

Nádorová angiogeneze

Š. Lukešová¹, O. Kopecký¹, J. Dvořák², D. Hlávková¹, V. Vrobllová¹

¹ Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta MUDr. Otakar Kopecký, CSc.

² Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta doc. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.

Souhrn: Novotvorba cév je významným faktorem, který se podílí na růstu a metastazování. Pro růst nádoru nad velikost 1–2 mm³ musí dojít k nastartování angiogeneze a k vytvoření vaskulárního zásobení nádoru. Angiogeneze je komplexní proces, zahrnující degradaci bazální membrány původní cévy, proliferaci endotelu k místu působení angiogenetického stimulu, vyrostání endotelií se vznikem luminizované kapiláry až vznik funkční cévy obklopené novotvořenou bazální membránou a pericyty. Angiogeneze je regulována řadou angiogenních a antiangiogenních faktorů. Významným stimulem k sekreci mnoha angiogenních faktorů je hypoxie. U mnoha nádorových onemocnění je zvýšená angiogeneze považována za negativní prognostický faktor, který znamená zvýšenou agresivitu nádoru a riziko metastáz.

Klíčová slova: angiogeneze – nádorový růst – metastazování – VEGF (vascular endothelial growth factor) – HIF (hypoxia inducible factor)

Tumor angiogenesis

Summary: Angiogenesis have shown a major role in tumor growth and metastasis formation. For tumor growth beyond the size 1–2 mm³, angiogenesis must be started to form vascular supply of tumor cells. Angiogenesis is a complex process, involving degradation of the basement membrane of preexisting vessel, proliferation of endothelial cells towards the angiogenetic stimulus, maturation of endothelial cells with formation of luminized capillary, and finally formation of a functional vessel, surrounded by basement membrane and pericytes. Angiogenesis is regulated by numerous angiogenic and anti-angiogenic factors. Hypoxia is a significant stimulus for angiogenesis. For many cancers the extent of vascularisation is a negative prognostic indicator signifying aggressive disease and increased potential for metastasis.

Key words: angiogenesis – tumor growth – metastasis – VEGF (vascular endothelial growth factor) – HIF (hypoxia inducible factor)

Úvod

Angiogeneze (novotvorba cév) je proces, který má velký význam za fyziologických okolností, jako je hojení ran a zlomenin, vývoj embrya, změny v průběhu menstruačního cyklu v ovariích a v endometriu. Porucha normálního procesu angiogeneze vede k různým chorobným stavům. Uplatňuje se při fibroproliferacích pochodech, v patogenezi revmatoidní artritidy, při vzniku retinopatie, u chronického zánětu a v neposlední řadě má významnou úlohu při metastazování nádorů a v patogenezi nádorového procesu vůbec [16,17].

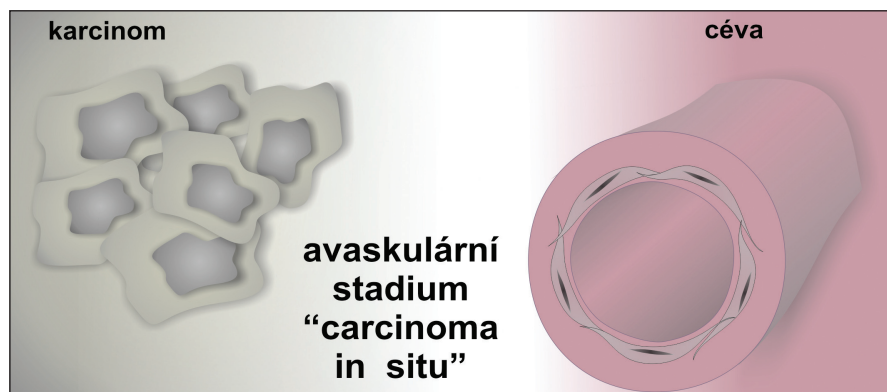
V průběhu angiogeneze dochází k následujícím morfologickým změnám. Dochází k vazodilataci. Endotelové buňky protahují svůj tvar, ply-

