

## WYBRANE ASPEKTY ANGIOGENEZY W SIATKÓWCZAKU

### SELECTED ASPECTS OF ANGIOGENESIS IN RETINOBLASTOMA

Patrycja SUJKA-KORDOWSKA<sup>1,2</sup>, Agnieszka MALIŃSKA<sup>1,2</sup>,  
Michał NOWICKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Anatomii i Histologii  
Uniwersytet Zielonogórski w Zielonej Górze

*Streszczenie:* Angiogeneza jest jednym z najbardziej istotnych czynników warunkujących wzrost i rozwój nowotworów. Większość guzów litych wykazuje zwiększony stopień unaczynienia. Dotyczy to także siatkówczaka – nowotworu wieku dziecięcego, rozwijającego się z komórek nerwowych siatkówki. Doniesienia literaturowe potwierdzają udział głównego regulatora angiogenezy – naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w patogenezie siatkówczaka. Intensywna angiogeneza nowotworowa wiąże się z dużym potencjałem inwazyjnym guza (naciekanie błony naczyniowej, nerwu wzrokowego), co jednocześnie przekłada się na niekorzystne rokowanie dla pacjenta. Z drugiej jednak strony, tak duże znaczenie VEGF dla rozwoju nowotworu stwarza nowe możliwości terapeutyczne. Wydaje się, że terapia z zastosowaniem bewacyzumabu – inhibitora VEGF w znaczący sposób hamuje proces neowaskularyzacji, a tym samym rozwój nowotworu.

*Słowa kluczowe:* angiogeneza, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, VEGF, siatkówczak

*Summary:* Angiogenesis is one of the most important determinants of cancer growth and development. Most solid tumors show an increased degree of vascularity. This also applies to retinoblastoma – a childhood cancer that develops from retinal nerve cells. Literature reports confirm the role of the main regulator of angiogenesis – vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of retinoblastoma. Intensive tumor angiogenesis is associated with high tumor invasive potential (infiltration of the choroid, optic nerve) and unfavorable prognosis for the patient. On the other hand, the significance of VEGF for cancer development comprises new therapeutic options. It seems that therapy with bevacizumab – a VEGF inhibitor, significantly inhibits the neovascularization process, and thus the development of cancer.

*Key words:* angiogenesis, vascular endothelial growth factor, VEGF, retinoblastoma

## ANGIOGENEZA

Proces powstawania naczyń krwionośnych dotyczy przede wszystkim życia prenatalnego. Układ krążenia rozwija się jako jeden z pierwszych. Bezspornie, jego funkcjonowanie jest jednym z najistotniejszych warunków utrzymania homeostazy organizmu.

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych w życiu płodowym uwarunkowane jest zachodzeniem trzech procesów: waskulogenezy, angiogenezy oraz arteriogenezy. Mechanizmem zapoczątkowującym naczyniotworzenie jest waskulogeneza, w której pierwotna sieć naczyniowa powstaje na skutek różnicowania się, migracji i proliferacji komórek macierzystych – hemangioblastów [15]. Z kolei rozrost sieci naczyniowej następuje na skutek angiogenezy, podczas której nowe naczynia krwionośne powstają z naczyń już istniejących poprzez ich rozgałęzianie i wydłużanie [3]. Natomiast proces arteriogenezy jest istotny z punktu widzenia rozwoju naczyń tętniczych. Polega on na znacznym rozroście błony środkowej (warstwy mięśni) małych tętniczek, co prowadzi do powstania funkcjonalnych tętnic [40].

W okresie życia postnatalnego fizjologiczne naczyniotworzenie ograniczone jest do angiogenezy. Proces ten zachodzi podczas cyklu menstruacyjnego (przebudowa błony śluzowej macicy), implantacji zarodka w endometrium czy tworzenia łożyska [32, 66]. Wzrost kości na długość (kostnienie na podłożu chrzęstnym) oraz powstawanie ziarniny podczas gojenia się ran także uwarunkowane są zachodzeniem angiogenezy [12, 76].

Każdy z powyżej przedstawionych procesów w okresie życia pozapłodowego może stać się kluczowym elementem dla rozwoju i przebiegu niektórych chorób. Arteriogeneza jest charakterystyczna dla dysfunkcji dojrzałego serca w stanie nieodtlenienia i niedokrwienia [74]. Naczyniotworzenie z udziałem komórek prekursorowych śródbłonna obserwuje się m.in. w przypadku uszkodzonej rogówki czy stanach niedokrwienia kończyn dolnych [46]. Z kolei zachodzenie procesu angiogenezy obserwuje się w przebiegu przewlekłych zapaleń (łuszczycy, reumatoidalne zapalenie stawów), schorzeń gastrologicznych (choroba Crohna), kardiologicznych (miażdżycy, choroba niedokrwienności serca) [13, 14]. Ponadto, powstawanie nowych naczyń krwionośnych na drodze waskulogenezy, arteriogenezy i angiogenezy obserwuje się w rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych. Wydaje się, że szczególną rolę w tym typie chorób odgrywa angiogeneza.

