

# Metastaziranje tumorskih stanica

---

**Dodig, Helena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:926222>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**METASTAZIRANJE TUMORSKIH STANICA**  
**METASTATIS OF CANCER CELLS**  
**SEMINARSKI RAD**

Helena Dodig

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Inga Marijanović

Zagreb, 2013.

## Sadržaj

1	UVOD.....	2
2	PROCES METASTAZIRANJA.....	3
2.1	Invazija.....	3
2.1.1	Veze sa susjednim stanicama.....	4
2.1.2	Veze s vanstaničnim matriksom .....	4
2.1.3	Prodor kroz bazalnu membranu .....	4
2.1.4	Tipovi invazija .....	5
2.2	Intravazacija .....	6
2.3	Transport .....	6
2.4	Ekstravazacija.....	6
2.5	Metastatska kolonizacija .....	7
2.6	Neuspješnost procesa .....	8
2.7	Angiogeneza.....	9
2.7.1	Aktivacija pritajenih mikrometastaza .....	10
3	NAČIN BIRANJA MJESTA UDOMLJENJA.....	11
4	CILJANE TERAPIJE .....	12
4.1	Genska terapija.....	13
4.2	Angiogenska inhibicija.....	13
4.3	Inhibitori metaloproteaza .....	14
4.4	Tehnologija nanočestica.....	15
4.5	Molekule RNAi .....	15
5	LITERATURA .....	16
5.1	Internet .....	18
6	SAŽETAK.....	19
7	SUMMARY.....	20

# 1 UVOD

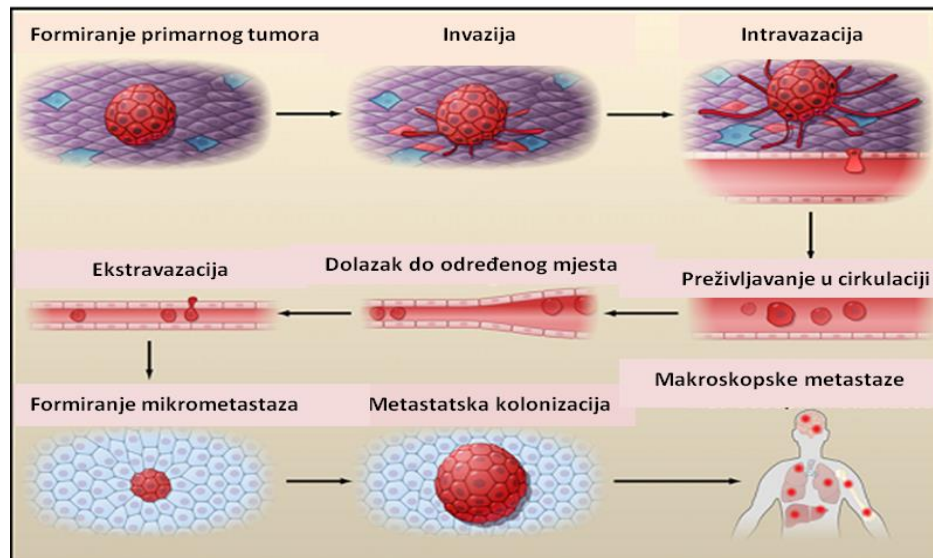
Rak je bolest kod koje se tjelesne stanice nekontrolirano razmnožavaju zbog poremećenih normalnih regulacijskih mehanizama. Mnoge vrste raka stvaraju čvrste tumore u određenom dijelu tijela, najčešće na koži, u dojčkama, plućima, crijevima ili prostati. Dok su dobroćudni (benigni) tumori česta pojava i ne zadiru u okolna tkiva te stoga ne uzrokuju veće medicinske poteškoće, zloćudni (maligni) tumori infiltriraju se u okolna tkiva prodirući među zdrave stanice i mogu se kroz krv i limfne žile proširiti na udaljene dijelove tijela. Širenje stanica primarnog tumora uzrokuje više od 90% smrtnih slučajeva zbog čega se tom procesu posvetila velika pozornost u istraživanjima raka. (Gupta and Massagué, 2006.)

Proces kojim maligne stanice migriraju s mjesta nastanka primarnog tumora u druge dijelove tijela naziva se metastaziranje. Stanica mora svladati mnoge prepreke da bi se uspješno smjestila na novom mjestu i stvorila sekundarni tumor, poznat kao metastaza. Međutim, nemaju sve stanice određenog tumora jednaku sposobnost metastaziranja. Na metastatski potencijal značajno utječe mikrookolina tumora, odnosno interakcija tumora sa zdravim stanicama s kojima dolazi u doticaj. Kako bi došlo do metastaziranja, potrebno je pronaći mikrookolinu sličnu mjestu primarnog nastanka. Maligni tumori međusobno se razlikuju prema odredištima metastaziranja. Često se šire na mjesta u tijelu koja su dobro opskrbljena krvlju, kao što su jetra, pluća, kosti i mozak te ometaju funkcije organa.

Cilj ovog rada je objasniti proces metastaziranja kroz specifične korake kroz koje tumorske stanice prolaze, objasniti način biranja mjesta udobljenja tumorskih stanica i navesti ciljane terapije koje se provode u svrhu sprječavanja rasta tumora i sprječavanja metastaziranja.

## 2 PROCES METASTAZIRANJA

Proces metastaziranja odvija se u nekoliko koraka i obuhvaća: invaziju, intravazaciju, transport, ekstravazaciju i metastatsku kolonizaciju. (Slika 1.) Posljednji i vrlo bitan korak za preživljavanje i rast tumora je angiogeneza, odnosno formiranje novih krvnih žila. (Pecorino, 2012.) Svaki pojedini korak omogućen je brojnim genetskim i epigenetskim promjenama tumorskih stanica, kao i specifičnim interakcijama sa stromalnim stanicama pripadajućeg organa. (Valastyan and Weinberg, 2011.)



