

Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych

Angiogenesis. Part II. Modulators regulating neovascularization

TADEUSZ M. ZIELONKA

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

Angiogeneza to złożony proces, który zależy od działania wielu czynników pobudzających i hamujących. W życiu pozapłodowym w stanie zdrowia zdecydowanie przeważają czynniki hamujące angiogenezę, takie jak trombospodina, endostatyna, angiostatyna, inhibitory metaloproteinaz, płytkowy czynnik 4 i inne czynniki ELR. W wielu stanach chorobowych przeważają czynniki pośrednio lub bezpośrednio pobudzające angiogenezę. Najważniejsze z nich to VEGF, bFGF, metaloproteinazy, angiopoetyna, integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, tlenek azotu itp. Modulatorami angiogenezy są naturalne chemokiny, mitogeny, czynniki wzrostu, enzymy proteolityczne, czynniki krzepnięcia krwi itd. Rola wielu mediatorów w angiogenezie nie jest poznana i niezbędne są dalsze prace wyjaśniające udział tych czynników w tym ważnym dla wielu chorób procesie.
Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(1), 25-31

Słowa kluczowe: angiogeneza, stymulatory, inhibitory

Angiogenesis is a complex process depending on many stimulating and inhibiting factors. In postnatal life in the healthy human organism angiogenesis inhibiting factors such as: thrombospondin, endostatin, angiostatin, inhibitors of metalloproteinases, platelet factor 4 and other factors ELR are dominating. When organism is affected by disease, direct and indirect factors exciting angiogenesis dominate. The most important are as follows: VEGF, bFGF, metalloproteinases, angiopoietin, integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$, nitric oxide etc. Natural chemokines, mitogens, growth factors, proteolytic enzymes, haemostasis factors etc. constitute modulators of angiogenesis. The role of many mediators in angiogenesis has not been fully determined yet. Hence further research work is required to determine influence of these factors.

Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(1), 25-31

Key words: angiogenesis, stimulators, inhibitors

Proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych wzbudza ostatnio coraz większe zainteresowanie naukowców różnych specjalności. Wydaje się, że uczestniczy on w patogenezie wielu chorób. Od ponad 20 już lat poszukuje się czynników hamujących unaczynienie guzów nowotworowych [1]. Duże nadzieje wiąże się ze znalezieniem czynników stymulujących neowaskularyzację w chorobach niedokrwiennych [1]. Najczęstszą przyczyną ślepoty są zmiany naczyniowe w siatkówce w przebiegu cukrzycy [2]. Ostatnio coraz więcej danych wskazuje na udział proliferacji nowych naczyń krwionośnych w chorobach zapalnych, takich jak choroby tkanki łącznej, astma czy przewlekła obturacyjna choroba płuc [2].

U dorosłych zdrowych osób angiogeneza nie jest częstym zjawiskiem. Proliferacja komórek śródbłonna naczyń jest bardzo powolna i czas obrotu tych komórek przekracza 1000 dni [3]. Uruchomienie angiogenezy wymaga lokalnej zmiany równowagi pomiędzy czynnikami

pobudzającymi a hamującymi wzrost naczyń włosowatych. U zdrowych osób dorosłych równowaga czynników pro- i antyangiogennych przechylona jest wyraźnie na stronę tych ostatnich [4]. Wiele cytokin innych biologicznie czynnych mediatorów i zalicza się do czynników pobudzających angiogenezę i równie dużo innych mediatorów wykazuje się zdolnością hamowania tego procesu (tab. I).

Czynniki pobudzające angiogenezę

Czynnik wzrostowy komórek śródbłonna i jego receptory

Głównym czynnikiem pobudzającym waskulogenezę i angiogenezę, zarówno fizjologiczną jak i patologiczną, jest czynnik wzrostowy komórek śródbłonna (*vascular endothelial growth factor* – VEGF). Jest to mitogen specyficzny dla śródbłonna naczyń, który stymuluje powstawanie nowych naczyń krwionośnych na bazie już

Tabela I. Czynniki pobudzające i hamujące angiogenezę (wyjaśnienia skrótów w tekście)