Angiogeneza jest procesem złożonym i wieloetapowym. Jako pierwszy etap naczyniotworzenia poprzez angiogenezę wymienia się zwiótnienie ściany naczynia oraz stymulację komórek śródbłonna wyściełających światło naczynia, co skutkuje miejscowym poszerzeniem światła naczynia i następowym wzrostem przepływu krwi. Kluczowe dla indukcji angiogenezy są zmiany w obszarze,

w którym następowo dojdzie do naczyńotworzenia. Szczególne znaczenie ma hipoksja (niedotlenienie) i/lub kwasica czy hipoglikemia [75]. Zjawiska te stymulują komórki śródbłonka naczyniowego do produkcji czynników o charakterze proangiogenym. Do tej grupy zalicza się m.in. płytkowy czynnik wzrostu PDGF (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*), angiopoetynę 2 Ang-2 (ang. *Angiopoietin 2*), łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor*) czy, najistotniejszy z nich, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) [57]. Ponadto, na skutek uwalniania przez komórki śródbłonka tlenu azotu, następuje zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych, w efekcie czego dochodzi do wynacynienia niektórych białek osocza (m.in. fibrynogen). To z kolei prowadzi do lokalnej przebudowy substancji międzykomórkowej (ECM, ang. *Extracellular Matrix*), do czego przyczynia się także wytwarzanie przez komórki śródbłonka enzymów proteolitycznych, do których zalicza się metaloproteinazy MMPs (ang. *Matrix Metalloproteinases*). Uwalniane metaloproteinazy degradują elementy macierzy zewnątrzkomórkowej otaczającej naczynie oraz błonę podstawną, na której spoczywają komórki śródbłonka. Otwiera to drogę dla migracji komórek śródbłonka i, jednocześnie, powoduje uwalnianie związanych z ECM cytokin proangiogenych, np. czynnika wzrostu fibroblastów FGF (ang. *Fibroblast Growth Factor*) czy VEGF [13]. Migracja komórek śródbłonka możliwa jest dzięki ekspresji cząsteczek o charakterze adhezyjnym na powierzchni wędrujących komórek śródbłonka (integryny  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , selektyna E), które wchodzi w interakcje ze składnikami ECM [22]. Wśród migrujących komórek śródbłonka można wyróżnić tzw. komórki wiodące (ang. *tip cells*) oraz komórki podążające. Pierwsze z nich nie proliferują, ich rolą jest wyznaczenie kierunku wzrostu powstającego naczynia. Pozostałe natomiast intensywnie się dzielą, co zachodzi jednocześnie z migracją [3]. Komórki śródbłonka układają się w szeregach i początkowo tworzą pęczki. Na skutek wzajemnych oddziaływań między komórkami śródbłonka, a także komórek śródbłonka z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej dochodzi do wytworzenia rurkowatych struktur ze światłem, stanowiących przyszłą błonę wewnętrzną naczynia. Istotną rolę w selekcji komórek wiodących oraz tworzeniu światła naczynia przypisuje się receptorowi Notch oraz jego ligandowi Dll-4 (ang. *Delta-like ligand 4*) [34]. Ostatni etap naczyńotworzenia obejmuje jego dojrzewanie i stabilizację. Konieczna jest stymulacja rekrutacji komórek przydanki (pericytów), a w przypadku naczyń większego kalibru – także komórek mięśni gładkich. Proces ten regulowany jest głównie przez PDGF [59]. Końcowa faza angiogenezy obejmuje wytworzenie stabilnych połączeń komórek śródbłonka z otaczającymi je komórkami mezenchymalnymi, za co odpowiadają przede wszystkim angiopoetyna 1 Ang 1 (ang. *Angiopoietin 1*) oraz ich receptory Tie-1 i Tie-2 [44].

## NACZYNIOWO-ŚRÓDBŁONKOWY CZYNNIK WZROSTU VEGF

Uważa się, że kluczową rolę w regulacji procesu angiogenezy pełnią czynniki o charakterze stymulatorów lub inhibitorów angiogenezy. Zrównoważona ekspresja powyższych czynników jest jednym z elementów determinujących zachowanie homeostazy organizmu. U dorosłych, zdrowych osób, nieco zwiększona ekspresja inhibitorów angiogenezy warunkuje utrzymanie tzw. przełącznika angiogenego (angiogenic switch) w pozycji „wyłączony”. Podczas fizjologicznego naczyniotworzenia, jak również w stanach patologicznych, a szczególnie w nowotworzeniu, równowaga przesuwana się w kierunku angiogenezy [30].

Dla zainicjowania procesu angiogenezy niezbędne jest uruchomienie kaskady sygnałowej, która będzie stymulować komórki śródbłonka naczyniowego do migracji i proliferacji. Kluczowym czynnikiem, który uruchamia powyższy proces, jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF. Odgrywa on znamienne rolę zarówno w angiogenezie fizjologicznej, jak i patologicznej.

