

(ANTY)ANGIOGENEZA W NERWIAKU ZARODKOWYM WSPÓLCZULNYM U PACJENTÓW PEDIATRYCZNYCH

(ANTY)ANGIOGENSIS
IN CHILDHOOD NEUROBLASTOMA

Patrycja SUJKA-KORDOWSKA, Agnieszka MALIŃSKA, Maciej ZABEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Z punktu widzenia biologii nowotworów, jednym z najistotniejszych procesów, pozwalających na ich wzrost, rozwój i progresję, jest naczyńiotworzenie, głównie na drodze angiogenezy. Nowopowstałe naczynia krwionośne uczestniczą w wymianie substancji odżywczych, gazów oraz metabolitów, jak również stwarzają możliwość rozsiewu komórek nowotworowych w organizmie. Do nowotworów bogato unaczynionych należy nerwiak zarodkowy współczulny. Jest to najczęstszy guz lity u pacjentów pediatrycznych wywodzący się z komórek listewki nerwowej. Nowotwór ten charakteryzuje się stosunkowo wysoką wyleczalnością, lecz zależne to jest od współistnienia wielu cech korzystnych rokowniczo. Niemniej, usprawnienie procesu terapeutycznego stwarza możliwość wyleczenia większej liczby pacjentów. Jednym z kierunków, które dają szansę na efektywniejsze leczenie, jest terapia antyangiogenna. Wydaje się, że neuroblastoma jest nowotworem wrażliwym na działanie inhibitorów angiogenezy, a dotychczasowe badania potwierdzają użyteczność tego typu leków w terapii nerwiaka.

Słowa kluczowe: angiogeneza, waskulogeneza, neuroblastoma, nerwiak zarodkowy, antyangiogeneza

Summary: The new blood vessels formation, especially through the angiogenesis, is a key process in carcinogenesis. Ten blood vessels supply the nutritions, oxygen and transport the metabolites, as well as they are involved in metastasis. Neuroblastoma is one of the most vascularized cancers and represents one of the most frequent solid tumors of childhood arising along the sympathetic nervous system. Clinically neuroblastoma is heterogenous thus the therapy standards are not perfect. The antyangiogenic therapy seems to improve the effectiveness of neuroblastoma treatment.

Key words: angiogenesis, vasculogenesis, neuroblastoma, antyangiogenesis

MECHANIZMY POWSTAWANIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH ANGIOGENEZA

Za prawidłowy wzrost i rozwój organizmu człowieka odpowiada wiele procesów fizjologicznych oraz biologicznych. Ich współistnienie warunkuje utrzymanie homeostazy organizmu.

Jednym z pierwszych procesów mających miejsce podczas organogenezy zarodka jest naczyńniotworzenie. Zachodzi ono na drodze trzech odmiennych mechanizmów: waskulogenezy, angiogenezy oraz arteriogenezy, prowadząc do wytworzenia nowej sieci naczyniowej.

Naczyńniotworzenie na drodze waskulogenezy zachodzi prawie wyłącznie w okresie embrionalnym. Proces ten może jednak towarzyszyć niektórym stanom chorobowym, m.in.: nowotworom, uszkodzonej rogówce, czy chorobie niedokrwiennej kończyn dolnych, gdzie zaobserwowano udział komórek prekursorowych śródbłonna w formowaniu nowych naczyń krwionośnych [5, 59, 63]. Waskulogeneza polega na powstawaniu naczyń krwionośnych z komórek macierzystych śródbłonna – hemangioblastów, pochodzących z wysp krwiotwórczych woreczka żółtkowego zarodka. W efekcie dochodzi do wytworzenia pierwotnego splotu naczyniowego zarodka w obszarach nieunaczynionych, co ma miejsce około 3 tygodnia embriogenezy [8, 27, 29, 39]. Jest to zatem proces charakterystyczny dla początkowego okresu rozwoju zarodka.

Zainicjowane przez waskulogenezę naczyńniotworzenie jest kontynuowane w późniejszych etapach embriogenezy, jednak na drodze odmiennych mechanizmów. Są za to odpowiedzialne dwa procesy: angiogeneza oraz arteriogeneza. W przypadku obu procesów nowe naczynia krwionośne powstają w wyniku rozwoju/przekształcenia naczyń już istniejących.

Arteriogeneza prowadzi do wytworzenia naczyń tętniczych o dużej średnicy. Polega na przekształceniu istniejących tętniczek kolateralnych w funkcjonalne tętnice o właściwościach wazomotorycznych, co jest następstwem rozrostu i pogrubienia ich warstwy środkowej (mięśniowej) [52]. Arteriogeneza fizjologicznie ma miejsce jedynie w okresie życia płodowego, natomiast może również zachodzić w określonych stanach patologicznych, np. w dojrzałym niedokrwionym i niedotlenionym sercu lub nowotworach [93].

W życiu postnatalnym u podłoża fizjologicznego naczyńniotworzenia leży angiogeneza. Proces ten ma miejsce w trakcie cyklu menstruacyjnego podczas remodelowania błony śluzowej macicy oraz w trakcie tworzenia ciała żółtego, implantacji zarodka w endometrium i formowania łożyska [42, 82]. Towarzyszy także kostnieniu na podłożu chrzęstnym a także odpowiada za tworzenie ziarniny podczas gojenia się ran [17, 96]. Angiogeneza może być również kluczowym elementem patomechanizmu niektórych chorób. Towarzyszy takim zaburzeniom

jak: przewlekłe zapalenia (reumatoidalne zapalenie stawów, astma), schorzenia gastroenterologiczne (choroba Crohna), naczyniowo-kardiologiczne (miażdżyca, choroba niedokrwienna mięśnia sercowego) czy cukrzyca [18, 32, 37, 56, 78, 91]. Wieloletnie obserwacje potwierdziły również udział i ogromne znaczenie angiogenezy w rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych [35, 36, 37].

Mechanizm angiogenezy jest złożony i wieloetapowy. Komórki śródbłonna istniejących naczyń krwionośnych zostają aktywowane w wyniku oddziaływania czynników o charakterze fizycznym (hipoksja) i humoralnym. Do tej drugiej grupy zalicza się cytokiny proangiogenne, spośród których znamioną rolę odgrywają białka należące do rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*). Aktywowane komórki endotelium rozpoczynają migrację w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, co uwarunkowane jest lokalnym działaniem enzymów proteolitycznych, i jednocześnie proliferują. W efekcie dochodzi do wytworzenia błony wewnętrznej naczyń krwionośnych oraz wydłużonych struktur ze światłem – kapilar. Do uformowania pełnowartościowych naczyń niezbędna jest rekrutacja pericytów oraz, w przypadku dużych naczyń, również komórek mięśni gładkich [98].

