

# НАСТАВНА ЈЕДИНИЦА 9 (ДЕВЕТА НЕДЕЉА)



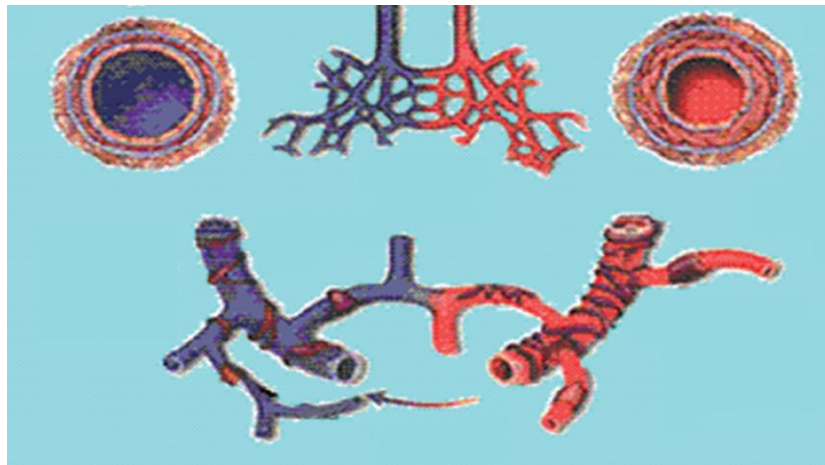
## Ангиогенеза тумора

*Механизми неоангиогенезе*

*Крвни судови тумора*

*Медијатори ангиогенезе*

Микроваскуларну мрежу чине најмањи крвни судови.  
Представља динамичан и сложен систем који је  
подложен сталним променама.

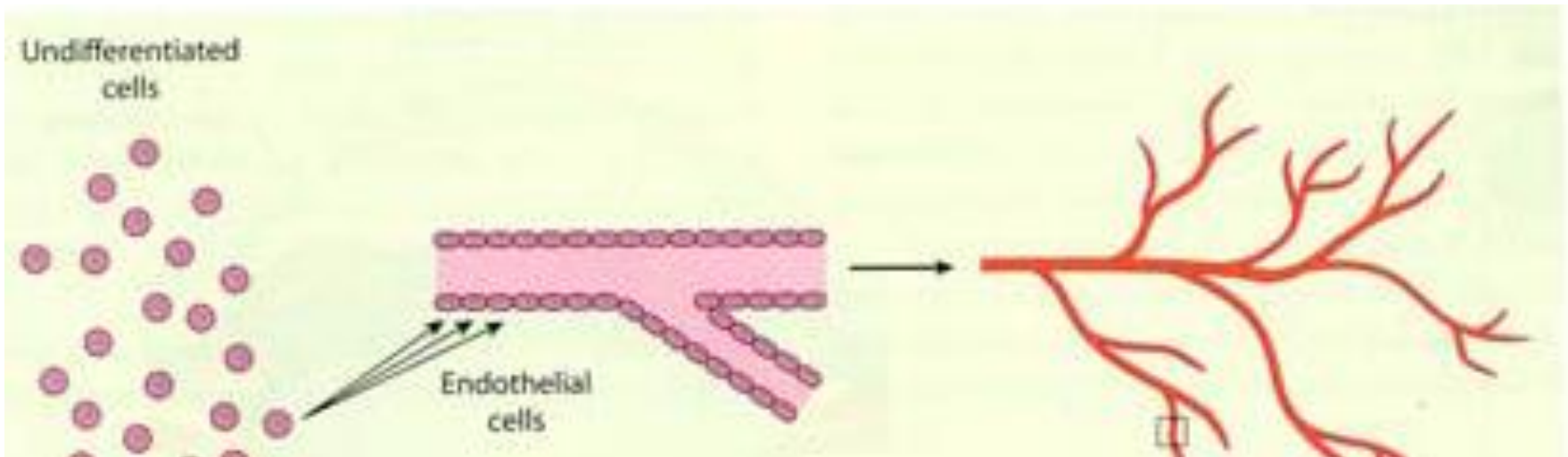


Крвни судови могу настати помоћу два процеса:

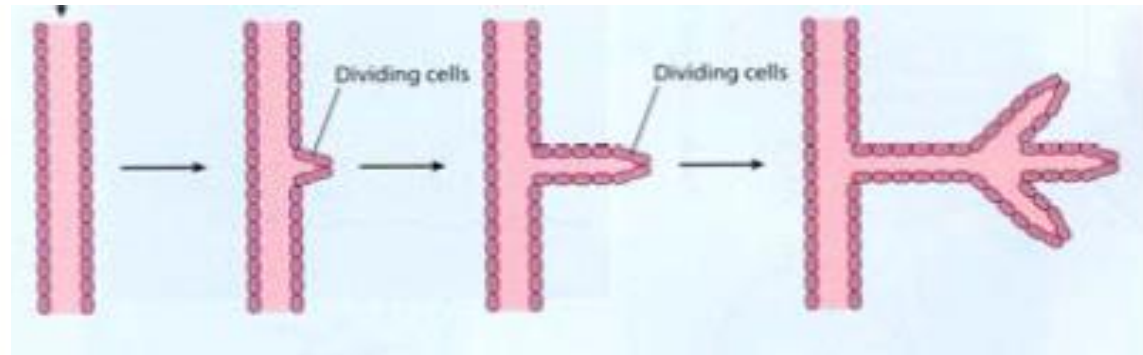
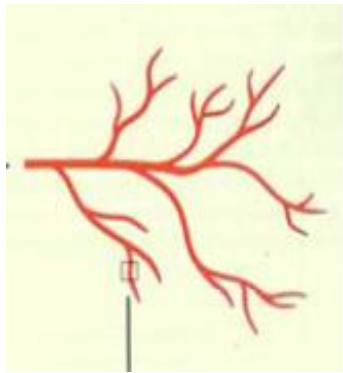
васкулогенеза

ангиогенеза...

**...Васкулогенеза** означава формирање **крвних судова *de novo*** и то диференцијацијом ангиобласта у ендотелне ћелије.

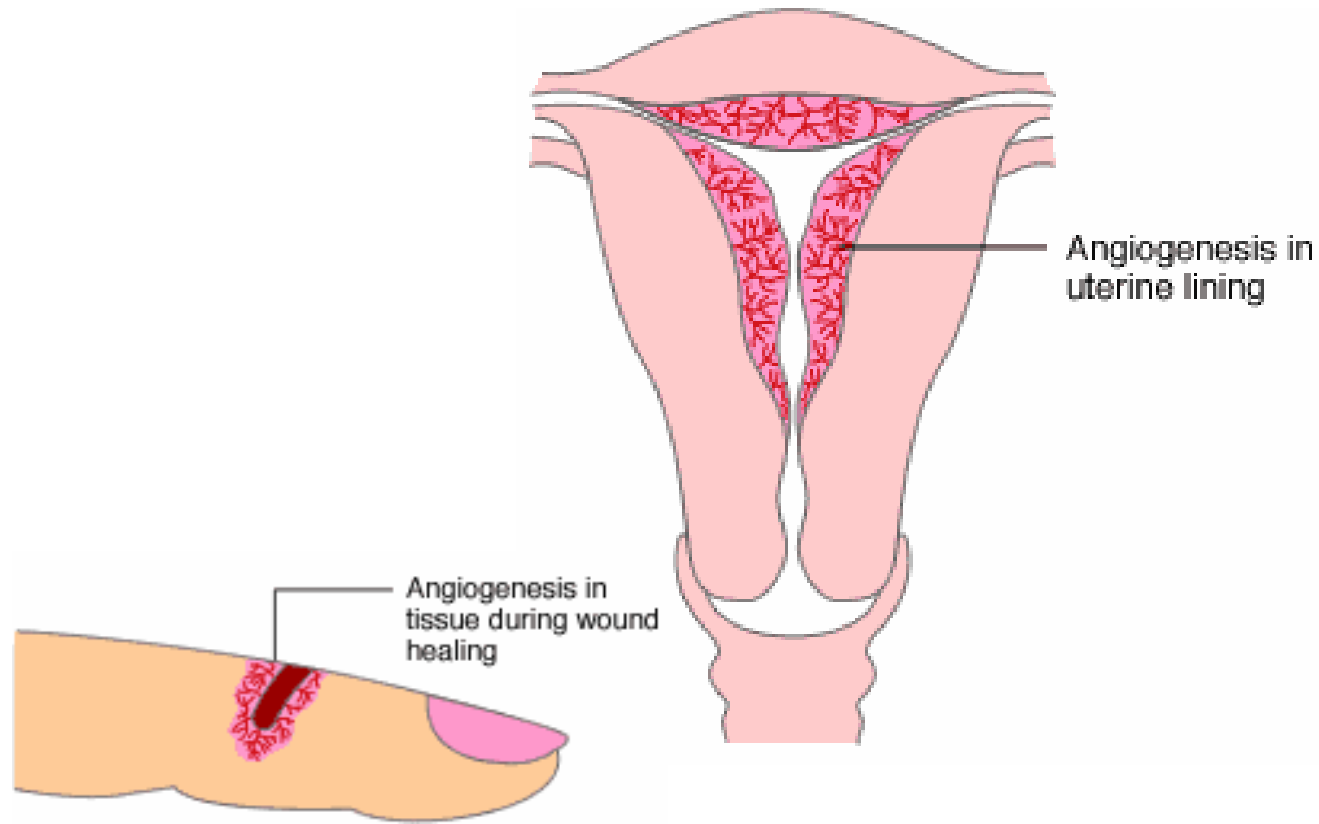
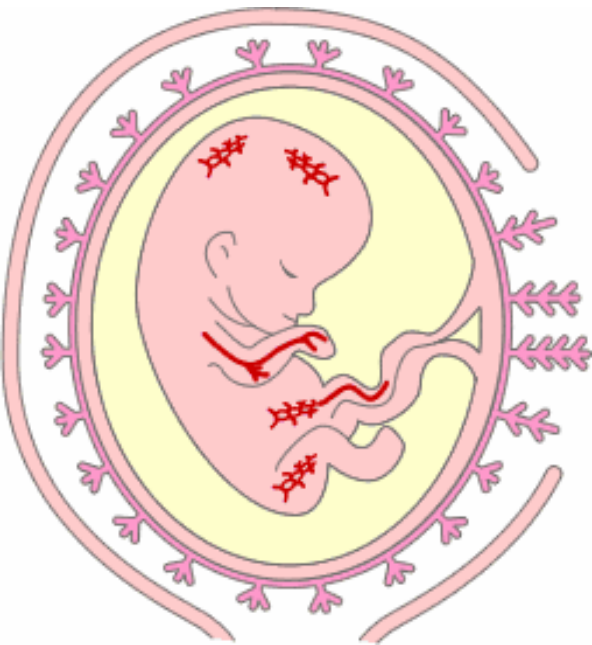


...**Ангиогенеза** је процес формирања **нових из већ постојећих крвних судова**, тако што ендотелне ћелије постојећих крвних судова пролиферишу и мигрирају и на тај начин граде нову капиларну цев.



Ангиогенеза је под строгим контролом. Неки молекули стимулишу процес ангиогенезе (**проангиогени фактори**), док други инхибирају ангиогенезу (**антиангиогени фактори**).

... Физиолошка ангиогенеза се јавља током ембрионалног развоја, зарастања рана, у време формирања жутог тела и фоликула јајника, као и током раста ендометријума материце.



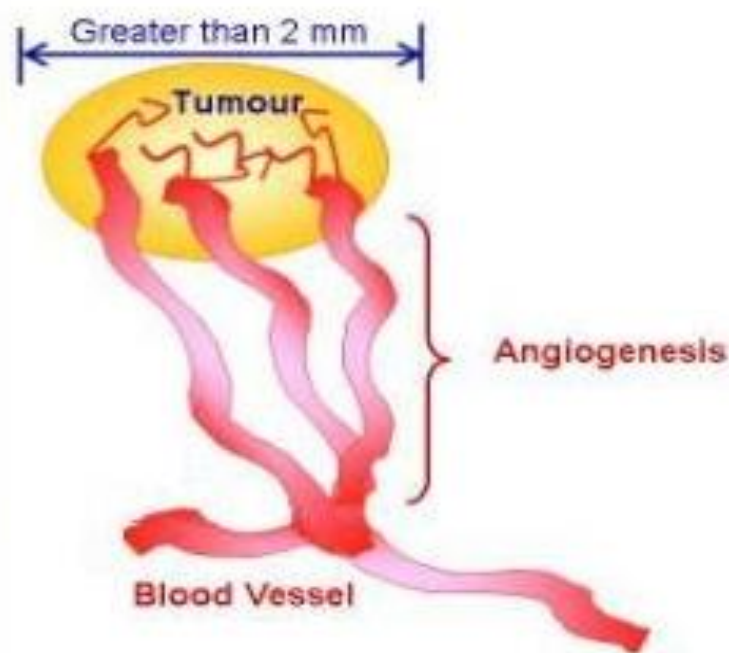
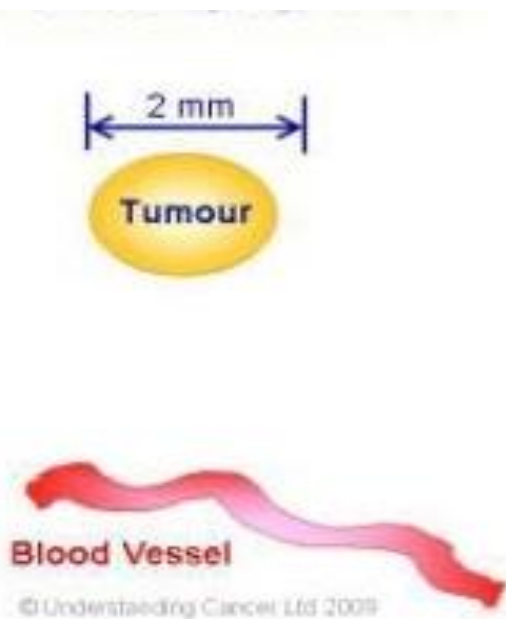
... Абнормална (неконтролисана) ангиогенеза  
укључена је у патогенезу различитих болести:

- дијабетична ретинопатија
- атеросклероза
- псоријаза
- реуматоидни артритис
- **малигноми**

# Ангиогенеза тумора

*-Механизми ангиогенезе-*

Солидни тумори због ограничених ресурса кисеоника и хранљивих материја не могу да расту више од 2-3mm ако их не прати ангиогенеза.







## Moses Judah Folkman

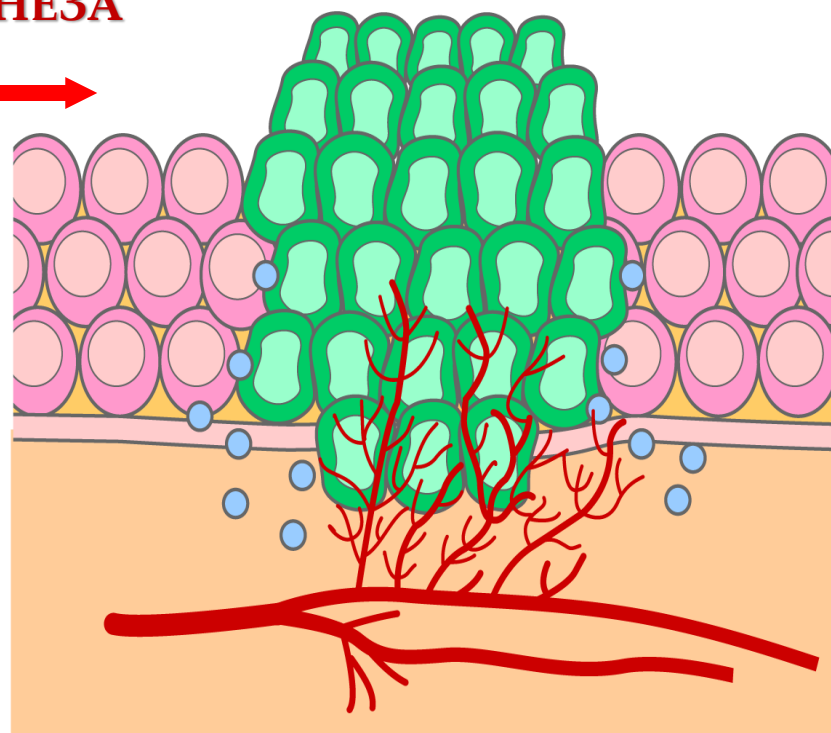
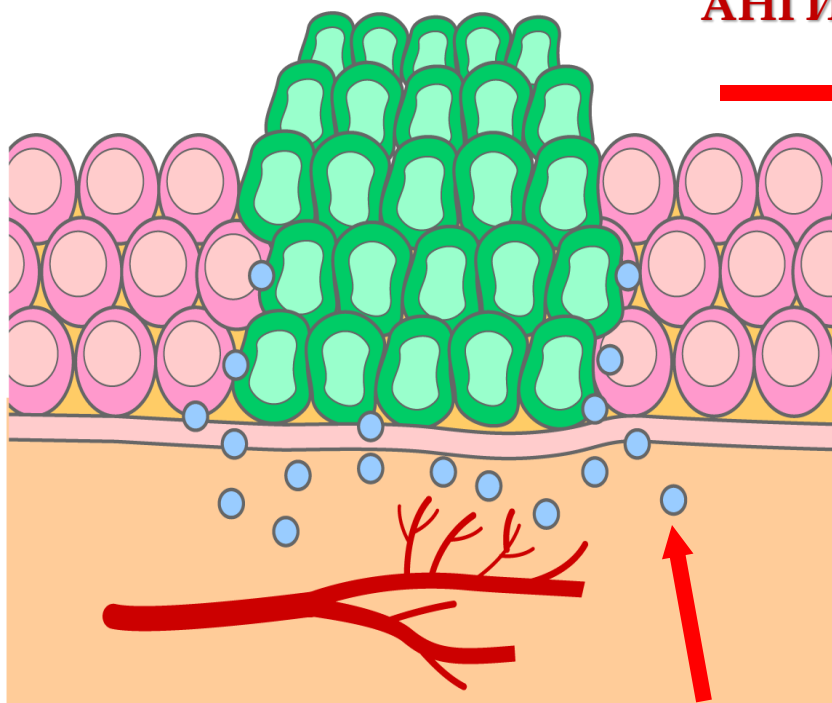
(1933.г. –2008.г)

Године 1971., Folkman поставља темеље значаја ангиогенезе за прогресију тумора.

