

Proces neoangiogenezy w raku jelita grubego

The process of neoangiogenesis in colorectal carcinoma

Marian Głowacz¹, Marek Kucharzewski²

¹Oddział Chirurgii Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej, Zespół Szpitali Miejskich w Chorzowie (Surgical Department, Self-Reliant Independent Public Health Care Institute, Municipal Hospital Complex, Chorzów, Poland)

²Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Bytom (Department of General Surgery, Medical University of Silesia, Bytom, Poland)

Streszczenie

Rak jelita grubego jest wciąż jednym z najważniejszych problemów w onkologii. Po pierwsze, nowotwór ten występuje bardzo często — pod względem liczby nowych zachorowań na świecie zajmuje drugie miejsce po raku płuc — około 1 miliona nowych zachorowań rocznie. Po drugie, jest to nowotwór o wciąż niezadowalającym rokowaniu — wskaźnik przeżycia 5-letniego nie przekracza w większości krajów 50% — około 0,5 miliona zgonów rocznie na świecie. W pracy autorzy omawiają znaczenie procesu neoangiogenezy w patogenezie raka jelita grubego.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, neoangiogeneza, VEGF

Chirurgia Polska 2008, 10, 170-174

Abstract

Colorectal carcinoma is still one of the most crucial problems in oncology today. Firstly, this neoplasm occurs frequently and in terms of new cases world wide — at around one million per year — it is second on the list, right after pulmonary carcinoma. Secondly, it is a neoplasm which still has a poor prognosis in which the survival rate over a five-year period, in the majority of cases, is below 50%. Moreover, there are around half a million deaths a year worldwide. In this work, the authors discussed the role of neoangiogenesis in the large intestine cancer pathogenesis.

Key words: colorectal carcinoma, neoangiogenesis, VEGF

Polish Surgery 2008, 10, 170-174

Nowotwór jest chorobą genetyczną, która charakteryzuje się kumulacją licznych mutacji somatycznych w populacji komórek przechodzących transformację nowotworową. Wypadkową wymienionych zmian genetycznych jest aktywacja proliferacji lub utrata kontroli nad proliferacją i różnicowaniem się komórek [1]. W wyniku tych procesów dochodzi do niekontrolowanego wzrostu kolejnych klonów niskozróżnicowanych komórek.

Za powstanie nowotworu w wielu przypadkach odpowiada przemiana nowotworowa mająca początek w polipach jelita grubego, a dokładniej mutacja w obrębie genu *p-53* lub aktywacja protoonkogenu *K-ras*, co

Neoplasm is a type of genetic disease which is characterised by the accumulation of many somatic mutations in a cell population going through a neoplasm transformation. These genetic changes result in the activation of cell proliferation and differentiation or the loss of control over both [1]. The outcome of this is the uncontrolled increase of further clones of low-diversified cells.

The reason for the occurrence of a neoplasm is, in many cases, a neoplastic change which starts in a polyp of the large intestine. To be more precise, it is a mutation concerning gene *p-53* or the activation of the

w ostatnich latach stało się obszarem intensywnych badań wielu naukowców [2].

Wzrost zapadalności i umieralności na nowotwory jest bardzo istotnym problemem zdrowotnym. Z danych epidemiologicznych wynika, że począwszy od 1998 roku umieralność z powodu nowotworów jelita grubego wśród mężczyzn jest drugą nowotworową przyczyną zgonów [3], przy czym rak jelita grubego jest najczęściej wykazywanym nowotworem przewodu pokarmowego [4]. Rocznie rozpoznaje się w Polsce około 11 tysięcy nowych zachorowań. Ogólna zachorowalność na raka jelita grubego wzrasta średnio o co najmniej 2,5% rocznie i jest podobna zarówno w populacji męskiej, jak i żeńskiej — 9,5% v. 10%, a monitorowaną 5-letnią przeżywalność szacuje się na 25–50% [5].

Aby lepiej zrozumieć komórkowy i molekularny mechanizm kancerogenezy, należy zwrócić uwagę na kilka istotnych aspektów. Każda komórka (w tym również nowotworowa) potrzebuje do wzrostu, przeżycia, rozmnażania i tworzenia ewentualnych ognisk przerzutowych kilku czynników. Mowa tu o: 1) dostarczeniu substancji odżywczych (za pośrednictwem krwi i płynu tkankowego), 2) całkowitym lub częściowym uniezależnieniu od adhezji do podłoża, 3) „oporności” na apoptozę, czyli programowaną śmierć komórki, 4) podniesionym potencjale replikacyjnym czy 5) uniezależnieniu się od czynników proliferacyjnych i inhibitorów wzrostu. Dopiero komórki, które w wyniku określonych mutacji nabeżdą wyżej wymienione cechy, zdobędą „autonomię” i przestaną być stymulowane przez endogenne czynniki, będą zdolne do tworzenia nowych klonów i wytworzenia przerzutów.

