Роля на хипоксия индуцираните фактори, съдово ендотелния растежен фактор и Notch каскадата за ангиогнезата при плоскоклетъчни карциноми на глава и шия

Molecular basis of angiogenesis in squamous cell carcinoma

И. Чалъков, Т. М. Попов

Катедра по ушни, носни и гърлени болести
Медицински университет – София

Резюме:

Неоангиогенезата е основен адаптивен отговор на всяка тъкан, която е подложена на хипоксия. Една от най-характерните локализации на този процес е солидната туморна тъкан. Крайъгълен камък на процеса на неоангиогенеза е акумулацията на хипоксия индуцирани фактори, които при повишени концентрации задействат голям брой взаимносвързани каскади, водещи в крайна сметка до миграция на ендотелни клетки от кръвното русло и тяхната пролиферация и диференциация до аберантни капилярни и съдови мрежи. Сред основните механизми на осъществяване на тези процеси е сигналната система на съдово ендотелния растежен фактор, както и notch-сигналната каскада. В този кратък обзор резюмираме основните роли на тези молекулярни каскади, последните открития за връзките помежду им и влиянието им на общия баланс на клетъчно ниво на ендотелните клетки.

Ключови думи: ангиогенеза, VEGF-A, HIF, Notch

Въведение

Физиологично тъканният кислород е в по-ниски нива спрямо кислорода в артериалната кръв поради зависимостта си от дифузия през капилярите и постоянната консумация при оксидативното фосфорилиране локално. При редица патологични процеси тъканният кислород може да бъде допълнително намален поради силна локална консумация и/или намалено ниво на циркулация. Подобен феномен се наблюдава именно при туморни тъкани, чийто растеж и съответно кислородна консумация надминават възможностите на хранещите ги съдове, което локално води до силно хипоксична микросреда на туморната тъкан [1]. С натрупването на различни експериментални данни ин виво и ин витро редица автори смятат, че рано в туморогенезата се наблюдава „ангиогенно превключване“, за което са отговорни трите основни компонента: хипоксия на туморната тъкан, активирани онкогени и метаболитен стрес.

Роля на хипоксия индуцирани фактори

Както нормалните клетки, така и туморните клетки притежават изключително чувствителни системи за долавяне на флуктуации в нивата на интрацелуларен кислород и отговарят на снижаване на тези нива с бързо акумулиране на т.нар. хипоксия индуцирани фактори (Hypoxia inducable factors, HIFs), които представляват хетеродимерни транскрипционни фактори [2-5]. Увеличаването на HIFs активира транскрипцията на голям брой HIF таргетни гени, сред които: фосфоглицерат киназа, еритропоетин и съдов ендоте-

лен растежен фактор (Vascular endothelial growth factor – A, VEGF-A). Това води до увеличение на гликолизата, адаптация на клетъчно ниво към хипоксията и стимулация и развитие на неоангиогенеза.

Освен от интрацелуларните нива на кислород, HIF протеините се регулират и от редица странични механизми, които допълнително настройват тази каскада. Сред позитивните регулатори на HIF протеините са: инсулинът, IGF-1 и 2, епидермален растежен фактор, тумор некрозис фактор – алфа, интерлевкин-1, ангиотензин II и др. Различни са механизмите за повишаване на тяхната експресия.

Хипоксия индуцираните фактори представляват хетеродимерни транскрипционни фактори, съставени от една алфа и една бета единица. При бозайниците алфа субединицата има три изоформи, като най-изследвана от трите е HIF-1алфа изоформата. HIF-1алфа и HIF-2алфа активират поредица от транскрипционни таргетни гени чрез свързването си с хипоксия отговарящи елементи (Hypoxia response elements, HRE). Наличието им е демонстрирано в голяма част от ангиогенните генни като съдов ендотелен растежен фактор-А (Vascular Endothelial Growth Factor – A), еритропоетин и фибробластен растежен фактор (Fibroblast Growth Factor, FGF) и eNOS [6-10]. Именно тази каскада от биологично активни молекули стимулира миграцията на ендотелни клетки от циркулацията и тяхното диференциране и организация в нови съдове за хипоксичната тъкан. Ролята на крайъгълен камък на HIF протеините в туморната ангиогенеза се доказва от опитите с нок-аут мишки, при които се наблюдава значително намаление във васкуларизацията на туморната тъкан. След задълбочена литературна извадка не се откриха студии, изследващи нивата на експресия на тези три изоформи в плоскоклетъчни карциноми на главата и шията и опити за тяхното диференциране във функционално отношение. Подобни проучвания има единствено направени за различни нормални тъкани, които показват специфични модели на експресия за всяка тъкан. Ние смятаме, че изследването и систематизирането на подобни данни за карциномите на глава и шия биха имали фундаментално значение за разбирането на ангиогенезата при тях, както и голяма прогностична значимост.

