

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular-endothelial growth factor* – VEGF) jest uważany za główny czynnik regulujący proces angiogenezy fizjologicznej i patologicznej. Zwiększoną ekspresję VEGF, zarówno mRNA w tkance nowotworowej, jak i samego białka (w cytozolu, osoczu, surowicy, moczu), stwierdzono w wielu nowotworach, również u chorych na raka piersi.

Celem pracy była ocena zależności między stężeniem VEGF w osoczu pacjentek chorych na niezaawansowanego raka piersi a wybranymi parametrami histoklinicznymi.

U 104 kobiet chorych na raka piersi w I i II stopniu zaawansowania klinicznego metodą immunoenzymatyczną ELISA oznaczono w osoczu stężenie VEGF. Średnia wieku chorych wynosiła 57 lat (29–89 lat). Określono następujące parametry histokliniczne guza – wielkość guza pierwotnego, typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej i obecność lub brak przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. Krew do badania została pobrana jednorazowo, przed rozpoczęciem leczenia.

Mediana stężenia VEGF w grupie chorych na raka piersi wynosiła 95 pg/ml (zakres wartości: 3,5–490,2 pg/ml, SD 101,3). Nie wykazano zależności między stężeniem VEGF a wiekiem chorych, jak również typem histologicznym nowotworu. Wykazano natomiast istotne statystycznie różnice w stężeniu VEGF w zależności od stopnia zaawansowania choroby, wielkości guza, obecności przerzutów w pachowych węzłach chłonnych oraz stopnia złośliwości histologicznej.

Wykazanie zależności stężenia VEGF od stopnia zaawansowania raka piersi i jego złośliwości histologicznej może potwierdzać rolę VEGF we wzroście guza, może także stanowić wskazanie do kontynuowania badań nad rolą VEGF jako czynnika prognostycznego choroby. Pośrednio wskazuje również na celowość stosowania terapii anty-VEGF w raku piersi.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, VEGF, angiogeneza, guz.

## Zależność stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) od wybranych parametrów histoklinicznych w niezaawansowanym raku piersi

*Vascular endothelial growth factor (VEGF) and selected clinicopathological parameters in breast carcinoma*

Maria Litwiniuk<sup>1</sup>, Anna Łojko<sup>2</sup>, Anna Thielemann<sup>3</sup>, Zygmunt Kopczyński<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

### Wstęp

Rozwój nowotworu, jego wzrost i tworzenie przerzutów zależą ściśle od stopnia jego unaczynienia [1–3]. Głównym czynnikiem regulującym proces angiogenezy fizjologicznej i patologicznej – w tym również nowotworowej – jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular-endothelial growth factor* – VEGF). Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu łącząc się ze specyficznymi receptorami obecnymi na powierzchni komórek śródbłonka, powoduje ich przejście ze stanu spoczynku do stanu, w którym wykazują one fenotyp angiogeny, prowadząc do proliferacji, migracji i formowania sznurów naczyniowych [1, 2, 4, 5]. Zwiększoną ekspresję VEGF, zarówno mRNA w tkance nowotworowej, jak i samego białka (w cytozolu, osoczu, surowicy, moczu), stwierdzono w wielu nowotworach (m.in. jelita grubego, żołądka, piersi, w niedrobnokomórkowym raku płuca, w rakach trzustki, prostaty, nerki, pęcherza moczowego, szyjki macicy, w ostrej białaczce szpikowej i w zespołach mielodysplastycznych) [6–12]. Wzmocniona ekspresja VEGF wiąże się ze zwiększoną gęstością naczyń krwionośnych w obrębie guza i może korelować z takimi cechami guza, jak obecność przerzutów odległych, długość przeżycia całkowitego czy wskaźnik osiągniętych remisji całkowitych [6, 8, 10, 11, 13–17].

Rola VEGF w promocji wzrostu guza nie ogranicza się tylko do indukowania neoangiogenezy. Wykazano obecność receptorów dla VEGF bezpośrednio na komórkach nowotworowych, w tym również na komórkach raka piersi [17]. Poprzez bezpośrednią aktywację receptora na powierzchni komórki nowotworowej VEGF może hamować apoptozę i promować migrację komórek nowotworu, niezależnie od procesów neoangiogenezy [18].