Slika 1. Proces metastaziranja u koracima, preuzeto i prilagođeno iz (Valastyan and Weinberg, 2011.)

### 2.1 INVAZIJA

Početni korak koji će omogućiti metastaziranje je prodiranje malignih stanica u lokalnu okolinu, a obuhvaća oslobađanje stanice veza sa susjednim stanicama i s vanstaničnim matriksom te prodor kroz bazalnu membranu organa. (Pecorino, 2012.)

### **2.1.1 VEZE SA SUSJEDNIM STANICAMA**

Normalne stanice međusobno su povezane različitim tipovima adhezijskih molekula koje ih drže na okupu, kao što su CAM (eng. *cell adhesion molecules*) i kadherini. Kadherini su transmembranski glikoproteini ovisni o kalciju, koji preko katenina ulaze u interakcije sa citoskeletom. Dokazano je da gen koji kodira za E-kadherin, koji je jedna od glavnih adhezijskih molekula epitelnih stanica, djeluje kao tumor-supresor, osiguravajući međusobno čvrsto prianjanje stanica. Naime, epitelne stanice koje su imale sposobnost metastaziranja izgubile su je transfekcijom navedenog gena, a stanice tretirane antitijelima koji blokiraju E-kadherin pokazale su povećan metastatski potencijal. (Vleminckx et al., 1991.)

### **2.1.2 VEZE S VANSTANIČNIM MATRIKSOM**

Osim međustaničnih kontakata, svaka je stanica pojedinačno povezana i s vanstaničnim matriksom kojeg sačinjavaju kolagen, fibronektin, laminin i dr. Maligne se stanice moraju osloboditi veza s matriksom kako bi mogle invadirati okolinu. Te veze stvaraju heterodimerni proteini integrini čija receptorska domena, ulazeći u interakcije s raznim ligandima, djeluje na citoskelet. Osim prenošenja signala iz okoline u unutrašnjost stanice, oni prenose signale i iz unutrašnjosti prema van, mijenjajući afinitet receptora za ligande. Mobilnost malignih stanica omogućena je promjenom ekspresije gena za integrinske receptore, čime se regulira raspodijeljenost integrina po membrani i povećava afinitet za prianjanje na matriks drugačijeg sastava. (Pecorino, 2012.) Također, promjena ekspresije gena za integrinske receptore, omogućuje malignim stanicama prevladavanje anoikisa, tj. apoptoze inducirane nemogućnošću adhezije na vanstanični matriks. Naime, u odsutnosti liganda iz matriksa, integrini bi potaknuli vezanje proteaza za membranu i time signalizirali staničnu smrt. (Guo and Giancotti, 2004.)

### **2.1.3 PRODOR KROZ BAZALNU MEMBRANU**

Bazalna membrana, koja osim strukturalne uloge odvajanja epitela od strome ima ulogu i u prijenosu signala unutar tumorskih stanica, često u svom sastavu uz glikoproteine i proteoglikane sadrži i razne faktore rasta koji se mogu osloboditi djelovanjem proteaza. Invadirajuće stanice ekspimiraju veliku količinu serinskih proteaza i metaloproteaza ili MMP (eng. *matrix metalloproteases*), koje svojim proteolitičkim djelovanjem omogućuju prodiranje u okolno tkivo.

Tumorske stanice potiču i okolne stromalne stanice na povećanu sintezu metaloproteaza zbog čega se praćenjem ekspresije MMP-ova može odrediti progresija tumora u nekim tipovima raka. (Roy, Yang and Moses, 2009.)

#### **2.1.4 TIPOVI INVAZIJA**

Ovisno o tipu i okolini, stanice mogu migrirati pojedinačno ili u skupinama. Većina karcinoma koristi proces kolektivne invazije, pri kojemu su stanice međusobno povezane aktinskim filamentom i čine višestanično, kontraktilno ‘tijelo’. Prednosti kolektivne invazije su više koncentracije autokrinih i promigratorskih faktora kao i MMP-a te zaštita unutarnjih stanica ‘tijela’ od napada stanica imunološkog sustava, kao što su limfociti ili NK stanice (eng. *natural killer cells*). Također, istovremena migracija više različitih tipova stanica povećava efikasnost same invazije i vjerojatnost za preživljavanje.

Pojedinačne mobilne tumorske stanice koriste mezenhimski ili ameboidni tip invazije. Stanice ameboidnog tipa za migraciju koriste prvenstveno svoju sposobnost kontraktilnosti. Prilagodavajući svoj oblik istiskuju se kroz tkivne pukotine. Za razliku od njih, stanice mezenhimskog tipa ne oslanjaju se na svoju morfologiju, iako su izdužene i vretenaste, već ekspimiraju visoku razinu integrina i proteolitičkih enzima. (Friedl and Wolf, 2003.)

Pretpostavlja se da je mehanizam kojim se sloj usko povezanih epitelnih stanica pretvori u visoko mobilne mezenhimske stanice sličan epitelno-mezenhimskoj tranziciji (EMT) prisutnoj u ranoj embriogenezi. Tim procesom stanice postižu karakteristike potrebne za invadiranje okoline. Naime, signali koje otpuštaju stromalne stanice tumora vežu se na specifične receptore i aktiviraju razne transkripcijske faktore, kao što su Slug, Snail, Twist, ZEB1 i ZEB2, koji će aktivirati niz gena i potaknuti prijelaz susjednih tumorskih stanica u mezenhimsko stanje. Pojedini transkripcijski faktori smanjuju ekspresiju već spomenutog E-kadherina. (Thiery et al., 2009.) EMT će stoga proizvesti stanice slične matičnim stanicama, koje osim što su sposobne za migraciju, imaju regeneracijski potencijal, dvije karakteristike koje će uvelike povećati uspješnost metastaziranja. (Pecorino, 2012.)

