

Czynniki z rodziny VEGF oraz ich receptory w diagnostyce raka piersi

VEGF family factors and their receptors in the diagnostics of breast cancer

Monika Zajkowska¹, Emilia Lubowicka², Maciej Szmitkowski¹, Sławomir Ławicki¹

¹ Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² Samodzielna Pracownia Medycyny Estetycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Rak piersi od lat jest najbardziej rozpowszechnionym nowotworem złośliwym dotyczącym kobiety i jedną z najczęstszych przyczyn ich śmiertelności z powodu chorób nowotworowych. Obecnie w diagnostyce raka piersi najbardziej popularną metodą wśród badań przesiewowych jest mammografia. Nie jest to jednak metoda wystarczająco czuła, dlatego też prowadzi się badania diagnostyczne, mające na celu znalezienie nowych markerów nowotworowych. W przypadku raka piersi dotychczas uznawanym markerem jest CA 15-3. Jednak nie wykazuje on wystarczająco wysokiej czułości diagnostycznej i nie przyspiesza procesu diagnostycznego, co przyczynia się do rozpoznania raka dopiero w stadium bardziej zaawansowanym i jednocześnie do skrócenia przeżywalności oraz jakości życia pacjentek. Dlatego też poszukuje się nowych markerów, którymi mogłyby być m. in. czynniki z rodziny VEGF oraz ich receptory, aby wykrywanie zmian nowotworowych odbywało się w jak najwcześniejszym stadium zawiązania raka piersi.

Abstract

Breast cancer since many years is the most widespread cancer in women and one of the most common causes of their death related to malignancies. Currently in breast cancer diagnosis, the most popular screening test is mammography. However, this is not a sufficiently sensitive method, therefore, other diagnostic tests are performed to detect new cancer markers. In the case of breast cancer, the currently accepted marker is CA 15-3. However, it does not show sufficiently high diagnostic sensitivity, does not accelerate the diagnostic process, which simultaneously contributes to the delayed diagnosis of cancer in more advanced stages, shortening of survival and quality of life for patients. Therefore, new diagnostic markers are being sought, which could be for example VEGF family factors and their receptors, to detect cancer lesions at the earliest possible stage of breast cancer implantation.

Słowa kluczowe: CA 15-3, markery nowotworowe, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3

Key words: CA 15-3, tumor markers, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3

Wstęp

Rak piersi stanowi jeden z najczęściej diagnozowanych nowotworów oraz najczęstszą przyczynę zgonów wśród kobiet na świecie. W 2012 roku stwierdzono 1,7 mln przypadków zachorowań oraz 521 900 zgonów. Największe odsetki zarówno występowania jak i umieralności związanej z rakiem piersi stwierdzono w Stanach Zjednoczonych, natomiast najmniejsze – w Afryce i Azji [1]. Na całym świecie obserwuje się dużą zmienność wskaźnika przeżywalności z szacowanym 5-letnim czasem przeżycia wynoszącym odpowiednio 80% w krajach o wysokim dochodzie, a poniżej 40% w krajach biednych [2]. W przypadku krajów wysoko rozwiniętych, takich jak USA, zachorowalność na raka piersi rokrocznie wzrasta [3].

Badania przesiewowe w raku piersi

Rak piersi jest zwykle diagnozowany w wyniku badań przesiewowych lub ze względu na zaobserwowanie niepokojących objawów

(np. ból, wyczuwalne palpacyjnie zmiany), co wpływa na konieczność zlecenia przez lekarza ginekologa specjalistycznych badań diagnostycznych. Wytyczne NCCN (National Comprehensive Cancer Network) z 2013 roku zalecają coroczne kliniczne badanie piersi dla kobiet znajdujących się w przedziale średniego stopnia ryzyka, mających powyżej 40 lat, oraz samobadanie piersi i konieczność wykonywania regularnych badań profilaktycznych [4]. Ginekolodzy zachęcają kobiety do wykonywania comiesięcznego samobadania (między 3 a 5 dniem cyklu miesięczkowego), aby zapoznać się z ich anatomią i tym samym wykryć wczesne zmiany nowotworowe [5]. Jedyną dostępną metodą badań przesiewowych, znacząco wpływającą na zmniejszenie śmiertelności z powodu raka piersi jest mammografia. Przesiewowe wykonywanie tego badania u kobiet w wieku 40 lat może zmniejszyć śmiertelność o 15%, natomiast u kobiet w wieku 60 lat – o 32%. American Cancer Society (ACS) rekomenduje wykonywanie tego rodzaju badania co rok, po prze-

kroczeniu 45 r.ż. lub wcześniej, w zależności od indywidualnych wskazań klinicznych [6, 7]. Klinicyści podejmują jednak dyskusję nad negatywnymi aspektami mammografii, do których zalicza się: zwiększony odsetek wyników fałszywie dodatnich, dodatkowe narażenie na promieniowanie, ból a także lęk przed badaniem [7]. W celu zwiększenia wykrywalności raka piersi u pacjentek z podwyższonym ryzykiem, badanie mammograficzne zostało uzupełnione o inne techniki obrazowe takie jak ultrasonografia i rezonans magnetyczny [8, 9].

