

# ZÁNĚT, NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ A NEOANGIOGENEZE

Karel Souček

E-mail: [ksoucek@ibp.cz](mailto:ksoucek@ibp.cz), tel.: 541 517 166

## Otázky

- ▶ Jaké je možné vysvětlení nízké účinnosti kolonizace mikrometastáz?
- ▶ Jaký mechanismus může vysvětlit korelaci mezi velikostí nádoru a prognózou vzniku metastáz?
- ▶ Jaké důkazy podporují zapojení EMT v nádorové patogenezi, jaké jsou naopak proti?

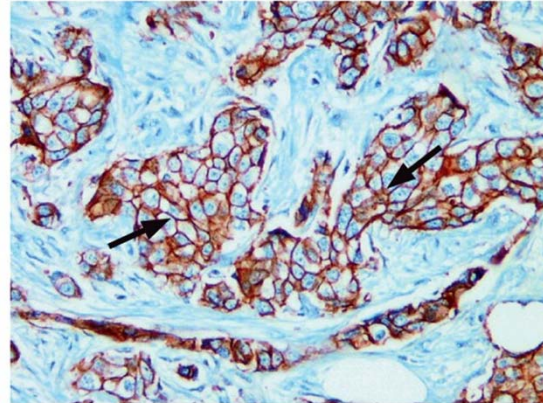
## Typické znaky nádorové buňky

- ▶ podpůrné proliferační signály
- ▶ deregulace supresorů růstu/proliferace
- ▶ odolnost k buněčné smrti
- ▶ neomezená replikace
- ▶ **neoangiogeneze**
- ▶ invaze a metastázování
- ▶ mutace a genomická nestabilita
- ▶ **záněť**
- ▶ přestavba energetického metabolismu
- ▶ únik před zničením imunitním systémem

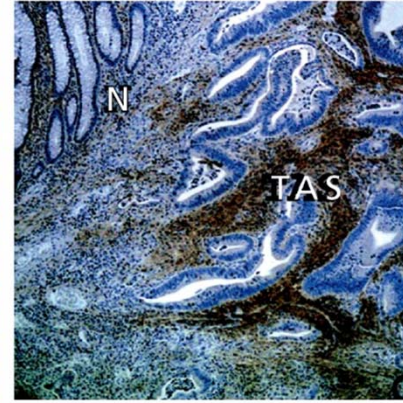


# Stromální komponenta karcinomu

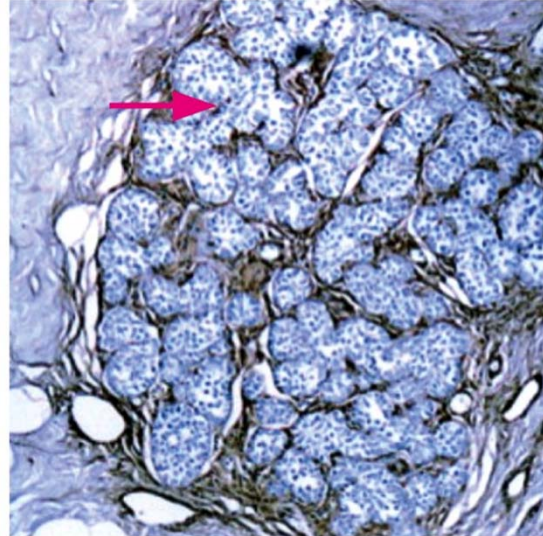
(A) duktální karcinom prsu



(B) karcinom střeva



(C)



(D)

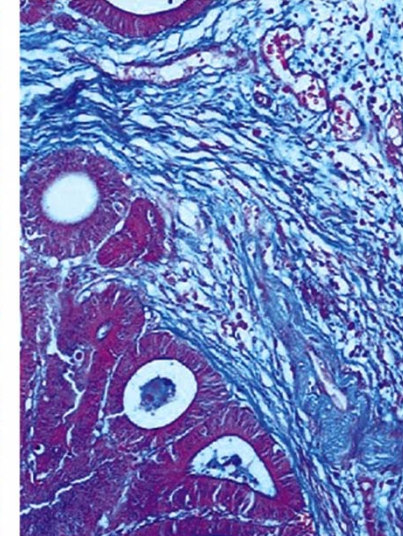


Figure 13.1 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

lobulární karcinom prsu adenokarcinom žaludku



## Variabilita poměru neoplastických buněk a stromatu

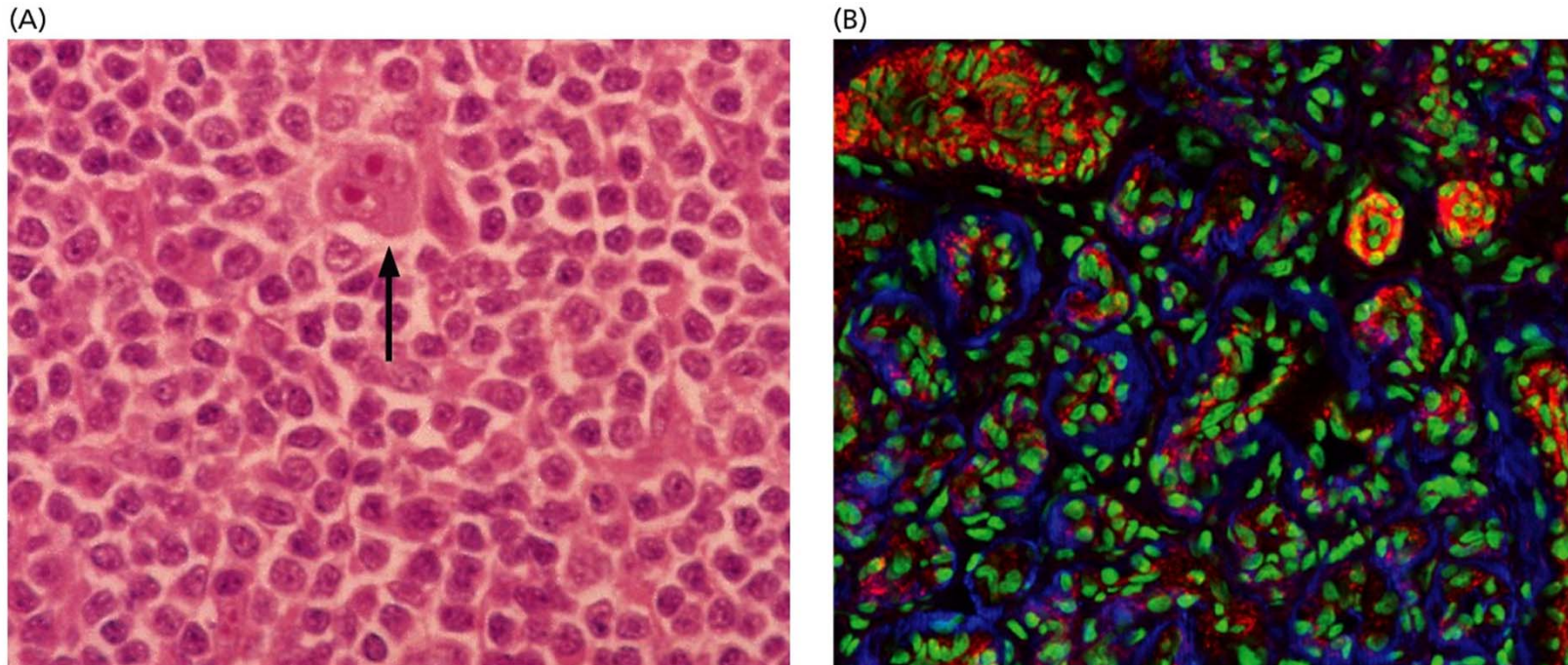


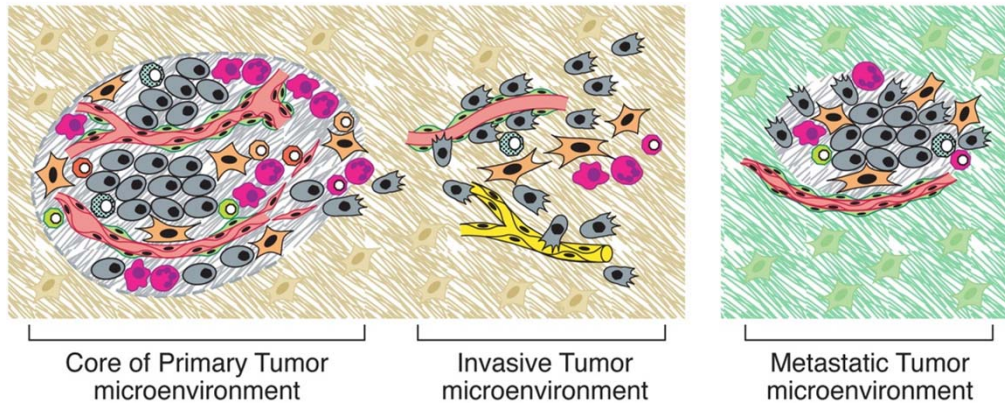
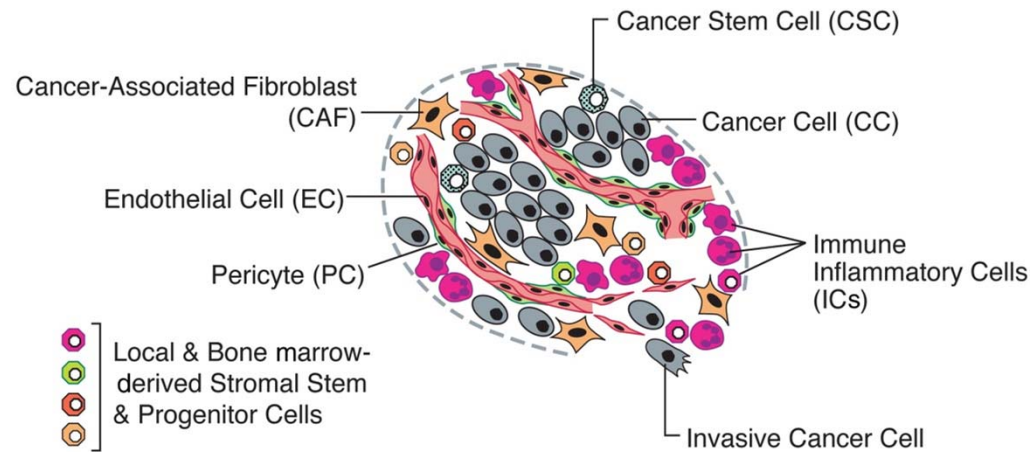
Figure 13.2 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Příklad:

- ▶ Hodgkinův lymfom – 99% buněk normální lymfocyty obklopující Reed-Sternebergovu buňku
- ▶ Hemangiom – **neoplastické endoteliální buňky** tvoří většinu masy nádoru

# Základní principy a znaky karcinogeneze

➤ Rakovina není onemocnění jedné buňky





## Heterotypická signalizace

- ▶ Výměna mitogenních signálů mezi různými typy buněk v normální tkáni
- ▶ Řada těchto interakcí přetrvává i v neoplastických tkáních
  - ▶ Důkaz – autologní transplantace nádorů kůže (1961)
  - ▶ Uplná nezávislost - ascit

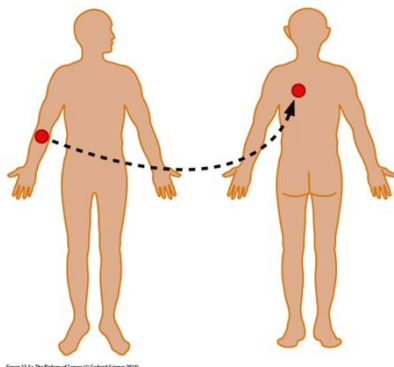


Figure 13.3a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

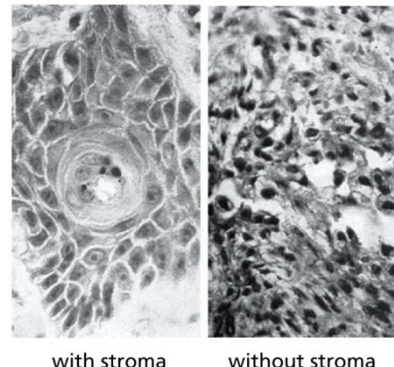


Figure 13.3b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

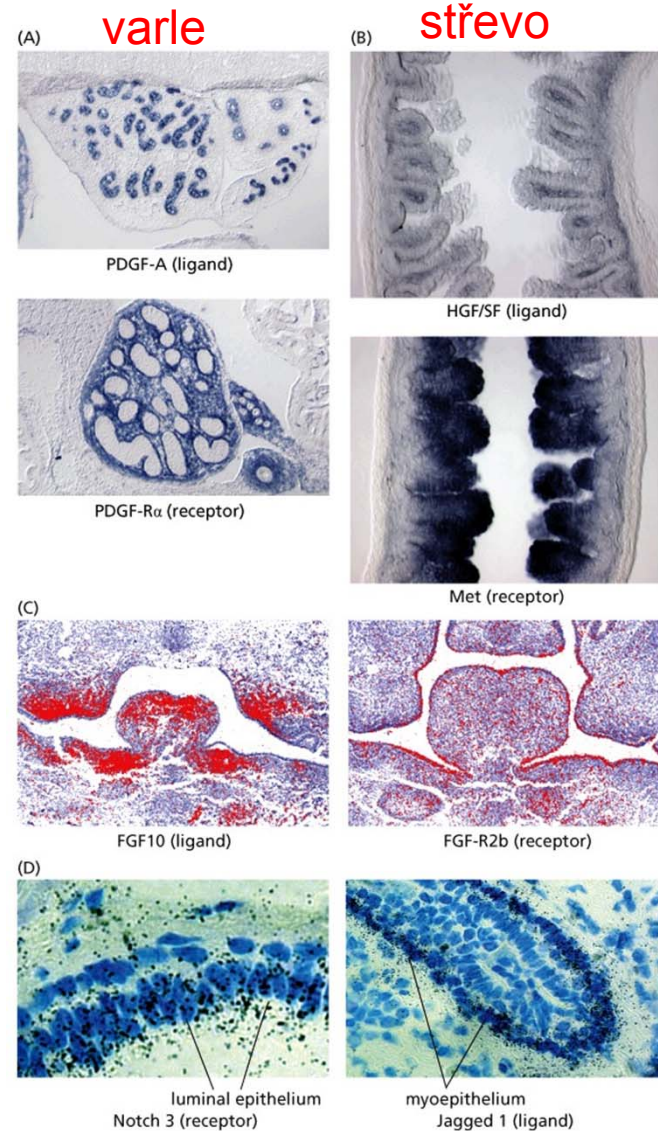


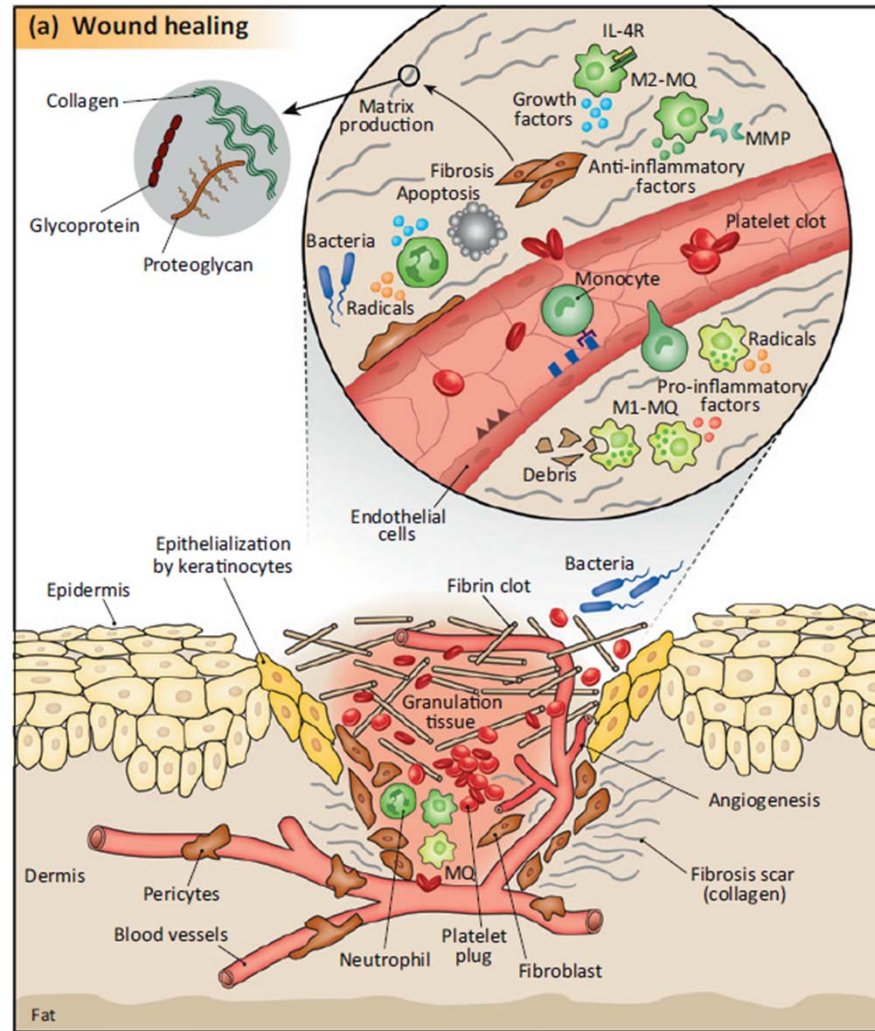
Figure 13.4 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