Regulacja procesu angiogenezy wymaga kooperacji czynników o różnym charakterze: różnego rodzaju komórek, składników substancji międzykomórkowej oraz związków chemicznych, które wykazują właściwości pro- lub antyangiogenne. Szczególnie istotna jest ta ostatnia grupa czynników. Uważa się, że zrównoważona ekspresja czynników stymulujących i hamujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych ma kluczowe znaczenie dla regulacji procesu angiogenezy. W życiu pozapłodowym, w warunkach fizjologicznych przeważa produkcja cytokin antyangiogennych, co blokuje naczyniotworzenie. Wiadomym jest jednak, że w określonych stanach fizjologicznych, jak również patologicznych, dochodzi do uruchomienia procesu angiogenezy, co związane jest z przesunięciem równowagi na rzecz czynników proangiogennych (tzw. *angiogenic switch*) [41, 81].

ANGIOGENEZA A NOWOTWORY

Naczyniotworzenie na drodze angiogenezy jest jedną ze składowych, które leżą u podstaw patomechanizmu wielu chorób. Istotną pod tym względem grupą schorzeń są nowotwory. Wieloletnie badania nad biologią tych chorób pozwoliły na wyłonienie czynników mających wpływ na ich wzrost i rozwój, wśród których kluczowym wydaje się być proces naczyniotworzenia. Obserwacje te dotyczą przede wszystkim guzów litych, ale również nowotworów o charakterze uogólnionym (białaczki, chłoniaki), które wykazują potencjał angiogeny [85]. Wy-

kazano szereg zależności pomiędzy zwiększonym naczyniotworzeniem a prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów w wielu typach nowotworów, m.in.: raku sutka, prostaty, pęcherza moczowego, głowy i szyi oraz jelita grubego [9, 10, 38]. Zaobserwowano również bezpośredni wpływ intensywności angiogenezy na wzrost guzów raka endometrium, płuc, prostaty czy przełyku [68, 85, 90, 94]. Stwierdzono również, że nowe naczynia krwionośne mogą powstawać w szpiku kostnym pacjentów z białaczką [1, 44, 65, 71, 73].

Podłoże powstawania nowych naczyń krwionośnych w nowotworach jest złożone i wielowymiarowe, przy czym determinantą decydującą o zainicjowaniu naczyniotworzenia jest wzrost masy nowotworowej. W początkowej fazie rozwoju nowotworu składniki odżywcze, czynniki wzrostu, tlen oraz produkty przemiany materii wytwarzane przez komórki nowotworowe transportowane są na drodze dyfuzji z, oraz do istniejących naczyń krwionośnych w okolicznych tkankach. Krytycznym momentem, od którego zależy dalszy rozwój nowotworu, jest osiągnięcie przez guz masy około 1 miliona komórek i objętości 1-2 mm³ [34]. Dochodzi wówczas do wytworzenia ognisk martwiczych w centralnej części guza, co jest spowodowane niewydolnością transportu substancji poprzez dyfuzję z tkanek otaczających. W obszarach dotkniętych martwicą pojawia się stres metaboliczny objawiający się m.in. hipoksją i kwasicą, co generuje nadekspresję HIF1 α (ang. *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*) w komórkach nowotworowych, który z kolei oddziałuje na komórki śródbłonna naczyń znajdujących się bezpośrednim sąsiedztwie. Zaktywowane komórki endotelialne zaczynają produkować czynniki wzrostu naczyń krwionośnych, w tym najistotniejszy VEGF. „Przełącznik angiogeny jest włączony” [41, 54].

W wyniku uruchomienia procesu naczyniotworzenia, w obrębie guza nowotworowego powstaje nowa sieć naczyniowa, pozwalająca na stały dostęp do składników odżywczych i tlenu. Nowopowstałe naczynia krwionośne pośredniczą także w rozsiewie komórek nowotworowych w organizmie, umożliwiając powstawanie wtórnych ognisk nowotworowych – przerzutów [28]. Produkują także czynniki wzrostu, hormony i cytokiny, które bezpośrednio oddziałują na komórki guza, jak również wykazują właściwości proteolityczne, sprzyjając tym samym inwazji nowotworu na okoliczne tkanki [13, 74, 80]. Ponadto, poprzez produkcję cytokin o charakterze immunosupresyjnym (głównie VEGF, ale także TGF β (ang. *Tumor Growth Factor beta*), PGE2 (ang. *Prostaglandin E2*), IL-10 (ang. *Interleukin 10*)) obecność wtórnych ognisk nowotworowych przyczynia się do „ucieczki” komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [86].

Naczynia krwionośne guza nowotworowego znacząco różnią się od naczyń prawidłowych. W wyniku zburzenia równowagi w działaniu czynników o charakterze pro- i antyangiogeny, prawidłowy układ naczyń małego kalibru oraz naczyń włosowatych ulega aberracji, co przejawia się zmianą ich struktury, kształtu oraz rozmiaru. Na skutek chaotycznego przebiegu sieci naczyniowej, niepełnego zróżnicowania tętniczo-żylnego i istnienia ślepych odgałęzień, prędkość przepływu

krwi jest często znacznie spowolniona. Obecność licznych porów w ścianie naczyń w sposób istotny wpływa na zwiększenie ich przepuszczalności [25, 87]. Przyczyniają się do tego również zmiany morfologiczne komórek śródbłonka [88].

Hipotezę mówiącą o niezwykle istotnym znaczeniu naczyńotworzenia dla rozwoju guza nowotworowego postawił w 1971 roku po raz pierwszy Judah Folkman. Stanowiła ona punkt wyjścia dla kolejnej idei, która pojawiła się już rok później – zahamowanie procesu angiogenezy może zahamować również rozwój guza [36]. Do dnia dzisiejszego próba zastosowania inhibitorów angiogenezy w terapii antynowotworowej jest przedmiotem intensywnych badań.

TERAPIA ANTYANGIOGENNA

Z uwagi na złożoną biologię nowotworów, mechanizmy obronne wytwarzane przez komórki nowotworowe, jak również niedoskonałość dotychczas stosowanych metod leczniczych, istnieje ogromna potrzeba usprawnienia procesu terapeutycznego tychże chorób. Strategie leczenia antynowotworowego powstają w oparciu o analizę funkcjonowania nowotworów, a ich głównym celem jest zahamowanie rozwoju choroby oraz eliminacja komórek nowotworowych. Tym samym, poznanie specyfiki chorób nowotworowych, która warunkuje ich wzrost i rozwój, jest strategiczne z punktu widzenia terapii.

