

# Molekularni mehanizmi rasta tumorskih stanica

---

**Đuranović, Ivona**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:650736>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Ivona Đuranović

**Molekularni mehanizmi rasta tumorskih stanica**

**Molecular mechanisms of tumor cell growth**

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2023.

## SAŽETAK

Tumor se odnosi na bilo koju neobičnu izbočinu, kvržicu ili masu koja se javlja na ili unutar tijela. Dijeli se prema različitoj klasifikaciji, a tu spadaju: klinička klasifikacija, morfološka klasifikacija, histogenetska i etiološka klasifikacija. Genetske promjene igraju važnu ulogu u razvoju tumora. Tumori se formiraju kada normalne stanice u tijelu steknu genetske mutacije koje mijenjaju njihovu prirodnu kontrolu rasta te se podijele. Za širenje tumora odgovorne su angiogeneza i metastaze koje omogućuju tumorskim stanicama ulazak u krvotok te ulazak u različita tkiva i stanice u cijelom tijelu.

Ključne riječi: tumor, klasifikacija, genetske promjene, širenje

## ABSTRACT

A tumor refers to any unusual growth, lump, or mass that occurs on or inside the body. It is divided according to different classifications, which include: clinical classification, morphological classification, histogenetic and etiological classification. Genetic changes play a pivotal role in tumor development. Tumors form when normal cells in the body acquire genetic mutations that alter their natural control of growth and division. Angiogenesis and metastasis are responsible for tumor spread, which enable tumor cells to enter the bloodstream and enter various tissues and cells throughout the body.

Key words: tumor, classification, genetic changes, spread

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TUMORI .....	2
2.1. Klinička klasifikacija .....	2
2.2. Morfološka klasifikacija .....	3
2.3. Histogenetska klasifikacija .....	5
2.4. Etiološka klasifikacija .....	6
3. OBILJEŽJE RAKA .....	7
3.1. Održavanje proliferativne signalizacije .....	7
3.2. Izbjegavanje supresora rasta .....	8
3.3. Otpor staničnoj smrti .....	9
3.4. Omogućavanje replikativne besmrtnosti .....	9
4. KARCINOGENEZA .....	10
4.1. Inicijacija .....	11
4.2. Promocija .....	12
4.3. Progresija .....	12
4.4. Signalizacija stanica u karcinogenezi .....	14
4.4.1. Faktori rasta i njihovi receptori .....	14
4.4.2. Drugi elementi stanične signalizacije .....	15
5. GENETSKE PROMJENE .....	16
5.1. Molekularni mehanizmi karcinogeneze .....	16
5.1.1. Stanični onkogeni .....	17
5.1.2. Tumor supresorski geni .....	17
5.1.3. <i>TP53</i> supresor tumora .....	19
5.2. Mehanizmi poznatih ljudskih karcinogena .....	21
6. OKSIDATIVNI STRES .....	21
7. ŠIRENJE TUMORA .....	22
7.1. Angiogeneza .....	22
7.2. Metastaziranje .....	25
8. ZAKLJUČAK .....	27
9. LITERATURA .....	28

## 1. UVOD

Kako tkiva rastu i obnavljaju se, svaka pojedinačna stanica mora prilagoditi svoje ponašanje prema potrebama organizma u cjelini. Stanica se mora dijeliti samo kada su nove stanice te vrste potrebne, a suzdržati se od diobe kada nisu; mora živjeti onoliko dugo koliko je potrebno, a ukloniti kada nije; mora zadržati svoj specijalizirani karakter te mora zauzeti svoje pravo mjesto i ne zalutati u neprikladna područja [1].

U velikom organizmu, povremeno narušavanje ponašanja pojedinačne stanice ne uzrokuje značajnu štetu. Međutim, potencijalno razorna disfunkcija reda nastaje kada jedna stanica doživi genetske promjene koje joj omogućuju preživljavanje i diobu u situacijama kada to ne bi trebala. To rezultira stvaranjem potomaka koji se ponašaju na isto neprihvatljiv način. Neprestano rastući klon abnormalnih stanica može poremetiti organizaciju tkiva te na kraju i cijelog tijela. Upravo se ta katastrofa događa u slučaju raka [1].

Fenotipske promjene kojima stanica prolazi u procesu maligne transformacije odraz su sekvencijalnog stjecanja genetskih promjena. Ovaj proces u više koraka nije nagli prijelaz iz normalnog u maligni rast, već se može odvijati tijekom 20 ili više godina. Mutacija kritičnih gena, uključujući supresorske gene, onkogene i gene uključene u popravak DNA, dovodi do genetske nestabilnosti i progresivnog gubitka diferencijacije [2].

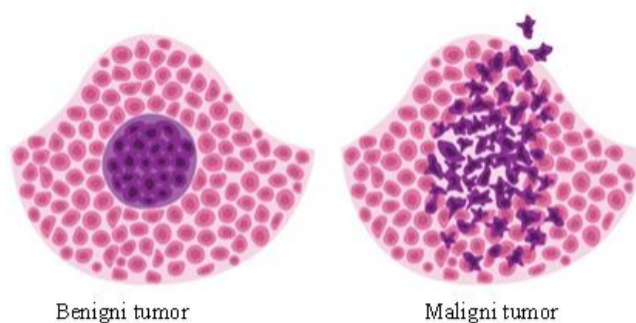
Tumori se povećavaju jer stanice raka nemaju sposobnost postići ravnotežu između stanične diobe i programirane smrti stanice (apoptoze), a rastu pridonosi i stvaranje vlastitog vaskularnog sustava (angiogeneza). Transformirane stanice gube svoju sposobnost međusobne interakcije i pokazuju nekontrolirani rast, napadaju susjedna tkiva i na kraju se šire kroz krvotok ili limfni sustav do udaljenih organa [2].

## 2. TUMORI

Tumori su patološki poremećaji rasta stanica, karakterizirani prekomjernom i abnormalnom proliferacijom stanica. Mogu se okarakterizirati kao abnormalna masa tkiva koja može biti čvrsta ili ispunjena tekućinom [3]. Tumori se mogu razlikovati prema: 1. kliničkoj klasifikaciji, 2. morfološkoj klasifikaciji, 3. histogenetskoj klasifikaciji i 4. etiološkoj klasifikaciji.

### 2.1. Klinička klasifikacija

Kliničkom klasifikacijom tumori se dijele na benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne) tumore (Slika 1.).



Slika 1. Benigni i maligni tumor [5].

Benigni tumori su oni koji ostaju na svom primarnom mjestu bez invazije na druga mjesta u tijelu. Ne šire se na lokalne strukture ili na udaljene dijelove tijela. Imaju tendenciju sporog rasta te imaju jasne granice. Benigni tumori obično nisu problematični. Međutim, mogu postati veliki i stisnuti strukture u blizini, uzrokujući bol ili druge medicinske komplikacije. Na primjer, veliki benigni tumor pluća može stisnuti dušnik i uzrokovati poteškoće u disanju. To bi zahtijevalo hitno kirurško uklanjanje. Mala je vjerojatnost da će se dobroćudni tumori ponovno pojaviti nakon uklanjanja. Uobičajeni primjeri benignih tumora su fibroidi u maternici i lipomi na koži. Određene vrste benignih tumora mogu se pretvoriti u maligne tumore. Takvi se pažljivo prate i mogu zahtijevati kirurško uklanjanje.

Na primjer, polipi debelog crijeva (drugi naziv za abnormalnu masu stanica) mogu postati zloćudni i stoga se obično uklanjaju kirurški [4].

Maligni oblik tumora naziva se i rak. Maligni tumori nekontrolirano rastu i šire se lokalno i/ili na udaljena mjesta putem krvotoka ili limfnog sustava. Takvo širenje naziva se metastaziranje. Metastaze se mogu pojaviti bilo gdje u tijelu, a najčešće se nalaze u jetri, plućima, mozgu i kostima. Maligni tumori se mogu brzo širiti i zahtijevaju liječenje kako bi se širenje izbjeglo. Ako se rano otkriju, liječenje će vjerojatno biti operacija s mogućom kemoterapijom ili radioterapijom. Ako se rak proširio, liječenje će vjerojatno biti sustavno, poput kemoterapije ili imunoterapije [4].