## Hojení rány

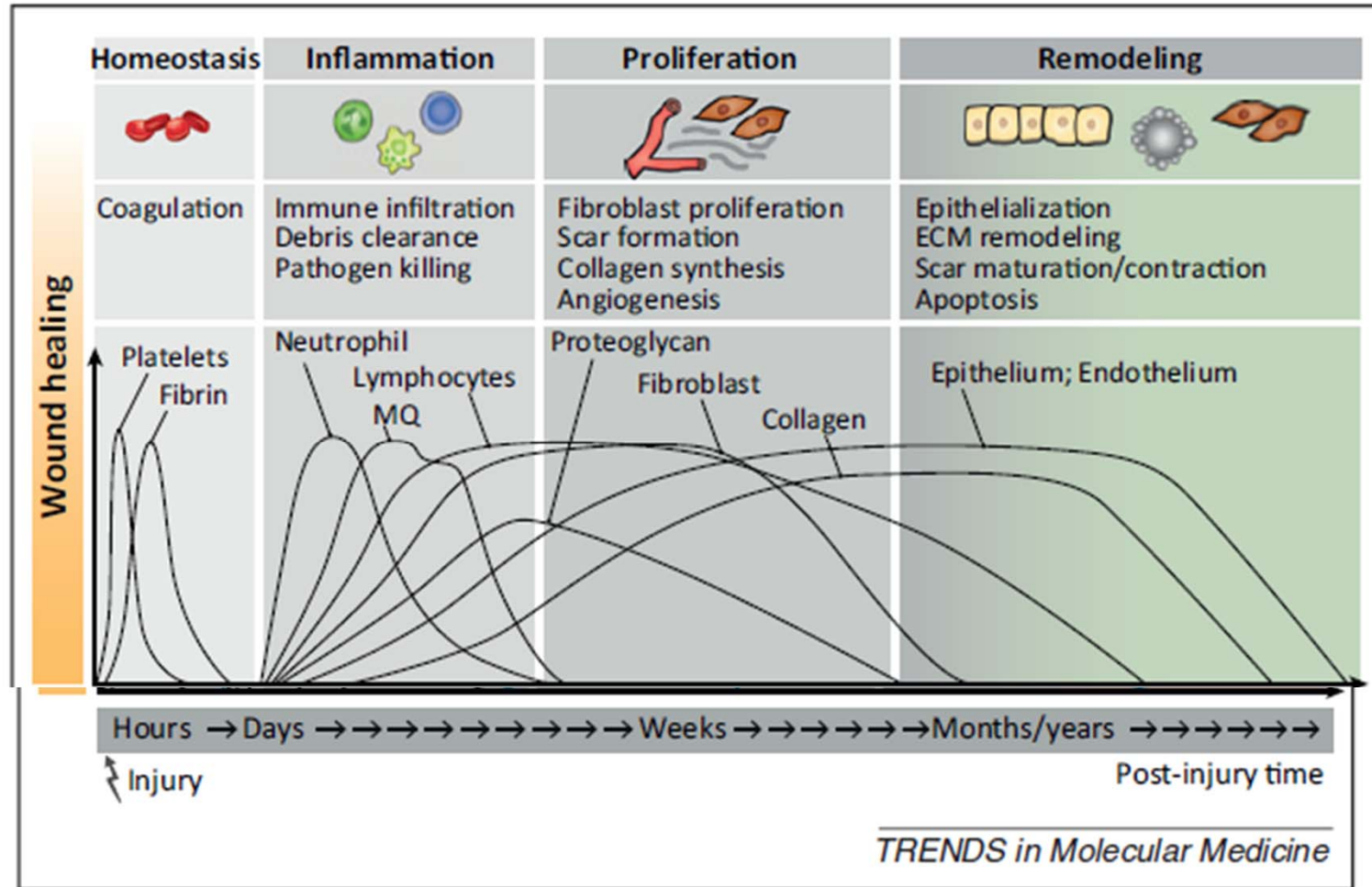
- ▶ Zajištění homeostázy (sekundy – minuty)
  - ▶ Koagulace
  - ▶ Provizorní ECM
- ▶ Zánět (hodiny – dny)
  - ▶ Infiltrace leukocytů
  - ▶ Trofické faktory stimulují migraci a proliferaci dalších buněk
- ▶ Proliferace (dny – týdny)
  - ▶ Vstup fibroblastů a endoteliálních buněk do rány
  - ▶ Reorganizace ECM
- ▶ Remodelace a maturace (týdny – měsíce – roky)
  - ▶ Reorganizace kolegenové ECM
  - ▶ Zakrytí rány epitelem
  - ▶ Migrace keratinocytů, ustanovení nové bazální membrány



# Hojení rány



# Hojení rány



# Nádor – nehojící se rána

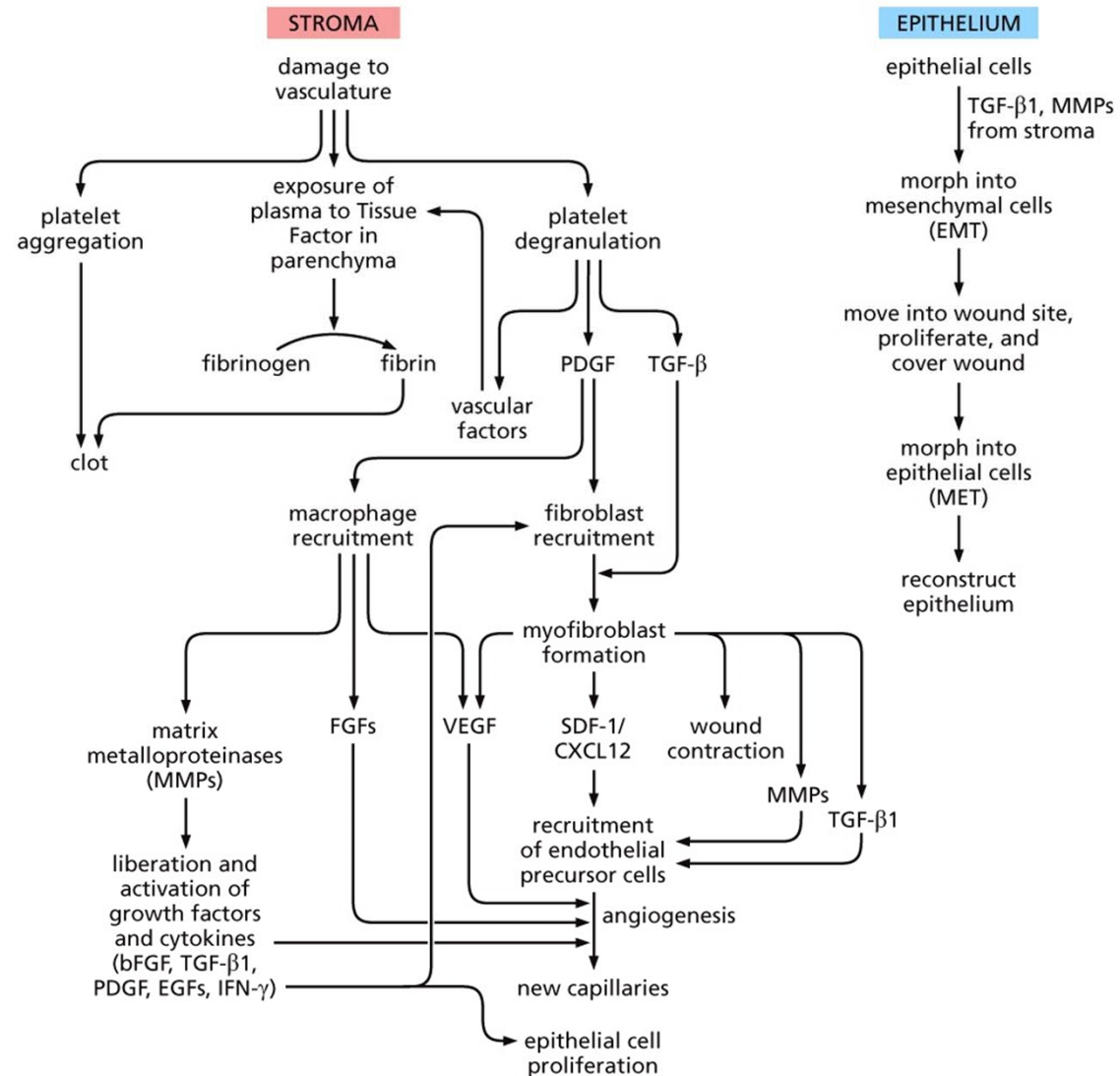
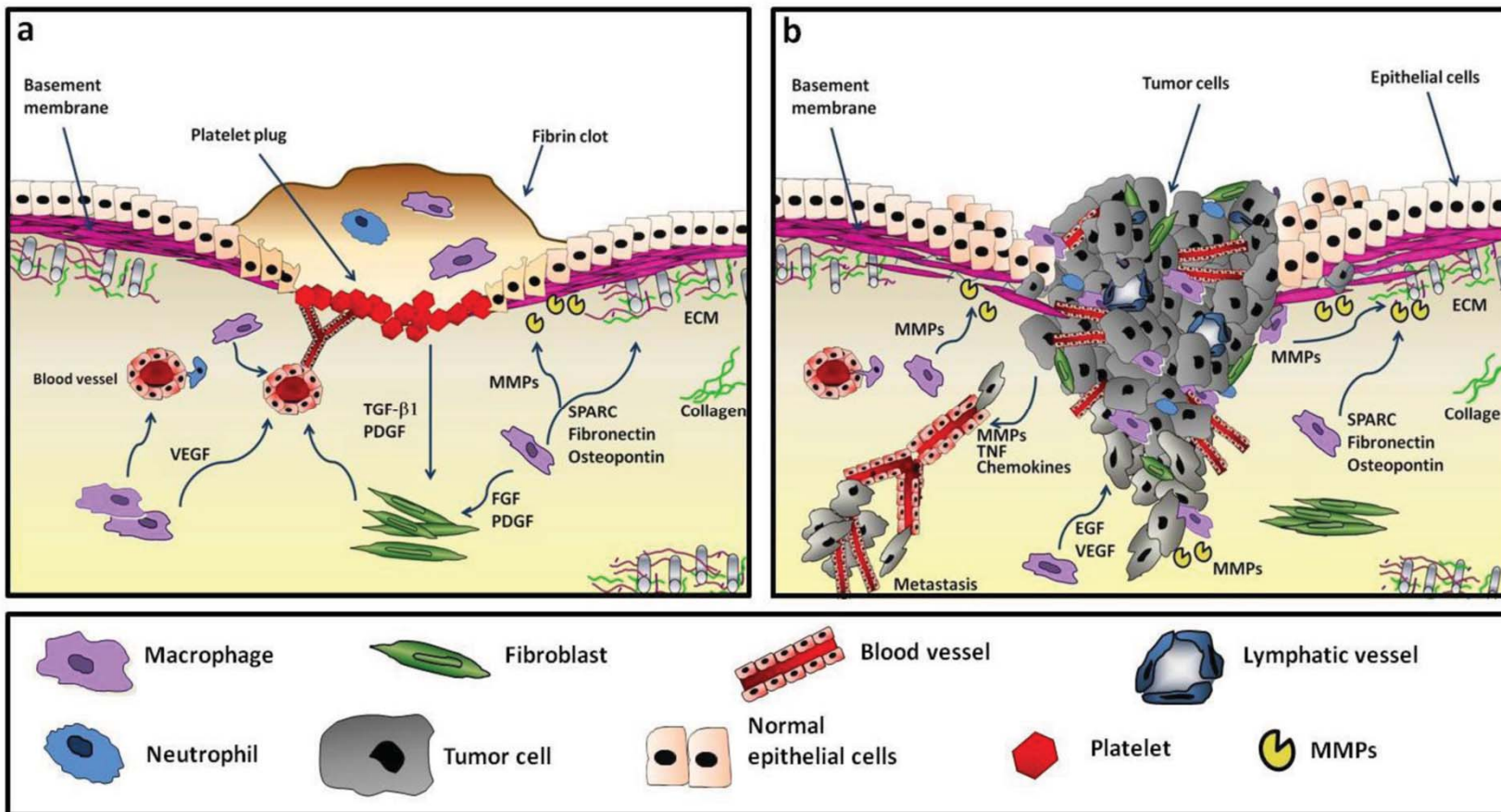


Figure 13.11 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Nádor – nehojící se rána