Poznane dotychczas cechy nowotworów wskazują na niekwestionowane znaczenie angiogenezy dla rozwoju tych chorób. Oczywistym jest zatem, że terapia antyangiogenna stała się jednym ze sposobów walki z nowotworami [48].

Funkcjonowanie leków o charakterze antyangiogennym bazuje w oparciu o mechanizm ich działania. Wyróżnia się dwa odmienne kierunki ich oddziaływania: bezpośredni oraz pośredni. Leki o bezpośrednim oddziaływaniu hamują proliferację komórek śródbłonka (taksol, herbimycyna, talidomid) oraz ich migrację (genistenina, linomid) poprzez indukcję programowanej śmierci komórki [31, 57]. Z kolei inhibitory pośrednie wykazują wieloraki sposób działania: mogą mieć charakter czynników blokujących cytokiny proangiogenne (bavacyzumab) oraz ich receptory (sorafenib, sunitinib) rekombinowanych syntetycznych cytokin antyangiogennych (angiostatyna, endostatyna) jak również mogą hamować enzymy proteolityczne (marimastat, prinomastat) [40, 47, 66, 95, 99].

Szeroki wachlarz działania leków antyangiogennych sprawia, że znajdują one zastosowanie w terapii większości nowotworów (dopuszczone do użytku bądź na zaawansowanym etapie badań klinicznych). Leczenie antyangiogenne charakteryzuje się wysoce swoistym efektem terapeutycznym, działaniem niezależnym od lokalizacji i typu nowotworu, jak również prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych na skutek niszczenia komórek śródbłonka, oraz ze względu na stabilność genetyczną komórek endotelium, nie skutkuje nabywaniem lekooporności [20].

Wśród wielu testowanych substancji o charakterze antyangiogenym, szczególnie miejsce zajmuje bewacyzumab (Avastin). Jest to rekombinowane ludzko-mysie przeciwciało, które ma zdolność wiązania i neutralizowania wszystkich izoform naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu, będącego najbardziej istotną cytokiną zaangażowaną w angiogenezę. Tym samym bewacyzumab hamuje angiogenezę zależną od VEGF, jak również prowadzi do regresji naczyń już istniejących [33]. Zmiana morfologii naczyń guza oraz ich regresja znacząco redukuje ciśnienie śródmiąższowe w obrębie guza, co ułatwia penetrację chemioterapeutyków do komórek nowotworowych [92]. Wydaje się, że skojarzenie terapii antyangiogennej oraz leczenia cytostatykami i/ bądź radioterapią wykazuje większą skuteczność niż monoterapia antyangiogenna [3]. W chwili obecnej bewacyzumab zatwierdzony jest przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) jako lek pierwszego rzutu w terapii przerzutowego raka jelita grubego oraz raka piersi [23].

Terapia antyangiogenna obciążona jest ryzykiem wystąpienia niekorzystnych skutków ubocznych. Leki angiosupresyjne stosowane są ogólnosystemowo, wobec czego mogą prowadzić do zaburzeń procesu tzw. fizjologicznej angiogenezy. Konsekwencją może być nieprawidłowe gojenie się ran czy anomalie w funkcjonowaniu żeńskich narządów rozrodczych. Leki te mogą w negatywny sposób wpływać na hemopoezę czy funkcjonowanie komórek śródbłonka. Często obserwowanym niepożądanym efektem tego typu leczenia jest perforacja naczyń krwionośnych prowadząca do krwotoków, czego konsekwencją jest niedokrwienie i niedotlenienie narządów [45].

NERWIAK ZARODKOWY WSPÓŁCZULNY/ NEUROBLASTOMA

Szczególne miejsce wśród nowotworów zajmują nowotwory występujące u dzieci. Stanowią 0,5-2 % wszystkich nowotworów, niemniej są drugą po wypadkach, zatruciach i urazach przyczyną zgonów w tej grupie wiekowej. Charakteryzują się odmienną niż nowotwory osób dorosłych biologią oraz etiopatogenezą. Rozwijają się z reguły z tkanek, nie narządów, wzrastają znacznie szybciej, ale jednocześnie są bardziej chemo- i radiowrażliwe, co przekłada się na wyższy współczynnik przeżycia [53].

Najczęstszym guzem litym w grupie pacjentów pediatrycznych, zlokalizowanym pozaczaszkowo, jest nerwiak zarodkowy współczulny (neuroblastoma). Stanowi 6-8% wszystkich nowotworów tego okresu życia. Szczyt zachorowania przypada na 2. rok życia, najczęściej rozwija się najpóźniej do 5. roku życia. Jednocześnie jest to najczęstszy nowotwór okresu noworodkowego.

Neuroblastoma rozwija się z komórek nerwowych, z której w warunkach prawidłowych powstają zwoje układu współczulnego oraz rdzeń nadnerczy. Z tego

powodu najczęstszym umiejscowieniem nerwiaka są: okolica zaotrzewnowa jamy brzusznej (60-80%), tylne śródpiersie (15%), szyja (2-5%) oraz miednica (2-5%). Nieznana jest do tej pory etiologia tego nowotworu. Znana jest dziedziczna postać tego nowotworu – 1 do 2% pacjentów posiada dodatni wywiad rodzinny. Badania cytogenetyczne ujawniły najczęstsze dla nerwiaka zmiany materiału genetycznego: delecję 1p36, mutację genu kodującego kinazę ALK (ang. *Anaplastic Lymphoma Kinase*), amplifikację protoonkogenu MYCN (ang. *Myelocytomatosis viral oncogene Neuroblastoma*) [70].

