

Roope Ohlsbom

# ANGIOGENEESIÄ INDUSOIVAT KEMIKAALIT

# TIIVISTELMÄ

Roope Ohlsbom: Angiogeneesiä indusoivat kemikaalit

Kandidaatintutkielma

Tampereen yliopisto

Bioteknologian tutkinto-ohjelma

4/2020

---

Angiogeneesi on uusien verisuonten muodostumista ennestään olemassa olevista verisuonista. Sillä on keskeinen rooli yksilönkehityksessä ja yksilön kasvussa sekä fysiologisissa prosesseissa, kuten haavan paranemisessa ja kudolvaurioiden korjaantumisessa. Häiriöt angiogeneesin säätelyssä voivat johtaa moniin vakaviin sairauksiin, kuten silmän märkärappeumaan ja syöpiin. Angiogeneesin säätelyn ja mekanismien tunteminen onkin tärkeää, jotta voidaan ymmärtää sairauksien syntyä ja toimintaa sekä kehittää niihin uusia hoitoja. Angiogeneesin säätelyyn osallistuu monia signaalintimolekyyliä, keskeisimpänä VEGF (vascular endothelial growth factor). Näiden signaalintimolekyylien ilmentymistä aktivoivat pääasiassa hypoksia, mekaaninen stressi ja inflammaatio, mutta myös monet ympäristössämme esiintyvät kemikaalit voivat indusoida niiden ilmentymistä. Tämän lisäksi kemikaalit voivat aktivoida angiogeneesiä suoraan edistämällä endoteelisolujen migraatiota, proliferaatiota ja erilaistumista. Angiogeneesiä indusoiisiin kemikaaleihin lukeutuu suuri joukko epäorgaanisia ioneja sekä monia muita elintarvikkeissa ja elinympäristössämme esiintyviä yhdisteitä.

Angiogeneesiä indusovien kemikaalien tunnistaminen on tärkeää, sillä niille altistumisella voi olla merkittävä vaikutus monien syöpien ilmentymiseen populaatiosalla. Niitä ei kuitenkaan usein tunnisteta yhdisteiden karsinogeenisyyttä tutkiessa, sillä angiogeneesin aktivoiminen tapahtuu yleensä vaikuttamatta solun perimään. Parempien *in vitro* -mallien kehittäminen voi olla avainasemassa angiogeenisten kemikaalien tehokkaampaan tunnistamiseen tulevaisuudessa.

Tietoa angiogeneesin indusovista kemikaaleista ja niiden mekanismeista voidaan myös käyttää hyödyksi lääketieteessä, sillä riittävä verisuonien kasvu on rajoittava tekijä muun muassa useissa regeneratiivisen lääketieteen sovelluksissa. Tämän lisäksi angiogeneesin aktivointi voi auttaa vakavien tautitilojen, kuten vakavan alaraajaiskemian ja diabeettisten jalkahaavojen hoidossa.

Avainsanat: Angiogeneesi, kemikaalit, VEGF, induktio, hypoksia, syöpä

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# ALKUSANAT

Tämä luonnontieteiden kandidaatintyö on tehty Tampereen yliopiston lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnassa. Kiitän FM Veera Hautasta mielenkiintoisen aiheen tarjoamisesta ja ohjaajana toimimisesta sekä neuvoista ja avusta työtä tehdessä.

Tampereella, 27.4.2020

Roope Ohlsbom

# SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO .....	4
2.	ANGIOGENEESI .....	5
2.1	Molekulaarinen säätely .....	5
2.1.1	Angiogeneeniset kasvutekijät .....	6
2.1.2	Muut angiogeneeniset säätelytekijät .....	7
2.1.3	Epäangiogeneeniset säätelytekijät .....	8
2.2	Angiogeneenin mekanismit .....	9
2.3	Angiogeneesi ja syöpä .....	11
3.	ANGIOGENEESIÄ INDUSOIVAT KEMIKAALIT .....	13
3.1	Metallit .....	14
3.2	Epämetallit ja puolimetallit .....	15
3.3	Muut yhdisteet .....	17
4.	KLIINISET SOVELLUKSET .....	18
4.1	Kasvatetun luukudoksen vaskularisaatio .....	19
4.2	Iskeemisen kudoksen vaskularisaatio .....	20
5.	YHTEENVETO .....	21
6.	LÄHTEET .....	22

# 1. JOHDANTO

Angiogeneesi on uusien verisuonten muodostumista ennestään olemassa olevista verisuonista (Tahergorabi & Khazaei 2012). Sillä on keskeinen rooli yksilönkehityksessä ja kasvussa, sekä fysiologisissa prosesseissa, kuten haavan paranemisessa ja kudonsvaurioiden korjaantumisessa (Tahergorabi & Khazaei 2012). Angiogeneesiä tapahtuu, kun olemassa olevat verisuonet eivät riitä kuljettamaan riittävästi happea ja ravinteita soluille (Chung & Ferrara 2011, Tahergorabi & Khazaei 2012).

Kun kehittyvä alkio kasvaa koossa ja passiivinen diffuusio ei enää riitä takaamaan riittävää hapen ja ravinteiden saantia kaikille soluille, tarvitaan verenkiertoelimistöä hoitamaan kaasujen, ravinteiden ja kuona-aineiden kuljetusta (Chung & Ferrara 2011). Ensimmäisenä tapahtuu vaskulogeneesi, jossa alkeellinen verisuonisto syntyy, kun angioblastit erilaistuvat endoteelisoluiksi ja muodostavat verisuonia (Tahergorabi & Khazaei 2012). Vaskulogeneesia seuraa välittömästi angiogeneesi, sillä verenkiertoelimistön kasvaa ja uudelleen muotoutuu jatkuvasti, jotta se pystyy vastaamaan kehittyvän elimistön hapen ja ravinteiden tarpeisiin (Carmeliet 2005). Lopulta muodostuu aikuiselle eliölle ominainen verisuonisto, jossa suonet ovat jakautuneet valtimoiksi, hiussuoniksi ja laskimoiksi (Chung & Ferrara 2011). Täysikasvuisessa yksilössä verisuonet ovat kasvun suhteen epäaktiivisessa tilassa, mutta pystyvät havaitsemaan angiogeneesiä edistäviä signaaleja ja niiden seurauksena jakautumaan nopeasti ja muodostaan uusia verisuonia tarpeen vaatiessa (Potente ym. 2011).

Kyky muodostaa uusia verisuonia on tärkeä muun muassa haavan paranemisessa, kudonsvaurioiden korjaantumisessa ja kuukautiskierron aikana (Chung & Ferrara 2011). Liiallinen angiogeneesi voi kuitenkin olla haitallista ja on osallisena vakavien sairauksien, kuten silmän märkärappeuman ja syövän synnyssä (Chung & Ferrara 2011). Angiogeneesin tutkiminen voikin auttaa ymmärtämään paremmin monien sairauksien etenemistä ja mahdollisesti auttaa kehittämään niihin hoitoja (Carmeliet 2005, Potente ym. 2011). Onkin arvioitu, että länsimaissa melkein 500 miljoonaa ihmistä voisi hyötyä angiogeneesiä indusoivasta tai inhiboivasta hoidosta (Saghiri ym. 2015a). Silmänpohjan märkärappeumaa ja syöpää vastaan on jo olemassa angiogeneesiä inhiboivia lääkkeitä, mutta etenkin syövän kohdalla kaivataan vielä parempaa ymmärrystä angiogeneesin toimintamekanismeista ja säätelystä, jotta saadaan kehitettyä paremmin toimivia hoitoja (Potente ym. 2011, Hu ym. 2015).

Lääkekehityksen lisäksi on myös tärkeää tunnistaa ympäristössämme esiintyviä angiogeneesiä indusoivia kemikaaleja, sillä niille altistuminen voi olla merkittävä tekijä monen syövän synnyssä (Hu ym. 2015, Saghiri ym. 2015a). Angiogeneesiä indusoiviin kemikaaleihin kuuluu laaja kirjo eri aineita ja yhdisteitä, ja ne indusoivat angiogeneesiä monin eri mekanismein (Hu ym. 2015, Saghiri ym. 2015a). Näiden kemikaalien ja niiden toimintamekanismien tunteminen voi olla hyödyksi myös erilaisten lääketieteellisten sovellusten kehittämisessä (Jia & Sowers 2014, Zeng ym. 2015, Dashnyam ym. 2017, Chai ym. 2018).

Tämän tutkielman tavoitteena on kartoittaa angiogeneesiä indusoivia kemikaaleja ja niiden toimintamekanismeja. Ensin käydään läpi angiogeenin yleisimmät säätelytekijät ja toimintamekanismit sekä pääpiirteittäin angiogeenin rooli syövässä, jotta on mahdollista ymmärtää miten kemikaalit aktivoivat angiogeneesiä. Tämän jälkeen perehdytään tarkemmin angiogeneesiä indusoiviin kemikaaleihin. Lopuksi vielä esitellään, esimerkein, miten tietämystä näistä kemikaaleista voidaan käyttää hyödyksi lääketieteellisten sovellusten kehittämisessä ja joidenkin sairauksien hoidossa.