## **2.2. Morfološka klasifikacija**

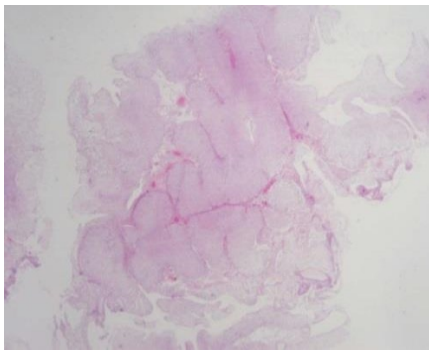
Tumori se mogu svrstati u makroskopski vidljive i makroskopski neuočljive tvorbe. Primjerice, većina se tumora kože može prepoznati pri liječničkome pregledu, dok se u bolesnika s leukemijom ne vide nikakvi tumori, a dijagnoza se postavlja tek nakon mikroskopskoga pregleda krvi. U početnim stadijima mnogi se tumori ne mogu uočiti golim okom, ali se mogu vidjeti s pomoću povećala. Na primjer, rani oblici raka materničnoga vrata mogu se prepoznati posebnim vaginalnim povećalom koje se naziva kolposkop. Makroskopski uočljivi tumori mogu se dijagnosticirati pri pregledu bolesnika, primjerice palpacijom, rendgenološkim pregledom, tijekom operacije ili pri patološkoj disekciji organa [6].

Makroskopski se pregled tkiva i organa u većini slučajeva mora upotpuniti mikroskopskim pregledom. Na osnovi takva kliničko-patološkog pristupa moguće je točno izmjeriti veličinu tumora i utvrditi je li tumor ograničen ili se proširio izvan organa u kojem je nastao. Ovi kliničko-patološki pokazatelji potrebni su za određivanje stadija tumora. U kliničko-patološkoj terminologiji pojam stadija primjenjuje se samo na zloćudne tumore, a uključuje veličinu tumora, lokalno širenje u okolna tkiva ili organe i proširenost tumora na udaljena mjesta u tijelu [6].

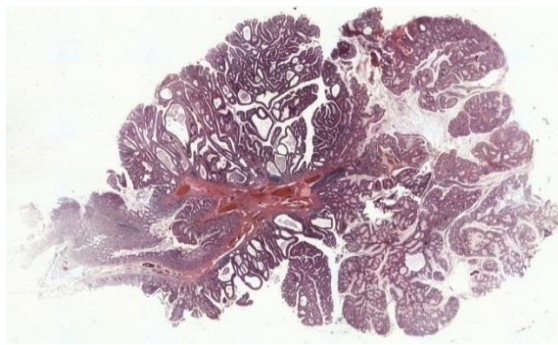
Kod makroskopski uočljivih tumora, mali tumori očituju se kao čvorić ili čvor, dok se veći može opisati kao tvorba ili masa. Bradavičasti tumori koji se izbočuju s površine kože ili sluznice naziva se papilomom, na slici 2. a), može se vidjeti prikaz papilarnog tumora mokraćnog mjehura. Polip izraslina je sluznice građena od izduljenih resica koje podsjećaju



na pipce hobotnice. Polipi debeloga crijeva (Slika 2. b)) često sličje na plod trešnje te imaju jedan zaobljeni dio i jedan tanki dio koji ga poput peteljke spaja sa sluznicom. Tumor koji se očituje u obliku vrieda opisuje se kao ulkus. Za tumor koji se probio kroz sluznicu ili kožu kaže se da je ulceriran. Tumor kože ili sluznica koji je uzdignutih rubova s centralnom ulceracijom opisuje se kao vulkanski krater. Budući da takvi tumori izrastaju iz kože ili sluznice šupljih organa nazivaju se egzofitičnima. Tumori koji urastaju u stijenku crijeva, mokraćnoga mjehura ili drugih šupljih organa nazivaju se endofitičnima. Tumor koji sadržava jednu ili više šupljina ili cista cističan je. Cistični tumori koji sadržavaju svijetlu tekućinu koja nalikuje na serum jesu serozni, a oni koji sadržavaju sluz jesu mucinozni. Za jako tvrde solidne tumore kaže se da su scirozni, a oni koji su mekani poput koštane srži nazivaju se medularni [6].



a)



b)

Slika 2. a) Papilarni tumor mokraćnog mjehura [7]. b) Polip debelog crijeva [7].

Pri mikroskopskom pregledu patolozi rabe svjetlosne mikroskope koji su od sredine devetnaestog stoljeća do sada ostali glavni instrumenti za dijagnostiku i klasifikaciju novotvorina. Mikroskopski se pregled može nadopuniti dodatnim pretragama kao što su imunohistokemija (primjena imunoloških metoda na mikroskopskim preparatima), ili se tkivo može pregledati elektronskim mikroskopom i metodama molekularne biologije. Ove se tehnike ponekad primjenjuju u rutinskoj dijagnostičkoj patologiji i za većinu tumora dostatno je primijeniti mikroskopski pregled [6].

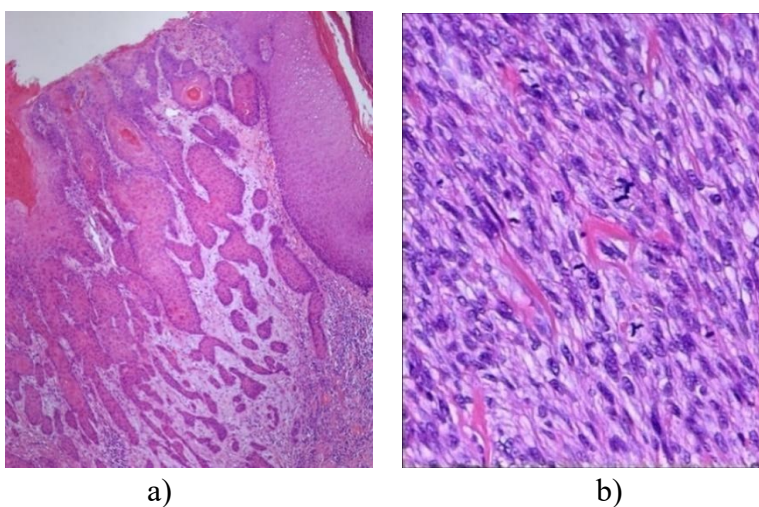
Za mikroskopsku pretragu tumora rabi se uzorak koji se dobije biopsijom ili pri kirurškom uklanjanju tumora. Tumori se mogu pregledati i nakon obdukcije. U svakom

slučaju, tumorsko se tkivo najprije mora izrezati u vrlo tanke rezove, od kojih se naprave mikroskopski preparati. Tijekom mikroskopskog pregleda tumorskih rezova patolog mora najprije odlučiti je li tkivo građeno od normalnih ili tumorskih stanica. Nakon toga mora se utvrditi nalikuju li tumorske stanice na normalne stanice ili se od njih više ili manje razlikuju. Za stanice koje nalikuju na zrele stanice odraslih tkiva kaže se da su diferencirane. Tumorske stanice koje su izgubile glavne morfološke značajke zrelih stanica nazivaju se nediferenciranim ili atipičnim. Benigni su tumori obično građeni od diferenciranih stanica, dok su maligni tumori obično građeni od nediferenciranih stanica [6].

### 2.3. Histogenetska klasifikacija

Histogenetski pristup proučavanju tumora zasniva se na pretpostavci da se mikroskopskim pregledom može utvrditi iz koje se stanice ili tkiva pojedini tumor razvio. Prema toj klasifikaciji tumori se svrstavaju u nekoliko većih skupina kao što su: epitelni tumori, mezenhimalni tumori, tumori limfocita i hematopoetičkih stanica, neutralni tumori i srodne novotvorine, tumori potpornih stanica živčanoga sustava i tumori spolnih stanica [6].

Epitelni tumori (Slika 3. a)) mogu nastati iz bilo kojeg epitelnog tkiva, kao što su pločasti epitel kože, epitel sluznice probavnoga i dišnoga sustava ili iz unutrašnjih organa građeni od epitelnih stanica kao što su npr. jetra ili bubreg. Mezenhimalni tumori (Slika 3. b)) nastaju iz vezivnog tkiva, kostiju, mišićja i drugih mezodermalnih tkiva i stanica. Tumori limfocita i hematopoetičkih stanica nastaju iz matičnih stanica koštane srži ili limfatičnih organa [6].



Slika 3. a) Epitelni tumor [7]. b) Mezenhimalni tumor [7].

Zrele se živčane stanice ne dijele pa tako iz njih i ne mogu nastati novotvorine. Prema tome neutralni tumori nastaju iz prekursora živčanih stanica (neuroblasta). Tumori mogu nastati i iz stanica podrijetlom iz fetalnoga neutralnoga grebena, kao što su melanociti kože ili stanice srži nadbubrežne žlijezde. Tumori potpornih stanica živčanog sustava nastaju od glijalnih stanica središnjega živčanog sustava (npr. astrociti), moždanih ovojnica ili perifernih živaca (Schwannove stanice) [6].

