

Angiogeneza w nowotworach złośliwych, strategie antyangiogenne i niszczenia naczyń krwionośnych

ZYGMUNT CYGAN, WIESŁAW CYGAN*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

*Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Kardynała Stefana Wyszyńskiego, al. Kraśnicka 100, 20-718 Lublin

Cygan Z., Cygan W.

Angiogenesis in cancer, antiangiogenic strategies and destruction of blood vessels

Summary

The neoplastic transformation of a cell can initiate mutations, mainly in suppressor gene p53 and in the protooncogenes (e.g. ras, src, raf). Angiogenesis simultaneously facilitates the uncontrolled growth of primary tumors and the formation of metastases. Not only numerous proangiogenic factors (for example, VEGF, FGF, PDGF) participate in this process of neovascularisation, but also enzymes of the extracellular matrix MMPs, unbalanced by inhibitory factors (e.g. endostatin, angiostatin, MMPs inhibitors, trombospondins) in conditions of staggered environmental homeostasis. Therapeutic strategies of antiangiogenic therapy (the tumor is not the target) and strategies of the destruction of preexisting blood vessels in solid tumors (e.g. by gene therapy, hyperthermia, photosensitization) are presented against this background. Numerous advantages of antiangiogenic therapy and the destruction of blood vessels are also discussed together with the evaluation of their possible limitations.

Keywords: cancer, angiogenesis

Transformację nowotworową komórki inicjują aberracje chromosomalne, nadto mutacje zachodzące w genach supresorowych (7, 19) oraz protoonkogenach (19, 25), ale klinicznie uchwytna zmiana (*carcinoma in situ*) pozostaje długo, przez całe często lata w stanie uśpionym (quiescent state). Impulsem stymulującym w niej proliferację komórek jest rozwój angiogenezy (1, 22, 26). Warunkuje ona wzrost guzów pierwotnych i powstawanie przerzutów (10, 12, 21). Dotyczy to takich złośliwych nowotworów, jak: rak sutka, prostaty i płuc, a także jajnika, trzustki oraz okrężnicy (10, 22, 34). Dlatego hamowanie angiogenezy i niszczenie sieci naczyń krwionośnych w guzach stały się podstawą opracowywanych, jednych z najnowszych strategii przeciwrakowych (4, 10, 11, 26). Przybliżenie tych aktualnych, interdyscyplinarnych dokonań naukowych, dotychczas nie przedstawianych w piśmiennictwie weterynaryjnym w zwartej tematycznie konwencji, a poruszonych jedynie w wielowątkowym opracowaniu monograficznym (19), stanowi myśl przewodnią niniejszego artykułu.

Angiogeneza

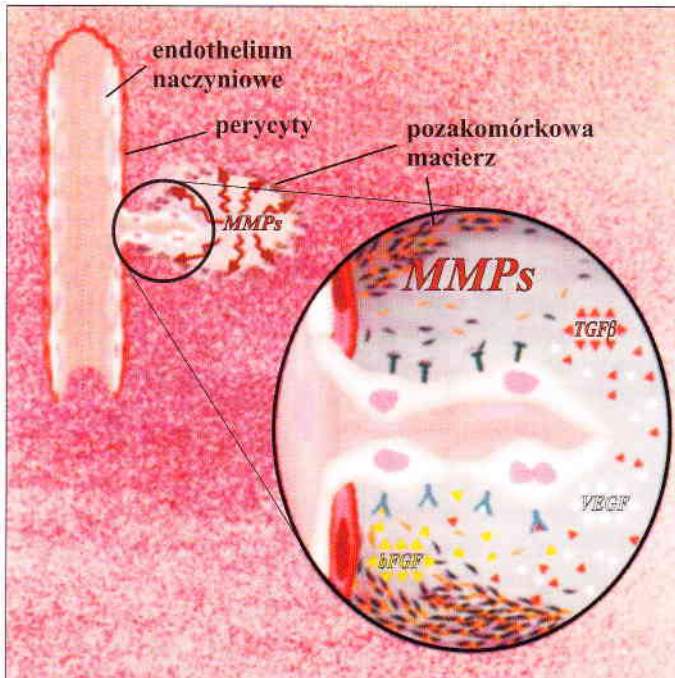
Imperatywem osiągnięcia przez lite guzy (rak, mięsak) rozmiarów przekraczających 2-3 mm (10^6 komórek) jest powstawanie *de novo* w ich tkankach naczyń krwionośnych (1), drogą rozgałęzień i wypustek (23) z istniejących w sąsiedztwie sieci kapilar w procesie