## **2.2 INTRAVAZACIJA**

Intravazacija je ulazak maligne stanice u krvnu ili limfnu žilu. Proces obuhvaća prihvaćanje stanice na žilu, razgrađivanje bazalne membrane serinskim i MMP proteazama (samo u slučaju krvnih žila) te transendotelnu migraciju, odnosno prolazak kroz endotelne stanice u krvotok. (Pecorino, 2012.) Sam mehanizam prolaska ovisi o strukturnim obilježjima žila. Krvne žile čiji je nastanak stimulirao sam tumor propusne su i vijugave omogućavajući time lakši prolaz. (Carmeliet and Jain, 2011.) Ulaskom u žilu, stanice se transportiraju do najbližeg odgovarajućeg ili unaprijed određenog mjesta.

## **2.3 TRANSPORT**

Tumorske stanice jednosmjerno putuju u smjeru krvotoka, pojedinačno ili u skupinama s trombocitima. Samo će mali postotak stanica koje uđu u krvotok biti uspješno u uspostavljanju metastatske kolonije (1 od 10 000 stanica preživljava transport). (Pecorino, 2012.) Postoji više uzroka, jedan od kojih je činjenica da je promjer tumorskih stanica 3-4 puta veći od promjera kapilara, zbog čega će veliki dio stanica ostati zaglavljeno pri susretu s kapilalom. Pretpostavlja se da mnoge stanice provedu samo kratko vrijeme u krvotoku, dovoljno da određene stanice pobjegnu prije nego što se zaglave. Kratko trajanje transporta također je bitno kako bi se izbjegao anoikis. Dodatna zapreka na putu su stanice imunološkog sustava, osobito NK stanice, koje tumorske stanice zaobilaze pokrivanjem s krvnim pločicama, koje privlače ekspresijom tkivnih faktora te L- i P-selektina. Nastali embolij onemogućit će na taj način njihovu detekciju. (Joyce and Pollard, 2009.) Unatoč svim preprekama, tumori nažalost ipak često metastaziraju budući da je dovoljno čak i 0,1% tumorskih stanica za stvoriti novu koloniju. (Chambers et al., 2002.)

## **2.4 EKSTRAVAZACIJA**

Ekstravazacija podrazumijeva izlazak maligne stanice iz krvne ili limfne žile. Jednom zaustavljene u mikrovaskulaturi organa, maligne stanice mogu inicirati intraluminalni rast i stvoriti mikrokoloniju koja će probiti stijenke žila, čime će doći u direktan kontakt s parenhimom. (Al-Mehdi et al., 2000.) Za razliku od toga, stanice mogu prijeći stijenku



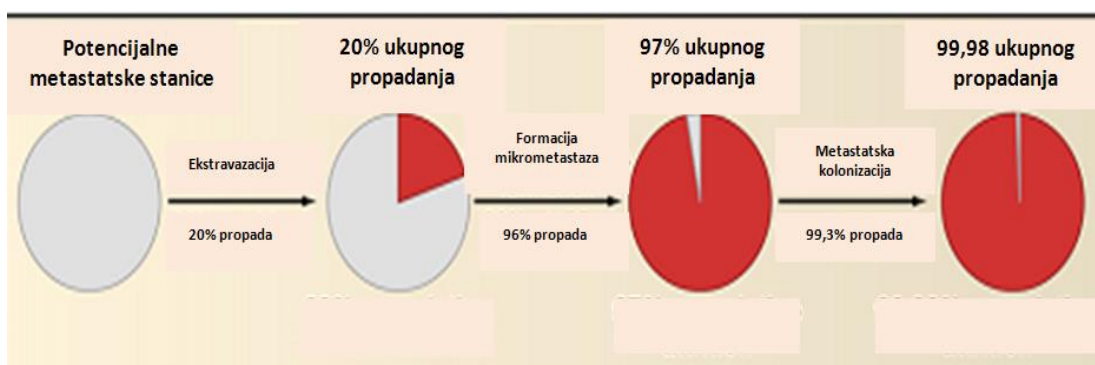
adhezijom na endotel, probijanjem endotelnih stanica i pericita te migracijom u okolnu stromu. Proces se naizgled čini suprotnim intravazaciji. Međutim, postoji više dokaza koji ukazuju da se radi o dva različita procesa, jedan od kojih je činjenica da je vaskulatura tumora vijugava i propusna za maligne stanice zbog čega one intravazacijom lako dospiju u krovotok, dok je ona na određenom mjestu najvjerojatnije visoko funkcionalna i puno teža za probijanje. (Valastyan and Weinberg, 2011.) Kako bi se nadišla ova fizička barijera, stanice primarnog tumora često luče razne faktore za poticanje vaskularne permeabilnosti. Tako je kod raka dojke primjećeno lučenje proteina sličnog angiopoietinu (Angptl4, eng. *angiopoietin-like-4*), kao i ciklooksigenaze-2 (COX-2) te MMP-1 i MMP-2 koji će poremetiti međusobne veze endotelnih stanica stijenci pulmonarnih žila te time omogućiti ekstravazaciju i stvaranje metastazi u plućima. (Padua et al., 2008.)