## **2.4. Etiološka klasifikacija**

Etiološka klasifikacija se zasniva na identifikaciji uzorka različitih tumora. Uzroci većinom nisu poznati te se, prema tomu, velik broj tumora ne može etiološki klasificirati. Uzrok je nekih tumora poznat pa se takvi tumori mogu svrstati u nekoliko skupina kao što su: genetski uvjetovani tumori, tumori uzrokovani egzogenim kemijskim ili fizikalnim kancerogenima te tumori uzrokovani virusima [6].

Kod genetski uvjetovanih tumora postoji nasljedna sklonost određenim tumorima i oni se pojavljuju učestalo u obiteljima koje nose specifične genske mutacije. Primjeri takvih genetskih tumora jesu tumori ovojnica perifernih živaca u neurofibromatozi tipa I (von Recklinghausenova bolest), tumori debeloga crijeva u obiteljskoj adenomatoznoj polipozi kolona, tumori endokrinih žlijezda u obiteljskoj multiploj endokrinoj neoplaziji [6].

U tumore uzrokovane egzogenim kemijskim ili fizikalnim kancerogenima svrstavaju se tumori kože koji su uzrokovani ultraljubičastim zrakama, tumori mokraćnoga mjehura u radnika u industriji anilinskih boja ili rak pluća u pušača [6].

Za brojne se tumore sumnja da su uzrokovani virusima, no stvarna uzročno-posljedična veza teško se može dokazati u većini slučajeva. Virusna je etiologija dokazana za brojne životinjske tumore, no definitivno samo u nekoliko ljudskih tumora. Danas se zna da je Kaposijev sarkom uzrokovan herpes virusom tipa 8 te da humani papiloma virusi (HPV) uzrokuju rak materničnoga vrata [6].

### **3. OBILJEŽJE RAKA**

Obilježja raka obuhvaćaju šest bioloških sposobnosti stečenih tijekom višestupanjskog razvoja ljudskih tumora. Ona uključuju održavanje proliferativne signalizacije, izbjegavanje supresora rasta, otpor programiranoj staničnoj smrti, omogućavanje replikativne besmrtnosti, induciranje angiogeneze i aktiviranje invazije i metastaza [8].

U posljednjem desetljeću, dodana su dva novonastala obilježja, a to su reprogramiranje energetskeg metabolizma i izbjegavanje uništenja imunološkog sustava. Uz stanice raka, tumori pokazuju još jednu dimenziju složenosti: oni sadrže repertoar regrutiranih, naizgled normalnih stanica koje pridonose stjecanju značajnih obilježja stvaranjem "tumorskog mikrokruženja". Prepoznavanje široke primjenjivosti ovih koncepata će sve više utjecati na razvoj novih načina liječenja raka kod ljudi [8].

#### **3.1. Održavanje proliferativne signalizacije**

Pojačana i održiva stanična proliferacija najosnovnije je i jedno od najvažnijih obilježja raka, koje se može identificirati korištenjem niza histoloških, biokemijskih i protočnih citometrijskih analiza. U normalnim tkivima postoji kontrola nad proizvodnjom i otpuštanjem signala za poticanje rasta koji reguliraju rast i diobu stanica. Na taj način održava se broj stanica, a time i normalna arhitektura i funkcija tkiva, čime se održava homeostaza. Narušena regulacija tih signala omogućava stanicama raka neovisan rast. Čimbenici rasta, koji obično sadrže unutarstanične domene tirozin kinaze, vežu receptore na staničnoj površini te prenose signale dalje putem razgranatih unutarstaničnih signalnih putova koji kontroliraju napredovanje kroz stanični ciklus i rast stanice. Ti signali utječu i na druga biološka svojstva stanica, poput staničnog preživljavanja i energetskeg metabolizma. Međutim, još uvijek se relativno malo zna o mehanizmima koji kontroliraju otpuštanje ovih mitogenih signala [9].

Štoviše, razumijevanje ovih mehanizama je zamršeno jer se smatra da se signali faktora rasta koji kontroliraju broj stanica i položaj unutar tkiva prenose na vremenski i prostorno reguliran način od jedne stanice do njezinih susjeda, a takvoj parakrinoj signalizaciji teško je pristupiti eksperimentalno. Osim djelovanja komplicirane mreže

proteaza, sulfataza i drugih enzima koji oslobađaju i aktiviraju faktore rasta na iznimno specifičan i lokaliziran način, bioraspoloživost ovih faktora regulirana je i sekvestracijom u pericelularnom prostoru i izvanstaničnom matriksu. Stanice raka pak postižu sposobnost održavanja proliferativne signalizacije na niz nekonvencionalnih načina: one to čine tako što same proizvode ligande faktora rasta i reagiraju na njih kroz ekspresiju srodnih receptora što dovodi do autokrine proliferativne stimulacije. S druge strane, oni promiču normalne stanice unutar strome povezane s tumorom koje reagiraju pružajući stanicama raka različite faktore rasta [9].

Deregulacija receptorske signalizacije povećanjem razina receptorskih proteina prisutnih na površini stanica raka, čini takve stanice hiperreaktivnima na inače ograničen broj liganda faktora rasta. Sličan zaključak može proizaći iz strukturnih varijacija u molekulama receptora koje olakšavaju aktivaciju neovisno o prisutnosti liganda. Kombinirana stimulacija komponenata signalnih putova koji djeluju nizvodno od ovih receptora može doprinijeti neovisnosti o faktorima rasta, izbjegavajući potrebu za aktiviranjem ovih putova vezanjem liganda [9].

### **3.2. Izbjegavanje supresora rasta**

Stanice raka odupiru se inhibitornim signalima koji bi inače mogli zaustaviti njihov rast. Glavni uključeni putovi su autofagija i signalizacija receptora smrti (apoptoza), a oba mogu u konačnici dovesti do stanične smrti i smanjenja rasta tumora [10].

Autofagija je dinamički sustav staničnog recikliranja koji rezultira degradacijom citoplazmatskog sadržaja, abnormalnih proteinskih agregata i viška ili oštećenih organela tako da se građevni blokovi (npr. aminokiseline) mogu koristiti za stvaranje novih staničnih komponenti. Stoga je autofagija proces koji potiče preživljavanje. Rak može pojačati autofagiju kako bi preživio stres mikrookoliša te povećao rast i agresivnost. Proces autofagije uključuje stvaranje autofagosoma, koji se zatim stapa s lizosomima i formira autofagolizosom. Proces je reguliran putevima mTOR/AMPK/PI3K/MAPK, cilj djelovanja rapamicina u sisavaca, (engl. mammalian /mechanistic target of rapamycin, mTOR,) / proteinska kinaza aktivirana adenozin-monofosfatom (engl. adenosin-monophosphate-activated protein kinase, *AMPK*) / fosfoinozimid-3-kinaza (engl. phosphoinositide 3-kinase,

PI3K) / Mitogenom aktivirana proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. Mitogen-activated protein kinase, MAPK) [10].

### **3.3. Otpor staničnoj smrti**

Stanice raka imaju sposobnost odupiranja smrti. Izbjegavaju proces apoptoze, mehanizma koji programira staničnu smrt nakon što se stanice oštete. U normalnim okolnostima, apoptoza pomaže održati organizam zdravim kroz rast i razvoj, održavajući tjelesno tkivo uklanjanjem zaraženih ili oštećenih stanica. Međutim stanice raka ne slijede taj proces, bez obzira na to koliko abnormalno rastu [11].

Stanice raka mogu promijeniti mehanizme koji otkrivaju oštećenja ili nepravilnosti, sprječavajući pravilno signaliziranje i aktivaciju apoptoze. Stanice raka također mogu unijeti nedostatke u samu nizvodnu signalizaciju ili proteine uključene u apoptozu, što bi također spriječilo pravilno odvijanje ovog procesa [11].

### **3.4. Omogućavanje replikativne besmrtnosti**

Stanice raka mogu se vratiti u prethodno diferencirani fenotip sličan matičnim stanicama, omogućujući nesputanu staničnu diobu i druge metaboličke prilagodbe koje omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Iako postoji više signalnih putova uključenih u ove promjene, dvije ključne komponente omogućuju replikativnu besmrtnost, Hippo i WNT signalni putevi. Postoji više puteva uključenih u ovu karakteristiku stanica raka. U nastavku ćemo se usredotočiti na dva od ovih ključnih putova: Hippo signaliziranje i Wnt signaliziranje [12].