Tab. 1. Niektóre czynniki regulujące angiogenezę

Czynniki stymulujące (proangiogenne)	Czynniki hamujące (antyangiogenne)
Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)	Angiostatyna
Zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu (bFGF)	Endostatyna
Transformujący czynnik wzrostu (TGF β)	Inhibitor metaloproteaz macierzy pozakomórkowej (MMPs)
Płytkowy czynnik wzrostu śródbłonka (PDGF)	Trombospondyny
Angiogenina (ANG)	Interferon (INF α)

określanym angiogenezą. Jej zaistnienie zapoczątkowuje niestabilność genetyczna komórek nowotworowych (mutacje genu supresorowego p53, onkogenów ras, src, raf, cyt. 25, 26), nadto zachwianie równowagi regulowanej wpływem czynników stymulujących i hamujących rozwój unaczynienia (tab. 1), ostatecznie doprowadzających do zmniejszenia oddziaływań inhibicyjnych (m.in. trombospondyn, angiostatyny, cyt. 35).

Angiogenezę uruchamia kaskada niezwykle złożonych, molekularnych interakcji zachodzących pomiędzy stransformowanymi komórkami nowotworowymi a śródbłonkiem naczyniowym w łączności z przebudowywanym jednocześnie łącznotkankowym podście-



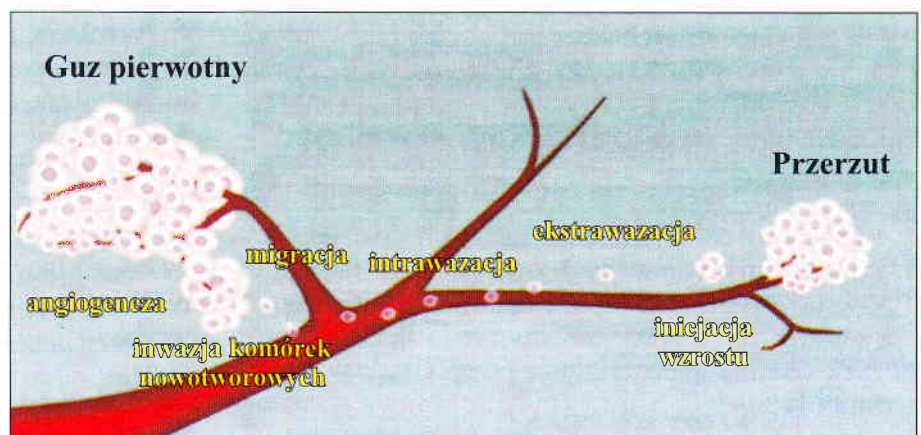
Ryc. 1. Angiogeneza (cyt. wg 26)

liskiem (19, 24), którego istotę stanowi macierz pozakomórkowa (extracellular matrix, ECM). Impuls wywołany niedotlenowaniem drzemiącej zmiany nowotworowej (dormant state) inicjuje uwalnianie przez komórki nowotworowe i nacieki zapalne guzów (16, 22, 26) proangiogennych czynników wzrostowych (12), głównie VEGF, bFGF i $TGF\beta$ (ryc. 1). Molekuły VEGF oraz bFGF specyficznie wiążą się z receptorami na powierzchni endothelium (Y) indukując – po zmianie ekspresji adhezyjnych integrzyn (receptory T) – proliferację komórek śródbłonna i sekrecję własnych, proteolitycznych metaloproteaz MMPs (matrix metalloproteinases). Stanowią one zespół enzymów (kolegenazy, żelatynazy, stromelizyny, cyt. 19) rozluźniających – łącznie z MMPs macierzy pozakomórkowej (ECM) – zwartą jej cytoarchitekturę, co umożliwia ukierunkowaną migrację komórek śródbłonna. Ich wzajemne kontakty w tak uformowanym mikrośrodku warunkują rekonstrukcję powstających naczyń umocowanych w ECM przez adhezyny (integryny, kadheryny). W końcu ekspresja $TGF\beta$ i PDEGF zapewnia stabilizację tych kapilar obudowywanych przez mięśnie gładkie i perycyty, a scalanych wydzielanym siarczanem chondroityny (24, 26). Jest to jednak proces niedokładny, wręcz chaotyczny, gdyż naczynia krwionośne wykazują szereg strukturalnych wad i funkcjonalnych zaburzeń (nieszczelność ściany, ślepe zakończenia, nadmierna krętość, przejściowa niedrożność, zwolniony przepływ, cyt. 3, 7).

