

Rola angiogenezy w rozwoju nowotworów

Angiogenesis in neoplastic processes

Paweł Sadłecki, Małgorzata Walentowicz-Sadłecka, Marek Grabiec

Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;

kierownik Katedry i Kliniki: dr hab. med. Marek Grabiec, prof. UMK

Przeгляд Menopauzalny 2010; 1: 28–31

Streszczenie

Angiogeneza odgrywa bardzo istotną rolę w przebiegu procesów nowotworowych zarówno łagodnych, jak i złośliwych. W początkowych fazach procesu nowotworowego guzy zbudowane są ze skupisk komórek nieprzekraczających 1–2 mm³ i pozbawionych naczyń krwionośnych. Substancje odżywcze, czynniki wzrostu oraz tlen dostarczane są głównie w wyniku dyfuzji. W takim stanie nowotwór może pozostawać przez długi czas. Dalszy rozwój guza wiąże się z wykształceniem naczyń krwionośnych umożliwiającymi wzrost, naciekanie tkanek oraz powstawanie przerzutów.

Słowa kluczowe: angiogeneza, nowotwory, czynniki proangiogenne

Summary

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from existing vasculature, is a complex multi-step process initiated by the secretion and action of soluble angiogenic factors. Thus degradation of extracellular matrix proteins and activation, proliferation, migration and organization into tubular structures of vascular endothelial cells and pericytes takes place. Formation of new blood vessels plays a key role in physiological processes involving neovascularization, such as ovulation, placentation and embryogenesis. Moreover, angiogenesis is crucial for benign and malignant neoplastic processes. Invasive cancer growth occurs as a result of formation of blood vessels within a tumour that enable its growth, infiltration of tissues and genesis of metastases.

Key words: angiogenesis, neoplasms, pro-angiogenic factors

Angiogeneza

Angiogeneza jest procesem polegającym na tworzeniu nowych kapilar na bazie istniejących naczyń krwionośnych. Może on występować zarówno podczas rozwoju embrionalnego, jak i u osób dorosłych. Angiogenezę należy odróżnić od waskulogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych wyłącznie podczas embriogenezy. Podczas waskulogenezy komórki śródbłonka powstają z komórek prekursorowych – angioblastów [1]. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest podstawowym procesem fizjologicznym umożliwiającym prawidłowy rozwój zarodka i łożyska, a także wzrost płodu i noworodka [2]. Angiogeneza umożliwia prawidłowy przebieg procesów naprawczych, takich jak gojenie ran oraz złamań.

W żeńskim układzie rozrodczym angiogeneza odgrywa szczególną rolę podczas dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, ciała żółtego, a także przemian endometrium w trakcie cyklu miesięczkowego [3]. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych pełni również istotną funkcję w wielu stanach patologicznych, takich jak: choroba niedokrwienna serca, przerost komór serca, toczeń rumieniowaty układowy oraz łuszczyca [4]. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych zaobserwowano także w przebiegu przewlekłych procesów zapalnych wśierdza, rogówki, reumatoidalnego zapalenia stawów oraz retinopatii cukrzycowej [5]. Angiogeneza odgrywa bardzo ważną rolę w przebiegu procesów nowotworowych zarówno łagodnych, jak i złośliwych. Inwazyjny wzrost nowotworu jest związany z pojawieniem się w guzie naczyń krwionośnych.

Adres do korespondencji:

dr med. **Paweł Sadłecki**, Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz, e-mail: pawelsadlecki@wp.pl

Powstawanie naczyń poprawia utlenianie komórek guza i ułatwia zaopatrywanie w substancje niezbędne do ich rozplemu [5].

Mechanizmy powstawania naczyń krwionośnych

Proces powstawania nowych naczyń krwionośnych na drodze angiogenezy składa się z następujących etapów:

1. Zwiększenia aktywności metaloproteinaz (kollagenaz, żelatynaz i stromelizyn) znajdujących się w formie nieaktywnych proenzymów w macierzy pozakomórkowej oraz błonie podstawnej. Najczęściej sygnałami inicjującymi są cytokiny oraz inne czynniki wzrostu stymulujące wydzielanie aktywatorów plazminogenu (urokinazy lub tkankowego aktywatora plazminogenu) [6]. Powstająca z plazminogenu proteaza zwana plazminą odsłania centra aktywne metaloproteinaz, które rozpoczynają degradację kolagenu, laminin i proteoglikanów będących podstawowymi składnikami błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej [7]. Na tym etapie dochodzi do odsłonięcia ściany naczyń, rozluźnienia struktury macierzy pozakomórkowej oraz stworzenia przestrzeni dla nowych naczyń krwionośnych [7].
2. Działania czynników proangiogennych zwiększających aktywność komórek śródbłonka oraz integrin, a także powodujących zmiany w szkielecie komórkowym. Rozluźnienie zwartej struktury macierzy pozakomórkowej ułatwia migrację komórek śródbłonka w kierunku źródła sygnałów mitogennych [8].
3. Proliferacji oraz różnicowania komórek śródbłonka. Migrujące komórki śródbłonka dzięki wzajemnym oddziaływaniom oraz właściwościom adhezyjnym do białek macierzy pozakomórkowej odtwarzają przestrzenną strukturę naczyń krwionośnych [7].
4. Dojrzwienia powstałych naczyń krwionośnych. Sieć naczyniowa dojrzeje w wyniku procesów obejmujących: zahamowanie proliferacji, rekonstrukcję błony