W walce z nowotworami szczególne nadzieje wiązane są z poznaniem mechanizmów neoangiogenezy oraz apoptozy. Procesem angiogenezy (neoangiogenezy) nazywa się tworzenie nowych naczyń włosowatych na bazie już istniejących naczyń krwionośnych. Fizjologicznie angiogeneza towarzyszy rozwojowi zarodka, regeneracji naczyń błony śluzowej macicy w przebiegu cyklu menstruacyjnego, implantacji zarodka do śluzówki macicy i tworzeniu się łożyska [6, 7]. Fizjologiczną angiogenezę obserwuje się również w krezce jelita [8], podczas tworzenia się nowej tkanki (ziarniny) w miejscu gojenia się ran [9].

Jedną z pierwszych hipotez powstania nowotworu jelita grubego mówiącą, że guz, by wzrastać, wymaga dostarczenia substancji odżywczych z nowo utworzonych naczyń, wysunął w 1971 roku Folkman. Teoria ta została poparta wieloma badaniami innych naukowców (Knighton, Liotta, zarówno na modelach zwierzęcych, jak i materiale ludzkim). Stąd też wysunięto propozycję, że zablokowanie procesu angiogenezy może być strategią zahamowania wzrostu nowotworu [10]. Badania dowodzą, że komórki są w stanie egzystować jedynie w warunkach umiarkowanej hipoksji, to jest w odległości nie większej niż 300–400 mikrometrów od naczynia krwionośnego. Tylko taka odległość zapewnia komórkom stały dopływ substancji odżywczych i tlenu. Z powyższego wynika, że w guzach o średnicy 0,5 mm panują już warunki hipoksji.

protooncogene K-ras, which in recent years has become the focus of interest of much scientific research [2].

The increase in those developing or dying of neoplasm is a significant health problem. According to epidemiological statistics, since 1998 colorectal carcinoma among men has become the second most common neoplastic cause of death [3]. However, colorectal carcinoma is the most frequent neoplasm of the digestive tract [4] of which there are eleven thousand of new cases in Poland every year. On average, the rate of developing colorectal carcinoma has increased by at least 2.5% a year and is similar among both men and women (9.5% v. 10%). Moreover, a monitored five-year period survival rate is estimated at 25–50% [5].

In order to understand the cell and molecular mechanism of cancerogenesis better, we have to pay attention to a few significant aspects. Each cell, including that which is neoplastic, needs to grow, survive, reproduce and build up a potential focus of metastasis comprising different factors. We are talking here about: 1) the provision of a nutrient (through blood and tissue fluid), 2) the entire or partial addition to adhesion to basement, 3) a 'resistance' to apoptosis, the programmed death of a cell, 4) an increased replication potential or 5) an independence from proliferating factors and growth inhibitors. Only cells which, as a result of certain mutations, gain the above-mentioned factors will obtain 'autonomy' and will stop being stimulated by endogenic factors. This means they will be able to create new clones and achieve metastasis.

When fighting a neoplasm, particular hopes are put into the comprehension of the mechanisms of neoangiogenesis and apoptosis. The angiogenic (neoangiogenic) process is a creation of new capillary vessels based on an already-existing blood vessel. Physiologically, angiogenesis accompanies embryogenesis, the regeneration of endometrium vessels during the menstrual cycle, the implementation of an embryo into uterine mucosa and the creation of placenta [6, 7]. Physiological angiogenesis is also observed through the intestinal mesentery [8], during the creation of new tissue (granulation) in the place of a healed wound [9].

One of the earliest hypotheses concerning the causes of colorectal carcinoma was introduced by Folkman in 1971 and proposed that tumours needed nutrients from newly-made vessels in order to grow. This theory was later proved by much research done on both animals and humans (Knighton, Liotta). An idea was also put forward that blocking the angiogenesis process could be used for suppressing the growth of a neoplasm [10]. Research has proved that cells are able to exist only in a moderate hypoxia which means at a distance no further than 300–400 micrometers from a blood vessel. Only such a distance guarantees cells a constant supply of nutrients and oxygen. This proves that the tumour of 0.5 mm in diameter can exist in a hypoxia.