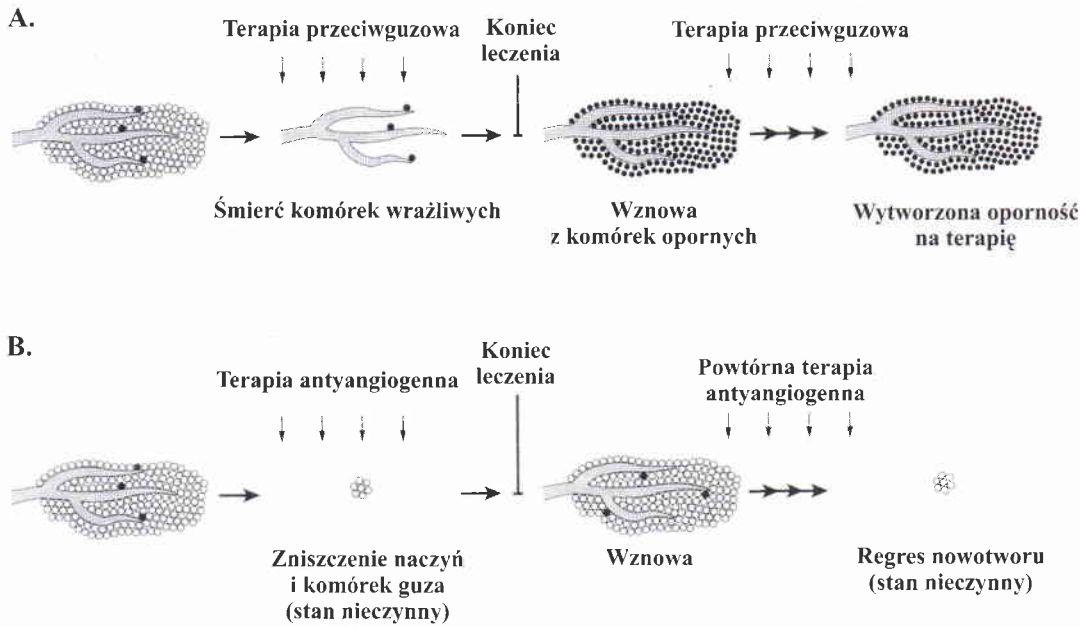
Angiogeneza w nowotworach jest bardzo niekorzystnym procesem (12,

22). Wydłużenie bowiem kapilar o 1 mm stwarza szansę dla wzrostu 10 000 nowych komórek nowotworowych, a duża proliferacja i tworzenie przerzutów cechuje letalny fenotyp guza (lethal cancer phenotype, cyt. 7, 28). Przy sprawnej odporności i homeostazie (22) większość powstałych komórek co prawda ginie (przeżywa ok. 1%), ale pozostałe – w warunkach możliwej ich autonomizacji – mogą kontynuować dalszy rozwój i wieść byt niezależny (26). Progresję nowotworową w zasadniczym stopniu umożliwiają metaloproteazy pozakomórkowej macierzy, które, degradując błonę podstawną kapilar (6, 26), zapewniają wnikanie komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych (intrawazacja) i późniejsze ich opuszczenie (ekstrawazacja) z następowym tworzeniem przerzutów (ryc. 2). Pobudza ich powstanie zatorowość agregujących komórek (ułatwiona ekstrawazacja) i możliwość zakotwiczenia (wpływ integrzyn, kadheryn) w nowo ukształtowanym miejscu (oddziaływanie metaloproteaz), w końcu indukcja w nim angiogenezy (6).