Stymulatory angiogenezy	Inhibitory angiogenezy
VEGF	trombospondyna-1
bFGF	angiostatyna
aFGF	endostatyna
angiopoetyna 1 i 2	troponina I
TGF α	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3
TGF β	antyintegryna $\alpha_v\beta_3$
integryna $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$	PEX
PDGF	czynnik płytkowy 4
PD-ECGF	interferon α
MMP-1, MMP-2, MMP-9	interferon β
angiogenina	interferon γ
PIGF	interleukina 4
interleukina 8	interleukina 6
interleukina 1 β	interleukina 10
interleukina 6	interleukina 12
TNF α	interleukina 18
HGF	TGF- β 1
G-CSF	chemokiny CXC
GM-CSF	MMP-12
tlenek azotu	IP-10
heparyna	antytrombina III
ENA-78	heparyny drobnocząsteczkowe
GRO α β γ	MIG
PBP	prolaktyna
beta-tromboglobulina	
NAP-2	
GCP-2	

istniejących i zwiększa przepuszczalność naczyń [5]. VEGF jest białkiem o ciężarze 40-45 kDa, które uwalnia jest przez różnego typu komórki, w tym również nowotworowe. U człowieka istnieje co najmniej 5 izoform VEGF (121, 145, 165, 189 i 206), z których najważniejsze to VEGF₁₆₅ i VEGF₁₂₁ [5]. Poziom ekspresji tego czynnika na komórkach zależy od wielu czynników, takich jak utlenowanie, temperatura, poziom cukru, prostaglandyn, estrogenów, cytokin itp. [6]. Proangiogenywny efekt VEGF wiąże się z obecnością odpowiednich receptorów dla tego czynnika. Opiszono 2 swoiste dla kinazy tyrozyny receptory przezłonowe dla VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2), które obecne są głównie na komórkach śródbłonna oraz na monocytach/makrofagach i niektórych komórkach nowotworowych [7]. Komórki śródbłonna naczyń limfatycznych posiadają na swej powierzchni odmienne receptory VEGF [4].

Czynniki wzrostu fibroblastów i ich receptory

Czynniki wzrostu fibroblastów są silnymi mitogenami i czynnikami chemotaktycznymi nie tylko dla fibroblastów lecz również dla komórek śródbłonna naczyń krwionośnych i komórek mięśni gładkich. Wykazują one silne działanie proangiogenne zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, ale w przeciwieństwie do VEGF nie wykazano, aby odgrywały one istotną rolę w trakcie embriogenezy [8]. Wiąże się one z heparyną i ich działanie zależy od interakcji z tym ważnym czynnikiem hemostazy [9].

Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (*acidic fibroblast growth factor* – aFGF/FGF-1) obecny jest zwłaszcza w mózgu i rogówce. Wykazuje działanie proangiogenne stymulując proliferację miocytów i komórek śródbłonna [10].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor* – bFGF/FGF-2) był jednym z pierwszych odkrytych czynników proangiogenywnych, obok VEGF uważanych za jeden z najsilniejszych stymulatorów tego procesu [11]. Jest on obecny w wielu tkankach, ale nie jest wykrywany w surowicy. bFGF jest zlokalizowany w cytoplazmie, jednak mechanizm uwalniania tego czynnika nie został dobrze poznany. Odpowiedź śródbłonna na bFGF odbywa się za pośrednictwem przezłonowych receptorów kinazy tyrozyny (FGFR), a wśród kilku odmian tych receptorów istotne są jedynie dwa pierwsze FGFR-1 i FGFR-2 [12].

Angiopoetyny i ich receptory

Receptory kinazy tyrozyny (Tie1 i Tie2) oraz ich ligandy (angiopoetyny – Ang1, Ang2) odgrywają kluczową rolę w angiogenezie w okresie zarodkowym [8]. Wrodzony brak Tie1 lub Tie2 jest śmiertelny [13]. Receptory te są obecne na komórkach śródbłonna i odpowiedzialne są za stabilizację sieci naczyniowej. Angiopoetyna-1 jest ligandem dla Tie2, natomiast ligand dla Tie1 nie został jeszcze opisany. Ang1 pobudzając fosforylację tyrozyny komórek śródbłonna nie wpływa na ich proliferację i chemotaksję. Wykazano natomiast, że pobudza tworzenie pączka naczyniowego i podtrzymuje przeżycie komórek śródbłonna. Działanie Ang1 wiąże się z komórkami mezenchymalnymi otaczającymi komórki śródbłonna. Nadmiar Ang1 powoduje powstawanie liczniejszych i bardziej rozgałęzionych naczyń włosowatych. Mutacje kinazy tyrozyny w domenie Tie2 powodują powstawanie żylnych malformacji i niedobór komórek mięśni gładkich w ścianie naczynia [15]. Natomiast mRNA dla Ang2 jest obecny wyłącznie w tofoblaście, ale czynnik ten nie pobudza Tie1 ani Tie2 [14]. Są nawet sugestie, że być może jest ona nawet naturalnym blokerem Ang1 i angiogenezy, gdyż nadmiar tego czynnika powoduje zaburzenia obserwowane przy niedoborze Ang1 lub Tie2 [16].