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu został odkryty w 1983 roku przez Dvoraka i pierwotnie opisywany był jako czynnik przepuszczalności naczyń krwionośnych [61]. VEGF obejmuje rodzinę cytokin, do której zalicza się VEGF-A (zwyczajowo określane jako VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F oraz łożyskowy czynnik wzrostu PlGF [71]. W wyniku alternatywnego składania podczas transkrypcji genu VEGF powstaje 6 izoform białka, spośród których najczęstsze są VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> i VEGF<sub>189</sub> [24]. VEGF oddziałuje na komórki śródbłonka naczyniowego poprzez wiązanie się ze specyficznymi receptorami błonowymi o charakterze kinaz tyrozynowych: VEGF-R1, VEGF-R2 oraz VEGF-R3. W wyniku oddziaływania VEGF z receptorem 1 i 2 inicjowany jest proces angiogenezy, z kolei receptor 3 stymuluje proces limfoangiogenezy [31]. Ponadto, VEGF-R1 charakterystyczny jest dla naczyniotworzenia w okresie embrionalnym, natomiast ekspresję VEGF-R2 obserwuje się głównie podczas angiogenezy w okresie życia postnatalnego [72]. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu wiąże się także do neuropiliny 1 i 2 (Nrp-1 i Nrp-2), które są receptorami czynników ukierunkowanego wzrostu aksonów – semaforyn.

Głównym czynnikiem indukującym ekspresję VEGF jest HIF-1 $\alpha$  (ang. *Hypoxia Inducible Factor-1 alpha*). Pełni on rolę czynnika transkrypcyjnego. W warunkach niedotlenienia, co często ma miejsce w nowotworzeniu, dochodzi do zablokowania konstytutywnej degradacji HIF-1 $\alpha$  zależnej od tlenu, w efekcie czego może on wiązać się do promotora genu VEGF i stymulować jego transkrypcję [60]. W efekcie VEGF wiążąc się ze swoimi receptorami na powierzchni komórek śródbłonka, uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową, której następstwem są proliferacja i migracja komórek śródbłonka [21]. Tym samym VEGF

wpływa na organizację przestrzenną komórek endotelialnych podczas formowania naczyń, a także zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych [24].

Angiogeny efekt działania VEGF ujawnia się także na innych polach. Czynniki aktywuje syntazę tlenu azotu eNOS, w efekcie czego, poprzez tlenek azotu, powoduje wazodylatację w początkowym stadium angiogenezy [36]. Bierze także udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez stymulację ekspresji odpowiednich proteaz [50]. Ponadto, poprzez aktywację antyapoptotycznego białka Bcl-2 hamuje programowaną śmierć komórki, sprzyjając procesom proliferacji [26].

Udział VEGF w procesach naczyniotworzenia ulega wzmocnieniu w wyniku indukcji jego ekspresji przez inne cytokiny proangiogenne. Należą do nich m.in. transformujący czynnik wzrostu TGF $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), PDGF, nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (ang. *Epithelial Growth Factor*) czy interleukina 1 [64]. Podobnie oddziałuje tlenek azotu, tworząc tym samym autokrynną pętlę z VEGF [55].

Oprócz niewątpliwej roli w neowaskularyzacji, VEGF zaangażowany jest także w procesy związane z dojrzewaniem i różnicowaniem komórek nerwowych oraz glejowych [67]. Wykazano także, że VEGF pełni rolę neurotroficzną względem neuronów ośrodkowego układu nerwowego [65]. Co więcej, badania w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazały zaangażowanie cytokiny w neurogenezę [37].

## ANGIOGENEZA I VEGF W NOWOTWORZENIU

Jednym z kluczowych elementów w rozwoju chorób nowotworowych jest proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. Fakt ten jest znany od 1971 roku, kiedy Judah Folkman postawił tezę, która mówi o tym, że wzrost guza nowotworowego zależy od angiogenezy [28]. W początkowym etapie rozwoju nowotwór rozwija się niezależnie od sieci naczyniowej, tlen, substancje odżywcze, produkty przemiany materii są transportowane na drodze dyfuzji [27]. Jednakże ciągły wzrost objętości guza spowodowany zwiększeniem liczby komórek powoduje, iż dotychczasowy sposób wymiany substancji z otaczającymi tkankami jest niewystarczający. Osiągnięcie przez guz nowotworowy objętości 1-2 mm<sup>3</sup>, co odpowiada około 1 milinowi komórek, jest momentem krytycznym w jego rozwoju. Mikrośrodowisko guza ulega hipoksji i zakwaszeniu na skutek gromadzenia się produktów przemiany materii, a w wyniku niedotlenienia liczba komórek proliferujących i ulegających apoptozie bądź martwicy zrównuje się [49]. Zjawisko to, jak już wspomniano, jest czynnikiem inicjującym proces tworzenia nowej sieci naczyniowej w obrębie guza nowotworowego. Komórki nowotworowe wydzielają czynniki proangiogenne, oddziałujące na drodze para-

kryennej na komórki śródbłonna, stymulując ich wzrost, proliferację i migrację. Indukcja angiogenezy charakteryzuje już początkowe etapy kancerogenezy i jest warunkiem niezbędnym do rozwoju i progresji nowotworu. Istotnym z tego punktu widzenia jest także fakt, iż nowopowstała sieć naczyń krwionośnych warunkuje rozprzestrzenianie się nowotworu w organizmie – tworzenie przerzutów [28]. Ponadto, naczynia krwionośne w obrębie guza stają się źródłem czynników wzrostu, cytokin czy hormonów stymulujących wzrost guza, jak również wykazujących aktywność proteolityczną promującą inwazyjność nowotworu [54, 9].