Biochemiczne markery nowotworowe raka piersi

W rekomendacjach ASCO (American Society of Clinical Oncology) uwzględniono markery nowotworowe przydatne w profilaktyce, badaniach przesiewowych i leczeniu raka piersi. Wśród tych markerów wyróżnia się: CEA, CA 15-3, CA 27.29, receptor estrogenowy (ER), receptor progesteronowy (PR) oraz receptor HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) [10].

Antygen karcinoembrionalny (CEA) jest glikoproteiną, zawierającą 45-50% węglowodanów [11]. CEA uznawany jest za klasyczny marker, którego stężenie wzrasta podczas pojawiania się przerzutów nowotworowych. Wytyczne ASCO zalecają monitorowanie stężenia CEA w surowicy chorych z przerzutowym rakiem piersi. Pozwala to na podjęcie odpowiedniej decyzji odnośnie leczenia, w połączeniu ze standardowym obrazowaniem, jeśli początkowe stężenia tego markera są podwyższone w momencie rozpoznania rozsiaanej choroby nowotworowej [12]. Mimo iż wykazano, że tylko u 40-50% pacjentów z przerzutowym rakiem piersi obserwuje się podwyższone stężenia CEA, to łączna analiza CEA z CA 15-3 może powodować wzrost czułości diagnostycznej [13].

CA 15-3 jest glikoproteiną produkowaną przez gen MUC-1 oraz jednym z pierwszych krążących markerów, wykazujących znaczenie jako niezależny czynnik prognostyczny u pacjentów z rakiem piersi. Podwyższony poziom tego markera w surowicy występuje częściej u chorych z rakiem piersi i towarzyszącymi przerzutami odległymi, niż u pacjentów z nowotworem pierwotnym [14]. Oznaczanie CA 15-3 znalazło zastosowanie kliniczne w monitorowaniu pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem piersi, umożliwiając wczesne wykrywanie nawrotów [15]. W kolejnych badaniach wykazano, że poziom CA 15-3 w surowicy jest niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka piersi z przerzutami [16].

CA 27.29 jest mucynopodobną glikoproteiną, produkowaną przez gen MUC-1. Marker CA 27.29 u chorych z rakiem piersi wykazuje znaczenie kliniczne podobne do markera CA 15-3. Niektóre badania wskazują jednak na jego wyższą czułość diagnostyczną [17]. Większość badań klinicznych dotyczących przydatności markerów kodowanych przez gen MUC-1 w monitorowaniu przerzutowego raka piersi przeprowadzono przy ocenie markera CA 15-3 [18]. Wydaje się, że CA 27.29 jest bardziej czuły i swoisty niż CEA, ale wykazuje przydatność diagnostyczną podobną do CA 15-3, umożliwiając wczesniejsze wykrywanie przerzutowego raka piersi [19]. Obecnie rutynowe leczenie kliniczne raka piersi opiera się na tradycyjnych czynnikach prognostycznych, do których zalicza się stan węzłów chłonnych, ocenę histologiczną i wielkość guza pierwotnego [20, 21]. Standardową praktyką w leczeniu raka piersi stała się

również ocena ekspresji receptora estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR) w materiałach biopsyjnych inwazyjnego raka piersi przed zabiegami terapeutycznymi, ponieważ dostarcza ona informacji na temat odpowiedzi na terapię hormonalną oraz rokowania co do przeżycia pacjentów. Receptory hormonalne odgrywają rolę w rozwoju i progresji raka piersi, a także identyfikują pacjentów z mniejszym ryzykiem nawrotu i dłuższym przeżyciem [22]. Guzy wykazujące ekspresję receptorów ER mają lepsze rokowanie i częściej reagują na terapię hormonalną niż nowotwory bez ekspresji tych receptorów. Dodatkowa obecność receptora PR zwiększa prawdopodobieństwo odpowiedzi na terapię hormonalną [23]. Receptor HER2 jest białkiem transbłonowym o aktywności kinazy tyrozynowej, kodowanym przez gen *c-erbB-2*. Aktywacja i nadekspresja komórkowych onkogenów odgrywa istotną rolę w rozwoju raka. Stwierdzono, że podwyższona ekspresja receptora HER2 lub amplifikacja genu HER2 stanowią niekorzystne czynniki rokownicze u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych [24]. W innych badaniach zaobserwowano, że ekspresja receptora HER2 może być użytecznym wskaźnikiem prognostycznym przeżycia pacjentów [25]. Cao i wsp. wykazali istotny związek między nadekspresją receptora HER2 a zmniejszoną przeżywalnością chorych z rakiem piersi [26]. Zaobserwowano również, że zastosowanie przeciwciał blokujących aktywność receptora HER2 skutkuje lepszą odpowiedzią na leczenie oraz wydłużeniem czasu przeżycia chorych z rakiem piersi [24, 27, 28].