Przekształcające czynniki wzrostu

Przekształcający czynnik wzrostu alfa (*transforming growth factor alpha* – TGF α) jest monomerem zbudowanym z 50 aminokwasów, produkowanym głównie przez makrofagi, ale może być także uwalniany przez komórki nowotworowe [17]. Wykazuje aktywność mitogenną w stosunku do fibroblastów, komórek śródbłonna i nabłonka. Uważany jest za czynnik pobudzający angiogenezę, ale jego działanie w tym procesie nie zostało w pełni określone [18].

Przekształcający czynnik wzrostu beta (TGF β) uważany jest za jeden z ważniejszych mediatorów zapalenia i gojenia się ran [17]. Jednak jego działanie na proces nowotworzenia naczyń jest dwójakie. TGF β *in vivo* pośrednio stymuluje angiogenezę. Natomiast *in vitro* bezpośrednio hamuje wzrost wielu komórek, takich jak fibroblasty, komórki nabłonka i śródbłonna, ale w małych stężeniach działa pobudzająco na proliferację tych komórek [4]. Czynnikiem ten zmniejsza również pozakomórkowy rozkład białek i wpływa na dojrzewanie naczyń krwionośnych [19].

Integryny

Integryny to przezbłonowe białka składające się z podjednostek z rodziny α i β , które tworzą różne kombinacje na powierzchni komórek. Cząsteczki te pozwalają rozpoznać i odpowiedzieć na różnorodne białka macierzy pozakomórkowej [20]. Wiążą się one z tymi białkami lub z ligandami powierzchni komórkowych i są zdolne do przekazywania sygnałów ze środowiska pozakomórkowego do komórki i w odwrotnym kierunku [21]. W normalnym spoczynkowym śródbłonnku stwierdza się minimalną ekspresję integryny $\alpha_v\beta_3$, ale znacząco wzrasta ona w pobudzonym śródbłonnku [22]. Drugą ważną dla procesu angiogenezy integryną jest $\alpha_v\beta_5$. Integryny chronią również proliferujące komórki śródbłonna przed apoptozą [22].

Czynniki wzrostowe uwalniane przez płytki

Płytkowy czynnik wzrostowy (*platelet derived growth factor* – PDGF) jest głównym czynnikiem wzrostu uwalnianym przez pobudzone płytki, który odgrywa rolę w rekrutacji komórek przydanki. Izoforn PDGF-BB jest silnym chemoatraktantem i mitogenem dla komórek przydanki i mięśni gładkich [23]. Rola tego czynnika w angiogenezie polega głównie na stabilizacji powstałych naczyń. Stwierdzono, że PDGF pośrednio pobudza angiogenezę *in vitro*, nawet gdy w naczyniach włosowatych brak jest receptorów dla PDGF [24].

Czynnik wzrostu komórek śródbłonna uwalniany przez płytki (*platelet derived endothelial cell growth factor* PD-ECGF) jest monomerem 45 kDa uwalnianym także przez płytki krwi, który pobudza syntezę DNA komórek śródbłonna, ale nie wpływa na proliferację tych ko-

mórek [25]. Ponieważ płytki krwi jako pierwsze pojawiają się w ranach i w ogniskach zapalnych, stąd PD-ECGF może przygotowywać łożysko naczyniowe do zmian spowodowanych przez inne czynniki wzrostu [17].