## **2. ANGIOGENEESI**

### **2.1 Molekulaarinen säätely**

Angiogeneesi on tarkasti säädelty prosessi, ja sen aktiivisuus riippuu angiogeenisten eli angiogeneesiä indusoivien ja epäangiogeenisten eli angiogeneesiä inhiboivien tekijöiden tasapainosta (Kuwano ym. 2001, Tahergorabi & Khazaei 2012). Tärkeimpiä angiogeenisiä tekijöitä ovat eri kasvutekijät (Ucuzian ym. 2010). Angiogeenisten tekijöiden lähteitä ovat muun muassa endoteelisolut, fibroblastit, sileät lihassolut, verihiutaleet, immuunijärjestelmän solut ja syöpäsolut (Ucuzian ym. 2010). Joitakin kasvutekijöitä on varastoituneena myös soluväliaineessa (Ucuzian ym. 2010). Angiogeeniset tekijät indusoivat angiogeneesiä aktivoimalla signaalintireittejä, kuten MAPK- (mitogen-activated protein kinase) ja PI3K-Akt-reittejä (Phosphoinositide 3-kinases-Akt), jotka edistävät endoteelisolujen proliferaatiota ja migraatiota, ja täten myös niiden kykyä muodostaa putkirakenteita (Ucuzian ym. 2010). Kasvutekijöiden lisäksi monet muutkin molekulaariset tekijät säätelevät angiogeneesiä vaikuttamalla endoteelisolujen geeniekspressioon, sekä angiogeenisten tekijöiden aktiivisuuteen (Kuwano ym. 2001, Kumar ym. 2008, Krock ym. 2011, Kim, Y. & Byzova 2014).

### 2.1.1 Angiogeeniset kasvutekijät

VEGF (vascular endothelial growth factor) on yksi eniten tutkituista ja tehokkaimmista angiogeneesiä säätelevistä kasvutekijöistä, ja sillä tiedetäänkin olevan rooli verisuonten endoteelisolujen migraatiossa, proliferaatiossa ja putkirakenteen muodostumisessa (Ucuzian ym. 2010). VEGF-kasvutekijäperheeseen kuuluu selkärankaisilla kuusi jäsentä: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ja VEGF-E ja PIGF (placental growth factor) (Holmes & Zachary 2005). Perheen ensimmäisenä löydetyllä jäsenellä, VEGF-A:lla, on keskeisin rooli angiogeneesin säätelyssä ja yleisesti, kun viitataan VEGF:ään, tarkoitetaan juuri VEGF-A:ta (Holmes & Zachary 2005). VEGF-A:n ja sen reseptorien kautta kulkee myös parhaiten tunnettu yksilönkehityksen aikaisen angiogeneesin signalointireitti (Chung & Ferrara 2011). VEGF sitoutuu kolmeen eri reseptoriin, joista VEGFR-1:llä on korkein affiniteetti VEGF:ään, mutta vaikutukset endoteelisolujen migraatioon ja proliferaatioon tapahtuvat yleisimmin VEGFR-2:n välityksellä (Tahergorabi & Khazaei 2012). VEGFR-3 puolestaan löytyy imusuoniston endoteeliistä (Tahergorabi & Khazaei 2012). VEGF-viestinnän tärkeys yksilönkehityksessä osoitettiin hiirikokeissa, kun vajavuudet sekä VEGF-A:n että VEGFR-2:n toiminnassa johtivat kuolemaan alkionkehityksen varhaisessa vaiheessa (Chung & Ferrara 2011). Näiden hiirten endoteelisolut erilaistuivat liian myöhään ja niiden verisuonten havaittiin myös järjestäytyneen epänormaalisti (Chung & Ferrara 2011).

FGF (fibroblast growth factor) on angiogeeninen tekijä, jota on varastoituneena suoniston tyvikalvossa, ja sen pitoisuuden on myös havaittu olevan soluissa normaalia korkeampi angiogeneesin aikana (Ucuzian ym. 2010). Eri FGF-tyyppejä on yhteensä 20, joista FGF1 ja FGF2 stimuloivat angiogeneesiä (Tahergorabi & Khazaei 2012). FGF:ille on neljä erilaista tyrosiinikinaasireseptoria ja FGF1 ja FGF2 sitoutuvat kaikkiin näihin, mutta yleisimmin ne sitoutuvat FGFR-1:teen ja FGFR-2:teen (Ucuzian ym. 2010). *In vitro* -tutkimuksissa on osoitettu FGFR-1-sitoutumisen lisäävän endoteelisolujen migraatiota ja edesauttavan putkirakenteiden muodostumista (Ucuzian ym. 2010). FGF2:n on myös osoitettu lisäävän VEGF-tuotantoa, minkä lisäksi sillä on osoitettu olevan tärkeä rooli soluväliaineen uudelleen muotoutumisessa angiogeneesin aikana (Ucuzian ym. 2010). FGF2:n keskeinen rooli uusien verisuonten muodostuksessa on osoitettu haavanparanemisen yhteydessä (Tahergorabi & Khazaei 2012). Hiirillä, joiden FGF2-ilmentyminen oli estetty, haavanparaneminen oli normaalia hitaampaa, minkä uskotaan johtuneen siitä, että FGF2 säätelee uusien verisuonten muodostumista kudosisaurioiden korjautumisen aikana (Tahergorabi & Khazaei 2012).

Angiopoietiinit Ang-1 ja Ang-2 ovat kasvutekijöitä, jotka sitoutuvat endoteelisolujen pinnalla olevaan Tie-2-reseptoriin (Tahergorabi & Khazaei 2012). Vaikka Ang-1 ja Ang-2 sitoutuvat samaan reseptoriin, niiden vaikutukset eroavat toisistaan. Ang-1:n sitoutuminen reseptoriin tukee endoteelisolujen eloonjäämistä ja on tärkeä tekijä verisuonten stabiloinnissa (Ucuzian ym. 2010, Chung &

Ferrara 2011). Sen sitoutuminen myös inhiboi Ang-2:n ilmentymistä. Angiogeenisen signaalin saaneet endoteelisolut alkavat kuitenkin erittää Ang-2:ta, mikä johtaa verisuonten epästabiloitumiseen, sillä Ang-2 kilpailee Ang-1:n kanssa sitoutumisesta Tie-2:teen ja näin estää sen stabiloivia vaikutuksia (Tahergorabi & Khazaei 2012).

Myös TGF- $\beta$ :a (transforming growth factor- $\beta$ ) pidetään angiogeenisenä kasvutekijänä, vaikka *in vitro* -olosuhteissa sen on havaittu inhiboivan angiogeneesiä reseptorivälitteisesti (Ucuzian ym. 2010). *In vivo* -olosuhteissa se stimuloi eri tulehdussoluja, jotka tuottavat angiogeenisiä signaaleja (Ucuzian ym. 2010). TGF- $\beta$ :n on muun muassa osoitettu stimuloiva soluväliaineen tuottoa ja säätelevä haavan endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota sekä putkenmuodostamista (Ucuzian ym. 2010).

### 2.1.2 Muut angiogeeniset säätelytekijät

Tulehdussytokiineista ainakin interleukiinit IL-1, IL-6, IL-8 ja TNF- $\alpha$  (tuumorinekroositekijä- $\alpha$ ) aktivoivat angiogeneesiä (Kuwano ym. 2001, Hu ym. 2015, Lugano ym. 2019). Näiden tulehdussytokiinien tuottamisesta vastaavat pääasiassa makrofagit ja muut puolustussysteemin solut immuunivasteen aikana, mutta muutkin solut, kuten endoteelisolut ja fibroblastit erittävät joitakin tulehdussytokiineja (Kuwano ym. 2001, Ucuzian ym. 2010, Hu ym. 2015). Tulehdussytokiinit voivat aktivoitua angiogeneesiä joko suoraan lisäämällä endoteelisolujen proliferaatiota, erilasitumista ja migraatiota tai aktivoimalla soluja tuottamaan angiogeenisiä kasvutekijöitä (Kuwano ym. 2001, Ucuzian ym. 2010, Hu ym. 2015).

HIF-1:tä (hypoxia inducible factor-1) pidetään yhtenä angiogeneesin tärkeimmistä yksittäisistä säätelijöistä, sillä hypoksisten eli vähähappisten olosuhteiden seurauksena tapahtuva angiogeneesi aktivoituu sen välityksellä (Krock ym. 2011). Esimerkiksi haavan paranemisprosessi on kokonaan riippuvainen HIF-1:n ilmentymisestä (Zeng ym. 2015). Hapekkaissa olosuhteissa PHD-perheen (prolyl hydroxylase domain) entsyymi hydroksyloi HIF-1 $\alpha$ -alaysikön kaksi proliinitähdettä, mikä mahdollistaa VHL-kompleksin (von Hippen-Lindau) sitoutumisen HIF-1 $\alpha$ :an (Krock ym. 2011). VHL ubikinoi HIF-1 $\alpha$ :n ja täten merkkää sen tuhottavaksi proteiinidegradaatiossa (Krock ym. 2011). PHD-entsyymit eivät kykene toimimaan ilman happea, joten hapettomissa olosuhteissa HIF-1 $\alpha$  stabiloituu ja siirtyy tumaan, jossa se dimerisoituu HIF-1 $\beta$ -alaysikön kanssa ja muodostaa transkriptiokompleksin (Krock ym. 2011). Kompleksi sitoutuu HRE-geenialueelle (hypoxia response element) ja siten lisää angiogeenisten säätelytekijöiden, kuten VEGF:n ja FGF2:n, geeniekspressiota (Krock ym. 2011).



NO (typpioksidi) edistää endoteelisolujen proliferaatiota ja migraatiota (Jia & Sowers 2014). Monet angiogeeniset kasvutekijät lisäävät typpioksidin määrää soluissa aktivoimalla endoteelisolujen eNOS:ia (typpioksidisyntaasi) (Kumar ym. 2008). Typpioksidin keskeinen rooli angiogeneesin säätelyssä osoitettiin inhiboimalla eNOS:n toimintaa, mikä johti VEGF:n ja FGF2:n angiogeenisten vaikutusten vaimenemiseen (Kumar ym. 2008). Sen lisäksi, että typpioksidilla on suoria vaikutuksia endoteelisolujen toimintaan, sen aiheuttama vasodilaatio saattaa myös välillisesti johtaa endoteelisolujen proliferaatioon (Kumar ym. 2008). Typpioksidi voi myös lisätä solujen VEGF tuotantoa, joka puolestaan lisää typpioksidin tuotantoa, ja näin voi syntyä itseään vahvistava angiogeeninen stimulus (Kumar ym. 2008, Jia & Sowers 2014). Kasvutekijöiden indusoiman tuotannon lisäksi solun typpioksidipitoisuus voi nousta NO<sub>2</sub>:n (nitriitti) pelkistymisen seurauksena. Ihmisen veressä on jatkuvasti jonkin verran nitriittiä, ja sen pelkistyminen typpioksidiksi tapahtuu yleensä tiettyjen olosuhteiden, kuten hypoksian ja matalan pH:n vallitessa (Jia & Sowers 2014, Yildirim ym. 2015). Näin typpioksidin tuotto on suurimmillaan kudoksissa, joissa uusien verisuonten muodostuminen on tarpeellista (Yildirim ym. 2015).