Folkman и сарадници хипотетишу да инхибицијом раста крвних судова у туморском ткиву може да се пролонгира "успаваност" тумора. Ова хипотеза о улози ангиогенезе у расту тумора, као и потенцијални терапијски бенефит антиангиогених лекова делимично су потврђени код неких врста малигнома.

... **Ангиогенеза тумора** је процес формирања нових из већ постојећих крвних судова у потки тумора. Овај процес игра важну улогу у **расту** и **ширењу** тумора.

### АНГИОГЕНЕЗА

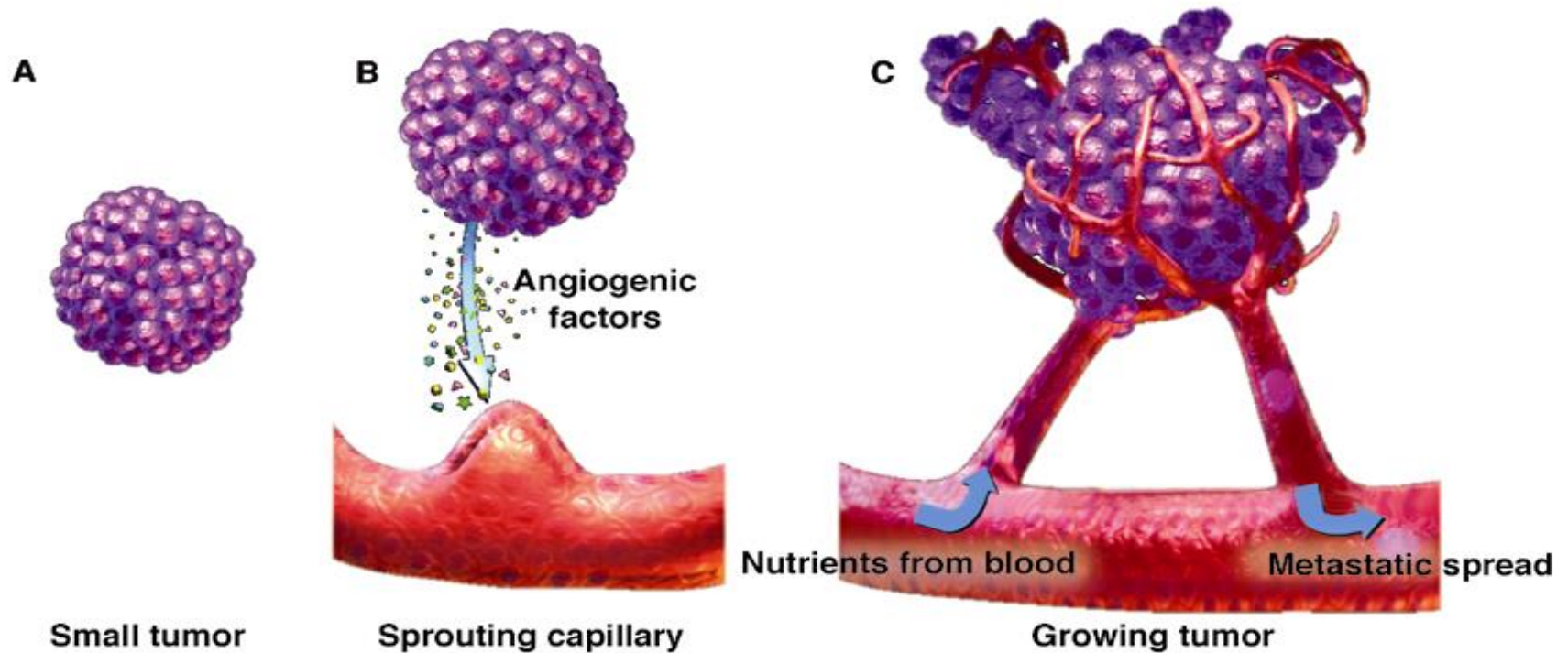


Крвни судови

Сигнални молекули

## Да запамтимо...

Нови крвни судови снабдевају малигне ћелије кисеоником и хранљивим материјама и на тај начин **омогућују да тумор расте и инвадира у околне структуре...**

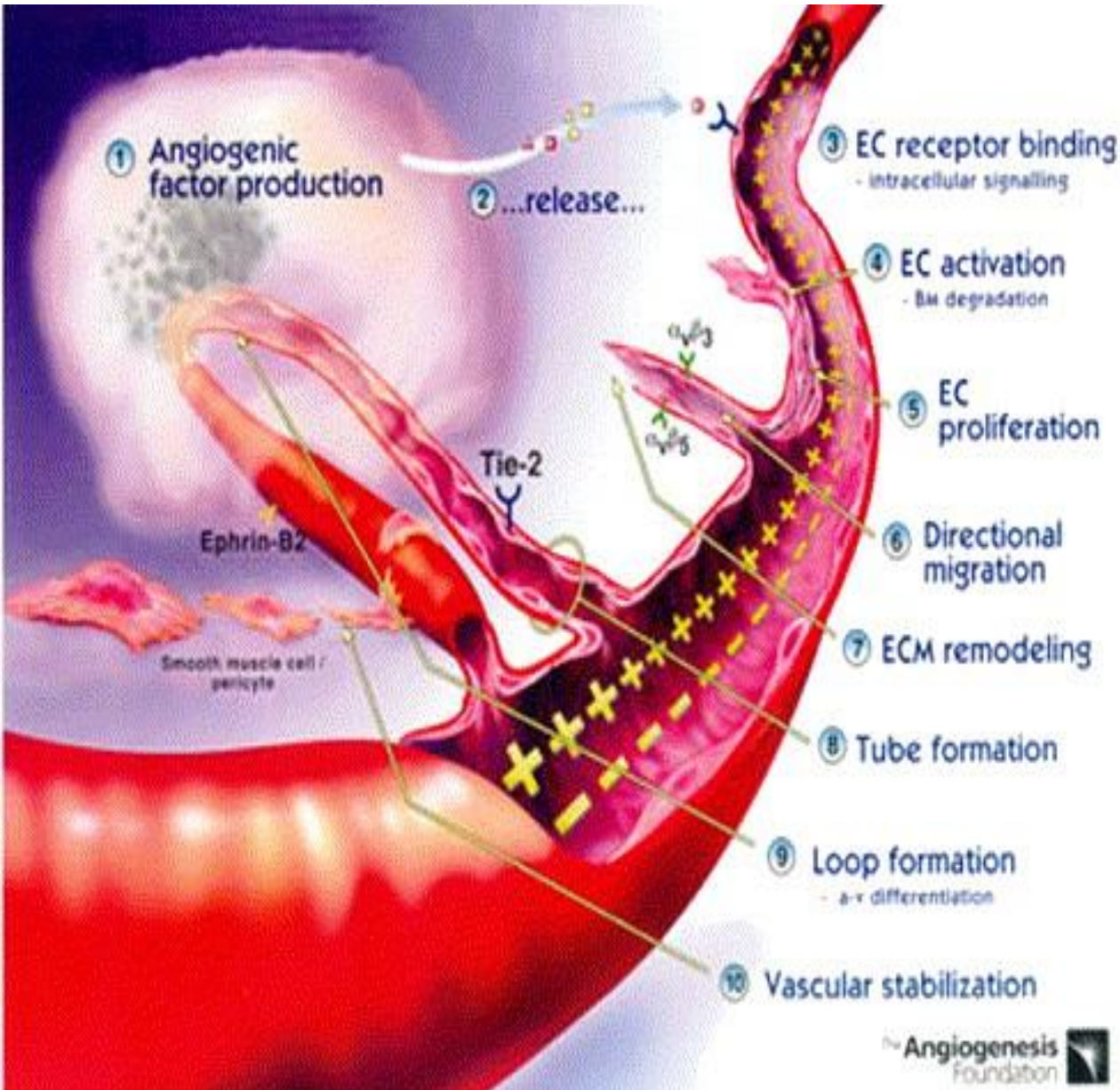


... Ови крвни судови, будући да су у директном контакту са тумором, представљају улазно место малигним ћелијама у циркулацију одакле се шире у организму и тако **формирају метастатска жаришта.**



# Главни кораци у формирању крвних судова у тумору

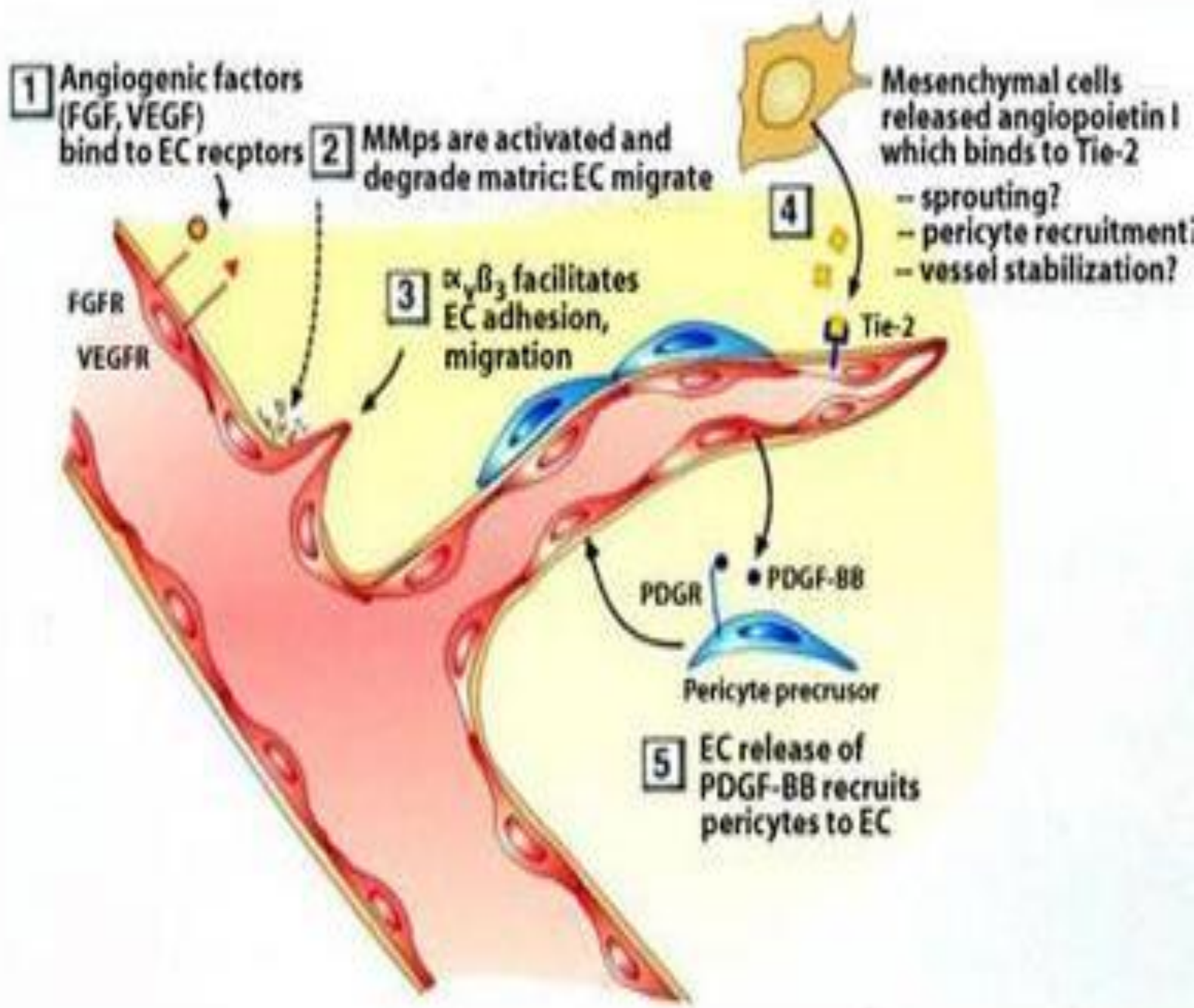
Процес ангиогенезе подразумева:



- ✓ продукцију фактора ангиогенезе и везивање ових фактора за рецепторе на ендотелним ћелијама
- ✓ активацију ендотелних ћелија
- ✓ протеолитичку разградњу базалне мембране и ванћелијског матрикса
- ✓ пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија
- ✓ пупљење и раст ендотелних трака и формирање капиларне петље
- ✓ васкуларну матурацију и стабилизацију

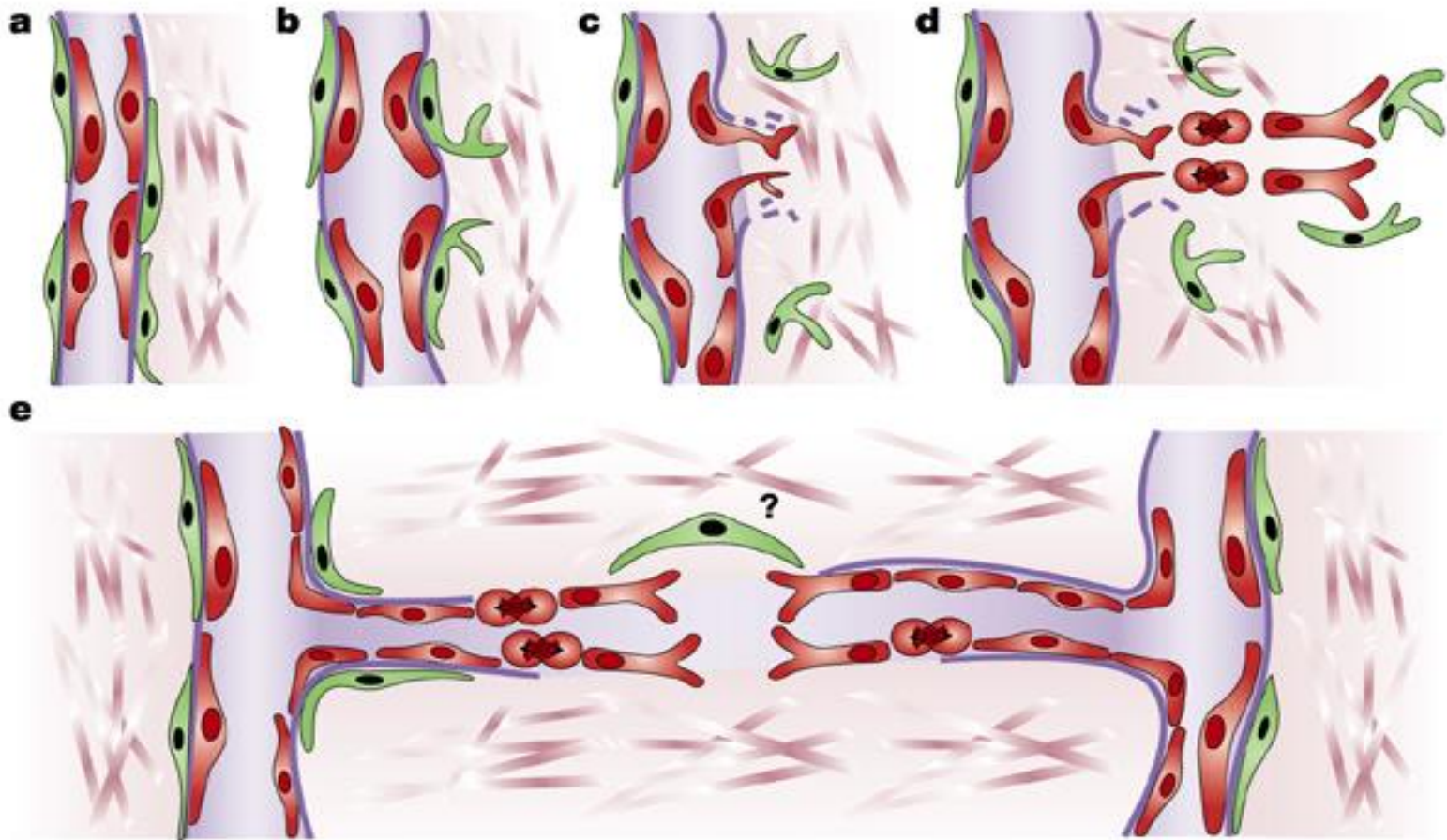
... Први корак у формирању нових крвних судова је **локализована разградња** суседне базалне мембране у саставу посткапиларне венуле. Локална протеолитичка разградња базалне мембране и ванћелијског матрикса је **последица дејства проангиогених фактора раста**. Ови фактори индукују синтезу и излазак **протеолитичких ензима** (металопротеиназе матрикса, катепсина, као и активатора урокиназе и плазминогена)...

...Следећи корак је **директно кретање/миграција ендотелних ћелија** венуле у правцу проангиогених стимулуса. Активиране ендотелне ћелије стичу **ангиогени фенотип**.



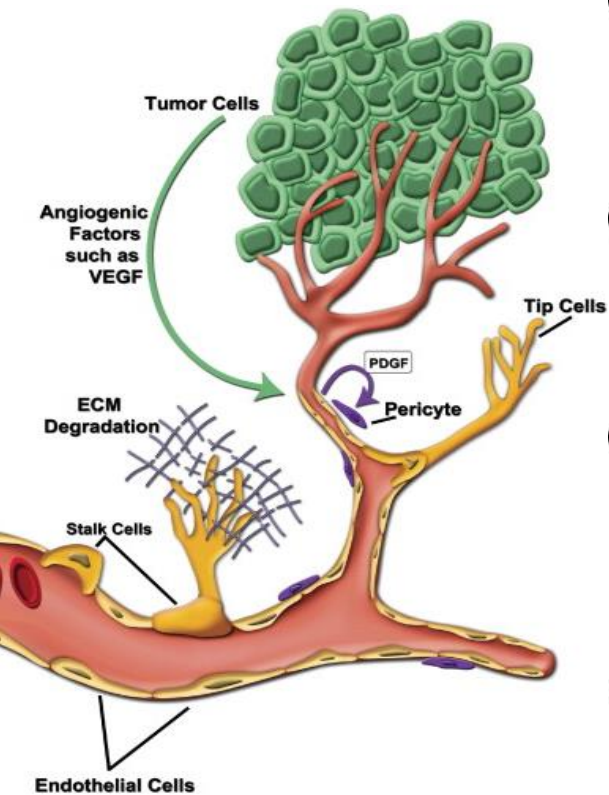


... **Пролиферацијом ендотелних ћелија** формира се пупољак који расте од постојећег крвног суда као солидна трака. Затим следе формирање лумена, спајање са другим капиларним тубусом, формирање капиларне петље и успостављање циркулације.