## **2.5 METASTATSKA KOLONIZACIJA**

Kako bi preživjele i stvorile mikrometastaze, stanice se moraju prilagoditi na novu okolinu koja je najčešće uvelike različita od primarne. Razlike mogu uključivati drukčiji tip stromalnih stanica, sastav vanstaničnog matriksa, dostupne citokine i faktore rasta, čak i organizaciju samog parenhima. Način na koji se rješava problem negostoljubive okoline je stvaranje pre-metastatske niše, o čemu će više biti rečeno u idućem poglavlju. Čak i ako se uspiju adaptirati na novu okolinu, šanse za stvaranje veće kolonije iz koje će razviti progresivno rastući tumor i dalje su izuzetno male, stoga većina stanica ulazi u polagano propadanje ili ostane u stanju pritajenih mikrometastaza. (Chambers et al., 2002.). Pretpostavlja se da je za povećanje šansi od velike važnosti sposobnost stanica da se autoregeneriraju. Samo određena subpopulacija stanica primarnog tumora ima tu sposobnost, takozvane tumor-inicirajuće stanice (TIC, eng. *tumor-initiating-cells*). (Clevers, 2011.) Za ulazak stanica u TIC-stanje potrebni su EMT-promovirajući transkripcijski faktori, kao što su već spomenuti Snail, Twist i ZEB1, koji osim što potiču lokalnu invaziju, mogu poticati i samoobnavljajuće karakteristike tumorskih stanica. (Thiery et al., 2009.) Nakon uspješnog dolaska navedenih tumorskih stanica na određeno mjesto i razrješenja problema njihove inkompatibilnosti s mikrookolinom, ulazi se u zadnju fazu metastaziranja koja označava uspostavu makroskopske, klinički vidljive, metastaze.

## 2.6 NEUSPJEŠNOST PROCESA

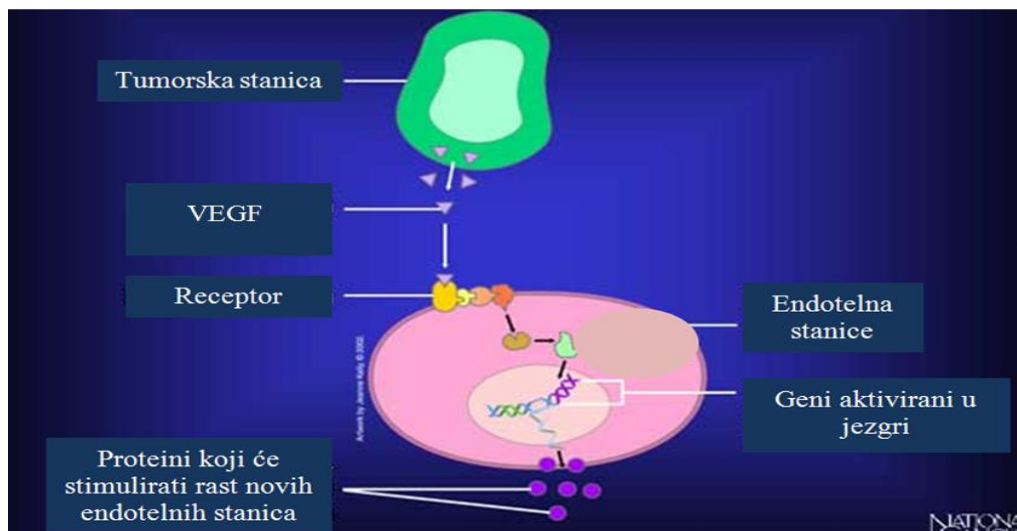
Koliko je metastaziranje zapravo neuspješno dokazuje činjenica da se veliki broj tumorskih stanica može naći u krvotoku pacijenata koji nikada niti ne razviju metastaze. (Nagrath et al., 2007.) Istraživanja su pokazala da transport i ekstravazaciju (kao i sve korake koji prethode navedenim) preživi čak do 80% tumorskih stanica. (Slika 2.) Za razliku od toga, jednom kad stanice napuste krvotok i uđu u parenhim stranog organa, mogu se uočiti visoke stope propadanja stanica – manje od 3% intravenozno implantiranih stanica stvori mikrometastaze. U dovršavanju procesa, odnosno stvaranju makrometastaza uspije manje od 0,02% stanica, što ga čini limitirajućim korakom cjelokupnog procesa. (Luzzi et al., 1998.) Dokazi za to nađeni su kod mnogih tipova tumora, jedan od kojih je rak dojke gdje metastaze mogu postati klinički vidljive čak godinama nakon odstranjenja primarnog tumora. (Aguirre-Ghiso, 2007.) Budući da su stanice napustile tumor prije njegova odstranjenja, morale su godinama preživjeti u pritajenom stanju na udaljenom mjestu. Iz toga proizlazi da je njihova detekcija ostala odgođena zbog neuspješnosti u uspostavljanju kolonije i da je dugi period latencije omogućio stanicama da evoluiraju i steknu potrebne karakteristike.



Slika 2. Neefikasnost metastatskog procesa, preuzeto i prilagođeno iz (Valastyan and Weinberg, 2011.)