W chwili obecnej 5-letnie przeżycie dzieci do 1. roku życia cierpiących z powodu nerwiaka zarodkowego wynosi 95%, natomiast dzieci do 14 roku życia 68% [14]. Dane te napawają optymizmem, należy zwrócić jednak uwagę na duże wahania prognostyczne zależne m.in. od wieku pacjenta, uwarunkowań genetycznych czy cech histologicznych guza. Warto również zaznaczyć, że w momencie rozpoznania choroby u 70% pacjentów obecne są już przerzuty odległe [2]. Istotnymi z punktu widzenia prognozy dla pacjenta są takie czynniki jak: wiek w momencie rozpoznania (do 1 r.ż. 5-letnie przeżycie wynosi 95%, a w przedziale 5-9 lat – 52%); miejsce ogniska pierwotnego – gorsze rokowanie wiąże się z umiejscowieniem guza w nadnerczach; brak stabilności genetycznej – amplifikacja MYCN i mutacja genu ALK są niekorzystne rokowniczo. Nie bez znaczenia są również pewne cechy histopatologiczne guza – wysoki indeks mitotyczny czy stopień odróżnicowania komórkowego. Ze względu na wielorakość cech mogących rzutować na przebieg choroby, ocena prognozy dla pacjentów z neuroblastoma nie jest łatwa. Dlatego też dla oceny stopnia zaawansowania nowotworu, a tym samym rokowania, stosuje się skalę INSS (ang. *International Neuroblastoma Staging System* wg Ewans, D'Angio i Randolpha) [2, 70].

Ciekawą obserwacją, określaną wręcz mianem fenomenu, jest samoistna regresja nerwiaka zarodkowego u niemowląt, bardzo często w najwyższym stopniu zaawansowania IVS wg skali INSS. Cechami, które w głównej mierze predysponują do wystąpienia tego zjawiska, są określone uwarunkowania genetyczne. Z kolei u starszych dzieci obserwuje się transformację złośliwego nerwiaka do łagodnej postaci ganglioneuroma [12].

Leczenie neuroblastoma opiera się na zastosowaniu schematów leczenia skojarzonego, przy czym intensywność terapii uzależniona jest od stopnia zaawansowania choroby, wieku pacjenta i cech biologicznych guza [14]. U dzieci młodszych (niemowlęta) oraz przy I stopniu zaawansowania wystarczające jest leczenie chirurgiczne. W pozostałych przypadkach włącza się również chemioterapię i/lub radioterapię. Przy zastosowaniu chemioterapii stosuje się skojarzone leczenie winkrystyną, endoksanem, doksorubicyną, cisplatyną, etopozydem oraz karboplatyną [70]. Nadal podejmowane są próby poszukiwania skuteczniejszych form leczenia. Zalicza się do nich autologiczne przeszczepy szpiku kostnego, zastosowanie kryzotyningu czy leków hamujących angiogenezę [24, 70].

ANGIOGENEZA W NERWIAKU ZARODKOWYM

Analogicznie do wielu nowotworów o charakterze guzów litych, nerwiak zarodkowy zaliczany jest do grupy nowotworów bogato unaczynionych. Wiele doniesień literaturowych wskazuje na znaczący wpływ procesu angiogenezy dla wzrostu i rozwoju neuroblastoma, co jednocześnie implikuje potencjalne zastosowanie inhibicji naczyniotworzenia, jako metody terapeutycznej.

Lata 90-te XX wieku to okres intensywnych badań na rolę angiogenezy w nowotworzeniu. W tym okresie pojawiły się pierwsze doniesienia sugerujące związek pomiędzy powstawaniem nowych naczyń krwionośnych a rozwojem nerwiaka zarodkowego. W 1994 roku Kleinman i wsp. wykazali, że wstrzyknięcie komórek neuroblastoma myszom inicjuje naczyniotworzenie w okolicy iniekcji już po 2 dniach [50]. Meitar i wsp. przeprowadzając badania nad pierwotnymi guzami nerwiaka pochodzącymi od 50 pacjentów zaobserwowali, że dobrze rozwinięta waskulatura charakteryzowała przypadki z rozsianym typem choroby, natomiast mniejsze ukrwienie wiązało się z łagodną postacią nowotworu [62]. Badania przeprowadzone w 1998 roku przez Ribatti i wsp. wykazały, że komórki linii neuroblastoma (LAN-5 i GI-LI-N) produkują substancje, które w warunkach *in vitro* stymulują proliferację komórek śródbłonna [75]. Ponadto, grupa ta zaobserwowała, że przeciwciała anti-VEGF blokują zależne od komórek nerwiaka podziały endotelium. Z kolei Canete i wsp., którzy w badaniach na guzach pochodzących od 69 pacjentów oceniali ich unaczynienie z wykorzystaniem przeciwciał anti-CD34, nie wykazali zależności pomiędzy ilością naczyń krwionośnych a innymi czynnikami złej prognozy (m.in.: wiek, stopień zaawansowania, liczba kopii genu MYCN), jak również u pacjentów, którzy przeżyli lub zmarli w wyniku choroby. Wskazywałoby to na brak korelacji występowania procesu z prognozą pacjentów z nerwiakiem [16].

Wiele doniesień wskazuje na udział czynników o charakterze proangiogennym w indukcji angiogenezy w zmianach neuroblastycznych. W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych i guzach pierwotnych neuroblastoma zaobserwowano produkcję przez komórki nowotworowe dużej ilości naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu [61]. Stwierdzono ponadto, że komórki te wykazują ekspresję receptora VEGF. Langer i wsp. wykazali metodą RT-PCR obecność transkryptu VEGF w liniach komórkowych, jak również w próbkach pochodzących od pacjentów z nerwiakiem [55]. Grupa Eggert i wsp. zaobserwowała wysoką ekspresję wielu stymulatorów angiogenezy (VEGF, FGF-2, Ang-2, TGF alfa, PDGF-A) w guzach pobranych od pacjentów, która korelowała z ze stopniem zaawansowania choroby. Ponadto, wykazano, że hodowla linii komórek neuroblastoma w obecności receptora neurotropiny (korzystny czynnik rokowniczy) skutkowało obniżeniem ekspresji VEGF, FGF-2, angiogeniny i TGFalpha [30]. Z kolei w badaniach na myszach z przeszczepionymi komórkami nerwiaka stwierdzono, że poziom VEGF-A w krwi obwodowej wzrasta wraz z objętością transplantowanych komórek [7]. W angioge-

nezie nowotworowej duże znaczenie przypisuje się enzymom o charakterze metaloproteinaz (MMP). Szczególnie istotne w nowotworzeniu są dwie z nich: MMP-2 oraz MMP-9, ponieważ odpowiedzialne są za degradację kolagenu i fibronektyny substancji międzykomórkowej, co jest niezwykle istotne dla migracji komórek śródbłonna w trakcie powstawania nowych naczyń krwionośnych. W badaniach na guzach nerwiaka zarodkowego z 1998 roku stwierdzono podwyższony poziom MMP-2 w zrębie nowotworu, jak również obniżoną ekspresję inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 (ang. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*), co korelowało z ze stopniem zaawansowania klinicznego [4]. Podobne wyniki uzyskała grupa Sugiura i wsp., gdzie wyższy poziom MMP-2 i MMP-9 obserwowany był u pacjentów z IV stopniem zaawansowania [84]. Badania immunocytochemiczne przeprowadzona na materiale biopsyjnym pobranym od pacjentów z nerwiakiem wykazały, że bogatsze unaczynienie wiąże się z wyższą ekspresją metaloproteinaz, co jednocześnie koreluje z progresją choroby [77].