Reaktiiviset happiradikaalit ovat yleensä soluille haitallisia, mutta pieninä määrinä ne voivat aktivoitua solujen proliferaatioon ja migraatioon johtavia signalointireittejä ja täten edistää angiogeneesiä (Alleva ym. 2011, Kim & Byzova 2014). Happiradikaalit aktivoivat angiogeneesiä vaikuttamalla joko VEGF-VEGFR-2- tai TLR2-MyD88-signalointiin (toll-like receptor-myeloid differentiating factor 88). Happiradikaalit voivat indusoida VEGF tuotantoa HIF-1 välitteisesti, minkä lisäksi ne voivat vahvistaa VEGFR-2:n välityksellä tapahtuvaa signalointivastetta (Kim & Byzova 2014). TLR2-MyD88-signalointi puolestaan aktivoituu lipidien hapettumistuotteiden vaikutuksesta ja johtaa Rac1-aktivaatioon (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), joka edistää angiogeneesiä (Kim & Byzova 2014). Näiden reittien lisäksi reaktiiviset happiradikaalit voivat mahdollisesti osallistua HIF-1 $\alpha$ :n stabilointiin, sillä ne hajottavat askorbiinihappoa, joka toimii PHD2-entsyymin kofaktorina (Dashnyam ym. 2017). Happiradikaaleilla on tärkeä rooli sekä fysiologisessa että patologisessa angiogeneesissä, ja niitä voi syntyä joko solujen omien luonnollisten toimintojen, kuten mitokondrioiden elektroninsiirtoketjujen tuotteena tai ulkoisen ärsykkeen seurauksena (Kim & Byzova 2014, Saghiri ym. 2016).

### 2.1.3 Epäangiogeeniset säätelytekijät

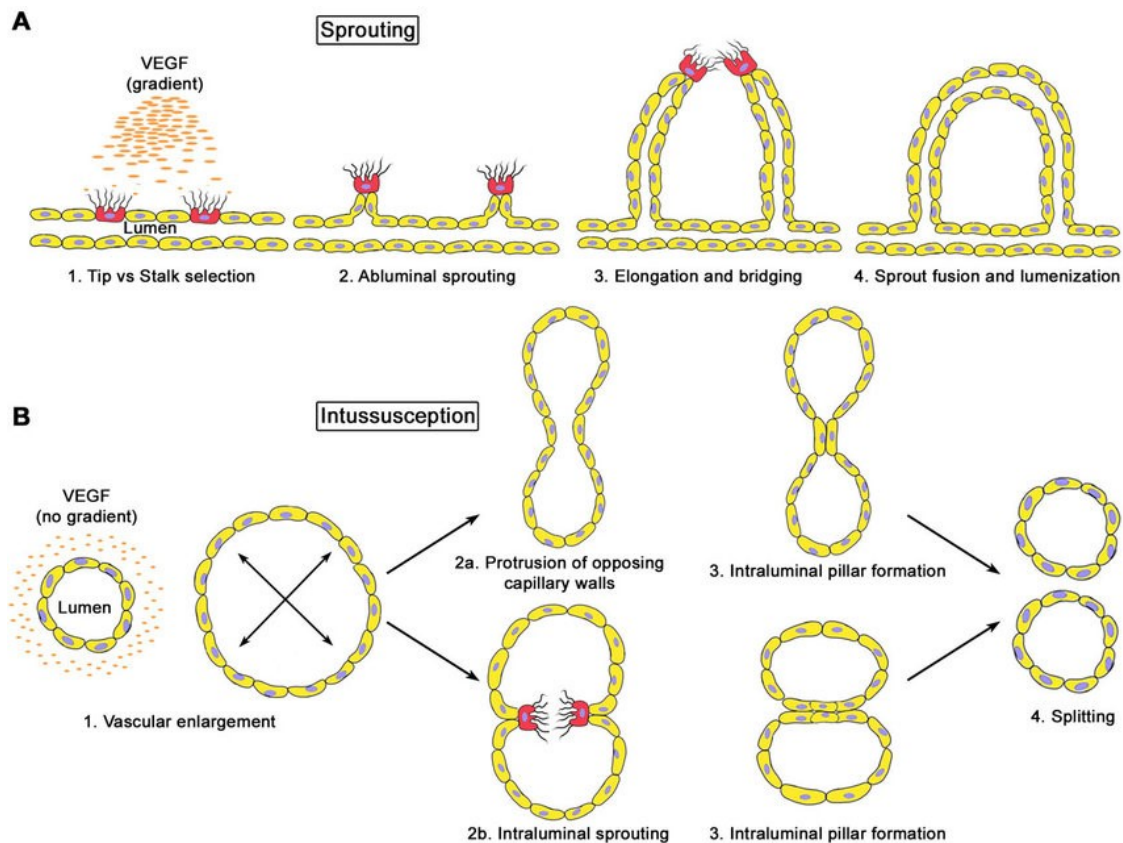
Keskeisimpiä epäangiogeenisiä tekijöitä ovat angiostatiini, endostatiini ja TSP:t (thrombospondiini) (Tahergorabi & Khazaei 2012). Angiostatiini toimii mahdollisesti angiogeneesin inhibiittorina, sillä sen on havaittu *in vitro* -olosuhteissa estävän endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja put-

kenmuodostamista (Tahergorabi & Khazaei 2012). Sen toiminta perustuu todennäköisesti sen kykyyn sitoa ATP-syntaasientsyymiä endoteelisolujen pinnalla (Tahergorabi & Khazaei 2012). Endostatiini myös estää endoteelisolujen migraatiota, ja tämän lisäksi se lisää solujen apoptoosia (Tahergorabi & Khazaei 2012). Kahdella TSP-proteiiniperheen jäsenestä, TSP-1:llä ja TSP-2:lla, on epäangiogeenisiä vaikutuksia (Tahergorabi & Khazaei 2012). TSP-1 estää endoteelisolujen proliferatiota, migraatiota ja putkenmuodostamista *in vitro* -olosuhteissa (Tahergorabi & Khazaei 2012). TSP1- ja -2 ovat rakenteeltaan hyvin samankaltaisia, mutta TSP-2:n on havaittu inhiboivan verisuonten kasvua ja muodostumista huomattavasti voimakkaammin, kun näiden vaikutuksia vertailtiin hiirimallissa (Tahergorabi & Khazaei 2012).

Kaiken kaikkiaan angiogeneesiin säätelyyn osallistuu suuri määrä eri viestimolekyylejä, joiden yhteisvaikutus määrää angiogeneesiin aktiivisuuden (Kuwano ym. 2001, Ucuzian ym. 2010). Häiriö yksittäisen säätelytekijän toiminnassa voi kuitenkin johtaa jo vakaviin kehityshäiriöihin ja moniin sairauksiin (Kuwano ym. 2001, Potente ym. 2011, Krock ym. 2011). Angiogeenisten ja epäangiogeenisten tekijöiden tunnistaminen onkin tärkeää, jotta voidaan paremmin ymmärtää eri sairauksien syitä ja kehittymistä, sekä kehittää hoitoja niitä vastaan (Potente ym. 2011, Lugano ym. 2019). Liiallista angiogeneesiä on esimerkiksi pyritty estämään kehittämällä VEGF-inhibiittoreita (Potente ym. 2011). Säätelytekijöiden toiminnan tunteminen on keskeistä myös, kun halutaan ymmärtää angiogeneesiin normaaleja mekanismeja (Potente ym. 2011, Tahergorabi & Khazaei 2012).

## 2.2 Angiogeneesiin mekanismit

Angiogeneesiin mekanismit voidaan selittää, kun tarkastellaan verisuonten kahden solutyypin, endoteelisolujen ja muraalisolujen, toimintaa, biologista säätelyä ja niiden vuorovaikutusta toistensa sekä ympäröivän kudoksen kanssa (Ucuzian ym. 2010, Tahergorabi & Khazaei 2012). Angiogeneesi tapahtuu pääpiirteissään kahdella tavalla: halkeamalla ja haarautumalla (Tahergorabi & Khazaei 2012). Useimmiten angiogeneesistä puhuessa viitataan haarautumiseen, jossa hypoksian ja angiogeenisten signaalien vaikutuksesta ennestään olemassa olevan verisuonen seinämästä haarautuu uusia verisuonia poikkisuorassa sen etenemissuuntaan nähden (Potente ym. 2011, Tahergorabi & Khazaei 2012). Halkeamisessa puolestaan ennestään olemassa oleva verisuoni halkeaa suuren leikkausjännityksen seurauksesta kahteen osaan, jolloin syntyy kaksi samansuuntaista tytärsuonta (Tahergorabi & Khazaei 2012). Haarautumalla ja halkeamalla tapahtuvan angiogeneesiin mekanismit on havainnollistettu kuvassa 1.



