFR, immunoterapii, oligonukleotydów hamujących ekspresję genu VEGFR oraz terapia przeciwnaczyniowa [70].

W terapii z użyciem przeciwciał stosuje się przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi VEGFR2 oraz przeciwko białku VEGF. Przeciwciała skutecznie hamowały rozwój guzów pierwotnych takich jak: rak płuca, piersi, okrężnicy, czy czerniaka [70]. Bevacizumab jest rekombinowanym monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko VEGF, wykorzystywanym jako lek pierwszego rzutu w leczeniu raka jelita grubego i raka piersi [107]. Mimo przeciwności w stosowaniu jakie napotyka terapia antyangiogennej budzi ona wielkie nadzieje. Efektem badań ostatnich lat dotyczących hamowania angiogenezy była rejestracja bevacizumabu w celu leczenia raka jelita grubego z przerzutami, ranibizumabu w leczeniu wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki żółtej, czy sunitinibu w leczeniu pacjentów z rakiem nerki i nowotworami podścieliska przewodu pokarmowego [70].

W ostatnich latach zaczęto również używać peptydów, które regulują angiogenezę. Białka te współzawodniczą z VEGF o miejsce wiązania z receptorem lub tworzą z nim nieaktywne kompleksy hamując tym samym proces naczyniotworzenia [109].

Prowadzone są badania w kierunku syntezy swoistych niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych – TKIs (ang. *small molecule tyrosine kinase inhibitors*)

blokujących transdukcję sygnału mitogennego indukowanego przez VEGF. Pierwszym syntetycznym inhibitorem był związek o symbolu PTK787 i nazwie handlowej Vatalanib, który charakteryzuje się dużym powinowactwem do ludzkiego receptora VEGFR2, natomiast w niewielkim stopniu hamuje aktywność VEGFR1. Przetestowano go w raku skóry, nowotworach prostaty, tarczycy i okrężnicy [110]. Znaczące pozytywne efekty przyniósł u pacjentów z rakiem jelita grubego [111].

W terapii z wykorzystaniem oligonukleotydów hamujących ekspresję głównych genów odpowiedzialnych za angiogenezę następuje blokowanie ekspresji genów kodujących receptory VEGFR1 oraz VEGFR2. W przeprowadzonych badaniach na myszach zaobserwowano zahamowanie rozwoju unaczynienia guza [112].

Terapia przeciwnaczyniowa ma na celu blokowanie angiogenezy zależnej od receptora VEGFR2, ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną ilością tego receptora. W terapii wykorzystuje się leki dwudomenowe – jedna domena kognitywna – rozpoznająca VEGFR, druga – efektorowa – indukująca apoptozę [113].

Wymienione powyżej metody działania terapeutycznego prowadzą do zahamowania angiogenezy co skutkuje blokowaniem rozwoju nowotworu. Jednakże hamowanie angiogenezy prowadzi do niekorzystnych skutków takich jak zaburzenie gojenia się ran czy tworzenia łożyska. Problemem jest także ich toksyczność w stosunku do układu krwiotwórczego, bowiem hamowanie angiogenezy zaburza procesy fizjologiczne tworzenia komórek szpikowych czy hematopoezę. Długotrwała terapia antyangiogenna może uszkadzać sieć naczyń krwionośnych, a powstające niedotlenienie i obniżone pH mogą stymulować wzrost i inwazyjność komórek nowotworowych [107].

## 7. Podsumowanie

Analiza bogatej literatury dotyczącej patogenezy nowotworów śródczaszkowych wskazuje, że zjawisko angiogenezy stanowi jeden z ważnych mechanizmów odpowiedzialnych za obraz kliniczny, postęp choroby oraz rokowanie i śmiertelność wśród chorych. Dużo badań poświęcono ocenie patologii unaczynienia mózgu zależnej od tzw. angiogenezy nowotworowej. W badaniach wykorzystano techniki immunoenzymatyczne, które pozwoliły na wykazanie ekspresji parametrów stanowiących układ VEGF/receptory VEGF stacjonarne/receptory VEGF krążące w strukturach guzów. Technika PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) umożliwiła identyfikację w komórkach guzów obecności mRNA VEGF, co dowodzi, że guzy śródczaszkowe syntetyzują białko VEGF, które w znacznej mierze odpowiada za zmianę fazy awaskularnej w fazę naczyniową rozwoju guza. Wykazano, że formy krążące receptorów VEGF-A- sVEGFR1 i sVEGFR2 posiadają właściwości hamowania proliferacji naczyń w czasie neoangiogenezy.

W dostępnej literaturze znaleziono także prace poświęcone badaniu stężeń we krwi VEGF o właściwościach proangiogennych i krążących receptorów sVEGFR1 i sVEGFR2, co pozwala ocenić najważniejszy obecny we krwi układ potencjalnie proangiogeny odpowiedzialny za angiogenezę nowotworową. Rozbieżność w uzyskanych wynikach i różna ich interpretacja dają podstawy do badań stężenia VEGF-A i jego krążących receptorów jako parametrów biochemicznych progresji choroby nowotworowej.

## 8. Cel pracy

Celem pracy była ocena potencjału angiogennego na podstawie pomiaru stężenia VEGF-A oraz jego krążących receptorów w osoczu i w tkance guza osób chorych na nowotwory śródczaszkowe.

### Cele szczegółowe to zbadanie:

1. Czy stężenie VEGF-A oraz receptorów sVEGFR1 i sVEGFR2 we krwi chorych na guzy śródczaszkowe różni się od stężenia tych czynników u osób zdrowych?
2. Porównanie stężenia VEGF oraz jego krążących receptorów w osoczu oraz tkance guza w grupie chorych,
3. Zbadanie stężenia tych czynników w poszczególnych typach nowotworów: glejaki, oponiaki, guzy przerzutowe,
4. Czy zastosowanie dwóch parametrów angiogenezy w postaci współczynników sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A pozwoli na pomiar potencjału angiogennego w poszczególnych typach nowotworów śródczaszkowych?



## 9. Materiał kliniczny i metody

Badaniami objęto 69 osób (45 kobiet i 24 mężczyzn) chorych w wieku od 20 do 80 lat, (średnia 61,6 lat) leczonych operacyjnie w powodu guzów śródczaszkowych w Oddziale Neurochirurgii Szpitala Uniwersyteckiego Nr 2 w Bydgoszczy. Wśród badanych próbek znajdował się materiał od 21 chorych na glejaki – wyróżniono grupę chorych z glejakami o niskim stopniu zaawansowania (I i II – 5 osób) oraz o wysokim stopniu zaawansowania (III i IV – 16 osób), 18 osób chorych na oponiaki (I stopień) i od 30 chorych z guzami przerzutowymi (III i IV stopień). Szczegółowe dane kliniczne przedstawiono w tabeli 3 (str. 35)

Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników w wieku od 20–55 lat, (średnia 51,3 lat), negujących w wywiadzie występowanie chorób nowotworowych.

Materiał do badań osób chorych stanowiła krew oraz tkanka guza. Pobrania dokonano zgodnie z procedurą pobierania krwi obowiązującą w Oddziale Neurochirurgii Szpitala Uniwersyteckiego Nr 2 w Bydgoszczy. Krew uzyskano od chorych na śródczaszkowe nowotwory oraz od osób zdrowych podczas bezpośredniego nakłucia żyły odłokciowej, po uprzednim zdezynfekowaniu skóry, używając próżniowego systemu do pobierania krwi Vacuette® firmy Greiner Bio-One. Krew żylną pobrano do plastikowych probówek z EDTA oraz do probówki nie zawierającej żadnego antykoagulantu. W celu uzyskania osocza próbki krwi pobrane na EDTA wirowano przez 20 min. przy prędkości 3000 obrotów na minutę. W celu uzyskania surowicy próbki krwi pobrane na skrzep wirowano 15 min. przy prędkości 1600 obrotów na minutę. Wycinek tkanki guza uzyskano podczas operacji usunięcia nowotworu, który zamrożono w ciekłym azocie przed wykonywaniem testów. Sporządzono homogenat. W grupie kontrolnej dokonano oznaczenia stężenia badanych czynników tylko w osoczu krwi i surowicy.

W badanym materiale (osocze, homogenat guza, surowica) oznaczono stężenia badanych parametrów angiogenezy przy pomocy techniki ELISA jak:

- 1) naczyniowo–śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF-A za pomocą zestawu Quantikine® ELISA Human VEGF firmy R&D Systems,
- 2) rozpuszczalny receptor 1 naczyniowo–śródbłonkowego czynnika wzrostu sVEGFR1 za pomocą zestawu Quantikine® ELISA Human sVEGF R1/Flt-1 firmy R&D Systems,

3) rozpuszczalny receptor 2 naczyńnowo–śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGFR2 przy użyciu zestawu Quantikine® ELISA Human sVEGF R2/KDR/Flk-1 firmy R&D Systems.

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) jest to immunoenzymatyczny test przeznaczony do oznaczania białek takich jak przeciwciała czy antygeny. Zasada działania testu opiera się na tworzeniu wiązań pomiędzy antygenem a przeciwciałem, które uwidacznia reakcja barwna. Reakcja barwna zachodzi dzięki skoniugowanym z immunoglobulinami enzymom i odpowiednim substratom [114]. Wyniki przedstawiono najpierw w pg/ml, a następnie przeliczono na 1 mg białka (pg/mgP).

4) Ponadto oznaczono stężenie białka w surowicy krwi i w homogenacie guza wyrażone w mg/ml.

Oznaczenia wykonano w Pracowni Zaburzeń Hemostazy Katedry Patofizjologii Collegium Medicum w Bydgoszczy. Osoby badane zostały poinformowane o celu badania oraz wyraziły zgodę na pobranie krwi i wykonanie badania.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy numer: KB 596/2016. Kopia zgody Komisji Bioetycznej została dołączona do niniejszej rozprawy w formie załącznika nr KB 596/2016 na stronie 111.

## **9.1 Wykonanie oznaczeń**

### **9.1.1 Stężenie VEGF-A**

Pomiar stężenia VEGF-A<sub>165</sub> wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA. Do oznaczenia wykorzystano test Quantikine® ELISA Human VEGF firmy R&D Systems.

Przygotowano odczynniki, standardy i próby badane wg zaleceń producenta. Do wszystkich studzienek pomiarowych dodano po 100 µl buforu i do odpowiednich studzienek pomiarowych po 100 µl standardów oraz prób badanych. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, po czym przemyto studzienki trzykrotnie buforem myjącym (400 µl buforu). Nadmiar buforu myjącego usunięto poprzez osuszenie płytki na bibule papierowej. Następnie dodano po 200 µl koniugatu do każdej studzienki i inkubowano płytkę w temperaturze pokojowej przez kolejne 2 godziny. Przemyto studzienki trzykrotnie

buforem myjącym (400 µl buforu), a nadmiar buforu myjącego usunięto poprzez osuszenie płytki na bibule papierowej. Dodano 200 µl substratu do każdej studzienki, inkubowano płytkę w temperaturze pokojowej przez 25 minut bez dostępu światła, po czym dodano 50 µl kwasu siarkowego w celu zatrzymanie reakcji barwnej. Dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm w ciągu 30 minut.

Wyniki odczytano z wykresu kalibracyjnego.

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta: 0 – 115 pg/ml

### **9.1.2 Stężenie sVEGFR1**

Pomiar stężenia sVEGFR-1 wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA. Do oznaczania sVEGFR-1 wykorzystano test Quantikine® ELISA Human sVEGF R1/Flt-1 firmy R&D Systems.

Przygotowano odczynniki, standardy i próby badane wg zaleceń producenta. Do wszystkich studzienek pomiarowych dodano po 100 µl buforu i do odpowiednich studzienek pomiarowych po 100 µl standardów oraz prób badanych. Dalej postępowano jak w punkcie 9.1.1 str. 33.

Wyniki odczytano z wykresu kalibracyjnego.

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta: 55 – 123 pg/ml.

### **9.1.3 Stężenie sVEGFR2**

Pomiar wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA. Do oznaczania sVEGFR-2 wykorzystano test Quantikine® ELISA Human sVEGF R2/KDR/Flk-1 firmy R&D Systems.

Przygotowano odczynniki, standardy i próby badane wg zaleceń producenta. Do wszystkich studzienek pomiarowych dodano po 100 µl buforu i do odpowiednich studzienek pomiarowych po 100 µl standardów oraz prób badanych. Dalej postępowano jak w punkcie 9.1.1 str. 33.

Wyniki odczytano z wykresu kalibracyjnego.

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta: 6635 – 13553 pg/ml.

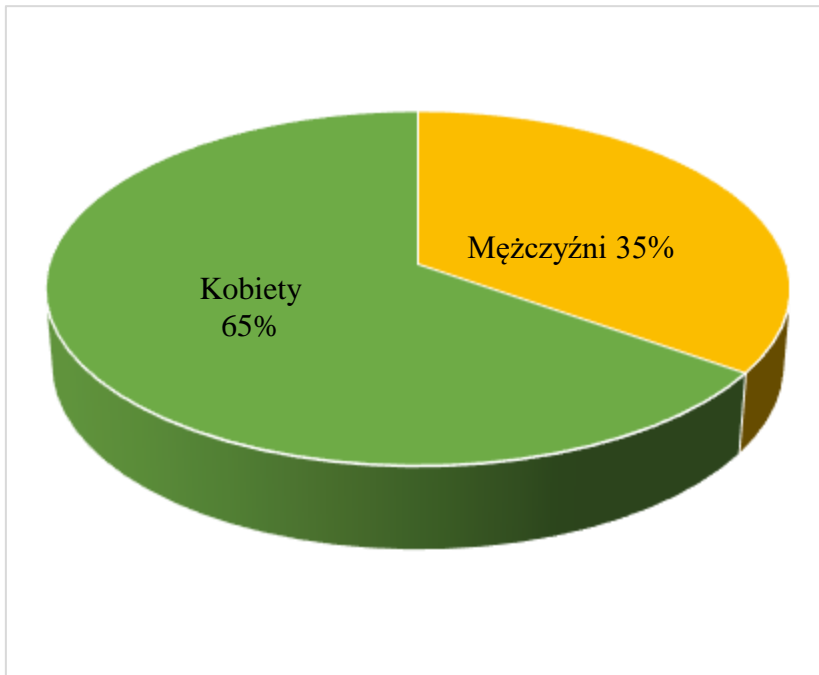
### **9.1.4 Stężenie białka**

## 9.2 Charakterystyka grupy badanej

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna chorych z guzami śródczaszkowymi.

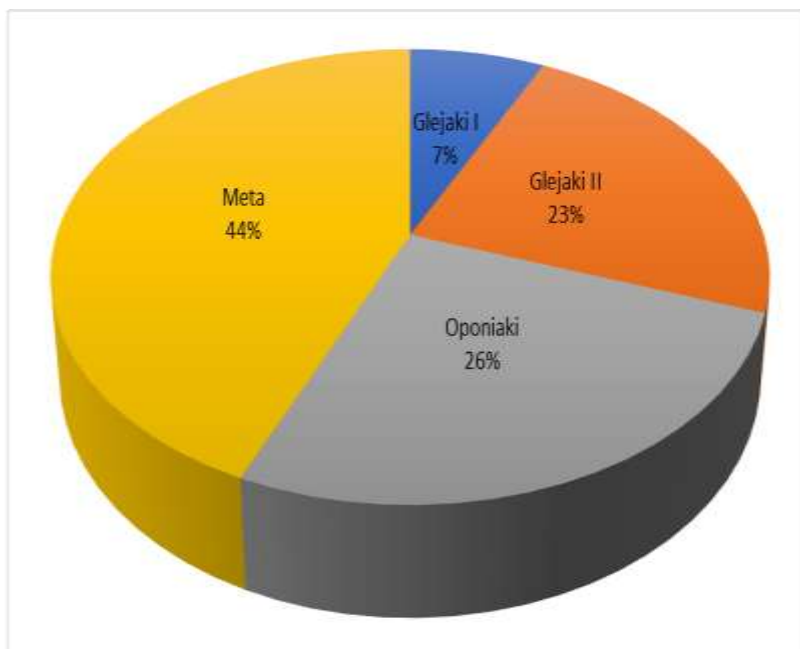
Rodzaj guza (stopień zaawansowania)	LGG (GI) Glejaki (I i II)	HGG (GII) Glejaki (III i IV)	Oponiaki M (I)	Przerzuty Meta (III i IV)
Liczba pacjentów M–mężczyźni, K–kobiety	5 M–3 K–2	16 M–6 K–10	18 M–2 K–16	30 M–13 K–17
Wiek w latach (średnia)	49,75	62,9	58,33	64,7
Stopień złośliwości (I, II, III, IV)	II–5	III–3 IV–13	I–18	III, IV
Lokalizacja guza (N) nadnamiotowo (P) podnamiotowo	N–1 P–4	N–5 P–11	N–15 P–3	N–22 P–8
Półkula mózgu w guzach nadnamiotowych (P) Prawa (L) Lewa (M) Miedzynamiotowo	P–2 L–3	P–8 L–7	P–7 L–10 M–1	P–11 L–11

LGG- Low Grade Glioma (GI) – glejaki o niskim stopniu zaawansowania, HGG – High Grade Glioma (GII) – glejaki o wysokim stopniu zaawansowania, M – Meningioma – oponiaki, Meta – Metastatic tumors – guzy przerzutowe



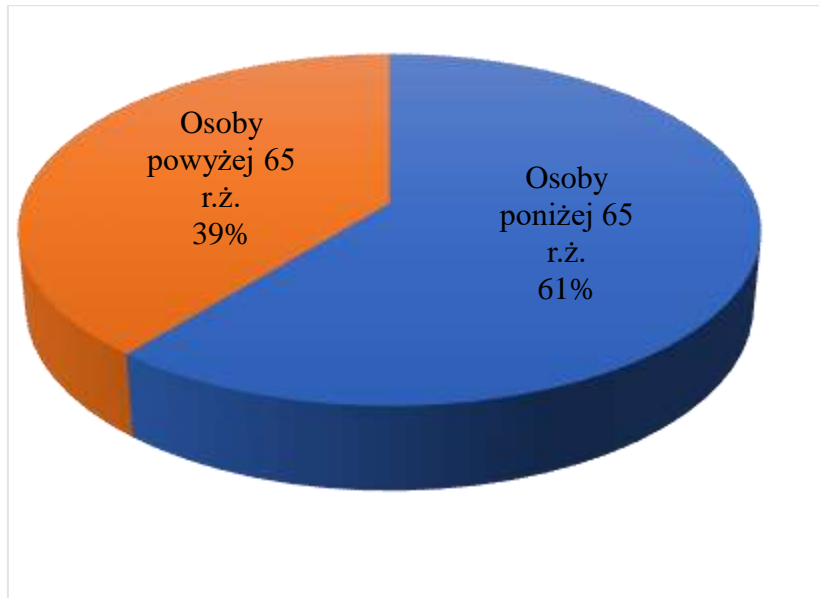
Ryc.2 Podział grupy badanej ze względu na płeć.

Kobiety stanowiły 65% (n=45), a mężczyźni (n=24) 35% wśród osób badanych.



Ryc.3 Podział grupy badanej ze względu na typ histopatologiczny guza.

Wśród badanych chorych glejaki o niskim stopniu zaawansowania GI, n=5 stanowiły (7,2%), o wysokim GII, n=16 (23,2%), oponiaki n=18 (26,1%), a guzy przerzutowe – meta, n=30 (43,5%).



Ryc.4 Podział grupy badanej ze względu na wiek.

W badanej grupie chorych na nowotwory śródczaszkowe przeważały osoby młodsze (poniżej 65 r.ż), których było 61% (n=42) oraz osoby w wieku powyżej 65 r.ż., których było 39% (n=27).

### 9.3 Metody wnioskowania statystycznego

Zgodność rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym analizowano testem Shapiro – Wilka. Badane parametry nie były zgodne z rozkładem normalnym, dlatego wyniki przedstawiono przy pomocy mediany i kwartyli.

Obliczono podstawowe miary położenia i zmienności badanych zmiennych. Ze względu na brak rozkładu normalnego w badanych podgrupach, analizy przeprowadzono w oparciu o testy nieparametryczne tj. w porównaniach 2 grup niezależnych wykorzystano test U Manna – Whitneya, powyżej 2 grup test Kruskala – Wallisa wraz z testami wielokrotnych porównań. Natomiast analizując układ dla par zależnych – test Wilcoxon. W analizach przyjęto poziom istotności  $p < 0,05$ .

Wykorzystano pakiet statystyczny Statistica 10.

STATSOFT, INC. (2011). STATISTICA (DATA ANALYSIS SOFTWARE SYSTEM), VERSION 10.  
WWW.STATSOFT.COM

## 10. Wyniki

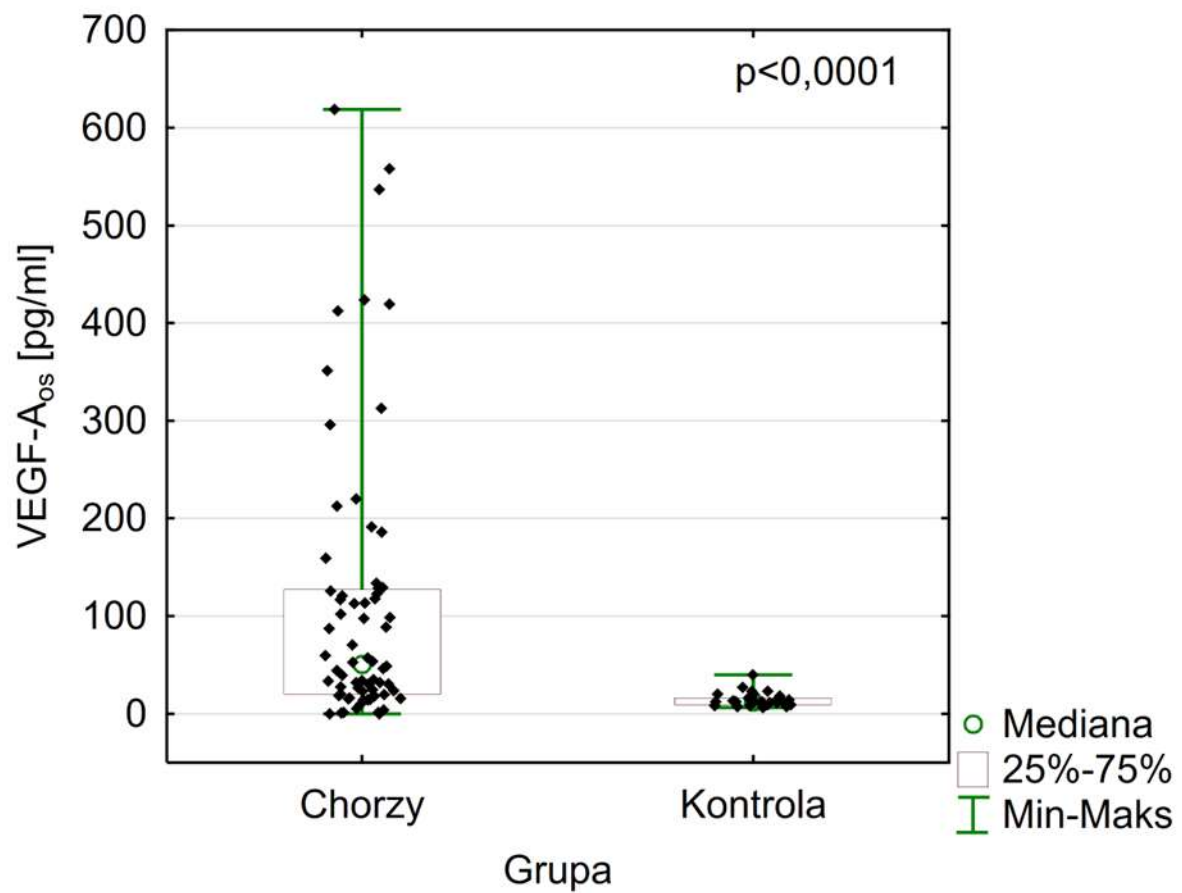
Tabela 4. Stężenie badanych parametrów w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=30).