podstawnej oraz formowanie złożonych połączeń pomiędzy naczyniami. Nowo powstałe naczynia rekrutują także komórki okołosródbłonkowe: pericyty i komórki mięśni gładkich, spełniające funkcje podporowe [8].

Czynniki stymulujące angiogenezę

Dotychczas poznano ok. 30 czynników o działaniu stymulującym angiogenezę. Poza bezpośrednim wpływem na poszczególne etapy angiogenezy czynniki te mogą pobudzać ekspresję innych substancji proangiogennych lub aktywować je dzięki właściwościom proteolitycznym [9].

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

W 1983 r. Senger po raz pierwszy wyizolował i opisał czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń ok. 50 000 razy mocniej od histaminy [10]. Dalsze badania wykazały, że czynnik ten jest również silnym i wysoce selektywnym mitogenem stymulującym komórki śródbłonka naczyniowego [6]. Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) jest zasadową homodimeryczną glikoproteiną o masie 45 kD, która wiąże się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek śródbłonka. Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego istnieje w postaci co najmniej pięciu izoform: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E, PLGF biorą udział w tworzeniu naczyń krwionośnych, natomiast VEGF-C i VEGF-D naczyń limfatycznych. Czynniki te są wiązane przez trzy różne receptory: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 odgrywają rolę w angiogenezie i waskulogenezie, natomiast VEGFR-3 w powstawaniu naczyń limfatycznych [11]. Ekspresja genu kodującego VEGF jest regulowana przez wiele różnych czynników. Główną rolę w regulacji transkrypcji genu VEGF odgrywa czynnik HIF-1. Przy prawidłowej ilości tlenu w tkankach czynnik HIF-1 jest nieaktywny, ponieważ

Tab. I. Wybrane czynniki proangiogenne i ich działanie na komórki śródbłonka naczyniowego

		Działanie na komórki śródbłonka		
		proliferaacja	migracja	różnicowanie
czynniki wzrostu wiążące heparynę	VEGF	+	+	+
	b-FGF	+	+	+
czynniki wzrostu niewiążące heparyny	TGF- α	+	+	+
	TGF- β 1	-	-	+
	EGF	+	+	+
mediatory stanu zapalnego	IL-8	+	+	?
czynniki hematopoetyczne	G-CSF	+	+	?

(+) pobudzanie; (-) hamowanie

jeden z jego składników, HIF-1 α , podlega hydroksylacji. Po przyłączeniu białka VHL (białka von Hippel-Lindau) i ubikwitynacji czynnik ten ulega degradacji. W warunkach beztlenowych HIF-1 α nie jest degradowany i po połączeniu z podjednostką HIF-1 β tworzy aktywną formę czynnika transkrypcyjnego. W warunkach niedotlenienia w guzach nowotworowych gen kodujący VEGF jest indukowany głównie przez czynnik transkrypcyjny HIF-1. Częste mutacje supresorowego genu *VHL* w komórkach nowotworowych powodują powstawanie zmutowanego białka VHL, które nie wiąże się z podjednostką HIF-1 α , co powoduje, że również przy prawidłowej ilości tlenu gen *VEGF* jest konstytutywnie aktywny [8]. Poza niedoborem tlenu wpływ na transkrypcję genów *VEGF* ma także: hipoglikemia, czynniki wzrostu, cytokiny prozapalne, niektóre prostaglandyny i hormony, a także zmutowane onkogeny oraz geny supresorowe [11].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