**Kuva 1.** Angiogeneesin kaksi päämekanismia vaiheineen. A: haarautumisessa ns. kärkisolut valikoituvat VEGF gradientin vaikutuksesta ja niiden kohdalta haarautuu uusi verisuoni poikkisuorassa alkuperäiseen suoneen nähden. Uusi yhtenäinen verisuoni muodostuu, kun kaksi kärkisolua kohtaavat ja kaksi haarautuvaa suonta yhdistyvät. B: Halkeamalla tapahtuvassa angiogeneesissä VEGF gradientti ei ohjaile angiogeneesiä, vaan siinä verisuonen vastakkaiset seinämät alkavat tunkeutua sisäänpäin ja muodostavat suonen lumenin läpäisevän pilarirakenteen, joka lopulta jakaa suonen kahteen tytärsuoneen (Uccelli ym. 2019).

VEGF on tärkein kärkisolujen ja varsisolujen valikoitumista sekä kärkisolujen suuntautumista ohjaileva tekijä (Potente ym. 2011, Tahergorabi & Khazaei 2012). VEGF:n vaikutuksesta suonta ympäröivät muraalisolut irrottautuvat, ja endoteelisolut alkavat hajottamaan verisuonta ympäröivää tyvikalvoa (Potente ym. 2011). Molemmat tapahtumat ovat välttämättömiä, jotta haarautuminen voi alkaa, sillä normaalisti tyvikalvo ja muraalisolut estävät suonen seinämän endoteelisolujen migraation (Potente ym. 2011). Korkea VEGF-pitoisuus saa aikaan myös DLL4:n (delta-like ligand 4) ilmenemisen kärkisolujen pinnalla (Chung & Ferrara 2011). DLL4 sitoutuu viereisten varsisolujen Notch-1- ja Notch-4 reseptoreihin, mikä johtaa VEGFR-2:n ilmenemisen vähenemiseen näissä soluissa (Chung & Ferrara 2011, Potente ym. 2011). Tämä on olennaista, jotta uudet suonet kehittyvät järjestäytyneesti, sillä VEGF-VEGFR-2-vuorovaikutus ohjailee solujen migraation suuntautumista (Tahergorabi & Khazaei 2012). Mikäli jokainen solu ilmentäisi VEGFR-2:ta, toimisivat kaikki solut kärkisoluina ja haarautuisivat liiallisesti ja epäjärjestäytyneesti VEGF-gradientin perässä

(Chung & Ferrara 2011). Siinä missä kärkisolut ovat hyvin liikkuvaisia ja kykenevät seuraamaan VEGF-gradienttia, varsisolut proliferoituvat ja muodostavat solujenvälisiä sidoksia ja tyvikalvoa ympärilleen (Chung & Ferrara 2011, Potente ym. 2011). Näin ne osallistuvat haarautumien pidentämiseen ja uusien eheiden verisuonten seinämien muodostumiseen (Potente ym. 2011). Lopulta, kun kaksi kärkisolua kohtaavat toisensa, muodostuu uusi suoni, ja veri voi alkaa virrata sen läpi; suonen täytyy kuitenkin kypsyä ennen kuin sen on täysin toiminnallinen (Potente ym. 2011). Tähän sisältyy muun muassa soluväliaineen tuotantoa ja muraalisolujen kiinnittymistä suonten pinnalle (Potente ym. 2011). Muraalisoluista perisytyt ovat suorassa kontaktissa endoteelisolujen kanssa ja ne osallistuvat uusien suonen seinämien muodostamiseen (Tahergerabi & Khazaei 2012). Perisytytien toimintaa uusien seinämien muodostuksessa säätelee pääasiassa PDGF-B (platelet derived growth factor subunit B) ja sen reseptori (Potente ym. 2011). Suonten kypsyminen on erilainen prosessi riippuen suonen sijainnista kehossa, sillä eri kokoiset ja eri tehtäviä hoitavat verisuonet vaativat eriäviä ominaisuuksia (Potente ym. 2011).

Halkeamalla tapahtuvassa eli intussuskeptisessä angiogeneesissä verissuoneen syntyy sen läpäisevä pilarimainen rakenne (Betz ym. 2016). Rakenne syntyy, kun endoteelisolut suonen vastakkaisilta puolilta alkavat tunkeutumaan sisäänpäin (Betz ym. 2016). Kohdatessaan toisensa ne yhdistyvät muodostaen onton, suonen läpäisevän, pilarirakenteen, johon muraalisolut voivat tunkeutua (Betz ym. 2016). Pilarirakenteiden kasvaessa ja vierekkäisten pilarirakenteiden yhdistyessä verisuoni jakautuu kahdeksi tytärsuoneksi pituussunnassa (Mentzer & Konerding 2014, Betz ym. 2016). Halkeamisella tapahtuvan angiogeneesin mekanismit eivät toistaiseksi ole hyvin tunnettuja, mutta leikkausjännityksen endoteelisoluihin aiheuttamalla mekaanisella stimuluksella uskotaan olevan vaikutus tiettyjen geenien ilmentymiseen, mikä johtaa pilarien muodostumiseen (Mentzer & Konerding 2014). Tämän lisäksi myös muilla tekijöillä, kuten ulkopuolisilla signaaleilla ja tulehdus-soluilla, voi olla rooli intussuskeptisessä angiogeneesissä (Mentzer & Konerding 2014).

Vaikka haarautumalla tapahtuvan angiogeneesin mekanismit tunnetaan suhteellisen hyvin, ja sen säätelyyn vaikuttamalla voidaan kehittää angiogeenisiä ja epäangiogeenisiä lääkkeitä, tulisi myös intussuskeptisessä angiogeneesiä edelleen tutkia, sillä nämä kaksi mekanismia toimivat todennäköisesti usein yhteistyössä uusien verisuonten muodostuksessa (Ucuzian ym. 2010). Tämän lisäksi intussuskeptisellä angiogeneesillä on todettu olevan keskeinen rooli iskemisissä kudoksissa sekä kasvainten kasvussa ja leviämässä (Potente ym. 2011, Mentzer & Konerding 2014).

### **2.3 Angiogeneesi ja syöpä**

Angiogeneesiä pidetään yhtenä syövän tunnusmerkeistä, ja se onkin olennainen piirre kasvaimissa, sillä ne tarvitsevat uusia verisuonia kasvaakseen (Tahergerabi & Khazaei 2012, Hu ym.

2015, Lugano ym. 2019). Kudosten normaali verisuonisto ei kykene vastaamaan hallitsemattomasti kasvavien ja lisääntyvien kasvainsolujen hapen ja ravinteiden tarpeeseen, joten kasvainten täytyy jo aikaisessa kehitysvaiheessa siirtyä angiogeenisesti aktiiviseen tilaan (Chung & Ferrara 2011, Krock ym. 2011). Angiogeneesi tapahtuu pääasiassa haarautumalla, mutta myös intussuskeptista angiogeneesiä esiintyy monissa kasvaimissa; etenkin myöhemmässä vaiheessa kasvua se lisää kasvaimen verisuoniston rakenteellista monimuotoisuutta (Tahergorabi & Khazaei 2012, Lugano ym. 2019). Angiogeneesiä kasvaimissa ajaa hypoksinen ympäristö, sillä hapenpuute soluissa saa aikaan HIF-1:n aktivaation, joka johtaa monen angiogeenisen tekijän, kuten VEGF:n ja angiopoi-etiinien, kasvaneeseen ilmentymiseen (Chung & Ferrara 2011, Krock ym. 2011). Ravinteiden ja hapen toimituksen lisäksi kasvava verisuonisto tarjoaa kasvainsoluille reittejä etäpesäkkeiden eli metastaasien lähettämiseen ja täten edistää syövän leviämistä (Chung & Ferrara 2011, Krock ym. 2011).

Kasvainten verisuonisto on usein epäjärjestäytynyt ja muutenkin epänormaali (Krock ym. 2011), mikä johtuu luultavasti nopeasti kasvavasta solupopulaatiosta ja angiogeenisten tekijöiden yliekspressiosta (Siemann & Horsman 2015). Suonet ovat tyypillisesti hauraita ja kiemuraisia, eikä niiden pinnalla esiinny perisytyttejä normaaliin tapaan (Chung & Ferrara 2011). Vaikka tämän voisi olettaa olevan kasvaimille haitallista, voi heikosti toimiva verisuonisto itseasiassa edistää pahalaatuisten kasvaimen kehittymistä, sillä kasvaimen hapettomat ja ravinneköyhät alueet aiheuttavat valintapainetta kasvainten solujen välillä (Al Tameemi ym. 2019). Tämän seurauksena yleistyvät kasvainsolupopulaatiot, jotka ovat invasiivisempiä ja vastustuskykyisempiä hankalille kasvuympäristöille ja täten myös metastasoivampia (Al Tameemi ym. 2019). Kasvainten verisuoniston suonten seinämät ovat usein myös erittäin läpäiseviä ja ”vuotavia”, mikä voi vaikeuttaa lääkeaineiden pääsyä kaikkiin kohdesoluihinsa (Lugano ym. 2019). Suuri läpäisevyys voi myös auttaa kasvainsoluja siirtymään vereen ja täten edesauttaa metastaasien syntyä (Lugano ym. 2019).

Epäangiogeeninen lääkitys on yksi hyvin potentiaalinen hoito monia syöpiä vastaan, mutta näiden lääkkeiden kehitykseen liittyy monia haasteita, sillä syövät usein tulevat vastustuskykyisiksi angiogeneesi-inhibiittoreille ja kykenevät muodostamaan uusia verisuonia niistä huolimatta (Potente ym. 2011, Chung & Ferrara 2011). Joidenkin epäangiogeenisten lääkkeiden kohdalla on myös nähty merkkejä siitä, että ne ovat tehneet kasvaimista aggressiivisempia (Potente ym. 2011, Lugano ym. 2019).