Badany parametr (jednostka)	Chorzy n=69	Kontrola n=30	p
	Me (Q1-Q3)		
VEGF-A (pg/ml)	50,88 (19,98-127,21)	12,13 (9,18-16,07)	<0,0001
sVEGFR1 (pg/ml)	144,61 (110,03-264,66)	124,80 (71,30-169,40)	<0,05
sVEGFR2 (pg/ml)	6 472,53 (5082,90-8394,35)	11 216,16 (9824,29-13533,42)	<0,0001

Stężenie VEGF-A w osoczu w grupie badanej jest około 4 razy większe od stwierdzonego w grupie kontrolnej. Stężenie sVEGFR1 w grupie badanej i kontrolnej różni się istotnie ( $p < 0,05$ ) przy wyższym stężeniu u chorych sVEGFR1 niż u osób zdrowych. Stężenie sVEGFR2 w grupie badanej jest około 2 razy mniejsze od stężenia w grupie kontrolnej, a różnica statystycznie istotna ( $p < 0,0001$ ).

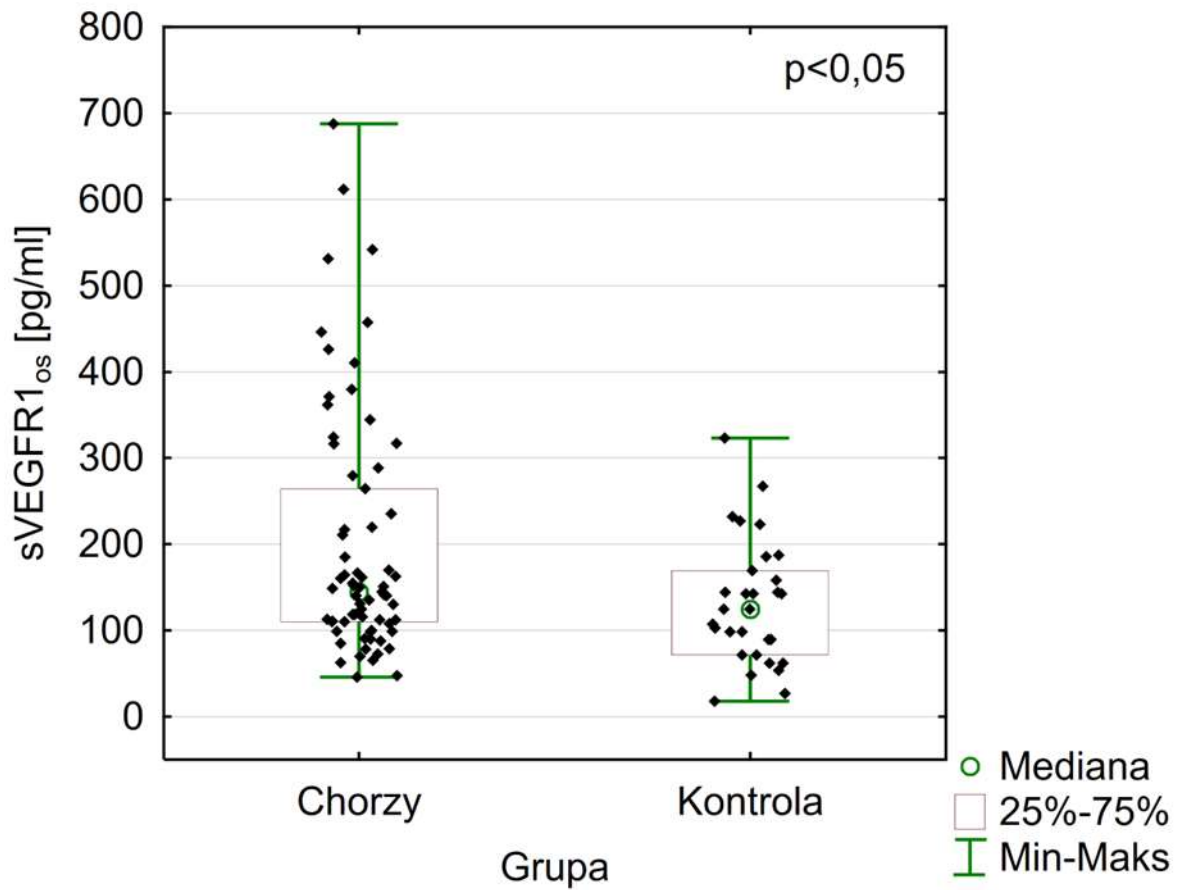
Na kolejnych rycinach przedstawiono uzyskane wyniki badanych parametrów.





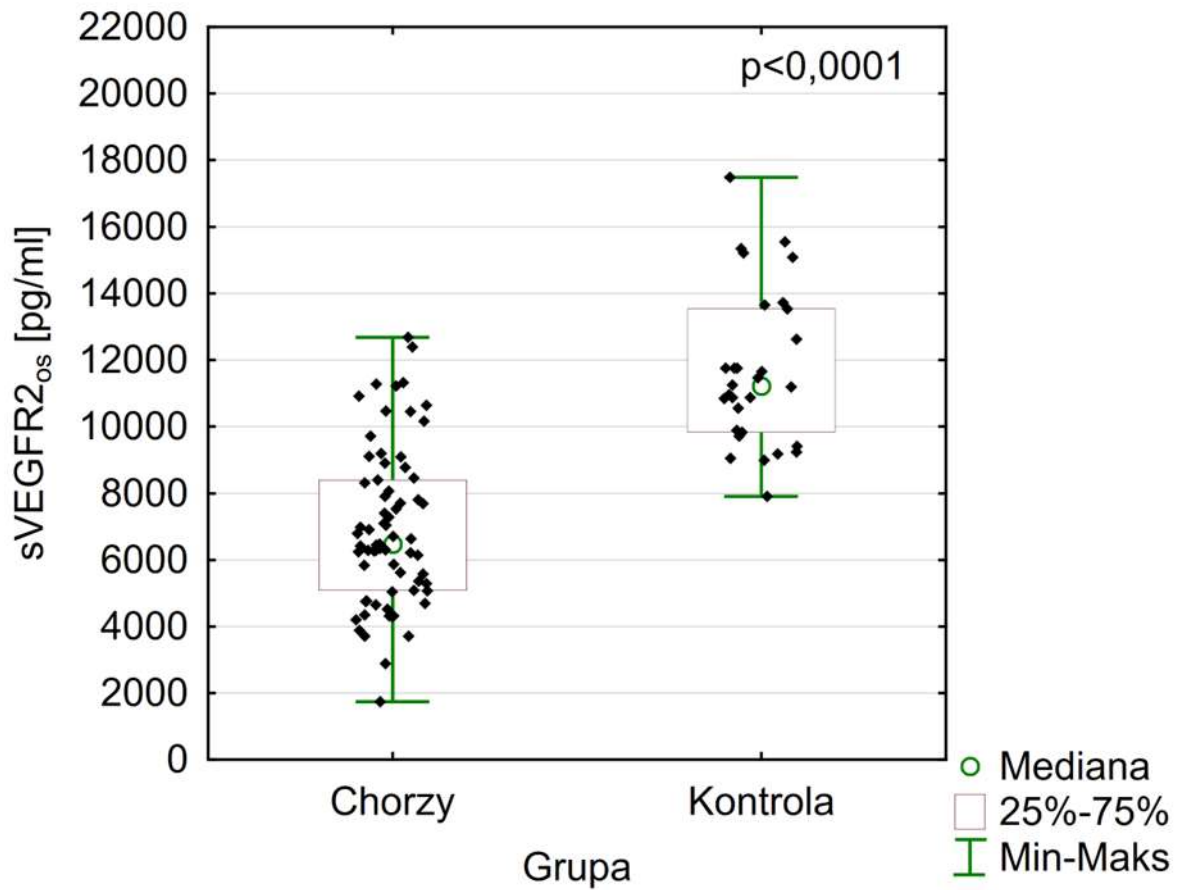
Ryc.5 Stężenie VEGF-A w osoczu w grupie osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie VEGF-A w osoczu krwi chorych, gdzie uwagę zwraca duży rozrzut uzyskanych wartości indywidualnych ( $p < 0,0001$ ).



Ryc.6 Stężenie sVEGFR1 w osoczu osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie sVEGFR1 w osoczu krwi osób chorych ( $p < 0,05$ ).



Ryc.7 Stężenie sVEGFR2 w osoczu osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

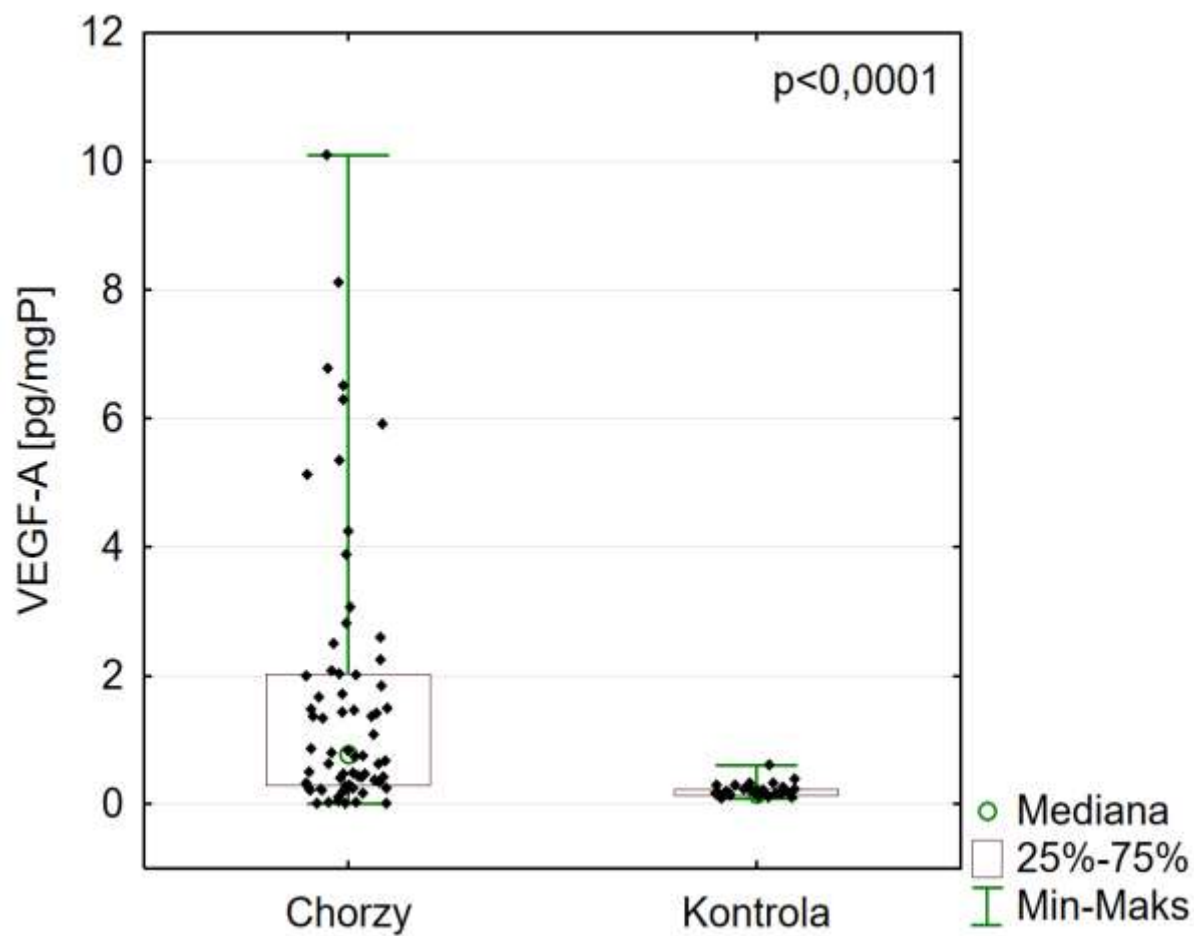
W osoczu krwi chorych stwierdzono istotnie niższe stężenie sVEGFR2 ( $p < 0,0001$ ) niż w grupie kontrolnej.

Tabela 5. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (pg/mgP).

Badany parametr (jednostka)	Chorzy osocze n=69	Kontrola osocze n=30	p
	Me (Q1-Q3)		
VEGF-A (pg/mgP)	0,80 (0,30-2,03)	0,17 (0,13-0,23)	<0,0001
sVEGFR1 (pg/mgP)	2,17 (1,52-3,83)	1,78 (1,02-2,42)	0,0097
sVEGFR2 (pg/mgP)	100,06 (78,39-125,36)	160,23 (140,35-193,33)	<0,0001

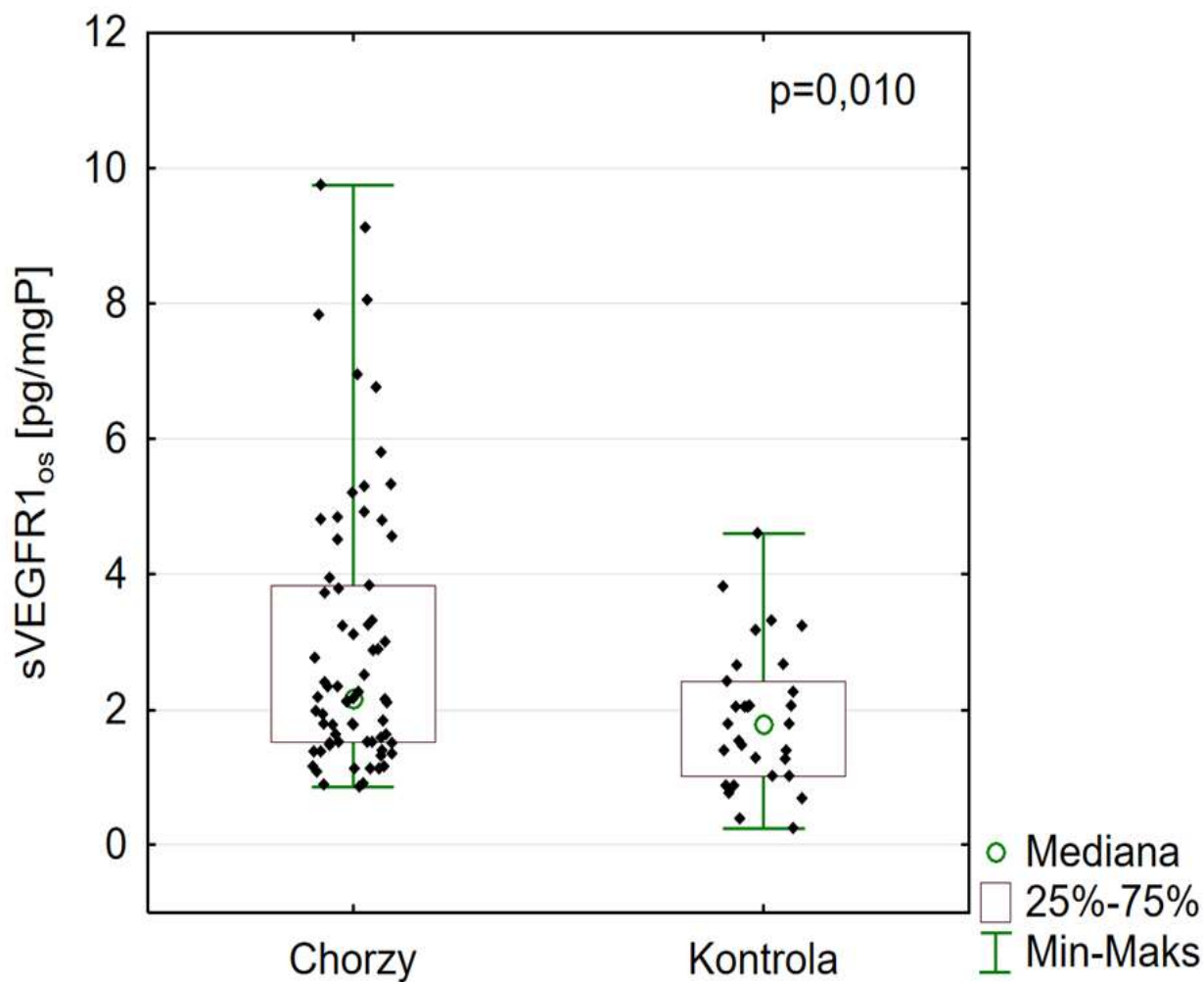
Stężenie VEGF-A w osoczu osób chorych było około 4 razy, a stężenie sVEGFR1 około 1,5 razy większe niż w grupie kontrolnej, natomiast stężenie sVEGFR2 było około 40% niższe w osoczu osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzone różnice były istotne statystycznie.

Na kolejnych rycinach zilustrowano uzyskane wyniki.



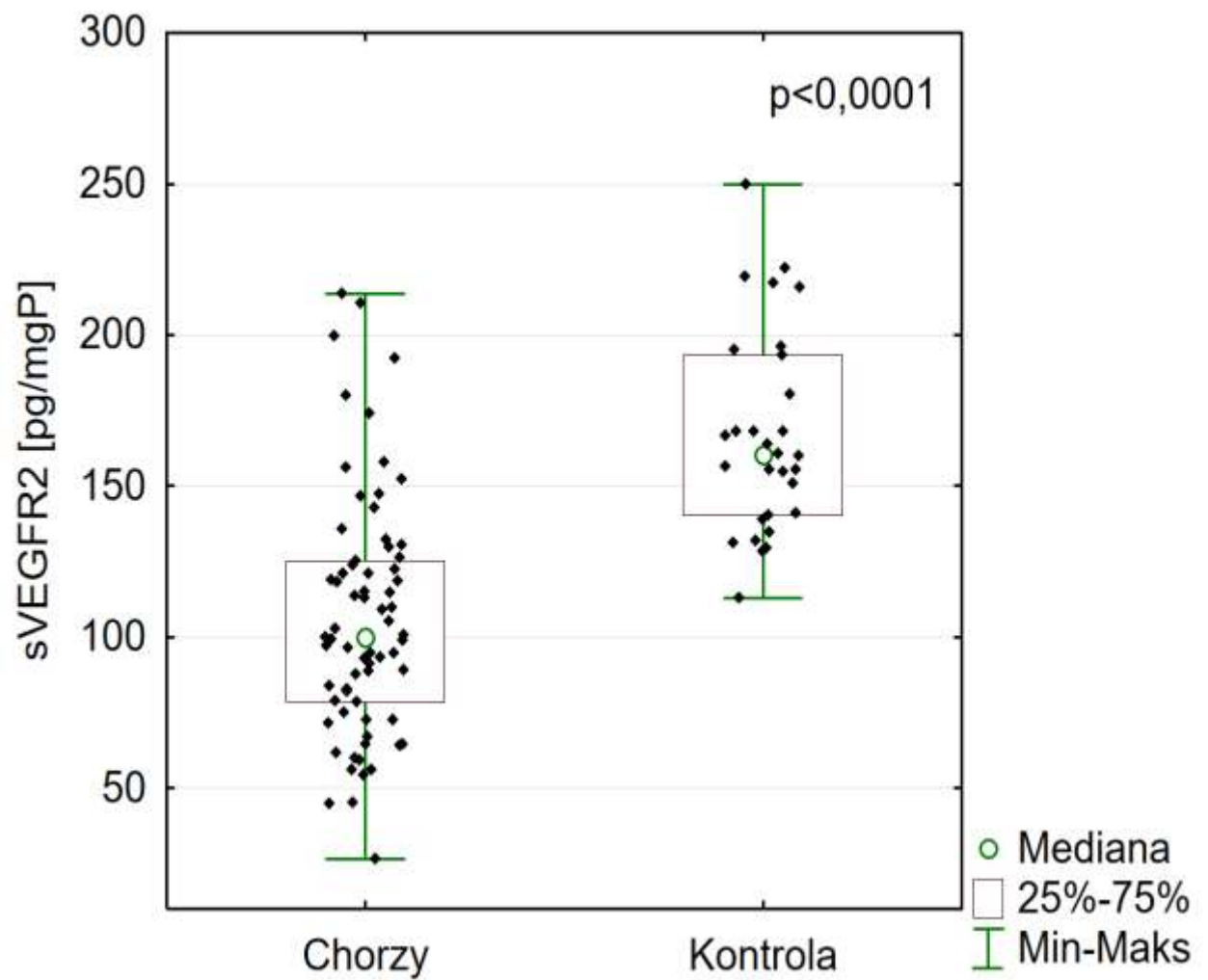
Ryc.8 Stężenie VEGF-A wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Stwierdzono, że stężenie VEGF-A wyrażone na 1 mg białka było istotnie wyższe we krwi chorych niż u osób zdrowych ( $p < 0,0001$ ).



Ryc. 9 Stężenie sVEGFR1 wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Stężenie sVEGFR1 po przeliczeniu na 1 mg białka było istotnie wyższe w osoczu krwi chorych niż u osób zdrowych ( $p=0,01$ ).



Ryc.10 Stężenie sVEGFR2 wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Stężenie sVEGFR2 po przeliczeniu na 1 mg białka było istotnie statystycznie niższe we krwi chorych w porównaniu z osobami zdrowymi ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 6. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu oraz homogenacie od osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69).

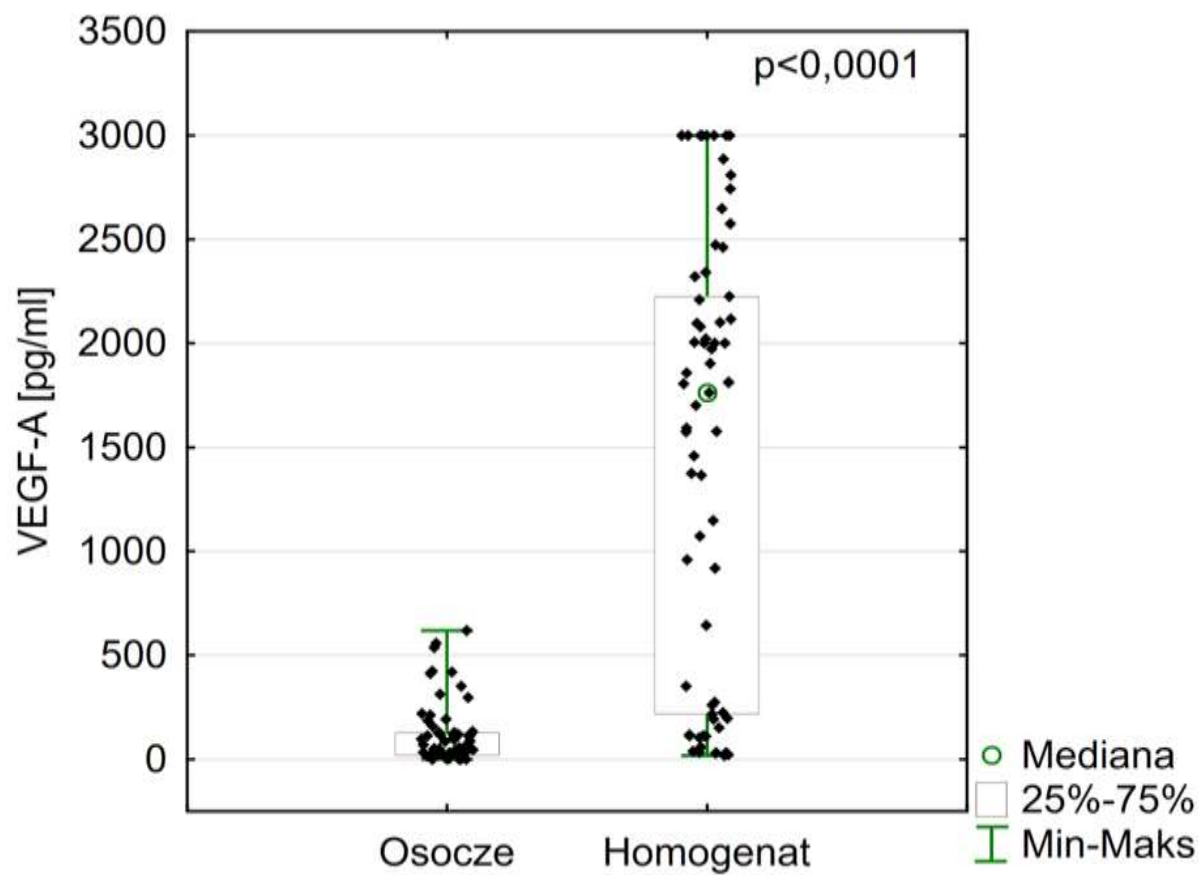
Badany parametr (jednostka)	Osocze	Homogenat	p
	Me (Q1-Q3)		
VEGF-A (pg/ml)	50,88 (19,98-127,21)	1785,34 (207,91-2272,61)	<0,0001
sVEGFR1 (pg/ml)	144,61 (110,03-264,66)	524,77 (287,66 -955,82)	<0,0001
sVEGFR2 (pg/ml)	6472,52 (5082,90-8394,35)	340,24 (228,97-780,00)	<0,0001

W tabeli pokazano stężenia badanych parametrów angiogenezy we krwi oraz homogenatach guzów chorych.