Metaloproteiny

Metaloproteiny (MMP) to enzymy proteolityczne, które jako pozakomórkowe endopeptydazy są wydzielane w nieaktywnej postaci i stają się aktywne w macierzy pozakomórkowej i selektywnie rozkładają jej składniki. Są produkowane przez różne komórki, takie jak fibroblasty, komórki zapalne, nabłonka i śródbłonna [26]. W angiogenezie biorą udział przede wszystkim MMP-1, MMP-2 i MMP-9 [26]. Rozkład błony podstawnej i innych pozakomórkowych składników macierzy przez te enzymy jest jedną z wcześniejszych konsekwencji uruchomienia procesu angiogenezy. Przerwanie ciągłości błony podstawnej naczyń umożliwia migrację komórek śródbłonna z istniejących naczyń do nowotworzonych. Wykazano także związek MMP z receptorem dla integryny $\alpha_v\beta_3$, który pobudza angiogenezę [27]. Równocześnie MMP-12 uwalniana przez makrofagi może powodować uwalnianie z macierzy pozakomórkowej inhibitorów angiogenezy takich jak np. angiostatyna [28].

Interleukiny proangiogenne (IL-8, IL-1, IL-6)

Wiele mediatorów zapalenia ma równocześnie zarówno bezpośrednie jak i pośrednie działanie proangiogenne. IL-8 to czynnik chemotaktyczny i pobudzający neutrofile, który produkowany jest przez różne komórki (monocyty, limfocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna, keratynocyty, chondrocyty). Jest on ważnym czynnikiem proangiogennym zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, gdyż stymuluje on chemotaksję, proliferację i migrację komórek śródbłonna oraz uwalnianie zawartości lizosomów przez neutrofile [31]. Ekspresja mRNA IL-8 koreluje z angiogenezą nowotworową, progresją guza, czasem przeżycia chorego i czasem wznowy w niedrobnokomórkowym raku płuca [32]. Choć *in vitro* wykazano, że IL-1 β silnie pobudza angiogenezę, to jednak niejednoznaczne są doniesienia dotyczące wpływu tej cytokiny na proliferację i migrację komórek śródbłonna [33]. Jeszcze bardziej sprzeczne doniesienia dotyczą IL-6. Wykazano wprawdzie, że IL-6 powoduje wzrost poziomu mRNA dla VEGF i nasila migrację komórek śródbłonna [33,34], ale mimo to niektórzy autorzy zaliczają IL-6 do czynników hamujących angiogenezę [4].

Angiogenina

Angiogenina jest pojedynczym łańcuchem 123 aminokwasów produkowanym głównie w wątrobie oraz przez fibroblasty, monocyty i nabłonek jelita grubego [29]. Obecna jest w surowicy zdrowych osób i pobudzając enzymy proteolityczne wywiera działanie proangiogenne [17].

Łożyskowy czynnik wzrostu

Łożyskowy czynnik wzrostu (*placenta growth factor* – PIGF) odgrywa istotną rolę w fizjologicznej i patologicznej angiogenezie. Pobudzając proliferację komórek śródbłonka działa podobnie jak VEGF [30]. Pierwotnie czynnik ten był wyizolowany z łożyska ludzkiego, ale później został zidentyfikowany w różnych nowotworach.

Czynnik wzrostu guzów

Podobnie jak prozapalne interleukiny, proangiogenne działanie wywiera także inna silnie prozapalna cytokina – czynnik martwicy guza alfa (*tumour necrosis factor alpha* – TNF α). Cytokina ta wydzielana jest przez komórki nowotworowe oraz makrofagi pobudzone przez endotoksyny lub produkty degradacji fibryny [17]. Sprzeczne są doniesienia na temat wpływu tej cytokiny na proliferację komórek śródbłonka *in vitro*, ale wydaje się, że czynnik ten nasila migrację i różnicowanie tych komórek [33,17]. Natomiast *in vivo* TNF α pobudza angiogenezę [35].

Wątrobowy czynnik wzrostu

Uwalniany przez fibroblasty wątroby czynnik wzrostu (*hepatocyte growth factor* HGF), wśród wielu funkcji wykazuje również właściwości proangiogenne [36]. Równocześnie jeden z fragmentów tego czynnika ma silne działanie antyangiogenne i być może znajduje zastosowanie w terapii ograniczającej wzrost guza [37].

Czynniki pobudzające kolonizację granulocytów i makrofagów

Czynnik pobudzający kolonizację granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor* G-CSF) oraz czynnik pobudzający kolonizację granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor* GM-CSF) obok VEGF i bFGF należą do czynników bezpośrednio pobudzających angiogenezę [33]. Oba te czynniki pobudzają proliferację, migrację i różnicowanie komórek śródbłonka [38].