Gęstość kapilar w guzach litych jest wskaźnikiem prognozującym inwazyjny przebieg choroby nowotworowej z przerzutami (11, 32). Jednocześnie zakłócony przepływ krwi w naczyniach – wskutek nienormalnej ich budowy – nie nadąża z zaopatrywaniem w O_2 i składniki odżywcze mnożących się komórek nowotworowych (9), z których część ulega niedotlenowaniu (hipoksji), nawet martwicy (16). Włączona w tych warunkach angiogeneza (teoria przełącznika, switch theory) staje się siłą napędzającą proliferację komórek nowotworowych, w dodatku uzyskujących coraz większą autonomizację, nadto oporność na konwencjonalne metody chemio/radioterapeutyczne (7, 11, 22). Stąd inspirowane nowe rozwiązania proponują leczenie genami supresorowymi, hamowaniem onkogenów oligonukleotydami antysensowymi i indukcją apoptozy (8, 14, 21, 30), nadto promują chemioprotekcję oraz immunoterapię z użyciem interleukin (IL-2, IL-15, cyt. 18), interferonu α (15), jak również genetycznie zmodyfikowanych szczepionek nowotworowych (14, 36). Celem z kolei innych strategii stają się receptory cytokin i przekazu sygnału, a także czynniki transkrypcyjne oraz proteasomy komórek (13). Roz-



Ryc. 2. Etapy powstawania przerzutu nowotworowego (cyt. wg 26)



Ryc. 3. Terapia przeciweguzowa (A) i antyangioterapia (B), cyt. wg 3

waża się również przeciwdziałanie mutacjom zachodzącym w procesie kancerogenezy prowadzącym do wytworzenia fenotypu mutatorowego (mutator phenotype, cyt. 17). W kontekście powyższych przedsięwzięć szczególne nadzieje wiąże się ze strategią antyangiogenną i niszczeniem naczyń krwionośnych w nowotworach złośliwych.

Strategie antyangiogenne

Zakładanym w tej strategii celem nie jest bezpośrednio guz (tumor is not the target), ale sam mechanizm nowotworzenia naczyń krwionośnych (37). Ingerencje weń wymierzone dotyczą głównie hamowania proliferacji komórek śródbłonna (endostatyna, angiostatyna, bevacizumab), rekonstrukcji kapilar (przeciwciała przeciwko integrynie α , β) i ich migracji (m.in. winblastyna), poza tym blokowania enzymów MMPs, zatem przeciwdziałania destabilizacji błony podstawnej oraz pozakomórkowej macierzy (naturalny inhibitor – neovastat, syntetyk – marimastat). Co więcej, systematycznie wciąż przybywa doniesień o wykrywaniu nowych inhibitorów angiogenezy (m.in. FR-118487, TNP-470, BSM-275291) powodujących – w modelowych doświadczeniach – recesję guzów pierwotnych i ich przerzutów (20, 31, 32). Niektóre z tych czynników – otrzymanych syntetycznie – znajdują się w fazie badań klinicznych (przykładem TNP-470, cyt. 37).

Strategie niszczenia naczyń krwionośnych

Wytyczony cel tej koncepcji stanowi swoiste niszczenie naczyń krwionośnych guza (vascular targeting) z powstawaniem zakrzepów, nadto martwicy komórek z następującą regresją nowotworu (30). Dalsze propozycje obejmują spowalnianie przepływu krwi hipertermią (41,5-43°C) i fotouczulanie wyzwalaające zabójcze nadtlenki (terapia fotodynamiczna), nadto oddziaływanie związanych z czynnikiem prozakrzepo-

wym przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonna (30) oraz zwiększenie ich destrukcji cytostatykiem obudowanym kationowym liposomem (27).

Fenotyp angiogeny nowotworu (angiogenic phenotype) generuje klony opornych na apoptozę komórek (29), a spotykane obszary hipoksji w guzach litych (rak, mięsak) stymulują wielolekową oporność regulowaną genem MDR1 (5), co odpowiada *inter alia* za niepowodzenie terapii tak złośliwych

nowotworów, jak rak sutka i jajnika (5). Strategie antyangiogenne i niszczenia naczyń krwionośnych ograniczają możliwość powyższych onkologicznych niepowodzeń, co ilustruje ryc. 3 (wznowy z niewrażliwych komórek w terapii przeciweguzowej – A i utrwalana recesja guza uzyskana leczeniem antyangiogennym – B).