# Remodelace epiteliální tkáně během hojení, EMT, MET

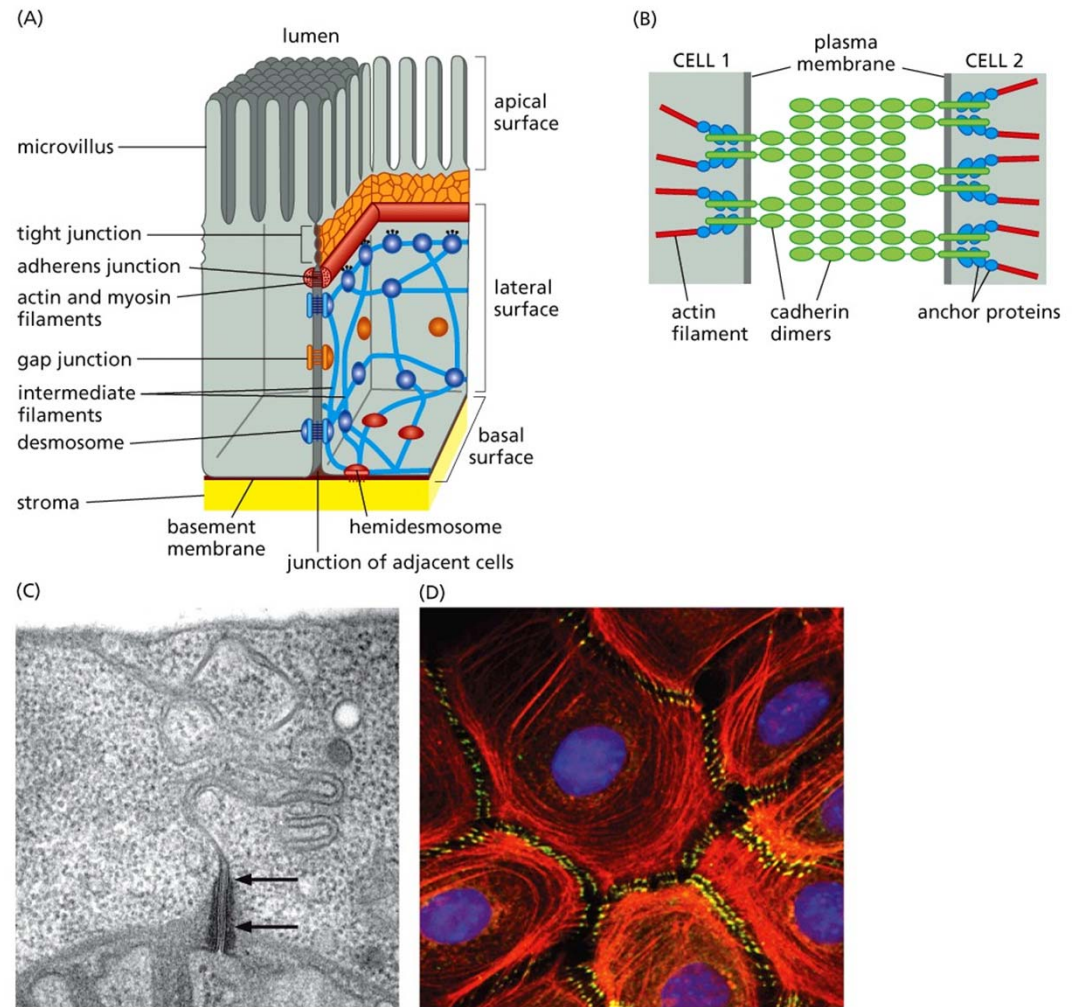


Figure 13.12 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

## Remodelace epiteliální tkáně během hojení, EMT, MET

- Exprese **vimentinu** (mes.) během hojení u normálních epiteliálních buněk
- Příklad plasticity buněk – spontánní indukce  **$\alpha$ -SMA** (mes.) z ztráta exprese **cytokeratinu** (ep.)
- Induce EMT působením MMP-3

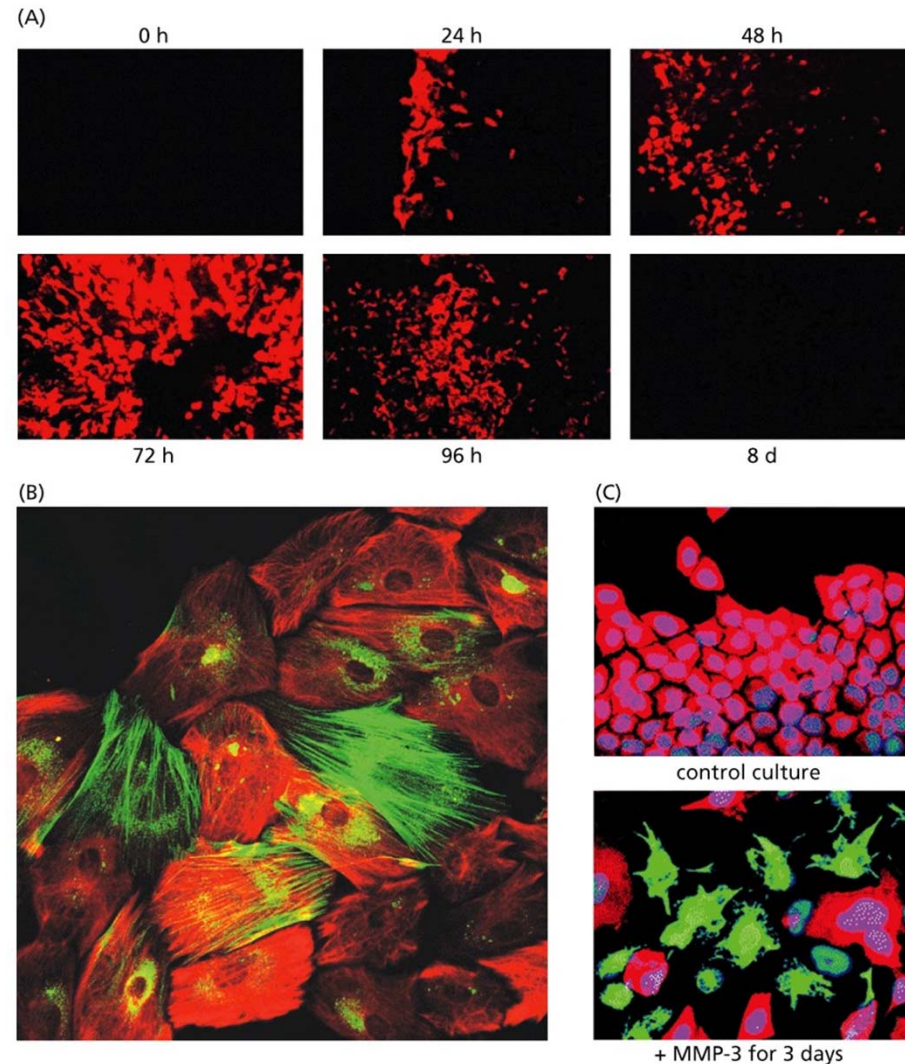
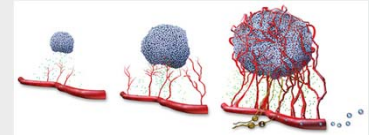


Figure 13.13 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

## Neoangiogeneze



- ▶ nádor, stejně jako zdravá tkáň, vyžaduje přísun živin a kyslíku a odvod metabolitů a CO<sub>2</sub>
- ▶ Nové endoteliální buňky vznikají v průběhu embryogeneze – dochází k vaskulogenezi – formování cév
- ▶ v dospělosti je tento proces utlumen, aktivován jen přechodně - hojení ran, ovulační cyklus
- ▶ Během nádorové progresy je trvale aktivní
  - ▶ VEGF-A (induktor) vs. TSP-1 (inhibitor)
- ▶ Exprese VEGF-A je indukována hypoxií a řadou onkogenů
- ▶ Pericyty a buňky derivované z kostní dřeně přispívají k nádorové neoangiogenezi
- ▶ Chronická aktivace neoangiogeneze v nádoru vede k tvorbě nenormálních cév
  - ▶ Neorganizovaně, složitě větvených
  - ▶ Zdeformované, zvětšené
  - ▶ Nestálý průtok krve
  - ▶ Krvácivost, netěsnost
  - ▶ Abnormální proliferace a apoptóza endoteliálních buněk



## Makrofágy hrají důležitou úlohu v angiogenezi

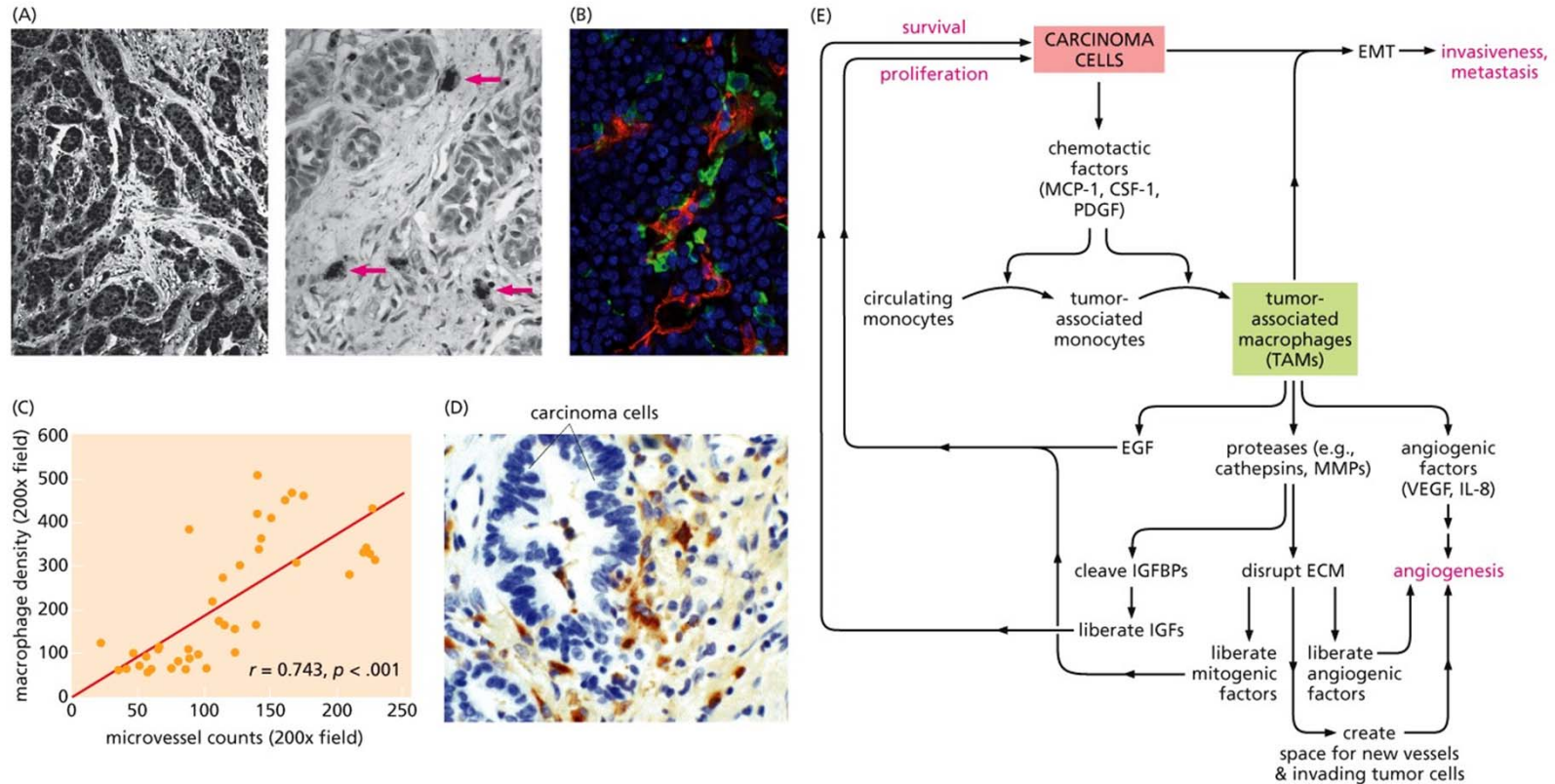


Figure 13.25 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

- Makrofágy mohou produkovat VEGF, asociují s neovaskulogenezí, produkují MMP-9, produkují mitogenní faktory a reorganizují stroma



# Hypoxie, neoangiogeneze

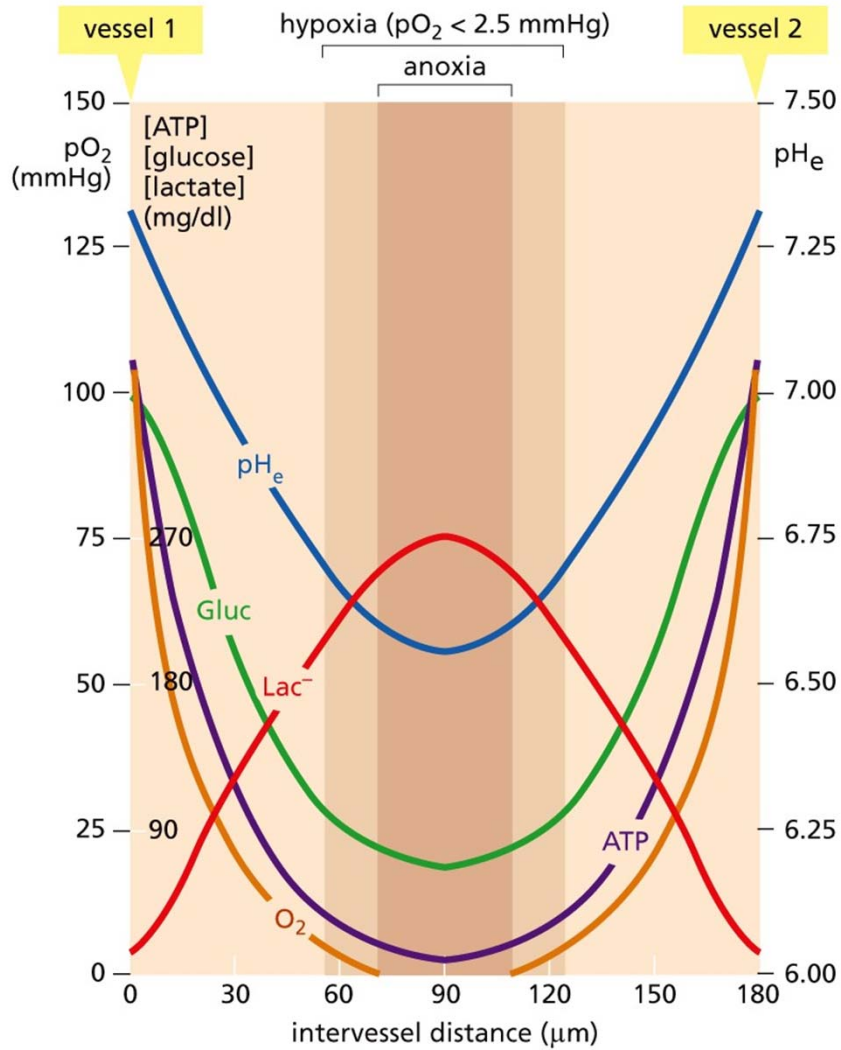


Figure 13.27d The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

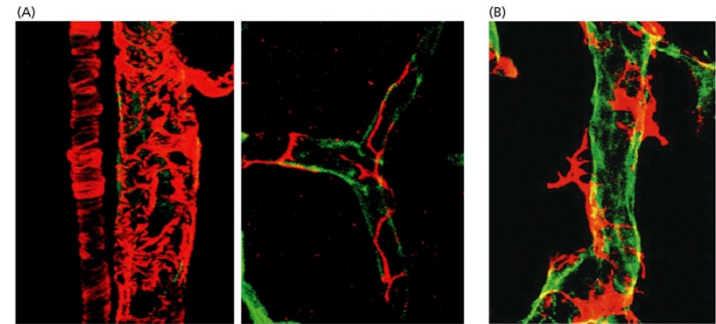


Figure 13.32 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

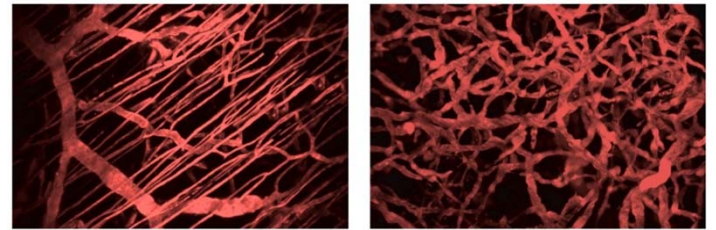


Figure 13.33b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)