Rodzina śródbłonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu

Czynniki z rodziny VEGF (śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu) zaliczane są do grupy białek nazywanych czynnikami wzrostu wchodzących w skład szerszego zbioru protein sygnalizacyjnych – cytokin. Stanowią one grupę pięciu białek (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu)) mających znaczący wpływ na procesy angi- i limfangiogenezy [29, 30, 31]. VEGF są uwalniane z komórek jako homodimerskie glikoproteiny związane mostkiem dwusiarczkowym (32). VEGF-A, VEGF-B i PlGF posiadają różne izoformy, natomiast VEGF-C i VEGF-D są proteolitycznie przetwarzane do postaci dojrzalej [29].

W przypadku VEGF-A nazywanego wcześniej czynnikiem przepuszczalności naczyń (VPF), w wyniku alternatywnego składania (splicingu) mRNA, mogą powstać jego izoformy. Wśród nich, możemy wyróżnić najważniejsze cztery, występujące u ludzi – VEGF121, VEGF165, VEGF189 i VEGF206. VEGF165 jest dominującą formą VEGF-A z punktu widzenia ilości i aktywności biologicznej. Ulega ona nadmiernej ekspresji w wielu nowotworach i jest często korelowana z progresją, inwazją i przerzutowaniem komórek nowotworowych [33-36]. VEGF-A został odkryty w roku 1989, jego gen składa się z 8 egzonów i odgrywa ważną rolę w procesach tworzenia naczyń krwionośnych [37, 38]. Jest syntetyzowany przez różne typy komórek, w tym komórki tuczne, komórki mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych, makrofagi, fibroblasty, komórki nowotworowe, komórki śródbłonka, monocyty, keratynocyty, eozynofile i limfocyty T [34]. W prawidłowych tkankach najwyższe poziomy mRNA czynnika VEGF-A można znaleźć w płucach, nerkach, sercu i nadnerczach [39]. VEGF-B i PlGF również stymulują angiogenezę w prawidłowych tkankach, jednak ich aktywność jest znacznie słabsza niż w przy-

padku VEGF-A. Udowodniono, że wzrost stężenia PlGF sprzyja patologicznej angiogenezie w guzach i zmianach zapalnych [40, 41]. PlGF wyizolowano po raz pierwszy z ludzkiego łożyska krótko po odkryciu VEGF, później nazwanego VEGF-A [30]. Istnieją cztery izoformy PlGF (PlGF-1-4) u ludzi, ale tylko jeden (PlGF-2) u myszy. PlGF jest znacząco wyrażany w łożysku, a w niższych stężeniach w sercu, płucach i mięśniach szkieletowych [42]. Później został zidentyfikowany również w różnych nowotworach [43]. PlGF jest bardzo podobny do VEGF-B pod wieloma względami, ale ich wpływ na angiogenezę wydaje się znacznie różnić. PlGF wiąże się z siarczanem heparanu i tymi samymi receptorami co VEGF-B, a mianowicie VEGFR-1 i NRP-1. W przeciwieństwie do VEGF-B, PlGF jest w stanie stymulować angiogenezę z podobną wydajnością jak VEGF-A. Zwiększa on również przepuszczalność naczyń [30, 40]. VEGF-B (znany również jako VRF – VEGF-related factor) został odkryty po raz pierwszy w 1996 r. Ma strukturę bardzo podobną do struktury VEGF-A, a mysie VEGF-B są w około 43% identyczne z sekwencją aminokwasową mysiego VEGF-A164 [34]. Gen *Vegfb* jest wysoce konserwatywny u ssaków, wykazuje 88% homologii między mysim a ludzkim czynnikiem wzrostu na poziomie sekwencji aminokwasowej. *Vegfb* składa się z siedmiu eksonów i wytwarza dwie izoformy z powodu istnienia akceptorowych alternatywnych miejsc składania (splicingowych) w eksonie 6 – VEGF-B167 oraz VEGF-B186. Masa cząsteczkowa homodimerów wynosi odpowiednio 42 i 60 kDa. Obie izoformy wiążą się z VEGFR-1 oraz NRP-1 (Neuropilin 1) [30].

VEGF-C i VEGF-D są wytwarzane z prekursorów poprzez cięcia proteolityczne. VEGF-C został po raz pierwszy zidentyfikowany w roku 1996, jest niezbędny w rozwoju zarodkowym w procesie tworzenia naczyń limfatycznych. Jest wytwarzany jako białko prekursorowe, które jest aktywowane przez wewnątrzkomórkowe konwertazy pro-proteiny [44]. Ujawnia on mitogenną i ochronną rolę zarówno dla naczyń limfatycznych, jak i naczyń krwionośnych. Wyraźną ekspresję VEGF-C stwierdza się w sercu, łożysku, mięśniach, jajnikach, jelitach i niektórych nowotworach. Czynniki ten odpowiada również za wzrost przepuszczalności i średnicy naczyń limfatycznych [39, 45, 46]. Udowodniono, że brak prawidłowego tworzenia naczyń limfatycznych, związanego z brakiem genu dla VEGF-C, skutkuje u myszy śmiercią prenatalną z powodu nagromadzenia płynu w tkankach zarówno u homo-, jak i heterozygot, co wskazuje, że VEGF-C odgrywa ważną rolę w rozwoju zarodkowej limfangiogenezy [45, 47, 48].