Роля на тумор асоциираните макрофаги

Хистологично еволюцията на неоангиогенезата се проследява, като в началото се оформят т. нар. горещи точки (“hot spots“), от които се организират млади капилярни структури. Впоследствие подредбата и разрастването на ендотелните клетки еволюира в по-големи съдови структури и аберантни колатерали. Интересна зависимост е открита между неоангиогенезата и т.нар тумор-асоциирани макрофаги (Tumor associated macrophages, TAMs). Установява се, че тяхната активност под формата на секреция на широка палитра от цитокини е от важно значение за туморната неоангиогенеза и нивата на новообразувани съдове корелира с нивата на инфилтрация от TAMs. Освен тези паракринни механизми на стимулиране са доказани като есенциални и автокринните механизми на самостимулация от страна на мигриралите от циркулацията ендотелни клетки.

Роля на съдово ендотелния растежен фактор

Съдово ендотелният растежен фактор (VEGF) е хомодимерен гликопротеин с молекулна маса от 45 кДа. Семейството на VEGF включва VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и структурно свързаната молекула – плацентарен растежен фактор (PlGF). Досега са открити три VEGF тирозин киназни рецептори – VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flt-1/KDR), VEGFR-3 (flt-4). Свързването на VEGF за тези рецептори инициира каскада от сигнални пътеки, които медиират миграцията и пролиферацията на ендотелни клетки, както и увеличен пермеабилитет. VEGF-A се свързва както с VEGFR-1, така и с VEGFR-2, за да медиира ангиогенеза, докато VEGF-B и PlGF имат афинитет само към VEGFR-1. Досега са изследвани многобройни стратегии за инхибиране на VEGF, включващи неутрализиращи моноклонални антитела спрямо него, нискомолекулни VEGFR тирозин киназни инхибитори и други. След тежки рандомизирани проучвания се наблюдават сериозни успехи в преживяемостта и прогнозата, но очакванията не се сбъдват в желаните мащаби – големият брой на резистентност към моноклонална терапия сред пациентите, както и липсата на стабилна стабилизация на туморите продължават да са причина за чести неуспехи. Допълнително се описват редица токсични странични реакции на тези препарати. Досега преминали фаза 3 от клинични изпитания са препарати за колоректален, ренален и карцином на гърдата, като за редица други неоплазми, включително плоскоклетъчния карцином на глава и шия в момента текат предклинични проучвания.

Роля на Delta/Jagged-Notch каскадата

Notch е фундаментална сигнална каскада, активна в клетки, които преминават през процес на диференциация и по-конкретно процеси, определящи клетъчната съдба – към съхранение и пролиферация или към апоптоза. Delta-Notch сигналната ситема е форма на клетъчна комуникация, помагаща на група от подобни една на друга клетки да интегрират информация за заобикалящата ги среда и да се разпределят в отделни различаващи се една от друга пътеки на диференциация. Един от механизмите, познат като латерална инхибиция, включва представянето на Notch лиганд (Delta или Jagged) на близкостояща Notch рецепторна клетка, в резултат на което интрацелуларно в първата се активира Notch каскада и тя пролиферира, докато втората бива инхибирана. Така едната клетка се промотира от Notch сигналната активация, докато другата застива поради инхибицията на същата тази каскада. При бозайниците тази каскада е представена от четири трансмембранни рецептора (Notch 1-4). В съдовете Notch 1 и Notch 4 функционират в диференциращите (незрели) ендотелни клетки, докато Notch 3 е важен за диференциацията на гладко мускулната клетка. Съответните лиганди биват пет вида: Delta-like 1,3,4 и Jagged-1, Jagged-2). Важни за процесите на ангиогенеза са Delta-like 1,4 и Jagged 1 лиганди, при свързване на рецептор-лиганд между две непосредствено стоящи една до друга ендотелни клетки.