Специјализоване ендотелне ћелије, на крајевима новонасталих капиlara, зову се "*tip*" ћелије. Ове ћелије се међусобно спајају и на тај начин формирају мрежу нових капиlara.

(1)



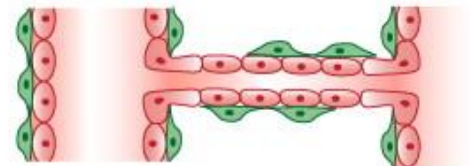
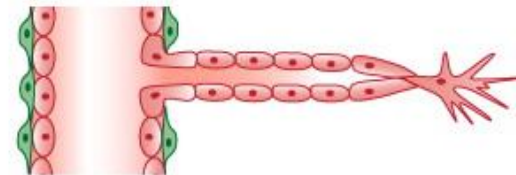
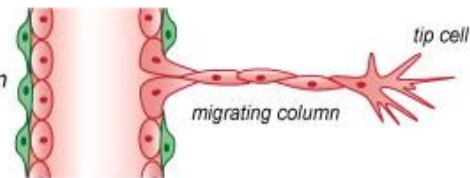
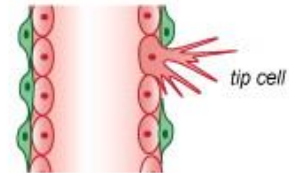
(A) pre-existing blood vessel

(B) tip cell formation

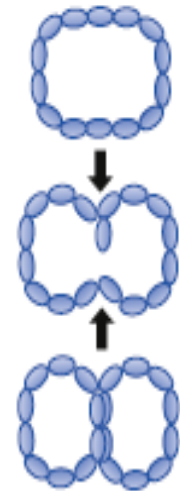
(C) endothelial sprout formation

(D) lumen formation

(E) maturation



(2) Intussusceptive growth

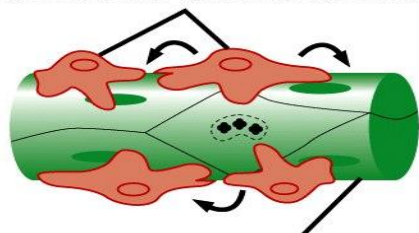




# Улога **перицита** у ангиогенези

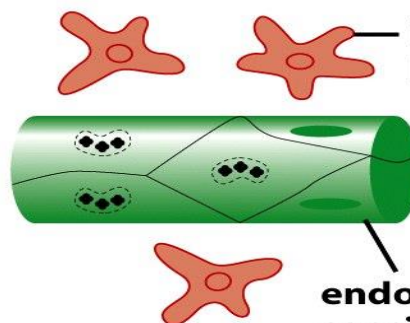
Перицити су важне компоненте крвних судова које модулишу функцију ендотелних ћелија и критичне су за развој зреле васкуларне мреже. Перицити регулишу васкуларну функцију укључујући **дијаметар крвног суда** (и на тај начин проток крви) и **васкуларну пропустљивост**. Пружају и **механичку потпору** и **стабилност зида крвног суда** и омогућају **преживљавање ендотелних ћелија** директним међућелијским контактом и паракриним дејством.

**pericytes provide survival functions to endothelial cells**



**endothelial cells are partially resistant to VEGF-R inhibition and are less sensitive to chemotherapy**

**targeting pericytes  
e.g., via PDGF receptor  
inhibitors**



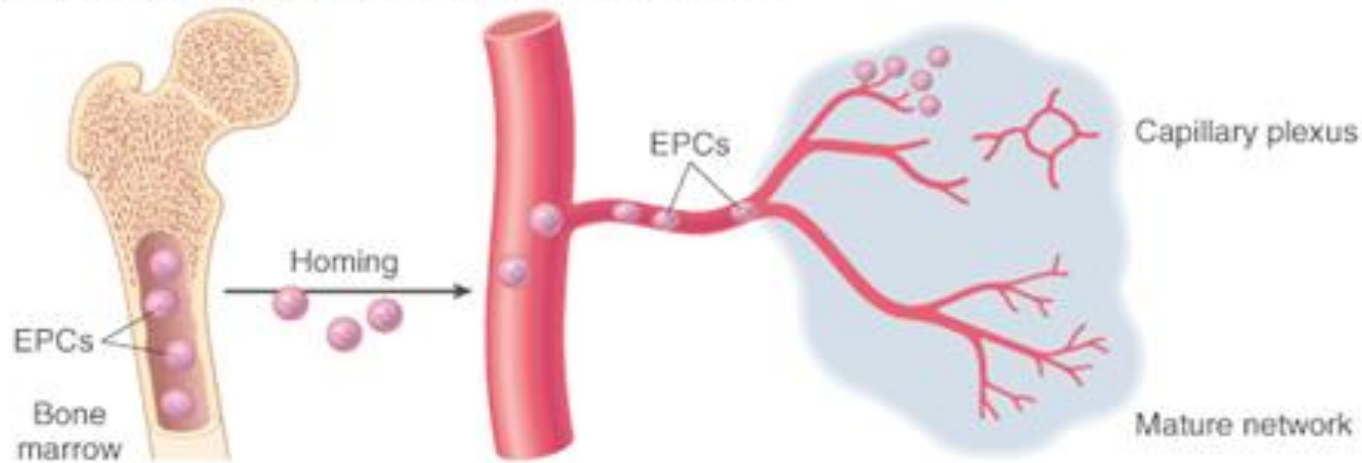
**impaired support or protection by pericytes**

**endothelial cells are very sensitive to VEGF-R inhibition and chemotherapy**

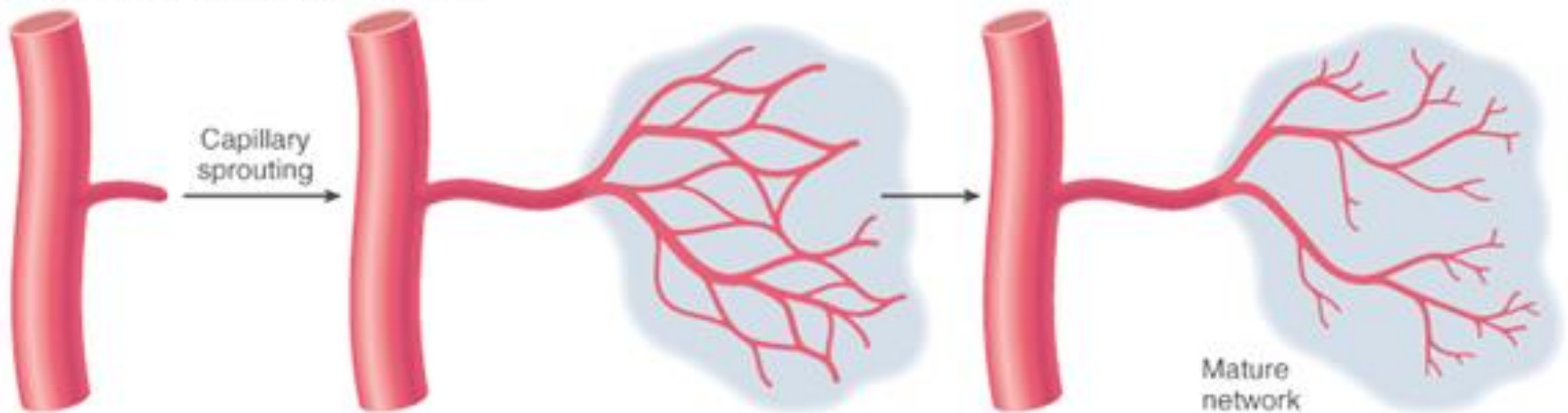
# Крвни судови тумора

# Тумори на више начина остварују сопствено снабдевање крвљу...

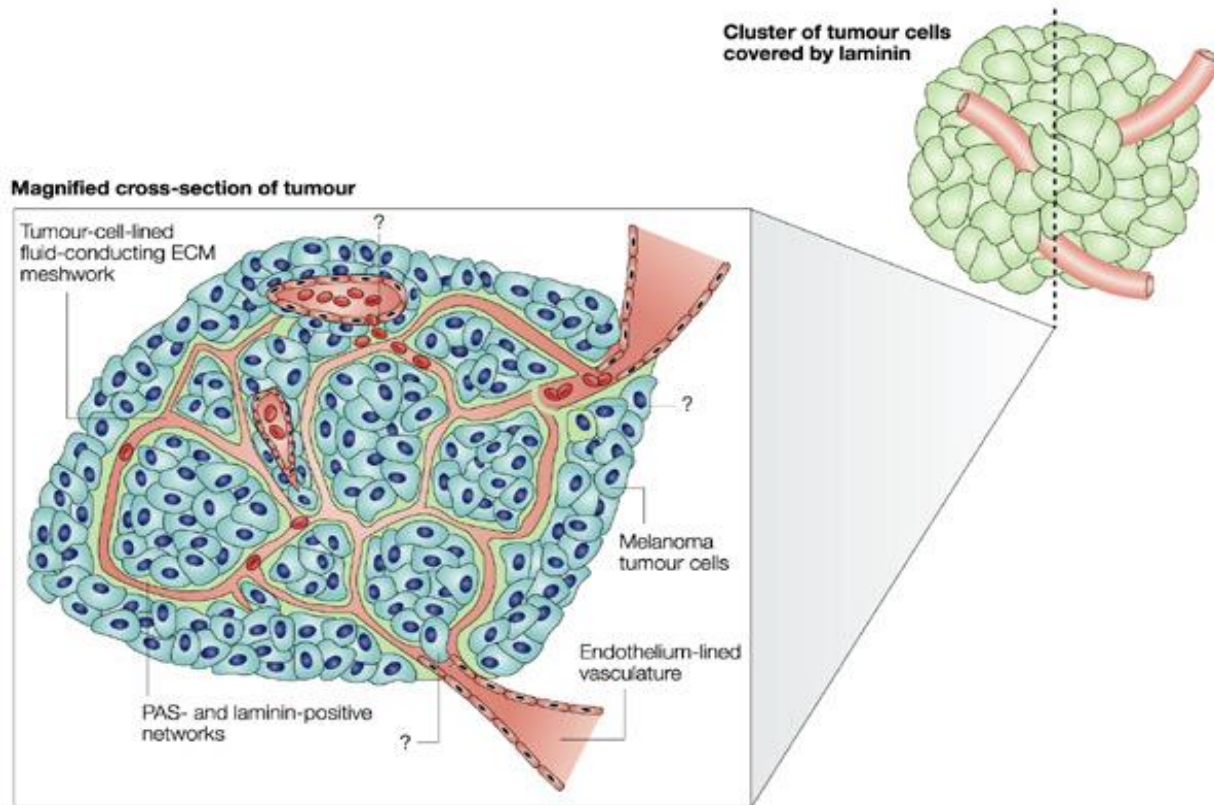
A. Angiogenesis by mobilization of EPCs from the bone marrow



B. Angiogenesis from pre-existing vessels



... Малигни меланоцити, као и макрофаги, показују изражену пластичност односно способност да дедиферентују у ћелије сличне ендотелним ћелијама и на тај начин омогућују формирање сопствене васкуларне мреже (феномен познат као **васкуларна мимикрија**)



# Крвни судови тумора показују различите структурне абнормалности

Healthy vessel



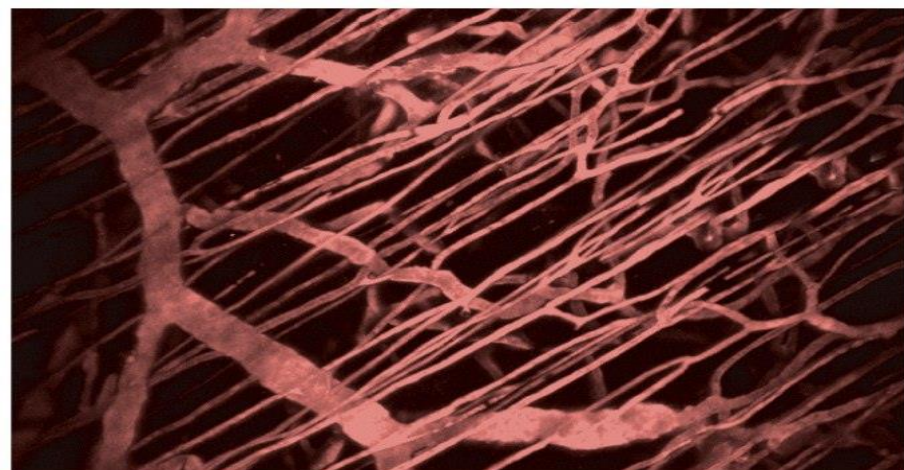
Well organized  
Defined arterioles and venules  
Regularly distributed  
Non-dilated  
Non-permeable  
Mature and coated with mural cells  
Low interstitial pressure  
Complete basement membrane  
Endothelial cell and mural cell  
Appropriate expression of markers  
Normal rate of blood flow

Tumor vessel

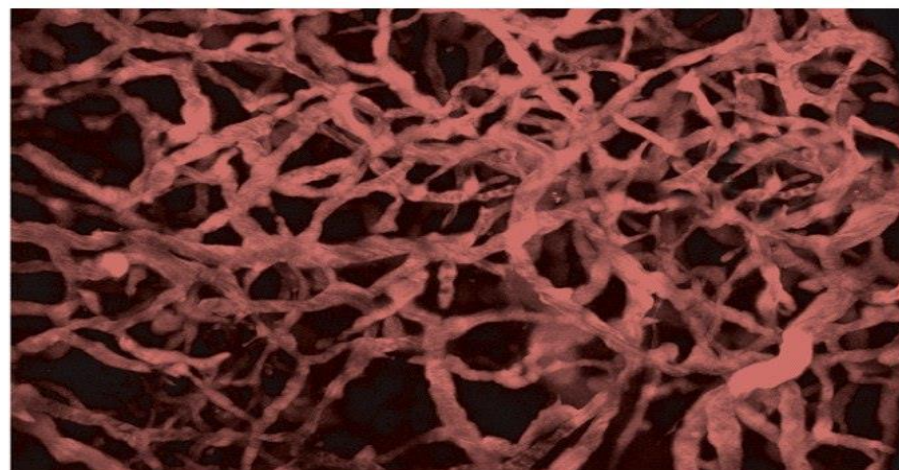


- ★ Disorganized
- ★ Undefined arterioles and venules
- ★ Unevenly distributed
- ★ Dilated
- ★ Highly permeable
- ★ Premature and lack of mural cells
- ★ High interstitial pressure
- ★ Lack basement membrane
- ★ Mosaic cells
- ★ High or low expression of markers
- ★ Sluggish blood flow

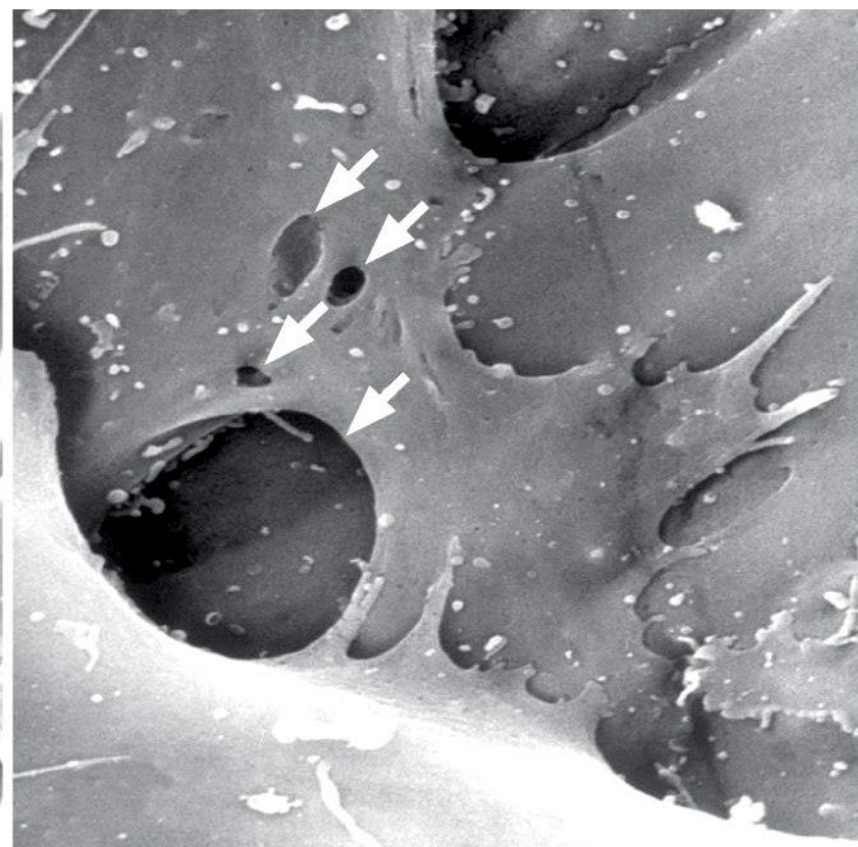
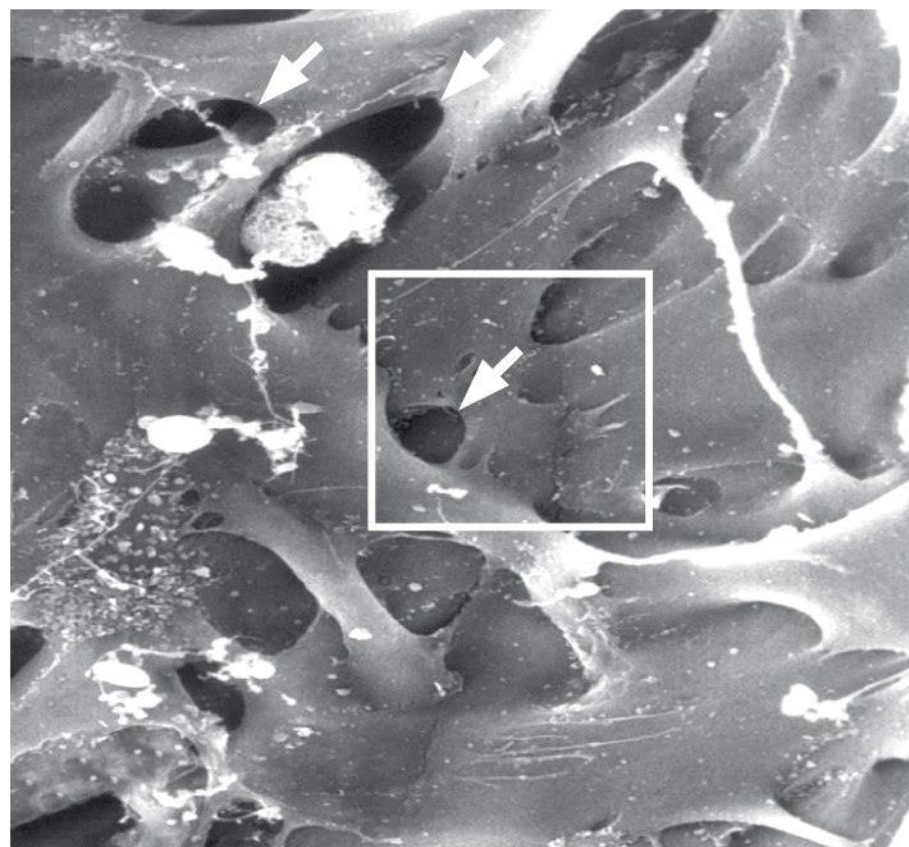