Figure 13.34c The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

## Angiogeneze a klinická prognóza

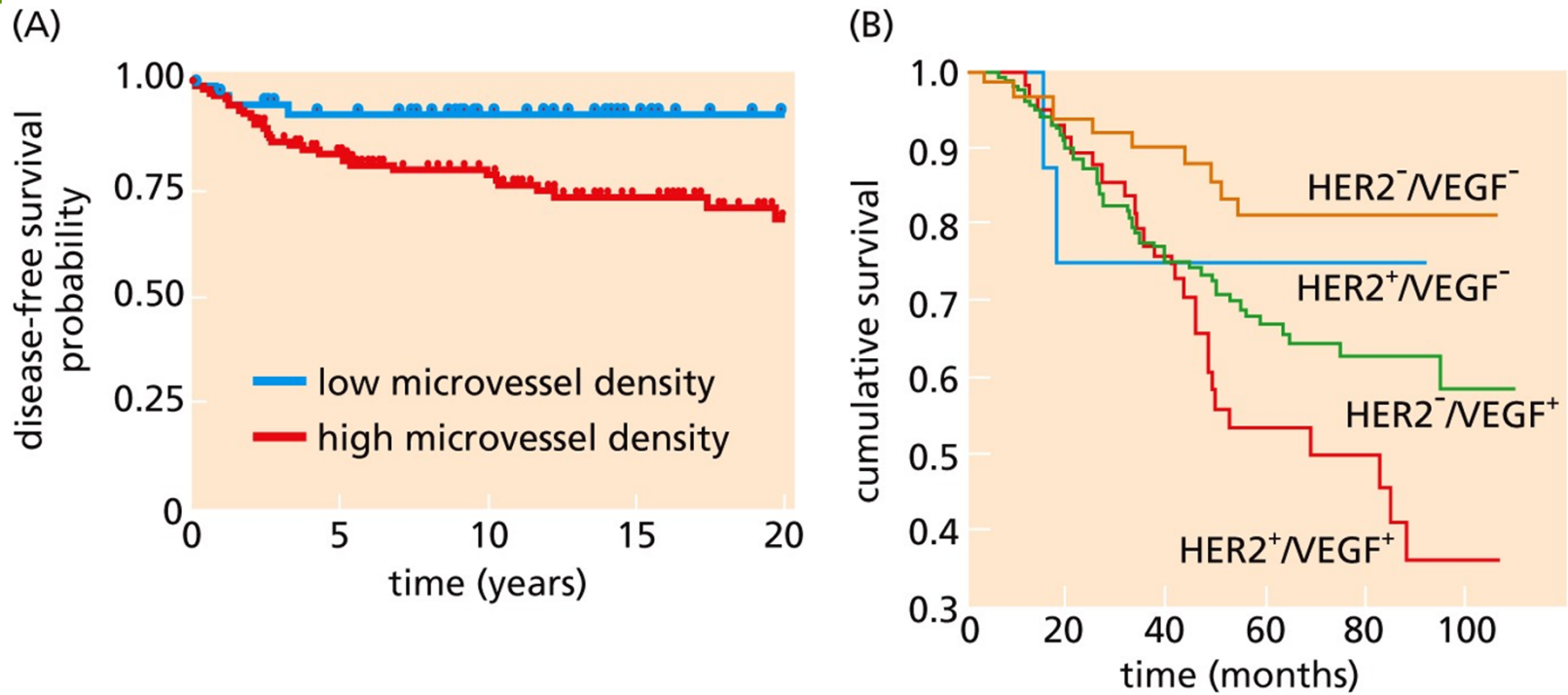


Figure 13.41 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

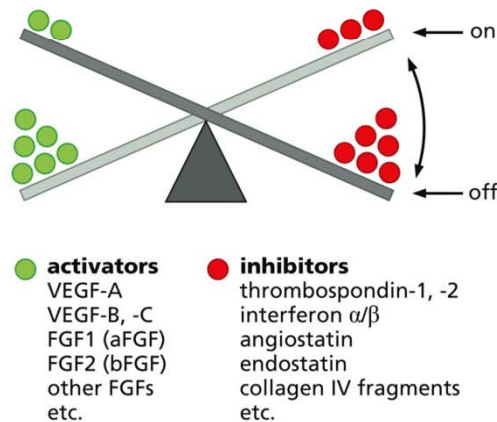


Figure 13.45 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Angiogeneze jako cíl protinádorové léčby

Table 13.6 Summary of clinically approved anti-angiogenic drugs<sup>a</sup>

Agent	Nature of agent	Approved indication	% of patients responding <sup>b</sup>	Improvement <sup>b</sup> in PFS (months)	Improvement <sup>b</sup> in OS (months)
Bevacizumab (Avastin) <sup>c</sup>	anti-VEGF-A MoAb	metastatic CRC <sup>d,e</sup>	10	4.4	4.7
			0	1.4	1.4
			7.8	2.8	2.5
			14.1	2.6	2.1
			20	1.7	2.0
		metastatic non-squamous NSCLC <sup>d</sup> (with chemotherapy)	10.3–14.0	0.4–0.6	NR
			15.7	5.9	NS
			9–18	0.8–1.9	NS
			11.8–13.4	1.2–2.9	NS <sup>d</sup>
			9.9	2.1	NS
Sunitinib (Sutent) <sup>c</sup>	inhibitor of RTKs <sup>g</sup>	recurrent GBM <sup>f</sup>	28		2–3
		metastatic RCC <sup>d</sup> (with IFN- $\alpha$ )	18	4.8	NS
		12.4	3.3	NS	
		metastatic RCC <sup>c</sup>	35	6.0	4.6
		GIST <sup>e</sup>		4.5	
		pancreatic neuroendocrine tumors <sup>c</sup>		4.8	

Table 13.6 (part 1 of 2) The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)



# Angiogeneze jako cíl protinádorové léčby

**Table 13.6 Summary of clinically approved anti-angiogenic drugs<sup>a</sup>**

Agent	Nature of agent	Approved indication	% of patients responding <sup>b</sup>	Improvement <sup>b</sup> in PFS (months)	Improvement <sup>b</sup> in OS (months)
Sorafenib (Nexavar)	inhibitor of VEGF-R, cRaf, PDGF-R, and Kit TKs <sup>h</sup>	metastatic RCC <sup>d</sup>	8	2.7	NS
		unresectable HCC <sup>d</sup>	1	NS	2.8
			2	1.4	2.3
Pazopanib (Votrient)	inhibitor of RTKs <sup>i</sup>	metastatic RCC <sup>d</sup>	27	5.0	NR
		soft tissue sarcoma <sup>e</sup>		3.0	
Vandetanib (Caprelsa)	inhibitor of VEGF-R, EGF-R, and Ret TKs	metastatic medullary thyroid carcinoma <sup>d</sup>		6.2	
Axitinib <sup>e</sup> (Inlyta)	inhibitor of VEGF-Rs, PDGF-R and Kit TKs	advanced RCC <sup>e</sup>		2.0	

<sup>a</sup>“Clinically approved” indicates approval for use by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). “Inhibitor” indicates in all cases a low molecular weight pharmacologic agent. In addition, as of March 2011, derivatives of thalidomide have been found to have substantial therapeutic utility in treating multiple myeloma; they are not included here, however, because the drugs have adverse physiologic effects, notably neurotoxicity. The mTOR inhibitor Everolimus has been approved for treatment of a series of different tumor types and has anti-angiogenic effects; it has not been listed here because it also has effects on apoptosis, nutrient uptake, and proliferation that may explain part or most of its effects.

<sup>b</sup>Improvement relative to standard treatment.

<sup>c</sup>FDA approval for use against breast cancer was revoked in 2011.

<sup>d</sup>First-line therapy.

<sup>e</sup>Second-line therapy. Axitinib was approved because PFS was 2.0 months longer than existing Sorafenib treatment.

<sup>f</sup>Monotherapy.

<sup>g</sup>Inhibitor of VEGF-R, PDGF-R, FLT-3, Ret, and Kit TKs; Raf/B-Raf.

<sup>h</sup>Low-molecular-weight inhibitor of VEGF-Rs and PDGF-Rs.

<sup>i</sup>Inhibitor of VEGF-Rs, PDGF-Rs, and c-Kit TKs.

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; GBM, glioblastoma multiforme; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HCC, hepatocellular carcinoma; IFN, interferon; MoAb, monoclonal antibody; NR, not reported; NS, not significant; NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; RCC, renal cell carcinoma; RTK, receptor tyrosine kinase.

Table adapted from P. Carmeliet and R. Jain, *Nature* 473:298–307, 2011.



# Inhibice angiogeneze - paradox

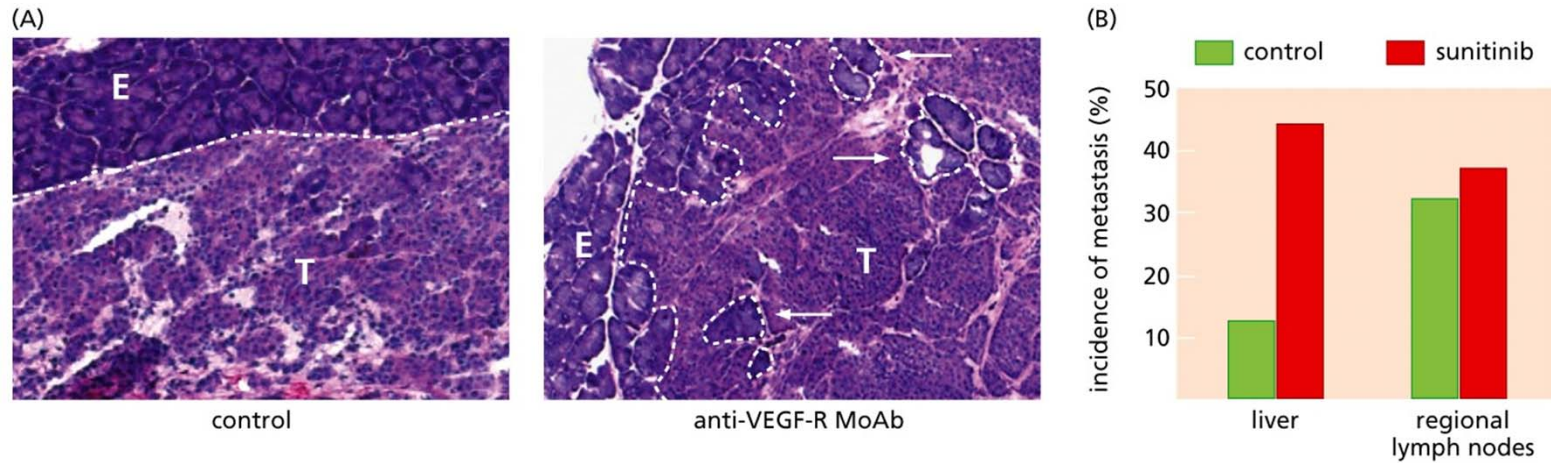


Figure 13.48 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

## Heterotypické interakce jako cíl protinádorové léčby

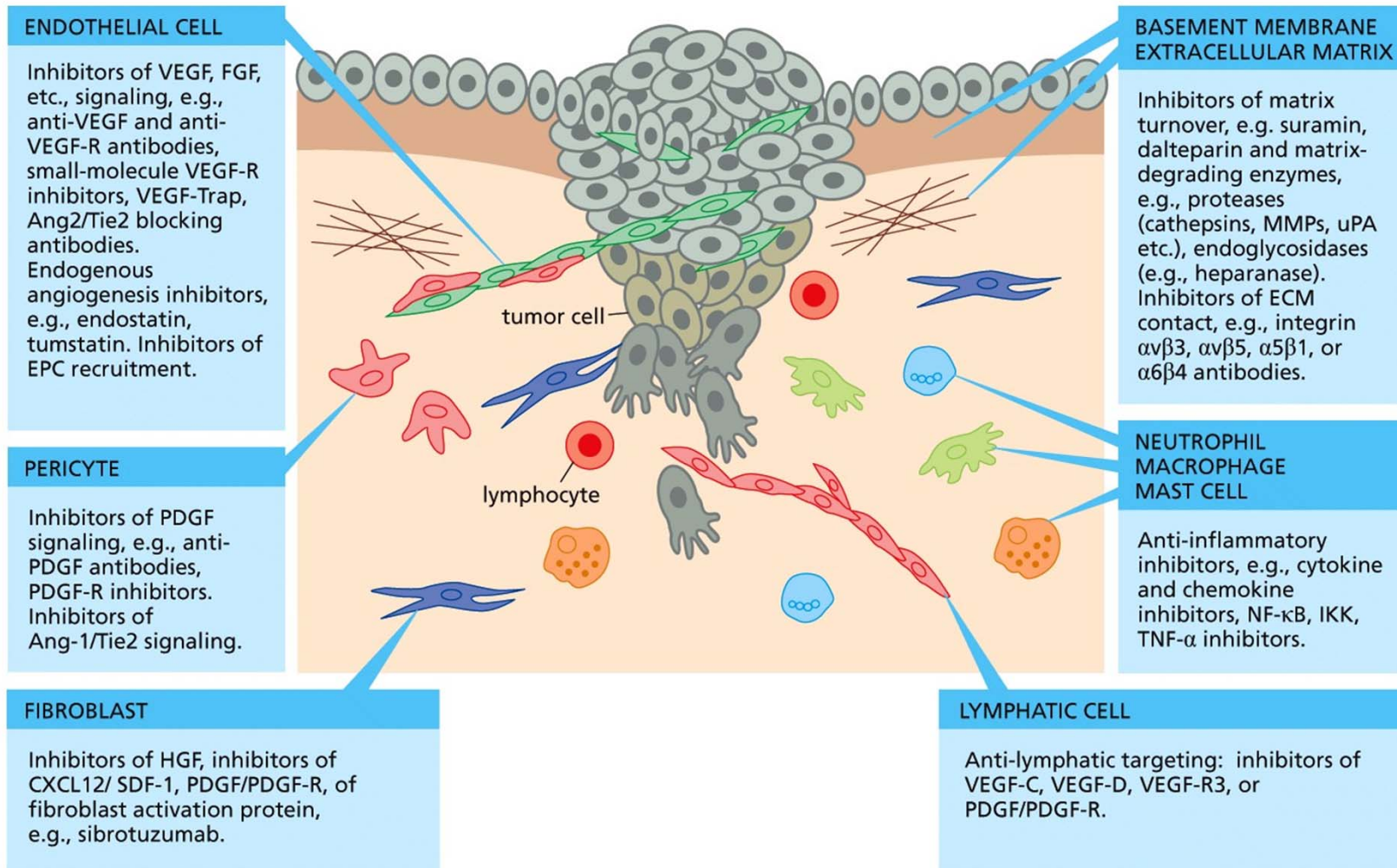
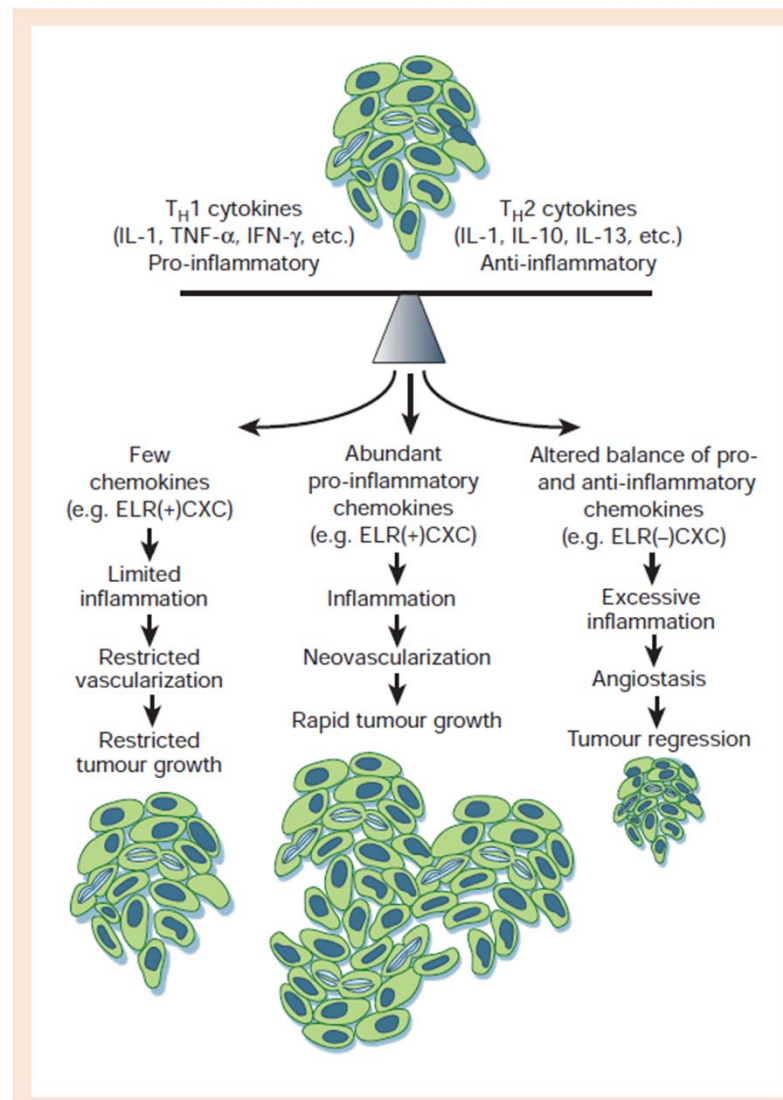