Nasilony proces naczyniotworzenia, głównie na drodze angiogenezy, obserwuje się w szeregu nowotworów mających postać guzów litych, ale zjawisko to dotyczy także chorób nowotworowych o charakterze uogólnionym (białaczki, chłoniaki) [70]. Szereg badań potwierdza nasilenie angiogenezy w obrębie nowotworów. Obserwuje się zależność pomiędzy wzrostem guza nowotworowego a intensywnością angiogenezy, mierzoną poziomem ekspresji czynników proangiogennych czy też gęstością mikrounaczynienia guza. Obserwacje te poczyniono dla większości nowotworów o charakterze guzów litych, m.in. w raku piersi, jelita grubego, przełyku, pęcherzyka żółciowego, trzustki czy prostaty [43, 62, 6, 52, 68]. Stwierdza się także, iż nasilenie naczyniotworzenia koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby, rokowaniem dla pacjenta i częstością występowania przerzutów [45]. Nasiloną angiogeneza charakteryzuje również nowotwory limfoproliferacyjne, gdzie obserwuje się powstawania naczyń krwionośnych na terenie szpiku kostnego [51, 1, 47].

Uwagi na znaczący udział naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w procesie angiogenezy, jest on jedną z najczęściej badanych molekuł proangiogennych w nowotworach. Wielokrotnie wykazano obecność VEGF w wielu typach nowotworów, takich jak nowotwory płuc, jajnika czy nerki [11, 23]. W nowotworach mózgu, żołądka, przełyku, wątroby obserwuje się istotnie podwyższony poziom transkrypty VEGF. W przypadku nowotworów jelita grubego, piersi, jajnika, przełyku czy kości wykazano podwyższony poziom białka VEGF we krwi pacjentów [78, 63, 8, 48, 35]. Ponadto, w wielu nowotworach (m.in. w raku jajnika, piersi, żołądka czy czerniaku) stwierdzono bezsprzeczną zależność pomiędzy poziomem ekspresji VEGF a stopniem zaawansowania nowotworu, czasem przeżycia pacjentów oraz ryzykiem nawrotu choroby [18, 43, 58].

Fakt, iż naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu ma tak niebagatelne znaczenie w rozwoju większości typów nowotworów, spowodował, iż cytokina ta stała się celem terapii antynowotworowej. Początek XXI wieku był momentem, w którym, po 30 latach badań, zaakceptowano do użytku klinicznego pierwszy lek blokujący działanie VEGF [20]. Substancją czynną leku jest bewacyzumab, który ma postać rekombinowanego przeciwciała mysio-ludzkiego, wykazującego zdolność wiązania wszystkich izoform VEGF. W efekcie dochodzi do zahamowania VEGF-zależnej angiogenezy [25]. Wartością dodaną zastosowania inhibitora

VEGF jest upośledzenie nowotworowej sieci naczyniowej, co skutkuje redukcją ciśnienia śródmiąższowego wewnątrz guza i tym samym ułatwia penetrację chemioterapeutyków [73]. Z uwagi na fakt, iż zastosowanie leczenia hamującego angiogenezę charakteryzuje się wysoce swoistym efektem terapeutycznym, w przypadku nowotworu jelita grubego oraz piersi bewacyzumab jest lekiem pierwszego rzutu [17].

## SIATKÓWCZAK (RETINOBLASTOMA)

Siatkówczak (retinoblastoma) stanowi około 11% wszystkich nowotworów pediatrycznych. Tym samym jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u dzieci. U zdecydowanej większości dzieci siatkówczak rozpoznawany przed ukończeniem 5 r.ż. Nowotwór może występować sporadycznie lub rodzinnie, przy czym dziedziczona jest z reguły postać obuoczną. Wczesne rozpoznanie i szybka interwencja terapeutyczna sprawiają, że w chwili obecnej 95% pacjentów udaje się uratować [19].

Siatkówczak rozwija się w obszarze siatkówki wewnątrz gałki ocznej. Objawy choroby zależą od wielkości oraz lokalizacji jednego bądź wielu ognisk nowotworowych. Siatkówczak we wczesnym stadium, kiedy obszar nowotworu ogranicza się jedynie do niewielkich skupisk na obwodzie siatkówki, bardzo często pozostaje bezobjawowy. Najbardziej charakterystycznym objawem siatkówczaka, który niepokoi rodziców i jest przyczyną zgłoszenia się z dzieckiem do lekarza, jest biała źrenica, tzw. leukokoria, która ma postać białego refleksu na dnie oka [2].

Jak każdy nowotwór, retinoblastoma ma podłoże genetyczne. Główną przyczyną wystąpienia siatkówczaka jest mutacja genu *RBI*, występującego na długim ramieniu chromosomu 13 w miejscu 14 [39]. *RBI* zaliczany jest do puli genów supresorowych, które w warunkach fizjologicznych hamują podziały komórkowe. Zmiany w locus genu powodują, iż nie może on pełnić swojej funkcji, co tym samym skutkuje nadmierną, niekontrolowaną proliferacją komórek nerwowych siatkówki. Istotnym jest fakt, że mutacja musi dotyczyć obydwu kopii genu. Ponadto, mutacje w obrębie genu *RBI* prowadzą do powstania zmian niezłośliwych, które mogą przekształcić się w postać złośliwą w wyniku zmian w innych obszarach genomu [16].