Hippo signalizacija je evolucijski očuvan put koji kontrolira veličinu organa reguliranjem stanične proliferacije, apoptoze i samoobnavljanje matičnih stanica. Osim toga, disregulacija Hippo puta doprinosi razvoju raka. YAP i TAZ su ključni posrednici za Hippo signalizaciju. YAP djeluje kao transkripcijski koaktivator, može se fosforilirati na više mjesta i translocirati iz jezgre u citoplazmu. Kada se Hippo put isključi, YAP se fosforilira, translocira u jezgru i povezuje se s različitim faktorima transkripcije, uključujući TEAD i

YAP/TEAD komplekse, koji reguliraju ekspresiju gena uključenih u staničnu proliferaciju i apoptozu [12].

Put Wnt/ $\beta$ -Catenin još je jedan evolucijski očuvan mehanizam koji je pridonio sposobnosti raka da se beskonačno replicira. Ovaj put regulira pluripotentnost matičnih stanica i odluke o sudbini stanica tijekom razvoja. Također se pokazalo da Wnt signalizacija potiče nuklearnu akumulaciju transkripcijskih regulatora koji su uključeni u rak, kao što je TAZ. Ključni regulatori uključuju:  $\beta$ -katenin je ključni nizvodni efektor u Wnt signalnom putu. Uključen je u dva glavna biološka procesa u kralješnjaka: rani embrionalni razvoj i tumorigenezu. Može se translocirati u jezgru. LEF1 i TCF vežu se za elemente Wnt odgovora kako bi osigurali mjesta spajanja za  $\beta$ -katenin, koji se translocira u jezgru kako bi promicao transkripciju ciljnih gena nakon aktivacije Wnt signalizacije [12].

#### **4. KARCINOGENEZA**

Karcinogeneza je složen proces koji zahtijeva koordinirane interakcije brojnih gena, proteina, signalnih putova i vrsta stanica. Kao rezultat opsežnih studija o molekularnoj karcinogenezi raka, identificiran je niz regulacijskih putova i mreža. Ti su putovi otkrili nekoliko jedinstvenih događaja, obilježenih strukturnim modifikacijama stanica i ekspresijom gena i proteina koji prate onkogenu transformaciju. Stoga se i stanična morfologija i molekularne karakteristike mijenjaju tijekom razvoja raka. Preciznim uočavanjem ovih promjena uz pomoć biomarkera, može se poboljšati rano otkrivanje i dijagnozu pojedinih karcinoma [13].

Biomarkeri su molekularni putokazi koji pokazuju koliko je napredovao proces karcinogeneze. Biomarkeri su glavne mjere pomoću kojih će buduća medicina biti personalizirana za pojedince, a prevencija ili liječenje temeljit će se na jedinstvenim ciljno specifičnim molekulama, za razliku od standardnih sistemskih infuzija toksičnih kemoterapijskih sredstava. Karcinogeneza se sastoji od tri faze, a to su inicijacija, promocija i napredovanje [13].

## 4.1. Inicijacija

Inicijacija čini prvu fazu karcinogeneze koju karakteriziraju ireverzibilne genetske promjene koje ranjive normalne stanice predisponiraju za malignu evoluciju. To je brza, trajna pojava koja se prenosi na stanice kćeri. Nakon pokretanja uzastopnih genotipskih i fenotipskih promjena, stanica se pretvara u neoplastičnu. Inicirana stanica slična je preostalim stanicama iz fenotipske perspektive i prolazi kroz mutacije koje induciraju proliferaciju, ali ne i diferencijaciju. Dobro je potvrđeno da je oštećenje DNA glavni događaj za pokretanje kemijske karcinogeneze koja se može popraviti enzimskim mehanizmima. Zbog nedostatka vremena, proliferirajuće stanice često nisu u mogućnosti popraviti oštećenu DNA i razgraditi kovalentne veze koje mutagene kemikalije stvaraju s DNA [9].

Utvrđeno je da inicirane stanice mogu ostati u stanju mirovanja tjednima, mjesecima ili godinama ili mogu rasti na autonoman i klonski način u ovoj fazi. Postoji mitogeni proces uzrokovan povećanjem broja novih stanica i inhibicijom apoptoze koja sprječava odumiranje iniciranih stanica što rezultira klonskom ekspanzijom. Oštećenje DNA matičnih stanica je najgore zbog njihovog dugog preživljavanja. Sve neoplastične stanice imaju monoklonsko podrijetlo iz matične stanice te mogu prikazati fenotip uspostavljen između embrionalnog aspekta i terminalne diferencijacije. Kao što je definirano, matične stanice su besmrtno stanice dok se ne diferenciraju ili dok se ne izazove smrt, a njihova odgođena diferencijacija rezultira inicijacijom i prikuplja te stanice u tkivima kao klonove abnormalnih stanica. Istraživanja otkrivaju da su matične stanice prisutne u svakom tkivu iako se u većini tkiva ne mogu pratiti [9].

U osnovi inicijacija zahtijeva staničnu proliferaciju i aditivni je proces. Oštećenje postaje trajno i nepovratno ako sustavi za popravak DNA ostanu inaktivirani bilo tijekom ili prije stanične diobe ili kada dođe do stanične diobe. Karcinogena doza izravno je proporcionalna razvoju neoplastičnosti, tj. povećanje doze povećava učestalost i višestrukost nastalih neoplazija i smanjuje latentno razdoblje njezine manifestacije. Bitno je da geni koji reguliraju terminalnu diferencijaciju moraju biti mutirani ili inače sve stanice živog organizma izložene inicijatoru neće biti pokrenute čak ni nakon mutacija. Spontane mutacije mogu započeti inicijaciju koja dalje može proći normalne procese kao što su depurinacija i deaminacija DNA. Pogreške u replikaciji DNA također su povezane s inicijacijom. Svi živi organizmi imaju spontano inicirane stanice, a pojava spontanih neoplazija u laboratorijskih životinja potvrdila je njihovu ulogu, iako je rjeđa od inducirane inicijacije [9].



## 4.2. Promocija

Budući da faza promocije ne uključuje molekularne promjene u strukturi DNA, već promjene u ekspresiji genoma, molekularne studije ove faze prvenstveno su se bavile metodama prijenosa informacija iz okolišnih signala u genom s njegovim naknadnim izrazom. Brojni kemijski agensi postižu svoje učinke putem molekula receptora. Ove molekule receptora u kombinaciji sa sredstvom za promicanje kao ligandom međusobno djeluju ili se vežu na nekovalentan način za specifične regije DNA, obično uzvodno od specifičnih gena. Vezanje takvih kompleksa receptor-promotor zauzvrat mijenja ekspresiju gena nizvodno [14].

Budući da konačna regulacija ove ekspresije ne uključuje samo ovu jednostavnu interakciju, već i koncentraciju receptora i svih molekula koje međusobno djeluju u jezgri stanice, lako je razumjeti da višestruke genetske promjene koje proizlaze iz djelovanja inicijalnog agensa dovode do promijenjene ekspresije gena pod utjecajem promotivnog agensa. Zapravo, vjerojatno je da su specifični promotivni agensi sposobni samo za promicanje replikacije i razvoja specifičnih podskupa iniciranih stanica, vjerojatno onih čiji skup genetskih promjena izazvanih tijekom procesa inicijacije omogućuje optimalnu interakciju s promotivnim agensom za indukciju ovoj fazi [14].

Međutim, važno je shvatiti da se faza promocije ne događa uvijek tijekom procesa karcinogeneze, posebno u određenim visoko umjetnim eksperimentalnim sustavima. Kada je doza kancerogenog agensa dovoljno visoka ili postoji uključenost više čimbenika, faza promicanja, a ponekad čak i faza inicijacije, može biti zaobiđena. Međutim, u većini slučajeva karcinogeneze u ljudi, faza promocije može se lako identificirati [14].

## 4.3. Progresija

Karakteristike progresije uključuju pojavu malignih neoplazmi praćenih velikim genetskim promjenama koje uključuju strukturne promjene unutar kariotipa stanica. Takve promjene uključuju ugradnju virusnih genoma, ili njihovih fragmenata, u genom stanice domaćina kao rezultat infekcije. Dakle, infekcija stanice onkogenim virusom čiji je genom ugrađen u genom stanice domaćina u potpunosti ili djelomično po definiciji rezultira zaobilaznjem faze promocije. Nadalje, progresiju karakterizira kontinuirana evolucija

kromosomskih abnormalnosti unutar stanice, potencijalno dovodeći do višestrukih "faza" ili promjena. Stanice u fazi progresije mogu se razvijati na takav način da ove neovisne karakteristike, kao što su invazija, metastatski rast, anaplazija i brzina rasta, napreduju do sve viših i viših stupnjeva malignosti [14].