Atrakcyjność powyższych strategii przeciwrakowych wynika ze stabilności celu, jaki stanowi endothelium naczyniowe. Dalszym walorem antyangiogenezy jest jej niewielka toksyczność, a także stała wrażliwość naczyń krwionośnych – na ten rodzaj leczenia – niezależnie od rodzaju guza (30). Natomiast pewnym mankamentem jest możliwość selekcjonowania niedotlenowanych komórek i występująca wtedy ich niepożądana adaptacja wyrażana naciekającym wzrostem nowotworu. Tę przeszkodę przewyciężają – w niektórych przypadkach – leki specyficznie aktywowane hipoksją, ale nietoksyczne dla tkanek zdrowych (przykładem tirapazamina, cyt. 2). Wiele oczekuje się również od grupy preparatów przeciwnowotworowych oddziałujących poprzez mechanizm jednoczący apoptozę z antyangiogenezą (33). Właśnie najlepiej chyba rokują, na obecnym etapie osiągnięć, strategie wielodocelowe (multi-hit strategies) łączące bezpośrednio niszczenie komórek nowotworowych (zabiegiem operacyjnym, radio/chemioterapią, lekami aktywowanymi hipoksją) z rozważnie ustawioną strategią antyangioterapii i swoistym niszczeniem naczyń krwionośnych (30).

Dokonujący się współcześnie wręcz niewiarygodny postęp w onkologii napawa optymizmem, bowiem przybliżyła realizację – oczekiwanego przez ludzkość – jednego z największych wyzwania XXI stulecia. Jednak w naszej rzeczywistości pozostaje jako zaszczość nie mniej ważna, codzienna prozaiczność, tj. koszt stosowania takich zabiegów.

Piśmiennictwo

1. *Arias V., Soares F. A.*: Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leukemia and Lymphoma* 2000, 40, 157-166.
2. *Brown J. M.*: The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy. *Cancer Res.* 1999, 59, 5863-5870.
3. *Brown J. M., Giaccia A. J.*: The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998, 58, 1408-1416.
4. *Budryk M., Szala S.*: Angiostatyna oraz inne polipeptydy hamujące angiogenezę nowotworów. *Współczesna Onkologia* 1997, 3, 11-16.
5. *Comerford K., Wallace T. J., Karahausen J., Louis N. A.*: Hypoxia inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002, 62, 3387-3394.
6. *Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L.*: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. *Science* 2002, 295, 2387-2392.
7. *Dachs G. U., Tozer G. M.*: Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis and therapeutic exploitation. *Europ. J. Cancer* 2000, 36, 1649-1660.
8. *Ferreina C. G., Epping M., Krutz F. A. C., Giaccone G.*: Apoptosis – target of cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 2024-2034.
9. *Fidler I. J.*: Angiogenic heterogeneity – regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93, 1040-1041.
10. *Gervaz P., Scholl B., Mainguene C., Poiry S., Gillet M., Wexner S.*: Angiogenesis of liver metastases. Role of sinusoidal endothelial cells. *Dis. Colon Rectum* 2000, 43, 980-986.
11. *Hlatky L., Hahnfeldt P., Folkman J.*: Clinical application of antiangiogenic therapy – microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94, 883-893.
12. *Höckel M., Vaupel P.*: Tumor hypoxia – definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 93, 266-276.
13. *Jędrzejczak W. W.*: Poszukiwanie postępu w chemioterapii nowotworów. *Współczesna Onkologia* 2003, 7, 6-10.
14. *Kotarski A.*: Terapia genowa. *Farmacja Polska* 2000, 56, 56-61.
15. *Kowalewski J.*: Cytokiny – ich zastosowanie w terapii. *Medicus, Lublin* 1994, 4, 7-9.
16. *Leek R. D., Landers B. J., Harris A. L., Lewis C. E.*: Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 1999, 79, 991-995.
17. *Loeb L. A.*: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 3230-3239.
18. *Mackiewicz J., Kasperkiewicz M.*: Interleukina 15 – właściwości biologiczne i aktywność przeciwnowotworowa. *Współczesna Onkologia* 2002, 6, 632-636.
19. *Madej J. A.*: Etiologia i patogeneza nowotworów, α -medica press, Bielsko-Biala, 1999.
20. *Naglich J. G., Jure-Kunkel M., Gupta E., Fagnoli J., Henderson A. J., Lewin A. C., Talbot R., Baxter A.*: Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res.* 2001, 61, 8480-8485.
21. *Nurzyńska D.*: Hamowanie onkogenów za pomocą oligonukleotydów anty-sensownych jako metoda terapii nowotworów. *Współczesna Onkologia* 2003, 7, 18-23.
22. *O'Byrne K. J., Dalgleish A. G., Browning M. J., Steward W. P., Harris A. L.*: The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Europ. J. Cancer* 2000, 36, 151-169.
23. *Riseau W.*: What, if anything, is angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev.* 1996, 15, 149-151.
24. *Roberts A. B., Sporn M. B.*: Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF β . *Am. J. Resp. Dis.* 1989, 140, 1126-1128.
25. *Robles A. I., Harris C. C.*: p53-mediated apoptosis and genomic instability diseases. *Acta Oncologica* 2001, 40, 696-701.
26. *Rundhaug J. E.*: Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 551-554.
27. *Schmitt-Sody M., Strieth S., Krasnici S., Sauer B.*: Neovascular targeting therapy-paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 2335-2341.
28. *Semenza G. L.*: Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Clinical Rev. Biochem. Molecular Biol.* 2000, 35, 71-103.
29. *Szala S.*: Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000, 50, 111-121.
30. *Szala S., Radzikowski C.*: Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997, 47, 1-19.
31. *Tanaka T., Konno H., Baba S., Kanai T., Matsumoto K., Matsuda I., Ohba K.*: Prevention of hepatic and peritoneal metastases by the angiogenesis inhibitor FR-118487 after removal of growing tumor in mice. *Jpn. J. Cancer* 2001, 92, 88-94.
32. *Tanaka T., Konno H., Matsuda I., Nakamura S., Baba S.*: Prevention of hepatic metastasis of human colon cancer by angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res.* 1995, 55, 836-839.
33. *Thun M. J., Henley S. J., Pawrono C.*: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94, 252-266.
34. *Wei D., Le X., Zheng L., Wang L., Frey J. A.*: Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003, 22, 319-329.
35. *White E. S., Flaherty K. R., Carskadon S., Brant A., Iannettoni M. D., Yee J.*: Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Cancer Res.* 2003, 9, 853-860.
36. *Wiźnerowicz M., Izycki D., Mackiewicz A.*: Genetycznie modyfikowane szczepionki nowotworowe. *Współczesna Onkologia* 1997, 3, 7-10.
37. *Zgodiński W., Wallner G., Dąbrowski A.*: Angiogenesis inhibitors. New anticancer therapy. *Pol. J. Pharmacol.* 1999, 51, 455-462.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-853 Lublin