Siatkówczak należy do nowotworów, których wzrost i rozwój uzależnione są od unaczynienia. Cechą charakterystyczną nowotworu w obrazie mikroskopowym jest tworzenie skupisk komórek w postaci mankietu otaczającego naczynia krwionośne. W peryferyjnych obszarach mankietów komórki nowotworowe ulegają nekrozie, co wyraźnie wskazuje na to, że rozwój nowotworu bardziej uzależniony jest od jego zdolności do indukcji neowaskularyzacji niż od wzrostu komórek nowotworowych [10]. Co również istotne, stopień unaczynienia guza

wyraźnie koreluje z potencjałem metastatycznym nowotworu. Siatkówczak wykazujący bogate unaczynienie często nacieka struktury wewnątrzgałkowe (błona naczyniowa, nerw wzrokowy) [56].

## VEGF W SIATKÓWCZAKU

Siatkówczak jest nowotworem naczynio-zależnym, stąd też wiele aspektów związanych z procesem angiogenezy w przebiegu tego nowotworu jest przedmiotem intensywnych badań. Z uwagi na fakt, iż czynniki proangiogenne pełnią kluczową rolę w inicjacji i przebiegu angiogenezy w nowotworach, określenie poziomu ich ekspresji oraz lokalizacji może być wyznacznikiem naczyniotworzenia w obrębie guza. Szczególne zainteresowanie budzi naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, jako główny mediator neowaskularyzacji.

Pierwsze doniesienia świadczące o zaangażowaniu VEGF w angiogenezę w przypadkach siatkówczaka pojawiły się w połowie lat 90-tych XX wieku. Kwanta i wsp. odnotowali obecność VEGF w komórkach siatkówczaka, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [41]. Dwa lata później, w 1998 roku, grupa badawcza Stitt i wsp. przeprowadziła immunolokalizację naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w komórkach guza, tkankach otaczających guz (tęczówka, siatkówka, błona naczyniowa), jak również w tym samych strukturach zdrowych gałek ocznych. Wykazano, że ekspresja VEGF charakteryzuje komórki guza oraz tęczówkę i naczyniówkę zajętych gałek ocznych, natomiast nie obserwowano VEGF w prawidłowych elementach oka, pochodzących z niezajętych gałek ocznych. Ponadto, grupa ta oceniała także lokalizację i ekspresję receptorów 1 i 2 VEGF. Obecność obydwu receptorów odnotowano w komórkach śródbłonka naczyń towarzyszących guzowi, jak również w komórkach guza zlokalizowanych w sąsiedztwie naczyń. Dodatkowo, podwyższona ekspresja receptorów charakteryzowała także naczynia błony naczyniowej oraz tęczówki. Co ciekawe, tęczówka i naczyniówka, jak również komórki Müllera, amakrynowe, zwojowe siatkówki pochodzące z prawidłowych gałek ocznych wykazywały ekspresję VEGF oraz jego receptorów [69]. Część z tych obserwacji została potwierdzona przez Bai i wsp.. Badania na myszach z nokautem genu VEGF wykazały, że komórki Müllera w warunkach niedotlenienia mają zdolność do regulacji neowaskularyzacji w siatkówce poprzez wydzielanie VEGF [7]. Z kolei Kim i wsp. zasugerowali, że naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu może mieć znaczenie w różnicowaniu się komórek siatkówczaka oraz formowaniu rozet Flexnera-Wintersteina, które są dosyć charakterystycznym dla tego nowotworu topograficznym ugrupowaniem komórek. Potwierdza to fakt lokalizacji białka w określonych obszarach guza,



szczególnie wewnętrznych partiach rozet [38]. Grupa Youssef i wsp. wykazała, że VEGF może być czynnikiem niepomyślnej prognozy dla pacjentów. Zaobserwowali oni wyraźną zależność między poziomem ekspresji cytokiny a potencjałem inwazyjnym nowotworu (co oceniano poprzez obecność lub brak nacieku komórek nowotworowych w obszarze nerwu wzrokowego). Ponadto, wykazali wysoką korelację pomiędzy ekspresją VEGF i białka CD117 (C-kit), które jest wyznacznikiem poziomu agresywności guza [79]. Podobną obserwację poczyniła grupa Garcia i wsp., przy czym dotyczyła ona korelacji ekspresji VEGF oraz Sox2, białka będącego markerem komórek macierzystych. Wykazano, że komórki wykazujące ekspresję Sox2 zaangażowane są w procesy związane z progresją nowotworową, wytwarzaniem mechanizmów oporności lekowej czy powstawaniem wznowy. Z uwagi na to, wydaje się, że zwiększony poziom obydwu molekuł w siatkówczaku może tłumaczyć agresywny charakter nowotworu [29]. W 2018 roku opublikowano rezultaty badań, w których za pomocą techniki metaanalizy określono zależność pomiędzy ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu a patogenezą siatkówczaka. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na związek między nadekspresją VEGF a ryzykiem zachorowania na siatkówczaka. Ponadto, podwyższony poziom cytokiny wyraźnie koreluje z potencjałem inwazyjnym nowotworu (zajęcie nerwu wzrokowego), jak również z poziomem różnicowania się komórek [77].