**normal tissue**



**tumor**

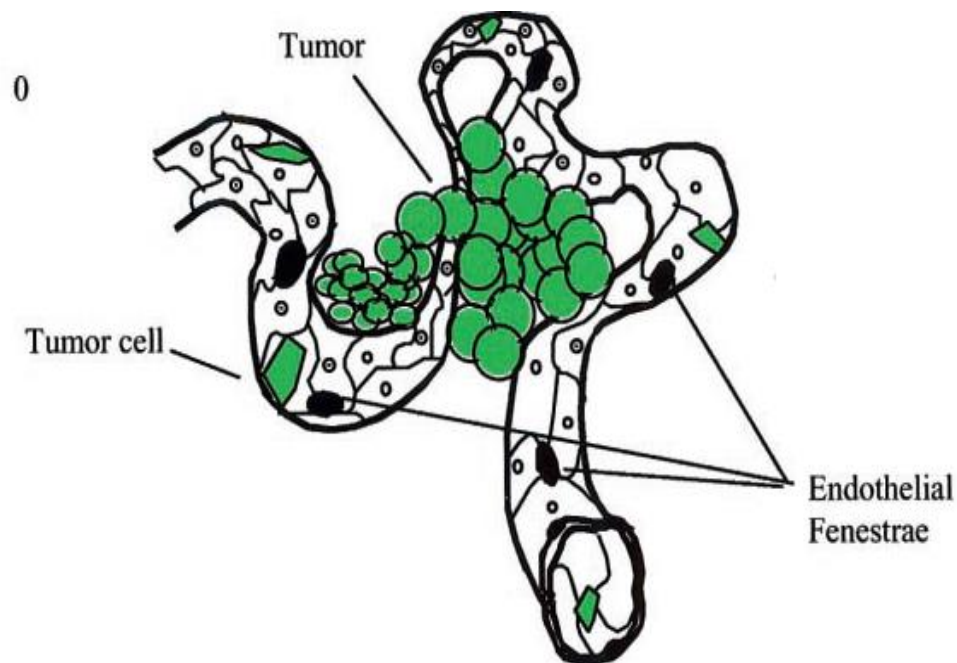


Механизам ангиогенезе може бити орган- и/или тумор-специфичан.

У неким туморима као што је меланом, делови зида крвног суда могу да садрже делимично (мозаични крвни судови) или потпуно (васкуларна мимикрија) малигне меланоците.

Зидове ових крвних судова чине туморске и ендотелне ћелије. У периферним крвним судовима обично су функционални перицити одсутни или ретко заступљени, док је базална мембрана непотпуна.

Крвни судови тумора су дилатирани и увијени, а због **непотпуне базалне мембране** и присуства **фенестри** (трансцелуларних отвора), ови крвни судови су **екстремно пропустљиви**.



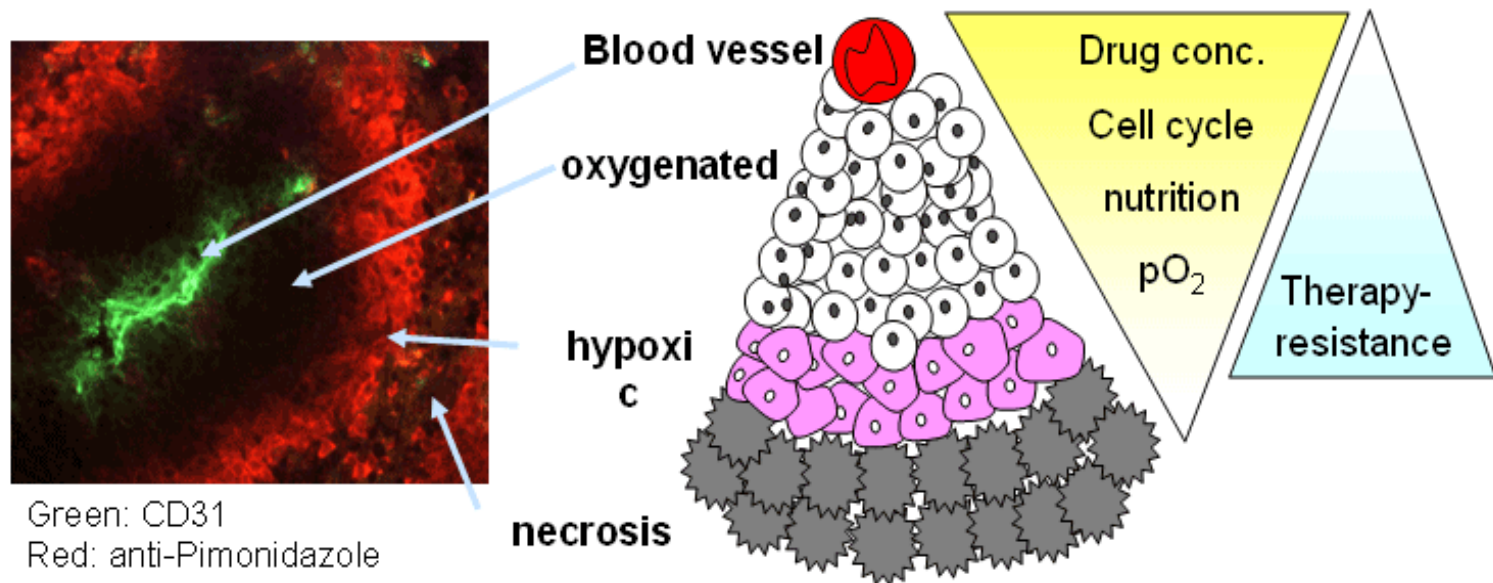


# Дисфункција крвних судова тумора

**Структурни поремећаји** крвних судова су прилично **променљиви** унутар солидне туморске масе. **Хетерогеност** се огледа и у **густини крвних судова**.

**Проток крви** у туморској средини је такође **хетероген**. У неким областима проток крви је спор због чега су суседне области лишене кисеоника и хранљивих материја што у овим областима изазива изражену **хипоксију**.

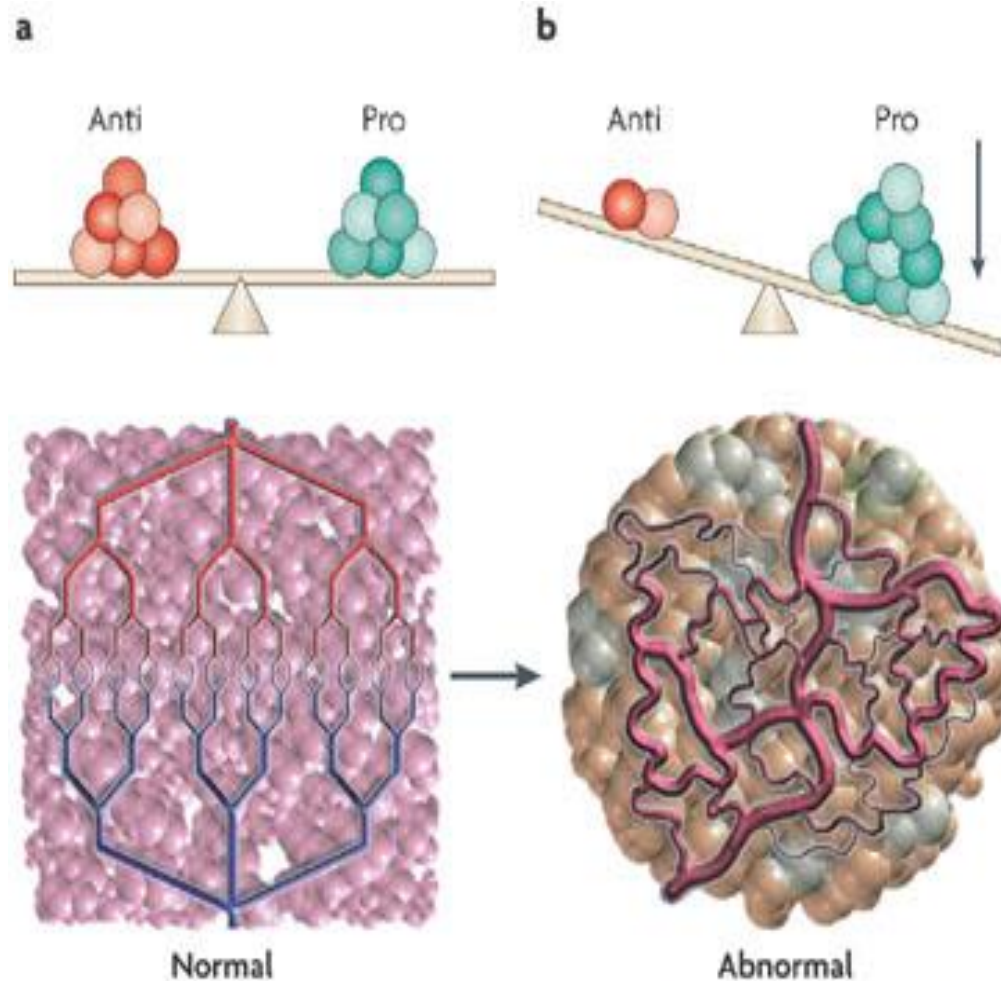
**Повећана пропустљивост** крвних судова тумора резултира екстравазацијом протеина плазме, као и течности у екстрацелуларној микросредини унутар тумора што за последицу има **повећање интерстицијалног притиска**.



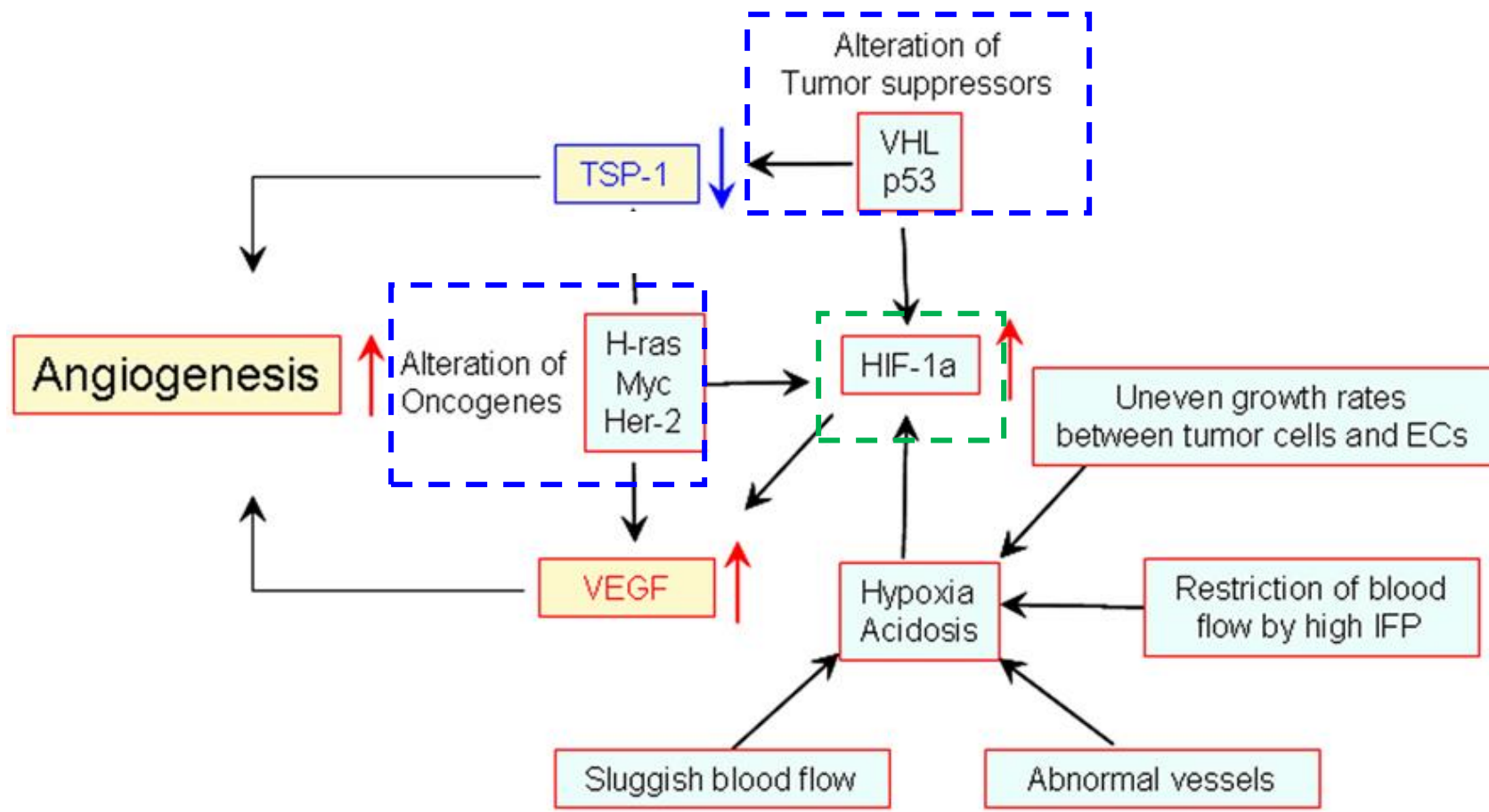
# Медијатори ангиогенезе

# Ангиогени фенотип тумора

Почетак процеса ангиогенезе у тумору је у вези са променама у локалном балансу између **проангиогених** и **антиангиогених** молекула.

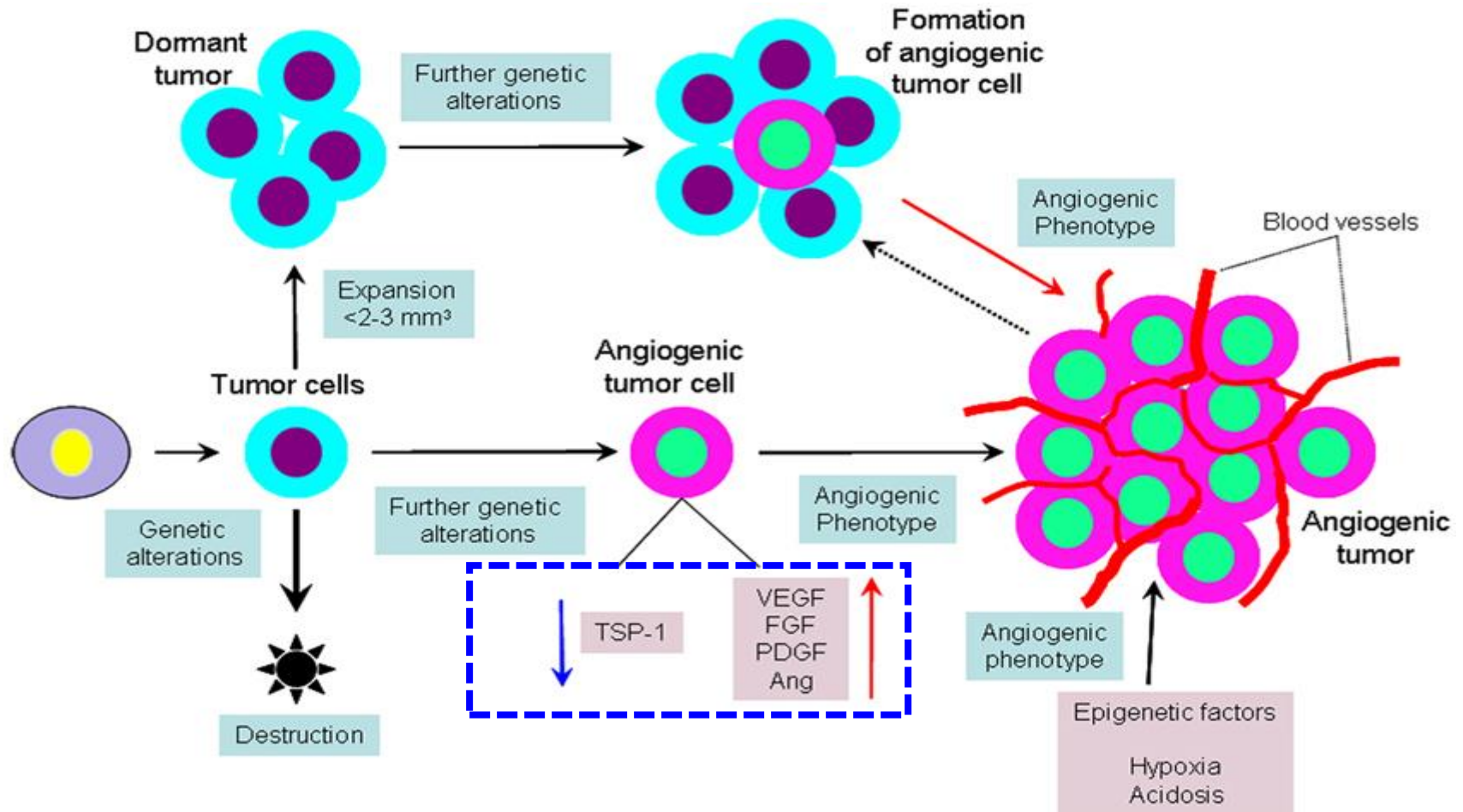


... Туморска ангиогенеза се одвија у две фазе. У првој фази, малигне ћелије експримирају **ангиогени фенотип** који је резултат "**ангиогеног свича**" (преваге проангиогених фактора). Активација онкогена (HER-2) и/или мутација и инаktivација антионкогена (p53) индукују експресију гена одговорних за ангиогенезу. У другој фази, малигне ћелије су додатно изложене утицајима **различитих фактора стреса** у туморској средини који стимулишу ангиогенезу.