nulost bazální membrány se narušuje jak mechanicky, tak enzymaticky uvolněnými proteolytickými enzymy. Porušenou bazální membránou unikají z cévy fibrinogen a plazminogen, které se vlivem tkáňových aktivátorů přeměňují na fibrin a plazmin. Endotelové buňky nabývají lokomočních schopností a zvýšeně proliferují. Vytvářejí „pupeny“ na cévě až postupný růst výhonku na matici fibrinových vláken. Novotvořená céva se postupně stabilizuje, opět se vytváří mezibuněčná spojení, aktivizují se pericyty, vytvoří se bazální membrána (jejíž součástí jsou kolagen IV, laminin, fibronectin a heparansulfát) a lumen. Jeho formace závisí na extracelulárním mikrostředí a na modulaci proteázových aktivit. Celý

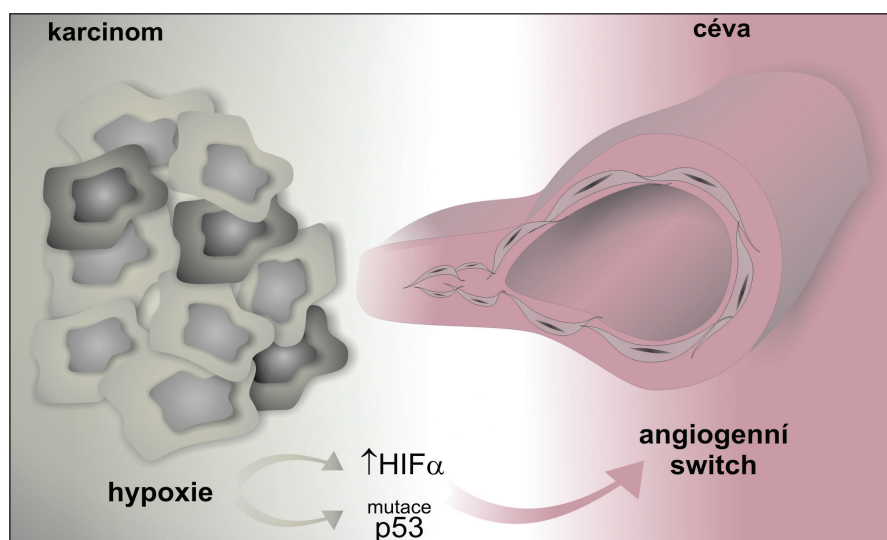
proces angiogeneze probíhá pod vlivem angiogenních a antiangiogenních faktorů [16,25].

Role angiogeneze v růstu nádorů

Angiogeneze je důležitým procesem doprovázejícím růst nádorů. Nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout nejvýše rozměru 1–2 mm³ (obr. 1). V průběhu avaskulárního stadia je dodávání kyslíku a výživných látek zajišťováno difúzí. Jakmile velikost nádoru přesáhne průměru 0,5 mm, je nutrice zajišťovaná difúzí nedostatečná [34]. Hypoxický nádor je geneticky nestabilní [8]. Vznikají mutace – např. mutace genu p53, a tím potlačení antiangiogenního trombospondinu. Objevuje se nový genotyp se zvýšenou pro-



Obr. 1. Avaskulární stadium „carcinoma in situ“ bez vlastního cévního zásobení, dodávka živin a kyslíku nádorovým buňkám je zajišťována difúzí.



Obr. 2. Angiogenní „switch“ – změna zahajující proces angiogeneze.

V důsledku hypoxie dochází ke genetické nestabilitě, vznikají mutace, např. mutace genu p53, která vede k potlačení antiangiogenního trombospondinu, kumuluje se HIF- α (hypoxia inducible factor α), jehož hromadění vede v konečném důsledku ke zvýšení hladiny proangiogenních růstových faktorů.