Stężenie VEGF-A w homogenacie tkanki guza osób chorych jest około 35 razy większe niż w osoczu, stężenie sVEGFR1 w homogenacie jest około 4 razy większe, natomiast stężenie sVEGFR2 w homogenacie tkanki jest około 19 razy mniejsze niż w osoczu. Różnice są statystycznie istotne przy  $p < 0,0001$ .

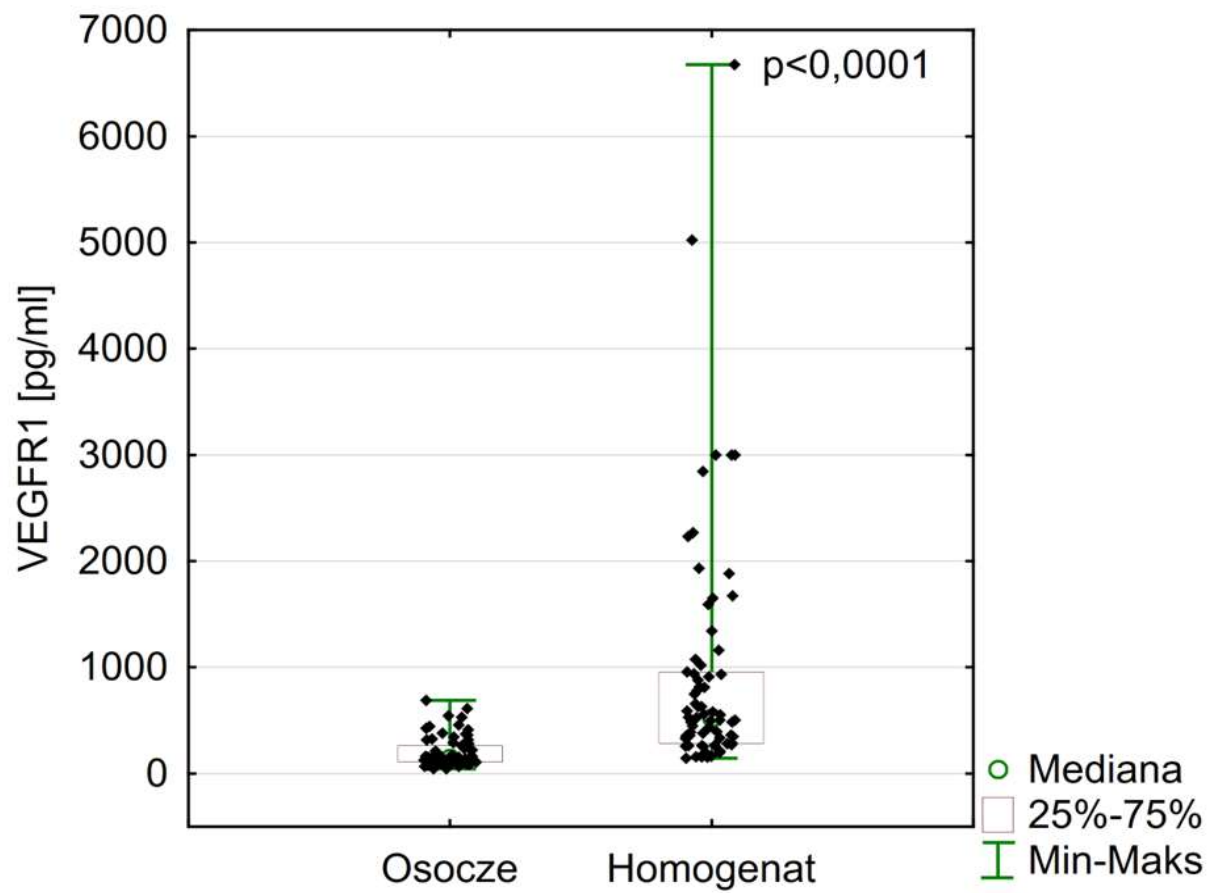
Na kolejnych rycinach zilustrowano zaobserwowane istotne różnice.





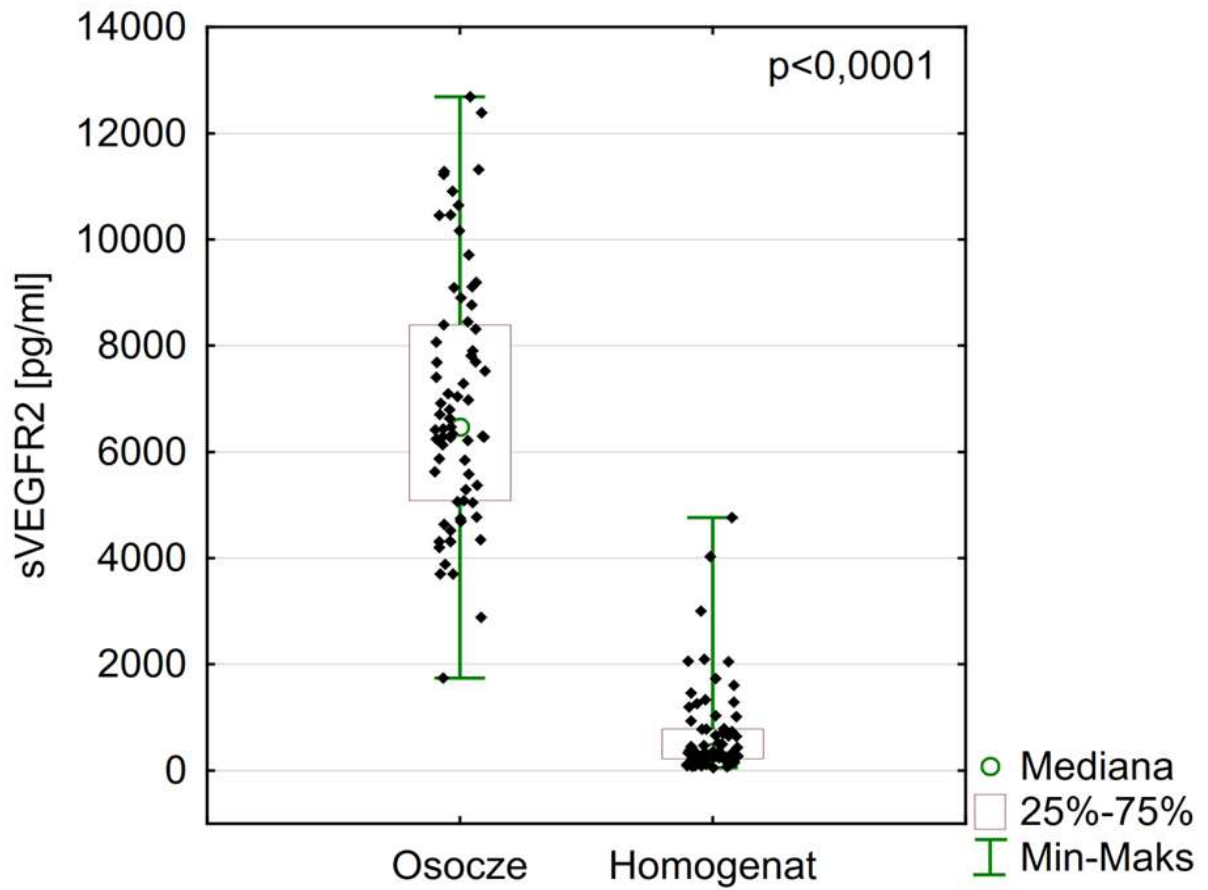
Ryc.11 Stężenie VEGF-A w osoczu oraz homogenacie guza osób chorych.

Zaobserwowano istotnie wyższe stężenia VEGF-A w homogenacie tkanki guza (35 krotnie) niż w osoczu krwi chorych ( $p < 0,0001$ ).



Ryc.12 Stężenie sVEGFR1 w osoczu oraz tkance guza osób chorych na guzy śródczaszkowe.

Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie sVEGFR1 w homogenacie tkanki guza (4 krotnie) niż w osoczu krwi osób chorych ( $p < 0,0001$ ).



Ryc.13 Stężenie sVEGFR2 w osoczu oraz homogenacie guza osób chorych.

Zanotowano stężenie sVEGFR2 istotnie niższe w homogenacie guza (19 krotnie) niż w osoczu ( $p < 0,0001$ ).

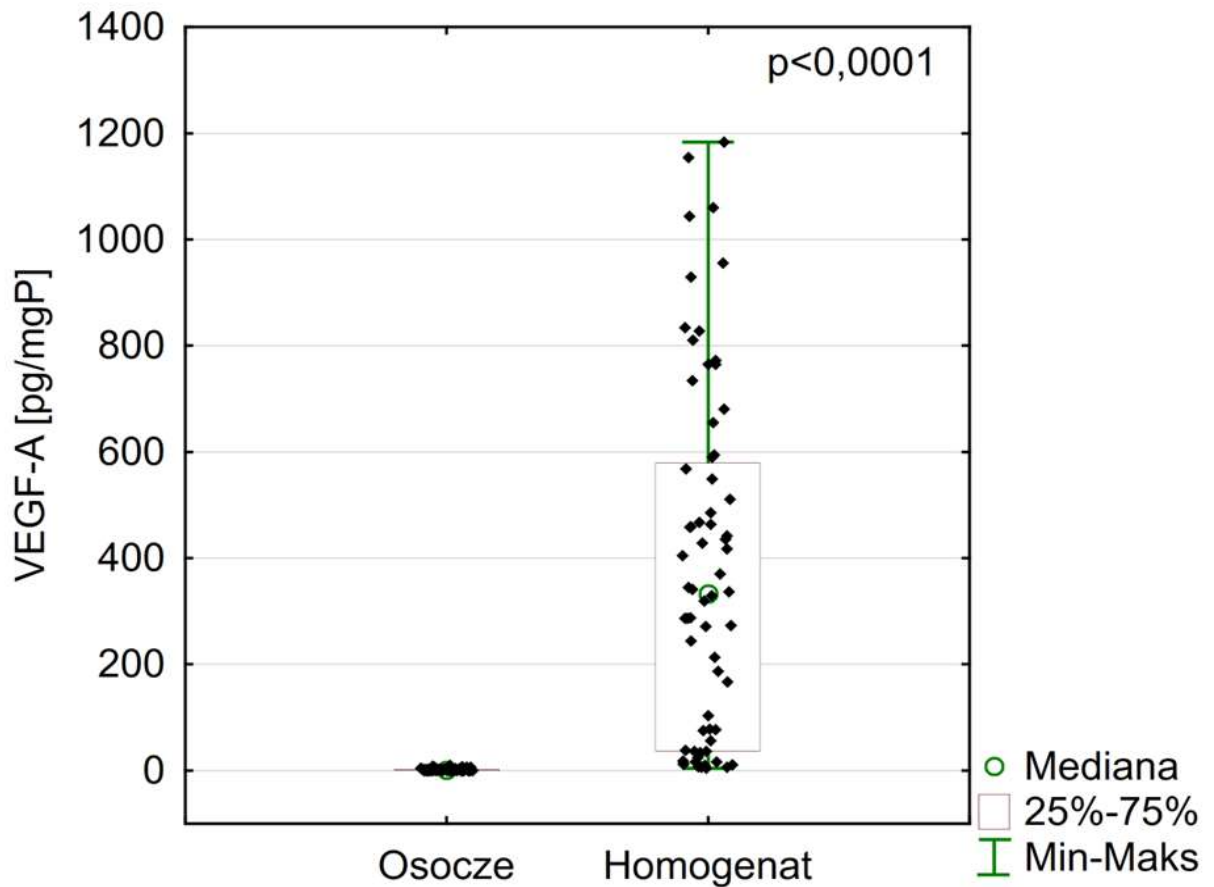
Tabela 7. Stężenie badanych parametrów w osoczu krwi i homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (pg/mgP).

Badany parametr (jednostka)	Osocze	Homogenat	p
	Me (Q1-Q3)		
VEGF-A pg/mgP	0,80 (0,30-2,027)	337,08 (37,60-567,98)	<0,0001
sVEGFR1 pg/mgP	2,17 (1,52-3,83)	136,39 (78,61-275,62)	<0,0001
sVEGFR2 pg/mgP	100,06 (78,39-125,36)	80,67 (41,89-231,39)	0,257

Zaobserwowano statystycznie istotne różnice stężenia VEGF-A oraz sVEGFR1 w osoczu i homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe.

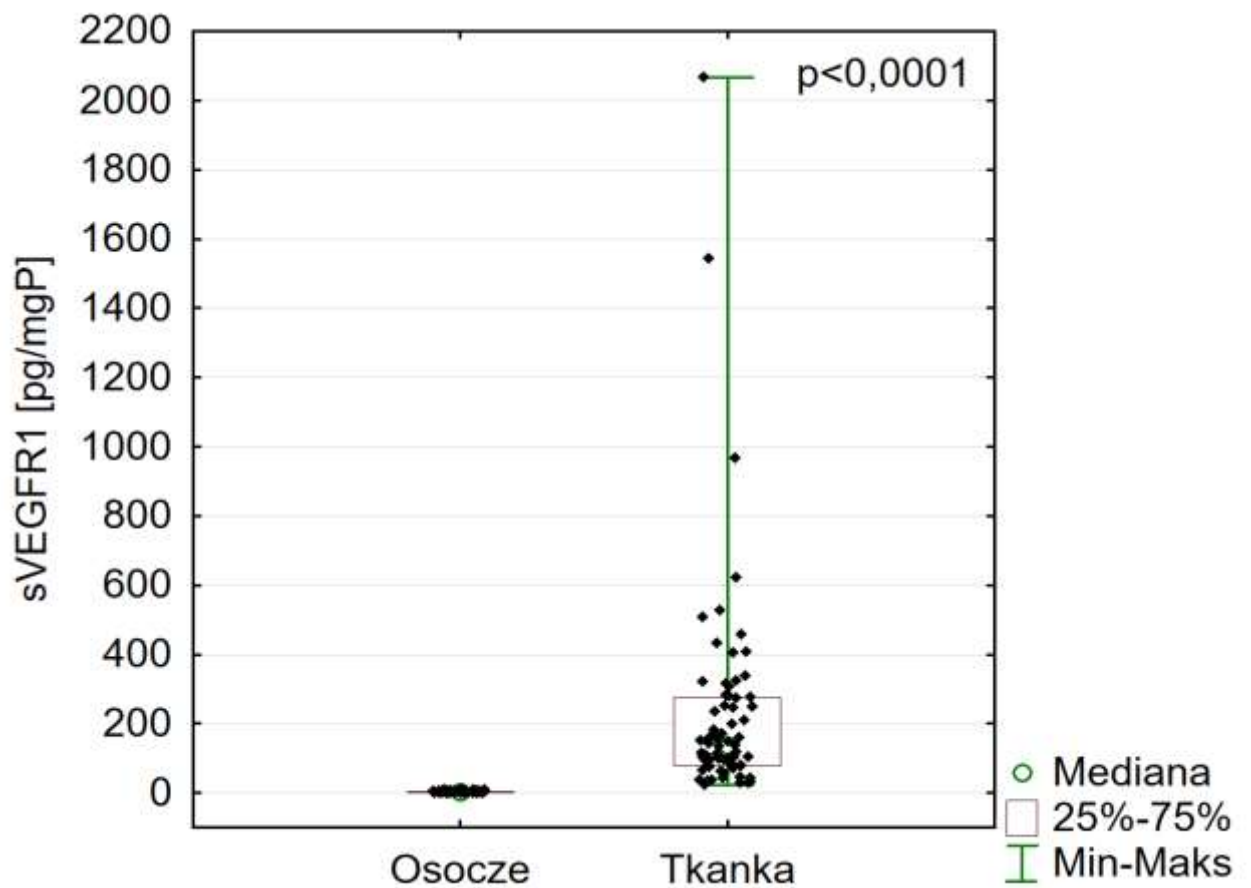
Stężenie VEGF-A wyrażone w pg/mgP w homogenacie tkanki guza w grupie badanej jest około 400 razy, stężenie sVEGFR1 około 60 razy większe niż w osoczu chorych, a sVEGFR2 o około 20 % mniejsze niż w osoczu badanych chorych.

Na kolejnych rycinach przedstawiono statystycznie istotne różnice stężenia badanych parametrów angiogenezy w osoczu i homogenacie guzów osób chorych po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).



Ryc.14 Stężenie VEGF-A w osoczu oraz homogenacie w grupie osób chorych po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Zanotowano istotnie wyższe stężenie VEGF-A w homogenacie tkanki guza niż w osoczu krwi chorych ( $p < 0,0001$ ). Zwraca uwagę duży rozrzut indywidualnych wartości VEGF-A w homogenacie. Stężenie VEGF-A w homogenacie było 400 krotnie wyższe niż w osoczu.



Ryc.15 Stężenie sVEGFR1 w osoczu oraz homogenacie w grupie osób chorych po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Stężenie sVEGFR1 było istotnie wyższe w homogenacie tkanki guza niż we krwi chorych ( $p < 0,0001$ ), około 60 krotnie.

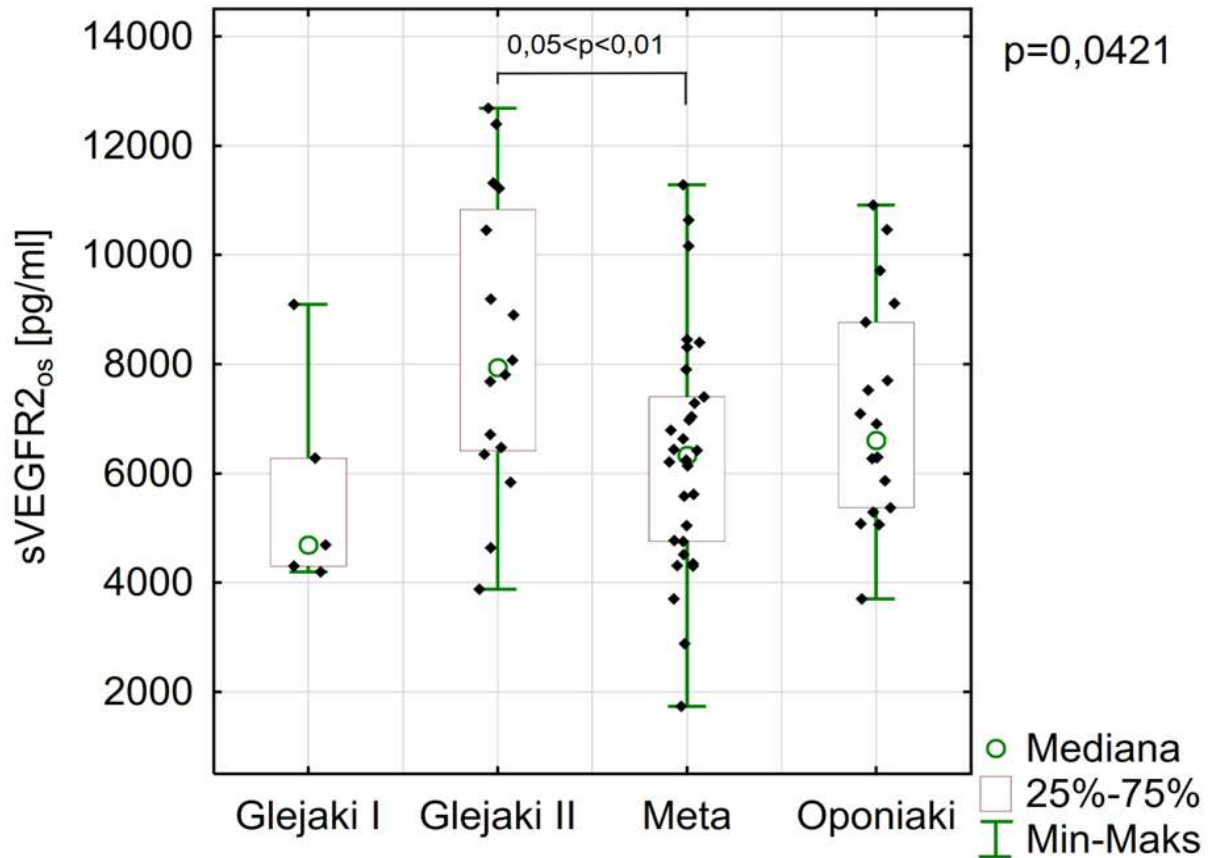
Tabela 8. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na: glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta).

Badany parametr (jednostka)	Glejaki I n=5	Glejaki II n=16	Oponiaki n=18	Meta n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
VEGF-A <sub>os</sub> pg/ml	53,68 (30,63-113,40)	66,27 (19,57-123,30)	94,710 (26,44-351,25)	42,90 (19,81-117,90)	0,6634
sVEGFR1 <sub>os</sub> pg/ml	118,25 (115,68-235,09)	202,50 (110,03-395,26)	150,250 (110,54-219,91)	138,14 (98,65-185,00)	0,6290
sVEGFR2 <sub>os</sub> pg/ml	4691,30 (4308,45-6279,15)	7939,46 (6410,20-10836,90)	6604,310 (5368,63-8770,15)	6330,95 (4749,87-7400,50)	<b>0,0421</b>

Stężenie VEGF-A w osoczu najwyższe jest w oponiakach, najniższe w guzach przerzutowych. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

Stężenie sVEGFR1 najwyższe jest w grupie glejaków o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), a najniższe w grupie glejaków o niskim stopniu zaawansowania I (glejaki I). Nie stwierdzono istotnych różnic.

Najwyższe stężenie sVEGFR2 występuje w grupie glejaków II, najniższe w grupie glejaków I. Przeprowadzona analiza wykazała różnice istotne statystycznie sVEGFR2 pomiędzy poszczególnymi grupami nowotworów (0,0421). Zaobserwowane istotne różnice stężenia sVEGFR2 przedstawiono na ryc.16.



Ryc.16 Stężenie sVEGFR2 w osoczu osób chorych na glejaki I (n=5), glejaki II (n=16), meta (n=30) oraz oponiaki (n=18).

Najwyższe stężenie sVEGFR2 zanotowano w osoczu krwi chorych z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania, najniższe w grupie chorych z glejakami o niskim stopniu zaawansowania. Statystycznie istotnie wyższe stężenie wykazano w grupie chorych z glejakami II w porównaniu do grupy chorych z guzami przerzutowymi ( $0,05 < p < 0,01$ ).