### Cel pracy

Celem pracy była ocena zależności między stężeniem VEGF w osoczu pacjentek chorych na niezaawansowanego raka piersi a wybranymi parametrami histoklinicznymi guza, takimi jak wielkość guza pierwotnego, typ histopatologiczny, stopień złośliwości histologicznej i obecność lub brak przerzutów do pachowych węzłów chłonnych.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key factor in normal and pathological angiogenesis. Increased levels of VEGF in cytosol, urine, serum, plasma or malignant tissue (mRNA) have been recorded in many tumour types, including breast cancer.

The aim of this work was to determine the level of VEGF in the plasma of women with primary breast cancer and to find whether it was correlated with some clinicopathological parameters. The study group consisted of 104 women with primary breast cancer (stage I or II). The age of the women ranged from 29 to 89 years (average age – 57 years). For the assessment of VEGF concentration, venous blood was taken and immunoenzymatic (ELISA) method was used.

The analysed clinicopathological variables included the size of the primary tumour, its histological type, the grade of histological malignancy and the status of axillary lymph nodes.

The median concentration of VEGF in the study group was 95 pg/ml (3.5–490.2 pg/ml, SD 101.3). No correlation was found between the level of VEGF and the histological type of cancer or the patient's age.

The level of VEGF correlated significantly with the size of the primary tumour, the axillary node involvement and the grade of histological malignancy.

The correlation found between the level of VEGF and some clinicopathological parameters indicates the important role that VEGF plays in tumour growth, and suggests a need for anti-VEGF therapy in breast cancer treatment.

**Key words:** breast cancer, VEGF, angiogenesis, tumour.

## Materiał i metody

Badaniem objęto grupę 104 kobiet chorych na niezaawansowanego, pierwotnie operacyjnego raka piersi, w wieku 29–89 lat (średnia wieku 57 lat), leczonych w Klinice Onkologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Autorzy dziękują pani prof. Sylwii Grodeckiej-Gazdeczej za umożliwienie przeprowadzenia badania na Oddziale Chirurgicznym Kliniki Onkologii.

U 49 pacjentek stwierdzono I stopień, a u 55 chorych II stopień zaawansowania klinicznego.

U wszystkich kobiet raka piersi rozpoznano *de novo*, żadna z pacjentek nie była wcześniej leczona przeciwnowotworowo. W badaniach określono następujące parametry histokliniczne guza:

- wielkość guza pierwotnego (T1 ≤ 2 cm, T2 > 2 cm i ≤ 5 cm),
- typ histopatologiczny,
- stopień złośliwości histologicznej (*grade*),
- obecność lub brak przerzutów do pachowych węzłów chłonnych potwierdzoną w badaniu histopatologicznym (pN0 – nie stwierdzono przerzutów nowotworowych w pachowych węzłach chłonnych, pN1 – obecne przerzuty w pachowych węzłach chłonnych).

Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tab. 1.

Krew do badania pobierano od pacjentek z żyły promieniowej przed rozpoczęciem leczenia (przed zabiegiem operacyjnym) do próbki napętnionej uprzednio 3,8-procentowym roztworem cytrynianu sodu w stosunku objętościowym 9:1, po czym krew wirowano z szybkością 1000 × g przez 10 min. Osocze zbierano do próbek w objętości 0,5 ml i zamrażano w temperaturze –20°C. Tak przygotowane próbki przechowywano w tej temperaturze do czasu wykonania badania, jednak nie dłużej niż 6 mies.

Stężenie VEGF oznaczono w osoczu chorych metodą immunoenzymatyczną ELISA, za pomocą komercyjnego testu Human VEGF Immunoassay (R&D Systems).