## 2.7 ANGIOGENEZA

Maligna stanica uzima kisik i hranjive tvari iz okolnih krvnih žila difuzijom preko svoje vanjske opne, kao i normalne stanice. Međutim, kako tumor raste, njegove unutarnje stanice ostaju bez hranjivih tvari. Stoga je bitno formiranje novih krvnih žila kako bi tumor preživio i rastao. Prije se mislilo da je to karakteristika samo brzo rastućih makroskopskih lezija, međutim novija istraživanja su pokazala da se stvaranje žila u tumorima iznenađujuće rano inducira. (Hanahan and Folkman, 2006.) Angiogenezom se iz već postojećih krvnih žila stvaraju nove procesom koji se naziva pupanje (eng. *sprouting*). Regulirana je ravnotežom između aktivatora i inhibitora, što se naziva takozvanim angiogenim prekidačem (eng. *angiogenic switch*). (Bergers and Benjamin, 2003.) Tumorske stanice otpuštaju signalne molekule koje će potaknuti angiogenezu u okolnom tkivu. Neki od tih regulatora su signalni proteini koji se vežu na receptore endotelne stanice, kao što je vaskularno-endotelni faktor rasta (VEGF, eng. *vascular endothelial growth factor*). VEGF potiče endotelne stanice na proizvodnju MMP-ova koje će biti otpuštene u okolno tkivo i razgraditi vanstanični matriks. To omogućava dolazak endotelne stanice, koje se počnu dijeliti i stvarati vaskulaturu. (Carmeliet, 2005.) (Slika 3.) Nove krvne žile strukturno su drukčije, propusne su i vijugave.



Slika 3. Signalna kaskada aktivacije angiogeneze, preuzeto i prilagođeno iz (National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/angiogenesis/AllPages>, 02.09.2013.)

VEGF regulira rast novih krvnih žila tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja, kao i u određenim fiziološkim ili patološkim stanjima u odraslo doba. Njegova ekspresija stoga može biti potaknuta hipoksijom ili onkogenom signalizacijom. U uvjetima hipoksije (koju stvara tumor dok raste) angiogenezu će potaknuti HIF-1 $\alpha$  (eng. *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ), transkripcijski faktor koji aktivira VEGF gen.

VEGF također stimulira sekreciju tkivnih faktora koji aktiviraju koagulacijsku kaskadu. Skoro 50% pacijenata koji boluju od raka, osobito oni kod kojih su već prisutne metastaze, imaju poremećaje u zgrušavanju krvi te je tromboembolizam drugi najčešći uzrok smrti koja nastaje kao posljedica raka. (Caine et al., 2002.) Aktivacija krvnih pločica pomaže tumorskim stanicama u transportu, kao što je već spomenuto u poglavlju 2.3, a sama koagulacija utječe i na endotelne stanice koje će posljedično izložiti adhezivne molekule na luminalnu stranu te time pomoći ekstrasvazaciji tumorskih stanica. (Camerer et al., 2004.) Na taj način je angiogeneza povezana i sa samim procesom metastaziranja te jedan drugoga podupiru i unapređuju.

### **2.7.1 AKTIVACIJA PRITAJENIH MIKROMETASAZA**

Primjećeno je da ponekad odstranjenje primarnog tumora, radijacijom ili kirurški, aktivira dormantne mikrometastaze. Naime, primarni tumor može lučiti angiogetske inhibitore, kao što su angiostatin i endostatin, koji će blokirati rast mikrometastaza na udaljenim mjestima. Kod raka prostate naprimjer, stanice luče prosaposin (Psap). Psap će inducirati ekspresiju anti-angioetskog faktora trombospondina-1 (TSP-1) u stromalnim stanicama i time blokirati angiogenezu. (Kang et al., 2009.) Odstranjenje primarnog tumora stoga odstranit će i inhibitore što će uvelike povećati šanse za preživljavanje novoformirane kolonije.

### 3 NAČIN BIRANJA MJESTA UDOMLJENJA

Neki tumori kao svoje odredište za metastaziranje biraju prvi organ koji im je na putu (eng. *first-pass organ*). U tom se slučaju radi o pasivnom procesu budući da tumorske stanice na svom putu zbog veličine i raznih prepreka lako mogu zaglaviti unutar kapilara. Kao primjer se navodi rak crijeva čije karcinogene stanice portalnom venom lako dopiju u jetru. (Gupta and Massagué, 2006.) Drugi pak metastaziraju na karakteristična, unaprijed određena mjesta, pri čemu se radi o genetski manipuliranim interakcijama između tumorskih stanica i receptora na stijenkama krvnih žila. Rak dojke, naprimjer, često metastazira u pluća, kosti ili mozak, mjesta koja nisu cirkulacijom direktno povezana s tkivom dojke. Uznapredovali rak prostate za svoje odredište primarno izabire kosti, melanom jetru, a sarkom pluća.

Traženje objašnjenja za specifičan odabir odredišta za metastaziranje traje otkad je Paget prvi predložio teoriju o klici i tlu (eng. *seed and soil theory*), po kojoj je potrebna odgovarajuća mikrookolina kako bi došlo do metastatske kolonizacije. (Paget, 1889.) Naime, primarni tumor i pridružene stromalne stanice otpuštaju određene faktore koji će promijeniti mikrookolinu na selektivnoj lokaciji te ju time učiniti pogodnom za naseljavanje tumorskim stanicama. Predlaže se model stvaranja pre-metastatske niše (Psaila and Lyden, 2009.) prema kojem sistemski signali koje otpušta primarni tumor potiču stvaranje fibronektina u stanicama fibroblastima određenog organa. To će dovesti do mobilizacije hematopoietskih progenitorskih stanica VEGFR1-HPC (eng. *VEGF receptor-1 hematopoietic progenitor cells*) iz koštane srži do tog mjesta, budući da one eksprimiraju integrinski receptor, VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ), pomoću kojeg se vežu na navedeni fibronektin. Stanice će zatim potaknuti sekreciju MMP-9 proteaza i posljedično stimulirati razne integrine i kemokine, kao što je SDF-1 (eng. *stromal cell-derived factor-1*), koji će dalje omogućiti prihvaćanje i rast nadolazećih tumorskih stanica. (Valastyan and Weinberg, 2011.) Nakon njihove implantacije, mobiliziraju se i endotelne progenitorske stanice VEGFR2-EPC stanice (eng. *VEGF receptor-2 endothelial progenitor cells*) čime će se potaknuti vaskularizacija, odnosno potpuno razvijanje novog tumora na mjestu koje je još do nedavno bilo pre-metastatska niša. (Kaplan, Rafii i Lyden, 2006.)