Взаимодействие между VEGF и Delta-Notch каскадите

Първите сведения за връзката между неоангиогенезата и Delta-Notch каскадата се съобщават, 2001, при чиито изследвания нок-даун гризачи имат дефектно развитие на артериални съдове. Впоследствие бе доказано, че VEGF стои по-високо в каскадата и води до увеличение на експресията на Notch, което съответно води до продуктивна интерцелуларна комуникация сред незрелите ендотелни клетки и съответно артериална диференциация. Така VEGF регулира експресията на Notch каскадните елементи. Изследвания показват, че това се получава, като VEGF увеличава експресията на Dll4-Notch. Допълнително последният се регулира нагоре и директно от хипоксия, както и от HIF1-alpha. При студии, изучаващи ангиогенезата, се откриват изключително високи нива на експресия на Dll4 в незрелите ендотелни клетки и най-вече в т.нар. „пъпкуващи се върхни клетки“ („tip cells“). Важно е да се отбележи, че блокирането на VEGF при експериментални модели не редуцира експресията на Dll4, което е своеобразна индикация, че експресията на последния протеин се индуцира и от други сигнали. Противоречиви на тези резултати са изследвания на тумори, при които при блокада на VEGF се наблюдава бърз спад на Dll4. Важна насока в бъдеще е да се изследва дали различните лиганди имат една и съща сигнална активност за ангиогенните ендотелни клетки.

Отделни проучвания намират и отрицателна обратна връзка, при която Notch каскадата може да променя нивата на експресия на трите VEGF рецептора, като редуцира VEGF/VEGF-R2 оста. Има хипотези, че тази регулация надолу на VEGF-R2 от Notch каскадата е механизъм да се позволи локална диференциация на клетки в зона на VEGF-медиирана ангиогенеза: високите нива на VEGF индуцират Dll4 в ендотелна пъпкуваща се зона, която съответно завишава активността на Notch каскадата, която от своя страна потиска VEGFR-2 сред оставащите зад тях вече оформени една спрямо друга като стъбло клетки. Така върховите клетки отговарят мощно на VEGF, докато вече подредените в колонка назад ендотелни клетки отговарят по-потиснато на него и това им позволява да тръгнат по пътя на диференциация, а не на пролиферация. Важно съобщение бе направено, 2006, когато се откри, че резистентни на терапия с моноклонални антитела срещу VEGF тумори биват инхибирани от блокери на Dll4. Въпреки това, досега изследванията в тази посока са недостатъчни, особено тези, обединяващи блокадата и на двете сигнални каскади. Има сведения, че високите нива на Dll4-Notch по някакъв начин корелират с чувствителността към блокада.

Концептуално, VEGF системата дава тласкащ сигнал към ендотелните клетки да пролиферират. Въпреки това не всички клетки отговарят еднакво на VEGF. Delta-Notch каскадата (чрез Dll4) позволява на ендотелните клетки да отговорят адекватно на активиращия сигнал на VEGF. Последващият васкуларен отговор увеличава васкуларната им функция и в крайна сметка редуцира чувствителността им към VEGF сигнализацията. Интересно би било да се докаже, че съществуват две паралелни клетъчни съдби – към пролиферация (както при „пъпкуващите се върхови клетки“) и на диференциация и специализация при образуващите стъблото на бъдещия съд клетки.

Заключение

В този кратък преглед разгледахме основните сигнални каскади, регулиращи процеса на неоангиогенеза, както и техните взаимовръзки. Изключително сложният баланс на тези процеси, хетерогенността на туморната тъкан и неточностите в методите на изследвания все още поставят много повече въпроси, отколкото дават отговори. Важно е да отбележим, че има редица фундаментални изследвания ин витро, които е необходимо да се пренесат на едно следващо ниво, а именно реалното им значение за туморната експанзия и малигненост.

Литература

1. Maltepe E, Simon MC (1998) Oxygen, genes, and development: ananalysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. J Mol Med 76(6): 391-401.
2. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Curr Opin Genet Dev 8(5): 588-594.
3. Elson DA, Ryan HE, Snow JW et al (2000) Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multistage epidermal carcinogenesis and wound healing. Cancer Res 60(21): 6189-6195.
4. Lee SH, Wolf PL, Escudero Retal (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med 342(9): 626-633.
5. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K et al (2003) Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia inducible factor 1. Circ Res 93 (11): 1074-1081.
6. Ikeda E, Achen MG,Breier G et al (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. J Biol Chem 270(34): 19761-19766.
7. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. Mol Cell Biol 16(9): 4604-4613.
8. Takeda N, Maemura K, Imai Y et al (2004) Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. Circ Res 95(2): 146-153.
9. Gerber HP, Condorelli F, Park J et al (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. J Biol Chem 272(38): 23659-23667.
10. Marti HH, Risau W (1998) Systemic hypoxia changes the organspecific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. Proc Natl Acad Sci USA 95(26): 15809-15814.