Figure 13.49 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Cytokiny a nádorová progrese





## Zánět a nádorová progrese

Table 1 **Chronic inflammatory conditions associated with neoplasms**

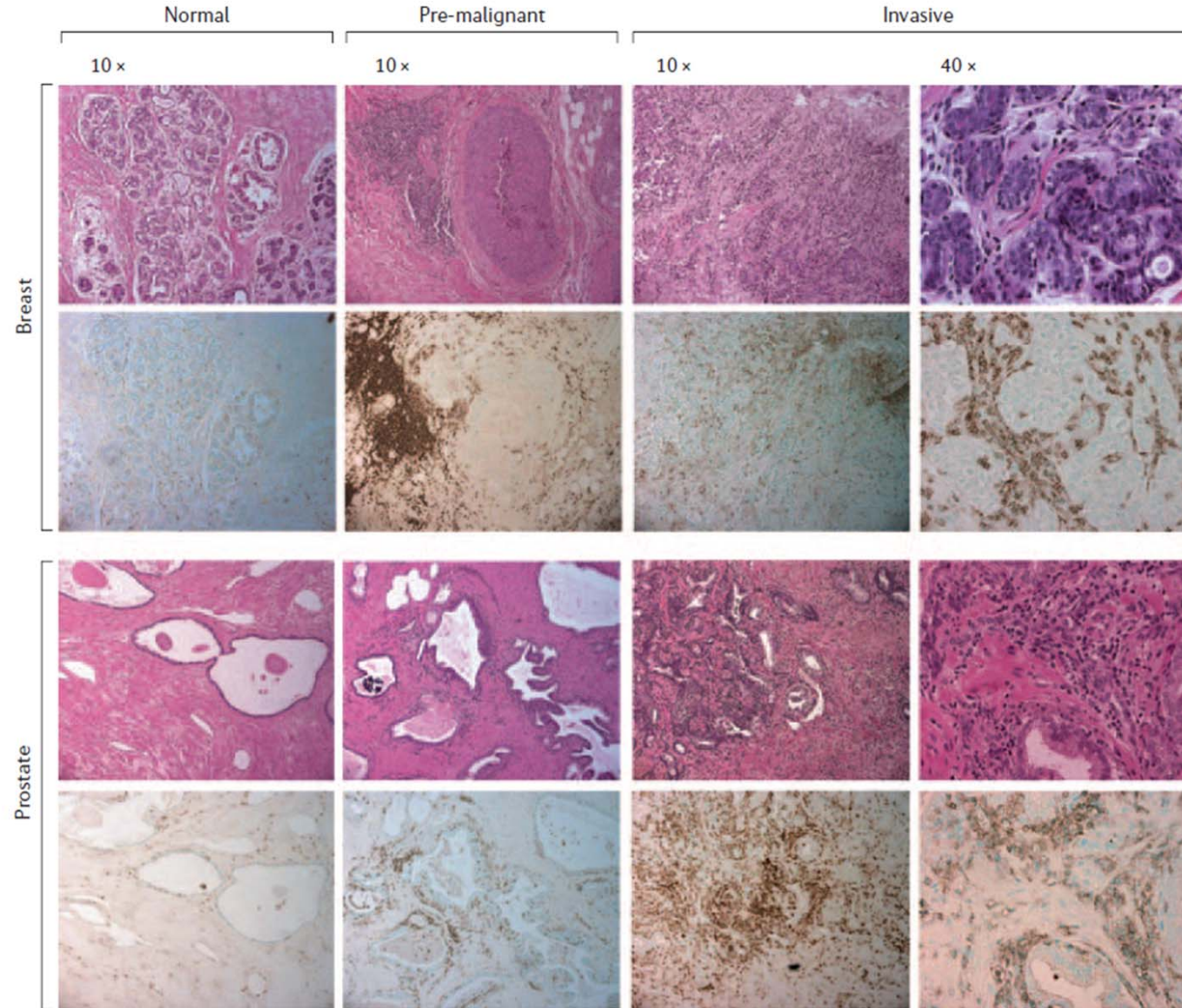
Pathologic condition	Associated neoplasm(s)	Aetiologic agent
Asbestosis, silicosis	Mesothelioma, lung carcinoma	Asbestos fibres, silica particles
Bronchitis	Lung carcinoma	Silica, asbestos, smoking (nitrosamines, peroxides)
Cystitis, bladder inflammation	Bladder carcinoma	Chronic indwelling, urinary catheters
Gingivitis, lichen planus	Oral squamous cell carcinoma	
Inflammatory bowel disease, Crohn's disease, chronic ulcerative colitis	Colorectal carcinoma	
Lichen sclerosis	Vulvar squamous cell carcinoma	
Chronic pancreatitis, hereditary pancreatitis	Pancreatic carcinoma	Alcoholism, mutation in trypsinogen gene on Ch. 7
Reflux oesophagitis, Barrett's oesophagus	Oesophageal carcinoma	Gastric acids
Sialadenitis	Salivary gland carcinoma	
Sjögren syndrome, Hashimoto's thyroiditis	MALT lymphoma	
Skin inflammation	Melanoma	Ultraviolet light

## Zánět a nádorová progrese

Cancers associated with infectious agents		
Pathologic condition	Associated neoplasm(s)	Aetiologic agent
<i>Opisthorchis</i> , Cholangitis	Cholangiosarcoma, colon carcinoma	Liver flukes ( <i>Opisthorchis viverrini</i> ), bile acids
Chronic cholecystitis	Gall bladder cancer	Bacteria, gall bladder stones
Gastritis/ulcers	Gastric adenocarcinoma, MALT	<i>Helicobacter pylori</i>
Hepatitis	Hepatocellular carcinoma	Hepatitis B and/or C virus
Mononucleosis	B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Burkitts lymphoma,	Epstein-Barr Virus
AIDS	Non-Hodgkin's lymphoma, squamous cell carcinomas, Kaposi's sarcoma	Human immunodeficiency virus, human herpesvirus type 8
Osteomyelitis	Skin carcinoma in draining sinuses	Bacterial infection
Pelvic inflammatory disease, chronic cervicitis	Ovarian carcinoma, cervical/anal carcinoma	Gonorrhoea, chlamydia, human papillomavirus
Chronic cystitis	Bladder, liver, rectal carcinoma, follicular lymphoma of the spleen	Schistosomiasis
Pathologic condition	Associated neoplasm(s)	Aetiologic agent

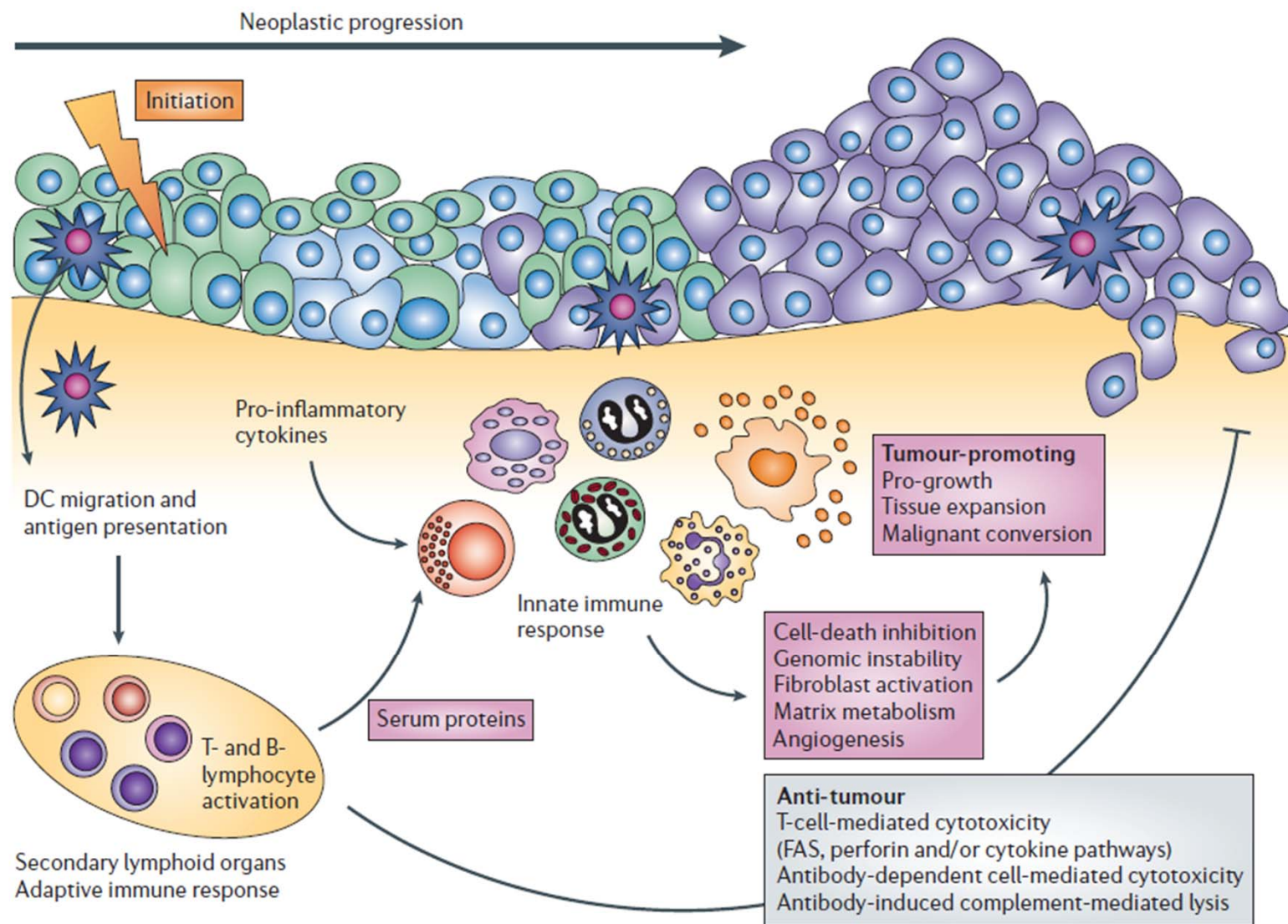


# Infiltrace CD45+ buněk do solidních nádorů





# Imunitní systém, zánět a tumorigeneze



# Rakovina slinivky



## Family History

Risk increases if multiple first-degree relatives had the disease, or any were diagnosed under 50.



## Diet

A diet high in red and processed meats may increase risk. A diet high in fruits and vegetable may decrease risk.



## Obesity

Obese people have a 20% increased risk of developing the disease compared to people of a normal weight.



## Race

African-Americans and Ashkenazi Jews have a higher incidence of pancreatic cancer.



## Smoking

Smoking may cause about 20-30% of all exocrine pancreatic cancer cases.



## Gender

Slightly more men are diagnosed with pancreatic cancer than women.



## Age

The chance of developing pancreatic cancer increases with age.



## Diabetes

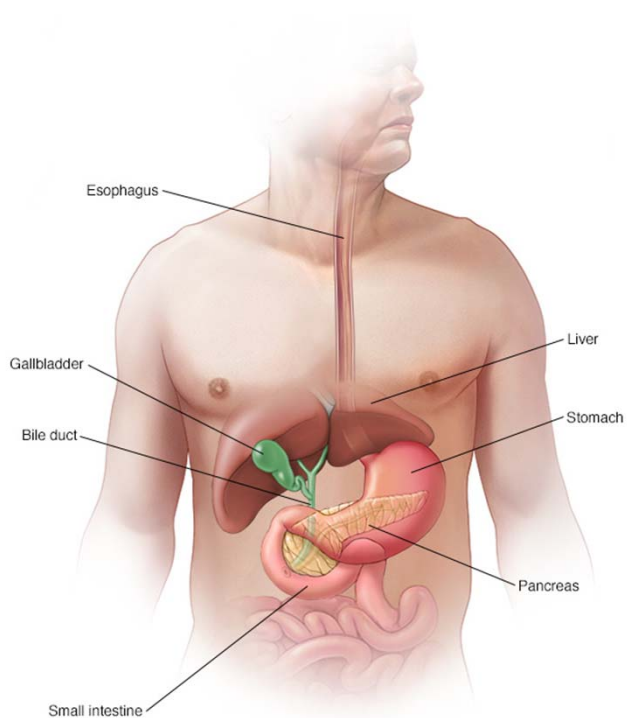
Long standing (over 5 years) diabetes increases risk.