VEGF-D (c-fos induced growth factor) ulega ekspresji w płucach, skórze, sercu, mięśniach szkieletowych, przewodzie pokarmowym i niektórych nowotworach. Stymuluje wzrost i migrację limfatycznych komórek śródbłonna. Podobnie jak VEGF-C, VEGF-D uczestniczy w procesie limfangiogenezy [34, 49, 50]. Gen VEGF-D koduje 7 egzonów. Dojrzwianie VEGF-D jest podobne do VEGF-C i zachodzi przez rozszczepienie białka w regionach N i C-końcowych. Ostatnie doniesienia wykazały, że nadekspresja VEGF-D indukuje limfangiogenezę guza i sprzyja przerzutom limfatycznym w modelach nowotworu u myszy

[51]. Nadekspresja VEGF-D koreluje ze wzrostem naczyń limfatycznych i przerzutami limfatycznymi. Ostatnie badania sugerują, że VEGF-D jest niezbędny do wprowadzenia komórek nowotworowych do układu limfatycznego, co przyczynia się do powstawania przerzutów. VEGF-D wspomaga zmiany strukturalne w naczyniach limfatycznych i indukuje rozszerzenie naczyń. Zwiększa również odpowiedź śródbłonna na prostaglandynę E2 (PGE2) przez hamowanie dehydrogenaz prostaglandyn (PGDH) [52, 53]. Rola niedotlenienia w promowaniu ekspresji VEGF-D nie została jednoznacznie ustalona. Ostatnie badania wykazały korelację między ekspresją VEGF-D i HIF-1 α w inwazyjnym raku sutka oraz po resekcji raka płaskonabłonkowego przełyku. Wyniki te ujawniły, że ekspresja czynników limfangiogeny jest ściśle związana z niedotlenieniem, które aktywuje ich ekspresję zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i translacyjnym. Obecnie wiadomo, że przynajmniej w guzach litych hipoksja jest głównym składnikiem mikrośrodowiska nowotworu i indukuje krytyczne zmiany w metabolizmie komórek nowotworowych, angiogenezie i limfangiogenezie [54]. Strukturalnie VEGF należą do rodziny czynników wzrostu tzw. węzła cystyny, gdyż posiadają wspólną grupę cystynową zaangażowaną w intra- i intercząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe. Wszystkie opisane wyżej czynniki, posiadają odpowiadające im receptory, dzięki którym dochodzi do ich aktywacji [30, 55].

Receptory VEGF

Istnieją trzy powszechnie znane rozpuszczalne receptory dla czynników VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) występujące na powierzchni komórek. Każdy z nich ma możliwość przyłączenia wybranych czynników należących do rodziny VEGF na podstawie różnego powinowactwa i selektywności [32, 56]. Wszystkie receptory posiadają siedem domen immunoglobulinopodobnych w regionie zewnątrzkomórkowym i domenę kinazy tyrozynowej w regionie wewnątrzkomórkowym [33]. VEGFR-1 i VEGFR-2 wykazują ekspresję w komórkach śródbłonna naczyniowego i hematopoetycznych komórkach macierzystych. Również niektóre komórki nowotworowe wykazują ekspresję VEGFR-1 i VEGFR-2. Dodatkowo, wykazano również ekspresję VEGFR-1 na monocytach i makrofagach. Ekspresja VEGFR-3 natomiast, jest w znacznym stopniu ograniczona do limfatycznych komórek śródbłonna [33, 57]. VEGF-A aktywuje VEGFR-1 i VEGFR-2, podczas gdy VEGF-B i PlGF wiążą się tylko z VEGFR-1. Dodatkowo, VEGF-C i VEGF-D wiążą się z VEGFR-2 i VEGFR-3. Ponadto, heparyna i neuropilina-1 są zdolne do wiązania VEGF165 i są zaangażowane w indukowaną przez VEGF-A aktywację VEGFR [32, 34, 58]. Możliwość wiązania poszczególnych receptorów z czynnikami z rodziny VEGF oraz pełnioną rolę w organizmie człowieka została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Rola i możliwość wiązania poszczególnych receptorów z czynnikami z rodziny VEGF [32, 85].