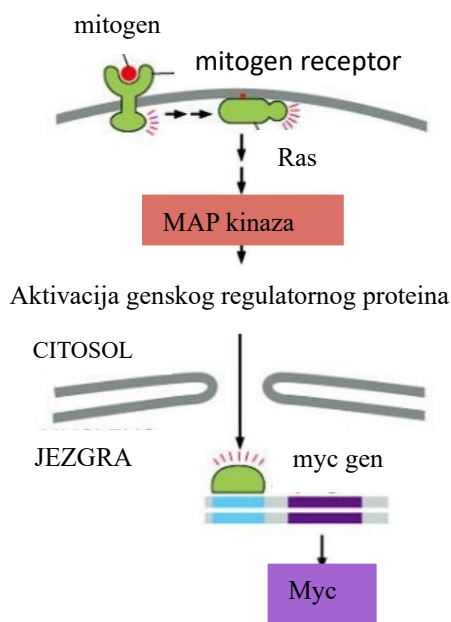
Danas se te neovisne karakteristike mogu shvatiti kao rezultat kariotipskih promjena koje se neprestano razvijaju u stanicama tijekom progresije. Dok se normalne stanice pridržavaju regulacije strukture svog genoma i kariotipa tijekom brojnih dioba stanica, maligne stanice to nisu u mogućnosti činiti. U ekstremnim slučajevima ove maligne stanice neprestano mijenjaju strukturu svog genoma. Takvo stalno molekularno "miješanje" osnova je ne samo za povećanu stopu rasta, invazivnost, metastatsku sposobnost i anaplaziju zloćudnih neoplazmi, već i za većinu otpornosti na lijekove koja se razvija u malignim neoplazmama i sposobnost neoplazmi da izbjegnu imunološke mehanizme domaćina, i abnormalna ekspresija gena, poput onih koji se normalno ekspimiraju samo tijekom fetalnog života i gena ekspimiranih ektopično u tkivima koja ih ne ekspimiraju u odrasloj osobi (npr. proizvodnja adrenokortikotropnog hormona tumorima pluća) [14].

U konačnici, stadij progresije je onaj u kojem liječnik mora liječiti bolest s nadom na izlječenje, dok stadij promocije nosi najveći potencijal za sprečavanje daljnjeg razvoja neoplastičnog procesa [14].

## 4.4. Signalizacija stanica u karcinogenezi

### 4.4.1. Faktori rasta i njihovi receptori

Faktori rasta (engl. growth factor, GF) igraju važnu fiziološku ulogu u normalnom procesu kontrole rasta s ciljem održavanja homeostaze tkiva. Oni prenose signale rasta od jedne stanice do druge. Ovi signali se percipiraju na površini stanice putem specifičnih receptora faktora rasta (engl. growth factor receptor, GFR). GFR-ovi prenose signal rasta putem signalnih puteva kako bi aktivirali ciljne molekule koje potiču proliferaciju (Slika 4.) [15].



Slika 4. Put MAP kinaze kao primjer signalnog puta rasta (preuzeto i prilagođeno iz [15])

Mitogen ili faktor rasta se veže za svoj receptor, poznat kao receptor tirozin kinaze. Fosforilacija tirozina na receptoru dovodi do aktivacije nekoliko proteina, a na kraju i do aktivacije Ras proteina, koji je vezan za unutrašnjost stanične membrane. Aktivni Ras zatim pokreće signalnu kaskadu MAP kinaza, počevši s Rafom (koji ovdje nije prikazan). Konačna MAP kinaza u ovoj sekvenci aktivira nekoliko ciljnih proteina, kao što je na primjer transkripcijski faktor koji potiče ekspresiju Myc gena. Myc protein je transkripcijski faktor koji potiče ekspresiju gena koji reguliraju aktivnost staničnog ciklusa [15].

Koraci koji karakteriziraju normalnu staničnu proliferaciju uključuju sljedeće:

1. vezanje faktora rasta (GF) na svoj specifični receptor na staničnoj membrani.
2. Privremenu i ograničenu aktivaciju receptora faktora rasta (GFR), što aktivira nekoliko proteina za prijenos signala (npr. Ras) na unutarnjem sloju stanične membrane.
3. Prijenos signala putem molekula za prijenos signala, bilo do ciljanih molekula u citoplazmi ili do jezgre gdje aktiviraju transkripciju specifičnih gena.
4. Ulazak stanice u stanični ciklus, što na kraju rezultira diobom stanice.

Ovaj put često se odvija u stanicama karcinoma, što omogućava stanici da stvara vlastite unutarnje signale koji potiču njezinu proliferaciju i čine je neovisnom o svojoj okolini. Karcinomske stanice mogu inducirati vlastite signale za poticanje rasta kada dođe do mutacija u genu receptora za faktore rasta (GFR), što olakšava aktivaciju čak i u odsutnosti faktora rasta ili kada prekomjerna proizvodnja faktora rasta rezultira autokrinim signalnim petljama [15].

#### **4.4.2. Drugi elementi stanične signalizacije**

Alternativna strategija putem koje stanice karcinom mogu postati neovisne o faktorima rasta uključuje konstitutivnu aktivaciju unutarnjih komponenata signalizacije. Na primjer, Ras protein je u normalnim stanicama isključen i ne signalizira, osim ako se ne aktivira GFR koji, preko niza posrednika, može aktivirati Ras protein, pretvarajući ga iz stanja mirovanja u aktivno stanje koje emitira signale. Nakon toga, Ras protein može oslobađati daljnje signale nizvodno koji su sposobni poticati proliferaciju. U stanicama karcinoma, ovaj signalni put je poremećen jer strukturno promijenjeni Ras proteini mogu kontinuirano slati signale poticanja rasta unutar stanice u odsutnosti faktora rasta [15].

## 5. GENETSKE PROMJENE

Genetske promjene temelj su raka. Sekvencioniranje cijelog ljudskog genoma omogućilo je identificiranje genetskih promjena u raku do neviđenih detalja. Pokazalo se da je oko 300 različitih gena mutirano s određenom učestalošću kod raka kod ljudi [13].

Otkrivanje mutacija u stanicama raka ima mnoge potencijalne implikacije za istraživanje i terapiju. Prvo, mutacije mogu biti informativne o evoluciji raka i pružiti klinički zanimljive prognostičke ili prediktivne informacije. Drugo, prve mutacije koje pridonose raku javljaju se, po definiciji, prije razvoja lezije. Otkrivanje tih mutacija može stoga pomoći u ranoj dijagnozi raka. Konačno, u nekoliko slučajeva mutacije mogu biti dobri pokazatelji terapijskih odgovora i mogu pomoći u odabiru terapija koje imaju veće izgleda za uspjeh. To je slučaj, na primjer, s mutacijama u receptoru epidermalnog faktora rasta (engl. Epidermal growth factor receptor, EGFR) koje se nalaze u 20-40 % slučajeva karcinoma pluća kod nepušača. Ove mutacije konstitutivno aktiviraju receptor, generirajući konstantan signal stanične proliferacije. Signal se može blokirati malim inhibicijskim lijekovima poput gefinitiba (Iressa) ili erlotiniba (Tarceva). Ovi lijekovi imaju dobre terapijske učinke kod pacijenata s EGFR mutacijama, ali su slabo učinkoviti kod većine drugih pacijenata. Stanice mnogih vrsta raka akumuliraju mutacije u stopi znatno višoj nego u normalnim stanicama, svojstvo koje se naziva "mutatorski fenotip" [13].

Vjeruje se da je ovo svojstvo transformiranih stanica kritično za razvoj raka kao i za razvoj otpornosti na liječenje raka. Fenotip mutatora je posljedica mutacija u genima koji normalno kontroliraju popravak i integritet DNA. Stanice s takvim mutacijama postaju nesposobne ispravno popraviti oštećenje DNA, i stoga akumuliraju mutacije puno većom stopom od normalnih stanica. Molekularni mehanizmi na kojima se temelji fenotip mutatora mogu uključivati defekte u popravku DNA, transkripciji gena, kontroli staničnog ciklusa i staničnoj smrti [13].

### 5.1. Molekularni mehanizmi karcinogeneze

Geni koji su uključeni u karcinogenezu podijeljeni su u dvije široke kategorije onkogeni i geni supresori tumora, ali također uključuju gene za popravak DNA [15].