Tlenek azotu NO

Ostatnio duże zainteresowanie wzbudza tlenek azotu, który uważa się za kluczowy czynnik w sygnalizacji i regulacji angiogenezy [39]. Jest to ważny mediator relaksacji naczyń krwionośnych, czynności płytek, zapalenia, neurotransmisji, proliferacji limfocytów oraz czynności cytotoksycznej makrofagów [40]. Tlenek azotu pobudza angiogenezę *in vitro* oraz *in vivo* wpływając na migrację i różnicowanie komórek śródbłonka we włóscizkach [39]. Niewyjaśniony pozostaje jednak mechanizm działania tlenku azotu w procesie nowotworzenia naczyń. Być może wiąże się on ze zwiększeniem ekspresji integryn $\alpha_v\beta_3$ na powierzchni komórek śródbłonka. Wykazano również odmienny wpływ NO na angiogenezę indukowaną bFGF i VEGF₁₆₅ [40].

Czynniki hamujące angiogenezę

Trombospondyna-1

Trombospondyna-1 jest to duża glikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej (450 kDa), wydzielana przez komórki pochodzenia nabłonkowego i mezenchymalnego [41]. Była ona jednym z pierwszych odkrytych naturalnych inhibitorów angiogenezy. Jej ekspresja jest odwrotnie skorelowana z aktywnością angiogenną [42]. Czynnik ten wpływa na adhezję komórek śródbłonka, pobudzając przyleganie i blokując odpowiedź komórek śródbłonka na bFGF. W zależności od warunków czynnik ten pobudza lub hamuje wzrost i migrację komórek śródbłonka oraz komórek zapalnych [43]. Trombospondyna jest regulowana przez gen supresorowy guza p53. Zmniejszenie p53 powoduje supresję trombospondyny i w konsekwencji wzrost aktywności angiogennej [44]. W badaniach u zwierząt wykazano skuteczność tego inhibitora w zahamowaniu wzrostu guzów [41].

Angiostatyna

Angiostatyna to wewnętrzny fragment plazminogenu o ciężarze 38 kDa. Utrzymuje ona w uśpieniu przerzuty nowotworowe zwiększając apoptozę komórek raka [45]. Ponieważ zaobserwowano, że usunięcie pewnych guzów powodowało wzrost uśpionych przerzutów, sugerowano produkcję czynników hamujących angiogenezę przez guza [46]. W oparciu o te sugestie wyizolowano angiostatynę z surowicy i z moczu zwierząt z guzem Lewisa w płucach.

Endostatyna

Endostatyna jest końcowym fragmentem kolagenu XVIII o ciężarze 20 kDa [47]. Podobnie jak angiostatyna to ukryty inhibitor angiogenezy, uwalniany z większej cząsteczki macierzystej, która sama w sobie nie hamuje angiogenezy. Nie zidentyfikowano jeszcze enzymu, który powoduje odszczepienie endostatyny z kolagenu. Endostatyna swoiście hamuje proliferację komórek śródbłonka *in vitro* oraz wzrost guza i przerzutów *in vivo* [47].

Troponina

Troponina I jest niedawno opisanym inhibitorem angiogenezy, który wyizolowano z chrząstki [48]. Białko to jest specyficznym dla tkanki mięśniowej inhibitorem ATP-azy aktynomiozyny i jego antyangiogenne działanie było nieoczekiwanym odkryciem. Wykazano, że troponina I jest specyficznym dla komórek śródbłonka inhibitorem bFGF, hamującym neowaskularyzację *in vitro* oraz powstawanie przerzutów *in vivo* u zwierząt [48]. Poziom troponiny I jest stosowany w praktyce klinicznej jako czuły marker uszkodzenia mięśnia serca w zawale.

Inhibitory enzymów proteolitycznych

Angiogeneza jest hamowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP) [49]. Są to endogenne inhibitory procesu nowotworzenia naczyń krwionośnych. Aktywność MMP zależy od stanu równowagi pomiędzy MMP/TIMP. Opisano już kilka TIMP (TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-3), które są kodowane przez geny położone na różnych chromosomach i wykazują swoistą czynność fizjologiczną [49]. Wykazano, że poziom TIMP-2 odgrywa istotną rolę w przejściu MMP-2 w aktywną formę, co zapoczątkowuje proces rozkładu błony podstawnej. TIMP-1 uważany jest za ważny czynnik w hamowaniu powstawania przerzutów.