Wydaje się także, że negatywny rokowniczo wskaźnik, jakim jest amplifikacja genu MYCN, może wiązać się ze zwiększoną angiogenezą w neuroblastoma. MYCN jest czynnikiem transkrypcyjnym, niezbędnym dla rozwoju m.in.: ośrodkowego układu nerwowego, zwojów nerwowych czy układu sercowo-naczyniowego [83]. Badania wielu ośrodków wskazują, że angiogeneza towarzyszy zmianom w obrębie genu MYCN [76]. Teoria ta budzi jednak wątpliwości niektórych zespołów badawczych [16].

Fenomen regresji nerwiaka zarodkowego czy zdolność różnicowania do form bardziej dojrzałych (ganglioneuroma) ma wpływ na ocenę rokowania dla pacjenta. Postać niedojrzała neuroblastoma, z małymi, niezróżnicowanymi neuroblastami, której towarzyszy ubogie utkanie z komórek Schwanna w zrębie, charakteryzuje się niekorzystną prognozą. Natomiast zarówno dojrzewanie komórek nowotworowych do komórek zwojowych, jak i jednoczesny wzrost ilości komórek Schwanna w zrębie nowotworu, koreluje z lepszym rokowaniem [72]. Co ciekawe, im więcej lemmocytów w zrębie, tym uboższa waskularura nowotworu, i odwrotnie – niezróżnicowane neuroblasty, mniej komórek Schwanna – większa liczba nieprawidłowych naczyń krwionośnych [62, 69]. Obserwacje te stały się punktem wyjścia dla hipotezy, która sugeruje, że komórki Schwanna produkują rozpuszczalne czynniki stymulujące różnicowanie komórek nerwiaka oraz hamujące angiogenezę [43]. Okazuje się, że lemmocyty są źródłem białka SPARC (ang. *Secreted Protein Acid Rich in Cysteine*) [21]. Białko to może oddziaływać na komórki nerwowe, upośledzając ich wzrost, jak również hamować proces tworzenia naczyń krwionośnych. Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, iż w nerwiaku wysokoroznicowanym, z bogatym utkaniem z lemmocytów, oraz słabym unaczynieniem ekspresja SPARC jest znacząco wyższa [21, 22]. Dowiedziono również, że komórki Schwanna produkują inne inhibitory angiogenezy, takie jak: TIMP-2 czy czynnik nabłonka barwnikowego (ang. *Pigment Epithelium-Derived Factor*, PEDF) [22, 43].

ANTYANGIOGENEZA W NERWIAKU ZARODKOWYM TERAPIA ANTYANGIOGENNA

Fakt, iż nerwiak zarodkowy jest nowotworem bogato unaczynionym, stwarza perspektywę wykorzystania poznanych już mechanizmów regulujących proces naczyńnotworzenia w leczeniu tej choroby. Jest to o tyle istotne, że konwencjonalna terapia nadal nie jest wystarczająca do osiągnięcia pożądaných rezultatów. Zniszczenie naczyń krwionośnych i blokada ich powstawania znacząco zwiększa szanse na zahamowanie rozwoju nowotworu. Do tej pory zidentyfikowano szereg substancji, które upośledzają proces angiogenezy i w warunkach *in vitro* bądź *in vivo* potwierdzono ich inhibujący wpływ na neuroblastoma.

Wykazano, że kwas retinowy może indukować dojrzewanie komórek nerwiaka, co zmniejsza zjadliwość nowotworu. Badania na modelu zwierzęcym potwierdziły ponadto, że syntetyczna postać retinoidów hamuje angiogenezę zależną od neuroblastów, jak również stymuluje ekspresję inhibitora angiogenezy TSP-1 (ang. *Thrombospondin 1*) [19]. Interesującą substancją wydaje się być TNP-470, syntetyczny analog antybiotyku naturalnie produkowanego przez *Aspergillus fumigatus*. Potwierdzono, zarówno z wykorzystaniem linii komórkowych, jak i na modelu zwierzęcym, że TNP-470 redukuje unaczynienie guza, jak również jego rozmiary, zwiększając jednocześnie czas przeżycia [64]. Niektórzy badacze sugerują użyteczność stosowania talidomidu w leczeniu nerwiaka. Oprócz wywoływania efektu antyangiogenego, lek ten indukuje również apoptozę [46]. Wydaje się, że również bortezomib – inhibitor proteasomów, który blokuje proliferację neuroblastów – może wykazywać działanie antyangiogenne [11]. Duże nadzieje wiąże się również z sunitinibem. Jest to selektywny inhibitor większości receptorów kinaz tyrozynowych. Może indukować apoptozę komórek nowotworowych oraz hamować angiogenezę poprzez blokowanie receptora VEGF [15]. Podejmuje się także próby zastosowania terapii skojarzonej, gdzie wykorzystuje się synergistyczne działanie dwóch leków, np.: sunitinibu i rapamycyny, winblastyny i rapamycyny oraz bortezomibu i retinoidów (fenretynid), które wykazują działanie hamujące na wzrost guza jak i działanie antyangiogenne [59, 67, 97].

Najskuteczniejszym sposobem hamowania angiogenezy wydaje się być blokowanie ekspresji lub działania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Również w przypadku nerwiaka zarodkowego testuje się działanie przeciwciała anti-VEGF – bewacyzumabu, oraz innych leków, które mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na poziom VEGF. Kim i wsp. przeprowadzając badania na mysim modelu ludzkiego nerwiaka, zaobserwowali, że zastosowanie przeciwciała anti-VEGF znacząco hamuje wzrost guza [49]. Badania przedkliniczne nad możliwością zastosowania bewacyzumabu w leczeniu neuroblastoma, wykazały, że lek ten znacząco redukuje wzrost guza, wykazując przy tym znikomą toksyczność

[79]. Ponadto, bewacyzumab może zmieniać strukturę i morfologię naczyń guza, co ułatwia propagację chemioterapeutyków w tkance nowotworowej [26]. Zasadne wydaje się również być stosowanie inhibitorów receptorów VEGF. Blokowanie VEGFR-2 skutkuje zmniejszeniem unaczynienia i rozmiarów guza [51]. Inne inhibitory VEGFR, takie jak SU5416 oraz AZD2171, wykazują również efekt antyangiogeny [6, 60].