Tabela 9. Badane parametry angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), glejaki o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

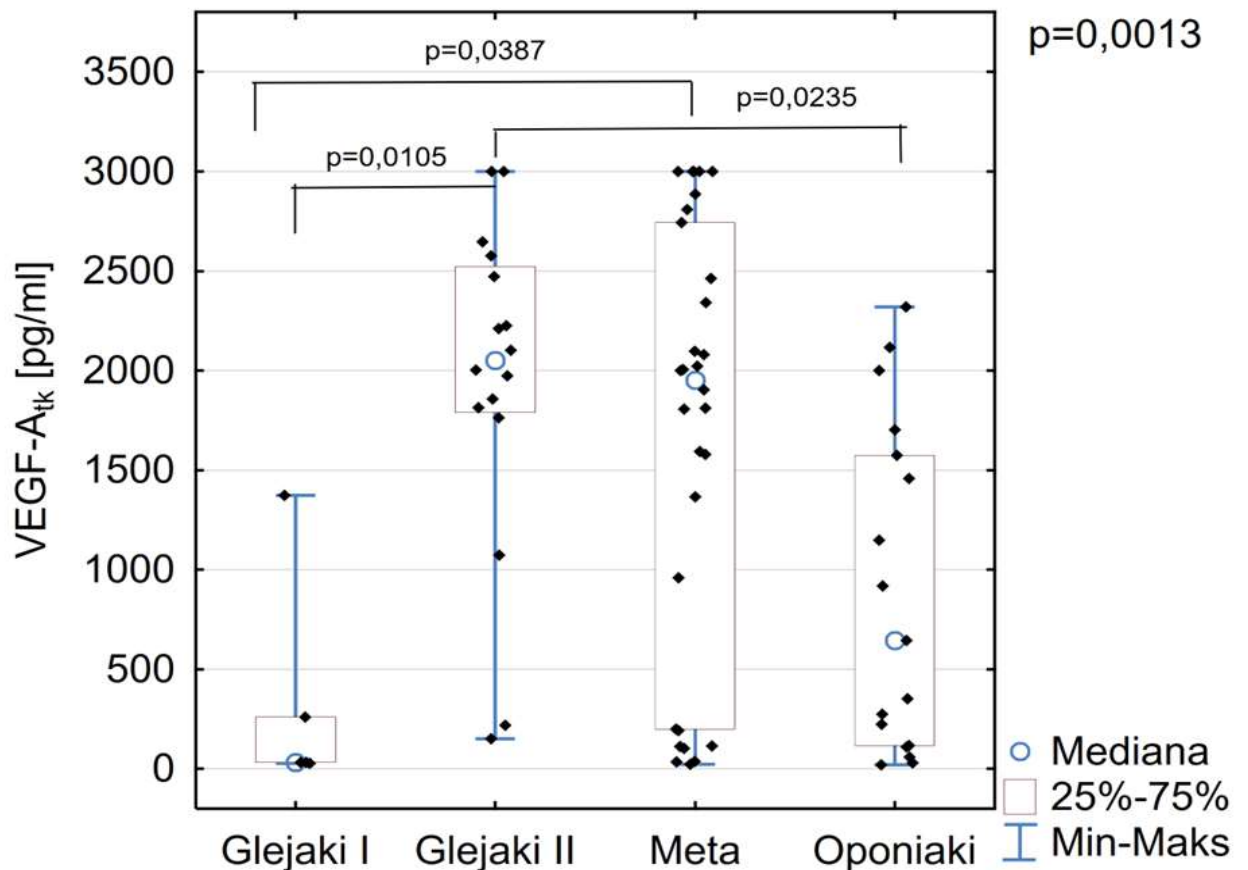
Badany parametr (jednostka)	Glejaki I n=5	Glejaki II n=16	Oponiaki (M) n=18	Meta n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
<b>VEGF-A<sub>os</sub></b> <b>pg/mgP</b>	0,80 (0,40-2,25)	0,94 (0,25-1,74)	1,54 (0,32-5,34)	0,70 (0,30-1,66)	0,6430
<b>sVEGFR1<sub>os</sub></b> <b>pg/mgP</b>	1,79 (1,76-3,32)	2,71 (1,51-5,31)	2,33 (1,63-3,79)	2,11 (1,50-3,23)	0,7884
<b>sVEGFR2<sub>os</sub></b> <b>pg/mgP</b>	72,59 (64,32-82,65)	117,75 (98,47-137,45)	106,23 (78,39-122,2)	94,67 (72,58-118,8)	0,1999

Przeprowadzona analiza stężenia parametrów angiogenezy w osoczu krwi po przeliczeniu na 1 mg białka nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy podgrupami chorych z określonym guzem śródczaszkowym.

Tabela 10. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie guza osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), glejaki o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta).

Badany parametr (jednostka)	Glejaki I n=5	Glejaki II n=16	Oponiaki M n=18	Meta n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
VEGF-A (pg/ml)	32,31 (31,47-260,60)	2051,82 (1787,96-2523,87)	645,19 (118,2-1574,66)	1951,36 (198,6 - 2743,36)	<b>0,0013</b>
sVEGFR1 (pg/ml)	395,23 (158,6-446,85)	669,15 (275,66-2080,01)	493,6 (287,66-881,15)	584,70 (347,12-940,43)	0,2361
sVEGFR2 (pg/ml)	235,75 (175,91-350,66)	343,10 (246,69-783,63)	562,385 (284,75-1256,69)	273,51 (139,7-732,77)	0,1855

Przeprowadzona analiza wykazała różnice istotne statystycznie stężenia VEGF-A pomiędzy poszczególnymi grupami nowotworów (p=0,013). Zaobserwowano różnice istotne statystycznie stężenia VEGF-A w homogenacie guza w grupie osób chorych na glejaki I i glejaki II, a także w grupie glejaki I i guzy przerzutowe. Istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi guzami w zakresie stężenia VEGF-A w homogenatach przedstawiono na kolejnej rycinie (Ryc.17)



Ryc.17 Stężenie VEGF-A w homogenacie u osób chorych na glejaki I (n=5), glejaki II (n=16), meta (n=30) oraz oponiaki (n=18).

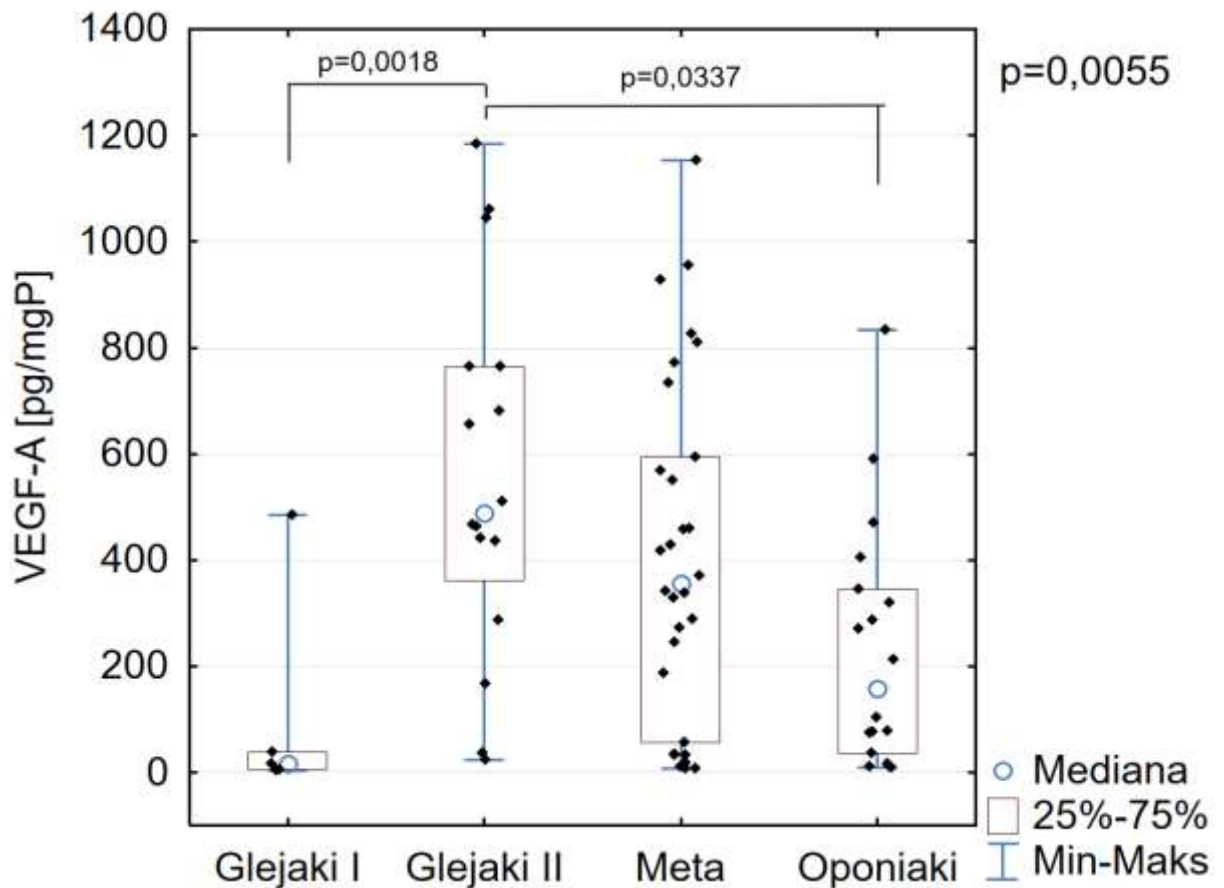
Najwyższe wartości stężenia VEGF-A zanotowano w homogenacie chorych na glejaki o wysokim stopniu zaawansowania (GII) i u chorych z przerzutami do mózgu (meta). Przeprowadzona analiza wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami nowotworów ( $p=0,013$ ).

Stwierdzono, że stężenie VEGF-A w homogenacie guzów glejaków o niskim stopniu zaawansowania jest istotnie niższe niż w homogenacie glejaków o wysokim stopniu zaawansowania ( $p=0,0105$ ) oraz niższe niż w homogenacie guzów przerzutowych ( $p=0,0387$ ). Ponadto zaobserwowano, że stężenie VEGF-A homogenatów z oponiaków jest istotnie niższe od wykazanego w homogenacie glejaków o wysokim stopniu zaawansowania ( $p=0,0235$ ).

Tabela 11. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Badany parametr (jednostka)	Glejaki I n=5	Glejaki II n=16	Oponiaki M n=18	Meta n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
<b>VEGF-A</b> (pg/mgP)	15,73 (5,80- 37,61)	488,72 (361,09- 765,07)	158,04 (36,48-344,72)	355,76 (55,92-594,72)	<b>0,0055</b>
<b>sVEGFR1</b> (pg/mgP)	76,00 (64,48- 84,09)	265,53 (70,47- 397,48)	135,053 (74,50-248,62)	139,599 (99,75±245,43)	0,2172
<b>sVEGFR2</b> (pg/mgP)	51,12 (28,40- 83,31)	79,008 (39,41- 250,33)	107,85 (74,78-413,39)	63,218 (33,75-197,13)	0,1282

Przeprowadzona analiza wykazała różnice istotne statystycznie stężenia VEGF-A pomiędzy poszczególnymi grupami nowotworów ( $p=0,055$ ).



Ryc.18 Stężenie VEGF-A w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I, n=5), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II, n=16), oponiaki (n=18) i guzy przerzutowe (meta, n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Stwierdzono, że stężenie VEGF-A w homogenacie osób chorych na glejaki II jest istotnie wyższe od stwierdzonego w homogenacie glejaków I ( $p=0,0018$ ), a także uzyskanym z oponiaków ( $p=0,0337$ ) (po przeliczeniu na 1 mg białka).

Tabela 12. Współczynniki sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz w grupie kontrolnej.

Współczynnik	Chorzy osocze n=68	Kontrola osocze n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
sVEGFR1/VEGF-A	2,78 (1,135-6,87)	10,01 (6,4375-14,055)	<0,0001
sVEGFR2/VEGF-A	122,81 (37,725-288,3925)	928,35 (632,47-1205,248)	<0,0001

Współczynnik sVEGFR1/VEGF-A w osoczu krwi grupy kontrolnej wynosi 10,1 co oznacza, że we krwi osób zdrowych inhibicja angiogenezy 10 krotnie przewyższa aktywację, a w grupie chorych jest istotnie niższa ( $p < 0,0001$ ) i 2,78 krotnie przewyższa aktywację.

Współczynnik sVEGFR2/VEGF-A we krwi grupy kontrolnej wynosi 928 co wskazuje, że inhibicja 928 razy przewyższa aktywację angiogenezy. U chorych ta inhibicja jest istotnie niższa ( $p < 0,0001$ ), a tylko 123 krotnie przewyższa aktywację angiogenezy.

Tabela 13. Wartości współczynników sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) oraz w grupie kontrolnej (n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Współczynnik	Chorzy osocze n=69	Kontrola osocze n=30	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
sVEGFR1/VEGF-A	0,05 (0,02-0,12)	0,141 (0,09-0,21)	0,0001
sVEGFR2/VEGF-A	1,79 (0,51-8,87)	13,011 (8,80-17,44)	<0,0001

W tabeli pokazano współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A (po przeliczeniu na 1 mg białka).

Współczynnik sVEGFR1/VEGF-A w osoczu osób chorych jest około 3 razy mniejszy od współczynnika w grupie kontrolnej (p=0,0001) natomiast współczynnik sVEGFR2/VEGF-A w osoczu osób chorych jest około 7 razy niższy niż w grupie kontrolnej (p<0,0001). Różnice wartości współczynników są istotne statystycznie.

Porównanie powyższych współczynników po uwzględnieniu stężenia białka wskazuje, że inhibicja tak wyrażona jest istotnie niższa u chorych w porównaniu z grupą kontrolną, 3 krotnie w przypadku sVEGFR1/VEGF-A i 7 krotnie w przypadku sVEGFR2/VEGF-A.

Tabela 14. Wartości współczynników sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

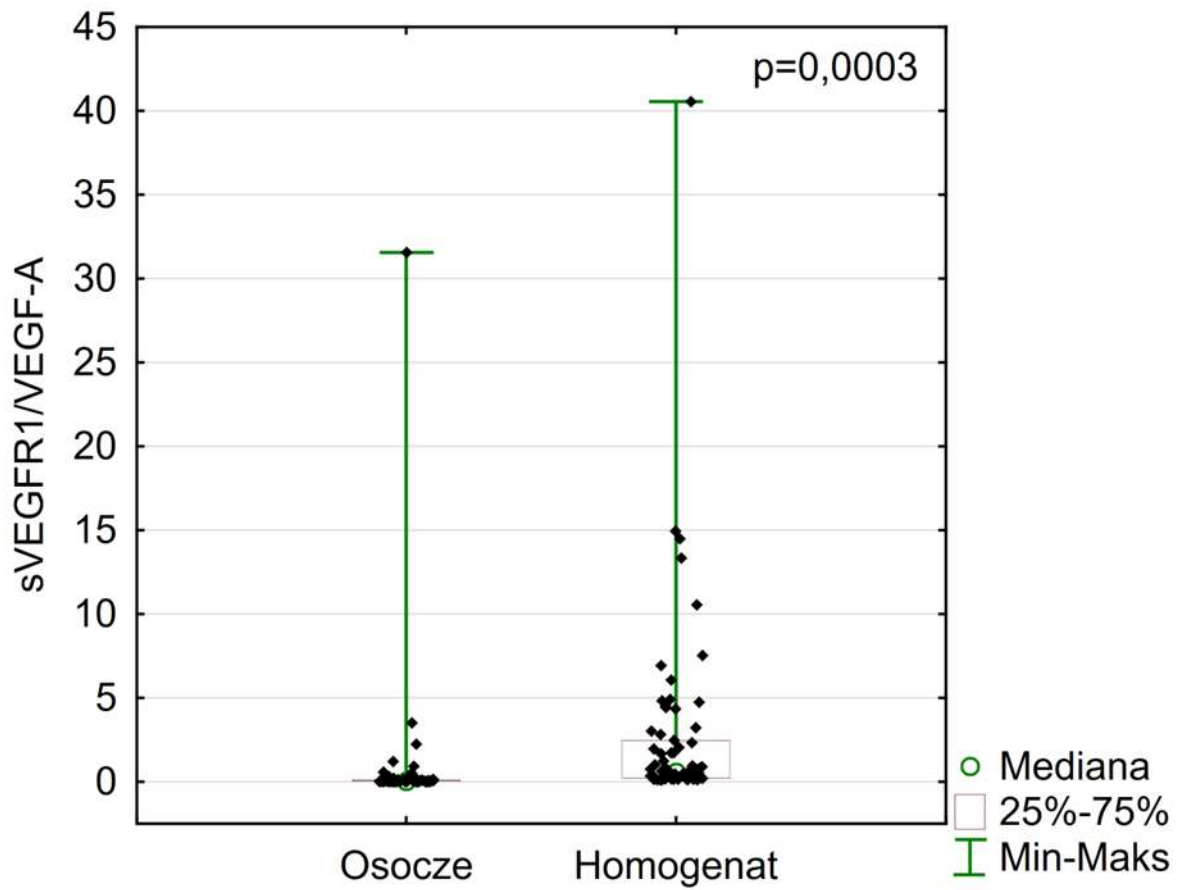
Współczynnik	Osocze	Homogenat	p
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
sVEGFR1/VEGF-A	0,05 (0,02-0,12)	0,12 (0,06-0,69)	<b>0,0003</b>
sVEGFR2/VEGF-A	1,79 (0,51-3,87)	0,10 (0,04-0,36)	<b>&lt;0,0001</b>

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice (odpowiednio  $p=0,0003$  i  $p<0,0001$ ) między współczynnikami sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69).

Współczynnik sVEGFR1/VEGF-A (mgP) w grupie badanej w homogenacie jest około 2,5 razy większy, a współczynnik sVEGFR2/VEGF-A (mgP) około 18 razy mniejszy niż w osoczu.

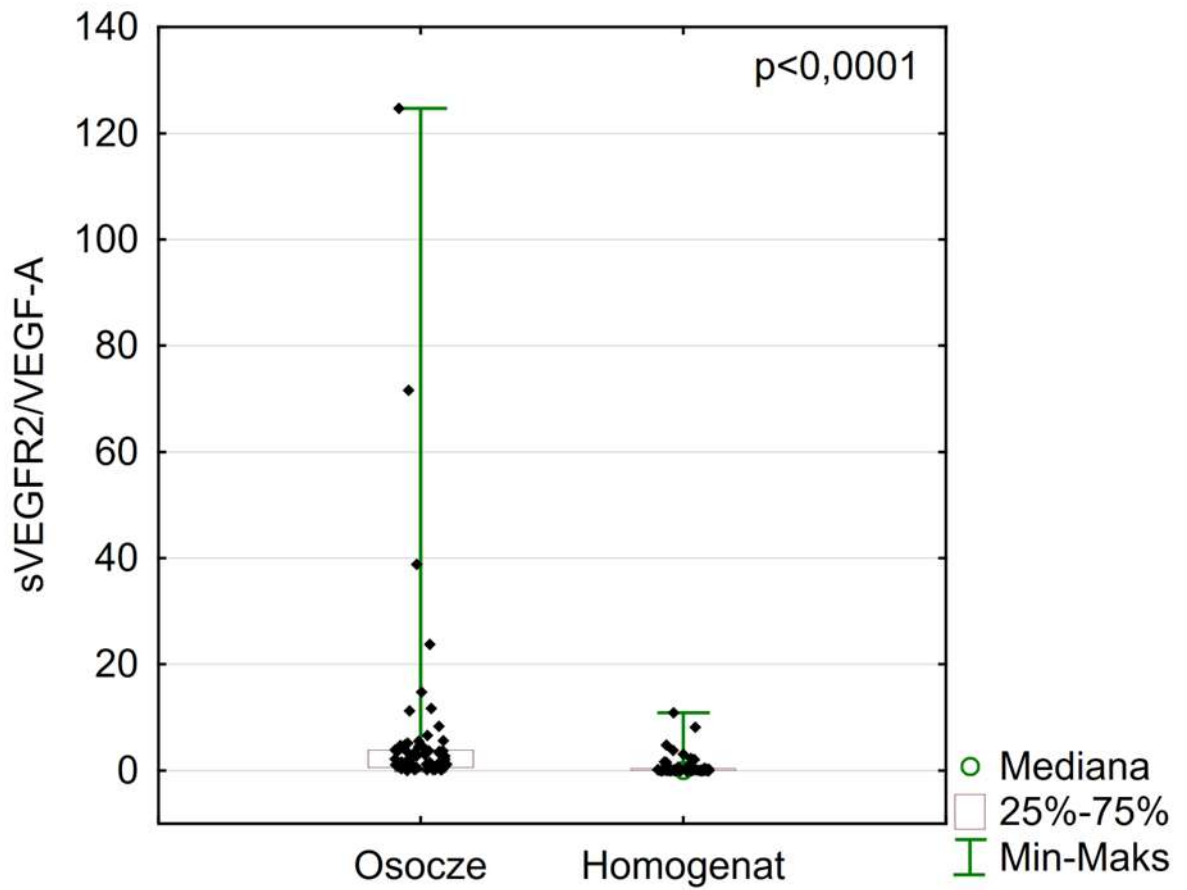
Analiza wskazuje, że w homogenacie guza po wyrażeniu stężeń badanych parametrów na 1 mg białka inhibicja jest około 2,5 krotnie wyższa w przypadku sVEGFR1/VEGF-A a w przypadku sVEGFR2/VEGF-A około 18 krotnie niższa w homogenacie guzów w porównaniu do osocza krwi chorych.





Ryc.19 Wartości współczynnika sVEGFR1/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Współczynnik sVEGFR1/VEGF-A jest istotnie wyższy w homogenacie niż w osoczu krwi chorych ( $p=0,0003$ ).



Ryc.20 Wartości współczynnika sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Współczynnik sVEGFR2/VEGF-A jest istotnie niższy w homogenacie niż w osoczu chorych ( $p < 0,0001$ ).

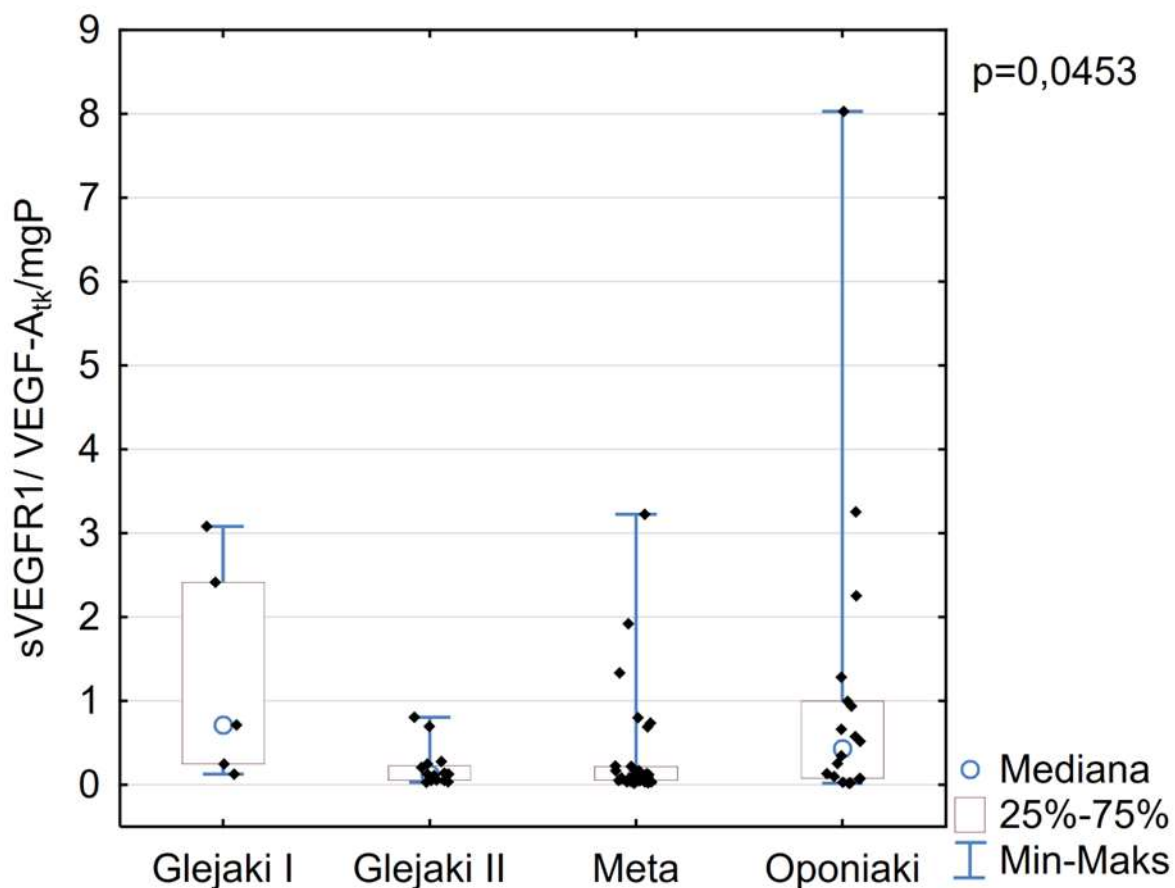
Tabela 15. Współczynniki sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Współczynnik	Glejaki I	Glejaki II	Oponiaki M	Meta	p
	n=5	n=16	n=18	n=30	
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	
sVEGFR1/VEGF-A	0,716 (0,25-2,41)	0,127 (0,05- 0,23)	0,430 (0,08-0,99)	0,09 (0,05-0,22)	<b>0,0453</b>
sVEGFR2/VEGF-A	1,041 (0,10-1,58)	0,048 (0,02- 0,19)	0,280 (0,16-0,63)	0,07 (0,03-0,17)	<b>0,0014</b>

Ocena współczynników sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A po przeliczeniu na 1 mg białka stężeń parametrów użytych do ich wyliczenia w homogenatach poszczególnych grup guzów, wskazuje na istotne różnice obu współczynników w analizowanych guzach śródczaszkowych.