dukci angiogenních faktorů (VEGF – vascular endothelial growth factor a další). Tato změna, označovaná jako angiogenní „switch“, zahajuje proces angiogeneze (obr. 2). V nádorové populaci vznikne angiogenní klon. Humorální podněty z nádorových angiogenních buněk indukují migraci endotelií směrem k nádorovému ložisku. Dochází k rozrušení bazální membrány vlivem proteolytických enzymů produkovaných nádorovými buňkami, vlivem kolagenazy IV. typu, aktivátoru plazmino-

genu a stromelyzinu produkovaných endoteliemi a stromálními buňkami. Rozrušení bazální membrány usnadňuje migraci endotelií, ale i migraci nádorových buněk a jejich metastazování. Z cév uniká fibrinogen a plazminogen. Vlivem tkáňových aktivátorů vznikají extravaskulární depozita fibrinu, vytvářející podpůrnou matici pro růst novotvořených cév. Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho perfuzi a další růst (obr. 3). Nádorové buňky a endotelie se vzájemně parakinně

ovlivňují. Endotelie produkují větší počet mitogenů a motogenů (působků ovlivňujících motilitu). Je to zejména bFGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1) a IGF-2 (insulin-like growth factor 2) [18].

V průběhu vaskulárního stadia nádorové angiogeneze probíhá těchto 6 fází [3]:

1. změny v poměru angiogenních a antiangiogenních faktorů
2. morfologické změny endoteliálních buněk
3. uvolnění proteolytických enzymů
4. migrace endoteliálních buněk a kapilární morfogeneze
5. reprodukce endoteliálních buněk
6. mikrovaskulární diferenciace

Mezi cévami zdravých tkání a cévami zásobujícími nádory jsou významné rozdíly, týkající se endoteliálních buněk, cévní stěny a bazální membrány. Mnohé endotelové buňky nádorových cév jsou v mitóze a ztratily některé strukturální charakteristiky normálních endoteliálních buněk. Bazální membrána novotvořených nádorových cév je tenčí než u normálních cév. Nádorové cévy mají větší propustnost, většinou není pozorováno vyzrávání novotvořených kapilár. Svalové a nervové komponenty, odpovědné za systolickou a diastolickou reaktivitu vůči vazomotorickým podnětům, se na nádorových cévách nenacházejí [10,20]. Nádorové cévy se klikatí, mají nedostatek pericytů.

Mezi normálním a nádorovým endotelem se nacházejí mnohé rozdíly [5,6,9,15,28]. Fenotyp nádorového endotelu může být různý uvnitř jednoho tumoru. Signifikantně je zvýšena exprese integrinů avb3 a avb5 [11,31]. U karcinomu prsu byla prokázána zvýšená exprese avb3 jako markeru aktivace endotelu [24]. Na aktivovaném endotelu jsou deregulovány E-selektin, endoglin, glykoproteiny jako PSA (prostatický an-

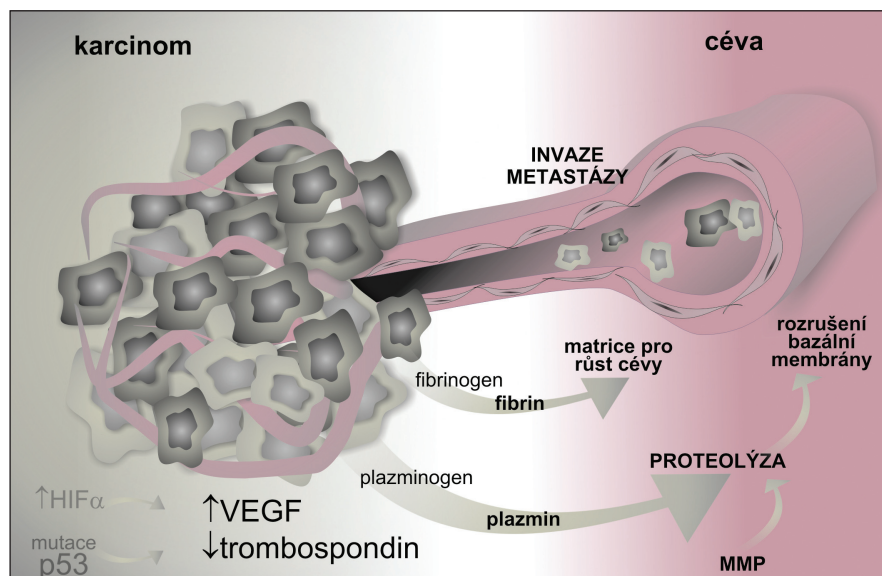
tigen), ED-B-doména fibronektinu a různé proteázy.