PODSUMOWANIE

Niewątpliwym jest, że neuroblastoma jest guzem o wysokim stopniu unaczynienia. Proces powstawania nowych naczyń krwionośnych odgrywa, podobnie jak w innych guzach litych, kluczową rolę w rozwoju i progresji nerwiaka zarodkowego. Jest to jednocześnie jeden z aspektów biologii tego nowotworu, który generuje możliwość opracowania skutecznych sposobów jego leczenia. Rezultaty badań, które analizują wpływ inhibitorów angiogenezy na nerwiaka zarodkowego, pozwalają na optymizm, jednak należy zwrócić uwagę na fakt, iż większość z nich prowadzona jest w warunkach *in vitro* bądź na modelu zwierzęcym. Niemniej, zastosowanie leków, które hamują proces angiogenezy, jest zasadne i daje nadzieję na usprawnienie procesu terapeutycznego.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Iuventus Plus (IP2012 039972).

LITERATURA

- [1] ABOUDOLA S, KINI AR. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders: a therapeutic target? *Curr Opin Hematol* 2005; **12**(4): 279-283.
- [2] ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA E. Prognostic factors and the new ways of treatment in neuroblastoma. *Współcz Onkol* 2000; **4**(2): 72-75.
- [3] ALBINI A, TOSETTI F, LI VW, NOONAN DM, LI WW. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; **9**(9): 498-509.
- [4] ARA T, FUKUZAWA M, KUSAFUKA T, KOMOTO Y, OUE T, INOUE M, OKADA A. Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. *J Pediatr Surg* 1998; **33**: 1272-1278.
- [5] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**(5302): 964-967.

- [6] BÄCKMAN U, SVENSSON A, CHRISTOFFERSON R. Importance of vascular endothelial growth factor A in the progression of experimental neuroblastoma. *Angiogenesis* 2002; **5**: 267-74.
- [7] BACKMAN V, SVENSSON A, CHRISTOFFERSON R. Importance of vascular endothelial growth factor A in the progression of experimental neuroblastoma. *Angiogenesis* 2003; **5**: 267-274.
- [8] BATTEGAY EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; **73**(7): 333-346.
- [9] BOSARI S, LEE AK, DELELLIS RA, WILEY BD, HEATLEY GJ, SILVERMAN ML. Microvessel quantification and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; **23**: 755-761.
- [10] BRAWER MK, DEERING RE, BROWN M, PRESTON SD, BIGLER SA. Predictors of pathological stage in prostatic carcinoma. *Cancer* 1994; **73**: 678-687.
- [11] BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, PASTORINO F, NICO B, DI PAOLO D, CIONI M, PICCARDI F, CILLI M, PEZZOLO A, CORRIAS MV, PISTOIA V, RIBATTI D, PAGNAN G, PONZONI M. Effects of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 1142-1157.
- [12] BRODEUR GM, MARIS JM, YAMASHIRO DJ, HOGARTY MD, WHITE PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; **19**: 93-101.
- [13] BROOKS PC, STRÖMLAD S, KLEMKE R, VISSCHER D, SARKAR FH, CHERESH DA. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; **96**(4): 1815-1822.
- [14] BUDNY A, LITAK J, GROCHOWSKI C. Nerwiak zarodkowy współczulny – Neuroblastoma. Przegląd literatury. *Journal of Education, Health and Sport* 2017; **7**(4): 504-513.
- [15] CALERO R, MORCHON E, JOHNSES JI, SERRANO R. Sunitinib suppress neuroblastoma growth through degradation of MYCN and inhibition of angiogenesis. *PLoS One* 2014, **9**(4): 1-10
- [16] CANETE A, NAVARRO S, BERMUDEZ J, PELLIN A, CASTEL V, LLOMBART-BOSCH A. Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 27-34.
- [17] CARLEVARO MF, CERMELLI S, CANCEDDA R, DESCALZI CANCEDDA F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000; **113**(Pt1): 59-69.
- [18] CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**(6801): 249-257.
- [19] CASTLE VP, OU X, O'SHEA S, DIXIT VM. Induction of thrombospondin 1 by retinoic acid is important during differentiation of neuroblastoma cells. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1857-1863.
- [20] CEA V, SALA C, VERPELLI C. Antiangiogenic Therapy for Glioma. *Journal of Signal Transduction* 2012; doi: 10.1155/2012/483040.
- [21] CHLENSKI A, LIU S, CRAWFORD SE, VOLPERT OV, DE VRIES GH, EVANGELISTA A, YANG Q, SALWEN HR, FARRER R, BRAY J, COHN SL. SPARC is a key schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2000; **62**: 7357-7363.
- [22] CRAWFORD SE, STELLMACH V, RANALLI M, HUANG X, HUANG L, VOLPERT O, DE VRIES GH, ABRAMSON LP, BOUCK N. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Science* 2001; **114**: 4421-4428.
- [23] CROOM KF, DHILLON S. Bevacizumab: a review of its use in combination with paclitaxel or capecitabine as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer. *Drugs* 2011; **71**(16): 2213-2229.
- [24] CZYŻYKOWSKI R, DĘBSKA S, HABIB M, KRAKOWSKA M, KUBICKA J, POTEMSKI P. Kryzotynib – nowy lek ukierunkowany molekularnie w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2012; **8**(5): 197-203.
- [25] DENEKAMP J. The tumor microcirculation as a target in cancer therapy: a clear perspective. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**: 733-736.
- [26] DICKSON PV, HAMNER JB, SIMS TL, FRAGA CH, NG CY, RAJASEKERAN S, HAGEDORN NL, MCCARVILLE MB, STEWART CF, DAVIDOFF AM. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2007; **13**: 3942-3950.