### 5.1.1. Stanični onkogeni

Geni koji potiču autonomni stanični rast u stanicama raka nazivaju se onkogeni, a njihovi normalni stanični dvojnici protoonkogeni. Protoonkogeni su fiziološki regulatori stanične proliferacije i diferencijacije, dok onkogene karakterizira sposobnost poticanja rasta stanica u nedostatku normalnih mitogenih signala. Njihovi proizvodi, onkoproteini, nalikuju normalnim produktima protoonkogenata s tom iznimkom što su onkoproteini lišeni važnih regulatornih elemenata. Njihova proizvodnja u transformiranim stanicama postaje konstitutivna, odnosno ne ovisi o faktorima rasta ili drugim vanjskim signalima [15]. Protoonkogeni mogu prijeći u onkogene putem nekoliko mehanizama, uključujući točkaste mutacije i amplifikaciju gena, što rezultira:

- a) Pretjerano stvaranje faktora rasta.
- b) Poplava stanica signalima za replikaciju.
- c) Nekontrolirana stimulacija u međuputevima.
- d) Rast stanice zbog povećanih razina transkripcijskih faktora.

RAS onkogen (engl. rat sarcoma virus) je najčešće mutirani onkogen u ljudskom raku. Ovaj gen kodira gvanozin trifosfat (engl. guanosine triphosphate, GTP) - vezujući protein Ras koji funkcionira kao 'prekidač' za uključivanje i isključivanje brojnih ključnih signalnih putova koji kontroliraju staničnu proliferaciju. U normalnoj stanici, Ras se privremeno aktivira i regrutira Raf kako bi aktivirao MAP-kinazni put za prijenos signala koji potiču rast u jezgri. Mutirani Ras protein trajno se aktivira što dovodi do kontinuirane stimulacije stanica bez ikakvog vanjskog okidača [15].

### 5.1.2. Tumor supresorski geni

Tumor supresorski geni (Tablica 1.) kodiraju proteine koji su: receptori za izlučene hormone koji djeluju na inhibiciju stanične proliferacije negativni regulatori ulaska ili napredovanja staničnog ciklusa, negativni regulatori signalnih putova rasta (npr. Adenomatous polipozni kolon (engl. Adenomatous polyposis coli, APC) ili homolog fosfataze i tenzina (engl. Phosphatase and tensin homolog, PTEN), proteini za kontrolu kontrolnih točaka koji zaustavljaju stanični ciklus ako je DNA oštećena ili su kromosomi abnormalni, proteini koji potiču apoptozu, enzime popravka DNA [15].

Transformacija normalne stanice u stanicu raka popraćena je gubitkom funkcije jednog ili više tumor supresorskih gena i obje kopije gena moraju biti neispravne kako bi se postigao razvoj tumora [15].

Tablica 1. Primjeri tumor supresorskih gena

Gen	Funkcija proteina	Nasljedna bolest	Spontani tumori
APC	Negativni regulator signalizacijskog puta	Adenomatozna polipoza coli (APC)	Većina raka debelog crijeva
BRCA1, BRCA2	Komponente sustava za popravak DNA	Obiteljski rak dojke i jajnika	Spontani rak dojke
CDH1	E-kadherin, molekula stanične adhezije	Nasljedni difuzni rak želuca	Mnogi epitelni karcinomi
CDKN2A	INK4a, inhibitor ciklin-ovisne kinaze Cdk4	Neki obiteljski melanomi	Neki tipovi raka jednjaka i gušterače
MEN1	Transkripcijski faktor i protein kinaza	Višestruka endokrina neoplazija	Mnogi metastatski karcinom
NF1	Neurofibromin, aktivacija Ras-GTPaze	Neurofibromatoza tip 1	neki tumori porijekla neuralnog grebena
PTEN	Negativni regulator signalnog puta rasta PI3K	Cowdenova bolest	30%-50% spontanih karcinoma
RB	Represija transkripcijskog faktora E2F	Retinoblastom, osteosarkom	Retinoblastom, sarkomi, nekoliko karcinoma
SMAD4	Transduktor signala u TGF-signalizaciji	Juvenilna polipoza	Rak debelog crijeva i gušterače
TP53	Transkripcijski faktor; "čuvar genoma"	Li-Fraumenijev sindrom	Najčešće mutiran kod ljudskih karcinoma
TSC1, TSC2	Inhibitor mTOR-a	Tuberozna skleroza	Rijetko
VHL	Ubikvitin ligaza	von Hippel-Lindauova bolest	Mnogi karcinomi bubrežnih stanica
WT1	Transkripcijski faktor	Wilmsov tumor	Neke vrste leukemije

Retinoblastomski protein (engl. Retinoblastoma protein, Rb) je tumorski supresorski gen koji kontrolira prijelaz staničnog ciklusa iz G1 u S fazu. Rb protein veže regulatorni transkripcijski faktor E2F koji je potreban za sintezu enzima koji sudjeluju u replikaciji DNA. Kada je Rb vezan za E2F, transkripcija/replikacija je blokirana. Prisutnost faktora rasta (putem Ras puta) aktivira kinazu ovisnu o ciklinu 4/6 (CDK4/6). Aktivni CDK4/6-fosforilira i inhibira Rb, koči E2F i dolazi do prijelaza u S fazu. Poremećaj/brisanje Rb gena stoga dovodi do nekontrolirane stanične proliferacije [15].

### 5.1.3. *TP53* supresor tumora

Najviše proučavan od svih gena u stanicama raka je *TP53*, koji kodira protein p53, supresor tumora koji je mutiran u otprilike polovici svih slučajeva raka kod ljudi. Baza podataka svih mutacija *TP53* pohranjena je u Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka te sadrži oko 24 000 mutacija otkrivenih u gotovo svakoj vrsti ljudskog raka. Većina njih pripada dijelu proteina koji se veže na DNA, omogućujući p53 da regulira nekoliko desetaka drugih gena. Mutacije su često supstitucija jedne baze, što dovodi do zamjene jedne aminokiseline u proteinu drugom. Ova mala promjena dovoljna je da poremeti savijanje proteina i spriječi njegovo vezanje na DNA, izazivajući tako gubitak funkcije [13].

Pomno ispitivanje distribucije ovih mutacija pokazuje da se one ne događaju nasumično i da postoje značajne razlike u obrascima mutacija među karcinomima koji su snažno povezani s izloženošću mutagenima iz okoliša. Te razlike nastaju zbog činjenice da različiti mutageni mogu oštetiti DNA na određene načine, što dovodi do različitih vrsta mutacija. Stoga se mutacije u *TP53* mogu promatrati kao "molekularni potpisi" mutagenih događaja koji pridonose razvoju raka. To čini profil mutacije *TP53* moćnim biomarkerom u molekularnoj epidemiologiji, kao potencijalnim pokazateljem izloženosti specifičnim mutagenima. To je potkrijepljeno dokazima koji pokazuju da se obrasci mutacije u uobičajenim vrstama raka značajno razlikuju ovisno o geografskim varijacijama u incidenciji, što ukazuje na razlike u izloženosti određenim karcinogenima iz okoliša. Na primjer, kod karcinoma jetre vrsta i učestalost mutacija vrlo je različita između pacijenata u Europi i SAD-u i onih u mnogim zemljama Afrike ili jugoistočne Azije. Razlika je posljedica utjecaja posebnog mutagena, aflatoksina, kojeg proizvodi gljiva koja kontaminira mnoge sastojke hrane u tropskim područjima. Ovaj mutagen je gotovo odsutan u zapadnoj prehrani,



ali inducira karakterističnu mutaciju *TP53* koja pridonosi raku jetre u regijama subsaharske Afrike i jugoistočne Azije [16].

Kod mnogih vrsta raka prisutnost mutacije u *TP53* povezana je s prilično lošom prognozom i lošim odgovorom na liječenje. Do sada, ova činjenica je imala samo ograničeni utjecaj u klinikama jer iste informacije mogu se zaključiti iz drugih pokazatelja koje redovito procjenjuje patolog: veličina tumora, njegov stupanj, proširenje bolesti u limfne čvorove itd. Međutim, nedavno je prepoznato da mutacije *TP53* mogu pomoći u razlikovanju tumora koji patologu izgledaju isto. Na primjer, kod raka dojke prisutnost mutacije *TP53* omogućuje identifikaciju tumora koji imaju visoki rizik progresije u odnosu na tumore klasificirane kao "dobre prognoze". Stoga je moguće te pacijente izdvojiti i ponuditi im agresivnije liječenje. Ne bi bilo opravdano dati takav tretman svim pacijentima jer bi rizik od sekundarnih učinaka bio veći od koristi, budući da većini njih takav tretman zapravo nije potreban [13].