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

VALLANT ANDRÉ: Farbatlas der Schlachtkörper-Pathologie bei Rind und Schwein (Barwny atlas zmian patologicznych tusz zwierząt rzeźnych u bydła i świń). Enke Verlag, Stuttgart 2004, str. 186, ryc. 300, cena 69,95 €. ISBN 3-8304-1017-4

Autor książki dr med. wet. André Vallant, inspektor higieny mięsa w Landshut, Niemcy, kilkudziesięcioletnią praktykę zawodową skutecznie połączył z zainteresowaniami naukowymi. Wynikiem tego jest recenzowane opracowanie. Książka jest praktycznym, a zarazem doskonale przygotowanym przewodnikiem dla studentów, jak też lekarzy wet. nadzoru sanitarno-weterynaryjnego.

Badanie san.-wet. zwierząt rzeźnych i mięsa stwarza niejednokrotnie dylemat poprawności rozpoznania dostrzeżonych zmian, ich etiologii i tym samym oceny przydatności spożywczej tuszy i narządów wewnętrznych. Książka jest

obrazowym przedstawieniem najczęściej występujących zmian, z którymi zetknąć się mogą lekarze wet. w trakcie badania. Przedstawiono 300 doskonałej jakości barwnych rycin oraz opis informacyjny nt. etiologii powstawania zmian, diagnozy różnicowej i czynników przyczynowych. Te ostatnie usystematyzował autor w 13 grupach, jak np.: wywołwane przez proces ubojowy, postępowania poubojowe, nowotworzenia, pigmentacje, zapalenia itp.

Książka, bardzo starannie wydana, w formacie A4 pozwala na łatwą percepcję treści. Kredowy dobry papier i doskonałe barwne ryciny powodują, że książka jest bardzo przydatnym przewodnikiem postępowania w nadzorze san.-wet. Warto ją posiadać we własnych zbiorach, gdyż prawie każdy lekarz wet., wcześniej lub później, zetknąć się musi z badaniem zwierząt rzeźnych i mięsa.

Edmund K. Prost