Cytokine is a vascular endothelial growth factor (VEGF) which is well-recognised and connected with

Dość dobrze poznaną i powiązaną z tworzeniem nowych naczyń cytokiną jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), który został odkryty przez Dvoraka w 1983 roku [wg 11]. Istotą działania VEGF są: 1) wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, 2) poszerzenie naczyń krwionośnych, 3) pobudzenie śródbłonna do wytwarzania tlenku azotu (NO, *nitric oxide*), 4) pobudzenie enzymów proteolitycznych oraz ekspresji receptorów ważnych dla powstawania nacieków komórkowych i przebudowy naczyń krwionośnych 5) zdolność ochrony komórek śródbłonna przed apoptozą [12, 13].

Obecnie poznano więcej niż 5 izoform VEGF. Są to: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 oraz VEGF 206. Zasadnicza różnica pomiędzy poszczególnymi izoformami polega na liczbie reszt aminokwasowych [14]. Działanie czynnika wzrostu realizowane jest przez dwa swoiste receptory znajdujące się głównie na komórkach śródbłonna VEGFR-1 i VEGFR-2. Połączenie VEGF z receptorem VEGFR-2 powoduje uruchomienie przemian biochemicznych w komórkach śródbłonna, które polegają między innymi na degradacji białek błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej przez swoiste proteazy (metaloproteinazy — MMP). Zainicjowane w ten sposób przemiana podścieliska, proliferacja komórek śródbłonna oraz migracja komórek endotelialnych prowadzą do wytworzenia — w wyniku dalszych przemian regulowanych przez kolejne cytokiny — struktury rurowej z komórek śródbłonna, a następnie pełnowartościowego naczynia krwionośnego [15].

Cały ten proces przebiega w kilku etapach:

- 1. Inicjacja**
Niedotlenienie tkanek jest impulsem do tworzenia naczyń *de novo*. W wyniku hipoksji dochodzi do aktywacji i transkrypcji genu dla VEGF, co prowadzi do zwiótczenia istniejących naczyń. Podkreśla się tu także znaczącą rolę tlenku azotu wytwarzanego przez komórki śródbłonna stymulowane przez VEGF [16–18].
- 2. Rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej**
Dzięki aktywności metaloproteinaz dochodzi do enzymatycznego rozkładu błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej. W przygotowane w ten sposób miejsce „napęczają” komórki śródbłonna mające w przyszłości utworzyć nowe naczynie krwionośne [19].
- 3. Adhezja komórek**
Dzięki integrynom (integryny $\alpha\beta$) dochodzi do różnicowania, proliferacji i migracji komórek śródbłonna. Komórki te przylegają do kolagenu, fibrynogeny, lamininy, czynnika Willebranda lub witronektyny. Dopiero tak „ufiksowane” komórki endotelialne ulegają dalszym przemianom [20].
- 4. Namnażanie**
Komórki śródbłonna, by wytworzyć nowe naczynie, muszą się namnożyć. Proliferacja ta jest możliwa dzięki działaniu na nie wielu składników macierzy pozakomórkowej — między innymi trombospondyny i lamininy. Białka te wpływają na stymulację lub inhibicję proliferacji komórek. I tak forma rozpuszczalna trom-

the creation of new vessels and was discovered by Dvorak in 1983 [11]. The essence of VEGF application is: 1) the growth of penetration of the blood vessels, 2) the widening of the blood vessels, 3) the endothelium awakening to nitric oxide production (NO), 4) proteolytic enzyme awakening and the expression of receptors crucial for the creation of cellular infiltration and blood vessel alteration 5) the demonstration of the ability of endothelium cells to protect themselves against apoptosis [12, 13].

Nowadays, we have come to know more than five isoforms of VEGF: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 and VEGF 206. The main difference between individual isoforms depends on the amount of amino acid residue [14]. Growth factor application is carried out by two receptors located mainly on endothelium cells, VEGFR-1 and VEGFR-2. The connection of VEGF with VEGFR-2 receptors causes the initiation of biochemical changes in the endothelium cells, which consist of the degradation of basement membrane proteins and an intracellular matrix through a type of protease (MMP). Stroma alteration, endothelium cell proliferation and migration of endothelium cells having been initiated in this way lead to the creation, as a result of further changes regulated by consecutive cytokine, of pipe-like structures from the endothelium cells and, later, whole blood vessels [15].