Inhibitory integryn

Uzyskane dzięki inżynierii genetycznej humanizowane przeciwciała antyintegryna $\alpha_v\beta_3$ oraz syntetyczne cykliczne peptydy będące antagonistami integryn hamują tworzenie nowych naczyń krwionośne, nie wpływając na już istniejące naczynia [22]. Stwierdzono, że połączenie integryny $\alpha_v\beta_3$ z MMP-2 na powierzchni komórek śródbłonna ułatwia degradację macierzy pozakomórkowej. Równocześnie fragment MMP-2 tzw. PEX (*hemopexin-like domain* MMP-2) może powodować zablokowanie interakcji integryn i MMP-2, co z kolei hamuje proces angiogenezy [27].

Czynnik płytkowy 4

Ta produkowana przez płytki krwi cytokina o małej masie cząsteczkowej była testowana jako pierwszy czynnik hamujący angiogenezę. Hamowanie tworzenia nowych naczyń krwionośnych wynika z zablokowania wiązania angiogennych czynników wzrostowych z proteoglikanami błony komórkowej [50]. Może on *in vitro* hamować proliferację i migrację komórek śródbłonna. Aktywność mitogenów komórek śródbłonna, takich jak VEGF i bFGF jest wrażliwa na zahamowanie spowodowane czynnikiem płytkowym 4 [51].

Interferony

Interferony alfa, beta i gamma to heterogenna grupa cytokin, które odgrywają ważną rolę w obronie organizmu przeciwko wirusowym i innym zakażeniom. Interferony I typu ($INF\alpha$ i $INF\beta$) są produkowane przez liczne komórki w odpowiedzi na infekcję wirusową, a II typ ($INF\gamma$) jest wytwarzany przez pobudzone limfocyty T i NK [4]. Choć *in vivo* wykazano, że $INF\alpha$ hamuje angiogenezę [52] to jednak *in vitro* obserwowano, że może pobudzać wzrost i migrację komórek śródbłonna [53]. Stwierdzono natomiast, że receptory $INF\gamma$ hamują proliferację komórek śródbłonna [54].

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

Interleukina 10 produkowana przez makrofagi i limfocyty T pomocnicze należy do głównych cytokin o działaniu przeciwzapalnym. Wykazano jej działanie hamujące wzrost guza poprzez zmniejszenie syntezy VEGF, $TNF\alpha$ oraz MMP-9 [55]. Stwierdzono również antyangiogenne działanie IL-10 na angiogenezę wywołaną niedokrwieniem z towarzyszącym zahamowaniem wydzielania VEGF [56].

Interleukina 12 jest produkowana przez komórki prezentujące antygen i wiąże się z receptorami na komórkach T i NK. Odgrywa ona kluczową rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Wykazano zahamowanie wzrostu guza *in vivo* [57] oraz zmniejszenie unaczynienia tkanek po implantacji fibroblastów produkujących IL-12 [58]. Hodowla komórek śródbłonna z IL-12 powodowała wzrost ekspresji $INF\gamma$ oraz IP-10 (interferon- γ inducible protein), które wykazują działanie antyangiogenne [58]. Ostatnio wykazano, że podobną rolę jak IL-12 spełnia IL-18, która również pobudza produkcję i wydzielanie $INF\gamma$ [59].