## 4 CILJANE TERAPIJE

Rak mogu uzrokovati karcinogene tvari koje aktiviraju onkogene. Većina se mutiranih gena popravi, ali taj proces katkad zakaže. U djece i odraslih, mutacije gena koji kontroliraju diobu i funkciju stanica mogu izazvati faktori iz okoliša kao što su kemikalije, virusi, ultraljubičasto ili druge vrste zračenja. U nekim se slučajevima mutirani gen može naslijediti od roditelja. Rak se češće javlja među starijim ljudima, uglavnom zato što su njihove stanice imale više vremena za nakupljanje genetskih oštećenja, ali također i zato što tjelesna obrana protiv raka postupno postaje manje učinkovita. Budući da se do druge polovice 20.stoljeća životni vijek u razvijenim zemljama znatno produžio, rak je postao jedan od najčešćih uzroka smrti, odmah nakon koronarne insuficijencije. Iako otprilike 1 od 3 osobe u nekom razdoblju svog života dobije rak, mnogi se mogu izliječiti zahvaljujući dostignućima u postavljanju dijagnoza i liječenju.

Izgledi da rak bude izlječiv najviši su ako se rutinskim pregledom otkrije dovoljno rano, prije nego što izazove simptome. Ovisno o vrsti i stadiju raka, terapija može biti namijenjena izliječenju, usporavanju rasta raka ili omogućavanju što ugodnijeg života. Tri glavne tehnike kojima se rak liječi su operativno, kemoterapijom i radioterapijom. U druga liječenja ubrajamo biološke i hormonske terapije.

U većini slučajeva, osobito u liječenju tumora u ranom stadiju, liječenje uključuje kirurško odstranjivanje tumora. Tijekom operacije uobičajeno je ukloniti dio zdravog tkiva oko tumora kako bi se povećali izgledi da su sve kancerozne stanice odstranjene iz tijela. Katkad se odstranjuju i limfni čvorovi blizu tumora jer se rak često najprije proširi na njih. Operacija međutim nije najbolje rješenje ako se rak proširio na druge dijelove tijela. U tim slučajevima prikladniji mogu biti drugi načini liječenja, kao što su kemoterapija ili radioterapija.

Radioterapija ili terapija zračenjem uključuje intenzivno zračenje kojim se uništavaju stanice raka. U kemoterapiji se koriste citostatici za uništavanje kanceroznih stanica. To je glavni način liječenja za leukemije i druge vrste raka raširenih po cijelom tijelu. Može se koristiti i za smanjivanje opasnosti od daljnjeg širenja.

Biološke terapije dosad su se uspješno primjenjivale za liječenje raka bubrega, malignog melanoma i nekih vrsta limfoma i leukemija. Dvije obećavajuće biološke terapije su genska terapija i angiogenetska inhibicija.

#### **4.1 GENSKA TERAPIJA**

Genska terapija podrazumijeva uvođenje gena u tumorske stanice primjenom virusa. Novi je gen odgovoran za proizvodnju prirodne tvari koja može pridonijeti uništavanju kanceroznih stanica. Genskom se terapijom također pokušavaju osmisliti metode za reaktivaciju gena koji inhibiraju metastaziranje (eng. *metastasis suppressor genes*). Ti su geni otkriveni usporedbom stanica s visokim i niskim metastatskim potencijalom. Produkti tih gena mogu održati tumorske stanice koje su već metastazirale u neaktivnom, pritajenom stanju, ali nemaju utjecaj na primarni tumor. Smanjena ekspresija gena (eng. *loss of function*) povećat će stoga metastatski potencijal. (Pecorino, 2012.) Prvi supresor gen koji je otkriven bio je NM23. Budući da je njegov promotor reguliran glukokortikoidnim putem, traže se odgovarajuće tvari koje bi mu povećale ekspresiju. Usporednim kliničkim istraživanjima tako se želi provjeriti efekt medroksiprogesteron acetata (MPA), u kombinaciji s kemoterapijom ili samostalno, na metastaze raka dojke. (Palmieri et al., 2005.)

#### **4.2 ANGIOGENSKA INHIBICIJA**

Pri angiogenskoj inhibiciji daju se lijekovi za zaustavljanje razvoja novih krvnih žila koje omogućuju nastavak rasta tumora. Tumor se smanjuje kada prestane dobivati hranjive tvari i kisik. Ne djeluje se direktno na tumorske stanice, već na endotelne stanice. Lijekovi mogu blokirati aktivatore angiogeneze ili spriječiti endotelne stanice da reagiraju na njih. Iako su lijekovi također citostatici, očekuju se puno manje nuspojave budući da se proces angiogeneze u odraslih događa rijetko. Također, endotelne stanice su, za razliku od tumorskih, genetički stabilne i stoga postoji manja vjerojatnost za razvijanje otpornosti.