Receptor	Czynniki wiążące się z receptorem	Rola receptora
VEGFR-1	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Inhibicja angiogenezy embrionalnej Stymulacja patologicznej angiogenezy
VEGFR-2	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D	Stymulacja angiogenezy
VEGFR-3	VEGF-C, VEGF-D	Stymulacja limfangiogenezy

VEGFR-1 jest znany również jako Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*) [59]. Kinaza tyrozynowa słabo aktywuje się w odpowiedzi na VEGF-A, mimo iż VEGFR-1 wiąże VEGF-A z około 10-krotnie wyższym powinowactwem niż VEGFR-2. Doniesiono, że VEGFR-1 pośredniczy w proliferacji komórek śródbłonna, migracji monocytów i makrofagów oraz rekrutacji komórek śródbłonna ze szpiku kostnego i prekursorowych komórek krwiotwórczych [33]. Badanie prowadzone na myszach z brakującym genem VEGFR-1 wykazało, że VEGFR-1 negatywnie reguluje fizjologiczną waskulogenezę podczas embriogenezy. Nadmierny wzrost naczyń krwionośnych powoduje ich śmierć. Myszy wykazujące ekspresję VEGFR-1 pozbawioną domeny kinazy tyrozynowej mają prawidłowe unaczynienie, co wskazuje, że VEGFR-1 jest słabo zaangażowany w pośredniczenie w fizjologicznej angiogenicznej odpowiedzi na VEGF [60, 61]. W przeciwieństwie do tego, sygnalizacja VEGFR-1 była powiązana ze wzrostem guza i przerzutami. Stymulacja VEGFR-1 pośrednio indukuje angiogenezę nowotworu poprzez aktywację monocytów i makrofagów. Komórki te migrują do guza i zmian zapalnych w celu wytworzenia VEGF-A, VEGF-C i cytokin, prowadząc do unaczynienia nowotworu poprzez VEGFR-2 i VEGFR-3 [62].

VEGFR-2 inaczej określane jako KDR (*kinase insert domain receptor*) u ludzi lub Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) u myszy, posiada silniejszą aktywność kinazy tyrozynowej niż VEGFR-1 pomimo niższego powinowactwa do VEGF-A. Coraz więcej dowodów wskazuje, że VEGFR-2 jest w przeważającej mierze odpowiedzialny za odpowiedzi komórek śródbłonna naczyń na VEGF zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Stymulacja VEGFR-2 promuje wzrost, migrację i tworzenie komórek śródbłonna i zwiększa przepuszczalność naczyń. Niepowodzenie w tworzeniu naczyń krwionośnych powoduje śmierć na etapie embrionu u myszy z niedoborem flk-1, co wskazuje, że VEGFR-2 odgrywa istotną rolę w tworzeniu układu krążenia podczas tego etapu rozwoju. Przeciwciała anti-VEGFR-2 hamuje pierwotny i przerzutowy wzrost guza w modelach myszy, wskazując na kluczową rolę VEGFR-2 w angiogenezie nowotworów [63].

VEGFR-3 (Flt-4 – *fms-like tyrosine kinase 4*) ulega ekspresji głównie w limfatycznych komórkach śródbłonna i reguluje limfangiogenezę w odpowiedzi na VEGF-C i VEGF-D [64]. Aktywacja VEGFR-3 przez jego ligandy, a także późniejsza aktywacja wewnętrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej, stymuluje proliferację limfatycznych komórek śródbłonna. Limfangiogenezę wykorzystującą oś VEGFR-3/VEGF-C/VEGF-D wykazano w licznych badaniach *in vivo* i *in vitro* [34, 65].

Stymulacja VEGFR za pomocą VEGF lub PIGF powoduje dimeryzację receptora, co prowadzi do aktywacji wewnętrznej kinazy tyrozynowej. Sygnały generowane z różnych VEGFR są różne, mimo wysokiej homologii w domenie kinazy. Domeny VEGFR-1 i VEGFR-2 są rozdzielane poprzez wstawienie regionu hydrofobowego, co działa jako ważne miejsce rozpoznawania substratów kinazowych [66].

Kompleksowa sygnalizacja VEGFR wykorzystuje wiele czynników do określenia odpowiedzi biologicznych na VEGF. VEGFR-1 jest słabo autofosforylowany przez czynnik VEGF-A w komórkach śródbłonna. Zbadano, że fosfolipaza C- γ , 3-kinaza fosfatydyloinozytolu

(PI3K), fosfataza Src 2 (Shp2) i białko 2 związane z receptorem czynnika wzrostu (Grb2 – Growth factor receptor-bound protein 2) mogą być potencjalnie oddziałującymi proteinami z VEGFR-1. Natomiast sygnalizacja VEGFR-2 jest stosunkowo dobrze poznana. VEGFR-2 jest bardziej skutecznie autofosforylowany niż VEGFR-1, a reszty Tyr1175 i Tyr1214 są identyfikowane jako główne miejsce autofosforylowania w VEGFR-2 [67]. Fosforylacja w Tyr1175 ma kluczowe znaczenie dla zainicjowania aktywacji fosfolipazy C- γ . Ponadto Tyr1175 jest miejscem wiązania dla innych białek adaptorowych, takich jak Shb (SH2 domain-containing adapter protein B), który jest odpowiedzialny za aktywację PI3K i późniejszą migrację komórek. Fosforylacja Tyr1214 bierze udział w aktywacji Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) i aktywowanej stresem kinazy białkowej p38, która może regulować ruchliwość komórek śródbłonna [68].