**Tabela 1.** Charakterystyka histokliniczna badanej grupy  
**Table 1.** Clinicopathological details of the studied group

Badany parametr	n=104 (100%)
wiek (lata): średnia±SD	57,0±12,6
przedział wieku (lata)	29–89
stopień klinicznego zaawansowania:	
I	49 (47%)
II	55 (53%)
typ histopatologiczny:	
rak przewodowy	87 (83%)
rak zrazikowy	17 (16%)
stopień złośliwości histologicznej:	
G1	15 (14%)
G2	49 (47%)
G3	39 (37%)
nieokreślony	1 (<1%)
wielkość guza:	
T1	56 (54%)
T2	48 (46%)
obecność przerzutów w pachowych węzłach chłonnych	
pN0	59 (57%)
pN1	45 (43%)

Wyniki badań przedstawiono w postaci mediany stężenia VEGF. Do obliczeń statystycznych wykorzystano testy U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa. Za istotny statystycznie przyjęto poziom  $p < 0,05$ . Obliczenia wykonano korzystając z programu Statistica for Windows (StatSoft 2001).

## Wyniki

Mediana stężenia VEGF w badanej grupie chorych wyniosła 95 pg/ml (3,5–490,2 pg/ml; SD 101,3). Nie wykazano zależności między stężeniem badanego białka a wiekiem chorych. Nie występowała także statystyczna zależność między stężeniem VEGF a typem histologicznym nowotworu.

Wykazano natomiast istotne statystycznie różnice w stężeniu VEGF w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej. Mediana stężenia VEGF u chorych w I stopniu zaawansowania wyniosła 71,8 pg/ml, a u chorych w II stopniu – 118,5 pg/ml ( $p = 0,01$ , test U Manna-Whitneya).

Podobną zależność wykazano, porównując stężenia VEGF i wielkość guza pierwotnego (T1 vs T2). Stwierdzono istotną statystycznie różnicę między stężeniami VEGF w 2 grupach: u pacjentek z guzem o wielkości do 2 cm mediana stężenia VEGF wyniosła 71,45 pg/ml, a z guzem o wielkości 2–5 cm – 125,25 pg/ml ( $p = 0,004$ , test Manna-Whitneya).

Istotne statystycznie różnice wykazano także, analizując stężenia VEGF w grupie bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych w porównaniu z poziomem VEGF u pacjentek z obecnością przerzutów nowotworowych do pachowych węzłów chłonnych. W grupie pN0 mediana stężenia VEGF wyniosła 66,3 pg/ml, a w grupie pN1 161,5 pg/ml ( $p = 0,00$ , test U Manna-Whitneya).

Kolejnym istotnym parametrem charakteryzującym guz i wykazującym istotną zależność od stężenia VEGF był stopień złośliwości histologicznej (*grade*). U pacjentek z guza-

mi w stopniu G1 mediana stężenia VEGF wyniosła 18,93 pg/ml, w grupie z G2 – 95,0 pg/ml, natomiast w grupie ze stopniem G3 – 151,2 pg/ml ( $p = 0,02$ , test Kruskala-Wallisa).

Otrzymane wyniki badań przedstawiono w tab. 2.

## Omówienie wyników

Przedstawione wyniki badań potwierdzają zależność stężenia VEGF oznaczanego we krwi obwodowej od stopnia zaawansowania raka piersi, co może pośrednio potwierdzać udział VEGF w stymulowaniu wzrostu guza. Stężenie VEGF w osoczu było wyższe u chorych z większym guzem pierwotnym, z obecnymi przerzutami do pachowych węzłów chłonnych oraz u chorych, u których w badaniu histopatologicznym stwierdzono wyższy stopień złośliwości histologicznej nowotworu.