Molekuly s rozdílnou expresí na endotelu nádorových a normálních cév jsou [3]:

1. VEGF-receptory
2. integriny: avb3, avb1
3. peptidy
4. adhezní molekuly: E-selektin, endoglin
5. glykoproteiny: PSA
6. proteázy

Nádorové buňky mohou exprimovat proangiogenní a/nebo antiangiogenní faktory. Za fyziologických okolností je angiogeneze kontrolována vyvážeností těchto faktorů. Tato rovnováha je porušena u malignit. Výsledkem je podpora angiogeneze. Ke zvýšené expresi angiogenních faktorů dochází na podkladě různých stimulů. Nejstudovanějším podnětem je hypoxie [19,35], která vede ke zvýšené expresi VEGF i dalších angiogenních faktorů [19,21]. Hypoxie je možno nazvat klíčem k angiogenezi. Hypoxií indukované faktory (HIF-1 a HIF-2) jsou heterodimerické transkripční faktory skládající se z α - a β -podjednotek [14,26,35]. Tumory HIF-1^{-/-} mají sníženou hypoxií indukovanou expresi VEGF a jsou méně vaskularizovány, ale mají akcelerovaný růst in vivo ve srovnání s tumory HIF-1^{+/+} díky poklesu hypoxií indukované apoptózy [7]. Cytokiny a růstové faktory jako IGF-1, EGF (epidermal growth factor), IL-1 (interleukin 2) mohou zvýšenou regulací VEGF indukovat angiogenezi [1].

Existuje úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz. Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je riziko metastáz větší a prognóza nádorového onemocnění horší. Expanze nádorových cév vede ke zvýšení pravděpodobnosti průniku nádorových buněk do cirkulace a formování metastáz v jiných orgánech. Tato hypotéza, resp. závislost mezi intenzitou cévní novotvorby a frekvencí vzniku metastáz, byla ověřena mnohými kli-



Obr. 3. Vlivem proteolytických enzymů produkovaných nádorovými buňkami, vlivem kolagenázy IV. typu, aktivátoru plazminogenu a stromelyzinu produkovaných epiteliemi a stromálními buňkami dochází k roztřesení bazální membrány, což usnadňuje migraci endotelií i migraci nádorových buněk a jejich metastazování. Z cév uniká fibrinogen a plasminogen. Vlivem tkáňových aktivátorů vznikající extravaskulární depozita fibrinu vytvářejí podpůrnou matrici pro růst novotvořené cévy. Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho perfuzi a další růst.

nicky studii [36,38]. Uvedený poznatek má své praktické důsledky, neboť stupeň angiogeneze může posloužit jako užitečný prognostický faktor. Mnohé studie dokazují prognosticky signifikantní význam exprese VEGF [12,13,22,23,27,29,33,37,39]. Vysoká hladina exprese VEGF koreluje s hustotou cévní sítě, zvyšuje pravděpodobnost recidivy a zkráceného přežívání. Některé studie u renálního karcinomu neprokázaly závislost mezi sérovou hladinou VEGF a prognózou tumoru [4], jiné pak neprokázaly rozdíl mezi sérovou hladinou VEGF u solitárního renálního karcinomu a metastazujícího renálního karcinomu [2]. Poslední studie prokazují závislost mezi expresí VEGF a stupněm infiltrace tumoru T-lymfocyty [32]. Mnohé studie dokumentují zvýšené plazmatické koncentrace VEGF u pacientů s nádorovým onemocněním na rozdíl od zdravých lidí. Ki Hak Song et al porovnávali, co je v případě renálního karcinomu lepším prognostickým

faktorem – zda hustota cévní sítě, či VEGF. Výsledek zněl – hustota cévní sítě [30].

Stále je diskutováno, zda generace novotvořených cév zásobujících tumor vzniká na podkladě angiogeneze (tj. je tvořena zralými endoteliálními buňkami) nebo vaskulogeneze (progenitorové buňky). Mnohé preklinické modely ukazují, že některé tumory mohou být závislé na vaskulogenezi (lymfomy, nediferencovaný karcinom prostaty), zatímco jiné jsou spojeny s angiogenezí (kožní tumory, diferencovaný karcinom prostaty).