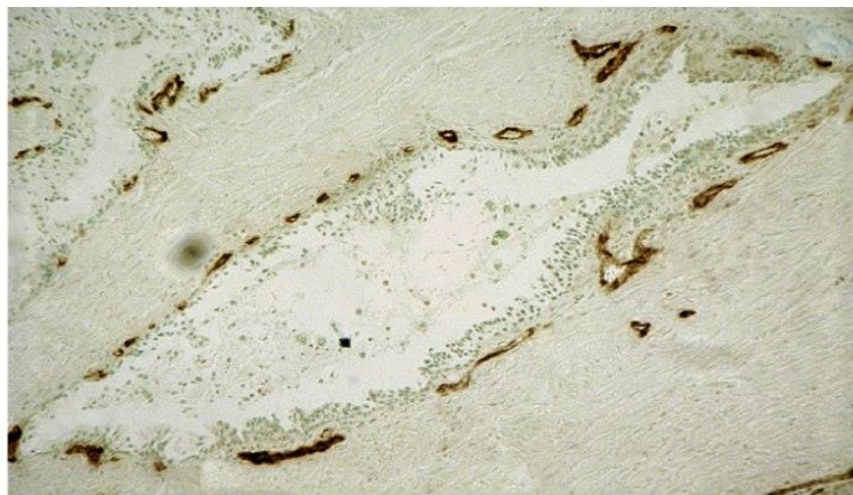
# Механизми одговорни за ангиогени фенотип малигних ћелија

За индукцију неоангиогенезе неопходна је с једне стране појачана експресија једног или више проангиогених фактора као што је VEGF, и с друге стране смањена експресија једног или више ендогених инхибитора као што је тромбоспондин-1.

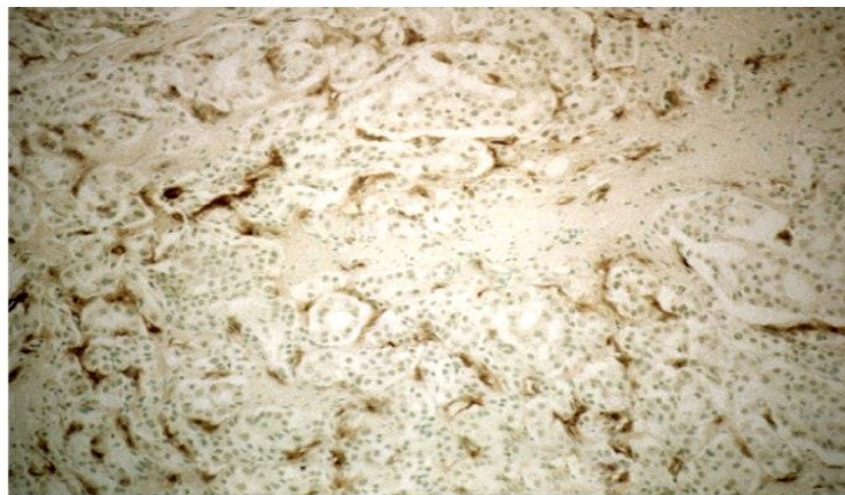




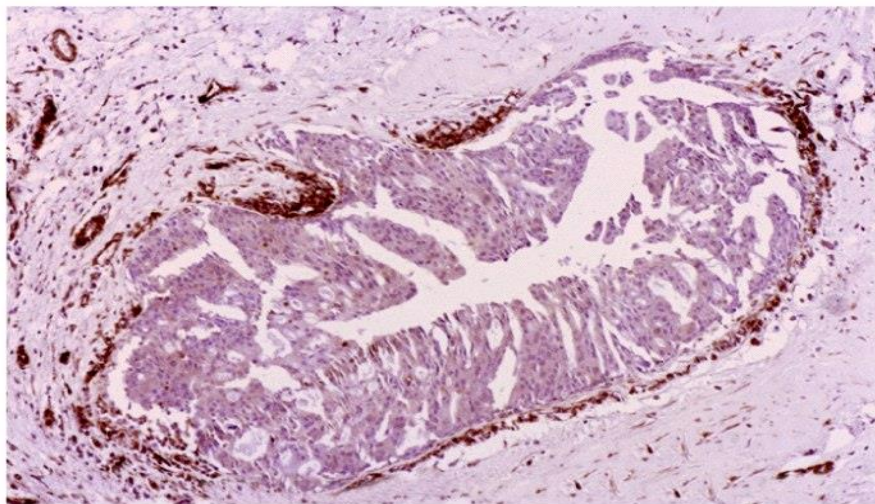
Ангиогени фенотип тумора је у блиској вези са **повећаном пролиферацијом** малигних ћелија, као и са **стицањем инвазивног и метастатског потенцијала**.



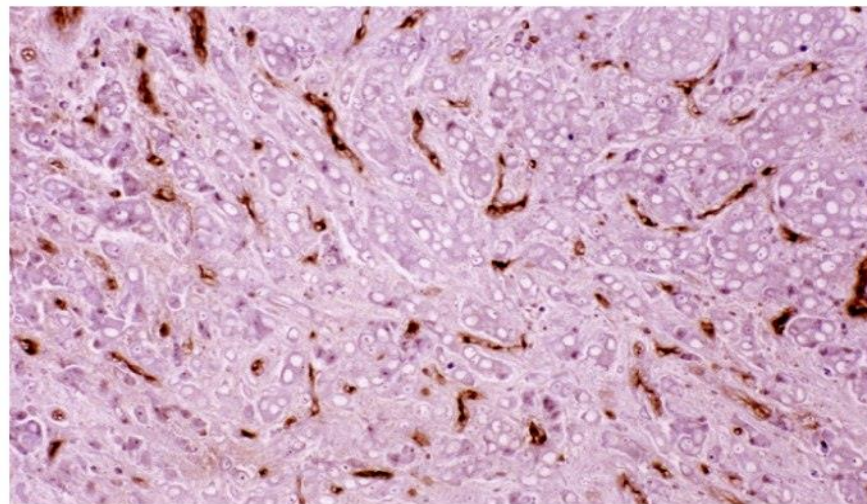
**prostate cancer (PIN; *in situ*)**



**invasive prostate cancer**



**human breast cancer (*in situ*)**



**invasive human breast cancer**

# Фактори регулације ангиогенезе

Специфичне стадијуме ангиогенезе регулишу:

.... **адхезивни молекули** (интегрини, селектини и кадхерини) који омогућују адхезију ћелија за компоненте ванћелијског матрикса.

.... **протеини ванћелијског матрикса** (колагени, фибронектин, ламинин и протеогликани) који су одговорни за интеракције ћелија и матрикса.

... **ензими ванћелијског матрикса** (металопроотеиназе матрикса) који узрокују протеолизу компоненти ванћелијског матрикса.

... **цитокини** (IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF).

... **фактори раста** (VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , EGF и ангиопоетин-1) који представљају проангиогене факторе.

Познато је неколико различитих фамилија фактора раста (проангиогених фактора).

Неки фактори, као што је фактор раста васкуларног ендотела (VEGF) свој ефекат остварује директно.

Индиректни проангиогени фактори су цитокини: TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-6, фактори стимулације гранулоцитне лозе, хемокини (SDF-1, енгл. *Stromal Cell-Derived Factor-1*), као и хормони.



Примарни ангиогени фактори, који делују директно, су **фамилија VEGF** и њихови рецептори са тирозин киназном активношћу, **ангиопоетини** (ангиопоетин-1 и -2) и њихови рецептори (tie-2), као и **Notch сигнални рецептори** (Notch-4) и њихова фамилија лиганада (DLL4, енгл. *Deltalike ligand-4*). Сви ови неведени фактори показују **висок** (али не апсолутни) **степен специфичности** за ендотелне ћелије, а нарочито за активиране ендотелне ћелије.

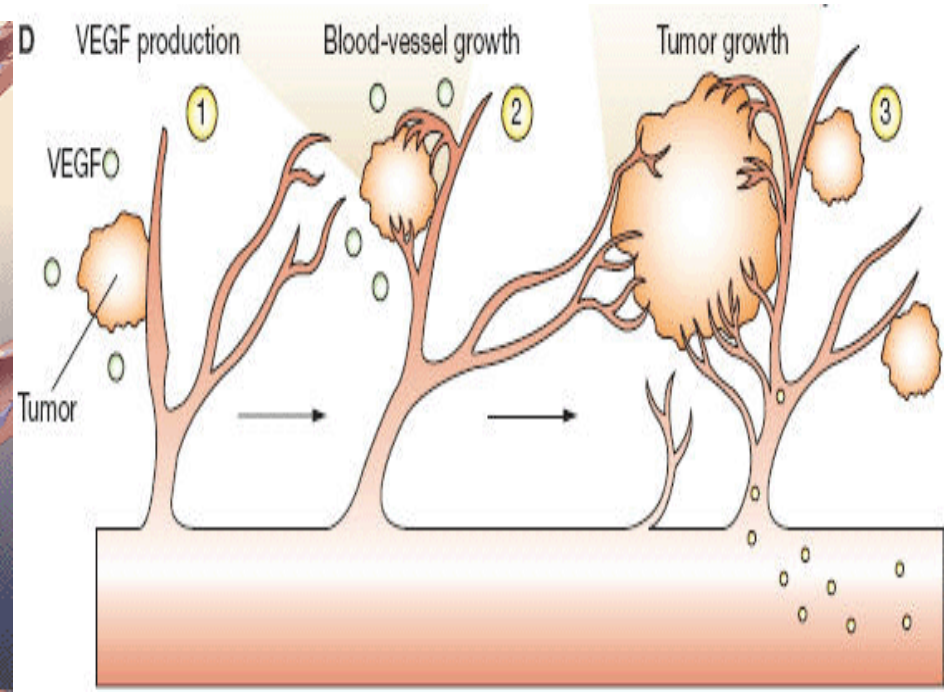
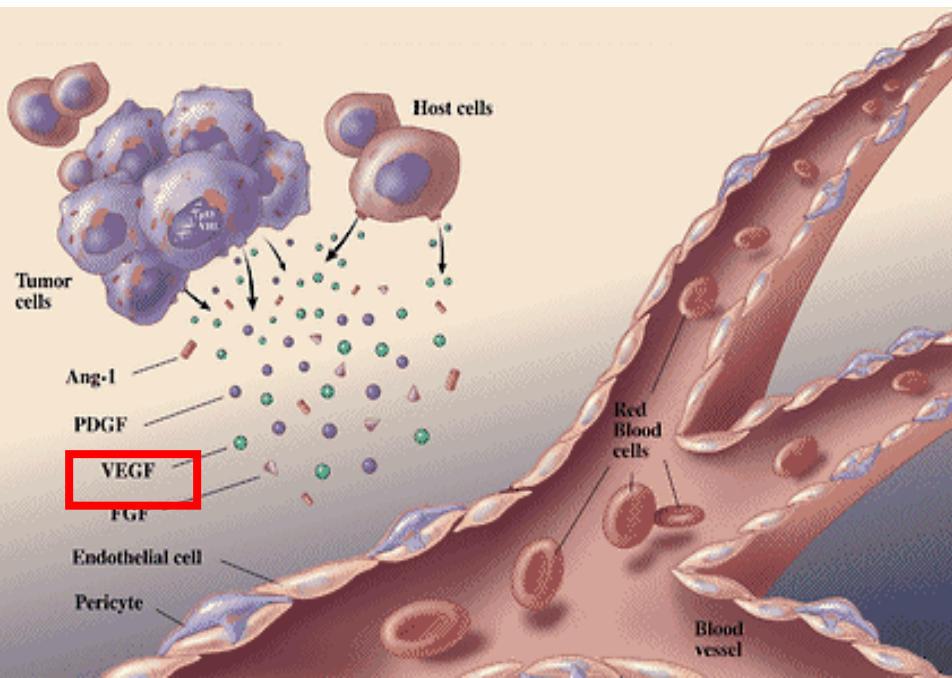
Други тип рецептора са тирозин киназном активношћу који је такође укључен у ангиогенезу је **Eph рецептор за ephrin-B2**. Ephrin-B2 је трансмембрански лиганд који регулише функцију *tip* ендотелних ћелија укључених у пупљењу и гранању нових капилара. Овај трансмембрански лиганд учествује и у регулацији функције VEGF-R2.

# Ангиогени фактори

Један од најзначајних и најјачих стимулатора ангиогенезе је

**фактор раста васкуларног ендотела (VEGF, енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*).**

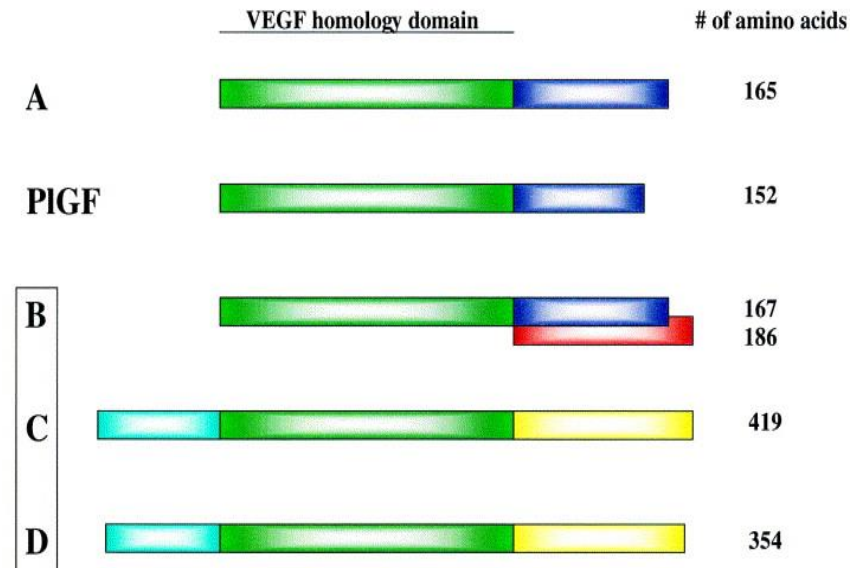
Кључан је медијатор ангиогенезе тумора.



# VEGF (VEGF-A)

Фамилија VEGF обухвата: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и фактор раста плаценте (PlGF, од енгл. Placental Growth Factor).

## VEGFs

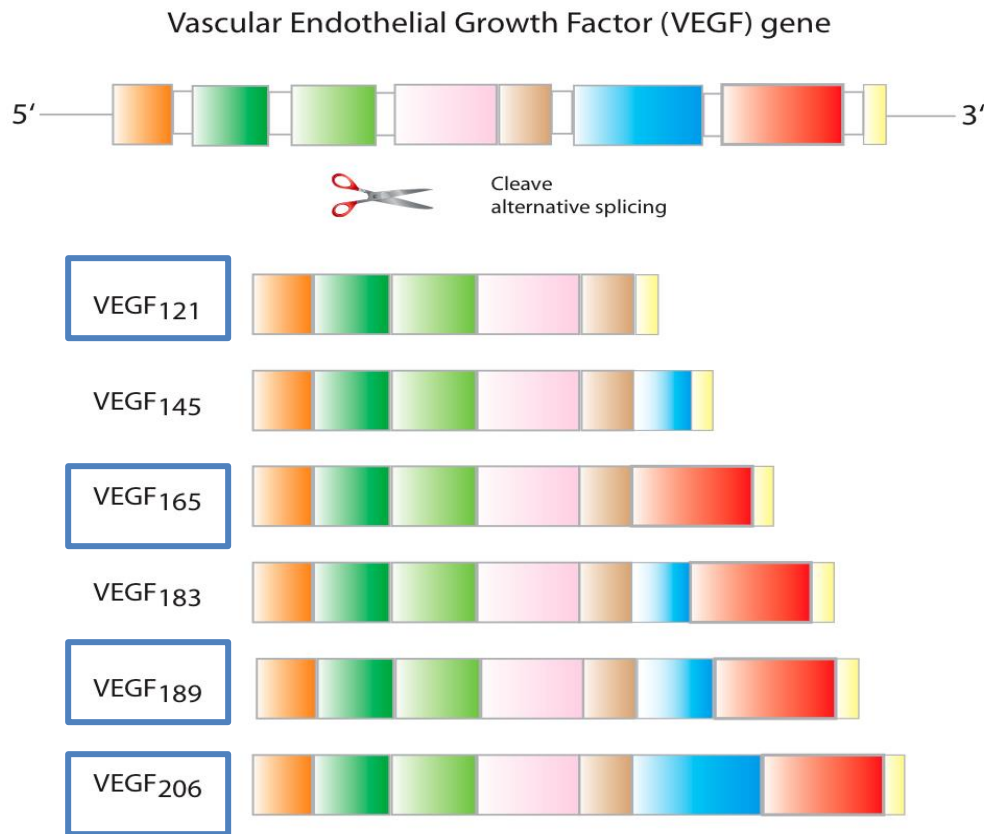


VEGF је најпре откривен као фактор васкуларне пропустљивости.