Chemokiny

Wśród czynników modulujących angiogenezę wyróżnia się także grupę zwaną chemokinami CXC. Tworzy ją rodzina chemotaktycznych polipeptydów o ciężarze cząsteczkowym mniejszym niż 10 kDa. Nazwa wywodzi się stąd, że wśród trzech ostatnich aminokwasów N-końca łańcucha polipeptydowego znajdują się dwie cząsteczki cysteiny przedzielone innym aminokwasem (C-X-C) [60]. Ważne jest występowanie w końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego sekwencji aminokwasów Glu-Leu-Arg tzw. *motyw ELR*. Te chemokiny, które posiadają *motyw ELR*⁺ wykazują działanie proangiogenne, a nie posiadające tego motywu działają hamująco na angiogenezę [61]. Wśród proangiogennych czynników (ELR^+) wyróżnia się IL-8, nabłonkowe białko pobudzające neutrofile 78 (*epithelial neutrophil activating protein-78*, ENA-78), geny związane ze wzrostem (*growth related genes* $GRO\ \alpha\ \beta\ \gamma$), białko chemotaktyczne dla granulocytów 2 (GCP-2), zasadowe białko płytkowe (PBP), białko pobudzające tkankę łączną III (CTAP-III), beta-tromboglobulinę (β -TG) i białko pobudzające neutrofile 2 (NAP-2). Do antyangiogennych czynników (ELR^-) zalicza się płytkowy czynnik 4, monokinę indukowaną przez interferon g (MIG) oraz IP-10 [60,61]. ELR^+ CXC chemokiny wykazują się znaczącym działaniem chemotaktycznym dla komórek śródbłonna, podczas gdy żadna z ELR^- chemokin nie wykazywała takiego działania [61]. Chemokiny CXC regulują wzrost guza [32,50,62].

Czynniki krzepnięcia krwi

W regulacji angiogenezy bierze również udział system krzepnięcia krwi [43]. Jak wykazywano powyżej, wiele czynników uczestniczących w modulacji angiogenezy odgrywa również rolę w hemostazie. Silnym inhibitorem angiogenezy jest antytrombina III [63]. Płytki krwi uczestniczące w procesie krzepnięcia wydzielają wiele czynników pobudzających angiogenezę (VEGF, bFGF, HGF, PDGF, PD-ECGF) oraz hamujących angiogenezę (PF-4, trombospondyna, TGF- β 1). Z kolei angiostatyna jest fragmentem plazminy [43]. Stwierdzono również modulację angiogenezy przez heparynę. Niskocząsteczkowe frakcje heparyny hamują, a cząstki o dużym ciężarze pobudzają angiogenezę [64].

Piśmiennictwo

- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 237-268.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
- Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* 1984; 23: 217-225.
- Pepper MS, Mandriota SJ, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Topics Microbiol Immun* 1996; 213: 31-67.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of angiogenesis. *Kidney Internat* 1999; 56: 794-814.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-212.
- Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure Function* 2001; 26: 25-35.
- Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chemist Biol* 1999; 6: R217-R224.
- Gleizes PE, Noaillic Depeyre J, Amalric F, Gas N. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) internalization through the heparan sulfate proteoglycans-mediated pathway: An ultrastructural approach. *Eur J Cell Biol* 1995; 66: 47-59.
- Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res* 1993; 72: 7-19.
- Norrby K. Basic fibroblast growth factor and *de novo* mammalian angiogenesis. *Microvasc Res* 1994; 48: 96-113.
- Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1992; 135: 185-199.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U i wsp. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie2 in blood vessel formation. *Nature (Lond)* 1995; 376: 70-74.
- Dunk C, Shams M, Nijjar S i wsp. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote and migration during placenta development. *Am J Pat* 2000; 156: 2185-2199.
- Vikkula M, Boon L, Mulliken JB, Olsen BR. Molecular basis of vascular anomalies. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 281-292.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF i wsp. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that distrusts *in vivo* angiogenesis. *Science (Wash DC)* 1997; 277: 55-60.
- Folkman J, Brem H. Angiogenesis and inflammation. w: *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, II wyd. JI Gallin, IM Goldstein, R Snyderman Raven Press Ltd New York 1992: 821-839.
- Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 232: 1250-1253.
- Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor - induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1990; 111: 743-755.
- Verner JA. The role of vascular cell integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ in angiogenesis. *EXS* 1997; 79: 361-390.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263.
- Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103: 1227-1230.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997; 277: 242-245.
- Sato N, Beitz JG, Kato J i wsp. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol* 1993; 142: 1119-1130.
- Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989; 338: 557-562.
- Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 47-54.
- Brooks PC, Silletti S, Schalsach TL, Friedlander M, Cheresh DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92: 391-400.
- Cornelius LA. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998; 271: 1079-1086.