W 1974 r. odkryto czynnik mający mitogenne działanie na kolonie fibroblastów (FGF) [12]. W latach 80. ub. wieku opracowano metody izolowania protein proangiogennych w oparciu o ich wysokie powinowactwo do heparyny. Doprowadziło to do identyfikacji dużej rodziny związków, określanych jako czynniki wzrostu fibroblastów. Wyróżnia się kilka rodzajów FGF: a-FGF, b-FGF, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10. Gen dla b-FGF znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 4. Większość form FGF wykazuje silne powinowactwo do heparyny. Masa cząsteczkowa poszczególnych form wynosi 18–30 kDa [9]. Czynnik ten może wiązać się z czterema receptorami należącymi do kinaz tyrozynowych: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 i FGFR-4, powodując aktywność mitotyczną różnych typów komórek [13]. Cytokiny te uczestniczą w procesach fizjologicznych, takich jak: proliferacja i różnicowanie osteoblastów, chondrocytów, komórek mięśni gładkich i poprzecznie prążkowanych, wzrost i różnicowanie komórek embrionalnych, hematopoeza oraz regeneracja tkanki nerwowej [13]. Wykazano także, że FGF ma działanie angiogenne w rozwoju nowotworów poprzez stymulację niekontrolowanej i patologicznej angiogenezy. W powstawaniu naczyń największe znaczenie przypisuje się b-FGF, który jest zaliczany do silnych stymulatorów angiogenezy. Aktywacja receptorów FGFR-1 i FGFR-2 przez a-FGF, b-FGF i FGF4 stymuluje proliferację komórek śródbłonna [14]. Czynniki a-FGF, b-FGF, FGF-8b i FGF-10 wpływają również na migrację komórek śródbłonna [14]. Z kolei a-FGF, b-FGF i FGF4 stymulują syntezę uPA oraz metaloproteinaz degradujących kolagen typu IV, będący podstawowym składnikiem błony podstawnej naczyń krwionośnych [15]. Czynnik b-FGF stymuluje także proliferację i migrację fibroblastów [13] oraz indukuje syntezę fibronektyny, kolagenu, proteoglikanów i kwasu hialuronowego, które odgrywają istotną rolę w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych [15]. b-FGF wpływa także na ekspresję integryn i kadheryn,

niezbędnych w powstawaniu naczyń krwionośnych [16]. Stwierdzono również, że FGF wykazuje działanie synergistyczne z VEGF w procesie tworzenia naczyń zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* [17].

Angiogeneza nowotworowa

W początkowych fazach procesu nowotworowego guzy są zbudowane ze skupisk komórek nieprzekraczających 1–2 mm³, pozbawionych naczyń krwionośnych (tzw. raki *in situ*). Tlen, substancje odżywcze oraz czynniki wzrostu dostarczane są głównie w wyniku dyfuzji. W takim stanie nowotwór może pozostawać przez długi czas [8]. Dalszy rozwój guza wiąże się z wykształceniem naczyń krwionośnych, umożliwiającym wzrost, naciekanie tkanek oraz powstawanie przerzutów [18]. Indukcja angiogenezy nowotworowej przebiega na drodze dwóch mechanizmów:

1. W warunkach niedotlenienia w tkankach dochodzi do syntezy HIF-1, który przyłączając się do regionu promotora genu *VEGF*, powoduje aktywację transkrypcji oraz syntezę produktu białkowego genu [19]. Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego stymuluje migrację oraz podziały komórek śródbłonna naczyniowego [20].
2. W wyniku mutacji genów supresorowych oraz onkogenów dochodzi do wytworzenia tzw. fenotypu angiogenego. Jest to stan, w którym komórki nowotworowe w stały i konstytutywny sposób wydzielają czynniki stymulujące angiogenezę przy jednoczesnym hamowaniu aktywności genów kodujących inhibitory angiogenezy [8].

Najlepiej poznanym przykładem związków pomiędzy onkogenami i ich produktami białkowymi a genami kodującymi czynniki proangiogenne i inhibitory angiogenezy jest mutacja genu supresorowego *p53*, odpowiedzialna za rozwój wielu nowotworów. Wykazano, że gen *p53* kontroluje transkrypcję genów, syntezę i naprawę DNA, a także uczestniczy w apoptozie, inwazji oraz powstawaniu przerzutów [8]. W ponad 72% przypadków zaawansowanego raka jajnika gen *p53* ulega mutacji i jest to czynnik prognostyczny związany ze złym rokowaniem [21]. Produkt zmutowanego genu *p53* powoduje aktywację genu *VEGF* oraz hamowanie genu trombospondyny 1, która jest silnym inhibitorem angiogenezy [21]. Podobne zależności udowodniono pomiędzy innymi onkogenami a cytokinami i czynnikiem wzrostu biorącymi udział w angiogenezie – najważniejsze z nich przedstawiono w tab. II i III [22].