Epäangiogeenisten lääkkeitten kehittämisen lisäksi olisi tärkeää löytää angiogeneesiä indusoivia yhdisteitä ja tunnistaa niitä karsinogeneiksi (Hu ym. 2015, Jacobs ym. 2016). Vaikka syövän synty vaatii yleensä mutaatioita soluissa, voi angiogeneesiä indusoivilla kemikaaleilla olla olennainen osuus syövän etenemisessä ja kasvainten pahalaatuistumisessa (Jacobs ym. 2016). Viime aikoina

onkin noussut huoli angiogeneesiä indusoivien, yleisesti ei karsinogeenisinä pidettyjen, ympäristökemikaalien vaikutuksista syövän aiheuttajina (Jacobs ym. 2016).

### 3. ANGIOGENEESIÄ INDUSOIVAT KEMIKAALIT

Elinympäristössämme esiintyy laaja kirjo kemikaaleja, joilla voi olla vaikutus moniin biologisiin prosesseihin. Monien ympäristökemikaalien vaikutus terveyteen on toistaiseksi huonosti ymmärretty niiden monitahoisten vaikutusten vuoksi, mutta on arvioitu, että niillä on osuus jopa 90-95 %:iin syöpätapauksista (Saghiri ym. 2015a). Vaikka monen ympäristökemikaalin vaikutusta syövän muodostumiseen onkin tutkittu, tietoa niiden osuudesta angiogeneesin ja sitä kautta syövän muodostumiseen ei olla juurikaan tarkasteltu (Hu ym. 2015). Etenkin useiden yhdisteiden matalille pitoisuuksille yhtäaikaaisesti altistumisen seuraukset ovat huonosti tunnettu (Hu ym. 2015).

Syynä angiogeneesiä indusoivien yhdisteiden heikkoon tunnistamiseen ovat todennäköisesti puutteet karsinogeenisyyden testausmenetelmissä ja testauksen sääntelyssä (Jacobs ym. 2016). Karsinogeenisyyden testaus on standardi kaikille kemikaaleille, mutta se perustuu usein niiden genotoksisuuden tutkimiseen, minkä vuoksi on mahdollista, että moni angiogeneesiä indusoiva yhdiste jää tunnistamatta, sillä ne toimivat usein vaikuttamatta solun perimään (Hu ym. 2015, Jacobs ym. 2016). Tällaisia syöväälle altistavia tekijöitä, jotka eivät aiheuta mutaatioita tai vauriota DNA:han, kutsutaan epägenotoksisiksi karsinogeeniksi (Jacobs ym. 2016). Genotoksisen karsinogeenisyyden tutkimiseen on olemassa OECD:n (taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö) hyväksymiä *in vitro* -menetelmiä, mutta epägenotoksisen karsinogeenisyyden riskin selvittämiseen käytetään yleensä jyrksijöillä tehtäviä testejä (Jacobs ym. 2016, Wilde ym. 2018). Jyrksijöillä suoritettavissa testeissä on monia haittapuolia, kuten niiden eettiset ongelmat, pitkä kesto ja tulosten mahdollinen huono vastaavuus ihmisiin (Jacobs ym. 2016, Wilde ym. 2018). Tämän lisäksi useimpien lainsäädäntöjen piirissä jyrksijöillä tehtäviä testejä ei vaadita, mikäli kemikaalin genotoksisen karsinogeenisyyden *in vitro*-testit ovat negatiivisia (Jacobs ym. 2016, Wilde ym. 2018). Täten monista epägenotoksisista karsinogeenistä, kuten angiogeneesiä indusoivista kemikaaleista, onkin rajallisesti tietoa (Jacobs ym. 2016, Wilde ym. 2018).

Angiogeneesiä indusoiviin kemikaaleihin lukeutuu useita hivenaineita sekä monia muita elinympäristössämme ja elintarvikkeissa esiintyviä kemikaaleja (Saghiri ym. 2015a, Hu ym. 2015, Jacobs ym. 2016). Kemikaalien indusoima angiogeneesi perustuu usein niiden kykyyn aiheuttaa tai jäljitellä hypoksiaa soluissa (Yesildal ym. 2015, Saghiri ym. 2016, Dashnyam ym. 2017). Tämän lisäksi

reaktiivisten happiradikaalien synnyttäminen tai tulehdusvasteen aiheuttaminen voi johtaa angiogeneesin aktivoitumiseen (Yesildal ym. 2015, Saghiri ym. 2016, Dashnyam ym. 2017). Angiogeneesin luonne voi vaihdella riippuen siitä, mikä kemikaali sitä on indusoinut. Jotkin kemikaalit indusoivat normaalia, fysiologista vastaavaa, angiogeneesiä, kun taas toisille kemikaaleille altistuminen johtaa epäfunktionaalisen verisuoniston muodostumiseen (Kim, J. ym. 2012, Hu ym. 2015, Jacobs ym. 2016, Dashnyam ym. 2017).

Eri aineiden ja yhdisteiden pitoisuudella on suuri merkitys niiden angiogeneesiä indusoiviin vaikutuksiin (Hu ym. 2015, Saghiri ym. 2015). Hyvän esimerkin tästä tarjoavat monet metallit, sillä ne voivat matalina pitoisuuksina olla angiogeenisiä, mutta korkeina pitoisuuksina ne ovat usein soluille myrkyllisiä, jolloin niiden vaikutus muuttuu epäangiogeeniseksi (Saghiri ym. 2015b). Konsentraation lisäksi myös aineen esiintyminen eri varauksellisena ionina, yhdisteenä jonkin toisen aineen kanssa tai osana jotakin rakennetta voi vaikuttaa kemikaalin angiogeenisiin ominaisuuksiin (Saghiri ym. 2015b, Dashnyam ym. 2017).

Tässä luvussa käydään seuraavaksi läpi angiogeneesiä indusovia metalleja, puoli- ja epämetalleja sekä muita yhdisteitä, ja mekanismeja, joilla ne aktivoivat angiogeneesiä. Parempi tietämys niistä voi auttaa ymmärtämään paremmin joitakin angiogeneesin liittyviä syövän syntymekanismeja (Hu ym. 2015, Jacobs ym. 2016). Tietämys angiogeneesiä indusovista kemikaaleista voi myös mahdollisesti auttaa lääketieteen osa-alueilla, joilla riittävä verisuonten kasvu on osoittautunut rajoittavaksi tekijäksi (Jia & Sowers 2014, Zeng ym. 2015, Dashnyam ym. 2017, Chai ym. 2018).

### 3.1 Metallit

Kuparilla on rooli normaalissa alkionkehityksessä ja uusien verisuonten kasvussa, ja sen on myös osoitettu edistävän uusien verisuonten kasvua jäniksen sarveiskalvokokeessa, jota käytetään yleisesti angiogeneesin tutkimisessa (Tahergorabi & Khazaei 2012, Saghiri ym. 2015b). Kuparin on näytetty lisäävän endoteelisolujen proliferaatiota, minkä lisäksi se voi myös edistää niiden migraatiota *in vivo* -olosuhteissa, sillä se toimii soluväliainetta hajottavien metalloproteasien kofaktorina (Saghiri ym. 2015b). Soluväliaineen hajottaminen voi johtaa myös siihen varastoituneiden angiogeenisten tekijöiden vapautumiseen, mikä osaltaan edistää angiogeneesiä. Kuparin angiogeeniset vaikutukset perustivat suurelta osin kupari-ionien kykyyn aktivoida monia angiogeenisiä tekijöitä, kuten VEGF:ää, FGF-2:ta, TNF- $\alpha$ :a ja IL-1 $\beta$ :a (Saghiri ym. 2015b). Sen lisäksi kupari-ionit voivat tehdä joistakin normaalisti ei-angiogeenisistä molekyyleistä, kuten hepariinista ja glyssyyli-L-histidyyli-L-lysiini -peptidistä, angiogeenisiä (Dashnyam ym. 2017, Chai ym. 2018).

Koboltin ja nikkelin angiogeeniset vaikutukset perustuvat niiden kykyyn jäljitellä hypoksiaolosuhteita stabiloimalla HIF-1 $\alpha$ :a (Dashnyam ym. 2017, Chai ym. 2018). Koboltin ja nikkelin HIF-1 $\alpha$ :a, stabiloiva ominaisuus perustuu niiden kykyyn inhiboida kahta HIF-1 $\alpha$ :n ubikinaatioon ja täten degradaatioon johtavaa tapahtumaa (Dashnyam ym. 2017). Ensimmäisen inhibition mekanismi on estää, HIF-1 $\alpha$ :a hydroksyloivan, PHD2-entsyymin toiminta (Dashnyam ym. 2017). Fe<sup>2+</sup> -ioni on PHD2:n happea sitova kofaktori, ja koska koboltin ja nikkelin Co<sup>2+</sup>- ja Ni<sup>2+</sup>- ionit muistuttavat läheisesti Fe<sup>2+</sup> -ionia, voivat ne sitoutua sen sijasta ja täten estää PHD2:n toiminnan. Nikkeli ja koboltti voivat myös suoraan sitoutua HIF -1 $\alpha$ :an ja näin estää VHL -proteiinin sitoutumisen ja täten HIF-1 $\alpha$ :n degradaation (Dashnyam ym. 2017). Koboltti ja nikkeli voivat myös mahdollisesti indusoida angiogeneesiä synnyttämiensä reaktiivisten happiradikaalien kautta (Dashnyam ym. 2017).

Kadmium on myrkyllinen metalli, jolle krooninen altistuminen aiheuttaa haitallisia muutoksia verisuonistossa (Kim ym. 2012). Pienten kadmiumpitoisuuksien (5  $\mu$ M ja 10  $\mu$ M) näytettiin *in vitro* -oloissa lisäävän endoteelisolujen proliferaatiota ja parantavan niiden kykyä muodostaa putkirakenteita (Kim ym. 2012). Samassa tutkimuksessa kadmiumin havaittiin lisäävän endoteelisolujen VEGF-eritystä ja VEGFR-2-ilmentymistä aktivoimalla solujen MAPK-signalointireittejä, mikä selittää sen angiogeeniset vaikutukset.