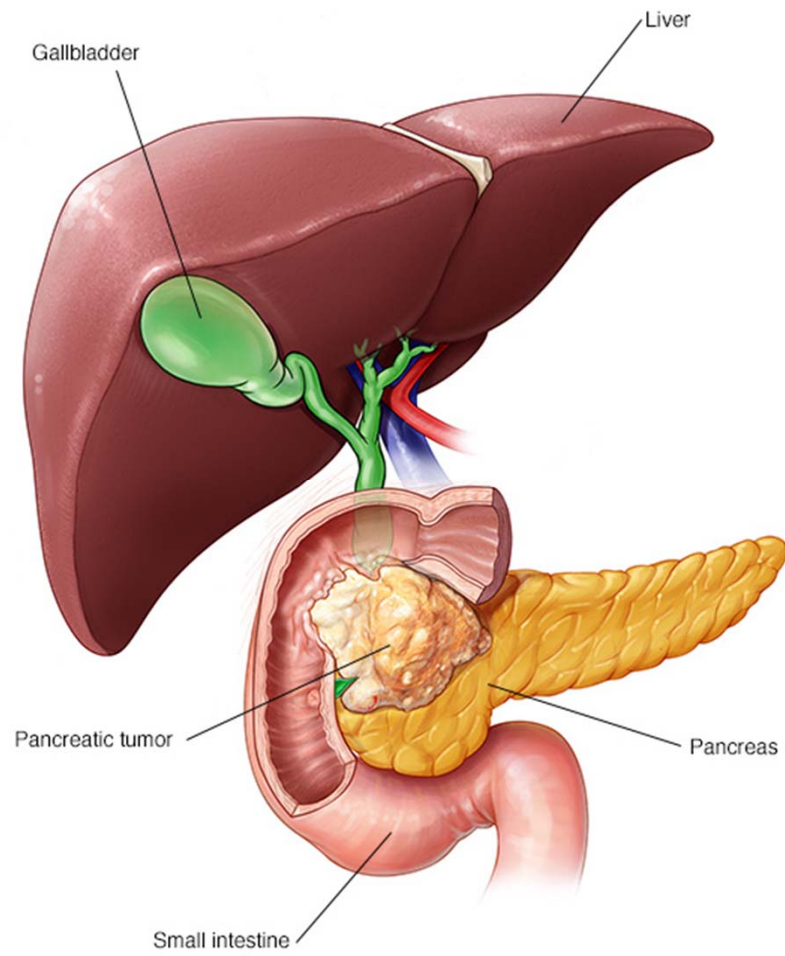
## Pancreatitis

Chronic pancreatitis increases risk. Risk is even higher for people with hereditary pancreatitis.

# Slinivka břišní, pankreas



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

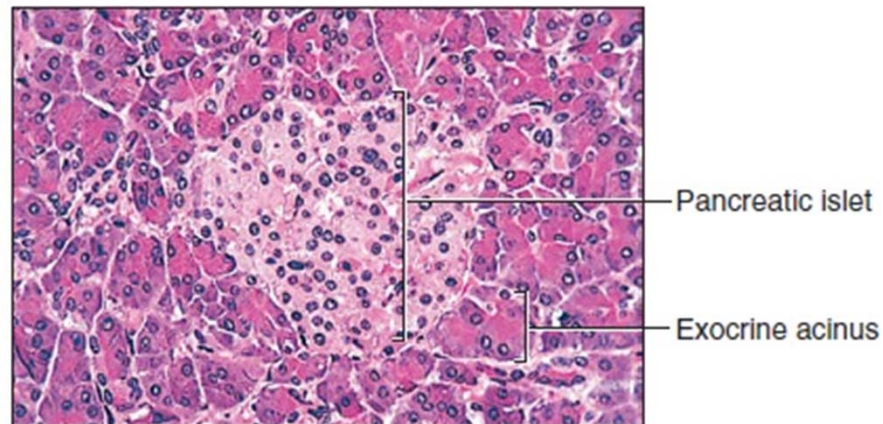


© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

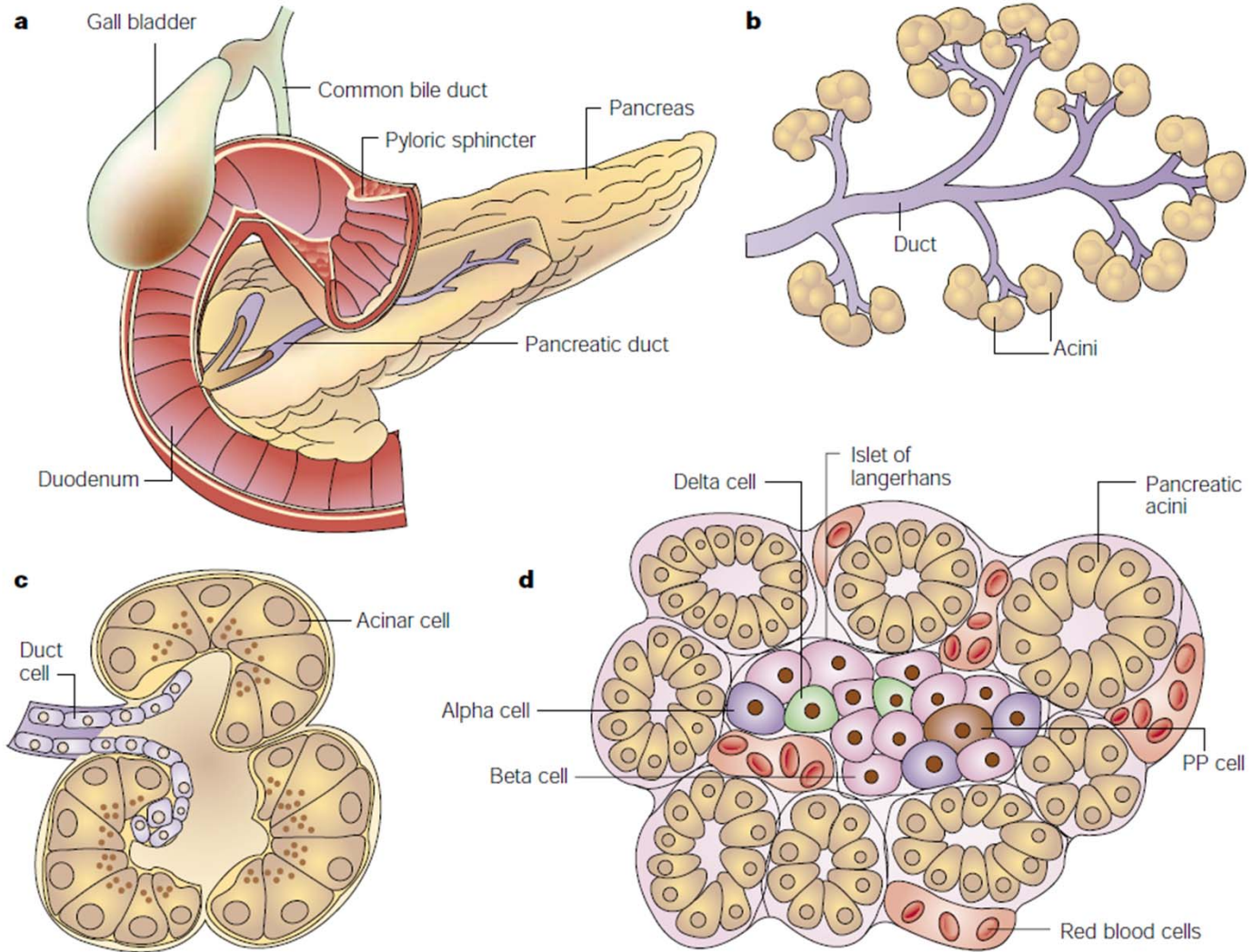


## Slinivka břišní, pankreas

- ▶ smíšená exo/endokrinní žláza, produkující trávicí enzymy a hormony (váha ~ 80g, velikost ~ 15 cm)
- ▶ **stroma:** na povrchu pouzdro (husté vazivo) – z něj vybíhají septa → laloky → lalůčky (cévní + nervové zásobení + větvení vývodů); podkladovou tkání je řídké vazivo
- ▶ **parenchym:** pankreatické aciny + trámčité uspořádání buněk (Langerhansovy ostrůvky)



# Pankreas

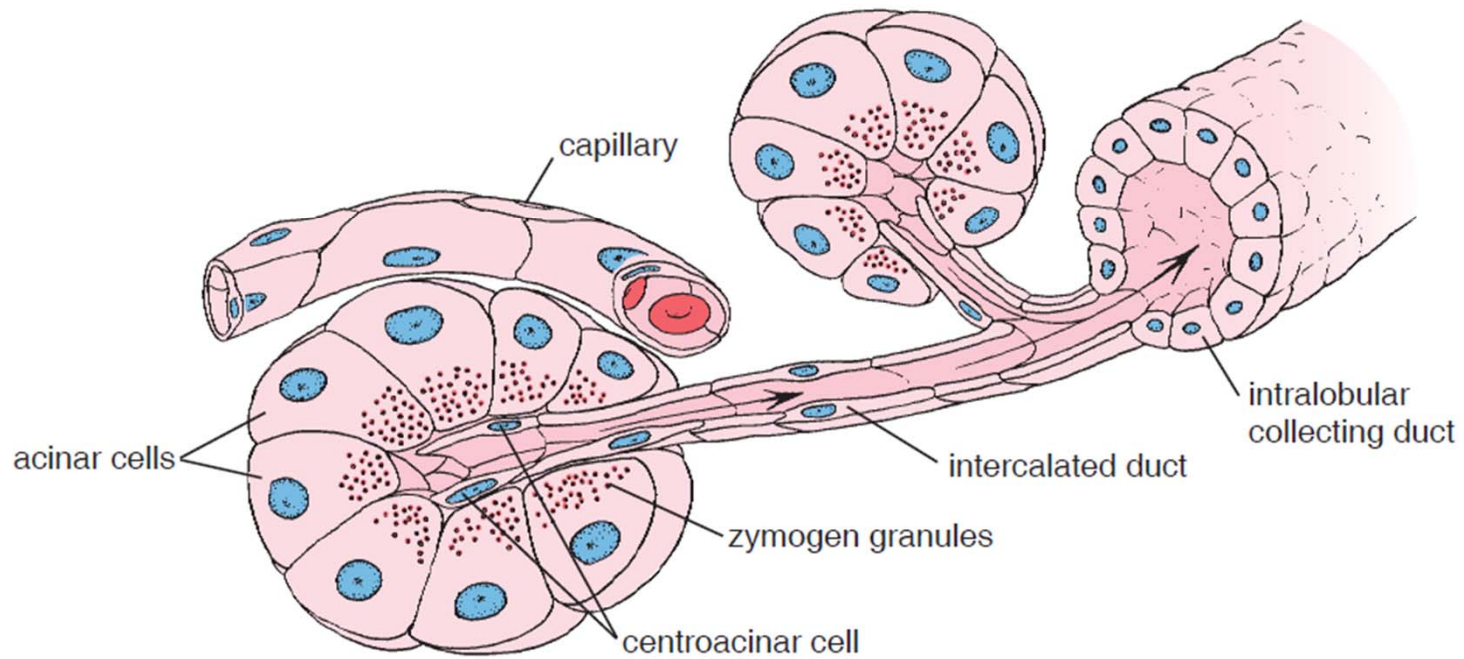
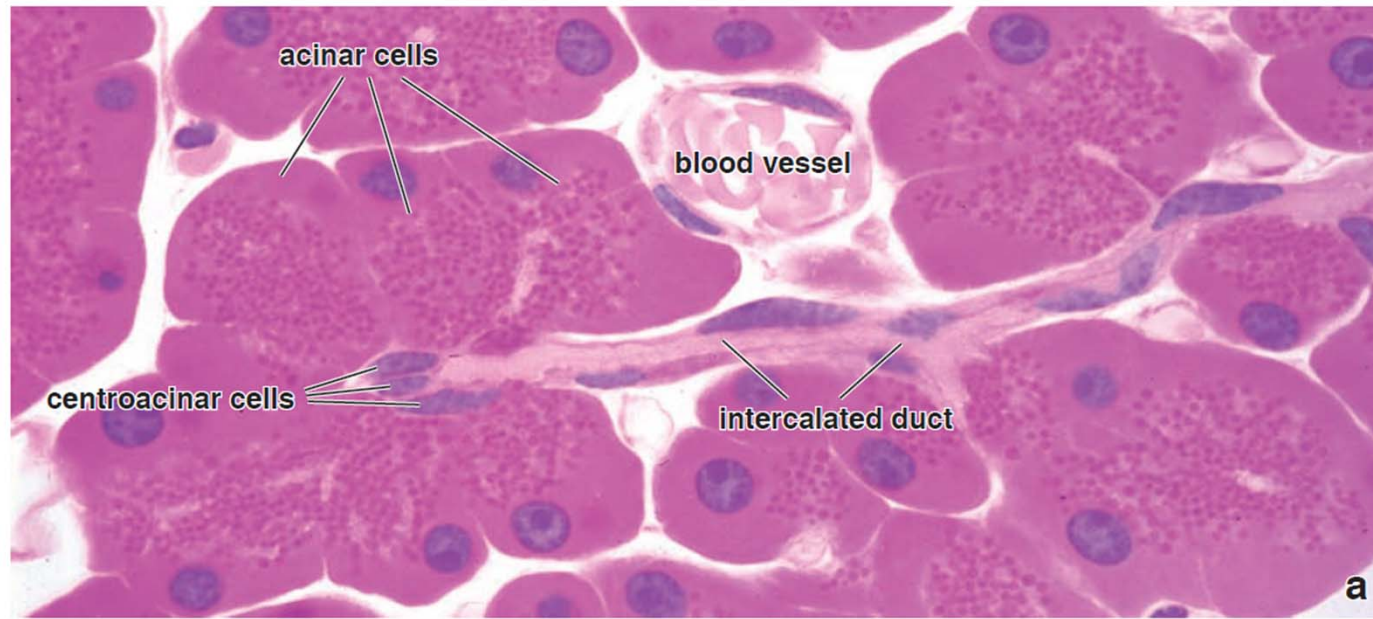


## EXOKRINNÍ ČÁST PANKREATU

- složená alveolární žláza
- syntetizuje a produkuje trávicí šťávu (cca 2 L/den): proteolytické endopeptidázy (trypsinogen, chymotrypsinogen), amylázy, lipázy a deoxyribonukleázy → mají za úkol štěpit tráveninu (chymus), přicházející z žaludku
- také zde probíhá produkce látek, podílejících se na alkalizaci sekretu (snížení pH = ↑ funkčnost trávicích enzymů)
- **pankreatické aciny** – bazofilní cytoplazma, množství sekrečních granulí, produkce trávicích enzymů
- **centroacinózní buňky** – světlá cytoplazma, přímo navazují na vsunuté vývody, alkalizace sekretu
- **absence myoepitelových buněk**