Rola i znaczenie cytokin z rodziny VEGF i ich receptorów w raku piersi

Rak piersi jest jednym z nowotworów złośliwych, które wykazują znaczne skłonności do tworzenia wczesnych przerzutów. Jego ogniska spotyka się najczęściej w tkankach: kostnej, płuc, wątroby i mózgu. Komórki nowotworowe w guzie pierwotnym charakteryzują się wysoką heterogennością, podyktowaną występowaniem mutacji i niestabilnością genetyczną komórek [69, 70]. W przebiegu rozwoju zmian nowotworowych wyróżnia się dwa etapy – wzrost guza pierwotnego i tworzenie przerzutów odległych [69, 71]. W drugim z tych procesów, bardzo ważną rolę spełniają procesy angio- i limfangiogenezy. Umożliwiają one nie tylko tworzenie przerzutów, ale również warunkują lokalny rozwój nowotworu. Zahamowanie tych procesów prowadzi do wzrostu guza oraz uniemożliwia migrację komórek zmienionych nowotworowo do odległych tkanek poprzez systemy naczyń [71].

W wyniku licznych doniesień wykazano, iż w następstwie rozwoju raka piersi dochodzi do wzrostu aktywności wielu czynników przyczyniających się do nasilenia procesów zarówno angio-, jak i limfangiogenezy [72, 73, 74].

Głównymi czynnikami przyczyniającym się do powstawania nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych są białka z rodziny VEGF. Ich głównym przedstawicielem jest VEGF-A, gdyż wykazuje się najwyższą aktywnością biologiczną. Na podstawie badań własnych [74, 75] oraz innych badaczy [76, 77, 78], można stwierdzić, iż stężenia VEGF-A wykazują wysokie wartości w przebiegu raka piersi w porównaniu nie tylko z osobami zdrowymi, ale również w porównaniu do kobiet ze zmianami łagodnymi piersi.

W wyniku licznych doniesień wykazano również, iż w następstwie rozwoju raka piersi dochodzi do wzrostu aktywności lub ekspresji genów pozostałych czynników z rodziny VEGF (VEGF-C, PIGF) [73, 79, 80, 81] oraz ich receptorów (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) [77, 78, 82] lub udowodniono ich znaczący wpływ na przerzutowanie (VEGF-B, VEGF-D) [72, 76, 83].

Prace przeprowadzone przez Choi i wsp. [84] udowodniły, że VEGF-C oraz VEGF-D wykazują selektywną rolę w procesie limfangiogenezy w tkance guza, a VEGF-A ma znaczący wpływ na zwiększenie gęstości naczyń krwionośnych w okolicy zmian nowotworowych. Częściowo, badania te potwierdziły prace Zhao i wsp. [80] oraz

Yao i wsp. [72], w których udowodniono rolę VEGF-C w raku piersi. Co więcej, badania Tylor'a i wsp. [81] dotyczące PlGF wykazały, że czynnik ten również ma znaczący wpływ na przerzutowanie. W przypadku badań przeprowadzonych nad VEGF-B, grupa badawcza Gunningham'a [83] udowodniła, że w przypadku tej cytokiny, mimo braku zwiększonej ekspresji, ma ona znaczący wpływ na powstawanie przerzutów do węzłów chłonnych.

W przypadku receptorów dla cytokin z rodziny VEGF, prace przeprowadzone przez Thielemann'a i wsp. [78] oraz Mylona i wsp. [77] nad VEGFR-1 i VEGFR-2 udowodniły, że podwyższone stężenia tych receptorów mają znaczący wpływ na zwiększenie ilości naczyń krwionośnych w obrębie guza. Natomiast badania Varney i wsp. [79] wykazały, że szlak sygnalizacji autokryny VEGF-C/VEGFR3 reguluje przeżycie i proliferację komórek raka piersi, a neutralizacja sygnalizacji VEGFR3 może prowadzić do opracowania nowego podejścia terapeutycznego do tego nowotworu.

Podsumowanie

Wczesna diagnoza i określenie stanu zaawansowania nowotworu pozwala na zwiększenie przeżywalności chorych na nowotwory piersi, poprzez wskazanie skutecznych metod leczenia. Ważne jest ciągle poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i diagnostycznych, które umożliwią wczesne wykrycie raka piersi i chirurgiczne usunięcie guza nowotworowego, a jednocześnie pozwolą, jeśli to konieczne, na wykorzystanie dostępnych możliwości leczenia w postaci chemioterapii, radioterapii lub hormonoterapii. Procesami, które w znaczącym stopniu przyczyniają się do rozrostu zmian nowotworowych i ich przerzutowania są angiogeneza i limfangiogeneza, a substancjami mającymi na te procesy największy wpływ są czynniki z rodziny VEGF oraz ich receptory. W związku z tym, badania potwierdzające ich skuteczność jako markerów nowotworowych, są potrzebne nie tylko przy detekcji nowotworu, ale również ustalaniu i monitorowaniu późniejszego leczenia. Wprowadzenie wczesnej diagnozy i skutecznej terapii staje się misją współczesnej ochrony zdrowia, zwłaszcza w przypadku tak częstego schorzenia, jakim jest rak piersi u kobiet.