Závěr

Další výzkum angiogeneze a možnosti využití antiangiogenních látek v léčbě nádorových onemocnění přináší slibné vyhlídky, ale na druhé straně je zatím výhradně výsadou výzkumných pracovišť.

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu výzkumného záměru IGA MZ ČR: NR/8914-4.

Literatura

1. Akagi Y, Liu W, Zebrowski B et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-growth factor-I. *Cancer Res* 1998; 58: 4008–4014.
2. Baltaci S, Orhan D, Göğüs C et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in renal cell carcinoma and their relationship with multifocality. *Eur Urol* 2003; 44: 76–81.
3. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Int Med* 2003; 14: 459–469.
4. Beecken WD, Bentas W, Glienke W et al. Serum angiogenic activity: diagnostic relevance in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2002; 42: 364–369.
5. Bischoff J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 69–73.
6. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenreid M et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157–1164.
7. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM et al. Role of HIF-1 in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485–490.
8. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2477–2490.
9. Eleutherakis-Papaiakovou V, Karali M, Kokkonouzis I et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma: clinical significance and therapeutic approach. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 937–948.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA et al (ed). *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: WB Saunders 1995: 206–232.
11. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E et al. Vascular integrin $\alpha v \beta 3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2625–2634.
12. Inoue K, Kamada M, Slaton JW et al. The prognostic value of angiogenesis and metastasis-related genes for progression of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1863–1870.
13. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T et al. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU International* 2004; 93: 297–302.
14. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A et al. Induction of HIF-1 in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15: 1312–1314.
15. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation or angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727–739.
16. Kliner P. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia* 2002; 12: 2–8.
17. Kliner P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén 2002; 66–71.
18. Kliner P. Význam angiogeneze u nádorových onemocnění a možnosti jejího ovlivnění. *Forum Medicinæ* 1999; 2: 54–61.
19. Levy AP, Levy NS, Wegner S et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333–13340.
20. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 (Suppl 1): 3–10.
21. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Seminars Cancer Biol* 2004; 14: 123–130.
22. O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper D et al. Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. *Lancet* 1999; 353: 1494–1495.
23. Or R, Feferman R, Shoshan S. Thalidomide reduces vascular density in granulation tissue of subcutaneously implanted polyvinyl alcohol sponges in guinea pigs. *Exp Hematol* 1998; 26: 217–221.
24. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380: 364–366.
25. Ryška A. Angiogeneze v nádorech. Část I: Úloha v určování biologických vlastností nádoru; faktory ovlivňující vznik a vývoj angiogeneze. *Čes Slov Patol* 2000; 36: 26–31.
26. Salceda S, Cam J. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642–22647.
27. Sasaki H, Yukiue H, Kobayashi Y et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor levels in patients with thymic epithelial neoplasms. *Surg Today* 2001; 31: 1038–1040.
28. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR et al. Mechanisms of neovascularization. *Lab Invest* 1984; 51: 624–634.
29. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158: 735–743.
30. Song KH, Song J, Jeong GB et al. Vascular endothelial growth factor – its relation to neovascularization and their significance as prognostic factors in renal cell carcinoma. *Yonsei Med J* 2001; 42: 539–546.
31. Stromblad S, Chersesh DA. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 462–467.
32. Takayashi Y, Clearly KR, Mai M et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1679–1684.
33. Takayashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 72: 319–324.
34. Talač R, Žaloudík J, Pačovský Z et al. Neovaskularizace u solidních nádorů. *Klin Onkol* 1995; 6: 165–167.
35. Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510–5514.
36. Weidner N, Sample JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1.
37. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y et al. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003; 10: 220–227.
38. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203–213.
39. Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H et al. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002; 9: 509–514.

MUDr. Šárka Lukešová
www.lfhk.cuni.cz/UKIA
 e-mail: lukesova@fnbk.cz

Doručeno do redakce: 14. 2. 2006
 Přijato po recenzi: 2. 5. 2006