Mutacije *TP53* također se mogu otkriti izvan tumorskih tkiva, posebno u tjelesnim tekućinama kao što je krv. Prisutnost mutanta *TP53* u krvi je zbog činjenice da mase raka oslobađaju male količine mrtvih stanica koje potječu iz tumora i stoga sadrže istu mutaciju. Otkrivanje takvih mutacija u plazmi može se iskoristiti za rano otkrivanje raka. Doista, mutacije *TP53* u DNA plazme zabilježene su kod pacijenata s rakom debelog crijeva, gušterače, pluća i jetre. Na primjer, gore spomenuta mutacija *TP53* izazvana aflatoksinom može se detektirati u plazmi subjekata koji nemaju rak, a koji su kronični nositelji virusa hepatitisa B, do 5 godina prije razvoja raka jetre [17]. Studije o *TP53* također ilustriraju još jednu karakteristiku genetskih mutacija koje uzrokuju rak: neke od njih mogu se pojaviti u zametnoj liniji i prenijeti kao naslijeđene osobine. Dakle, osobe koje naslijede te mutacije rađaju se s genom koji uzrokuje rak koji je prisutan u svim stanicama tijela [13].

Ove osobe imaju vrlo visoki rizik od razvoja raka. Nasljeđivanje mutacije *TP53* uzrokuje ozbiljan obiteljski sindrom raka, Li-Fraumenijev sindrom (LFS). Članovi obitelji koji nasljeđuju mutaciju često imaju tumore u djetinjstvu ili tinejdžerskim godinama i zahtijevaju poseban medicinski nadzor i njegu kako bi se otkrili i izliječili ti karcinomi u najranijoj mogućoj fazi [13].

## 5.2. Mehanizmi poznatih ljudskih karcinogena

Čak i ljudski karcinogeni koji ne pokazuju direktnu kemijsku interakciju s DNA, kao što su hormoni i azbest, pokazali su da induciraju genetske efekte kada se koriste *in vitro* testovi za mutacije kromosoma. Budući da ove kemikalije obično nisu aktivne u Salmonella testu i drugim testovima za genske mutacije, veći naglasak je stavljen na njihove nefunkcionalne mehanizme. Postoje dokazi da ovi karcinogeni mijenjaju izražavanje gena i potiču proliferaciju stanica putem epigenetskih mehanizama; ova svojstva gotovo sigurno doprinose karcinogenoj aktivnosti ovih kemikalija. Iako manje istraženi, karcinogeni koji reagiraju s DNA i imaju genotoksični učinak također mijenjaju izražavanje gena i proliferaciju stanica putem epigenetskih mehanizama [18].

Čađa, katrani i ulja također su općenito aktivni u testu Salmonella, a kada se testiraju, aktivni su i u drugim sustavima, iako u mnogim slučajevima ta istraživanja nisu provedena. Neki od kancerogenih metala nisu aktivni u testu na salmonelu, ali pokazuju aktivnost u nizu drugih testnih sustava, posebno u testovima klastogenosti. Ovo otkriće naglašava nužnost da se ispitivanje mutagenosti ne ograniči na testove mutacije gena, već da se radije ispita cijeli spektar mogućih mutacijskih događaja. Dvije klase kemikalija koje su općenito neaktivne u testovima mutagenosti su mineralna vlakna i hormoni [19].

## 6. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres, definiran kao relativni višak reaktivnih kisikovih vrsta (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) u usporedbi s antioksidansima, je povezan s neurodegenerativnim bolestima, kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom melitusom i mnogim drugim patologijama. Ove veze naglašavaju da je važno postići ravnotežu između ROS-a i antioksidansa. Stanice posjeduju složene biokemijske i genetske mehanizme za održavanje takve ravnoteže i jasno je da njihova perturbacija može imati duboke patofiziološke posljedice [20].

Ovisno o koncentraciji, reaktivne kisikove vrste utječu na evoluciju raka na naizgled kontradiktorne načine, bilo pokrećući/potičući tumorigenezu i podržavajući transformaciju/proliferaciju stanica raka ili uzrokujući staničnu smrt. Kako bi se prilagodile visokim razinama ROS-a, tumorske stanice modificiraju metabolizam temeljen na sumporu,

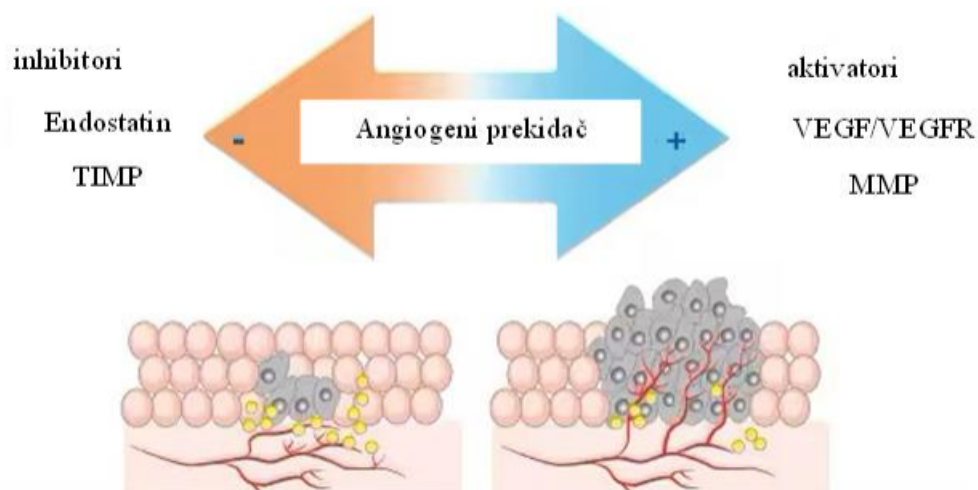
stvaranje NADPH-a i aktivnost antioksidativnih faktora transkripcije. Tijekom inicijacije, genetske promjene omogućuju preživljavanje stanica pod visokim razinama ROS-a aktiviranjem antioksidativnih faktora transkripcije ili povećanjem NADPH putem pentozofosfatnog puta (PPP, pentose phosphate pathway). Tijekom progresije i metastaziranja, tumorske stanice prilagođavaju se oksidativnom stresu povećanjem NADPH na različite načine, uključujući aktivaciju AMPK, PPP i redukcijski metabolizam glutamina i folata [21].

ROS se može proizvesti iz endogenih izvora, poput mitohondrija, peroksisoma i aktivacije upalnih stanica; i egzogeni izvori, uključujući agense iz okoliša, lijekove i industrijske kemikalije. Ovaj oksidativni stres zatim može uzrokovati oštećenje DNA, proteina i/ili lipida, što dovodi do promjena u nestabilnosti kromosoma, genetske mutacije i/ili modulacije rasta stanica koje mogu rezultirati rakom [22].

## 7. ŠIRENJE TUMORA

### 7.1. Angiogeneza

Angiogeneza (Slika 5.) je stvaranje novih krvnih žila. Ovaj proces uključuje migraciju, rast i diferencijaciju endotelnih stanica, koje oblažu unutarnju stijenku krvnih žila. Proces angiogeneze kontroliraju kemijski signali u tijelu [23].



Slika 5. Angiogeneza (preuzeto i prilagođeno iz [24])

Neki od signala, kao što je faktor rasta endotela krvnih žila (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF), vežu se za receptore na površini normalnih endotelnih stanica. Kada se VEGF i drugi endotelni čimbenici rasta vežu za svoje receptore, pokreću se signali unutar stanica koji potiču rast i preživljavanje novih krvnih žila. Drugi kemijski signali, koji se nazivaju inhibitori angiogeneze, ometaju stvaranje krvnih žila [23].

S obzirom na složenost procesa kao što je angiogeneza, VEGF-A igra izuzetnu ulogu u signalizaciji kroz VEGF receptor-2 (FLK1) koji inducira angiogenezu u procesima zdravlja i bolesti. VEGF aktivnost pojačavaju VEGF ko-receptori, kao što su neuropilin 1 (engl. neuropilin 1, NRP1) i neuropilin 2 (engl. neuropilin 2, NRP2). Nasuprot tome, gubitak VEGF rezultira prekidom vaskularnog razvoja. Placentni čimbenik rasta (PlGF) homolog je citokina VEGF koji stimulira angiogenezu i različite vrste stanica, poput mijeloida i stromalnih karcinoma, osim što aktivira tumorske stanice, dok njihova inhibicija poboljšava liječenje raka [25].

Kolagenaze (MMP-1, -8 i -13) su proteini povezani s angiogenezom, a njihov gubitak dovodi do ireverzibilnog pucanja matriksa. Kolagen tipa IV sudjeluje u staničnoj endotelnoj migraciji u intersticijskim stromalnim prostorima. Poznato je da tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP-1, TIMP-2, TIMP3 i TIMP-4) reguliraju iste, igrajući ključnu ulogu u regulaciji angiogeneze inhibicijom neovaskularizacije [25].