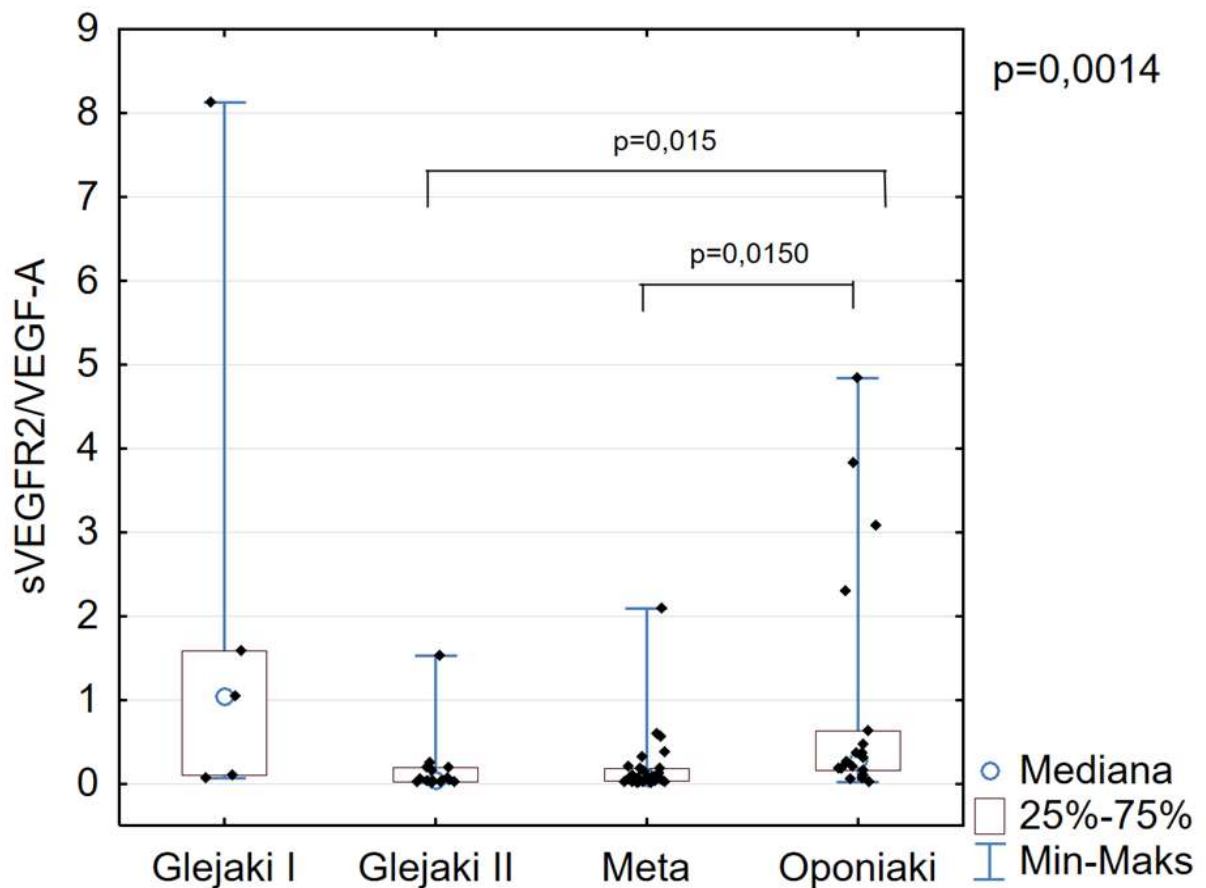
Odnotowano, że największa inhibicja dotyczyła glejaków o niskim stopniu zaawansowania i oponiaków, dużo niższa była dla glejaków o wysokim stopniu zaawansowania i minimalna dla nowotworów przerzutowych.

Zaobserwowane różnice zilustrowano na rycinie 21.



Ryc.21 Wartości współczynnika sVEGFR1/VEGF-A w homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Największa inhibicja występowała w grupie chorych z glejakami o niskim stopniu zaawansowania, nieco niższa u chorych z oponiakami, a najniższa w podgrupie z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania i w guzach przerzutowych. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi grupami nowotworów (p=0,0453).



Ryc.22 Wartości współczynnika sVEGFR2/VEGF-A w homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Największa inhibicja występowała w grupie chorych z glejakami o niskim stopniu zaawansowania, nieco niższa u chorych z oponiakami, a najniższa w podgrupie z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania i w guzach przerzutowych. Odnotowano, że współczynnik sVEGFR2/VEGF-A był istotnie niższy w glejakach o wysokim stopniu zaawansowania i guzach przerzutowych niż w oponiakach (w obu przypadkach  $p=0,015$ ).

Tabela 16. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe z podziałem na płeć (K=45, M=24).

Parametr	Kobiety n=45	Mężczyźni n=24	P
	Me Q1-Q3		
VEGF-A <sub>os</sub>	59,62 (23,94-185,89)	42,900 (17,59-107,90)	0,2780
sVEGFR1 <sub>os</sub>	141,22 (99,00-185,00)	155,0 (111,195-316,75)	0,3570
sVEGFR2 <sub>os</sub>	6300,54 (5065,52-8394,35)	6757,88 (5601,46-8379,23)	0,8758

Stężenia badanych parametrów angiogenezy w osoczu w grupie kobiet (n=45) oraz mężczyzn (n=24) nie wykazywały różnic istotnych statystycznie.

Tabela 17. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie tkanki guza osób chorych z podziałem na płeć (K=45, M=24).

Parametr	Kobiety n=45	Mężczyźni n=24	p
	Me Q1-Q3		
VEGF-A	1577,59 (198,60-2095,68)	2013,90 (267,45-2559,29)	0,2562
sVEGFR1	527,87 (281,98-940,43)	505,52 (334,19-988,46)	0,7688
sVEGFR2	340,24 (242,30-696,30)	357,61 (136,58-908,28)	0,6569

Stężenia badanych parametrów angiogenezy w tkance guza w grupie kobiet (n=45) oraz mężczyzn (n=24) nie wykazywały różnic istotnych statystycznie.

Tabela 18. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe z podziałem na wiek pacjentów (<65 n=42, >65 n=27).

Parametr	<65 lat n=42 osocze	>65 lat n=27 osocze	p
	Me Q1-Q3		
VEGF-A	49,65 (19,81-185,89)	57,16 (20,16-121,04)	0,8499
sVEGFR1	142,42 (110,54-235,09)	160,27 (98,42-279,21)	0,9854
sVEGFR2	6671,56 (5581,39-8394,35)	6347,88 (4345,65-8451,77)	0,3686
sVEGFR1/VEGF-A	2,795 (0,90-8,20)	3,32 (1,60-5,15)	0,7368
sVEGFR2/VEGF-A	120,06 (31,59-300,54)	178,00 (49,95-270,40)	0,9405

W badanej grupie z podziałem na wiek (< 65lat oraz >65 lat) nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie stężeń parametrów angiogenezy w osoczu.

Tabela 19. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) z podziałem na wiek (<65 n=42, >65 n=27).

Parametr	<65 lat n=42 homogenat	>65 lat n=27 homogenat	p
	Me Q1-Q3		
VEGF-A <sub>tk</sub>	1576,12 (151,92-2225,20)	1858,02 (274,30-2341,04)	0,3368
sVEGFR1 <sub>tk</sub>	466,57 (261,99-912,22)	628,89 (354,13-1021,11)	0,2573
sVEGFR2 <sub>tk</sub>	369,05 (240,47-787,27)	284,75 (162,08-657,44)	0,2678

W badanej grupie z podziałem na wiek (< 65lat oraz >65 lat) nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie stężeń parametrów angiogenezy w homogenacie tkanki guza.

## 11. Dyskusja

Angiogeneza jest fizjologicznym procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych, niezbędnym do prawidłowego rozwoju organizmu zwłaszcza w okresie embrionalnym. U osób dorosłych angiogeneza zachodzi rzadko m.in. podczas rozwoju endometrium w trakcie cyklu menstruacyjnego dorosłych kobiet czy w czasie gojenia się rany [70]. Nasila się natomiast w przebiegu chorób o podłożu niedokrwiennym, zapalnym czy nowotworowym. Proces ten regulowany jest przez szereg substancji proangiogennych oraz antyangiogennych pozostających ze sobą w równowadze w warunkach fizjologicznych. W momencie zaburzenia równowagi inhibitorów oraz aktywatorów angiogenezy rozpoczyna się proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych [51, 71].

W rozwoju nowotworu wyróżnia się następujące etapy: inicjacja, promocja i progresja. Inicjacja kończy się powstaniem komórki inicjowanej tj. z uszkodzonym genotypem lub o zmienionym fenotypie – nowotworowym. W czasie promocji powstaje niewielki guzek, który wykorzystuje zjawisko dyfuzji do pobierania materiałów odżywczych i tlenu od gospodarza. Progresja nowotworu wiąże się z koniecznością wytworzenia własnego systemu naczyniowego w procesie angiogenezy, zapewniającego stały dopływ materiałów niezbędnych do tworzenia nowych komórek guza.

Ważnym momentem w powstawaniu nowotworowych naczyń krwionośnych jest tzw. przełom angiogeny (ang. *angiogenic switch*) czyli przejście nowotworu z fazy awaskularnej w fazę naczyniową. Wówczas nowotwór nabiera cech inwazyjności i zdolności do przerzutowania [67]. Rozwój własnego unaczynienia umożliwia nowotworowi wytworzenie klonów opornych, szybki wzrost i powstanie ognisk wtórnych.

Wzrost większości nowotworów zależy od właściwego unaczynienia aczkolwiek istnieją nowotwory takie jak struniak, które posiadają znikomą sieć naczyń krwionośnych i odżywiają się drogą dyfuzji [71].



## 11.1 Badania we krwi

### 11.1.1 VEGF-A

Jak pisze Dvorak, angiogeneza nowotworowa jest „niegojącą się raną”, procesem przewlekłym, w trakcie którego wydzielane są różne czynniki proangiogenne [92]. Główną cytokiną aktywującą tworzenie nowych naczyń krwionośnych w trakcie trwania procesu nowotworowego, w tym również guzów śródczaszkowych, jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF-A. Powszechnie znana jest rola VEGF-A w angiogenezie, remodelingu czy nasileniu przepuszczalności naczyń zwłaszcza w procesie nowotworowym, są jednakże doniesienia na temat jego roli w innych stanach chorobowych.

VEGF dzięki swoim właściwościom inicjuje proces zapalny. Podczas reakcji zapalnej następuje uwalnianie VEGF z płytek krwi i granulocytów [115]. Zwiększając przepuszczalność naczyń, ułatwia on tworzenie obrzęku i przechodzenie komórek z krwioobiegu do miejsc toczącego się zapalenia [116]. VEGF zwiększa swoje stężenie w trakcie endometriozy [64], a także w otyłości [117], którym to zjawiskom towarzyszy przewlekłe zapalenie.

Badania wykazały, że VEGF może stanowić istotny czynnik w przewlekłych procesach zapalnych skóry związanych z nadwrażliwością typu opóźnionego [118]. Zhang Y. i wsp. zaobserwowali zwiększone stężenie VEGF w warstwie rogowej naskórki u chorych na atopowe zapalenie skóry [119]. VEGF jest syntetyzowany w keratynocytach i fibroblastach skóry i ma swój udział również w patomechanizmie wyprysku kontaktowego kiedy alergen kontaktowy stymuluje wytwarzanie VEGF [120, 121]. Wykazano zwiększoną ekspresję VEGF w keratynocytach i komórkach jednojądrzastych na śródbłonku w zmianach skórnych o charakterze wyprysku [122]. VEGF ma również udział w patomechanizmie chorób zapalnych skóry takich jak łuszczyca, trądzik różowaty, choroby pęcherzowe, opryszczkowe zapalenie skóry i rumień wielopostaciowy [123, 124, 125].

Stężenie VEGF wzrasta w wolu mięsowym i guzkowym gruczołu tarczowego w porównaniu z osobami zdrowymi [130, 131]. Wzrost stężenia VEGF zaobserwowano również w chorobie Graves Basedova, gdzie stymulacja gruczołu tarczowego przez TRAb (przeciwciała przeciwko receptorom TSH) nasila angiogenezę [132–134]. Podwyższone stężenie VEGF stwierdzono także u ludzi z chorobą Hashimoto, co koreluje dodatnio

ze stopniem unaczynienia tarczycy [132, 134]. Silna ekspresja VEGF obserwowana jest w limfocytarnym zapaleniu tarczycy, a także w rakach tarczycy [134, 135].

Podwyższone stężenie VEGF występuje u pacjentów chorych na cukrzycę. W badaniach *in vitro* na liniach szczurzych komórek mezengialnych zaobserwowano, że wysokie stężenia glukozy zwiększają ekspresję VEGF [136]. Wykazano podwyższone stężenie białka VEGF oraz ekspresję mRNA VEGF w nerkach osób chorych na nefropatię cukrzycową [137, 138].

VEGF ma swój udział również w rozwoju miażdżycy. Blaszkki miażdżycowe powstające w naczyniach tętniczych odpowiadają za obszar niedokrwienia tkanek. Celletti F.L. i wsp. stwierdzili, że po wstrzyknięciu VEGF, do krwi zwierząt przedostaje się wiele komórek macierzystych, które kierowane są do miejsca niedokrwienia. Bodziec hipoksemiczny z tych okolic jest stymulatorem do uwolnienia ze szpiku progenitorowych komórek śródbłonka, które po przejściu w funkcjonalne komórki śródbłonka tworzą nowe naczynie w procesie neoangiogenezy (waskulogenezy). Powstanie unaczynienia przyspiesza tworzenie blaszki miażdżycowej [139, 140]. Z drugiej strony stymulując angiogenezę w blaszce miażdżycowej VEGF odpowiada za jej destabilizację i pęknięcie.

VEGF stymuluje wzrost i przeżywalność komórek Schwanna w warunkach hipoksji, zwiększa proliferację astrocytów, stymuluje wzrost aksonów w hodowlach siatkówki czy zwojów nerwowych korzenia grzbietowego (DRG) [126, 127]. Także w warunkach *in vitro* zwiększa przeżywalność komórek nerwowych w sytuacji hipoksji i stresu oksydacyjnego [128]. Badania immunoenzymatyczne wykazały obecność VEGF w neuronach i komórkach glejowych [129, 127].

VEGF-A odgrywa ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej, kiedy dochodzi do ekspresji VEGF. Nadekspresja VEGF wpływa hamująco na dojrzewanie komórek dendrytycznych osłabiając odpowiedź immunologiczną gospodarza skierowaną przeciwko rozwijającemu się nowotworowi [141].

W niniejszej pracy zaobserwowano istotny, 4-krotny wzrost stężenia VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe w porównaniu do grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami Nowackiej A. i wsp., którzy przed zabiegiem w osoczu krwi chorych poddanych operacji usunięcia guza stwierdzili istotnie

wyższe stężenie VEGF-A niż w grupie kontrolnej [142] oraz z badaniem stężenia VEGF w surowicy krwi chorych na glejaka wielopostaciowego i chorych z guzami przerzutowymi do mózgu przeprowadzonymi przez Rafata N. i wsp., gdzie także odnotowano stężenie wyższe VEGF niż w grupie osób zdrowych [143]. Handzhiev D. i wsp. istotnie wyższe stężenia VEGF-A zaobserwowali tylko w grupie chorych na glejaki o niskim stopniu złośliwości [144], a Siedlecki Z. [145] nie stwierdził istotnych różnic pomiędzy chorymi z guzami śródczaszkowymi, a grupą kontrolną.

Analiza literatury na temat stężeń VEGF we krwi w innych rodzajach nowotworów wskazuje, że oceny poziomu VEGF dokonywano w osoczu lub w surowicy krwi. Gornall R.J. i wsp. stwierdzili w surowicy krwi chorych na raka macicy silną dodatnią korelację stężenia VEGF i liczby płytek krwi i sądzą, że te komórki są jego źródłem. Autorzy nie odnotowali zależności stężenia VEGF i objawów postępu choroby [146]. Shimada H. i wsp. zaobserwowali w surowicy krwi chorych na raka piersi zależność stężenia VEGF i progresji choroby, złej odpowiedzi na leczenie i krótszego przeżycia. Autorzy wykazali, że VEGF jest niezależnym czynnikiem prognostycznym [147]. Holzer G. i wsp. ocenili stężenie VEGF w surowicy krwi u chorych na kilka rodzajów raka kości i stwierdzili jego stężenie wyższe u chorych niż w grupie kontrolnej [148], a Oehler M.K. i wsp. wykazali wysokie stężenie VEGF u chorych na raka jajnika [149]. George D.J. i wsp. w osoczu krwi chorych na raka prostaty zaobserwowali istotnie wyższe VEGF niż u zdrowych i uważają, że ten czynnik może być wskaźnikiem klinicznym progresji raka prostaty [202].

Przeprowadzona analiza piśmiennictwa na temat VEGF we krwi chorych z guzami śródczaszkowymi i z innymi nowotworami potwierdza obecność jego wysokich stężeń we krwi chorych i udział tego czynnika w angiogennej proliferacji naczyń.

### **11.1.2 sVEGFR1**

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że w osoczu krwi chorych z guzami śródczaszkowymi (w całej grupie) występuje wyższe stężenie sVEGFR1 w wartościach bezwzględnych i po przeliczeniu na 1 mg białka niż we krwi osób zdrowych.

Z analizy piśmiennictwa wynika że, stężenie sVEGFR1 badano w różnych sytuacjach klinicznych, gdzie dochodziło do zmian w intensywności angiogenezy, często łącznie z oceną

stężenia VEGF-A. Podwyższone stężenie sVEGFR1 stwierdzili Di Marco G.S. i wsp. w osoczu krwi 130 chorych na przewlekłą chorobę nerek w zaawansowanym stadium choroby (3–5 stadium). Uzyskaną surowicę od tych chorych oraz rekombinowany sVEGFR1 autorzy wykorzystali do zbadania ich wpływu na angiogenezę płodów kurcząt [150]. Zaobserwowali działanie antyangiogenne sVEGFR1 w postaci indukcji apoptozy komórek endotelialnych w warunkach *in vitro* i zmniejszenia tworzenia tlenku azotu NO w hodowlach komórek śródbłonna. Robak E. i wsp. odnotowali zwiększone stężenie sVEGFR1 we krwi chorych z toczeniem układowym, przy czym najwyższe jego wartości stwierdzono u chorych w aktywnej fazie choroby [151]. Autorzy sugerują, że źródłem sVEGFR1 są komórki endotelialne, ale także monocyty i makrofagi. Podwyższone stężenie sVEGFR1 wykazali Ismail Erturk i wsp. w osoczu krwi chorych na cukrzycę insulinozależną, u których stosowanie metforminy spowodowało obniżenie stężenia tego receptora [152]. Wykazano, że sVEGFR1 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu stanu awaskularności rogówki poprzez hamowanie VEGF-A [153].

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono badania dotyczące oceny stężenia sVEGFR1 we krwi pacjentów z chorobą nowotworową. Wierzbowska A. i wsp. stwierdzili wysokie stężenie sVEGFR1 we krwi chorych na ostrą białaczkę szpikową i ostrą białaczkę limfatyczną oraz zaobserwowali dodatnią korelację stężenia receptora i liczby blastów w szpiku, a także liczby krwinek białych we krwi obwodowej [154]. Gadomska G. i wsp. opisali obniżone stężenie sVEGFR1 u chorych na czerwienicę prawdziwą i nadpłytkowość samoistną [155]. Autorzy sądzą, że sVEGFR1 jest odpowiedzialny za blokowanie ligandu dla VEGF na powierzchni komórek endotelialnych i zmniejszenie dostępności VEGF do VEGFR2 stacjonarnego. Boiocchi L. i wsp. stwierdzili u chorych na czerwienicę prawdziwą i mielofibrozę pierwotną badaniem immunohistochemicznym ekspresję sVEGFR1 i VEGF-A w komórkach szpiku kostnego: megakariocytach, makrofagach i niedojrzałych prekursorach mieloidalnych szpiku kostnego [156]. Autorzy uważają, że występuje wewnętrzna autokrynną regulacja pomiędzy VEGF-A i sVEGFR1. Wykazano, że wysokie stężenie VEGF jest bodźcem stymulującym syntezę i wydzielanie do krwi sVEGFR1 przez komórki endotelium [157].

Znaleziono także badania dotyczące sVEGFR1 w guzach litych. Kemik O. i wsp. przeprowadzili ocenę stężenia sVEGFR1 we krwi oraz badaniem immunohistochemicznym ustalili lokalizację receptora w komórkach u chorych z wątrobowokomórkowym rakiem [158]. Stwierdzili wysokie stężenie sVEGFR1 w surowicy krwi oraz ekspresję tego receptora

w komórkach nowotworu. Badacze zaobserwowali korelację ekspresji sVEGFR1 z przerzutami, stopniem zaawansowania choroby oraz zróżnicowaniem komórek guza. Uważają, że pomiar sVEGFR1 oraz VEGF-A w surowicy krwi chorych może odzwierciedlać powstawanie guza, przerzuty i proces angiogenezy. Thielemann A. i wsp. oraz Zarychta E. i wsp. oceniając stężenie VEGF-A i obu receptorów rozpuszczalnych zaobserwowali w osoczu krwi chorych na raka piersi wysokie stężenie sVEGFR1, które rosło wraz z postępem choroby [159, 160].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że w świetle ostatnich badań, obok znanego działania sVEGFR1 jako receptora „pułapkowego” dla krążącego VEGF-A, w chorobie nowotworowej podkreślana jest jego rola jako markera progresji guza, a także jako biomarkera odpowiedzi na terapię antyangiogenną.

Przeprowadzone badanie wskazuje, że znacząco wysokiemu stężeniu VEGF-A we krwi towarzyszy wysokie stężenie sVEGFR1 we krwi spowodowane, jak się wydaje, stymulującym działaniem VEGF-A na komórki endotelialne i komórki zapalne towarzyszące procesowi nowotworzenia i stanowi wewnętrzny mechanizm kompensacyjny w warunkach silnej aktywacji angiogenezy.

### **11.1.3 sVEGFR2**

Przeprowadzone obecnie badania wykazały, że w osoczu krwi osób chorych (całej grupy) stężenie sVEGFR2 było istotnie niższe w grupie kontrolnej – w wartościach bezwzględnych i po przeliczeniu na 1 mg białka.

Z analizy dostępnej literatury dotyczącej sVEGFR2 wynika, że stężenia tego receptora VEGF badano w chorobach naczyń. Wieczór R. i wsp. wykazali we krwi chorych z chorobą naczyń obwodowych, a także w grupie chorych z miażdżycą i towarzyszącą cukrzycą typu 2 obniżone stężenie sVEGFR2 [161, 162]. Natomiast Ruszkowska B. i wsp. nie stwierdzili istotnych różnic stężenia sVEGFR2 w osoczu krwi chorych z dobrze kontrolowaną cukrzycą typu 2 [163]. Podwyższone stężenie sVEGFR2 zaobserwował Sugimoto M. i wsp. u ciężarnych kobiet z towarzyszącą cukrzycą lub cukrzycą ciężarnych w porównaniu do kobiet w ciąży bez cukrzycy [164]. Wysokie stężenie sVEGFR2 odnotował Suman K. i wsp. we krwi chorych z cukrzycą typu 2 z towarzyszącą retinopatią proliferacyjną i zaobserwował jego wzrost wraz z progresją retinopatii [165]. Ahmed M. Abu El-Asrar i wsp. stwierdzili wyższe stężenie

sVEGFR2 w płynie ocznym u chorych z cukrzycową retinopatią proliferacyjną w porównaniu do osób bez cukrzycy [166].

Przegląd piśmiennictwa wskazuje na obecność badań dotyczących sVEGFR2 w nowotworach: guzach litych i rozrostach hematologicznych. Grochoła–Małecka I. i wsp. [167], Thielmann A. i wsp. [159], a także Zarychta E. i wsp. [160] opisują podwyższone stężenie sVEGFR2 we krwi chorych na raka piersi. Zarychta E. i wsp. są zdania, że podwyższone stężenie sVEGFR2 może stanowić pozytywny czynnik prognostyczny, natomiast Grochoła–Małecka w swoich badaniach nie potwierdzają tej obserwacji. Thielmann A. i wsp. zaobserwowali korelację stężenia sVEGFR2 i klinicznego stadium choroby [159, 167]. Yoshiko Aoyagi i wsp. stwierdzili wysokie stężenie sVEGFR2 w osoczu krwi chorych na raka okrężnicy [168]. Gadomska G. i wsp. zanotowali obniżone stężenie sVEGFR2 w grupie 72 chorych na przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne (nadpłytkowość samoistna, czerwienica prawdziwa, mielofibroza pierwotna) [155]. Autorzy uważają, że obniżenie stężenia tego receptora mogło odzwierciedlać jego zużycie w sytuacji wysokiego stężenia VEGF-A aktywującego angiogenezę.