Повећана пропустљивост крвних судова је последица присуства унутарћелијских фенестри, смањене потпоре перицита (које представљају другу баријеру за васкуларну пропустљивост), и/или присуства специјализованих ендотелних органела које се зову **везикуловакуларне органеле**.

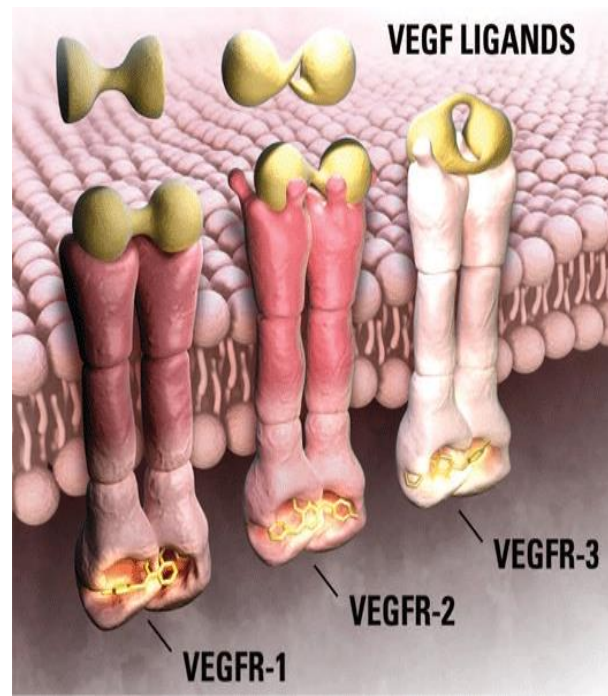
VEGF је високо специфичан и снажан митоген ендотелних ћелија.

**Алтернативним сплајсингом** гена за VEGF настају неколико изоформи: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> и VEGF<sub>206</sub>. **VEGF<sub>121</sub>** је најкраћа изоформа која је присутна у циркулишућем облику, док су **VEGF<sub>189</sub>** и **VEGF<sub>206</sub>** везани за површину ћелија или су секвестрирани у ванћелијском матриксу у инактивној форми и под утицајем протеаза се активирају. **VEGF<sub>165</sub>** је такође везан за површину ћелија али је присутан и у циркулишућој форми. Сматра се да су VEGF<sub>121</sub> и VEGF<sub>165</sub> изоформе главни медијатори ангиогенезе.



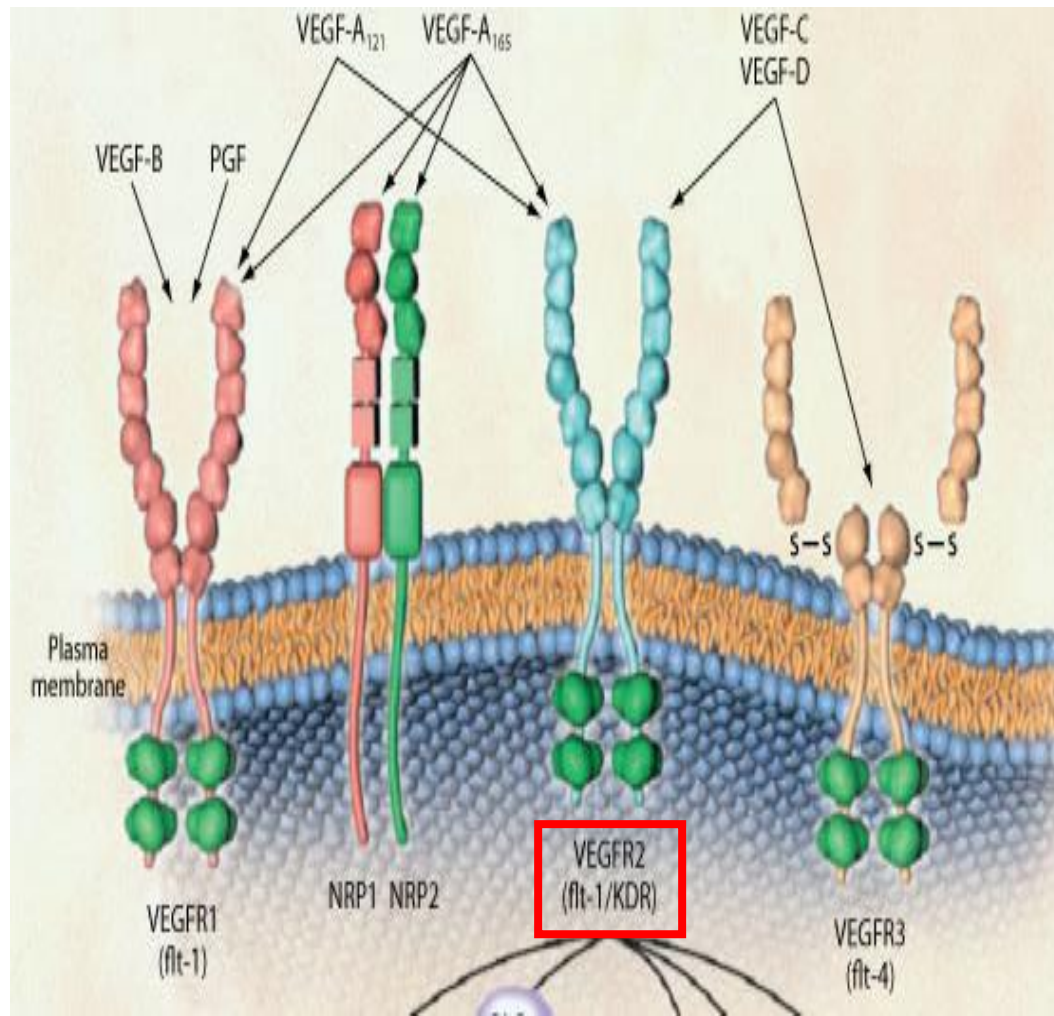
# Рецептори за VEGF

Постоји три типа рецептора са тирозин киназном активвношћу: **VEGFR-1**, **VEGFR-2** и VEGFR-3. VEGFR-1 и VEGFR-2 исказују ендотелне ћелије крвних судова, док VEGFR-3 експримирају ендотелне ћелије лимфних судова и за овај рецептор се везује VEGF-C који игра важну улогу у лимфангиогенези.

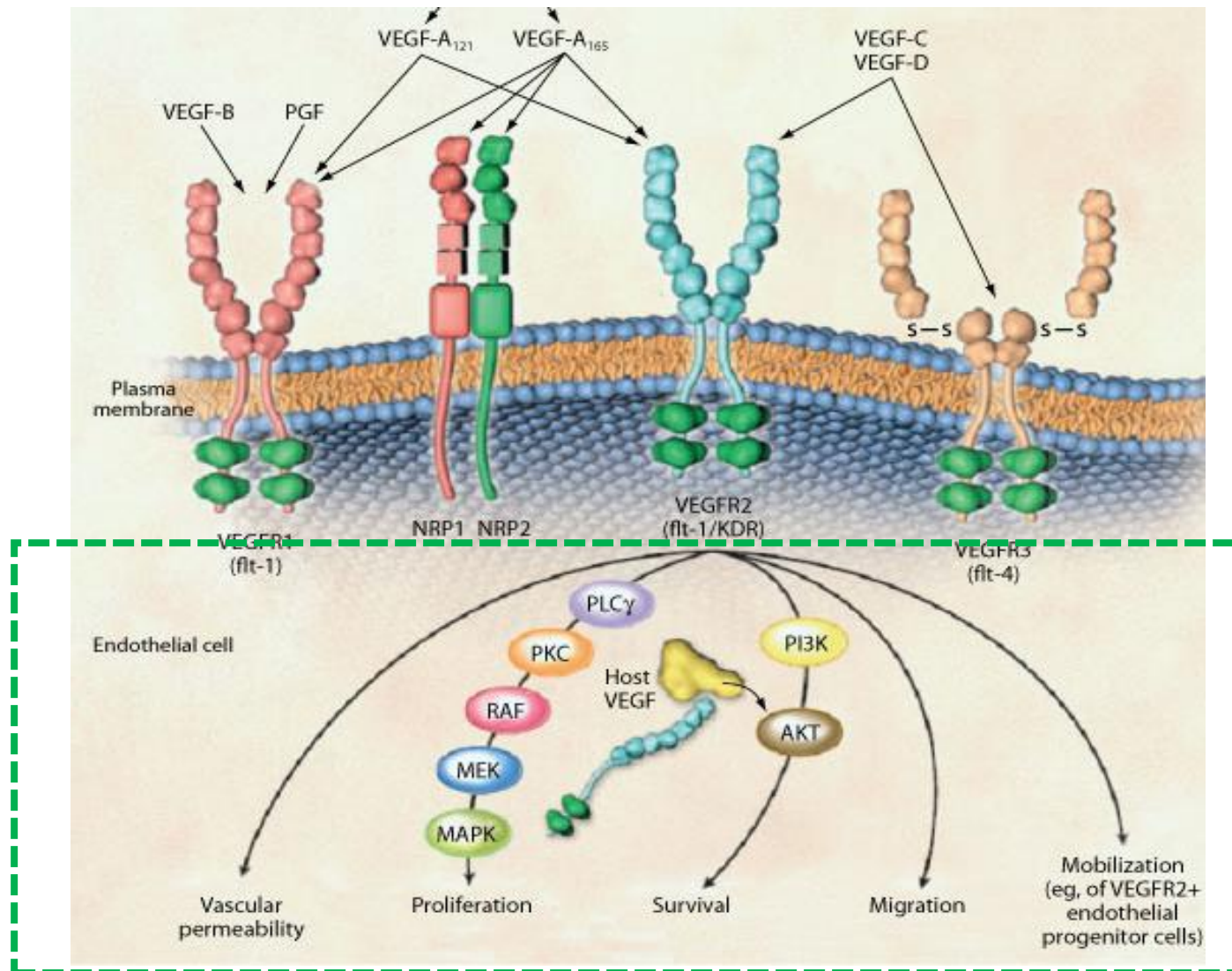


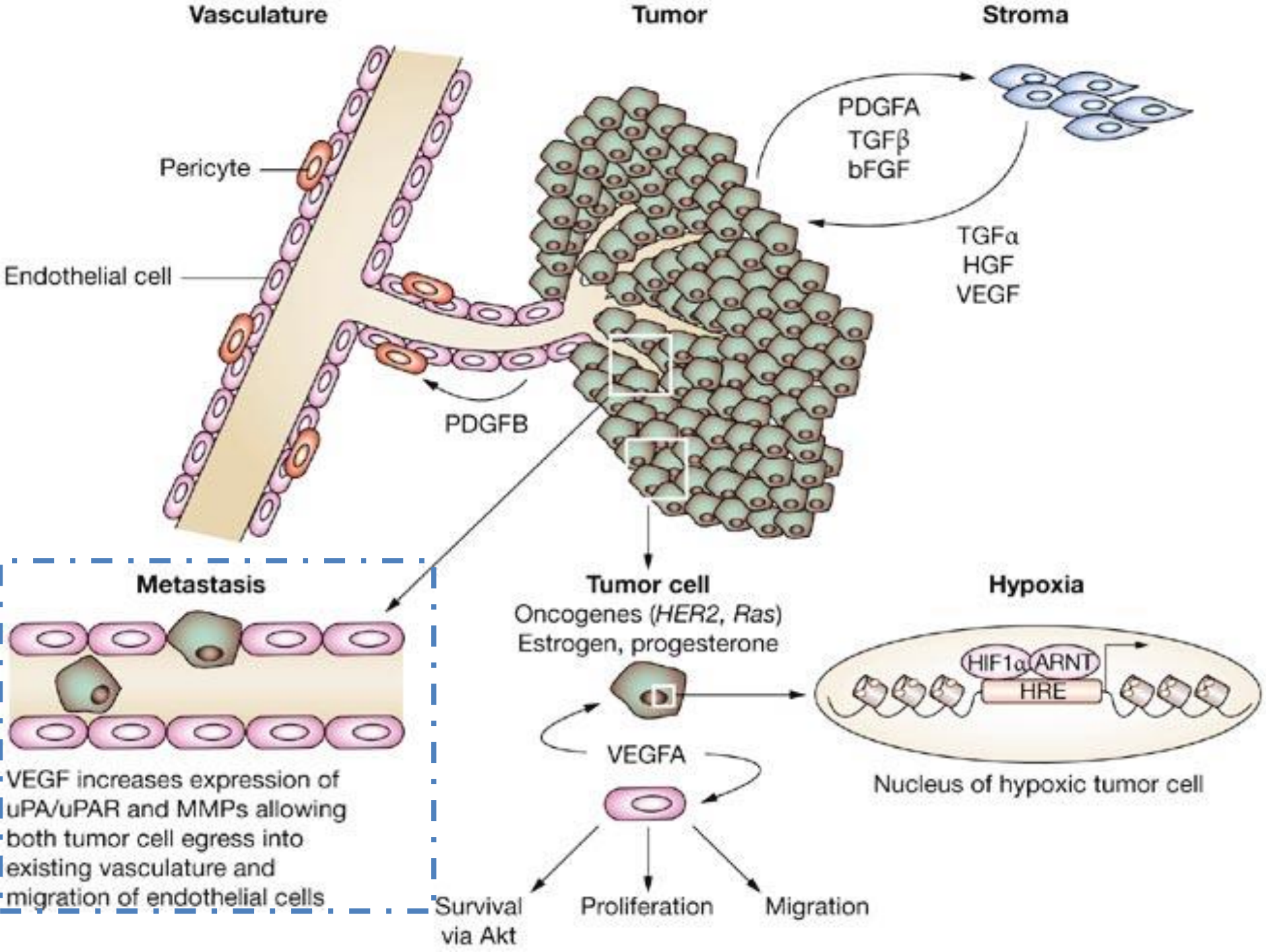


**Главни сигнални рецептор** у ангиогенези је **VEGFR-2**, док су сигнали са VEGFR-1 слабији. Претпоставља се да солубилна форма VEGFR-1 служи као негативни регулатор у физиолошкој ангиогенези. **Неуропилини** (неуропилин-1 и неуропилин-2) се везују за дуже изоформе VEGF.