This whole process is carried out in few stages

- 1. Initiation**
Oxygen deficiency in tissues is an impulse for *de novo* tissue creation. As a result of hypoxia, there is activation and transcription of a gene for VEGF, which leads to the flaccidity of already-existing vessels. There is also a noticeable effect of nitric oxide creation by endothelium cells stimulated by VEGF [16–18].
- 2. Extracellular matrix dismemberment**
Due to metalloproteinase activity, we may observe the enzymatic decomposition of the basement membrane and extracellular matrix. Locations prepared in this way are covered by endothelium cells which, in the future, will create a new blood vessel [19].
- 3. Cell adhesion**
Thanks to integrins (integrins $\alpha\beta$), there is a differentiation, proliferation and migration of endothelium cells. These cells cling to collagen, fibrinogen, laminine, Willebrand's factor or vitronectin. Fixed only in that way, endothelium cells undergo further change [20].
- 4. Multiplication**
Endothelium cells, in order to create a new cell, have to multiply. Proliferation of this kind is possible thanks to an effect of a big number of extracellular matrix factors onto endothelium cells. Among them, are thrombospondin and laminine. These proteins influence the stimulation or inhibition of cell proliferation. The dissolved form of thrombospondin suppresses proliferation while the form of this protein bound by a matrix stimulates proliferation. However, laminine, together with other matrix factors, intensifies endothelium cell proliferation [21].

bospondyny hamuje proliferację, a forma tego białka związana przez macierz — pobudza ją. Natomiast laminina wraz z innymi składnikami macierzy nasila proliferację komórek śródbłonna [21].

5. Dojrzewanie

Aby wytworzyć pełnowartościowe naczynie krwionośne, rurowate struktury utworzone przez komórki śródbłonna muszą wytworzyć przydankę. Jest ona wytworzona z komórek mezenchymalnych. Proces ten podlega regulacji przez płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *platelet derived growth factor*), jak również czynnik wzrostu fibroblastów typu 1 (FGF-1, *fibroblast growth factor 1*) oraz transformujący czynnik wzrostu typu β (TGF- β , *transforming growth factor beta*) [22].

Warto zaznaczyć, że VEGF oraz jego receptor VEGFR-2 zostały wykryte nie tylko w naczyniach krwionośnych, lecz również w kapilarach chłonnych podlegających aktywnej limfangiogenezie [23]. Obecność w guzach nowotworowych naczyń obu typów, jak również potwierdzenie obecności na nich identycznych receptorów dla VEGF mogą wskazywać na podobny mechanizm ich powstawania.

Biorąc pod uwagę możliwość migracji komórek nowotworowych i tworzenia przerzutów drogą zarówno krwionośną, jak i chłonną, selektywne pozbawienie guza wyżej wymienionych naczyń mogłoby spowodować zmniejszenie masy guza. Powoduje to tym samym niedokrwienia guza i pozbawienia go substancji odżywczych, a co za tym idzie spadek śmiertelności związany z mniejszym odsetkiem wytworzonych przerzutów regionalnych czy odległych. Wspomniany efekt można by uzyskać, stosując inhibitory angiogenezy. Obecny stan wiedzy wskazuje na wiele problemów związanych z takim planem postępowania. Poza VEGF zidentyfikowano ponad 12 różnych białek oraz kilka innych mniejszych cząstek o udowodnionym działaniu proangiogennym. Dla przykładu warto wymienić: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), VEGF, kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF, *acidic fibroblast growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*), interleukina 8 (IL-8, *interleukin 8*), łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF, *placental growth factor*), PDGF, TGF- α , adenozyne, nikotynamid, prostaglandyny: PGE1 czy PGE2 [24].

Problemem pozostają nadal ogólnoustrojowe konsekwencje zahamowania fizjologicznie powstających naczyń podczas prób zahamowania wzrostu naczyń w samym nowotworze. Można oczekiwać, że kolejne lata badań nad inhibitorami neoangiogenezy lub regulatorami apoptozy dadzą odpowiedź, w jaki sposób i w którym miejscu będzie można przerwać proces powstawania nowych naczyń w obrębie guza nowotworowego.

5. Maturation

In order to create a whole blood vessel, the tubular structure created by the endothelium cells must construct an adventitia which is produced from mesenchymal cells. This process undergoes regulation by platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and transforming growth factor beta (TGF- β) [22].

It is worth pointing out that VEGF and its receptor VEGFR-2 have not only been discovered in blood vessels but also in absorptive capillary vessels going through an active lymphangiogenesis [23]. The presence of both types of vessels in neoplastic tumours, as well as that of identical receptors for VEGF on such tumours, might suggest that there is a similar mechanism at work concerning their creation.