Kromilla ei perusmuodossa ole vaikutuksia angiogeneesiin, sillä se ei imeydy kehoon, mutta epäorgaanisissa yhdisteissä esiintyvä kromaatti-ioni puolestaan on myrkyllinen ja karsinogeeninen (Saghiri ym. 2015b). Kromaatti edistää angiogeneesiä muun muassa aktivoimalla solujen proliferaatiota ja erilaistumista edistäviä signalointireittejä sekä HIF-1 $\alpha$ :n ilmentymistä (Saghiri ym. 2015b). Kromaatti indusoi angiogeneesiä myös sen soluissa muodostamien vapaiden OH-radikaalien kautta, sillä ne aktivoivat NF- $\kappa$ B-transkriptiotekijää (nuclear factor- $\kappa$ B), joka aktivoi IL-8 tuotantoa, mikä puolestaan on angiogeeninen tekijä (Saghiri ym. 2015b).

### 3.2 Epämetallit ja puolimetallit

Fosfori on hyvin keskeisessä osassa monissa biologisissa prosesseissa kuten ATP:n tuotannossa, ja sitä on luonnostaankin kehossa suhteellisen suuri määrä (Saghiri ym. 2015a). Korkea fosforipitoisuus voi kuitenkin lisätä angiogeneesiä keuhkoissa sekä kasvaimissa (Saghiri ym. 2015a). Keuhkoissa sen angiogeeniset vaikutukset perustuvat sen kykyyn lisätä fosforylaatiota Akt-signalointireitissä, mikä johtaa FGF2- ja MMP2-ilmentymiseen (matrix metalloproteinase-2). Syöpäsoluissa fosforin puolestaan havaittiin lisäävän VEGF-A:n ja FOX2P:n (forkhead box P2) ilmentymistä (Saghiri ym. 2015a). FOX2P:llä on havaittu olevan rooli kasvainten angiogeneesissa, sillä se muun muassa vahvistaa endoteelisolujen kykyä liikkua erilaisten kemiallisten gradienttien ohjailmana (Saghiri ym. 2015a).



Piillä on tärkeä rooli normaalissa luun toiminnassa ja sitä myös käytetään biomateriaaleissa parantamaan luunmuodostusta (Saghiri ym. 2015b). Yksi sen tärkeimmistä vaikutuksista paremmassa luunmuodostuksessa on angiogeneesin indusointi, joka on seurausta materiaaleista vapautuneiden  $\text{Si}^{4+}$ -ionien vaikutuksista endoteelisoluihin (Dashnyam ym. 2017). *In vitro* -olosuhteissa 2.87–8.39  $\mu\text{g/ml}$   $\text{Si}^{4+}$ -konsentraatio edisti endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja putkenmuodosta sekä lisäsi angiogeenisten tekijöiden kuten VEGF:n ja FGF:n määrää.  $\text{Si}^{4+}$ -ioninen toimintamekanismi on pitkälti samanlainen kuin koboltti- ja nikkeli-ionien, eli HIF-1 $\alpha$ :n degradaation estäminen (Dashnyam ym. 2017).

Rikki on sen joissain muodoissa epäangiogeeninen, mutta  $\text{H}_2\text{S}$ :llä (divetyysulfidi) on rooli VEGF välitteisessä angiogeneesissä ja sen ulkoisen lisäämisen on näytetty indusoivan angiogeneesiä *in vitro* -kokeissa (Saghiri ym. 2015b).  $\text{H}_2\text{S}$ :n on näytetty aktivoivan MAPK- ja Akt-signaalintireittejä, jotka edistävät endoteelisolujen putkenmuodostusta ja migraatiota. Rikki on osallisena angiogeneesissä myös heparaanisulffaattia sisältävien proteoglykaanien muodossa, sillä ne toimivat koreseptoreina monille angiogeenisille tekijöille, kuten VEGF:lle ja FGF:lle (Saghiri ym. 2015b).

Arsenikin havaittiin *in vitro* -kokeissa indusoivain angiogeneesiä matalina pitoisuuksina ( $< 1 \mu\text{M}$ ) (Hu ym. 2015). VEGF ilmentyminen endoteelisoluissa oli suurempaa, ja solujen kasvu sekä putkirakenteiden muodostaminen lisääntyivät (Hu ym. 2015). Hiirikokeissa havaittiin, että 10-100 ppm arsenikkia juomavedessä lisäsi verisuonten muodostusta maksassa (Saghiri ym. 2016). Arsenikki indusoi angiogeneesiä vaikuttamalla eri mekanismein moneen eri signaalintireittiin. Se stimuloi muun muassa VEGF-, HIF-, Akt- ja MAPK-signaalointia (Saghiri ym. 2016). Arsenikki voi vaikuttaa solusignaalointiin joko menemällä solun sisälle tai toimimalla S1P1-reseptorin (sphingosine-1-phosphate type 1) välityksellä (Saghiri ym. 2016).

Lyijylle altistumisen on havaittu nostavan joidenkin tulehdussytokiiniinien määrään ihmisillä, ja täten on mahdollista, että lyijy myös indusoi angiogeneesiä (Saghiri ym. 2016). Esimerkiksi IL-8:n ja TNF- $\alpha$ :n määrä lisääntyi, ja kummankin näistä tulehdussytokiineista tiedetään olevan angiogeenisiä, minkä lisäksi IL-8:lla on näytetty olevan angiogeneesiä indusoiva vaikutus karsinoomissa (Saghiri ym. 2016). Krooninen altistuminen jopa hyvin pienille lyijypitoisuuksille ( $< 0,1 \mu\text{M}$ ) voi johtaa IL-8 tuotantoon (Saghiri ym. 2016). AP-1-transkriptiotekijä ja MAPK-signaalointi reitti välittävät lyijyaltistuksen seurauksena tapahtuvaa IL-8 aktivaatiota (Saghiri ym. 2016).

### 3.3 Muut yhdisteet

Monien tutkimusten perusteella ilmassa esiintyvien pienhiukkasten määrällä ja syöpien esiintymisen välillä on vahva yhteys (Xu ym. 2009). Yksi selittävä tekijä tälle voi olla dieselpakokaasun angiogeneesiä edistävät vaikutukset (Xu ym. 2009). Hiirikokeissa havaittiin dieselpakokaasualtistuksen lisänsen endoteelisolujen lukumäärää ja putkenmuodostusta, kun sen vaikutuksia tutkittiin ihonalaisen kudosteknologisen implantaation ja takaraajaan aiheutuneen iskemian jälkeen (Xu ym. 2009). Dieselpakokaasu aiheuttaa angiogeneesiä todennäköisesti jäljittelemällä hypoksisia olosuhteita, sillä sen näytettiin *in vitro* -kokeissa lisäävän HIF-1 $\alpha$ :n ja VEGF:n ja vähentävän PHD2:n ilmentymistä (Xu ym. 2009).

Nikotiinin on yksi tupakan pääainesosista, ja sen on näytetty indusoivan syöpäsolujen VEGF- ja HIF-ekspressiota, sekä lisäävän endoteelisolujen putkirakenteiden muodostusta *in vitro* -olosuhteissa (Hu ym. 2015). Endoteelisolut myös proliferoituivat ja niistä tuli liikkuvampia, kun ne altistettiin pitoisuuksille, joille tupakoitsijat altistuvat (Hu ym. 2015). Nikotiinin angiogeeniset vaikutukset välittyvät mahdollisesti nikotiiniasetyylikoliinireseptorin välityksellä, sillä se on keskeisessä roolissa VEGF- ja FGF-välitteisessä solujen liikkuvuuden kasvussa (Hu ym. 2015).

BPA (Bisfenoli A) on yleinen kulutustuotteista, kuten juoma- ja ruokapakkauksissa, löytyvä orgaaninen yhdiste, jota käytetään polykarbonaattimuoveissa ja epoksihartseissa (Andersson & Brittebo 2012). Sitä on havaittu pieninä pitoisuuksina ihmisten veressä normaalin altistumisen seurauksena (Andersson & Brittebo 2012). Kun endoteelisoluja viljeltiin verinäytteistä löydettyjä vastaavissa BPA-pitoisuuksissa, havaittiin niissä kohonnut VEGFR-2-, VEGF-A-, eNOS-geeniekspressio, ja ne myös muodostivat enemmän putkirakenteita kontrolliryhmään verrattuna (Andersson & Brittebo 2012).

Aspartaami on yleisesti monissa juomissa ja makeisissa käytetty makeutusaine, jolla on mahdollisesti yhteys monen taudin muodostumiseen (Alleva ym. 2011). Jo päivittäisiä enimmäissuosituksia huomattavasti matalammat aspartaamipitoisuudet näyttivät indusoivan angiogeneesiä *in vivo* -kokeissa (Yesildal ym. 2015). Tämän lisäksi havaittiin, että angiogeneesi lisääntyi konsentraation kasvaessa. Kun soluviljelyssä endoteelisolut altistettiin aspartaamille, havaittiin viljelyksessä kasvanut VEGF:n, IL-6:n ja niiden reseptorien määrä (Alleva ym. 2011). Aspartaamin angiogeeniset vaikutukset johtuvat todennäköisesti sen aiheuttamasta vapaiden radikaalien tuotosta soluissa, joka johtaa inflammaatioon ja täten IL-6:n eritykseen (Alleva ym. 2011). IL-6 aktivoi VEGF- ja VEGFR-2 tuotantoa, joka lopulta johtaa MAPK-reittien aktivaatioon ja angiogeneesin lisääntymiseen (Alleva ym. 2011).