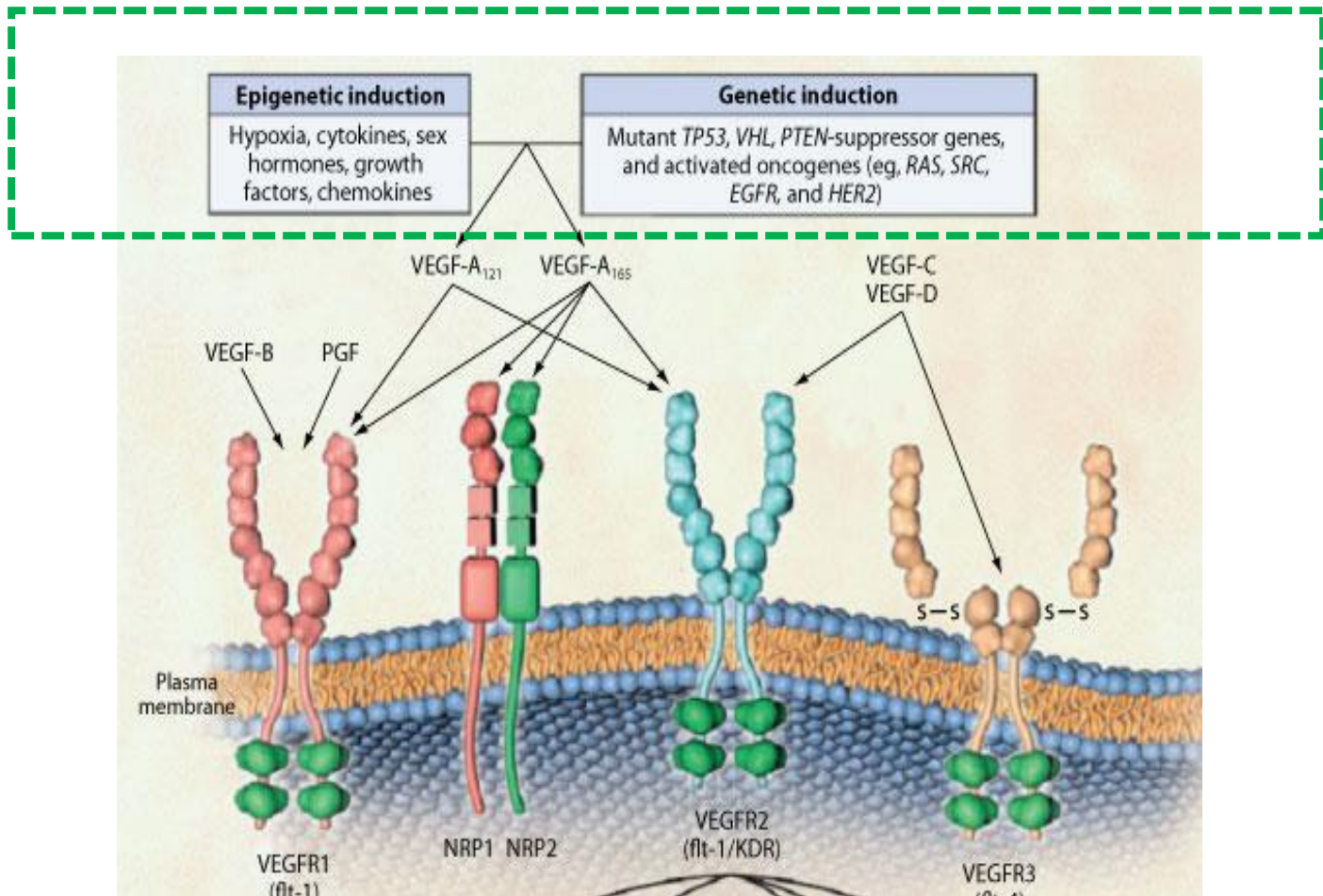
# Улога VEGF у ангиогенези тумора



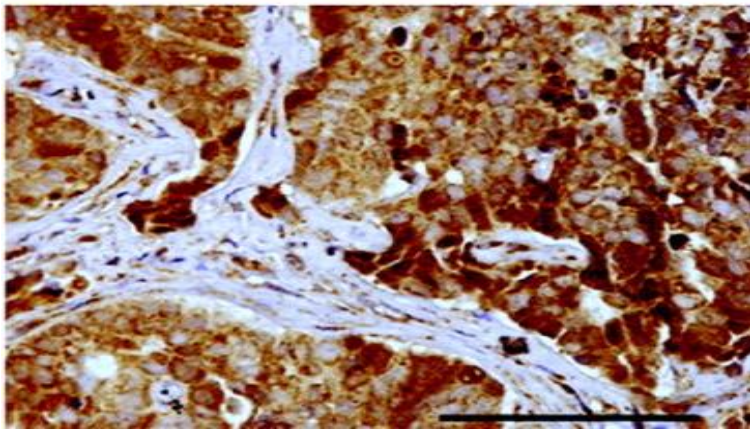
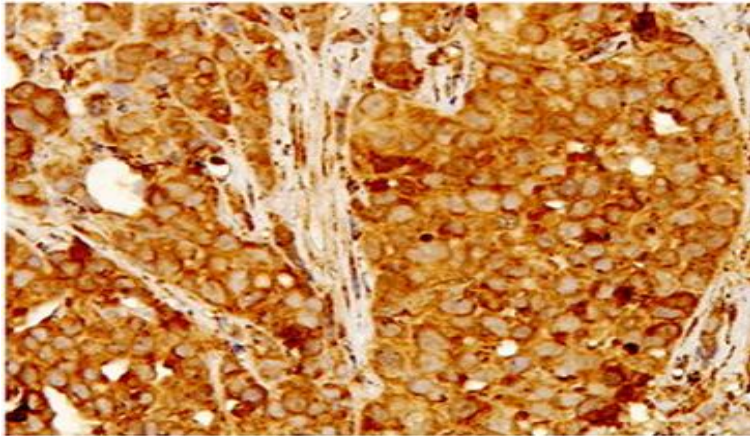
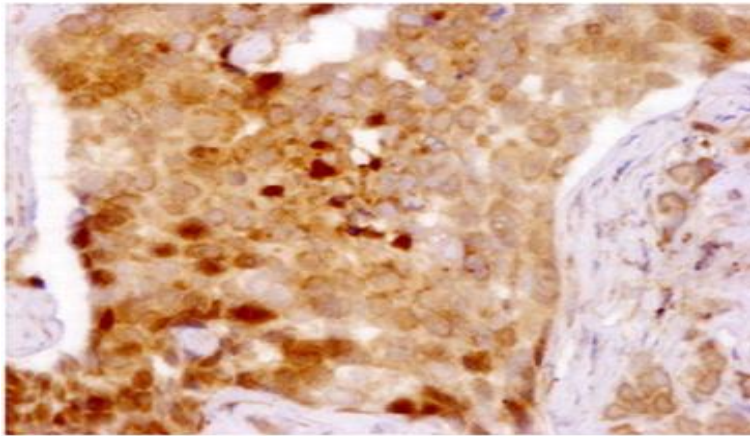




... VEGF продукују многе врсте ћелија, као што су туморске ћелије, макрофаги, глаткомишићне ћелије крвних судова и фибробласти. VEGF је **појачано експримиран** у многим туморима код људи у односу на нормално ткиво.



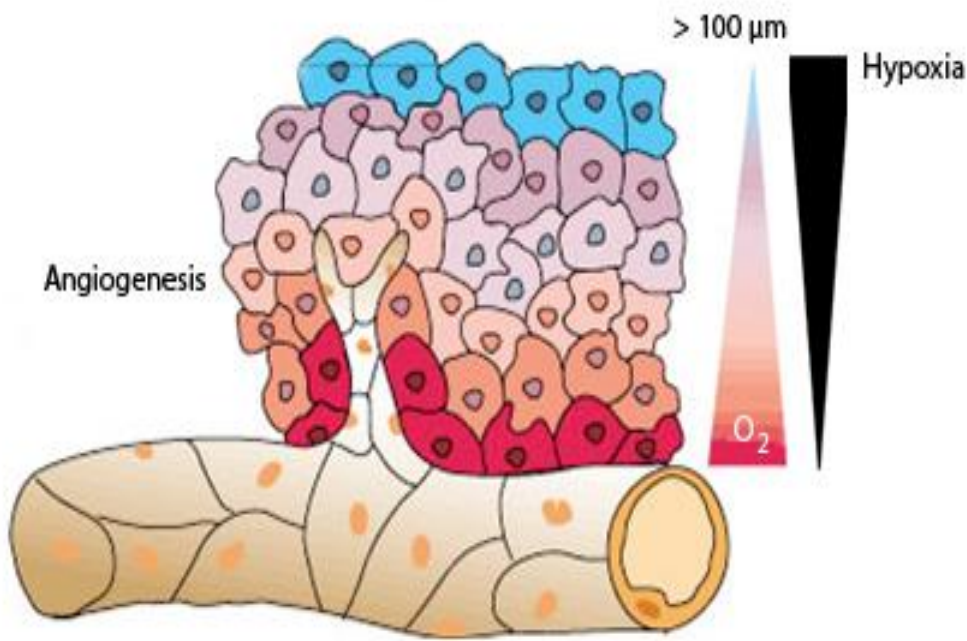
VEGF



Експресија VEGF у туморском  
ткиву

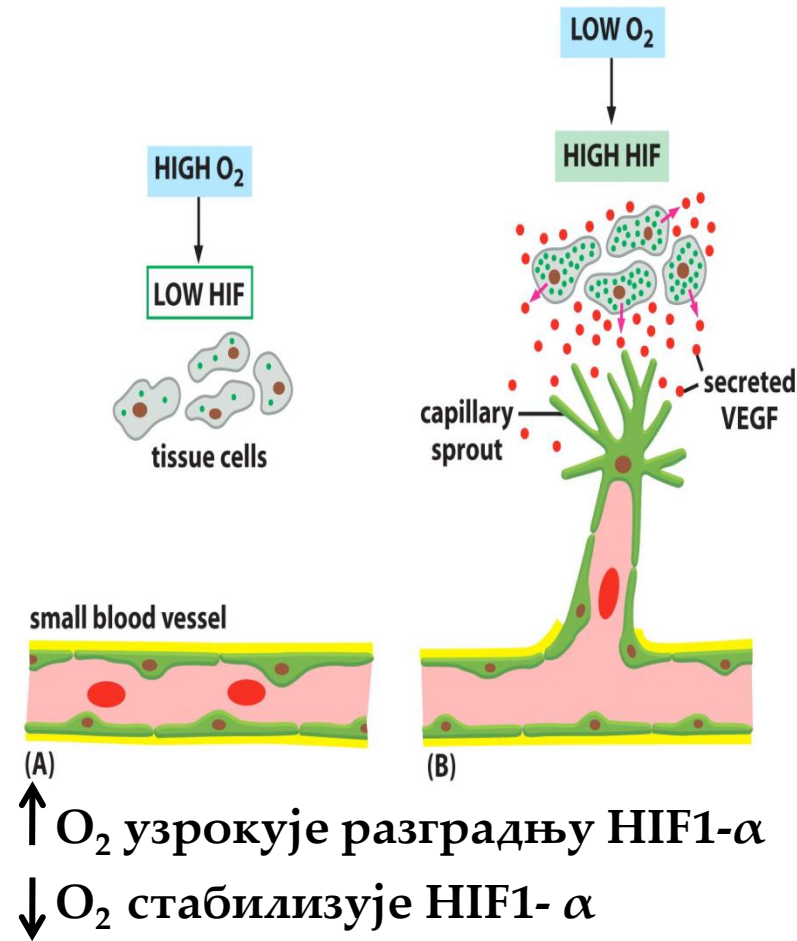
# Улога хипоксије у ангиогенези тумора

**Хипоксија ткива** је важан стимулус за експресију VEGF. Недостатак кисеоника изазива повећање интрацелуларне концентрације активне форме HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  стимулише транскрипцију VEGF који се лучи, дифундује кроз ткиво, доспева до ендотелних ћелија и везује се за специфичне рецепторе на њиховој површини.



## HIF (Hypoxia- inducible factor)

- главни транскрипциони фактор VEGF
- стабилан у условима хипоксије ткива



(A)

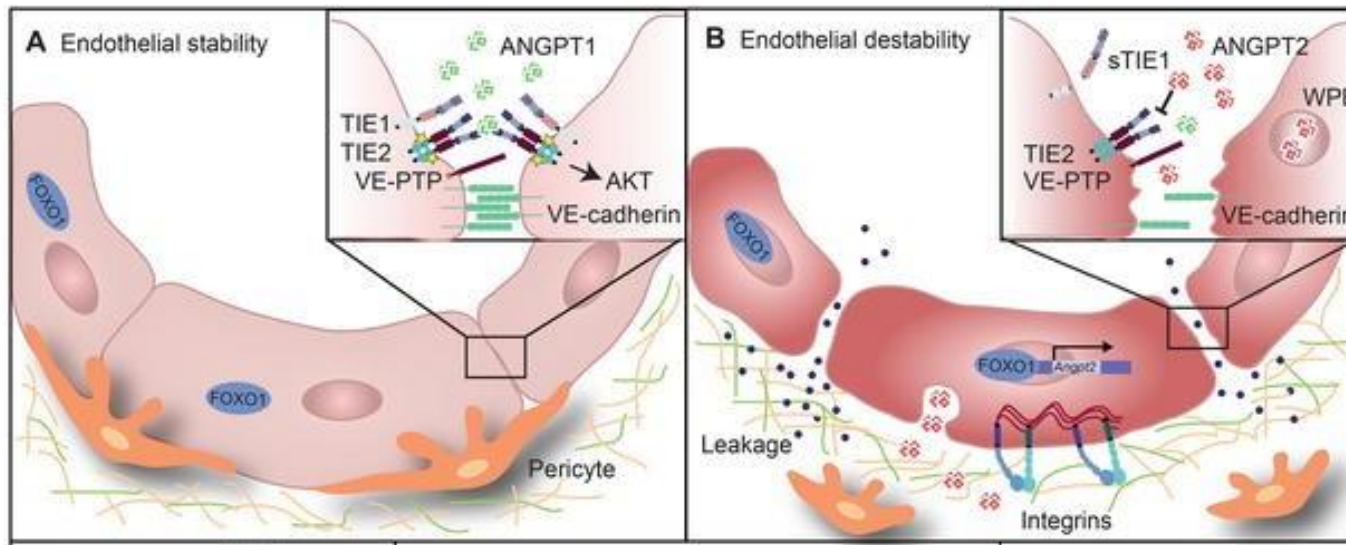
(B)

↑ O<sub>2</sub> узрокује разградњу HIF1- $\alpha$

↓ O<sub>2</sub> стабилизује HIF1-  $\alpha$



# Сигнални пут ангиопоетин/tie-2



Следећи важни фактори који регулишу ангиогенезу су **ангиопоетин-1** и **ангиопоетин-2**.

Везују се за рецептор **tie-2**.

**Ангиопоетин-1** подстиче сазревање и стабилизацију новонасталих крвних судова тако што покреће активацију сигналног пута Akt/survivin.

**Ангиопоетин-2** индукује дестабилизацију крвних судова, одвајање перицита и пупљење постојећих крвних судова.



# Базични фактор раста фибробласта (bFGF, енгл. *basic Fibroblast Growth Factor*)

bFGF, заједно са VEGF, учествује у ангиогенези и једна од функција овог фактора раста је индукција лучења ензима, MMPs, активатора плазминогена и колагеназа, који су одговорни за разградњу и организацију ванћелијског матрикса.

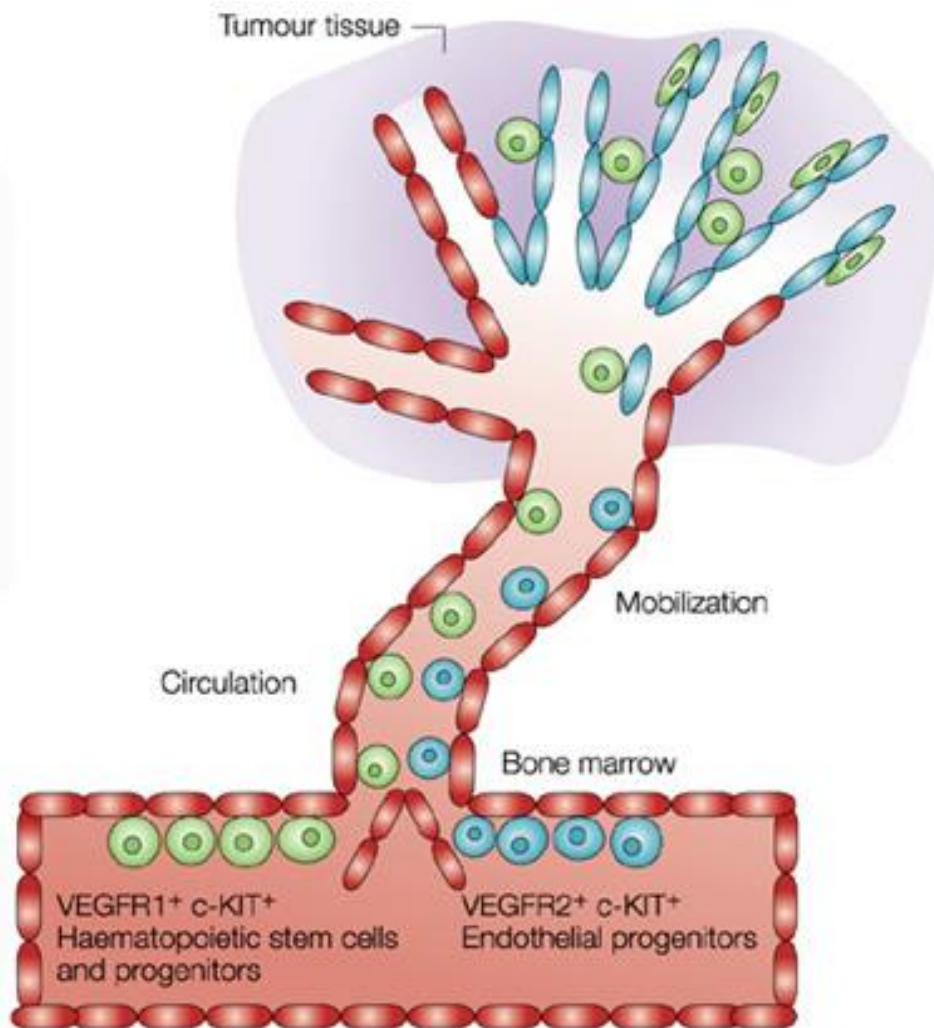
Делује и тако што повећава продукцију VEGF у глаткомишићним ћелијама крвних судова, као и експресију рецептора за VEGF на ендотелним ћелијама.

# PDGF-B

(енгл. *Platelet-derived growth factor-B*)

Повећана експресија PDGF-B подстиче регрутовање перицита и стабилизацију крвних судова, док инхибиција PDGF-B сигналног пута редукује регрутовање перицита и последично повећава апоптозу ендотелних ћелија.

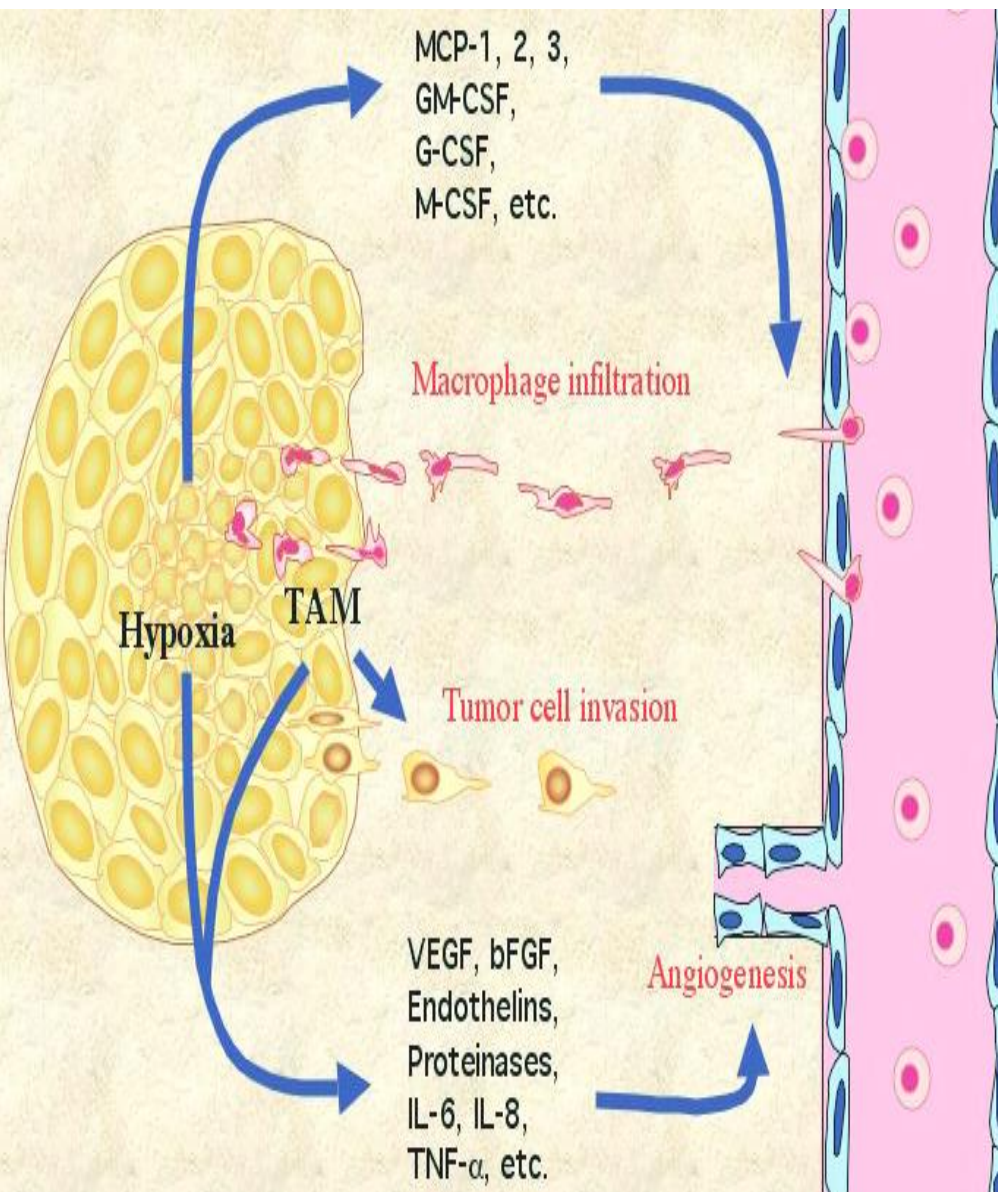
# Ангиогенеза и циркулишуће ћелије пореклом из костне сржи



Многе врсте ћелија могу да се из костне сржи мобилишу на место формирања нових крвних судова где амплификују процесе ангиогенезе. У процесима ангиогенезе могу бити укључене хематопоеетске (CD45+) ћелије, као што су моноцити и друге мијелоидне ћелије. Ове ћелије исказују маркере ендотелних ћелија (VE-cadherin, VEGFR-1, VEGFR-2 и tie-2). Неутрофили и макрофаги испољавају проангиогено дејство.