Dotychczasowe doniesienia, dotyczące związku stężenia VEGF w osoczu czy też jego ekspresji w tkankach kobiet chorych na raka piersi z cechami klinicznymi i histopatologicznymi tego nowotworu, nie są do końca jednoznaczne. Wykazano, że stężenie VEGF w surowicy jest statystycznie istotnie wyższe u chorych z obecnością przerzutów do narządów mięszzowych w porównaniu z chorymi z przerzutami wyłącznie do kości [19]. Stwierdzono również różnice w stężeniu VEGF w surowicy w zależności od typu histopatologicznego raka piersi i obecności receptorów dla estrogenów [20]. W kilku pracach wykazano ujemną korelację stężenia VEGF oznaczanego w cytozolu w tkance raka piersi z obecnością receptorów dla estrogenów i progesteronu [21–24]. Jednakże znane są także doniesienia, które nie potwierdzają związku stężenia VEGF oznaczanego w cytozolu i w osoczu z takimi parametrami, jak wiek pacjentki i stan menopauzalny, wielkość guza, typ histopatologiczny raka i stopień złośliwości histologicznej, obecność przerzutów do pachowych węzłów chłonnych oraz obecność recepto-

**Tabela 2.** Stężenie VEGF (mediana) w zależności od wybranych parametrów

**Table 2.** Levels of VEGF (median) in relation to selected parameters

Badany parametr	n	Mediana stężenia VEGF (pg/ml)	p
stężenie VEGF w całej badanej grupie	104	95,0	
stopień zaawansowania klinicznego:			
I	49	71,8	0,01
II	55	118,5	
wielkość guza:			
T1	56	71,4	0,004
T2	48	125,2	
obecność przerzutów w pachowych węzłach chłonnych:			
pN0	59	66,3	0,00
pN1	45	161,5	
stopień złośliwości histologicznej:			
G1	15	18,9	0,02
G2	49	95,0	
G3	39	151,2	

n – liczba pacjentów

p – poziom istotności

rów dla estrogenów [25–27]. Mimo braku zależności stężenia VEGF od obecnością uznanych czynników rokowniczych, badacze ci udowodnili wartość VEGF jako niezależnego czynnika rokowniczego wystąpienia nawrotu choroby i całkowitego przeżycia [22, 23, 25, 27].

Istotna zależność między stężeniem VEGF a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej zdaje się potwierdzać udział tej cytokiny w patogenezie guza oraz wskazuje na potrzebę dalszych badań nad rolą VEGF jako markera rokowniczego, jak również, być może, czynnika predykcyjnego. Wykazano bowiem, że pomiar stężenia VEGF może pomagać w ocenie przewidywanej skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Manders i wsp. opublikowali pracę, w której wykazali, że duże stężenie VEGF w cytozolu komórek guza przed rozpoczęciem leczenia wiąże się z gorszymi wynikami leczenia hormonalnego, niezależnie od stanu receptorów [24]. Dotychczasowe doniesienia na temat skuteczności chemioterapii w zależności od stężenia VEGF są jak dotąd sprzeczne [23, 24]. Związek między angiogenezą, VEGF a estrogenami i ich receptorami został potwierdzony w badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych, które wykazały, że ekspresja genu VEGF oraz receptora dla VEGF typu 2 (VEGFR-2) może podlegać regulacji przez estrogeny i receptory dla estrogenów  $\alpha$  i  $\beta$  [28, 29]. Na drodze tego mechanizmu odbywa się regulacja angiogenezy fizjologicznej w endometrium podczas cyklu owulacyjnego u kobiet. Przypuszcza się, że może na tej drodze estrogeny odgrywać ważną rolę w stymulacji angiogenezy nowotworowej i w patogenezie raka piersi [28, 29].

Wykazano również, że zwiększona ekspresja VEGF wiąże się często z nadekspresją HER2, co może sugerować, iż angiogeneza indukowana poprzez VEGF w tym typie nowotworu ma szczególne znaczenie [30].

Ze względu na kluczową rolę VEGF w procesach angiogenezy nowotworowej, jak również niezależny od angiogenezy wpływ na wzrost guza i migrację komórek nowotworowych, prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem leków antyangiogennych w terapii. Obecnie w leczeniu rozlanego raka piersi i raka jelita grubego z powodzeniem stosuje się przeciwciała monoklonalne przeciw VEGF (bewacizumab) [31, 32]. W leczeniu chorych z rakiem piersi przeciwciała to jest najczęściej stosowane w połączeniu z taksanami, a w przypadku raka jelita grubego z 5-fluorouracylem [31, 32]. Obecnie trwają także badania nad zastosowaniem bewacizumabu w terapii wczesnego raka piersi i to zarówno w leczeniu uzupełniającym, jak i neoadjuwantowym [30, 31].