Na uwagę zasługuje badanie Albuguergue R.J.C. i wsp., gdzie wykazano, że alternatywnie składana izoforma sVEGFR2 jest antagonistą endogennego VEGF-A, co uniemożliwia jego wiązanie ze stacjonarnym VEGFR3 i w konsekwencji prowadzi do hamowania proliferacji limfatycznych komórek endotelialnych [169]. Harris H. i wsp. zaobserwowali, że u kobiet z rakiem piersi występuje w osoczu krwi podwyższone stężenie sVEGFR2 oraz sVEGFR3 [170], co świadczy o zaburzeniach limfangiogenezy. Becker J. i wsp. badali stężenie u 49 chorych z pierwotnym neuroblastoma w różnych stadiach rozwoju i tworzenia przerzutów. Stwierdzili postępujący spadek stężenia sVEGFR2 we krwi najbardziej wyrażony w 3 i 4 stadium choroby [171].

Oba rozpuszczalne receptory tj. sVEGFR1 i sVEGFR2 uważane są za endogenne naturalne inhibitory angiogenezy z uwagi na zdolność blokowania wolnych krążących cząsteczek VEGF-A, co wydatnie zmniejsza dostępność tego aktywatora do stacjonarnego inhibitora sVEGFR2 – na powierzchni komórek śródbłonna. Działanie sVEGFR1 jako „pułapki” dla VEGF-A było znane i potwierdzone od dawna. W przypadku sVEGFR2 także są badania wskazujące na jego hamujący wpływ na angiogenezę. Kemik O. i wsp. wykazali wpływ

sVEGFR2 w postaci blokady różnicowania raka wątrobowokomórkowego, a Aweimer A. i wsp. hamujący wpływ sVEGFR2 na raka gruczołu krokowego [158, 172].

Ocena statystyczna badanych parametrów w osoczu krwi zależnie od rodzaju guza wykazała istotnie niskie stężenie sVEGFR2: najniższe w grupie glejaków o niskim stopniu zaawansowania, a najwyższe w grupie chorych o wysokim stopniu zaawansowania .

Obniżone stężenie sVEGFR2 we krwi chorych na nowotwory śródczaszkowe wydaje się stanowić kolejny mechanizm kompensacyjny w warunkach nasilonej angiogenezy. Podkreślenia wymaga wysokie stężenie sVEGFR2 we krwi w warunkach prawidłowych (tj. przy niezmienionej angiogenezie) wielokrotnie przewyższające stężenie sVEGFR1. Należy sądzić, że fizjologiczne wysokie stężenie sVEGFR2 we krwi w warunkach prawidłowych stanowi zabezpieczenie organizmu przed potencjalną aktywacją angiogenezy.

## **11.2 Guzy śródczaszkowe – homogenaty**

Porównanie stężenia VEGF-A w osoczu chorych oraz homogenacie guzów (cała grupa badanych) wykazało, że w tkance nowotworu jest około 35 krotnie wyższe w wartościach bezwzględnych, a po przeliczeniu na mgP (mg białka) 421 krotnie razy wyższe.

Stężenie sVEGFR1 w homogenacie guzów było 4 krotnie wyższe niż w osoczu, a po przeliczeniu na 1 mg białka stężenie sVEGFR1 było w homogenacie około 60 krotnie wyższe.

Stężenie sVEGFR2 w homogenacie tkanki guzów było około 19 razy mniejsze niż w osoczu, a po przeliczeniu na 1 mg białka o około 20% niższe niż w osoczu badanych chorych.

Badania immunoenzymatyczne wykonane w próbkach guzów nowotworowych wskazują na wysoką ekspresję VEGF-A w komórkach nowotworowych oraz w komórkach śródbłonna naczyń odżywiających guz.

Wśród 69 obecnie badanych chorych z guzami śródczaszkowymi badaniem histopatologicznym skrawków pobranych śródoperacyjnie stwierdzono u 21 osób glejaka, u 18 – oponiaka, a u 30 – guzy przerzutowe. Analiza stężeń badanych parametrów

w homogenatach od chorych z poszczególnymi rodzajami nowotworu wykazała istotne różnice tylko w zakresie stężeń VEGF-A.

### 11.2.1 Glejaki

W grupie chorych z glejakami wyodrębniono podgrupę 5 chorych z niskim stopniem zaawansowania (II) i podgrupę 16 chorych z wysokim stopniem zaawansowania (III–3 osoby, IV–13 osób). Przeprowadzone badanie wykazało, że w homogenacie uzyskanym z glejaków o wysokim stopniu zaawansowania było najwyższe stężenie VEGF-A w wartościach bezwzględnych i po przeliczeniu na 1 mg białka. Wśród chorych było 9 mężczyzn i 12 kobiet.

Glejaki stanowią ponad 40% pierwotnych nowotworów wewnątrzczaszkowych, a jednocześnie 70–80% pierwotnych nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego [173]. Należą do guzów z największą angiogenezą spośród wszystkich guzów litych. Wśród nich glejak wielopostaciowy jest najczęstszym i najbardziej agresywnym pierwotnym guzem mózgu u dorosłych o szybkim rozwoju i dużej częstotliwości ognisk niedokrwienia i martwicy. W warunkach hipoksji pod wpływem HIF-1 w jądrze komórkowym dochodzi do ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za produkcję białek o działaniu proangiogennym. Wśród nich najsilniejszym i najlepiej poznanym jest VEGF-A odpowiedzialny za neoangiogenezę. W glejakach poznano 5 głównych mechanizmów tego procesu: „*vascular co-option*” – naczyniowa kooptacja (włączenie do naczynia – tworzenie mankietów wokół prawidłowych mikronaczyń); angiogeneza – tworzenie naczyń na bazie już istniejących (najczęściej przez pączkowanie); waskulogeneza – powstawanie naczyń z progenitorowych komórek śródbłonna pochodzących ze szpiku kostnego; naczyniowa mimikra – zdolność komórek guza do tworzenia czynnościowej sieci naczyniopodobnej; transdyferencjacja komórek śródbłonna glejaka wielopostaciowego (GMB) [174].

Transdyferencjacja GBM jest charakterystyczna dla glejaków o najwyższym stopniu zaawansowania i polega na przeprogramowaniu komórek macierzystych śródbłonna naczyniowego guza w kierunku funkcjonalnych komórek śródbłonna naczyniowego. Te komórki to GSCs (podobne do komórek macierzystych komórki glioblastoma), które zlokalizowane są w okołonaczyniowych niszach (w pobliżu naczyń krwionośnych). Wykazano, że komórki GSCs posiadają zdolność do wydzielania pęcherzyków pozakomórkowych



(EV – *extracellular vesicles*), które między innymi zawierają VEGF-A odpowiedzialny za inicjację angiogenezy nowotworowej [175].

Ostatnie badania wykazały, że komórki GSCs wchodzą w ścisłe relacje z mikrośrodowiskiem gospodarza za pośrednictwem komórek śródbłonna mikronaczyń mózgu (BMECs – *brain microvascular endothelial cell*) [176]. VEGF-A zawarty w pęcherzykach pozakomórkowych uwalnianych przez komórki GSCs działa proangiogenicznie na komórki BMECs pobudzając je do angiogenezy na rzecz guza, a wraz z obecnymi w pęcherzykach pozakomórkowych metaloproteinazą 9 (MMP-9) i urokinazowym aktywatorem plazminogenu (u-PA) doprowadza do rozluźnienia i destrukcji bariery krew–mózg (BBB – *brain-blood-barrier*).

Analiza dostępnej literatury dowodzi, że wiele badań poświęcono obecności VEGF w glejakach. Większość stanowią badania immunohistochemiczne wskazujące na ekspresję VEGF/VEGF-A w skrawkach uzyskanych z guza [177, 178, 179]. Ekspresja VEGF-A rosła wraz z przekształcaniem postaci niskozaawansowanej glejaka w postać wysokozaawansowaną [180]. W obszarach martwiczych glejaków wysokozaawansowanych obserwowano wysoki poziom ekspresji mRNA VEGF (co związane było z hipoksją tych okolic) [181].

Shingo Takano i wsp. wykazali, że stężenie VEGF u pacjentów z glejakiem wielopostaciowym jest znamienne wyższe w tkance mózgu w porównaniu do gwiaździaków, oponiaków i chłoniaków złośliwych oraz grupy kontrolnej. Stężenie VEGF w płynie z torbieli glejaka było 200–300 krotnie wyższe niż w surowicy i było skorelowane z unaczynieniem [182].

W badaniach Lamszus K. i wsp. zaobserwowano 30 krotnie wyższe stężenie VEGF-A w glejakach niż w gwiaździakach rozlanych ( $p < 0,001$ ), które korelowało z gęstością mikronaczyń ( $p < 0,001$ ) [183].

VEGF-A jest uważany za główny mediator indukowania wzrostu guza zależnego od hipoksji poprzez pobudzenie receptora kinazy tyrozynowej wchodzącej w skład stacjonarnych receptorów VEGFR1 i VEGFR2, co inicjuje różnorakie działania jak: aktywność proangiogeniczną, zwiększenie przepuszczalności naczyń oraz stymuluje migrację komórek śródbłonna [178, 180]. Obok hipoksji ważnym czynnikiem pobudzającym angiogenezę glejaków są mutacje niektórych genów, np. mutacja p53 [184].

### 11.2.2 Oponiaki

Badaniem histopatologicznym wśród chorych z guzami śródczaszkowymi stwierdzono w 18 przypadkach I stopień zaawansowania. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że w homogenacie guzów chorych z oponiakami istotnie niższe było stężenie VEGF niż w grupie chorych z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania. W grupie 18 chorych na oponiaki było 16 kobiet i 2 mężczyzn.

Oponiaki to pierwotne guzy mózgu, które stanowią od 20% do 36% guzów śródczaszkowych [185, 186]. Mahzouni P. i wsp. wykonali retrospektywne badania immunohistochemiczne w blaszkach tkankowych osadzonych w parafinie od 83 chorych z rozpoznaniem oponiakom [185]. We wszystkich próbkach (100%) wykazano obecność VEGF i zaobserwowano korelację pomiędzy ekspresją VEGF, a stopniem złośliwości guza. Ling C. i wsp. oceniali prognostyczną wartość angiogenezy przez zbadanie proliferacji i gęstości mikronaczyń oraz hipertrofii komórek endotelialnych. Stwierdzono ich związek z krótszym okresem przeżycia [187].

Codzienne obserwacje kliniczne wskazują, że oponiakom często towarzyszy obrzęk okołoguzowy, który bardzo pogarsza rokowanie. Ding Y.S. i wsp. badali rolę VEGF w powstawaniu obrzęku okołoguzowego. U 37 chorych z oponiakami dokonano resekcji guza i śródoperacyjnie pobrano skrawki tkanki nowotworowej. Badaniem immunohistochemicznym oceniono ekspresję białka VEGF, a używając metody RT-PCR (ang. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ekspresję mRNA VEGF. Rozległość obrzęku badano przy pomocy rezonansu magnetycznego. Stwierdzono, że stężenie VEGF obniżyło się wraz ze wzrostem odległości od guza, a obecność mRNA VEGF – wykazano tylko w guzie [188]. Autorzy wnioskuje, że makrocząsteczki VEGF są wydzielane przez tkankę guza i przechodzą do prawidłowej tkanki mózgu, co powoduje obrzęk tej okolicy. Markovic M. i wsp. u 78 chorych z oponiakom z towarzyszącym obrzękiem okołoguzowym i bez obrzęku w próbkach pobranych śródoperacyjnie podczas resekcji guza wykonali badanie ekspresji VEGF i stwierdzili korelację wysokiej ekspresji VEGF z wielkością obrzęku w grupie chorych z towarzyszącym obrzękiem oraz korelację VEGF z wydłużeniem czasu leczenia i większą liczbą powikłań pooperacyjnych [189]. VEGF powoduje istotny wzrost przepuszczalności naczyń guza, co umożliwia wysięk płynu z przestrzeni okołonaczyniowej do mięszu mózgu,

a to powoduje zwiększenie ciśnienia płynu międzykomórkowego i wazogeniczny (naczyniopochodny) obrzęk mózgu [185].

Wśród czynników pobudzających angiogenezę w oponiakach na pierwszym miejscu wymieniana jest hipoksja tkanek stymulująca syntezę i uwalnianie VEGF-A. Hipoksja prowadząca do martwicy guza jako patomechanizm angiogenezy w przypadku oponiaków ma znaczenie jedynie w formie atypowej (II WHO) i postaci anaplastycznej (III WHO) [190]. U większości jednakże chorych z oponiakami inne mechanizmy powinny być rozważane jak: stymulacja syntezy VEGF przez hormony płciowe żeńskie lub obecność w komórkach nowotworowych oponiaka specjalnych receptorów dla VEGF, których aktywacja stymuluje angiogenezę i tworzenie obrzęku mózgu wokół guza [188].

### **11.2.3 Guzy przerzutowe**

Wśród 30 chorych z guzami przerzutowymi było 17 kobiet i 13 mężczyzn. U 20 chorych stwierdzono pierwotne ognisko nowotworowe: u 14 był to nowotwór płuc, w 2-óch przypadkach rak gruczołu piersiowego i po 1 przypadku rozpoznano nowotwór szyjki macicy, odbytnicy, nadnercza i nerki. U pozostałych 10 pacjentów nie udało się ustalić ogniska pierwotnego.

Dane literaturowe wskazują, że guzy przerzutowe do mózgu są najczęstszymi wśród nowotworów śródczaszkowych i występują z częstością 8,3 do 14,3 na 100 000 ludzi [191]. Najczęściej ognisko pierwotne stwierdza się w płucach, gruczole piersiowym i skórze (czerniak złośliwy) skąd pochodzi od 67–80% wszystkich przerzutów do mózgu [192].

Mózg jest szczególnym miejscem naszego organizmu i posiada zabezpieczenie przed ingerencją obcych czynników i komórek w postaci selektywnej bariery krew–mózg BBB (ang. *blood-brain-barier*). BBB zbudowana z komórek endotelialnych utrzymuje równowagę centralnego układu nerwowego dzięki zabezpieczeniom jak: ciągłość ścisłych połączeń, zmniejszona aktywność pinocytozy, nadaktywność pomp błonowych w kierunku wyrzucania poza komórkę substancji obcych [193].

Przeprowadzone obecnie badanie stężenia VEGF-A w homogenacie guzów śródczaszkowych wykazało najwyższe stężenia tego aktywatora angiogenezy u chorych

z glejakami i z guzami przerzutowymi, co stwierdzono w wartościach bezwzględnych i po przeliczeniu na 1mgP.

Obecne wyniki pozostają w zgodzie z badaniami Huanga H. i wsp. [194]. Autorzy przy pomocy techniki ELISA badali zawartość białka VEGF w skrawkach kilku rodzajów guzów śródczaszkowych i stwierdzili wysoką ekspresję VEGF w glejakach i guzach przerzutowych z nerek. Identyfikowali oni rodzaje VEGF i zaobserwowali, że dominowały izoformy VEGF<sub>121</sub> i VEGF<sub>165</sub>. Lee Su Kim i wsp. na modelu zwierzęcym (myszy) wykazali, że komórki przerzutów do mózgu od chorych na raka gruczołu piersiowego uwalniały więcej VEGF-A i IL-8 do supernatantu hodowli niż komórki guza z ogniska pierwotnego. Zdaniem autorów istotnie większe tworzenie i uwalnianie VEGF warunkuje zdolność komórek przerzutowych do tworzenia ognisk wtórnych [195].

Yang Y. i Cao Y. w ciekawej pracy poglądowej przytaczają najbardziej prawdopodobne mechanizmy, które decydują o znaczeniu VEGF w pobudzaniu powstawania przerzutów nowotworowych. Najważniejsze z nich to: stymulacja angiogenezy guza, tworzenie prymitywnych naczyń guza o zakłóconej organizacji i skłonności do przerzutowania przez nieprawidłowe ściany naczyń, promocja procesu zapalnego w guzie, zmiany w guzie skutkujące ogniskami hipoksji, remodeling naczyń zależny od interakcji komórek raka i komórek endotelium naczyniowego, podtrzymywanie odrodzenia przerzutów w odległych narządach [196].

W podsumowaniu tej części badań poświęconych porównaniu stężeń badanych parametrów procesu angiogenezy należy podkreślić zasadnicze znaczenie naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF-A w trzech typach nowotworów śródczaszkowych: o charakterze pierwotnym (glejaki, oponiaki) i w guzach przerzutowych.

Glejaki charakteryzujące się wybitnie pobudzoną i rozwiniętą angiogenezą wykorzystują różne właściwości VEGF-A do wytworzenia rozmaitych odmian neoangiogenezy. Odkryta niedawno niewielka ilościowo ale ogromnie ważna czynnościowo pula komórek glejaka podobnych do komórek macierzystych uwalniając do krwi pęcherzyki pozakomórkowe zawierające różnorodne cytokiny, chemokiny a wśród nich VEGF, doprowadza do lokalnego i ogólnego rozprzestrzenienia się komórek guza.

W przypadku oponiaków rola VEGF obok stymulacji angiogenezy nowotworu polega na udziale w patomechanizmie tworzenia obrzęku okołoguzowego o charakterze angiopochodnym, którego obecność znacznie pogarsza rokowanie i sprzyja nawrotom choroby.

Guzy przerzutowe wykorzystują VEGF zwłaszcza do rozluźnienia wyściółki śródbłonkowej naczyń, co skutkuje osłabieniem a następnie pokonaniem bariery krew – mózg przez komórki guzów inwazyjnych.

### **11.3 Współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A**

Przeprowadzone badania VEGF-A wykazały jego wysokie stężenie w homogenacie guzów w całej badanej grupie chorych (tab. 6 i 7) oraz w poszczególnych guzach śródczaszkowych (tab. 10 i 11), co wskazuje na aktywację angiogenezy, a także na komórki guzów jako źródło VEGF-A. Z tabeli 11 wynika również, że nie ma istotnych różnic stężenia krążących receptorów VEGF tj. sVEGFR1 i sVEGFR2 pomiędzy analizowanymi rodzajami guzów śródczaszkowych. Jednakże autorzy niektórych prac wskazują na przydatność równoczesnej oceny biochemicznej choroby nowotworowej przy pomocy dwóch parametrów tj. sVEGFR1 i VEGF-A lub sVEGFR2 i VEGF-A.

Z analizy literatury wynika, że do pomiaru tzw. potencjału angiogenego w chorobie nowotworowej używano wskaźników VEGF-A/sVEGFR1 i VEGF-A/sVEGFR2 dla wykazania dominacji proangiogennej aktywności lub współczynników sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A dla podkreślenia znaczenia upośledzonej inhibicji angiogenezy.

Wiadomo, że we krwi osób zdrowych występuje przewaga hamowania angiogenezy. Pokazuje to tabela 12, gdzie przedstawiono współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi dla badanej grupy chorych z guzami śródczaszkowym i dla grupy kontrolnej. Pokazano w tej tabeli 10-krotną inhibicję w grupie kontrolnej i obniżoną do 2,78-krotności inhibicję w grupie chorych dla współczynnika sVEGFR1/VEGF-A. W przypadku współczynnika sVEGFR2/VEGF-A inhibicja dla grupy kontrolnej wynosi wielokrotność liczby – 928, oraz dla osób chorych tylko 122, 81-krotność.

Stężenie badanych parametrów angiogenezy tj. VEGF-A, sVEGFR1 i sVEGFR2 przeliczono na 1 mg białka, a uzyskane wyniki wyrażone w pg/mg białka użyto do ustalenia współczynników co zostało pokazane w tabeli 13. Współczynnik sVEGFR1/ VEGF-A w osoczu krwi osób zdrowych wynosi 0,141 i jest 3 krotnie wyższy od wyliczonego dla grupy chorych, który jest równy 0,05. Współczynnik sVEGFR2/VEGF-A po przeliczeniu na 1 mg białka wynosi dla kontroli 13,0 i jest 7 krotnie wyższy od stwierdzonego dla osób chorych (1,79).

W tabeli 15 pokazano oba współczynniki obliczone dla homogenatów 4 rodzajów badanych guzów po wyrażeniu stężeń parametrów angiogenezy na 1 mg białka. Im wartość współczynnika jest wyższa, tym siła hamowania angiogenezy jest większa. Największą siłę hamowania angiogenezy w przypadku obu zastosowanych współczynników stwierdzono w glejakach o niskim stopniu zaawansowania, nieco niższą w oponiakach, niską w glejakach o wysokim stopniu złośliwości i najniższą w nowotworach przerzutowych.

Z przeglądu dostępnego piśmiennictwa wynika, że ocenę stężeń parametrów angiogenezy takich jak w obecnym badaniu, wykonali we krwi (osocze, surowica) Thielemann A. i wsp. u kobiet chorych na raka sutka, Aoyagi Y. i wsp. u chorych na raka okrężnicy, Kulapaditharom B. i wsp. u chorych na raka kolczystokomórkowego szyi i głowy i użyli ich do obliczenia wskaźników angiogenezy [159, 197, 198]. Badania stężenia parametrów angiogenezy w homogenacie tkanki guzów przeprowadzili w raku sutka Toi M. i wsp, a Tang T–Y. i wsp. we krwi i płynie mózgowo–rdzeniowym u chorych na białaczkę z przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego [199, 200].

Udało się odnaleźć jedynie 2 badania stężeń VEGF i jego krążących receptorów w homogenatach guzów śródczaszkowych.

Autorzy pierwszej publikacji Takano S. i wsp. do oceny potencjału angiogennego wykorzystali współczynnik VEGF/sVEGFR1 u 69 chorych z glejakami (39 chorych z glejakiem wielopostaciowym, 29 z gwiaździakiem anaplastycznym i 4 z anaplastycznym oligogwiaździakiem) [201]. Obok stężeń VEGF-A i sVEGFR1 zbadali oni techniką PCR także stężenia mRNA VEGF i mRNA VEGFR1. Wykazali, że w warunkach hipoksji nie ulega zmianie ekspresja mRNA sVEGFR1, ale wydzielanie białka sVEGFR1 zostało zahamowane. Autorzy uważają, że sVEGFR1 jako endogenny inhibitor VEGF odpowiada za regulację angiogenezy w glejakach.

W drugiej publikacji Lamszus K. i wsp. przeprowadzili pomiary stężenia VEGF-A i jego krążących receptorów w ekstrakcie homogenatów od 99 chorych z guzami śródczaszkowymi i w 5 skrawkach prawidłowego mózgu [183]. Zastosowali oni współczynnik sVEGFR1/VEGF-A i stwierdzili, że jest on 2,6 krotnie niższy w homogenacie uzyskanym od chorych z glejakiem wielopostaciowym (najbardziej złośliwym wśród glejaków) niż u chorych z rozszianym gwiaździakiem. Autorzy sugerują, że zastosowanie tego współczynnika może być użyteczne do oceny inhibicji angiogenezy, szczególnie w przypadkach ludzkich glejaków.

W naszych badaniach wykazano, że współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A pozwalają na precyzyjną ocenę potencjału angiogenego w homogenacie 3 rodzajów najczęściej występujących wśród ludzi nowotworów śródczaszkowych. Potwierdzono przydatność użytego wcześniej współczynnika sVEGFR1/VEGF-A i udało się wykazać bardzo niską siłę hamowania przez wewnętrzny mechanizm inhibicyjny angiogenezy u chorych z guzami przerzutowymi.

Podobny kierunek zmienionej inhibicji w homogenatach poszczególnych rodzajów nowotworów można wykazać także przy pomocy współczynnika sVEGFR2/VEGF-A przy wyższej istotności statystycznej. Wartość stężenia sVEGFR2 rzutuje na wielkość współczynnika sVEGFR2/VEGF-A. W obecnym badaniu wykazano obniżone stężenie sVEGFR2 w osoczu krwi chorych w porównaniu do osób zdrowych, a także obniżone stężenie sVEGFR2 w homogenacie guzów śródczaszkowych w porównaniu do osocza krwi chorych. Z kilku cytowanych wcześniej publikacji wynika, że obniżenie stężenia sVEGFR2 we krwi chorych na nowotwory występuje w najbardziej zaawansowanych stadiach choroby. Becker J. i wsp. zaobserwowali postępujący spadek stężenia sVEGFR2 u chorych z pierwotnym neuroblastoma najbardziej wyrażony w 3 i 4 stadium choroby [171], Gadomska G. i wsp. zaobserwowali obniżenie stężenia VEGFR2 w rozrostowych chorobach układu krwiotwórczego (czerwieńca prawdziwa, nadpłytkowość samoistna, mielofibroza pierwotna) [155].