Неке нехаматопоеетске (CD45-) ћелије су такође укључене у ангиогенезу тумора. Циркулишући прекурсори ендотелних ћелија се инкорпорирају у зид растућих крвних судова где затим диферентују у ендотелне ћелије.

# Улога **TAM-2** у ангиогенези тумора



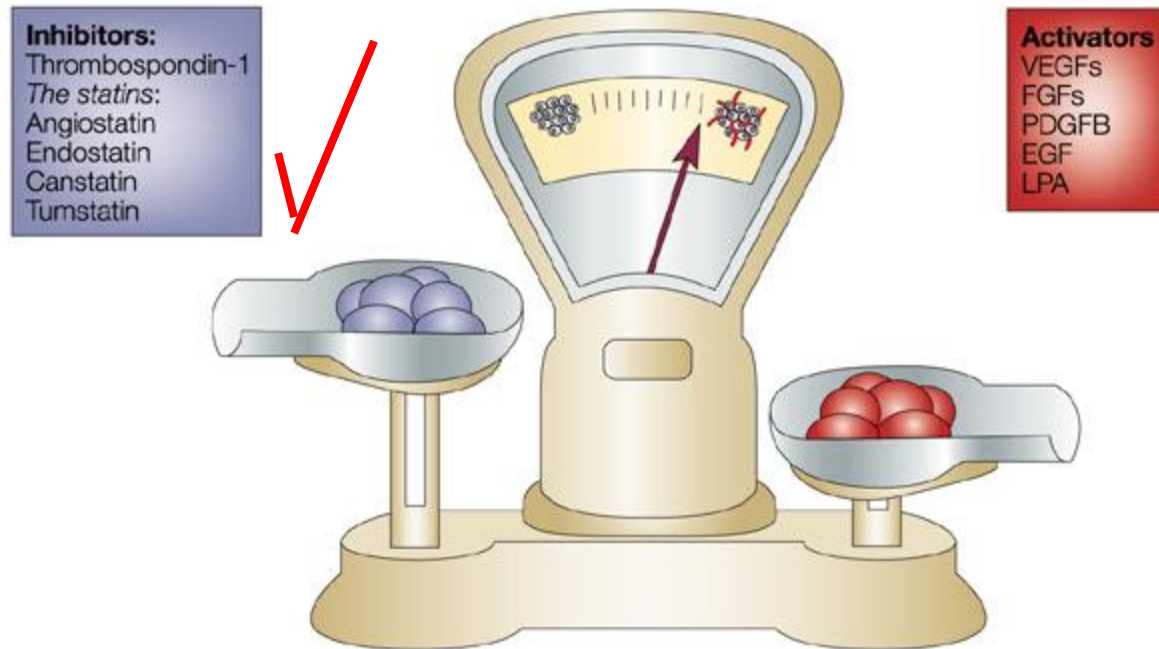
Још је 1863. г. Virchow први открио леукоците у туморском ткиву као и у његовој околини. Тумор- асоцирани макрофаги (TAMs) чине већи део леукоцитног инфилтрата око многих тумора (и примарних тумора и метастаза).

У току прогресије, формирају се многобројни региони хипоксије који су карактеристични за већину солидних тумора. У овим регионима секретују се различити фактори (**MCP-1, GM-CSF...**) који делују хемотактично и привлаче макрофаге у туморску микросредину. Инфилтрација макрофага убрзава ширење тумора тако што индукује ангиогенезу и инвазију .

**Тумор-асоцирани макрофаги, M2 фенотипа**, важан су извор VEGF и металопротеиназа матрикса укључених у процесу ангиогенезе тумора.



# Эндогени инхибитори ангиогенезе тумора



## Тромбоспондин-1

... је гликопротеин ванћелијског матрикса који се везује за CD36 рецептор и функционише као снажан ендогени инхибитор ангиогенезе. Тумор-супресорски ген *p53*, повећава експресију тромбоспондина-1 у различитим малигномима. Инхибира пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и истовремено индукује апоптозу ових ћелија.

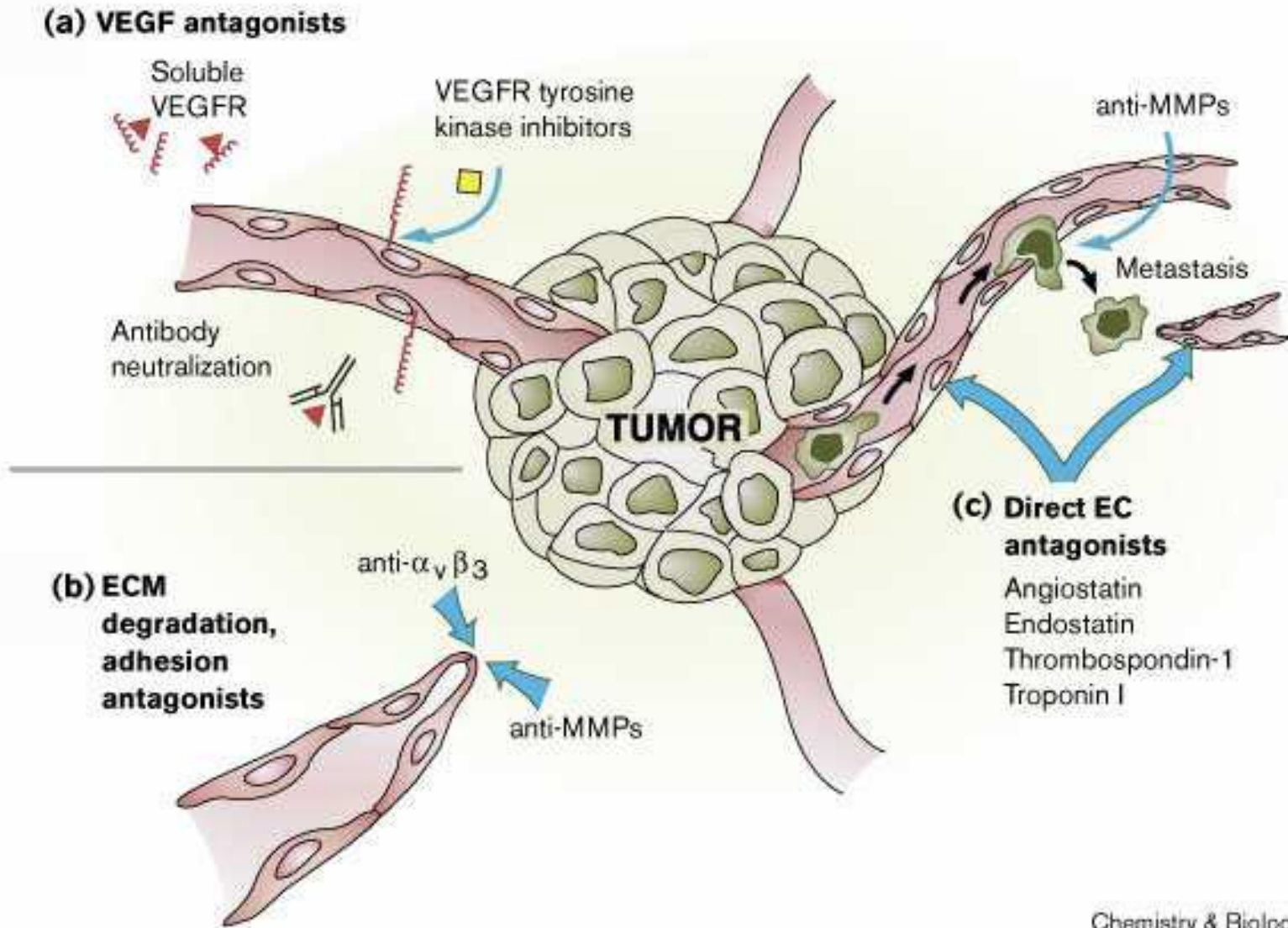
...

**Ангиостатин**, фрагмент плазминогена, инхибира пролиферацију ћелија и индукује апоптозу ендотелних ћелија.

Инхибитори ангиогенезе су и **фрагменти колагена IV типа** као што су ендостатин, тумстатин и канстатин.

Други ендогени инхибитор је фрагмент калретикулина познат и као **вазостатин**. **Вазохибин** је секретовани протеин кога продукују ендотелне ћелије.

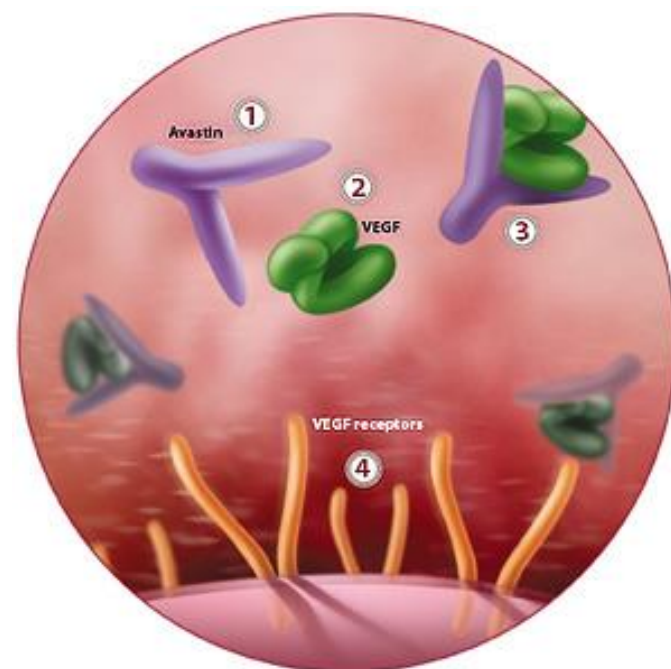
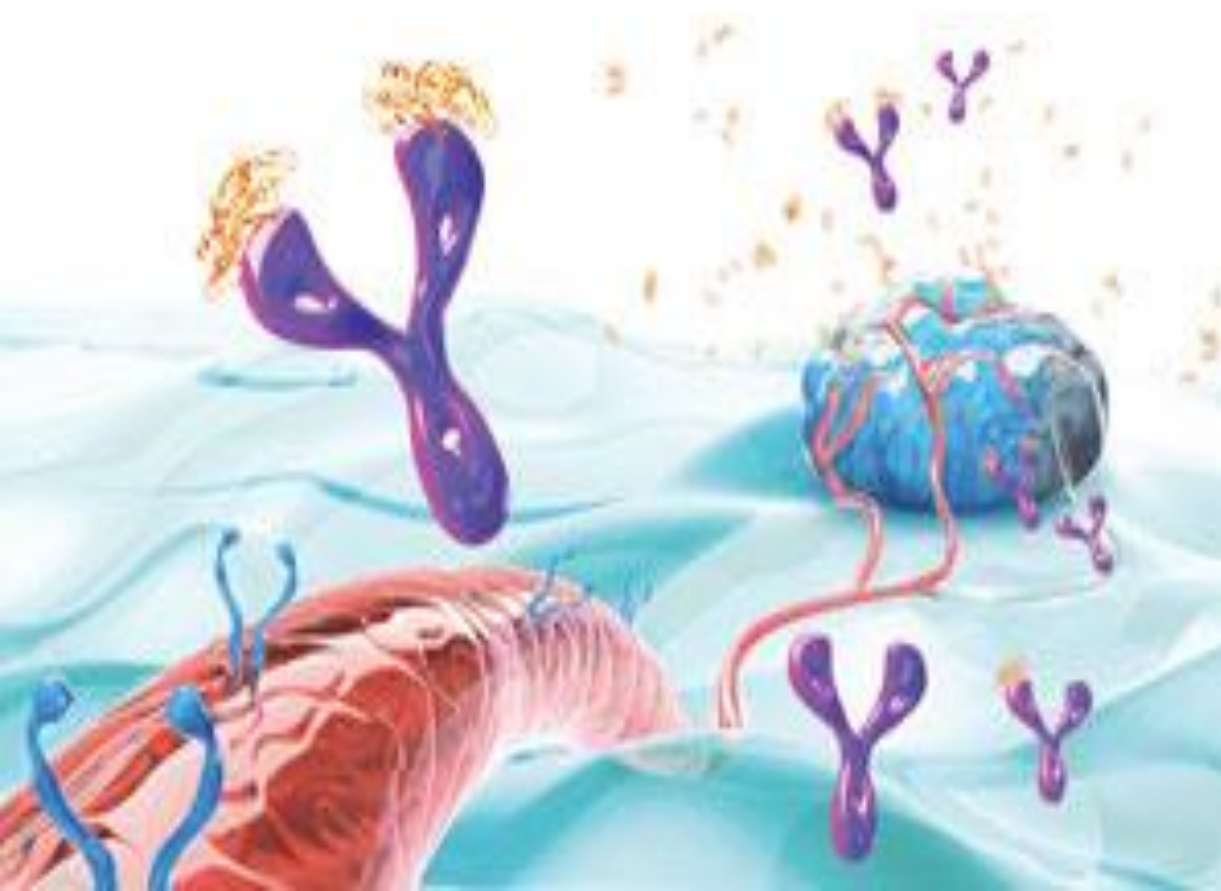
# Инхибиција ангиогенезе тумора у различитим фазама

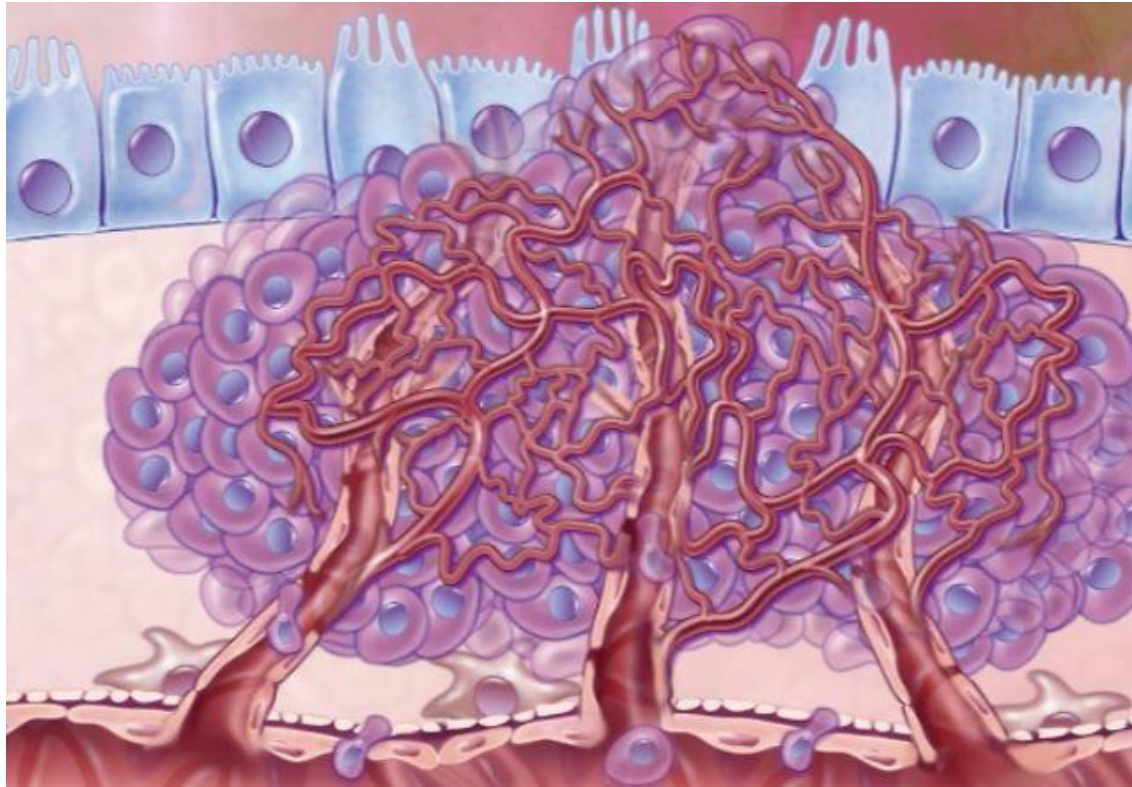




# Bevacizumab

Хуманизовано анти-VEGF  
МОНОКЛОНСКО АНТИТЕЛО





<http://vimeo.com/28439795>