Co ciekawe, powyższych obserwacji nie potwierdzili Arean i wsp.. Nie stwierdzili oni zależności pomiędzy ekspresją VEGF a niepomyślnymi czynnikami prognostycznymi, wśród których znalazły się poziom zróżnicowania komórek guza, naciekanie błony naczyniowej i/lub nerwu wzrokowego, rozsiew w obszarze komory przedniej i komory ciała szklistego, jak również stopień zaawansowania nowotworu. Jednakże, zaobserwowali wyraźną zależność pomiędzy progresją guza a zwiększoną ekspresją VEGF na poziomie białka w obszarze guza. Ponadto, poziom VEGF korelował z indeksem mitotycznym i apoptotycznym komórek, co odzwierciedla wysoki potencjał proliferacyjny nowotworu [5].

W 2012 roku grupa Radhakrishnan i wsp. dokonała oceny ekspresji VEGF w gałkach ocznych, które zostały pobrane od pacjentów poddanych uprzednio chemioterapii neoadiuwantowej. Obserwacje były zaskakujące – w ponad 27% przypadków stwierdzono obecność VEGF w komórkach guza. Ponadto, ekspresja VEGF korelowała z lokalnym rozsiewem obserwowanym w badaniu rezonansem magnetycznym wykonanym przed enukleacją, jak również z rozsiewem guza poza twardówkę. Sugeruje to, że VEGF jest czynnikiem niepomyślnej prognozy, jak również wskazuje, że stosowane leczenie nie jest wystarczająco efektywne [53]. Implikuje to także przypuszczenie, że być może skuteczniejszą formą leczenia w przypadku siatkówczaka mogłoby być zastosowanie także/lub terapii antyangiogennej.

## TERAPIA ANTYANGIOGENNA W SIATKÓWCZAKU

Nowotwory bogato unaczynione należą do tej grupy chorób, w których jedną z form potencjalnej terapii może być leczenie hamujące powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Podobne próby podejmowane są także w przypadku siatkówczaka. Czynnikiem, który potwierdza zasadność podejmowanych prób wydaje się być także fakt, iż terapia hamująca VEGF przynosi doskonałe rezultaty u pacjentów z chorobami naczyniowymi siatkówki i naczyńówki [4].

Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania inhibitorów VEGF w retinoblastoma pojawiły się w pierwszych latach XXI wieku. W 2008 roku Lee i wsp. sprawdzili skuteczność stosowania bewacyzumabu na liniach komórek siatkówczaka Y79. Komórki nowotworowe wszczepiane były także myszom, w celu określenia działania terapeutycznego w warunkach *in vivo*. W obydwu przypadkach zastosowanie leku znacząco zahamowało wzrost guza nowotworowego [42]. Podobnych obserwacji dokonali Zhang i wsp. Ponadto, wyniki ich badań wyraźnie wskazują, że jednoczesne zastosowanie inhibitora VEGF i karboplatyny hamuje wzrost guza i zwiększa potencjał apoptotyczny komórek nowotworowych [80]. Ciekawe obserwacje poczyniła grupa Heo i wsp. Wykazali oni, że bewacyzumab może hamować różnicowanie komórek siatkówczaka, poprzez blokadę ścieżki sygnałowej kinazy ERK1/2, jak również hamowanie ekspresji neurofilamentów i białka shank2 [33]. Sugeruje to, że oprócz klasycznego efektu antyangiogennego, bewacyzumab może oddziaływać negatywnie na rozwój nowotworu również poprzez inhibicję samych komórek guza.

Mimo niewątpliwego zaangażowania naczyniowo-śródbłonkowego czynniki wzrostu w rozwój siatkówczaka, jak również obiecujących rezultatów stosowania inhibitorów VEGF, należy zwrócić uwagę na bardzo istotny aspekt potencjalnego wykorzystania tego typu terapii u pacjentów pediatrycznych, jako że nowotwór ten występuje właśnie w tej grupie wiekowej. Otwartą kwestią pozostaje ogólnoustrojowy wpływ inhibitorów VEGF u pacjentów w okresie intensywnego wzrostu i rozwoju. Również z uwagi na zaangażowanie VEGF w rozwój komórek nerwowych i glejowych, krótkotrwała supresja cytokiny może negatywnie oddziaływać na funkcjonowanie układu nerwowego.

## PODSUMOWANIE

Retinoblastoma jest nowotworem charakteryzującym się wysokim stopniem unaczynienia. W dużej mierze świadczy o tym fakt, iż komórki guza wykazują ekspresję kluczowego stymulatora angiogenezy – naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Wydaje się także, że ekspresja VEGF wiąże się ze zwiększoną inwazyjnością nowotworu, co sugeruje zaangażowanie cytokiny w rozwój siat-

kówcza. Sprawia to także, że VEGF jest potencjalnym celem w terapii nowotworu. Dotychczasowe wyniki badań z zastosowaniem bewacyzumabu – inhibitora VEGF, są obiecujące. Jednakże, należy mieć na uwadze fakt, iż stosowanie u pacjentów pediatrycznych terapeutyków hamujących czynniki działające na poziomie fizjologicznym i niezbędne dla prawidłowego rozwoju, obarczone jest pewnym ryzykiem wystąpienia niepożądanych powikłań.

## PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Inventus Plus (IP2012 39972).

## LITERATURA

- [1] Aboudola S, KINI AR. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders: a therapeutic target? *Curr Opin Hematol* 2005; 12(4): 279-283.
- [2] ABRAMSON DH, FRANK CM, SUSMAN M, WHALEN MP, DUNKEL IJ, BOYD NW 3RD. Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr* 1998; 132: 505-08.
- [3] ADAMS RH, ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 464-478
- [4] ANDREOLI CM, MILLER JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 502-508.
- [5] Areán C, ORELLANA ME, ABOURBIH D, ABREU C, PIFANO I, BURNIER MN JR. Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2010; 128(2): 223-9.
- [6] BACHELDER RE, CRAGO A, CHUNG J, WENDT MA, SHAW LM, ROBINSON G, MERCURIO AM. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5736-40.
- [7] BAI Y, MA JX, GUO J, WANG J, ZHU M, CHEN Y, LE YZ. Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J Pathol* 2009; 219(4): 446-454.
- [8] BROLL R, ERDMANN H, DUCHROW M, OEVERMANN E, SCHWANDNER O, MARKERT U, BRUCH HP, WINDHÖVEL U. Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? *Eur J Surg Oncol* 2001; 27(1): 37-42.
- [9] Brooks PC, STRÖMBLAD 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): 1815-22.
- [10] BURNIER MN, MCLEAN IW, ZIMMERMAN LE, ROSENBERG SH. Retinoblastoma. The relationship of proliferating cells to blood vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(10): 2037-40.
- [11] CAPP C , WAJNER SM, SIQUEIRA DR, BRASIL BA, MEURER L, MAIA AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20: 863-71.
- [12] Carlevaro Mf, CERPELLI 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.
- [13] Carmeliet P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-257.
- [14] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653-660.

- [15] CONWAY EM, COLLEN D, CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; **49**: 507-521
- [16] CORSON TW, GALLIE BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 617-34.
- [17] 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.
- [18] DABROSIN C. Variability of vascular endothelial growth factor in normal human breast tissue in vivo during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 2695-8.
- [19] DIMARAS H, KIMANI K, DIMBA EA, GRONSDAHL P, WHITE A, CHAN HS, GALLIE BL. Retinoblastoma. *Lancet* 2012; **379**(9824): 1436-46.
- [20] D'ORAZIO A, LEE D, ELLIS L, CHU E. Adding a Humanized Antibody to Vascular Endothelial Growth Factor (Bevacizumab, Avastin™) to Chemotherapy Improves Survival in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2003; **3**(2): 85-8.
- [21] DVORAK HF, NAGY JA, FENG D, BROWN LF, DVORAK AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**: 97-132.
- [22] ELICEIRI BP, CHERESH DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; **103**(9): 1227-1230.
- [23] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997 **18**: 4-25.
- [24] FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The Biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**(6):669-676.
- [25] 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.
- [26] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; **9**: 2-10.
- [27] FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; **1**: 27-31.
- [28] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**(21): 1182-6.
- [29] GARCIA JR, GOMBOS DS, PROSPERO CM, GANAPATHY A, PENLAND RL, CHÉVEZ-BARRIOS P. Expression of Angiogenic Factors in Invasive Retinoblastoma Tumors Is Associated With Increase in Tumor Cells Expressing Stem Cell Marker Sox2. *Arch Pathol Lab Med* 2015; **139**(12): 1531-8.
- [30] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**(3): 353-364.
- [31] HARPER J, MOSES MA. Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *EXS* 2006; **96**: 223-268.
- [32] HAZZARD TM, STOUFFER RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; **14**(6): 883-900.
- [33] HEO JW, KIM JH, CHO CS, JUN HO, KIM DH, YU YS, KIM JH. Inhibitory activity of bevacizumab to differentiation of retinoblastoma cells. *PLoS One* 2012; **7**(3): e33456.
- [34] HOFMANN JJ, IRUELA-ARISPE ML. Notch signaling in blood vessels. Who is taking to whom about what? *Circ Res* 2007; **100**: 1556-1568.
- [35] HOLZER G, OBERMAIR A, KOSCHAT M, PREYER O, KOTZ R, TRIEB K. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 601-604.
- [36] HOOD JD, MEININGER CJ, ZICHE M, GRANGER HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; **274**(3Pt2): H1054-1058
- [37] JIN K, ZHU Y, SUN Y, MAO XO, XIE L, GREENBERG DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(18): 11946-50.