Źródło finansowania

Projekty badawcze w ramach działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o numerach N/ST/MN/16/004/2207 i N/ST/MN/17/002/2207.

Piśmiennictwo

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): 87-108.
- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008; 9(8): 730-56.
- Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, et al. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol.* 2005; 34(2): 405-412.
- Theriault RL, Carlson RW, Allred C, et al. Breast cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013; 11(7): 753-60; quiz 61.
- McCready T, Littlewood D, Jenkinson J. Breast self-examination and breast awareness: a literature review. *J Clin Nurs.* 2005; 14(5): 570-578.
- Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(17): 1784-1792.
- Pace LE, Keating NL. A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions. *JAMA.* 2014; 311(13): 1327-1335.
- Warner E, Messersmith H, Causer P, et al. Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer. *Ann Intern Med.* 2008; 148(9): 671-679.
- Granader EJ, Dwamena B, Carlos RC. MRI and mammography surveillance of women at increased risk for breast cancer: recommendations using an evidence-based approach. *Acad Radiol.* 2008; 15(12): 1590-1595.
- Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkateshan P. Breast cancer statistics and markers. *J Cancer Res Ther.* 2014; 10(3): 506-511.
- Shao Y, Sun X, He Y, et al. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0133830.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(33): 5287-5312.
- Guadagni F, Ferroni P, Carlini S, et al. A re-evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as a serum marker for breast cancer: a prospective longitudinal study. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(8): 2357-2362.
- Coveney EC, Geraghty JG, Sherry F, et al. The clinical value of CEA and CA 15-3 in breast cancer management. *Int J Biol Markers.* 1995; 10(1): 35-41.
- Busetto M, Vianello L, Franceschi R, Bolzan M. CA 15-3 value and neoplastic disease predictivity in the follow-up for breast cancer. *Tumour Biol.* 1995; 16(4): 243-253.
- Darlix A, Lamy PJ, Lopez-Crapez E, et al. Serum HER2 extra-cellular domain, S100B and CA 15-3 levels are independent prognostic factors in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2016; 416:428.
- Gion M, Mione R, Leon AE, Dittadi R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin Chem.* 1999; 45(5): 630-637.
- Klee GG, Schreiber WE. MUC1 gene-derived glycoprotein assays for monitoring breast cancer (CA 15-3, CA 27.29, BR): are they measuring the same antigen? *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128(10): 1131-1135.
- Hou MF, Chen YL, Tseng TF, et al. Evaluation of serum CA27.29, CA15-3 and CEA in patients with breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci.* 1999; 15(9): 520-528.
- Mori I, Yang Q, Kakudo K. Predictive and prognostic markers for invasive breast cancer. *Pathol Int.* 2002; 52(3): 186-194.
- Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6(4): 375-392.
- Jensen EV. Hormone dependency of breast cancer. *Cancer.* 1981; 47(10): 2319-2326.
- Henson DE, Fielding LP, Grignon DJ, et al. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Summary. Members of the Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med.* 1995; 119(12): 1109-1112.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003; 8(4): 307-325.
- Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol.* 2014; 21(2): 100-107.
- Cao W, Zhang B, Liu Y, et al. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival. *Am J Clin Pathol.* 2007; 128(3): 430-436.

27. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008; 5(9): 531-542.
28. Leary AF, Hanna WM, van de Vijver MJ, et al. Value and limitations of measuring HER-2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009; 27(10): 1694-1705.
29. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011; 437(2): 169-183.
30. Bry M, Kivelä R, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiol Rev*. 2014; 94(3): 779-794.
31. Mahecha AM, Wang H. The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and -9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer. *Onco Targets Ther*. 2017; 10: 4617-4624.
32. Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C, Carmen ReA. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(10): 1763-1778.
33. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(12): 1785-1788.
34. Weryńska B, Dziegiel P, Jankowska R. Role of lymphangiogenesis in lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009; 47(3): 333-342.
35. Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor inhibitors in the treatment of renal cell carcinomas. *Pharmacol Res*. 2017; 120: 116-132.
36. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(1): 1-19.
37. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; 246(4935): 1306-1309.
38. Żyła MM, Kostrzewa M, Litwińska E, et al. The role of angiogenic factors in endometrial cancer. *Prz Menopauzalny*. 2014; 13(2): 122-126.
39. Costache MI, Ioana M, Iordache S, et al. VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature. *Rom J Intern Med*. 2015; 53(3): 199-208.
40. Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*. 2002; 8(8): 831-840.
41. Scotney PD, MacKenzie A, Maccarone P, et al. Human vascular endothelial growth factor B: characterization of recombinant isoforms and generation of neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29(11): 1024-1029.
42. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med*. 2012; 44(1): 1-9.
43. Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2002; 13(1): 9-18.
44. Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, et al. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Mol Cell Oncol*. 2015; 2(4): e1024821.
45. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004; 5(1): 74-80.
46. Barańska P, Jerczyńska H, Pawłowska Z. Vascular endothelial growth factor—structure and functions]. *Postepy Biochem*. 2005; 51(1): 12-21.
47. McColl BK, Paavonen K, Karnezis T, et al. Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2. *FASEB J*. 2007; 21(4): 1088-1098.
48. Ratajska A, Jankowska-Steifer E, Czarnowska E, et al. [Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012; 66: 901-912.
49. Kopfstein L, Veikkola T, Djonov VG, et al. Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. *Am J Pathol*. 2007; 170(4): 1348-1361.
50. Della-Morte D, Riondino S, Ferroni P, et al. Impact of VEGF gene polymorphisms in elderly cancer patients: clinical outcome and toxicity. *Pharmacogenomics*. 2015; 16(1): 61-78.
51. Stacker SA, Achen MG. From anti-angiogenesis to anti-lymphangiogenesis: emerging trends in cancer therapy. *Lymphat Res Biol*. 2008; 6(3-4): 165-172.
52. Karnezis T, Shayan R, Fox S, et al. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget*. 2012; 3(8): 893-906.
53. Karnezis T, Shayan R, Caesar C, et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell*. 2012; 21(2): 181-195.
54. Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, et al. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Mol Cell Oncol*. 2014; 1(1): e29907.
55. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005; 6(2): 209.
56. Caballero B, Sherman SJ, Falk T. Insights into the Mechanisms Involved in Protective Effects of VEGF-B in Dopaminergic Neurons. *Parkinsons Dis*. 2017; 2017: 4263795.
57. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(3): 227-241.
58. Zafar MI, Zheng J, Kong W, et al. The role of vascular endothelial growth factor-B in metabolic homeostasis: current evidence. *Biosci Rep*. 2017; 37(4).
59. Rashidi B, Malekzadeh M, Goodarzi M, et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects. *Biomed Pharmacother*. 2017; 89: 949-956.
60. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376(6535): 66-70.
61. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(16): 9349-9354.
62. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, et al. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(4): 658-664.
63. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005; 23(5): 1011-1027.
64. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002; 1(3): 219-227.
65. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread—new players begin to emerge. *Int J Cancer*. 2006; 119(8): 1755-1760.
66. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*. 1999; 253(1): 117-130.
67. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5): 359-371.
68. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*. 2004; 279(21): 22267-22275.
69. Wideł MS, Wideł M. [Mechanisms of metastasis and molecular markers of malignant tumor progression. I. Colorectal cancer]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006; 60: 453-470.

70. Ławicki S, Szmikowski M, Wojtukiewicz M. The pretreatment plasma level and diagnostic utility of M-CSF in benign breast tumor and breast cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2006; 371(1-2): 112-116.
71. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(3): 161-174.
72. Yao G, He P, Chen L, et al. MT1-MMP in breast cancer: induction of VEGF-C correlates with metastasis and poor prognosis. *Cancer Cell Int*. 2013; 13(1): 98.
73. Eroğlu A, Ersöz C, Karasoy D, Sak S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D, VEGFR-3 and D2-40 expressions in primary breast cancer: Association with lymph node metastasis. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(2): 245-249.
74. Zajkowska M, Głażewska EK, Będowska GE, et al. Diagnostic Power of Vascular Endothelial Growth Factor and Macrophage Colony-Stimulating Factor in Breast Cancer Patients Based on ROC Analysis. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 5962946.
75. Ławicki S, Zajkowska M, Głażewska EK, et al. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 911-919.
76. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90(9): 977-981.
77. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007; 104(3): 557-563.
78. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, et al. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agric Environ Med*. 2013; 20(2): 293-297.
79. Varney ML, Singh RK. VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner. *Am J Cancer Res*. 2015; 5(2): 616-628.
80. Zhao YC, Ni XJ, Wang MH, et al. Tumor-derived VEGF-C, but not VEGF-D, promotes sentinel lymph node lymphangiogenesis prior to metastasis in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2012; 29(4): 2594-2600.
81. Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PlGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(2): 524-531.
82. Raica M, Cimpean AM, Ceausu R, Ribatti D. Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res*. 2011; 31(5): 1757-1764.
83. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, et al. VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol*. 2001; 193(3): 325-332.
84. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005; 18(1): 143-152.
85. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21(2): 154-65.

Autor do korespondencji:

mgr Monika Zajkowska
 Zakład Diagnostyki Biochemicznej
 Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
 15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 15A
 tel. +48 85 7468587
 e-mail: monika@zajkowska.com

Otrzymano: 07.02.2018

Akceptacja do druku: 22.06.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