Aspartaamin lisäksi yleinen elintarvikkeista löytyvä angiogeneesiä indusoiva yhdiste on  $\text{NaNO}_2$  (natriumnitriitti), jota lisätään moniin lihavalmistuksiin (Hord ym. 2009, Yildirim ym. 2015). Natriumnitriitin angiogeeniset vaikutukset perustuvat nitriitin pelkistymiseen NO:ksi, mikä tapahtuu yleensä iskemian, hypoksian tai matalan pH:n seurauksena (Yildirim ym. 2015). *In vitro*- ja *in vivo*-kokeissa natriumnitriitin havaittiin edistävän endoteelisolujen proliferaatiota, putkenmuodostusta ja suonien haaratumista myös normaaleissa fysiologisissa olosuhteissa (Yildirim ym. 2015).

AS-IV (astragalosiidi IV) ja Arnebin-1 ovat luonnollisia yhdisteitä, jotka kumpikin esiintyvät rohdoskasvissa, joita on käytetty lääkinnällisiin tarkoituksiin Kiinassa jo satojen vuosien ajan (Zhang, Y. ym. 2012, Zeng ym. 2015). AS-IV:n havaittiin edistävän angiogeneesiä seeprakaloilla, joilla esiintyi verisuonivaurioita (Zhang ym. 2012). Samassa tutkimuksessa myös osoitettiin AS-IV:n lisäävän endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja putkenmuodostusta *in vitro*-olosuhteissa. AS-IV indusoi angiogeneesiä mahdollisesti VEGF-VEGFR2- ja Akt-signaaloinnin välityksellä, sillä sen havaittiin lisäävän VEGF- ja VEGFR-2-ekspressiota sekä Akt fosforylaatiota (Zhang ym. 2012). Arnebin-1 edistää angiogeneesiä, sekä *in vitro*- että *in vivo*-olosuhteissa. *In vitro*-kokeissa sen näytettiin lisäävän endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja putkenmuodostusta. Arnebin-1 lisäsi endoteelisolujen HIF1- $\alpha$ -ilmentymistä ja tämän lisäksi se aktivoi muidenkin angiogeenisten tekijöiden, kuten VEGF:n ja eNOS:n tuotantoa (Zeng ym. 2015). Angiogeenisten tekijöiden indusointi oli riippuvainen Akt-signaalintireitistä, sillä sen inhiboimisen näytettiin estävän Arnebin-1:n angiogeeniset vaikutukset soluihin sekä pienentävän HIF1- $\alpha$ :n määrää soluissa (Zeng ym. 2015). Sama tutkimus näytti Arnebin-1:n mahdollisesti stimuloivan angiogeneesiä myös fosforyloimalla VEGFR-2:n ja täten aktivoimalla MAPK-signaalointia. AS-IV:n ja Arnebin-1:n lisäksi muidenkin rohdoskasveissa esiintyvien yhdisteiden, kuten *Panax notoginseng* -kasvista eristettyjen 20(S)-protopanaksadiolin ja notoginsenosiidi Ft1:n, on havaittu indusoivan angiogeneesiä (Shen ym. 2012, Zhang, E. ym. 2017). 20(S)-protopanaksadiolin ja notoginsenosiidi Ft1:n angiogeeniset vaikutukset ovat HIF1- $\alpha$ -välitteisiä (Shen ym. 2012, Zhang ym. 2017).

## 4. KLIINISET SOVELLUKSET

Riittävän verisuonituksen aikaansaaminen on monesti suuri haaste regeneratiivisessa lääketieteessä, minkä takia keinoja angiogeenin edistämiseen tarvitaan (Dashnyam ym. 2017, Chai ym.

2018). Angiogeneesin aktivoiminen voi myös mahdollisesti auttaa vakavien tautitilojen, kuten vakavan iskemian tai diabeettisten jalkahaavojen hoidossa (Zeng ym. 2015). Tähän mennessä angiogeneesiä on pyritty aktivoimaan muun muassa eri kasvutekijöiden ja geeniterapioiden avulla, mutta näihin menetelmiin liittyy monia riskitekijöitä, minkä lisäksi ne ovat kalliita (Zeng ym. 2015). Jotkin kemikaalit voisivat olla varteenotettava vaihtoehto niille, sillä ne kykenevät indusoimaan angiogeneesiä ilman monia kasvutekijöiden ja geeniterapian riskejä ja ovat saatavilla edullisemmin (Zeng ym. 2015, Dashnyam ym. 2017).

## 4.1 Kasvatetun luukudoksen vaskularisaatio

Luukudosteknologiassa yksi suurimmista haasteista on riittävän verisuonituksen aikaansaaminen kudosteknologisessa implantissa (Dashnyam ym. 2017). Se on edellytys uuden kudoksen kasvulle (Dashnyam ym. 2017), minkä lisäksi verisuonisto myös mahdollisesti toimii mallina muodostuvalle luulle (Chai ym. 2018). Kudosteknologisten implanttien lisäksi verisuonituksen aikaansaaminen on tärkeää, kun kehitetään *in vitro* -luumalleja, joita voidaan käyttää esimerkiksi lääkkeiden vaikutuksia ja myrkyllisyyttä tutkiessa (Piroso ym. 2018). Sekä kudosteknologisissa implanteissa että *in vitro* -malleissa keskeisenä osana on biomateriaali, jonka pinnalla solut kasvavat. Materiaalin tulisi mahdollisimman hyvin edistää luukudoksen muodostusta (Dashnyam ym. 2017, Piroso ym. 2018). Verisuonitukseen liittyviä ongelmia onkin pyritty ratkaisemaan sisällyttämällä biomateriaaleihin angiogeenisiä kasvutekijöitä, jotka vapautuvat materiaalista solujen kasvuympäristöön (Dashnyam ym. 2017, Piroso ym. 2018). Myös kasvutekijöiden lisäämistä soluviljelymediaan on käytetty *in vitro* -malleissa, tai kun kudosteknologista implanttia on pyritty verisuonittamaan ennen implantaatiota (Piroso ym. 2018).

Kasvutekijöiden, kuten VEGF:n, käyttäminen angiogeneesin induktiossa on osoittautunut tehokkaaksi, mutta siihen liittyy myös monia haittapuolia, kuten korkea hinta, korkeiden pitoisuuksien mahdolliset haitat ja mahdollinen VEGF:n hajoaminen, kun se sisällytetään biomateriaaliin (Dashnyam ym. 2017). Tämän vuoksi muita keinoja edistää angiogeneesiä on myös pyritty kehittämään. Yhdeksi potentiaaliseksi vaihtoehdoksi ovat osoittautuneet epäorgaaniset ionit, sillä ne ovat halpoja, helposti saatavilla ja sisällytettävissä biomateriaaleihin; ne ovat lisäksi tehokkaita matalina pitoisuuksina (Dashnyam ym. 2017). Muun muassa pii- ja koboltti-ionien vaikutuksia on tutkittu kudosteknologisissa implanteissa (Dashnyam ym. 2017, Chai ym. 2018). Pii-ionit ovat hyvin varteenotettava vaihtoehto, sillä niitä voidaan sisällyttää moniin eri materiaaleihin eri määrinä, mikä mahdollistaa solujen ympäristöön syntyvän ionipitoisuuden optimoinnin (Dashnyam ym. 2017). Pii-ioneja vapauttaviin biomateriaaleihin sisältyy esimerkiksi biolaseja, kiteisiä keraameja ja komposiittimateriaaleja (Dashnyam ym. 2017). Piitä sisältävien biomateriaalien on näytetty edistävän

luunmuodostusta, sillä niiden pinnalle muodostuu luun mineraalirakennetta muistuttava hydroksoapatiittikerros, minkä lisäksi  $\text{Si}^{4+}$ -ionien on näytetty aktivoivan myös monia luunmuodostuksessa keskeisiä geenejä (Dashnyam ym. 2017). Tämä voi myös osaltaan edistää angiogeneesiä, sillä Runx2:lla (runt-related transcription factor 2), joka on luusolujen erilaistumisen kannalta keskeinen tekijä, on osoitettu olevan rooli VEGF:n ilmentymisessä luukudoksen kasvun aikana (Chai ym. 2018). Muiden angiogeneesiä indusoivien ionien yhteisvaikutukset  $\text{Si}^{4+}$ -ionien kanssa voivat myös mahdollisesti edistää angiogeneesiä. Esimerkiksi, kun kuparia lisättiin piitä sisältävään keraamiin, lisääntyi verisuonten muodostus jo pienemällä ionikonsentraatiolla, kun yksittäistä ionityyppiä käytettäessä (Dashnyam ym. 2017). *In vitro* -oloissa myös muiden angiogeneesiä indusoivien ionien lisääminen viljelymediaan voisi auttaa parantamaan verisuonten kasvua (Chai ym. 2018). Koboltti-ionit voisivat olla yksi potentiaalinen vaihtoehto, sillä matalien  $\text{Co}^{2+}$ -ionipitoisuuksissa osoitettiin lisäävän verisuonten muodostusta ja angiogeenisten tekijöiden ilmentymistä, kun endoteelisoluja viljeltiin biomateriaalilla (Chai ym. 2018).