Taking into consideration neoplastic cell migration and the creation of metastasis through both blood and absorptive pathways, a selective deprivation of the tumour's above-mentioned vessels might reduce the tumour weight. This causes tumour ischaemia and the deprivation of its nutrients which leads to a lower number of deaths that are, in turn, related to fewer near and remote metastases. The effect mentioned above may be gained by using angiogenesis inhibitors. However, current research indicates that there are many problems connected with such a plan of action. Apart from VEGF, over twelve different protein types have also been identified, as well as other smaller molecules with proven proangiogenic action such as: bFGF, VEGF, aFGF, EGF, HGF, IL-8, PIGF, PDGF, TGF- α , adenosine, nikotinamid, PGE1 or PGE2, just to mention a few [24].

Up to now this problem has still caused systemic consequences concerning the suppression of physiologically-created vessels taking place during trials of vessel growth suppression in the same neoplasm. It may be expected that the next few years of research on neoangiogenic inhibitors or apoptosis regulators shall give us the answer to the question regarding in what way and in which place we will be able to suppress the process of new vessel creation in and around neoplastic tumours.

Piśmiennictwo (References)

1. Szmidt J, Gruca Z, Krawczyk M, Kuźdżał J, Lampe P. Podstawy chirurgii. Medycyna Praktyczna 2004; 1: 351–353.
2. Niedzielska I, Orawczyk T, Szaniewski K, Ziąja K. Polip a rak jelita grubego. Chirurgia Polska 2008; 10: 30–34.
3. Korniluk J, Wcisto G, Nurzyński P *et al.* Epidemiologia raka jelita grubego. Współczesna Onkologia 2006; 10: 136.

4. Ławicki S, Mroczko B. Markery nowotworowe przydatne w diagnostyce i monitorowaniu raka jelita grubego. *Postępy Hig Med Dośw.* 2002; 56: 617–634.
5. Krakowczyk Ł, Strzelczyk J. Epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów w rozwoju raka jelita grubego. *Współczesna Onkologia* 2007; 11: 289–294.
6. Breier G. Angiogenesis in embryonic development — a review. *Placenta* 2000; 21 (supl. 14): 11–15.
7. Smith S. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15 (supl. 6): 59–66.
8. Hansen-Smith FM, Morris L. Patterns of physiological angiogenesis in adult mesentery. *Angiogenesis: Models, Modulators and Clinical Applications.* Springer 1998; 75–84.
9. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997; 77: 509–528.
10. Folkman J. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *PNAS* 2001; 98: 398–400.
11. Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implication. *EXS* 1997; 79: 209–232.
12. Zielonka T. Angiogeneza — część 13. 1. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia, Astma, Immunologia* 2003; 8: 169–174.
13. Gupta K, Kshirsagar S, Li W *et al.* VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res.* 1999; 247: 495–504.
14. Poltorak Z, Cohen T, Neufeld G. The VEGF splice variants: properties, receptors and usage for the treatment of ischemic diseases. *Herz* 2000; 25: 126–129.
15. Bałan B. Angiogeneza — problem na miarę XXI wieku. *Nowa Medycyna — Pulmonologia IV (4/2000)* zeszyt 100.
16. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16: 4604–4613.
17. Naslund I, Norrby K. NO and de novo mammalian angiogenesis: further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF165 induced angiogenesis. *APMIS* 2000; 108: 29–37.
18. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R *et al.* Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor — induced but not basic fibroblast growth factor — induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2625–2634.
19. Hiraoka N, Allen E, Apel I, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinase regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365–377.
20. Howe A, Aplin AE, Alaharie SK, Juliano RL. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 220–231.
21. Grant TS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminine and other components of the extracellular matrix. *EXS* 1997; 79: 317–333.
22. Kanda S, Landgren E, Ljungstrom M, Claesson Welsh L. Fibroblast growth factor receptor 1 — induced differentiation of endothelial cell line established from TsA large T transgenic mice. *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 383–395.
23. Veikkola T, Jussila L, Makinen T *et al.* Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001; 20: 1223–1231.
24. Pastewka K, Skopińska-Różewska E. Angiogeneza w raku nerki. *Nowa Medycyna — Urologia IV* 1999; 3.

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Marek Kucharzewski
Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41–902 Bytom
tel.: (032) 786–15–18
e-mail: kucharzewskimarek@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do redakcji: 10.10.2008 r.