Jedna od strategija koju angiogenetska inhibicija koristi je ciljano djelovanje na angiogenetske faktore. Primjer takvog faktora je vaskularno-endotelni faktor rasta, VEGF, koji potiče proliferaciju endotelnih stanica, ali može potaknuti i povećanu propusnost žila i time inicirati angiogenezu, budući da je postojeće žile potrebno destabilizirati prije pupanja. U

slučajevima raka crijeva odobren je lijek Avastin (Bevacizumab), monoklonsko antitijelo koje prepoznaje i veže se na sve izoforme VEGFa. Vezanjem antitijela na angiogenetski aktivator onemogućit će njegovo djelovanje te time spriječiti i samu angiogenezu. (Chen et al., 2001.) Lijek koji također djeluje na VEGF, ali i druge aktivatore, je Talidomid, koji je uspješan u liječenju multiplih mijeloma, ali je potreban oprez kod trudnica zbog teratogenog učinka. (Rajkumar and Witzig, 2000.) Postoje i lijekovi koji mogu povećati ekspresiju inhibitora angiogeneze, kao što je Herceptin (Trastuzumab). (Hudis, 2007.)

Mogu se koristiti i antagonisti integrina koji blokiraju interakcije endotelnih stanica i vanstaničnog matriksa te time specifično induciraju apoptozu angiogenih žila (bez utjecaja na već postojeće žile).

Osim angiogenske terapije kojoj je cilj spriječiti stvaranje krvnih žila, postoji i terapija kojoj je cilj uništiti već stvorene (eng. *vascular targeting*). Metoda je moguća zbog karakterističnih razlika između tumorskog i normalnog tkivnog žilnog sustava. Combretastatin primjer je lijeka koji djeluje na citoskelet i selektivno je toksičan za žile tumora čiji endotel nema bazalnu membranu. Ometanjem citoskeleta gubi se oblik stanica što u konačnici blokira prolaz krvi i vodi do kolapsa novih žila zbog čega tumor ostaje bez kisika i hranjivih tvari te u sredini tumora počinje nekroza. Budući da vanjske tumorske stanice ostaju vijabilne, potrebna je kombinirana terapija. (Galbraith et al., 2001.)

### **4.3 INHIBITORI METALOPROTEAZA**

Jedna od mogućih terapija uključuje i inhibitore metaloproteaza, budući da one imaju veliku ulogu u samom početku procesa metastaziranja, ali i kasnije u kolonizaciji. Kako bi terapija bila što uspješnija, potrebno ju je primjeniti u što ranijoj fazi. Međutim, područje je problematično jer se radi o raznovrsnoj porodici proteaza. Zbog neočekivanih nuspojava i poteškoća u mjerenju efikasnosti, terapija nije odobrena i traže se alternativne mogućnosti. Jedna od obećavajućih uključuje selektivna antitijela koja bi se vezala za proteaze na membrani. (Kessenbrock et al., 2010.)



#### **4.4 TEHNOLOGIJA NANOČESTICA**

Istraživanja provedena na miševima, koja su uključivala kombinaciju tehnologije nanočestica, genske terapije i uništavanja već stvorenih krvnih žila, pokazala su uspjeh u regresiji primarnog tumora i metastaza. Nanočestice na bazi lipida, pokrivene ligandom koji se specifično veže na integrin novonastalih stanica krvnih žila, sadržavale su mutant gena ključnog za angiogenezu. Nakon unosa u krvotok miša, primjećena je apoptoza tumorskih endotelnih stanica, kao i stanica koje su okruživale ciljne žile. (Hood et al., 2002.)

#### **4.5 MOLEKULE RNAi**

U posljednje su se vrijeme također identificirali geni koji se povezuju s rastom primarnog tumora i rizikom od metastaziranja (eng. *gene signatures*). Korištenjem molekula RNAi mogu se inhibirati produkti tih gena. Konačni cilj je odrediti gene koji su odgovorni za svaki pojedini korak metastaziranja i ukloniti njihove transkripcijske produkte, čime bi se od samog početka spriječilo širenje malignog tumora i omogućilo njegovo obuzdavanje. Terapija pokazuje veliki potencijal za uspješno liječenje raka u budućnosti.

## 5 LITERATURA

- Aguirre-Ghiso JA. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7 (11) (November): 834-846.
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* 6 (1) (January): 100-102.
- Bergers B and Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401-410.
- Caine GJ, PS Stonelake, GY Lip, ST Kehoe. 2002. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia* 4 (6) (November): 465-473.
- Camerer E, AA Qazi, DN Duong, I Cornelissen, R Advincula, SR Coughlin. 2004. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104 (2) (July): 397-401.
- Carmeliet P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 (3): 4-10.
- Carmeliet P and Jain RK. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat.Rev. Drug Discov.* 10: 417-427.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2 (8) (August): 563-572.
- Chen HX, RE Gore-Langton, BD Cheson. 2001. Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology (Williston Park)* 15 (8) (August): 1017- 1020, 1023-1026.
- Clevers H. 2011. The cancer stem cells: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* 17: 313-319.
- Friedl P and Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3 (5) (May):362-74
- Galbraith SM, DJ Chaplin, F Lee, MR Stratford, RJ Locke, B Vojnovic, GM Tozer. 2001. Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo. *Anticancer Res.* 21 (1A) (January): 93-102.
- Guo W and Giancotti FG. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.* 5: 816-826.
- Gupta GP and Massagué J. 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127 (4) (November): 679-695. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.001
- Hanahan D and Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (3) (August): 353-364.
- Hood JD, M Bednarski, R Frausto, S Guccione, RA Reisfeld, R Xiang., et al. 2002. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296: 2404-2407.
- Hudis CA. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* 357 (1) (July): 39-51.
- Joyce JA and Pollard JW. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9: 239-252.