- [38] Kim M, Kim JH, Kim JH, Kim DH, Yu YS. Differential expression of stem cell markers and vascular endothelial growth factor in human retinoblastoma tissue. *Korean J Ophthalmol* 2010; **24**(1): 35-9.
- [39] KNUDSON AG JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 820-23.
- [40] 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.
- [41] Kvantá A, STEEN B, SEREGARD S. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinoblastoma but not in posterior uveal melanoma. *Exp Eye Res* 1996; **63**(5): 511-8.
- [42] LEE SY, KIM DK, CHO JH, KOH JY, YOON YH. Inhibitory effect of bevacizumab on the angiogenesis and growth of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2008; **126**(7): 953-8.
- [43] MAEDA K, CHUNG YS, OGAWA Y, TAKATSUKA S, KANG SM, OGAWA M, SAWADA T, SOWA M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; **77**(5): 858-63.
- [44] MAISONPIERRE PC, SURI C, JONES PF, BARTUNKOVA S, WIEGAND SJ, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, McCLAIN J, ALDRICH TH, PAPADOPOULOS N, DALY TJ, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; **277**(5322): 55-60.
- [45] MIZIA-MALARZ A, SOBOL G, Woś H. Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych. *Pol Merk Lek* 2008; **141**: 185-189.
- [46] NACOV E. Tumor angiogenesis formation of vessels de novo at germ cel tumors. *Cancer* 1999; **66**(5): 916-922.
- [47] 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.
- [48] OEHLER MK, CAFFIER H. Prognostic relevance of serum vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; **20**(5): 109-112.
- [49] PAWLAK J, KLIM B, SZKUDLAREK M, DZIĘCIOŁ J. Formowanie naczyń krwionośnych w chorobie wieńcowej – gdzie jesteśmy. *Post Hig Med Dośw* 2004; **5**: 358-363.
- [50] PEPPER MS, FERRARA N, ORCI L, MEONTESANO R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**(2): 902-906.
- [51] 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.
- [52] PRICE DJ, MIRALEM T, JIANG S, STEINBERG R, AVRAHAM H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; **12**(3): 129-35.
- [53] RADHAKRISHNAN V, KASHYAP S, SINGH L, BAKHSI S. VEGF expression in residual tumor cells in orbital retinoblastoma (IRSS stage III) treated with NACT: a prospective study. *Pediatr Blood Cancer* 2012; **59**(3): 567-9.
- [54] 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): 2438-50.
- [55] RISTIMÄKI A, NARKO K, ENHOLM B, JOUKOV V, ALITALO K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998; **273**(14):8413-8.
- [56] RÖSSLER J, DIETRICH T, PAVLAKOVIC H, SCHWEIGERER L, HAVERS W, SCHÜLER A, BORNFELD N, SCHILLING H. Higher vessel densities in retinoblastoma with local invasive growth and metastasis. *Am J Pathol* 2004; **164**(2): 391-4.
- [57] SACEWICZ I, WIKTORSKA M, WYSOCKI T, NIEWIAROWSKA J. Mechanizmy angiogenezy nowotworowej. *Postępy Hig Med Dosw.* 2009; **63**: 159-168.

- [58] SALVEN P, HEIKKILA P, JOENSUU H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 1997; **76**: 930-934.
- [59] SATO N, BEITZ JG, KATO J, YAMAMOTO M, CLARK JW, CALABRESI P, RAYMOND A, FRACKELTON AR JR. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993; **142**(4): 1119-1130.
- [60] SEMENZA GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J APPL Physiol* 2000; **88**: 1474-80.
- [61] SENGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**(4587): 5629-5632.
- [62] Seo Y, BABA H, FUKUDA T, TAKASHIMA M, SUGIMACHI K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; **88**(10): 2239-45.
- [63] SHIMADA H, TAKEDA A, NABEYA Y, OKAZUMI SI, MATSUBARA H, FUNAMI Y, HAYASHI H, GUNJI Y, KOBAYASHI S, SUZUKI T, OCHIAI T. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; **92**(3): 663-9.
- [64] SIEGFRIED G, BASAK A, CROMLISH JA, BENJANNET S, MARCINKIEWICZ J, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG, KHATIB AM. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003; **111**(11):1723-32.
- [65] SILVERMAN WF, KRUM JM, MANI N, ROSENSTEIN JM. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience* 1999; **90**(4):1529-41.
- [66] SMITH SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* 2000; **15** Suppl 6: 59-66.
- [67] 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**(14):5731-40.
- [68] STEWART M, TURLEY H, COOK N, PEZZELLA F, PILLAI G, OGLIVIE D, CARLIDGE S, PATERSON D, COPLEY C, KENDREW J, BARNES C, HARRIS AL, GATTER KC. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology* 2003; **43**(1): 33-9.
- [69] STITT AW, SIMPSON DA, BOOCOCK C, GARDINER TA, MURPHY GM, ARCHER DB. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours. *J Pathol* 1998; **186**(3): 306-12.
- [70] 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.
- [71] TAMMELA T, ENHOLM B, ALITALO K, PAAVONEN K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; **65**(3): 550-563.
- [72] THAIRU N, KIRIAKIDIS S, DAWSON P, PALEOLOG E. Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience. *Angiogenesis* 2011; **14**(3): 223-234.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] VAUPEL P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncology* 2004; **9**: 10-17.
- [76] WITTE MB, BARBUL A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; **77**(3): 509-528.
- [77] WU Q, SUN X, ZHENG G. VEGF overexpression is associated with optic nerve involvement and differentiation of retinoblastoma: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; **97**(51): e13753

- [78] YAMAGUCHI R, YANO H, IEMURA A, OGASAWARA S, HARAMAKI M, KOJIRO M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; **28**(1): 68-77.
- [79] YOUSSEF NS, SAID AM. Immunohistochemical expression of CD117 and vascular endothelial growth factor in retinoblastoma: possible targets of new therapies. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7**(9): 5725-37.
- [80] ZHANG Q, CHENG Y, HUANG L, BAI Y, LIANG J, LI X. Inhibitory effect of carboplatin in combination with bevacizumab on human retinoblastoma in an *in vitro* and *in vivo* model. *Oncol Lett* 2017; **14**(5): 5326-5332.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 30.01.19*

*Przyjęto: 12.02.19*

*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*