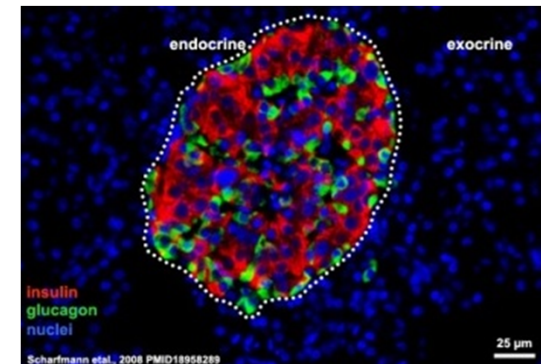
# Mechanismy karcinogeneze



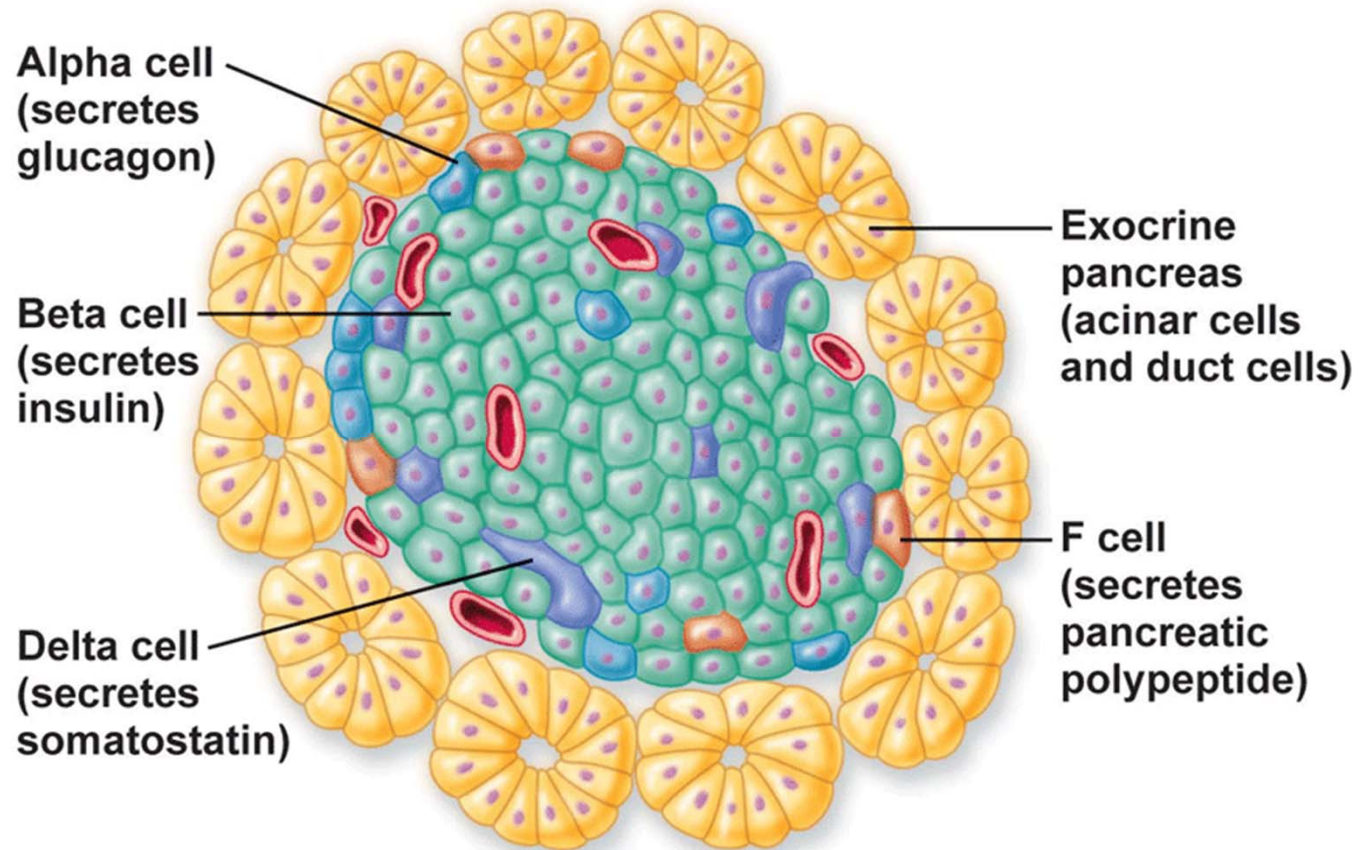
# ENDOKRINNÍ ČÁST PANKREATU

## Langerhansovy ostrůvky

- velikost 100-200  $\mu\text{m}$ , počet  $\sim$  1 mil., 1-2% objemu slinivky
- **trámčitý** stavební typ s bohatým kapilárním zásobením (fenestrované kapiláry)
- ostrůvky jsou obklopeny tenkou vrstvou řídkého vaziva
- součástí „Diffuse Neuroendocrine Systém“ (DNES) systému
- světlá cytoplazma s přítomností sekrečních granulí  $\rightarrow$  4 typy buněk:
  - **A buňky – glukagon (cca 20%)**
  - **B buňky – inzulin (cca 70%)**
  - **D buňky – somatostatin (cca 5%)**
  - **PP buňky – pankreatický polypeptid (< 5%)**



# Langerhansův ostrůvek

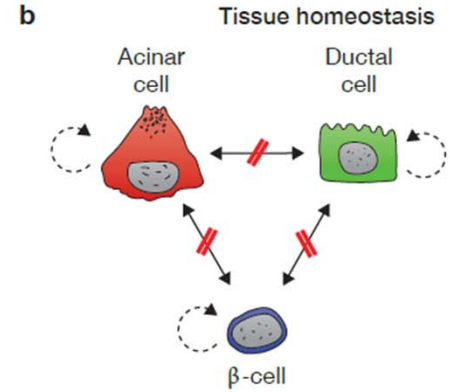
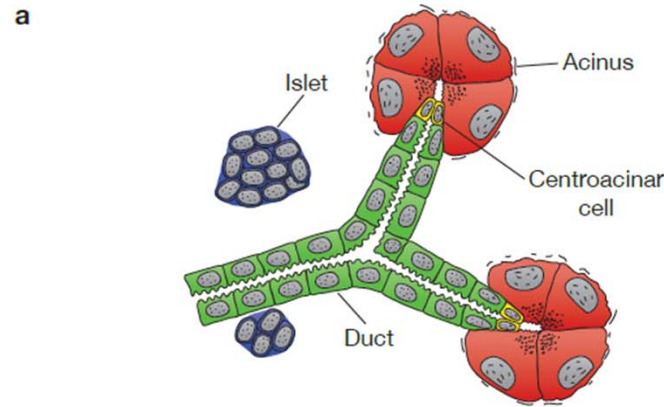




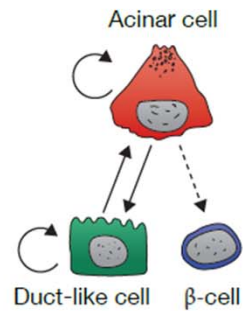
## Regenerace pankreatu

- Nízká intenzita proliferace
- Nízká klonogenní kapacita
- Délka života u myších buněk ~ 1 rok (podobně jako u jater)
- Regenerační kapacita odlišná od jaterní
  - Buňky zvýší svoji proliferační kapacitu, ale k úplné obnově poškozené tkáně nedojde
  - Lgr5+ buňky nejsou přítomny, jsou indukovány při poškození v buňkách ductu nebo v podmínkách in vitro – vliv mikroprostředí?
- Buňky pankreatu jsou plastické
  - Během zánětu lze nalézt buňky s ductální i acinární charakteristikou
  - Transdiferenciace
  - Risk pro vznik onemocnění (acinar-to-ductal metaplasia)

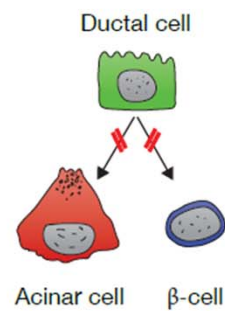
# Regenerace pankreatu



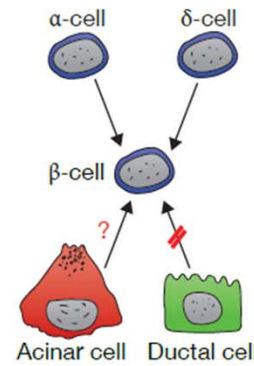
- c**
- Inflammatory injury
    - Drug-induced
    - Partial duct ligation



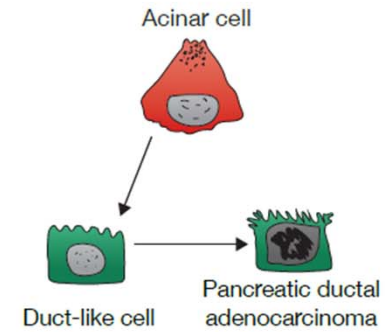
- Inflammatory injury
  - Drug-induced
  - Partial duct ligation
  - Partial pancreatectomy



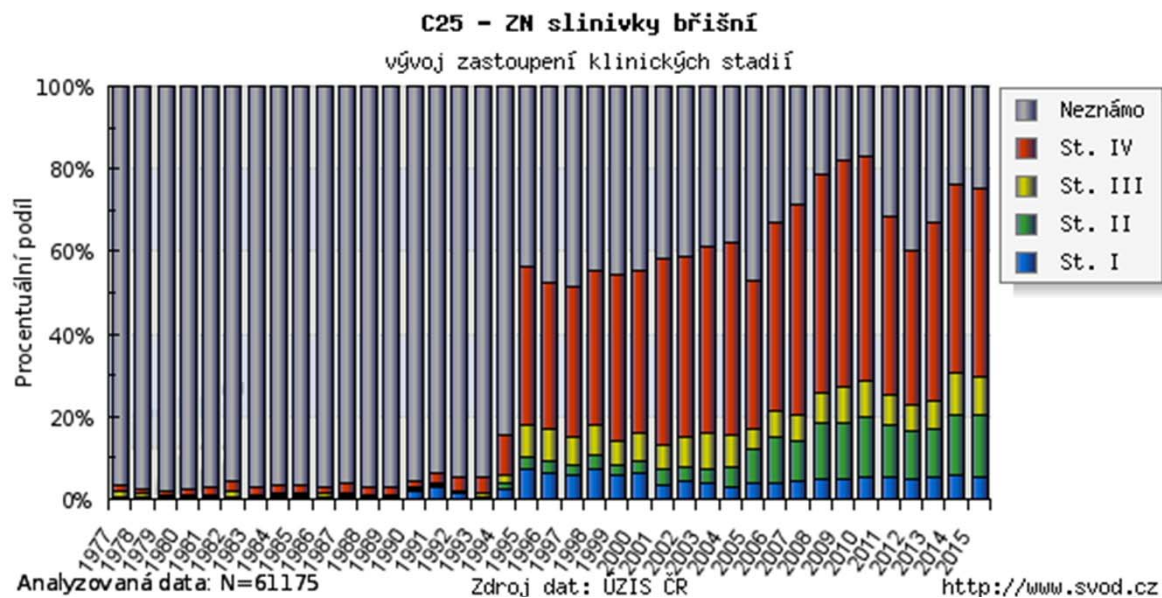
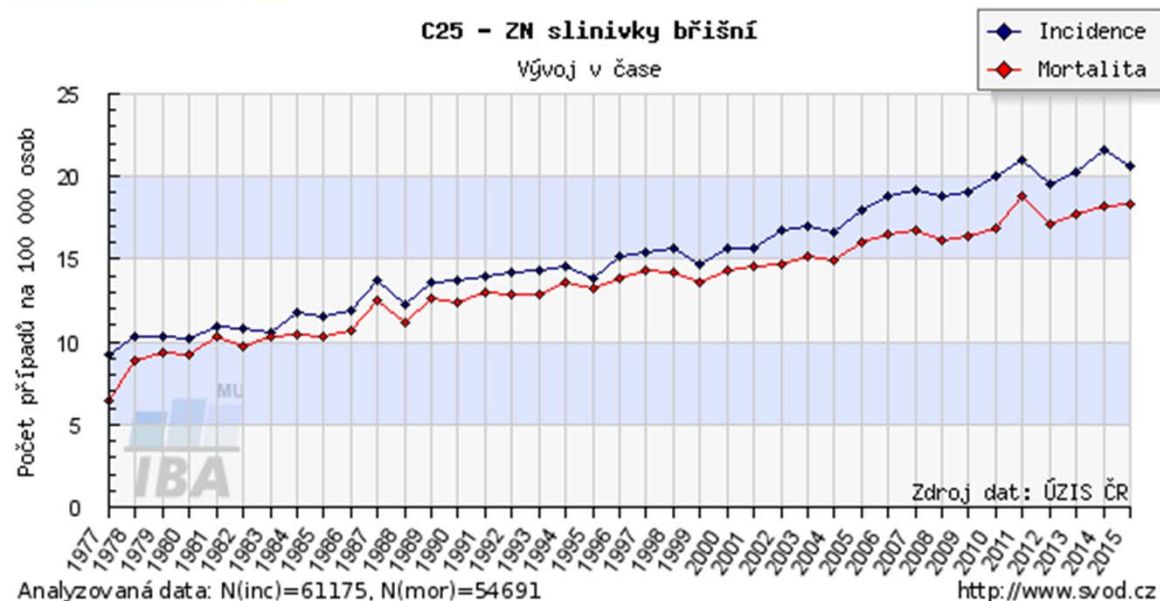
- Near-complete  $\beta$ -cell ablation



- d** Tumorigenesis
- Inflammatory injury and oncogenic Kras

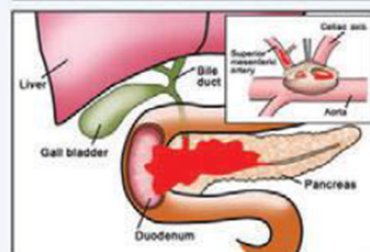
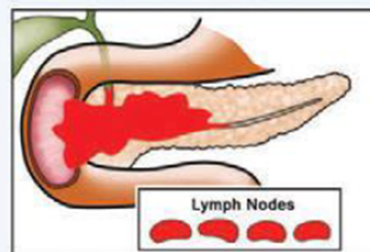
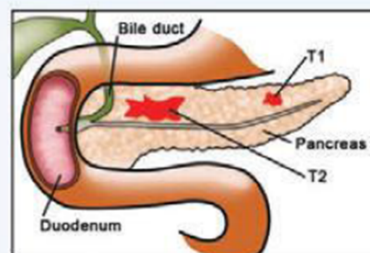