Ponadto prowadzone są badania nad lekami wiążącymi się z receptorami dla VEGF, hamującymi produkcję VEGF przez wiązanie się z mRNA [31, 33].

## Podsumowanie

W wykonanym badaniu stwierdzono zależność stężenia VEGF w osoczu od stopnia zaawansowania raka piersi i stopnia jego złośliwości histologicznej, co może potwierdzać rolę VEGF we wzroście guza i może stanowić wskazanie do kontynuowania badań nad rolą VEGF jako czynnika prognostycznego choroby.

## Piśmiennictwo

- Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews* 2002; 2: 795-803.
- Bertolini F, Mancuso P, Gobbi A, Pruneri G. The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. *Exp Hematol* 2000; 28: 993-1000.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4.
- Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med* 2003; 81: 20-31.
- Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 186: 671-4.
- Brown LF, Berse B, Jackam RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 86-91.
- Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, Tognazzi K, Dvorak HF. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1041-56.
- de Vita F, Orditura M, Lieto E, et al. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 270-8.
- Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 1237-45.
- Shariat SF, Anwuri VA, Lamb DJ, Shah NV, Wheeler TM, Slawin KM. Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1655-63.
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Can Res* 1995; 55: 3964-68.
- Thielemann A, Kopczyński Z, Grodecka-Gazdecka S, Piekarska B. Ocena stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Diagn Lab* 2005; 41: 154-64.
- Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, et al. Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2002; 95: 1923-30.
- Chan LW, Moses MA, Goley E, et al. Urinary VEGF and MMP levels as predictive markers of 1-year progression-free survival in cancer patients treated with radiation therapy: a longitudinal study of protein kinetics throughout tumor progression and therapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 499-506.
- Lind SE, Caprini JA, Goldshteyn S, Dohnal JC, Vesely SK, Shevrin DH. Correlates of thrombin generation in patients with advanced prostate cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89: 185-9.
- Roselli M, Mineo TC, Basili S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) plasma levels in non-small cell lung cancer: relationship with coagulation and platelet activation markers. *Thromb Haemost* 2003; 89: 177-84.
- Seo Y, Baba H, Fakuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and poor prognosis in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-45.
- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Biol Neoplasia* 2005; 10: 283-90.
- Coskun U, Gunel N, Toruner FB, et al. Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasia* 2003; 50: 41-6.
- Heer K, Kumar H, Read JR, Fox JN, Monson JR, Kerin MJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3491-4.
- Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol* 2006; 14: 49-55.

22. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5407-14.
23. Gasparini G, Toi M, Miceli R, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999; 5: 101-11.
24. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Sweep CG. Vascular endothelial growth factor is associated with the efficacy of endocrine therapy in patients with advanced breast carcinoma. *Cancer* 2003, 98: 2125-32.
25. Gasparini G, Toi M, Gion M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 139-47.
26. Sancak B, Coskun U, Gunel N, Onuk E, Cihan A, Karamercan A, Yildirir Y, Ozkan S. No association between serum levels of insulin-like growth factor-1, vascular endothelial growth factor, prolactin and clinicopathological characteristics of breast carcinoma after surgery. *Inter Med J* 2004; 34: 310-5.
27. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98: 14-8.
28. Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; 60: 3183-90.
29. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 60: 10972-7.
30. Sledge GW. VEGF-targeting therapy for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 319-23.
31. Schneider BP, Sledge GW. Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 181-9.
32. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2004; 350: 2335-42.
33. Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Lavey RS, Hines OJ. Antiangiogenic activity of Genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 the down-regulation of VEGF gene expression. *Cancer* 2004; 100: 201-10.

**Adres do korespondencji**dr med. **Maria Litwiniuk**

Katedra Onkologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

ul. Łąkowa 1/2

61-878 Poznań

tel. +48 61 854 90 19

e-mail: litwiniuk@skrzynka.pl