Podsumowanie

Przedstawione powyżej czynniki nie są pełnym zestawieniem czynników modulujących proces powstawania nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących. Lista ta stale ulega rozszerzeniu. Ważna jest świadomość, że proces angiogenezy zależy od działania wielu bezpośrednich i pośrednich czynników pobudzających i hamujących ten proces. Czynniki te nie są swoiste wyłącznie dla tego procesu i wykazują wiele innych funkcji. Są to naturalne chemokiny, mitogeny, czynniki wzrostu, enzymy proteolityczne, czynniki krzepnięcia krwi itp. Konieczne są dalsze prace wyjaśniające bardziej dokładnie znaczenie udziału tych czynników w angiogenezie.

29. Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Vallee BL. Isolation of angiogenin from normal human plasma. *Biochemistry* 1987; 26: 5141-46.
30. Persico MG, Vincenti V, diPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor. *Curr Topics Microbiol Immun* 1999; 237: 31-40.
31. Koch AE, Polverini PJ, Kundel SL. Interleukin-8 as macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-1801.
32. Yuan A, Yang PC, Yu CJ i wsp. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumour angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1957-1963.
33. Jackson J, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997; 11: 457-65.
34. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth-factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-741.
35. Liebovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiesman DM, Shively V, Nusseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α . *Nature* 1987; 329: 630-632.
36. Shima N, Itagaki Y, Nagao M, Yasuda H, Morinaaga T, Higashio K. A fibroblast-derived tumor cytotoxic factor/F-TCT (hepatocyte growth factor/HGF) has multiple functions in vitro. *Cell Biol Int Rep* 1991; 15: 397-408.
37. Date K, Matsumoto K, Kubs K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. Inhibition of tumor growth and invasion by four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 1998; 17: 3045-3054.
38. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P i wsp. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature (London)* 1989; 337: 471-473.
39. Lee PC, Kibbe MR, Schuchert MJ i wsp. Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates $\alpha_v\beta_3$ integrin expression on endothelial cells. *Microvascular Res* 2000; 60: 269-270.
40. Näslund I, Norrby K. NO and de novo mammalian angiogenesis: further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF₁₆₅- induced angiogenesis. *APMIS* 2000; 108: 29-37.
41. diPietro L. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS* 1997; 79: 295-314.
42. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck N. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355.
43. Browder T, Folkman J, Pirie-Shephard S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chemistry* 2000; 275: 1521-1524.
44. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.
45. Holmgren L, O'Reilly S, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med* 1995; 1: 149-53.
46. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y i wsp. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
47. Perletti G, Concari P, Giardini R i wsp. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 1793-1796.
48. Moses MA, Langer R. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 2645-2650.
49. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
50. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998; 91: 3289-99.
51. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T i wsp. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF-121 and VEGF-165 using several concurrent mechanisms *J Biol Chem* 1995; 270: 15059-65.
52. Majewski S, Szmurlo NA, Marczak M, Jablonska S, Bollag W. Synergistic effect of retinoids and interferon α on tumor-induced angiogenesis: antiangiogenic effect on HPV-harboring tumor cell lines. *Int J Cancer* 1994; 57: 81-85.
53. Pepper MS, Vassalli JD, Wilks JW, Schweigerer L, Orci L, Montesano R. Modulation of bovine microvascular endothelial cell proteolytic properties by inhibitors of angiogenesis. *J Cell Biochem*.1994; 55: 419-434.
54. Friesel R, Komoriya A, Maciag T. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol* 1987; 104: 689-696.
55. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 697-703.
56. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M i wsp. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 2000; 87: 448-452.
57. Voest E, Kenyon BM, O'Reilly M, Truitt G, D'Amato R, Folkman J. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. *J National Cancer Inst* 1995; 87: 581-586.
58. Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L i wsp. Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of IL12. *Cancer Res* 2000; 60: 1111-1116.
59. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M i wsp. IL-12 and IL-18 are increased and stimulated INF γ production in sarcoid lungs. *J Immunol* 2001; 166: 642-649.
60. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Schock* 1995; 4, 155-160.
61. Moore BB, Keane MP, Addison ChL, Arenberg DA, Streiter RM. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med* 1998; 46: 113-120.
62. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ i wsp. Interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 1996; 184: 981-992.
63. O'Reilly M, Pirie-Shephard S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the Serpin antithrombin. *Science* 1999; 285: 1926-1931.
64. Norrby K. Heparin and angiogenesis: a low-molecular-weight fraction inhibits and high-molecular-weight fraction stimulates angiogenesis systemically. *Haemostasis* 1993; 23 (Suppl 1): 141-149.