- [27] DISTLER JH, HIRTH A, KUROWSKA-STOLARSKA M, GAY RE, GAY S, DISTLER O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; **47**(3): 149-61.
- [28] DÖME B, HENDRIX MJC, PAKU S, TÓVÁRI J, TÍMÁR J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1-15.
- [29] DVORAK HF. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 2000; **24**(1): 75-78.
- [30] EGGERT A, IKEGAKI N, KWIATKOWSKI J, ZHAO H, BROUDER GM, HIMELSTEI BP. High level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1900-1908.
- [31] EICHHOLZ A, MERCHANT S, GAYA A. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *OncoTargets Therapy* 2010; **3**: 69-82
- [32] FERRARA N, HENZEL WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**(2): 851-858.
- [33] FERRARA N, HILLAN KJ, NOVOTNY W. Bevacizumab (Avastin) a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 328-335.
- [34] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Oncologist* 2004, **9**(1), 2-10.
- [35] FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; **1**(1): 27-31.
- [36] FOLKMAN J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; **175**(3): 409-416.
- [37] FOLKMAN J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; **28**(26): 1757-1763.
- [38] GASPARINI G, WEIDNER N, MATULA S. Intratumoral microvessel density and p53 protein correlation with metastasis in headand-neck carcinoma. *Int J Cancer* 1993; **55**: 739-744.
- [39] GIORDANO FJ. Angiogenesis: mechanisms, modulation, and targeted imaging. *J Nucl Cardiol* 1999; **6**(6): 664-671.
- [40] GOTINK KJ, VERHEUL HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 2010; **13**: 1-14
- [41] HANAHAH D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**(3): 353-364.
- [42] HAZZARD TM, STOFFER RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14**(6): 883-900.
- [43] HUANG D, RUTKOWSKI JL, BRODEUR GM, CHOU PM, KWIATKOWSKI JL, BABBO A, COHN SL. Schwann cell-conditioned medium inhibits angiogenesis. *Cancer Res* 2000; **60**: 5966-5971.
- [44] HUSSONG JW, RODGERS GM, SHAMI PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; **95**(1): 309-313.
- [45] JAROSZ P, WOŹNIAK B. Angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*, 2012, **4**: 498-507.
- [46] KAICKER S, MCCRUDDEN KM, BECK L, NEW T, HUANG J, FRISCHER JS, SERUR A, KADENHE-CHIWESHE A, YOKOI A, KANDEL JJ, YAMASHIRO DJ. Thalidomide is anti-angiogenic in a xenograft model of neuroblastoma. *Int J Oncol* 2003; **23**: 1651-1655.
- [47] KEERL S, GEHMERT S, GEHMERT S, SONG YH, ALT E. PDGF and bFGF modulate tube formation in adipose tissue-derived stem cells. *Ann Plas Sur* 2010; **64**: 487-490.
- [48] KEUNEN O, JOHANSSON M, OUDIN A, SANZEY M, RAHIM SA, FACK F, THORSEN F, TAXT T, BARTOS M, JIRIK R, MILETIC H, WANG J, STIEBER D, STUHR L, MOEN I, RYGH CB, BJERKVIK R, NICLOU SP. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**(9): 3749-3754.
- [49] KIM ES, SOFFER SZ, HUANG J, MCCRUDDEN KW, YOKOI A, MANLEY CA, MIDDLESWORTH W, KANDEL J, YAMASHIRO DJ. Distinct response of experimental neuroblastoma to combination antiangiogenic strategies. *Journal of Pediatric Surgery* 2002; **37**: 518-522.

- [50] KLEINMAN NR, LEWANDOWSKA K, CULP LA. Tumor progression of human neuroblastoma cells tagged with a lacZ marker gene; earliest events at ectopic injection sites. *Br J Cancer* 1994; **69**: 670-679.
- [51] KLEMENT G, BARUCHEL S, RAK J, MAN S, CLARK K, HICKLIN DJ, BOHLEN P, KERBEL RS. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *Journal of Clinical Investigation* 2000; **105**:1049-1058.
- [52] KOERSELMAN J, VAN DER GRAAF Y, DE JAEGERE PP, GROBBEE DE. Coronary collaterals: an important and underexposed aspect of coronary artery disease. *Circulation* 2003; **107**(19): 2507-2511.
- [53] KOWALCZYK JR (red.). Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 2011
- [54] KWIDZIŃSKA E, NAUMNIK W, CHYCZEWSKA E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol Alergol Pol* 2006, **74**: 414-420.
- [55] LANGER, J, VERTONGEN P, PERRET J, FONTAINE AJ, ATASSI G, ROBBERECHT P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000; **34**: 386-393.
- [56] LIMB GA, HICKMAN-CASEY J, HOLLIFIELD RD, CHIGNELL AH. Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**(10): 2453-2457.
- [57] LOSORDO DW, ISNER JM, DIAZ-SANDOVAL LJ. Endothelial recovery. The next target in restenosis prevention. *Circulation* 2003; **107**: 2635
- [58] LUCCHI M, MUSSI A, FONTANINI G, FAVIANA P, RIBECHINI A, ANGELETTI CA. Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002; **21**(6): 1105-1110.
- [59] MARIMPIETRI D, BRIGNOLE C, NICO B, PASTORINO F, PEZZOLO A, PICCARDI F, CILLI M, DI PAOLO D, PAGNAN G, LONGO L, PERRI P, RIBATTI D, PONZONI M. Combined therapeutic effects of vinblastine and rapamycin on human neuroblastoma growth, apoptosis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 2007; **13**(13): 3977-3988.
- [60] MARIS JM, COURTRIGHT J, HOUGHTON PJ, MORTON CL, GORLICK R, KOLB EA, LOCK R, TAJBAKSH M, REYNOLDS CP, KEIR ST, WU J, SMITH MA. Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the Pediatric Preclinical testing Program. *Pediatric Blood & Cancer* 2008; **50**: 581-587.
- [61] MEISTER B, GRUNEBACH F, BAUTZ F, BRUGGER W, FINK FM, KANZ L, MOHLE R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 445-449.
- [62] MEITAR D, CRAWFORD SE, RADEMAKER AW, COHN SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 405-414.
- [63] NACOY E. Tumor angiogenesis formation of vessels de novo at germ cell tumors. *Cancer* 1990; **66**(5): 916-922.
- [64] NAGABUCHI E, VANDERKOLK WE, UNE Y, ZIEGLER MM. TNP-470 antiangiogenic therapy for advanced murine neuroblastoma. *J Pediatric Surg*. 1997; **32**: 287-293.
- [65] NORÉN-NYSTRÖM U, HEYMAN M, FRISK P, GOLOVLEVA I, SUNDSTRÖM C, PORWIT A, ROOS G, BERGH A, FORESTIER E. Vascular density in childhood acute lymphoblastic leukaemia correlates to biological factors and outcome. *Br J Haematol* 2009; **146**(5): 521-530.
- [66] O'REILLY MS, HOLMGREN L, SHING Y, CHEN C, ROSENTHAL RA, MOSES M, LANE WS, CAO Y, SAGE EH, FOLKMAN J. Angiostatin. A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; **79**: 315-328.
- [67] PAGNAN G, DI PAOLO L, CAROSIO R, PASTORINO F, MARIMPIETRI D, BRIGNOLE C, PEZZOLO A, LOI M, GALIETTA LJ, PICCARDI F, CILLI M, NICO B, RIBATTI D, PISTOIA V, PONZONI M. The combined therapeutic effects of bortezomib and fenretinide on neuroblastoma cells involve endoplasmic reticulum stress response. *Clin Cancer Res*, 2009; **15**: 1199-1209.
- [68] PAPA A, ZACCARELLI E, CARUSO D, VICI P, BENEDETTI PANICI P, TOMAO F. Targeting angiogenesis in endometrial cancer – new agents for tailored treatments. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; **25**(1): 31-49.