Wydaje się, że można i należy w większym stopniu wykorzystać współczynnik sVEGFR2/VEGF-A do oceny znaczenia inhibicji angiogenezy ze względu na potencjalnie dużą pojemność inhibicyjną tego krążącego receptora VEGF.

## Ograniczenia badania

Przeprowadzone badanie posiada pewne ograniczenia, które można zdefiniować następująco:

1. Zbyt mała liczba chorych, co jest widoczne przy podziale grupy chorych na podgrupy zależnie od stwierdzonego rodzaju nowotworu. Grupa 5 chorych o małym stopniu glejaka zaawansowania została wyłoniona dopiero w wyniku wstępnej analizy statystycznej (duża rozbieżność uzyskanych wyników).
2. Badanie dotyczyło układu VEGF i jego krążących receptorów – najważniejszego i najsilniejszego. Nie uwzględniono układu angiopoetyna i Tie-2 oraz działania proangiogenego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2).
3. Wytłumaczenie obniżenia sVEGFR2 we krwi i w homogenacie guzów od chorych jest oparte o wyniki innych badaczy, ze względu na brak obecnie testów pozwalających na badanie stężenia połączeń (kompleksów) sVEGFR2–VEGF-A.



## 12. Wnioski

1. Wysokie stężenie VEGF-A we krwi chorych i w homogenatach guzów śródczaszkowych świadczy o pobudzeniu angiogenezy.
2. Wielokrotnie wyższe stężenie VEGF-A w homogenatach guzów niż we krwi chorych wskazuje na komórki guza jako źródło VEGF-A.
3. Podwyższone stężenie sVEGFR1 w osoczu krwi i homogenacie guzów od chorych jest mechanizmem kompensacyjnym uruchomionym przez wysokie stężenie VEGF-A.
4. Obniżone stężenie sVEGFR2 we krwi i w homogenacie guzów wydaje się być spowodowane jego zużyciem w procesie hamowania wzmożonej angiogenezy.
5. Analiza stężeń VEGF-A w poszczególnych typach nowotworów (glejaki o niskim/wysokim stopniu zaawansowania, oponiaki, guzy przerzutowe) wskazuje, że pobudzenie angiogenezy występuje we wszystkich typach badanych nowotworów śródczaszkowych ale ze zróżnicowaną intensywnością. Najwyższą aktywność proangiogenną stwierdzono u chorych z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania i u chorych z guzami przerzutowymi.
6. Zastosowane współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A pozwalają na uzyskanie dodatkowej informacji o wewnątrzustrojowej inhibicji angiogenezy zależnej od krążących receptorów VEGF-A.

### 13. Streszczenie

Angiogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych w oparciu o istniejącą już sieć naczyń włosowatych. Proces ten jest uzależniony od czynników pro – oraz antyangiogennych, które w stanie fizjologicznym pozostają ze sobą w równowadze. W procesie nowotworowym na skutek zjawiska „switch on” dochodzi do zaburzenia tej równowagi i przewagi czynników proangiogennych (a więc VEGF-A), co prowadzi do aktywacji angiogenezy. Krążące receptory VEGF-A – sVEGFR1 i sVEGFR2 są uważane za endogenne inhibitory angiogenezy, jednakże ich rola w procesie nowotworzenia jest niejasna.

Celem pracy była ocena potencjału angiogenego na podstawie pomiaru stężenia VEGF-A oraz jego krążących receptorów sVEGFR1 i sVEGFR2 w osoczu krwi (chorzy, osoby zdrowe) i w tkance guza osób chorych na nowotwory śródczaszkowe.

Badaniem objęto 69 osób (45 kobiet i 24 mężczyzn) chorych w wieku od 20 do 80 lat, (średnia 61,6 lat) leczonych operacyjnie w powodu guzów śródczaszkowych. Wśród badanych próbek znajdował się materiał od 21 chorych na glejaki – wyróżniono grupę chorych z glejakami o niskim stopniu zaawansowania (I i II – 5 osób) oraz o wysokim stopniu zaawansowania (III i IV – 16 osób), 18 osób chorych na oponiaki (I stopień) i od 30 chorych z guzami przerzutowymi (III i IV stopień). Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników w wieku od 20–55 lat (średnia 51,3 lat).

Materiałem do badań była krew obwodowa oraz wycinek tkanki guza. W skrawku guza uzyskanego podczas zabiegu operacyjnego oraz w osoczu krwi testem ELISA oznaczono stężenie VEGF-A, sVEGFR1 i sVEGFR2. Dokonano również oznaczenia stężenia białka w surowicy. Badane parametry angiogenezy przeliczono na 1 mg białka oraz wyliczono współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A.

Stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie VEGF-A oraz sVEGFR1 w osoczu krwi od osób chorych w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie sVEGFR2 w osoczu krwi osób chorych było istotnie niższe. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższe stężenie VEGF-A w homogenatach guzów w porównaniu do osocza.

Wyciągnięto następujące wnioski: 1. Wysokie stężenie VEGF-A we krwi chorych i w homogenatach guzów śródczaszkowych świadczy o pobudzeniu angiogenezy. 2. Wielokrotnie wyższe stężenie VEGF-A w homogenatach guzów niż we krwi chorych

wskazuje na komórki guza jako źródło VEGF-A. 3. Podwyższone stężenie sVEGFR1 w osoczu krwi i homogenacie guzów od chorych jest mechanizmem kompensacyjnym uruchomionym przez wysokie stężenie VEGF-A. 4. Obniżone stężenie sVEGFR2 we krwi i w homogenacie guzów wydaje się być spowodowane jego zużyciem w procesie hamowania wzmożonej angiogenezy. 5. Analiza stężeń VEGF-A poszczególnych typów nowotworów (glejaki o niskim/wysokim stopniu zaawansowania, oponiaki, guzy przerzutowe) wskazuje, że pobudzenie angiogenezy występuje we wszystkich typach badanych nowotworów śródczaszkowych ale ze zróżnicowaną intensywnością. Najwyższą aktywność proangiogenną stwierdzono u chorych z glejakami o wysokim stopniu zaawansowania i u chorych z guzami przerzutowymi. 6. Zastosowane współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A pozwalają na uzyskanie dodatkowej informacji o wewnątrzustrojowej inhibicji angiogenezy zależnej od krążących receptorów VEGF-A.

## 14. Abstract

Angiogenesis is the process of creating new blood vessels based on the existing capillary network. This process depends on pro – and anti – angiogenic factors, which in a physiological state are in balance with each other. In the neoplastic process, as a result of the "switch on" phenomenon, this balance is disturbed and proangiogenic factors (VEGF-A) predominate, which leads to the activation of angiogenesis. The circulating VEGF-A receptors sVEGFR1 and sVEGFR2 are considered endogenous angiogenesis inhibitors, however, their role in carcinogenesis is unclear.

The aim of the study was to assess the angiogenic potential by measuring the concentration of VEGF-A and its circulating receptors sVEGFR1 and sVEGFR2 in the blood plasma (issue controls) and tumor tissue of patients with intracranial neoplasms.

The study included 69 patients (45 women and 24 men) aged 20 to 80 (mean 61,6 years) treated surgically for intracranial tumors. Among the tested samples there was material from 21 patients with gliomas – a group of patients with low-stage gliomas (I and II – 5 people) and high-stage gliomas (III and IV – 16 people) was distinguished, 18 people with meningiomas (I grade) and from 30 patients with metastatic tumors (grade III and IV). The control group consisted of 30 healthy volunteers aged 20–55 (mean 51,3 years).

The material for the study was peripheral blood and a section of tumor tissue. The concentration of VEGF-A, sVEGFR1 and sVEGFR2 was determined in the tumor section obtained during surgery and in the blood plasma by ELISA. Protein concentration was also determined. The studied angiogenesis parameters were converted to 1 mg of protein and the sVEGFR1/VEGF-A and sVEGFR2/VEGF-A ratios were calculated.

Statistically significantly higher concentrations of VEGF-A and sVEGFR1 in the blood plasma of the patients were found in comparison to the control group. The concentration of sVEGFR2 in the blood plasma of patients was significantly lower. A statistically significantly higher concentration of VEGF-A was observed in tumor homogenates compared to plasma. The following conclusions were drawn: 1. A high concentration of VEGF-A in the blood of patients and in the homogenates of intracranial tumors indicates the stimulation of angiogenesis. 2. Many times than in the blood higher concentration of VEGF-A in tumor homogenates than in blood of patients indicates tumor cells as a source of VEGF-A.

3. Increased concentration of sVEGFR1 in blood plasma and tumor homogenate from patients is a compensatory mechanism triggered by high concentration of VEGF-A. 4. The reduced concentration of sVEGFR2 in the blood and in the tumor homogenate seems to be caused by its consumption in the process of inhibiting increased angiogenesis. 5. The analysis of VEGF-A concentrations of individual types of tumors (low/high-grade gliomas, meningiomas, metastatic tumors) indicates that angiogenesis is stimulated in all types of intracranial tumors studied, but with varying intensity. The highest proangiogenic activity was found in patients with high-grade gliomas and in patients with metastatic tumors. 6. The used sVEGFR1/VEGF-A and sVEGFR2/VEGF-A ratios allow to obtain additional information about the intra-body inhibition of angiogenesis dependent on circulating VEGF-A receptors.

## 15. Piśmiennictwo

1. Instytut Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Krajowy Rejestr Nowotworów. Nowotwory w Polsce w 2010; [www.epid.coi.waw.pl](http://www.epid.coi.waw.pl).
2. Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A. et al. Primary brain tumors in adults. *Lancet* 2003; 361:323-331.
3. Gerrard G.E., Prestwich R.J., Franks K. et al. Neuro-oncology practice in the U.K. *Clin. Oncol.* 2003; 15:478-484.
4. Wrensch M., Minn Y., Chew T. et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro. Oncol.* 2002; 4:278-299.
5. Gupta T., Sarin R. Poor-prognosis high-grade glioma: evolving an evidence-based standard of care. *Lancet Oncol.* 2002; 3:557-564.
6. Rodriguez F.J., Orr B.A., Ligon K.L., Eberhart C.G. Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* 2012; 3:98-106.
7. Wen P.Y., Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359:492-507.
8. Żyromska A., Makarewicz R. Przerzuty do mózgu. *Pol. Med. Paliatywna* 2004; 3, 1, 27-31.
9. Fijuth J., Dziadziuszko R. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych; 2013.
10. Longstreth W.T. Jr, Phillips L.E., Drangsholt M. i wsp. Dental X-rays and the risk of intracranial meningioma: a population-based case-control study. *Cancer* 2004; 100: 1026-1034.
11. Thomas H.G., Dolman C.I., Berry K. Malignant meningioma: clinical and pathological features. *J. Neurosurg.* 1981; 55: 929-934.
12. Bruner J.M. Neuropathology of malignant gliomas. *Semin. Oncol.* 1994; 21:126-132.
13. Woehrer A., Marosi C., Widhalm G. Clinical neuropathology practice guide 1-2013: molecular subtyping of glioblastoma: ready for clinical use? *Clin. Neuropathol.* 2013; 32:5-8.
14. Wang Y., Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Lett.* 2013; 331:139-146.
15. Westphal M., Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12:495-508.

16. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114:97-109.
17. Kordek R. Gwiaździaki-klasifikacja histokliniczna i molekularna. *Pol. Przegl. Neurol.* 2010; 6 (Suppl.A):11-12.
18. Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 2010; 10:319-331.
19. Zagzag D., Esencay M., Mendez O., Yee H., Smirnova I., Huang Y., Chiriboga L. Hypoxia and vascular endothelial growth factor induced stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 expression in glioblastomas. *Am. J. Pathol.* 2008; 173, 2.
20. Stupp R., Taillibert S., Kanner A. et al. Maintenance therapy with tumor- treating fields plus talidomide vs talidomide alone for glioblastoma. A randomized clinical trial. *Jama* 2017; 318 (23:2306–16 doi 10.1001/jama.2017.18718).
21. Riemenschneider M.J., Perry A., Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006; 5:1045-1054.
22. Rohringer M., Sutherland G.R., Louw D.F., Sima A.A. Incidence and clinicopathological features of meningioma. *J. Neurosurg.* 1989; 71:665-672.
23. Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63:275-286.
24. Bitzer M., Wöckel L., Luft A.R. i wsp. The importance of pial blood supply to the development of peritumoral brain edema in meningiomas. *J. Neurosurg.* 1997; 87:368-373.
25. Saleman M. Malignant meningiomas. W: Al-Mefty O. (red.) *Meningiomas.* Raven Press New York 1991.
26. Patchel R.A., Tibbs P.A., Walsh J.W. i wsp. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N. Engl. J. Med.* 1990; 332:494.
27. Graus F., Walker R.W., Allen J.C. Brain metastases in children. *J. Pediatr.* 1983; 103:558.
28. Coia L.R. The role of radiation therapy in the treatment of brain metastases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992; 23:229.
29. Posner J.B. Management of brain metastases. *Rev. Neurol.* 1992; 148:477.

30. Arbit E., Wronski M. The treatment of brain metastases. *Neurosurg. Cancer* 1995; 76, (595); 5:1.
31. Delattre J.Y., Krol G., Thaler H.T. i wsp. Distribution of brain metastases. *Arch. Neurol.* 1988; 45:741.
32. Jaskólski D.J., Papierz W., Biernat W., Liberski P.P. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. Kozubski W., Liberski P.P. Choroby układu nerwowego. PZWL, Warszawa 2004.
33. Jaskólski D.J., Liberski P.P., Kozubski W., Biernat W., Kordek R. Ogólne objawy kliniczne w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego. *Neuroonkologia kliniczna*. Czelej, Lublin 2011.
34. Gutmann D.H., Sherman L., Seftor L. i wsp. Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8:267-275.
35. Simon M., Park T.W., Leuenroth S. i wsp. Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, in meningioma progression. *J. Neurosurg.* 2000; 92:832-840.
36. Turk J.L. Inflammation: Juhn Hunter's a treatise on the blood, inflammation, and gunshot wounds. *J. Exp. Pathol.* 1994; 75(6):385-95.
37. Skalak T.C. Angiogenesis and microvascular remodeling: A brief history and future roadmap. *Microcirculation* 2005; 12: 47-58.
38. Krogh A. The anatomy and physiology of capillaries. Sagwan Press 2015.
39. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 2003; 3:643-651.
40. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.S. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-985.
41. Ferrara N., Hanzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 161:851-858.
42. Plouet J., Schilling J., Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989; 8:3801-3806.



43. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003; 9:669-676.
44. Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z. VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny, neuroprotekcyny. *Post. Hig. Med Dośw.* 2005; 59:573-583.
45. Breier G. Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta* 2000; 21, (Suppl.14), 11-15.
46. Sobczyńska-Rak A., Silmanowicz P., Polkowska I. Angiogeneza w nowotworach-czynniki wpływające na rozwój sieci naczyniowej guza oraz ocean neoangiogenezy w preparatach histopatologicznych. *Med. Weter.* 2016; 72 (9), 542-548.
47. Risau W., Flamme I. Vasculogenesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995; 11:73-91.
48. Kurzyk A. Angiogeneza-możliwości, problemy, perspektywy. *Post. Bioch.* 2015; 61(1).
49. Tomczyk M., Nowak W., Jaźwa A. Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Post. Bioch.* 2013; 59:357-365.
50. Skóra J., Biegus J., Pupka A., Pupka A., Barć P., Sikora J., Szyber P. Molekularne podstawy angiogenezy. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2006; 60:410-415.
51. Zielonka T.M. Angiogeneza-część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2003; 8:169-174.
52. Xu Wei-Hai. Large artery: an important target for cerebral small vessel diseases. *Ann. Transl. Med.* 2014; 2:78.
53. Xia Li Tian, Yang Li. Endothelial cell senescence and age-related vascular diseases. *J. Genet. Genomics* 2014; 41, 9:485-495.
54. Smith S. Angiogenesis and implantation. *Hum. Reprod.* 2000; 15(Suppl.6): 59-66.
55. Witte M.B., Barbul A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 1997; 77:509-528.
56. Hansen-Smith F.M., Morris L. Patterns of physiological angiogenesis in adult mesentery. *Angiogenesis: models, modulators, and clinical applications.* (wyd.) ME Maragoudakis Plenum Press 1998; 75-84.
57. Hazzard T.M., Stouffer R.L., Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development, *Bailliere's Clin. Obstet. Gynecol.* 2000; 14:883-900.
58. Banai S., Shweiki D., Pinson A. i wsp. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28:1176-1179.

59. Manoonkitiwongsa P.S., Jacson-Friedman C., McMillian P.J. i wsp. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J. Cerber Blood Flow Metab.* 2001; 21:1223-1231.
60. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
61. Limb G.A., Hickman-Casey J., Hollifield R.D. i wsp. Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 1999; 40:2453-2457.
62. Bouloumie A., Drexler H., Lafontan M. i wsp. The product of ob. gene, promotes angiogenesis. *Cris. Res.* 1998; 83:1059-1053.
63. Zhang Q.X., Magovern C.J., Mackm C.A. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated. *J. Surg. Res.* 1997; 67:147-154.
64. Gogacz M., Gałczyński K., Romanek-Piva K. Stężenie wybranych czynników angiogennych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą. *Ginekol. Pol.* 2015; 86:188-192.
65. Döme B., Hendrix M.J., Paku S., Tóvári J., Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 2007; 170: 1–15.
66. Szala S., Jarosz M. Nowotworowe naczynia krwionośne. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2011; 65:437-446.
67. Baeriswyl V., Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009; 19:329-337.
68. Pepper M.S., Mandriota S.J., Vassalli J.D. i wsp. Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* 1996; 213:31-67.
69. Zielonka TM. Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. 2004; *Alergia Astma Immunologia* 9(1), 25-31.
70. Gruchlik A., Chodurek E., Domal-Kwiatkowska D., Dzierżewicz Z. VEGF-A celem antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej. *Post. Biol. Kom.* 2007; 34:557-580.
71. Wojtukiewicz M., Sierko E. Podstawy terapii antyangiogennej u chorych na nowotwory. *Onkol. w Prak. Klin.* 2009; 5, (suplA), A1-A14.

72. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.* 2000; 26:561–569.
73. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001; 280:1358-1366.
74. Carrol V.A., Binder B.R. The role of the plasminogen activation system in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999; 25:183-197.
75. Vecchiarelli-Federico L.M., Cervi D., Haeri M., Li Y., Nagy A., BenDavid Y. Vascular endothelial growth factor-a positive and negative regulator of tumor growth. *Cancer Res.* 2010; 70:863-867.
76. Brockington A., Lewis C., Wharton S., Shaw P.J. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004; 30:427-446.
77. Mattei M.G., Borg J.P., Rosnet O., Marme D., Birnbaum D. Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics* 1996; 32:168-169.
78. Nakamura M., Abe Y., Tokunaga T. Pathological significance of vascular endothelial growth factor VEGF-A isoform expression in human cancer. *Pathol. Int.* 2002; 52:331-339.
79. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. *Faseb. J.* 1999; 13:9-22.
80. Connolly D.T., Heuvelman D., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel NR., Leimgruber RM., Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1989, 84:1470-1478.
81. Gospodarowicz D., Abraham J., Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo-stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86:7311-7315.
82. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18:4-25 .
83. Kerbel R., Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2:727-739.

84. Uttecht-Pudełko A., Partyka R., Jałowiecka I., Żerdziński M., Pieczyrak B., Kokocińska D. Udział VEGF-A i jego receptorów w procesie angiogenezy. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2014; 68, 6: 457–464.
85. Barańska P., Jerczyńska H., Pawłowska Z. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń-budowa i funkcje. *Post. Bioch.* 2005; 51 (1); s.14-15.
86. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y., Neufeld G. Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 18040-18045.
87. Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C., Pajusola K., Bueler H., Eichman A., Kauppinen R., Kettunen M.I., Yla-Herttuala S., Finegold D.N., Ferrell R.E., Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 12677–12682.
88. Karkkainen M.J., Petrova T.V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5598-5603.
89. Petrova TV., Makinen T., Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell Res.* 1999; 253:117-130.
90. Van der Geer P., Hunter T., Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1994; 10: 251-337.
91. Lu D., Kussie P., Pytowski B., Persaud K., Bohlen P., Witte I., Zhu Z. Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 14321-14330.
92. Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:4368–4380.
93. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: C1375-C1386.
94. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 1999; 77:527-543.

95. Kearney JB., Kappas NC., Ellerstrom C., DiPaola F.W., Bautch V.I. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 2004; 103: 4527-4535.
96. Cai J., Ahmad S., Jiang WG., Huang J., Kontos CD., Boulton M., Ahmed A. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 2003; 52: 2959-2968.
97. Scadden D.T. Cancer stem cells refined. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 701–703.
98. Zeng H., Dvorak H.F., Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 downregulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 26969-26979.
99. Soker S., Fidler H., Neufeld G., Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:5761-5767.
100. Ziegler Bl., Valtieri M., Porada GA., De Maria R., Muller R., Masella B., Gabbianelli M., Casella I., Pelosi E., Bock T., Zanjani ED., Peschle C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999; 285: 1553-1558.
101. Ebos J.M., Bocci G., Man S., Thorpe P.E., Hicklin D.J., Zhou D., Jia X., Kerbel R.S. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2:315-326.
102. Saaristo A., Karpanen T., Alitalo K. Mechanism of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000; 19:6122-6129.
103. Shalaby F., Ho J., Stanford W.L., Fischer K.D., Schuh A.C., Schwartz L., Bernstein A., Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997; 89:981990.
104. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25:581-611.
105. Dulak J., Józkowicz A. Rola cytokin, tlenku azotu i oksygenazy hemowej-1 w angiogenezie. W: Szlaki przekazywania sygnałów komórkowych. XXI Zimowa Szkoła

- Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2004. Red. I. Nalepa. Inst. Farmakol. PAN 2004; 115-122.
106. Luo J.C., Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factor (1a, 2a, 3a). *Oncogene* 2001; 20:1435-1444.
  107. Jarosz P., Woźniak B. *Angiogeneza w chorobach nowotworowych*. 2012; 4; 498-507.
  108. Prewett M., Huber Li Y., Santiago A., Oconnor W., King K., Overholser J., Hooper A., Pytowski B., Witte L., Bohlen P., Hicklin D.J. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res.* 1999; 59:5209-5218.
  109. Fairbrother W.J., Christinger H.W., Cochran A.G., Fuh G., Keenan C.J., Quan C., Shriver S.K., Tom J.Y. et al. Wells J.A., Cunningham B.C. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 1998; 37:17754-17764.
  110. Wood J.M., Bold G., Buchdunger E., Cozens R., Ferrari S., Frei J., Hofmann F. et al. A novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* 2000; 60:2178-2189.
  111. Morabito A., De Maio E., Di Maio M., Normanno N., Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 2006; 11: 753-764.
  112. Marchand G.S., Noiseux N., Tanguay J.F., Sirois M.G. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282: H194-204.
  113. Hucz J., Szala S. Receptor VEGFR-2-cel terapii kierowanej w chorobach nowotworowych. *Współcz. Onkol.* 2006; 10:506-514.
  114. Kępska M., Futoma-Kołoch B. Test immunoenzymatyczny ELISA-zasada działania i optymalizacja reakcji. *Techniki technologie infrastruktura* 2018, 2.
  115. Koehne P., Willam C., Strauss E., Schindler R., Eckardt K.U., Bühner C. Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 279: H817-H824.

116. Koczy-Baron E., Kasperska-Zajac A. Rola naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w procesach zapalnych. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2014; 68:57-65.
117. Pietrzykowska M., Reiwer-Gostomska M., Siebert J. Otyłość a angiogeneza. *Forum Med. Rodz.* 2014; 8:(4), 169-173.
118. Kunstfeld R., Hirakawa S., Hong Y.K., Schacht V., Lange-Asschenfeldt B., Velasco P., Lin C., Fiebiger E., Wei X., Wu Y., Hicklin D., Bohlen P., Detmar M. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004; 104: 1048-1057.
119. Zhang Y., Matsuo H., Morita E. Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 2006; 297: 425-429.
120. Palacio S., Schmitt D., Viac J. Contact allergens and sodium lauryl sulphate upregulate vascular endothelial growth factor in normal keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 1997; 137: 540-544.
121. Watanabe H., Mamelak A.J., Wang B., Howell B.G., Freed I., Esche C., Nakayama M., Nagasaki G., Hicklin D.J., Kerbel R.S., Sauder D.N. Anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1/KDR) antibody suppresses contact hypersensitivity. *Exp. Dermatol.* 2004; 13: 671-681.
122. Brown L.F., Olbricht S.M., Berse B., Jackman R.W., Matsueda G., Tognazzi K.A., Manseau E.J., Dvorak H.F., Van de Water L. Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. *J. Immunol.* 1995; 154: 2801-2807.
123. Xia Y.P., Li B., Hylton D., Detmar M., Yancopoulos G.D., Rudge J.S. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 2003; 102: 161-168.
124. Smith J.R., Lanier V.B., Brazier R.M., Falkenhagen K.M., White C., Rosenbaum J.T. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. *Br. J. Ophthalmol.* 2007; 91: 226-229.
125. Brown L.F., Harrist T.J., Yeo K.T., Stahle-Bäckdahl M., Jackman R.W., Berse B., Tognazzi K., Dvorak H.F., Detmar M. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 104: 744-749.