## 4.2 Iskeemisen kudoksen vaskularisaatio

Diabetes on maailmanlaajuisesti yleinen sairaus, ja yksi sen oireista on verisuonten ahtautuminen ääreisverenkierrossa, mikä voi johtaa alaraajojen tukkivaan valtimotautiin (Jia & Sowers 2014). Alaraajojen tukkiva valtimotauti voi pahimmillaan johtaa vakavaan alaraajaiskemiaan, ja taudista aiheutuva kudosiskemia voi myös olla osatekijänä kroonisten diabeettisten jalkahaavojen synnyssä (Jia & Sowers 2014, Zeng ym. 2015, Polhemus ym. 2015). Kumpikin edellä mainituista tautitiloista voi johtaa alaraajan amputointiin ja pahimmillaan kuolemaan (Polhemus ym. 2015, Zeng ym. 2015). Toistaiseksi hyviä hoitokeinoja näitä vakavia tautitiloja vastaan ei ole, mutta uusien verisuontien muodostaminen iskeemiseen kudokseen angiogeneesiä aktivoimalla voisi olla yksi ratkaisu (Jia & Sowers 2014, Zeng ym. 2015). Koska angiogeenin edistäminen geeniterapian ja kasvutekijöiden avulla on kallista ja riskialtista, on kemikaalien avulla indusoitu angiogeneesi mahdollisesti paras vaihtoehto (Zeng ym. 2015). Angiogeneesiä indusovista kemikaaleista natriumnitraatti on potentiaalinen vaihtoehto tässä yhteydessä, sillä nitraatin tiedetään iskeemisissä oloissa pelkistyvän typpioksidiksi, ja kykenevän täten aktivoimaan angiogeenisiä kasvutekijöitä ja kudoksen uudelleen vaskularisoitumista (Jia & Sowers 2014, Yildirim ym. 2015). Typpioksidin ja sitä vapauttavien yhdisteiden on useissa tutkimuksissa näytetty lieventävän iskemiasta aiheutuvia haitallisia seurauksia, kun niitä on annettu ennen iskemian aiheutumista (Yildirim ym. 2015). Tämän lisäksi natriumnitraatin on diabeettisilla hiirillä tehdyssä kokeissa näytetty parantavan veren virtausta iskeemiseen takajalkaan, sekä lisäävän jalan angiogeneesiä NO-VEGF-välitteisesti (Jia & Sowers 2014).

Natriumnitraatin lisäksi myös Arnebin-1:tä voi mahdollisesti auttaa iskeemisen kudoksen uudelleen vaskularisaatiossa (Zeng ym. 2015). Yksi syy kroonisten diabeettisten jalkahaavojen synnylle on juuri iskemiasta johtuva, kudoksen riittämätön angiogeneesi (Zeng ym. 2015). Yksittäisten kasvutekijöiden käyttäminen hoitona on tehotonta, sillä diabeettisten jalkahaavojen kehittyminen on monimutkainen prosessi ja niiden paraneminen vaatii todennäköisesti monen angiogeenisen tekijän pitkäaikaista vaikutusta (Zeng ym. 2015). Arnebin-1 voisi tarjota tähän ratkaisun, sillä sen on näytetty aktivoivan monien eri angiogeenisten tekijöiden tuotantoa endoteelisoluissa (Zeng ym. 2015). Arnebin-1:n havaittiinkin merkittävästi edistävän haavojen sulkeutumista, kun sen vaikutuksia diabeettisten haavojen paranemiseen tutkittiin rotilla (Zeng ym. 2015). Rotilta kerätyillä haavakudosnäytteillä tehdyissä kokeissa osoitettiin, että arnebin-1:n haavanparanemista edistävät vaikutukset olivat seurausta aktivoituneesta angiogeenisistä (Zeng ym. 2015).

## 5. YHTEENVETO

Monet elinympäristössämme esiintyvät kemikaalit voivat indusoida angiogeneesiä jäljittelemällä hypoksisia olosuhteita, tuottamalla soluissa reaktiivisia happiradikaaleja tai aiheuttamalla tulehdusvasteen. Nämä tapahtumat johtavat joko lisääntyneeseen angiogeenisten kasvutekijöiden ekspresioon tai suoraan edistävät endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja putkenmuodostusta. Angiogeneesiä indusovia kemikaaleja ja niiden toimintamekanismeja on tutkittu suhteellisen vähän siihen nähden, että angiogeenisillä on keskeinen rooli sekä syövän synnyssä että kudosten regeneraatiossa. Kumpikin näistä prosesseista kuitenkin vaikuttaa merkittävästi elinajanodotteeseen populaatiotasolla. Olisikin pyrittävä mahdollisimman tehokkaaseen angiogeneesiä indusovien kemikaalien ja niiden vaikutusmekanismien tunnistamiseen, jotta pystyttäisiin tunnistamaan karsinogeenisiä aineita ja yhdisteitä sekä kehittämään uusia ratkaisuja lääketieteellisiin sovelluksiin. Yhtenä ratkaisuna tähän voisi olla parempien, ihmisolupohjaisten, *in vitro* -menetelmien kehittäminen epägenotoksisten karsinogeenien tunnistamiseen. Tällöin kemikaalien epägenotoksista karsinogeenisyyttä voitaisiin tutkia tehokkaammin ja järjestelmällisemmin, jolloin myös angiogeneesiä indusovia kemikaaleja tunnistettaisiin varmasti enemmän.

## 6. LÄHTEET

Al Tameemi W, Dale T.P., Al-Jumaily R., ym. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2019;7.

Alleva R, Borghi B., Santarelli L., ym. In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. *Toxicology in Vitro* 2011;25(1):286–293.

Andersson H & Brittebo E. Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Archives of Toxicology* 2012;86(3):465–474.

Betz C, Lenard A., Belting H., ym. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development (Cambridge, England)* 2016;143(13):2249–2260.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438(7070):932–936.

Chai YC, Mendes L.F., van Gastel N., ym. Fine-tuning pro-angiogenic effects of cobalt for simultaneous enhancement of vascular endothelial growth factor secretion and implant neovascularization. *Acta Biomaterialia* 2018;72:447–460.

Chung A.S. & Ferrara N. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011;27(1):563–584.

Dashnyam K, El-Fiqi A., Buitrago J.O., ym. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *Journal of Tissue Engineering* 2017;8.

Holmes D.I.R. & Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 2005;6(2):209.

Hord N.G., Tang Y. & Bryan N.S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2009;90(1):1.

Hu Z, Brooks S.A., Dormoy V., ym. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: focus on the cancer hallmark of tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 2015;36 Suppl 1(Suppl 1):184–202.

Jacobs M.N., Colacci A., Louekari K., ym. International regulatory needs for development of an IATA for non-genotoxic carcinogenic chemical substances. *Altex* 2016;33(4):359–392.

Jia G & Sowers J.R. New Thoughts in an Old Player: Role of Nitrite in the Treatment of Ischemic Revascularization. *Diabetes* 2014;63(1):39–41.

Kim J, Lim W., Ko Y., ym. The effects of cadmium on VEGF-mediated angiogenesis in HUVECs. *Journal of Applied Toxicology* 2012;32(5):342–349.

Kim Y & Byzova T.V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 2014;123(5):625.

Krock B.L., Skuli N. & Simon M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & Cancer* 2011;2(12):1117.

Kumar D, Branch B.G., Pattillo C.B., ym. Chronic Sodium Nitrite Therapy Augments Ischemia-Induced Angiogenesis and Arteriogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(21):7540–7545.

Kuwano M, Fukushi J., Okamoto M., ym. *Angiogenesis Factors*. 2001;40.

Lugano R, Ramachandran M. & Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences (Cmls)* 2019.

Mentzer S & Konerding M. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis* 2014;17(3):499–509.

Pirosa A, Gottardi R., Alexander P.G., ym. Engineering in-vitro stem cell-based vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology. *Stem Cell Research & Therapy* 2018;9(1):1–23.

Polhemus DJ, Bradley J.M., Islam K.N., ym. Therapeutic potential of sustained-release sodium nitrite for critical limb ischemia in the setting of metabolic syndrome. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2015;309(1):82.

Potente M, Gerhardt H. & Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 2011;146(6):873–887.

Saghiri M.A., Asatourian A., Orangi J., ym. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis—Part I: N, Fe, Se, P, Au, and Ca. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 2015a;96(1):129–142.

Saghiri M.A., Asatourian A., Orangi J., ym. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis—Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 2015b;96(1):143–155.

Saghiri M.A., Orangi J., Asatourian A., ym. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016;98:290.

Shen K, Ji L., Gong C., ym. Notoginsenoside Ft1 promotes angiogenesis via HIF-1 $\alpha$  mediated VEGF secretion and the regulation of PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK signaling pathways. *Biochemical Pharmacology* 2012;84(6):784–792.

Siemann D.W. & Horsman M.R. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2015;153:107.

Tahergorabi Z & Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2012;15(6):1110–1126.

Uccelli A, Wolff T., Valente P., ym. Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Medical Weekly* 2019;149(3-4):w20011.



Ucuzian AA, Gassman A.A., East A.T., ym. Molecular Mediators of Angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research : Official Publication of the American Burn Association* 2010;31(1):158–175.

Wilde E, Chapman K., Stannard L., ym. A novel, integrated in vitro carcinogenicity test to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens using human lymphoblastoid cells. *Archives of Toxicology* 2018;92(2):935–951.

Xu X, Kherada N., Hong X., ym. Diesel exhaust exposure induces angiogenesis. *Toxicology Letters* 2009;191(1):57–68.

Yesildal F, Aydin F., Deveci S., ym. Aspartame induces angiogenesis in vitro and in vivo models. *Human & Experimental Toxicology* 2015;34(3):260–265.

Yildirim V, Doganci S., Yesildal F., ym. Sodium nitrite provides angiogenic and proliferative effects in vivo and in vitro. *Medical Science Monitor Basic Research* 2015;21:41.

Zeng Z, Huang W., Gao Q., ym. Arnebin-1 promotes angiogenesis by inducing eNOS, VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression through the PI3K-dependent pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 2015;36(3):685.

Zhang E, Bo G., Shi H., ym. 20(S)-Protopanaxadiol enhances angiogenesis via HIF-1 $\alpha$ -mediated VEGF secretion by activating p70S6 kinase and benefits wound healing in genetically diabetic mice. *Experimental & Molecular Medicine* 2017;49(10):387.

Zhang Y, Hu G., Li S., ym. Pro-angiogenic activity of astragaloside IV in HUVECs in vitro and zebrafish in vivo. *Molecular Medicine Reports* 2012;5(3):805.