- [69] PEDDINTI R, ZEINE R, LUCA D, SESHADRI R, CHLENSKI A, COLE K, PAWEŁ B, SALWEN HR, MARIS JM, COHN SL. Prominent microvascular proliferation in clinically aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3499-3506.
- [70] PEREK D. Choroby nowotworowe u dzieci. W: *Pediatrics*, Kawalec W, Grenda R, Ziółkowska H (red.) PZWL, Warszawa 2014; 624-630.
- [71] PEREZ-ATAYDE AR, SALLAN SE, TEDROW U, CONNORS S, ALLRED E, FOLKMAN J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; **150**(3): 815-821.
- [72] PEUCHMAUR M, D'AMORE ES, JOSHI VV, HATA J, ROALD B, DEHNER LP, GERBING RB, STRAM DO, LUKENS JN, MATTATYH KK, SHIMADA H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavourable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 2003; **98**: 2274-2281.
- [73] PULÈ MA, GULLMANN C, DENNIS D, MCMAHON C, JEFFERS M, SMITH OP. Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance. *Br J Haematol* 2002; **118**(4): 991-998.
- [74] RAK J, FILMUS J, KERBEL RS. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; **32A**(14): 2438-2450.
- [75] RIBATTI D, ALESSANDRI G, VACCA A, IURLARO M, PONZONI M. Human neuroblastoma cells produce extracellular matrix-degrading enzymes, induce endothelial cell proliferation, and are angiogenic *in vivo*. *Int J Cancer* 1998; **77**: 449-454.
- [76] RIBATTI D, RAFFAGHELLO L, POSTORINO F, NICO B, BRIGNOLE C, VACCA A, PONZONI M. *In vivo* angiogenic activity of neuroblastoma correlates with MYCN oncogene overexpression. *Int J Cancer* 2002; **102**: 351-354.
- [77] RIBATTI D, SURICO G, VACCA A, DE LEONARIS F, LASTILLA G, MONTALDO PG, RIGILLO N, PONZONI M. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 2001; **68**: 1161-1168.
- [78] SALGADO R, BENOY I, BOGERS J, WEYTIJENS R, VERMEULEN P, DIRIX L, VAN MARCK E. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001; **4**(1): 37-43.
- [79] SEGERSTROM L, FUCHS D, BACKMAN U, HOLMQUIST K, CHISTOFFERSON R, AZARBAYIANI E. The anti-VEGF antibody bevacizumab potently reduces the growth rate of highrisk neuroblastoma xenografts. *Pediatr Res*, 2006; **60**: 576-581.
- [80] SKOBE M, ROCKWELL P, GOLDSTEIN N, VOSSELER S, FUSENIG NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997; **3**(11): 1222-1227.
- [81] SKÓRA J, BIEGUS J, PUPKA A, BARC P, SIKORA J, SZYBER P. Molekularne podstawy angiogenezy. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; **60**: 410-415.
- [82] SMITH SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* 2000; **15** Suppl 6: 59-66.
- [83] STANTON BL, PARADA LF. The *N-myc* proto-oncogene: developmental expression and *in vivo* site-directed mutagenesis. *Brain Pathol* 1992; **2**: 71-83.
- [84] SUGIURA Y, SHIMADA H, SEEGER RC, LAUG WE, DECLERCK YA. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 1998; **58**: 2209-2216.
- [85] SUJKA-KORDOWSKA P, MALINSKA A, OSTALSKA-NOWICKA D, ZABEL M, NOWICKI M. CD105 and placental growth factor--potent prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 2012; **36**(7): 846-851.
- [86] SZALA S. Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów? *Postepy Hig Med Dosw* 2009; **63**: 598-612
- [87] ŚWIDZIŃSKA E, NAUMNIK W, CHYCZEWSKA E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; **74**: 414-420.
- [88] FURUYA M, NISHIYAMA M, KASUYA Y, KIMURA S, ISHIKURA H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag* 2005; **1**: 277-290

- [89] TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; **5**(4): 434-438.
- [90] TANIGAWA N, MATSUMURA M, AMAYA H, KITAOKA A, SHIMOMATSUYA T, LU C, MURAOKA R, TANAKA T. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; **79**: 220-225.
- [91] TERAI M, HONDA T, YASUKAWA K, HIGASHI K, HAMADA H, KOHNO Y. Prognostic impact of vascular leakage in acute Kawasaki disease. *Circulation* 2003; **108**(3): 325-330.
- [92] TONG RT, BOUCHER Y, KOZIN SV, WINKLER F, HICKLIN DJ, JAIN RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 2004; **64**: 3731-3736.
- [93] VAN ROYEN N, PIEK JJ, SCHAPER W, BODE C, BUSCHMANN I. Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol* 2001; **8**(6): 687-693.
- [94] WAKUI S, FURUSATO M, ITOH T, SASAKI H, AKIYAMA A, KINOSHITA I, ASANO K, TOKUDA T, AIZAWA S, USHIGOME S. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; **168**(3): 257-262.
- [95] WIETECHA MS, CERNY WL, DIPIETRO LA. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; **367**: 3-32
- [96] WITTE MB, BARBUL A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; **77**(3): 509-528.
- [97] ZHANG L, SMITH KM, CHONG AL, STEMPAK D, YEGER H, MARRANO P, THORNER PS, IRWIN MS, KAPLAN DR, BURACHEL S. In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia* 2009; **11**: 426-435.
- [98] ZIELONKA TM. Angiogeneza – część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2003; **8**(4): 169-174.
- [99] ZIELONKA TM. Angiogeneza – część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2004; **9**: 25-31.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 20.05.2017

Przyjęto: 30.06.2017

Patrycja Sujka-Kordowska

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

ul. Święcickiego 6

60-781 Poznań

tel.: 61 854 64 55

fax: 61 854 64 40

e-mail: psujka@ump.edu.pl