# Rakovina slinivky



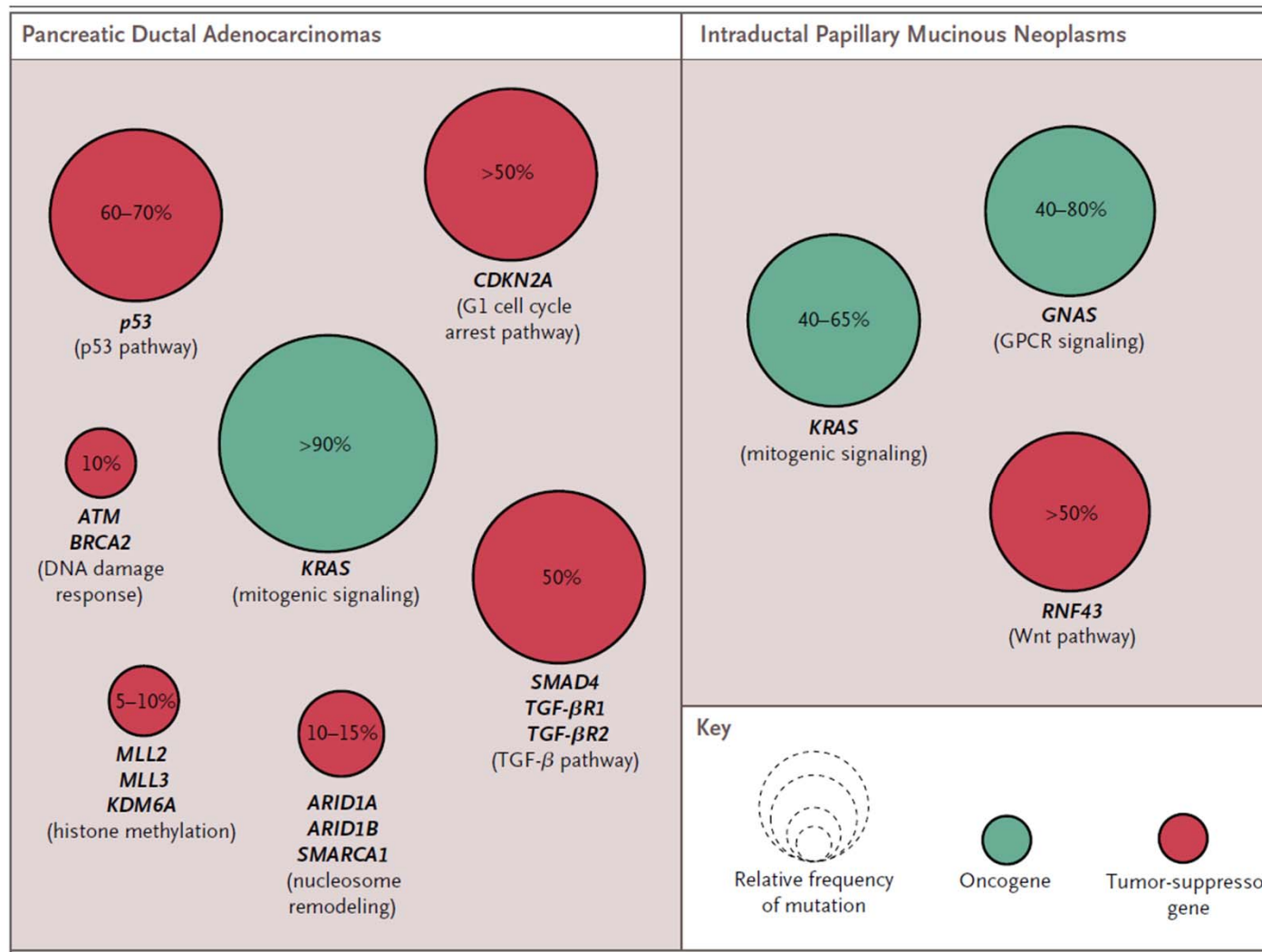


# Rakovina slinivky



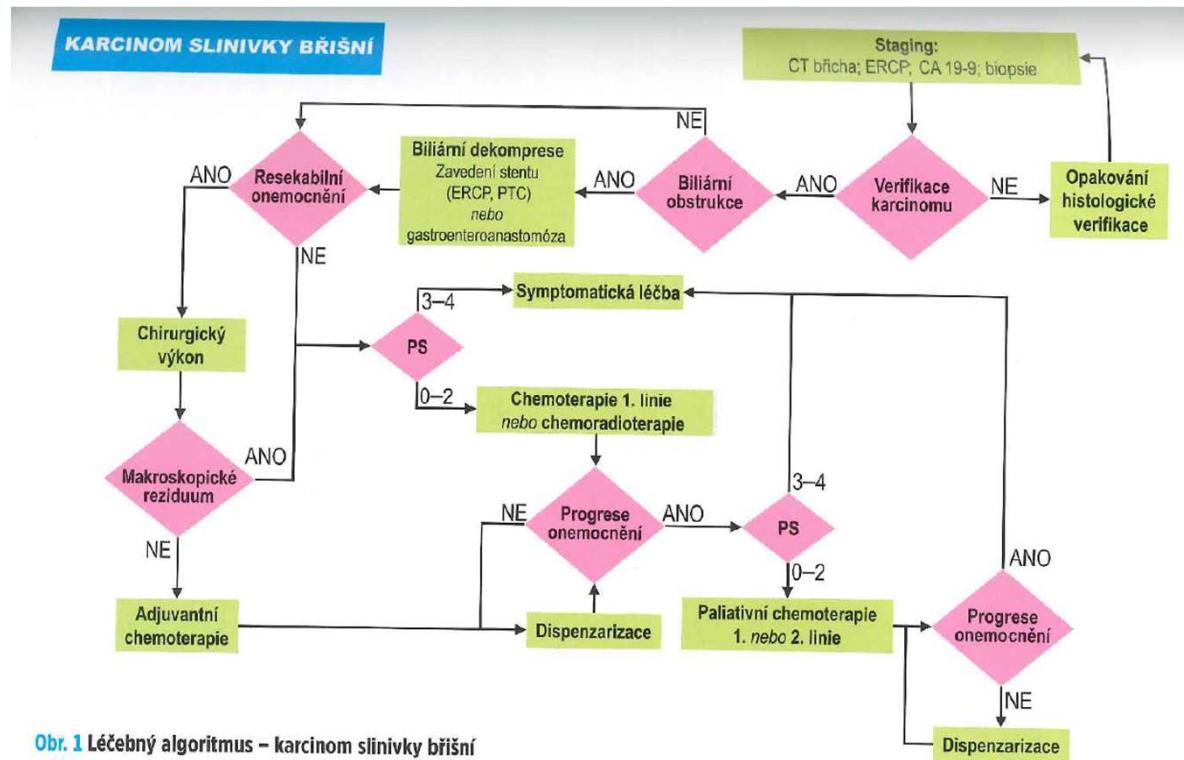
AJCC Stage	TNM Stage	Extent of Tumor	5 year Survival	Stage at Presentation (14% Unknown)
I	T1/N0	Limited to pancreas $\leq$ 2cm	20%	7%
	T2/N0	Limited to pancreas $>$ 2cm		
II	T3 or N1	Beyond pancreas or regional lymph node metastases	8%	26%
III	T4 any N	Involves celiac axis or superior mesenteric artery		
IV	M1	Distant metastases	2%	53%

# Mutace u nádorů slinivky



## Nádor slinivky - léčba

- radikální resekce - stádium I a II
- Adjuvantní terapie
  - Chemorezistentní onemocnění
- radioterapie



Obr. 1 Léčebný algoritmus - karcinom slinivky břišní



## Adjuvantní terapie

**Table 2.** Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer.\*

Study	No. of Patients	Treatment	Survival	P Value
GITSG <sup>58</sup>	43	Observation	10% at 2 yr	0.007
		Fluorouracil plus radiotherapy	20% at 2 yr	
EORTC <sup>59</sup>	218	Observation	26% at 2 yr	0.10
		Fluorouracil plus radiotherapy	34% at 2 yr	
ESPAC-1 <sup>60</sup>	289	Observation	16.9 mo (median)†	
		Chemoradiotherapy	13.9 mo	
		Fluorouracil Chemoradiotherapy plus fluorouracil	21.6 mo 19.9 mo	
CONKO-01 <sup>61</sup>	368	Observation	10.4% at 5 yr	0.01
		Gemcitabine	20.7% at 5 yr	
ESPAC 3 <sup>62</sup>	1088	Fluorouracil Gemcitabine	23.0 mo (median) 23.6 mo	0.39
RTOG 9704 <sup>63</sup>	451	Fluorouracil plus radiotherapy Gemcitabine plus radiotherapy	22% at 5 yr 18% at 5 yr	0.12
JASPAC-01 <sup>64</sup>	378	S-1 (oral fluoropyrimidine) Gemcitabine	70% at 2 yr 53% at 2 yr	<0.001

\* CONKO-01 denotes Charité Onkologie 01, EORTC European Organization for Research and Treatment of Cancer, ESPAC European Study Group for Pancreatic Cancer, GITSG Gastrointestinal Tumor Study Group, JASPAC-01 Japan Adjuvant Study Group of Pancreatic Cancer, and RTOG 9704 Radiation Therapy Oncology Group 9704.

† The estimated 5-year survival rate was 10% among patients who received chemoradiotherapy and 20% among patients who did not receive chemoradiotherapy (P=0.05). The 5-year survival rate was 21% among patients who received chemotherapy and 8% among patients who did not receive chemotherapy (P=0.009).

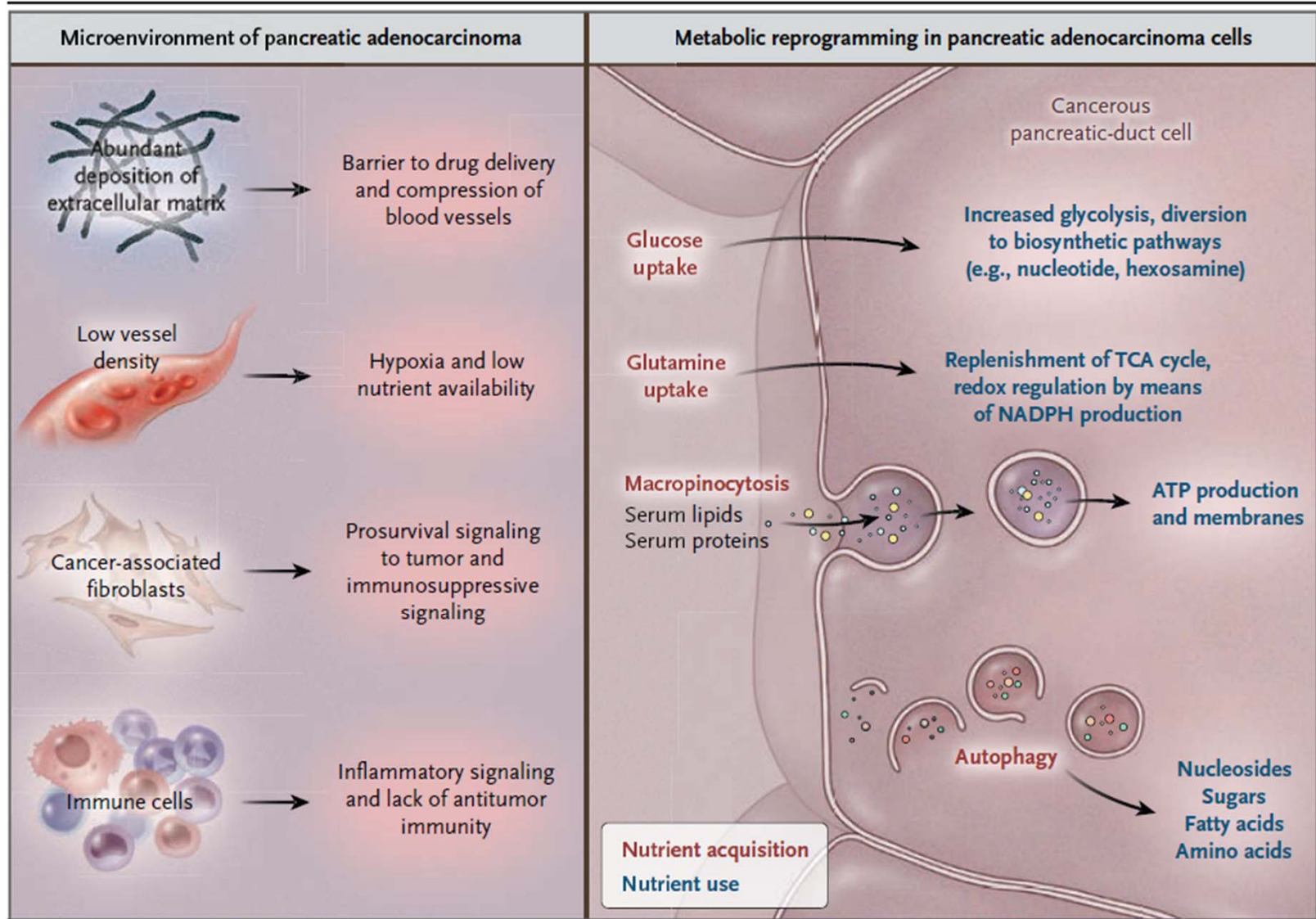
## Léčba metastazujícího adenokarcinomu slinivky

**Table 3.** Key Clinical Trials in Metastatic Pancreatic Cancer.\*

Trial	No. of Patients	Treatment	Median Survival		P Value
			<i>mo</i>		
Burriss et al. <sup>70</sup>	126	Fluorouracil	4.4		0.002
		Gemcitabine	5.6		
NCIC <sup>71</sup>	569	Gemcitabine	5.9		0.04
		Gemcitabine plus erlotinib	6.2		
Ueno et al. <sup>72</sup>	834	Gemcitabine	8.8		<0.001 for non-inferiority
		S-1	9.7		
Conroy et al. <sup>73</sup>	342	Gemcitabine	6.8		<0.001
		FOLFIRINOX	11.1		
Von Hoff et al. <sup>74</sup>	861	Gemcitabine	6.7		<0.001
		Gemcitabine plus nab-paclitaxel	8.5		


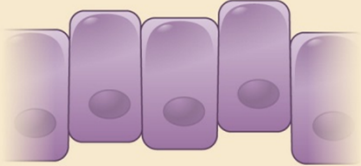

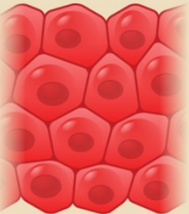

\* FOLFIRINOX denotes fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, and leucovorin; and NCIC National Cancer Institute of Canada.

# Biologické vlastnosti nádoru slinivky





# Mechanismy karcinogeneze

Metastasis in Pancreatic Cancer		
 <p>Stationary normal cells</p>	 <p>Migratory preneoplastic cells (PanIN)</p>  <p>Invading EMT cells</p>	 <p>Colonizing neoplastic cells (PDAC)</p> 
Extrinsic factors:	Inflammation	Inflammation, ?hypoxia
Intrinsic factors:	KRAS*	KRAS LOH, Ink4a/ARF, TP53*, SMAD4
Competency to colonize:	Nil or low	High

## Shrnutí

- ▶ Nádor je komplexní tkáň závislá na komunikaci mezi různými buněčnými typy
- ▶ Karcinomy zahrnují neoplastické buňky a buňky stromatu – fibroblasty, myofibroblasty, zánětlivé buňky, endoteliální buňky, pericity
- ▶ Většina nádorů je na stromatu závislá s výjimkou ascitických nádorů
- ▶ Formování nových cév je kritickým faktorem determinující růst solidních nádorů
- ▶ Antiangiogenní léčba může vést k paradoxním výsledkům
- ▶ Rakovina jako nikdy se nehojící rána
- ▶ Zánět – jeden z rizikových faktorů pro vznik nádorů slinivky
- ▶ EMT předchází metastázování nádorových buněk slinivky

## Otázky

- ▶ Jakým způsobem může inhibice neoangiogeneze zlepšit nebo neutralizovat účinnost konvenční chemoterapie?
- ▶ Jakým způsobem mohou makrofágy ovlivňovat proces tumorigeneze?
- ▶ Jakým způsobem mohou onkogeny narušit interakci mezi nádorovými buňkami a nádorovým stromatem?