- Kang SY, OJ Halvorsen, K Gravidal, N Bhattacharya, JM Lee, NW Liu, BT Johnston, A B Johnston, SA Haukaas, K Aamodt, S Yoo, LA Akslen, RS Watnick. 2009. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (29) (July): 12115-12120. doi: 10.1073/pnas.0903120106
- Kaplan RN, Rafii S and Lyden D. 2006. Preparing the “Soil”: The Premetastatic Niche. *Cancer Res*. 66 (23)( December ): 11089–11093. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2407
- Kazerounian S, KO Yee, J Lawler. 2008. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 65 (5) (March) :700-712. doi: 10.1007/s00018-007-7486-z.
- Kessenbrock K, V Plaks and Z Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
- Luzzi KJ, IC MacDonald, EE Schmidt, N Kerkvliet, VL Morris, AF Chambers, AC Groom. 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol*. 153 (3) (September): 865-873.
- Nagrath S, LV Sequist, S Maheswaran, DW Bell, D Irimia, L Ulkus, MR Smith, EL Kwak, S Digumarthy, A Muzikansky, P Ryan, UJ Balis, RG Tompkins, DA Haber, M Toner. 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450 (7173) (December): 1235-1239.
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133 (1) (April): 66-77. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1989. *Cancer Metastasis Rev*. 8: 98–101.
- Palmieri D, DO Halverson, T Ouatas, CE Horak, M Salerno, J Johnson, WD Figg, M Hollingshead, S Hursting, D Berrigan, SM Steinberg, MJ Merino, PS Steeg. 2005. Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 97 (9) (May): 632-642.
- Pecorino, L. (2012.) : *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Third edition. University of Greenwich: 197-224
- Psaila B and Lyden D. 2009. The Metastatic Niche: Adapting the Foreign Soil. *Nat. Rev. Cancer* 9 (4) (April): 285–293. doi: 10.1038/nrc2621
- Rajkumar SV, T E Witzig. 2000. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev*. 26 (5) (October): 351-362.
- Roy R, Yang J and Moses MA. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol*. 27: 5287- 5297.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139 (5) (November): 871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Valastyan S and Weinberg RA. 2011. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147 (2) (October): 275–292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024
- Vleminckx K, Vakaet Jr K, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66 (1) (July): 107-119

## 5.1 INTERNET

<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/angiogenesis/AllPages>,  
02.09.2013.

## 6 SAŽETAK

Rak je bolest kod koje se tjelesne stanice nekontrolirano razmnožavaju zbog poremećenih normalnih regulacijskih mehanizama. Maligni tumori infiltriraju se u okolna tkiva prodirući među zdrave stanice i mogu se kroz krv i limfne žile proširiti na udaljene dijelove tijela. Proces kojim maligne stanice migriraju s mjesta nastanka primarnog tumora u druge dijelove tijela naziva se metastaziranje. Metastaziranje obuhvaća invaziju, intravazaciju, transport, ekstravazaciju i metastatsku kolonizaciju. Ključni korak za preživljavanje tumora je angiogeneza, odnosno formiranje novih krvnih žila iz već postojećih. Svaki pojedini korak omogućen je brojnim genetskim i epigenetskim promjenama tumorskih stanica, kao i specifičnim interakcijama sa stromalnim stanicama pripadajućeg organa. Kako bi došlo do metastaziranja, potrebno je pronaći odgovarajuću mikrookolinu. Neki tumori kao svoje odredište za metastaziranje biraju prvi najbliži organ, budući da tumorske stanice na svom putu zbog veličine i raznih prepreka lako mogu zaglaviti unutar kapilara. Drugi pak metastaziraju na karakteristična, unaprijed određena mjesta, pri čemu se radi o genetski manipuliranim interakcijama između tumorskih stanica i receptora na stijenkama krvnih žila. Iako otprilike 1 od 3 osobe u nekom razdoblju svog života dobije rak, mnogi se mogu izliječiti zahvaljujući dostignućima u postavljanju dijagnoza i liječenju. Ovisno o vrsti i stadiju raka, terapija može biti namijenjena izliječenju, usporavanju rasta raka ili omogućavanju što ugodnijeg života. Dvije obećavajuće biološke terapije su genska terapija i angiogenska inhibicija. Razvijanje novih terapija koje će ciljano djelovati na produkte gena koji se eksprimiraju u određenim fazama rasta tumora omogućit će sprječavanje daljnjeg rasta i metastaziranje tumora.

## 7 SUMMARY

Cancer is a disease in which somatic cells multiply uncontrollably due to dysfunctional regulation mechanisms. A malignant tumor is capable of invading into adjacent tissues and may be capable of spreading to distant tissues through blood and lymph vessels. The process by which tumor cells from a primary site invade and migrate to other parts of the body is called metastasis. Tumor cells undergo several major steps during metastasis: invasion, intravasation, transport, extravasation, and metastatic colonization. Metastatic colonization cannot be successful without the formation of new blood vessels from pre-existing ones in a process called angiogenesis. Each of these events is driven by the acquisition of genetic and epigenetic alterations within tumor cells and the co-option of nonneoplastic stromal cells. Metastases selectively colonize specific organs because of a 'match' between the migrating tumor cell and a suitable environment. As the bloodstream is the predominant means of long-distance transport and tumor cells can easily get stuck in the vasculature, organs in close proximity are likely to be main sites of metastasis for a particular primary tumor. On the contrary, the destination of metastasized cells can be genetically influenced by interactions between receptors lining the capillaries in certain an organ and tumor cells. Basic research findings have helped develop two new most promising therapies: gene and anti-angiogenic therapy. Developing new techniques which will target protein products of genes that are associated with primary tumor growth and risk of metastasis could give us hope of managing cancer.