Nowo powstałe naczynia guzów nowotworowych różnią się zdecydowanie od naczyń prawidłowych. Komórki śródbłonna naczyń nowotworowych dzielą się ok. 50–200 razy intensywniej niż komórki śródbłonna naczyń prawidłowych. Komórki śródbłonna mają nieregularne kształty oraz liczne wypustki wchodzące do światła naczynia [23]. Stwierdzono rozluźnienie połączeń pomiędzy komórkami śródbłonna, a także komórkami śródbłonna i pericytami. Prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności naczyń, co wpływa na wzrost ciśnienia śródmiąższowego w guzach

Tab. II. Najważniejsze onkogeny aktywujące angiogenezę poprzez zwiększenie ekspresji czynników proangiogennych

Nazwa onkogeny	Działanie wywołane przez jego aktywację
onkogeny grupy ras	stymuluje VEGF
onkogeny grupy ras: K-ras, H-ras	stymulują VEGF, TGF- α , TGF- β
HER 2	stymuluje VEGF
EGFR	stymuluje VEGF, b-FGF, IL-8
PTTG1	stymuluje VEGF i b-FGF
HPV-16	stymuluje VEGF i IFN- α
v-src	stymuluje VEGF

Tab. III. Najważniejsze onkogeny aktywujące angiogenezę poprzez zmniejszenie ekspresji inhibitorów angiogenezę

Nazwa onkogeny	Wpływ na inhibitory angiogenezę
onkogeny grupy ras	hamują trombospondynę 1
c-myc	hamują trombospondynę 2
v-src	hamują trombospondynę 1
Py MT	hamują trombospondynę 1

nowotworowych [24]. Również skład błony podstawnej naczyń nowotworowych różni się od składu błony otaczającej naczynia prawidłowe. W błonie podstawnej naczyń nowotworowych występuje więcej kwasu hialuronowego, a mniej proteoglikanu heparano-siarczanowego [25]. W komórkach śródbłonna naczyń nowotworowych występuje białko – endogлина, którego nie stwierdza się w śródbłonku prawidłowym. Jest to proteoglikan biorący udział w wiązaniu transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) [26]. W naczyniach nowotworowych występuje zwiększona ilość perlekanu, jednego z proteoglikanów ułatwiających wiązanie b-FGF ze swoistym receptorem śródbłonkowym [27]. Naczynia nowotworowe charakteryzują się chaotyczną architekturą, nieregularnym i krętym przebiegiem, licznymi przetokami tętniczo-żylnymi oraz ślepymi zakończeniami. Wiele danych wskazuje, że naczynia nowotworowe nie dostarczają komórkom nowotworowym wystarczającej ilości tlenu [28]. W warstwach komórek nowotworowych bardziej oddalonych od naczyń często występuje niedotlenienie oraz martwica [8]. Niedotlenienie wiąże się ze zmianą metabolizmu komórek, prowadząc do stopniowego zakwaszenia „mikrośrodowiska”. W takich warunkach dochodzi do selekcji komórek, w których zniesione zostały funkcje apoptozy [29]. Niskie pH może sprzyjać mobilności i inwazyjności komórek nowotworowych, a także hamować penetrację oraz aktywność komórek układu immunologicznego [28].

Piśmiennictwo

- Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 586-603.
- Reisinger K, Baal N, McKinnon T, et al. The gonadotropins: tissue specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 65-80.
- Hazzard TM, Stouffer RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 883-900.
- Sasano H, Suzuki T. Pathological evaluation of angiogenesis in human tumor. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: S334-6.
- Weston GC, Cattrall F, Lederman F, et al. Differences between the premenopausal and post-menopausal uterine fibroid vasculature. *Maturitas* 2005; 51: 343-8.
- Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, et al. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39: 212-20.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-44.
- Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 53-61.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 253-70.
- Senger DL, Galli SJ, Dvorak AM. Tumors cells secrete vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-5.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
- Koch AE, Poverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-801.
- Presta M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 159-78.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 201-7.
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, et al. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-77.
- Underwood PA, Bean PA, Gamble JR. Rate of endothelial expansion is controlled by cell: cell adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 55-69.
- Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 1073-85.
- Hefler LA, Zeillinger R, Grimm C, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 512-7.
- Folkman J. Fundamental Concepts of the Angiogenic Process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-51.
- Mazure NM, Chen EY, Yeh P, et al. Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 1996; 56: 3436-40.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
- Anttila MA, Ji H, Jugola MT, et al. The prognostic significance of p53 expression quantitated by computerized image analysis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 42-51.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-4.
- Rak JW, Filmus J, Finkenzeller G, et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 263-77.
- Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162: 1747-57.
- McDonald DM, Bulak P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5381-5.
- Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: S340-3.
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumors – what is it not for? *J Pathol* 2003; 201: 173-80.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.