126. Sondell M., Lundborg G., Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 1999; 19: 5731-5740.
127. Sondell M., Sundler F., Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12: 4243-4254.
128. Oosthuyse B., Moons L., Storkebaum E., Beck H., Nuyens D., Brusselmans K., Van Dorpe J., Hellings P., Gorselink M., Heymans S., Theilmeier G., Dewerchin M., Laudenbach V., Vermylen P., Raat H., Acker T., Vleminckx V., Van Den Bosch L., Cashman N., Fujisawa H., Drost M.R., Sciot R., Bruyninckx F., Hicklin D.J., Ince C., Gressens P., Lupu F., Plate K.H., Robberecht W., Herbert J.M., Collen D., Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 2001; 28: 131-138.
129. Brockington A., Lewis C., Wharton S., Shaw P.J. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004; 30: 427-446.
130. Kajdaniuk D., Marek B., Fołyn W., Kos-Kudła B. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF w endokrynologii i onkologii. *Endokrynol Pol.* 2011; 62(5): 456-464.
131. Turner HE., Harris AL., Melmed S. et al. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2003; 24: 600-632.
132. Sato K., Yamazaki K, Shizume K. et al. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 1295-1302.
133. Ramsden J.D. Angiogenesis in the thyroid gland. *J. Endocrinol.* 2000; 166: 475-480.
134. Klein M., Picard E., Vignaud JM. et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J. Endocrinol.* 1999; 161: 41-49.
135. Khoury C.C., Ziyadeh F.N. Angiogenic factors. *Contrib Nephrol.* 2011; 170: 83-92.
136. Hitsuka S., Maru Y., Okada A. i wsp. Involvement of Flt-1 tyrosine A14. *Onkologia w praktyce klinicznej* 2009, tom 5, suplement A kinase (vascular endothelial growth receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 1207-1213.



137. Shi B., Wang X., Yang Z. Vascular endothelial growth factors and liver diseases. *Hepatology* 2001; 48: 1145-1148.
138. Garcia de la Torre N., Wass J.A.H., Turner H.E. Antiangiogenic effects of somatostatin analogs. *Clin. Endocrinol.* 2002; 57:425-441.
139. Inoue M., Itoh H., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Komatsu R., Doi K., Ogawa Y., Tamura N., Takaya K., Igaki T., Yamashita J., Chun TH., Masatsugu K., Becker AE., Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98:2108-2116.
140. Celletti FL., Waugh JM., Amabile PG., Brendolan A., Hilfiker PR., Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature Med.* 2001; 7:425-429.
141. Inoshima N. i wsp. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8:3480-3486.
142. Nowacka A., Smuczyński W., Rość D., Woźniak-Dąbrowska K., Śniegocki M. Serum VEGF- A concentration in patients with central nervous (CNS) tumors. *PLoS One* 2018; 13(3), 1-8.
143. Rafat N., Beck G., Schulte J., Tuettenberg J., Vajkoczy P. Circulating endothelial progenitor cells in malignant gliomas. *Clinical article. J. Neurosurg.* 2010; 112(1), 43-9.
144. Handzhiev D., Kiuchukov G., Enchev J., Avramov T., Georgiev R., Varbanova S. Plasma expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (BFGF) in patients with brain tumors. *J. IMAB* 2015; 21, 805-809.
145. Siedlecki Z. Ocena stężenia czynników angiogenezy w osoczu chorych leczonych operacyjnie z powodu nowotworów śródczaszkowych. *Rozprawa doktorska, Bydgoszcz* 2010.
146. Gornall R.J., Anthony F.W., Coombes E.J. et al. Investigation of women with endometrial carcinoma using serum vascular endothelial growth factor (VEGF) measurement. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2001; 11: 164-166.

147. Shimada H., Takeda A., Nabeya Y. et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663-669.
148. Holzer G., Obermair A., Koschat M. et al. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. *Med. Pediatr. Oncol.* 2001; 36: 601-604.
149. Oehler M.K., Caffier H. Prognostic relevance of serum vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 5109-5112.
150. Di Marco G.S., Reuter S., Hillebrand U., Amler S., König M., Larger E., Oberleithner H., Brand E., Pavenstädt H., Brand M. The soluble VEGF seceptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20(10): 2235-2245.
151. Robak E., Sysa-Jędrzejewska A., Robak T. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR1 and VEGFR2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Mediat. of Inflamm.* 2003; 12(5), 293-298.
152. Ismail Erturk, Erdim Sertoglu, Fatih Yesildal, Ramazan Acar, Kenan Saglam and Taner Ozgurtas. Evaluation of plasma VEGF and sVEGFR-1 levels in patients with diabetes mellitus receiving insulin treatment. *Turk. J. Biochem.* 2019; 44(2):182-188.
153. Stevens M., Oltean S. Modulation of receptor tyrosine kinase activity through alternative splicing of ligands and receptors in the VEGF-A/VEGFR. *Cells* 2019; 8,288.
154. Wierzbowska A., Robak T., Wrzesień-Kuś A., Krawczyńska A., Lech-Marańda E., Urbańska-Ryś H. Circulating VEGF and its soluble receptors sVEGFR1 and sVEGFR2 in patients with acute leukemia. *Eur. Cyt. Net.* 2003; 14, 3.
155. Gadomska G., Stankowska K., Boinska J., Ślusarz R., Tylicka M., Michalska M., Jachalska A., Roś D. VEGF-A, sVEGFR-1, and sVEGFR-2 in BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Medicina* 2017; 53 34-39.
156. Boiocchi L., Vener C., Savi F., Bonoldi E., Moro A., Fracchiolla N.S. i wsp. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Pathol.* 2011, 64(3):226-31.
157. Failla CM., Carbo M., Morea V. Positive and negative regulation of angiogenesis by soluble Vascular Endothelial Growth Factor. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19, 1-16.

158. Kemik O., Sumer A., Sarbay Kemik A., Purisa S., Tuzun S. Circulating levels of VEGF family and their receptors in hepatocellular carcinoma. *Bratisl. Lek. Listy* 2010; 111(9), 485-488.
159. Thielemann A., Baszczuk A., Kopczyński Z., Kopczyński P., Grodecka-Gazdecka S. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann. Agricult. Environ. Med.* 2013; 20,(2), 293-29.
160. Zarychta E., Rhone P., Bielawski K., Michalska M., Rość D., Ruszkowska-Ciastek B. Anti-angiogenic efficacy in invasive breast carcinoma patients depends on clinicopathological determinants. *Adv. Med. Sci.* 2019; 64(2):216-223.
161. Wieczór R., Gadomska G., Ruszkowska-Ciastek B., Stankowska K., Budzyński J., Fabisiak J., Suppan K., Pulkowski G., Rość D. Impact of type 2 diabetes on the plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors type 1 and type 2 in patients with peripheral arterial disease. *J. Zhejiang Univ-Sci. B (Biomed & Biotechnol)* 2015; 16(11):948-956.
162. Wieczór R., Rość D., Wieczór A., Kulwas A. Vascular-1 and vascular-2 as a new potential angiogenesis and endothelial dysfunction markers in peripheral arterial disease. *Clin. Appl. Thromb/Hemos.* 2019; 25; 1-8.
163. Ruszkowska-Ciastek B., Sokup A., Socha M., Ruprecht Z., Hałas L., Góralczyk B., Góralczyk K., Gadomska G., Rość D. A preliminary evaluation of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. 2014; *J. Zhejiang Univ-Sci. B (Biomed & Biotechnol)* 2014; 15(6):575-581.
164. Sugimoto M., Kondo M., Kamimoto Y., Ikeda T., Cutler A., Mariya A., Anand-Apte B. Changes in VEGF-related factors are associated with presence of inflammatory factors in carbohydrate metabolism disorders during pregnancy. *PLoS ONE* 2019; 14(8).
165. Suman K. Paine, Lakshmi K. Mondal, Prasanta K. Borah, Chandra K. Bhattacharya, Jagadish Mahanta. Pro-and antiangiogenic VEGF and its receptor status for the severity of diabetic retinopathy. *Molecular Vision* 2017; 23:356-363.
166. Ahmed M. Abu El-Asrar, Mohd Imtiaz Nawaz, Dustan Kangave, Mohammed Mairaj Siddiquei, Karel Geboes. Angiogenic and vasculogenic factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *J. Diab. Res.* 2013; 9.

167. Grochoła-Matecka I., Czajka-Francuz P., Owczarek A.J., Wojnar J., Handzlik G., Francuz T., Chudek J.. Serum levels of VEGF-A, sVEGFR-2 and galectin-3 do not correlate with clinical stage, tumor size, or effectiveness of perioperative chemotherapy in patients with non-metastatic breast cancer. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2022; 76: 96-105.
168. Yoshiko Aoyagi, Hisae Inuma, Atsushi Horiuchi, Ryu Shimada And Toshiaki Watanabe. Association of plasma VEGF-A, soluble VEGFR-1 and VEGFR-2 levels and clinical response and survival in advanced colorectal cancer patients receiving bevacizumab with modified FOLFOX6. *Oncol. Lett.* 2010; 1(2):253-259.
169. Romulo J.C. Albuquerque, Takahiko Hayashi, Won Gil Cho, Mark E. Kleinman, Sami Dridi, Atsunobu Takeda, Judit Z. Baffi, Kiyoshi Yamada, Hiroki Kaneko, Martha G. Green. Alternatively spliced VEGF receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessels. *Nat. Med.* 2009; 15(9): 1023-1030.
170. Harris H., Wolk A., Larsson A., Vasson MP., Basu S. Soluble vascular endothelial growth factor receptors 2 (sVEGFR-2) and 3 (sVEGFR-3) and breast cancer risk in the Swedish Mammography Cohort. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2016; 7(1):81-86.
171. Becker J., Pavlakovic H., Ludewig F., Wilting F., Weich HA., Albuquerque R, Ambati J., Wilting J. Neuroblastoma progression correlates with down-regulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. *Clin. Cancer. Res.* 2010; 1; 16(5):1431-1441.
172. Aweimer A., Stachon T., Tannapfel A., Köller M., Truss MC., Stachon A. Regulation of soluble VEGFR2 secreted by microvascular endothelial cells derived from human BPH. *Prost. Cancer and Prost. Dis.* 2012; 15, 157-164.
173. Schneider T. Mawrin Ch., Scherlach C., Skalej M., Firsching R. Gliomas in adults, *Deutsches Ärzteblatt International* 2010; 107, 45, 799-807.
174. Hardee M., Zagzag D. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2012; 181(4):1126-41.
175. Treps L., Perret R., Edmond S., Ricard D., Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J. Extracell. Ves.* 2017; 6(1).
176. Testa E., Palazzo C., Mastrantonio R., Viscomi MT. Dynamic interactions between tumor cells and brain microvascular endothelial cells in glioblastoma. *Cancers* 2022; 14, 3128.

177. Wenjie Chen, Deshen He, Zuyun Li, Xin Zhang, Denghua Pan, Gang Chen. Overexpression of vascular endothelial growth factor indicates poor outcomes of glioma: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(6):8709-8719.
178. Hlobilkova A., Ehrmann J., Knizetova P., Krejci V., Kalita O., Kolar Z. Analysis of VEGF, Flt-1, Flk-1, nestin and MMP-9 in relation to astrocytoma pathogenesis and progression. *Neoplasma* 2009; 56, 4, 284-290.
179. Carlos Alfonso Clara, Suely K.N. Marie, José Reynaldo Walther de Almeida, Alda Wakamatsu, Sueli Mieko Oba-Shinjo, Miyuki Uno, Munro Neville, Sérgio Rosemberg. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 $\alpha$  in human glioblastoma. *Neuropathology* 2014; 34, 4:343-352.
180. Ahir B.K., Engelhard H.H., Lakka S.S. tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* 2020; 57:2461-2478.
181. Phillips H., Armani M., Stavrou D., Ferrara N., Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth-factor messenger-RNA in human intracranial neoplasms-association with regions of necrosis. *Int J Oncol.* 1993; 2(6):913-919.
182. Takano S., Yoshii Y., Kondo S., Suzuki H., Maruno T., Shirai S., Nose T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res.* 1996; 56, 2185-2190.
183. Lamszus K., Ulbricht U., Matschke J., M.A Brockmann, Fillbrandt R., Westphal M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9, 1399-1405.
184. Noschka R., Gerbl F., Löffler F., Kubis J., Rodríguez A.A., Mayer D., Grieshaber M., Holch A., Raasholm M., Forssmann W.G. et.al. Unbiased identification of angiogenin as an endogenous antimicrobial protein with activity against virulent mycobacterium tuberculosis. *Front. Microbiol.* 2021; 11,3591.
185. Mahzouni P., Aghili E., Sabaghi B. An Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor expression in meningioma and its correlation with tumor grade. *Mid. East J. Cancer* 2018; 9(4): 288-294.
186. Quinn T. Ostrom M.A., M.P.H., Haley Gittleman M.S., Jordonna Fulop R.N., Max Liu, Rachel Blanda, Courtney Kromer B.A., Yingli Wolinsky Ph.D., M.B.A., Carol Kruchko

- B.A., and Jill S. Barnholtz-Sloan Ph.D. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro. Oncol.* 2015; 17:iv1-iv62.
187. Ling C., Pouget C., Rech F., Pflaum R., Treffel M., Bielle F., Mokhtari K., Casse J.M. et.al. Endothelial cell hypertrophy and microvascular proliferation in meningiomas are correlated with higher histological grade and shorter progression-free survival. *J/ Neuropathol. Exp. Neurol.* 2016; 75, (12), 1160-1170.
  188. Ya-Suo Ding, Han-Dong Wang, Ke Tang, Zhi-Gang Hu, Wei Jin, and Wei Yan. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Meningiomas and Peritumoral Brain Areas. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2008; 38,(4).
  189. Markovic M., Antunovic V., Milenkovic S., Zivkovic N. Prognostic value of peritumoral edema and angiogenesis in intracranial meningioma surgery. *JBUON* 2013; 18(2): 430-436.
  190. Siedlecki Z., Nowak K., Grzyb S., Shaik FA., Śniegocki M. Angiogenesis in brain tumors: gliomas and meningiomas. *ISSN, Eur. J. Mol. & Clin. Med.* 2021; 2515-8260, 8, 2.
  191. Walker A.E., Robins M., Weinfeld F.D. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology* 1985; 35(2):219-226.
  192. Barnholtz-Sloan J.S., Sloan A.E., Davis F.G. et.al. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin. Oncol.* 2004; 22(14):2865-2872.
  193. Wenting Ni, Wenxing Chen, Yin Lu. Emerging findings into molecular mechanism of brain metastasis. *Cancer Med.* 2018; 7:3820-3833.
  194. Huang H., Held-Feindt J., Buhl R.,Mehdorn H.M.,Mentlein R. Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors. *J Progr in Neurosurg, Neurol and Neurosci* 2005; 27(4):371-377.
  195. Lee Su Kim, Suyung Huang, Weixin Lu, Dina Chelouche Lev, Janet E Price. Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice. *Clin. Exp. Metastasis* 2004; 21(2):107-18.
  196. Yang Y., Cao Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease. *Semin Cancer Biol.* 2022; 86; 251-261.
  197. Aoyagi Y. i linuma H., Horiuchi A., Shimda R., Watanabwe T. Association of plasma VEGF-A, soluble VEGFR1 and VEGFR2 levels and clinical response and survival in

- advanced colorectal cancer receiving bevacizumab with modified FOLFOX6. *Oncol. Lett.* 2010; 1(2), 253-259.
198. Kulapaditharom B., Boonkitticharoen V., Sritara I. Plasma vascular endothelial growth factor dysregulation in defining aggressiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *Hindawi Publishing Corporation J. Oncol.* 2012; ID 687934.
199. Toi. M., Bando H., Ogawa T., Muta M., Hornig C., Weich A.W. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 98, 14-18.
200. Tang T-Y., Jiang F., Guo L., Si M-Y., Jiao X-Y.: The soluble VEGF receptor 1 and 2 expression in cerebral spinal fluid as an indicator for leukemia central nervous system metastasis. *J. Neurooncol.* 2013; 112, 329-338.
201. Takano S., Ishikawa E., Matsuda M., Sakamoto N. Akutsu H., Yamamoto T., Matsumura A. The anti-angiogenic role of soluble-form VEGF receptor in malignant gliomas. *Int. J. Oncol.* 2017; 50, 515-524.
202. George D.J., Halabi S., Shepard T.F. et al. Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 1932-1936.

## 16. Załączniki

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
**KOMISJA BIOETYCZNA**  
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

Bydgoszcz, 20.09.2016r

**KB 596/2016**

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 marca 1999 r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCI

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **20.09.2016r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

**prof. dr hab. n. med. Danuta Rość**  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- dr n. med. Andrzej Swincow, dr n. med. Maciej Bierwa  
dr n. med. Abu Sitta Al Drawi, dr n. med. Renata Jabłońska  
lek. med. Marcin Wierciński, inż. Barbara Góralczyk,

w sprawie badania:

**„Angiogeneza a proces hemostazy w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła


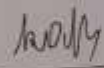
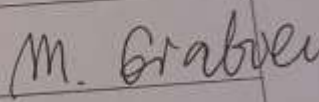
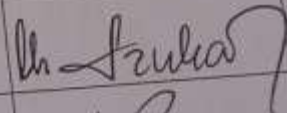

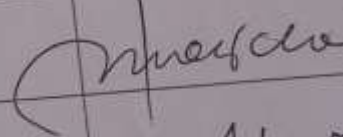
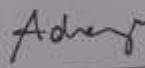

**Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku**

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich o pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datą najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej na takie badanie;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiające identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacyjnego i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.



Lista obecności  
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej  
w dniu 19.06.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Poletek-Zygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy  
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 596/2016

Bydgoszcz, 19.06.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu 19.06.2018 r. przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na włączenie do zespołu badawczego następująca osobę:  
- mgr Magdalенę Zduńską

którą złożyła:

prof. dr hab. n. med. Danuta Rośc  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

**„Angiogeneza a proces hemostazy w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 20.09.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:


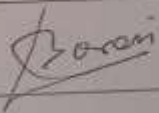
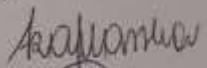
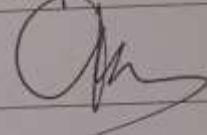
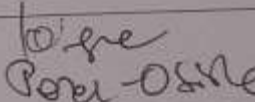
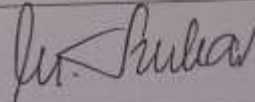

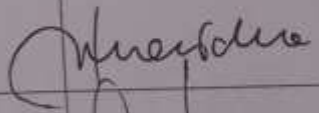
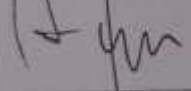
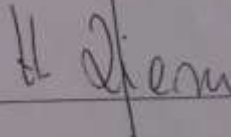
prof. dr hab. n. med. Danuta Rośc  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Świadczam zgodę i wyrażam

SPECJALISTA

mgr inż. Agnieszka Głowacka

**Lista obecności**  
**na posiedzeniu Komisji Bioetycznej**  
**w dniu 20.09.2016 r.**

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciuński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
	Ks. dr hab. Wojciech Szukański, prof. UAM		
	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
	Dr hab. n. med. Maria Kłopotcka		
	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
	Mgr piel. Hanna Ziemniarska		

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby, Nr historii choroby pacjenta (L.k.s.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tego badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania w okresie dwudziestu lat.

**Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (20.09.2016 r.) do końca 2020r.**

Wysłana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawianego projektu. Każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik z opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:  
prof. dr hab. n. med. Danuta Roś  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Zwierzdam zgodność z oryginałem  
29.09.19  
mgr inż. Agnieszka

## 17. Wykaz tabel

Tabela 1. Podział pierwotnych nowotworów OUN według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) z 2007 roku.

Tabela 2. Rodzina VEGF-rola biologiczna.

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna chorych z guzami śródczaszkowymi.

Tabela 4. Stężenie badanych parametrów w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=30).

Tabela 5. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (pg/mgP).

Tabela 6. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69).

Tabela 7. Stężenie badanych parametrów w osoczu krwi i homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (pg/mgP).

Tabela 8. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na: glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta).

Tabela 9. Badane parametry angiogenezy oraz ich współczynniki sVEGFR1/VEGF-A i sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I, n=5), glejaki o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Tabela 10. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie guza osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), glejaki o wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta).

Tabela 11. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Tabela 12. Współczynniki sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 13. Wartości współczynników sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) oraz w grupie kontrolnej (n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Tabela 14. Wartości współczynników sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Tabela 15. Współczynniki sVEGFR1/VEGF-A oraz sVEGFR2/VEGF-A w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II), oponiaki i guzy przerzutowe (Meta) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Tabela 16. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi osób chorych na guzy śródczaszkowe z podziałem na płeć (K=45, M=24).

Tabela 17. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie tkanki guza osób chorych z podziałem na płeć (K=45, M=24).

Tabela 18. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w osoczu krwi oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe z podziałem na wiek pacjentów (<65 n=42, >65 n=27).

Tabela 19. Stężenie badanych parametrów angiogenezy w homogenacie guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) z podziałem na wiek (<65 n=42, >65 n=27).

## 18. Wykaz rycin

Rycina 1. Powstawanie nowego naczynia krwionośnego.

Rycina 2. Podział grupy badanej ze względu na płeć. Kobiety stanowiły 65% (n=45), a mężczyźni (n=24) 35% wśród osób badanych.

Rycina 3. Podział grupy badanej ze względu na typ histopatologiczny guza.

Rycina 4. Podział grupy badanej ze względu na wiek.

Rycina 5. Stężenie VEGF-A w osoczu w grupie osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

Rycina 6. Stężenie sVEGFR1 w osoczu osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

Rycina 7. Stężenie sVEGFR2 w osoczu osób chorych na guzy śródczaszkowe oraz grupie kontrolnej.

Rycina 8. Stężenie VEGF-A wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Rycina 9. Stężenie sVEGFR1 wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Rycina 10. Stężenie sVEGFR2 wyrażone w pg/mgP w osoczu krwi osób chorych oraz zdrowych.

Rycina 11. Stężenie VEGF-A w osoczu oraz homogenacie guza osób chorych.

Rycina 12. Stężenie sVEGFR1 w osoczu oraz tkance guza osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69).

Rycina 13. Stężenie sVEGFR2 w osoczu oraz homogenacie guza osób chorych.

Rycina 14. Stężenie VEGF-A w osoczu oraz homogenacie w grupie osób chorych po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 15. Stężenie sVEGFR1 w osoczu oraz homogenacie w grupie osób chorych po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 16. Stężenie sVEGFR2 w osoczu osób chorych na glejaki I (n=5), glejaki II (n=16), meta (n=30) oraz oponiaki (n=18).

Rycina 17. Stężenie VEGF-A w homogenacie u osób chorych na glejaki I (n=5), glejaki II (n=16), meta (n=30) oraz oponiaki (n=18).

Rycina 18. Stężenie VEGF-A w homogenacie osób chorych na glejaki o niskim stopniu zaawansowania (glejaki I, n=5), wysokim stopniu zaawansowania (glejaki II, n=16), oponiaki (n=18) i guzy przerzutowe (meta, n=30) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 19. Wartości współczynnika sVEGFR1/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 20. Wartości współczynnika sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 21. Wartości współczynnika sVEGFR1/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).

Rycina 22. Wartości współczynnika sVEGFR2/VEGF-A w osoczu oraz homogenacie osób chorych na guzy śródczaszkowe (n=69) po przeliczeniu na 1 mg białka (mgP).