U odraslih, angiogeneza se pokreće samo u uvjetima upale ili hipoksije. U ranoj proliferativnoj fazi, vaskularni popravak mora prevladati kako bi se krvarenje kontroliralo vazokonstrikcijom i koagulacijom. Tijekom menstruacije dolazi do izbacivanja endometrija ako ovula nije oplodena. Žene koje boluju od endometrioze pokazuju agresivnu angiogenezu u peritonealnoj šupljini [25].

S druge strane, nekoliko je studija utvrdilo važnost transmembranskih receptora i liganada koji sudjeluju u staničnoj diferencijaciji. Nedavno je proučavana njihova uloga u klijanju endotela tijekom angiogeneze. EC eksprimiraju nekoliko Notch receptora (kao što su Notch1 i Notch4), kao i Notch1 protein i Notch ligand delta-like 4 (DLL4), koji su važni signali za vaskularni razvoj. U većini zdrave populacije, EC-i u mirovanju pokazali su duga vremena poluživota putem VEGF aktivacije, Notch signalizacije i ekspresije angiopoetina-1 (ANG-1) i faktora rasta fibroblasta (FGF). Novija saznanja o složenosti angiogeneze nedvojbeno pokazuju ulogu sudionika u ovom događaju i omogućuju pronalaženje primjene u antiangiogenjskoj terapiji [25].

Kao što je prethodno spomenuto, angiogeneza je normalan razvoj i dio procesa ozdravljenja; međutim, to je ključno za grananje tumora i arborizaciju u patološkim stanjima kao što je rak. Stvaranje novih vaskularnih mreža potiče rast, održavanje i širenje raka. Tijekom angiogeneze kod raka opisane su promjene na razini limfangiogeneze i vaskulogeneze, oba procesa su jako uključena u razmnožavanje stanica raka i nepovoljna prognoza [25].

Ubrzani rast tumora dovodi do hipoksičnog tumorskog mikrokruženja, intersticijske hipertenzije i acidoze. Kako bi se preokrenule te nepovoljne fizikalno-kemijske promjene, VEGF-C i VEGF-D se sintetiziraju aktivacijom VEGFR-3/2, izazivajući povećanje promjera i gustoće peritumoralnih limfnih žila, pogodujući širenju tumorskih stanica prema sentinel limfnim čvorovima. Pokazalo se da inhibicija ovih čimbenika upotrebom antitijela smanjuje limfogenezu i metastaze u obližnjim ganglijima. Zatim, angiogeneza održava stalnu i trajnu opskrbu stanica raka hranjivim tvarima što dovodi do rasta tumora [25].

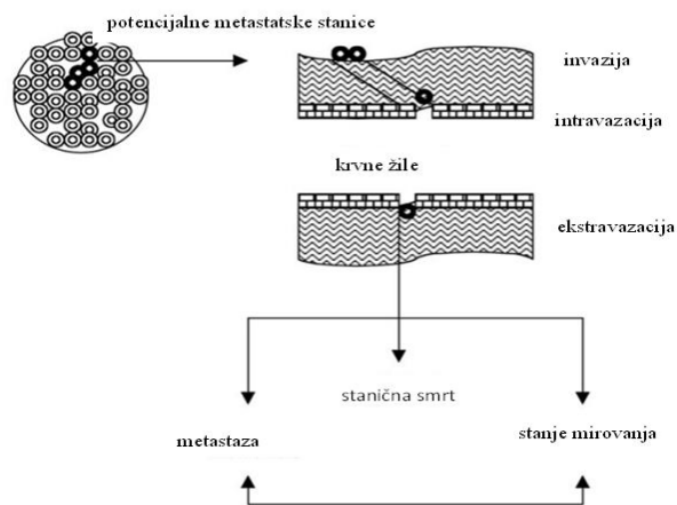
Ova nenormalna revaskularizacija počinje nakon gubitka regulacije inhibicijskih čimbenika (npr. trombospondin-1) i angiogenih promotora (VEGF). Čimbenik inducibilan hipoksijom (HIF) jedan je od prvih čimbenika rasta koji pokreće abnormalni proces vaskularnog rasta i odgovara na nisku napetost kisika u tumorskoj masi. Nakon toga, val čimbenika rasta kao što su EGF, bazični i kiseli FGF, estrogen, prostaglandin E1 i E2, IL-8, TGF, TNF, neuropilini i VEGF potiče stvaranje vaskularne mreže koja osigurava izmjenu kisika i hranjivih tvari s tumorom. Ovaj proces vaskularizacije prvenstveno je reguliran VEGF-A/VEGF-1,2 i DLL4 signalizacijom. Aktivacija EC-a također pokreće proces grananja prema središnjem području tumora. Ova nova dovodna i odvodna mreža koja podupire tumor omogućuje potonjem da održi povoljno mikrokruženje za njegov rast i širenje. Danas se tumorska niša smatra neovisnim organom koji se može sam održati. Dodatno, receptori integrina su prekomjerno izraženi u tumorskim EC i igraju ključnu ulogu u povezivanju staničnog citoskeleta s proteinskim ligandima izvanstaničnog matriksa kao što je arginin-glicin-asparaginska kiselina (RGD). Ova interakcija vezanja između integrina i proteinskih liganada važan je mehanizam tijekom angiogeneze tumorskih endotelnih stanica [25].

## 7.2. Metastaziranje

Metastaze uključuju širenje stanica raka iz primarnog tumora u okolna tkiva i udaljene organe i primarni su uzrok morbiditeta i smrtnosti od raka. Kako bi dovršile metastatsku kaskadu, stanice raka moraju se odvojiti od primarnog tumora, ući u krvožilni i limfni sustav, izbjeći imunološki napad, izići iz krvnih i limfnih žila na udaljenim kapilarama, te proliferirati u udaljenim organima [26].

Vodeći uzrok smrti pacijenata oboljelih od raka nije primarni tumor, već su njegove metastaze, međutim, nije jasno potječu li sve metastaze od primarnih tumora ili same metastaze imaju sposobnost metastaziranja. Prema vodećem modelu, sposobnost razvoja metastaza predstavlja visoko selektivan proces, jer među heterogenom populacijom primarnog tumora samo mali podskup stanica može metastazirati. Formiranje metastaza je vrlo složen i dinamičan proces tijekom kojeg je broj interakcija između tumorskih stanica i između tumorskih stanica i okolnog okruženja [27].

U onkološkom jeziku, koraci uključeni u proces metastaziranja često se opisuju kao „metastatska kaskada“ (Slika 6.). U početku, pojedinačne tumorske stanice ili mali agregati tumorskih stanica se odvajaju i napuštaju primarni tumor, a proces se naziva disocijacija tumorskih stanica. Nadalje, stanice aktivno infiltriraju okolnu stromu i ulaze u krvožilni sustav putujući na različita mjesta kako bi se uspostavio sekundarni rast tumora. U krvotoku, vrlo mali broj tumorskih stanica preživi da bi došlo do ciljnog organa, što ukazuje na to da se mora uzeti u obzir stvaranje metastaza kao vrlo neučinkovit slučaj [27].



Slika 6. Metastaziranje (preuzeto i prilagođeno iz [27])

Milijuni stanica karcinoma ulazi u krvožilni sustav, ali većina ih umire tijekom transporta, samo 1-5 % živih stanica je uspješan u formiranju sekundarnih naslaga na različitim mjestima. Poznato je da mnoge stanice imunološkog sustava kao što su stanice prirodne ubojice (engl. natural killer, NK) stanice, makrofagi i limfociti, mogu doprinjeti eliminaciji tumorskih stanica u vaskularnom sustavu. Također, može doći do smrti cirkulirajućih stanica raka uzrokovana vrlo jednostavnim čimbenicima poput mehaničkim kretanjima, turbulencijama i nedostatkom pravilne prehrane i metabolizma. Općenito, koraci potrebni za razvoj metastaza su slični za sve karcinome, a ekspresija invazivnog fenotipa se pojavljuje unutar dinamičkog mikrosustava koji je izgradio stanice raka, razine stanice domaćina i izvanstanični matriks [27].

## 8. ZAKLJUČAK

Razvoj tumora je složen proces koji uključuje više molekularnih mehanizama. Iako specifični mehanizmi mogu varirati ovisno o vrsti tumora, postoji nekoliko ključnih procesa koji su obično uključeni. Genetske mutacije igraju ključnu ulogu u razvoju tumora. Mutacije se mogu pojaviti u različitim genima, uključujući onkogene (koji pospješuju rast i diobu stanica) i gene supresore tumora (koji inhibiraju rast stanica i pospješuju apoptozu). Mutacije mogu poremetiti normalnu regulaciju rasta stanica, što dovodi do nekontrolirane proliferacije.

Oštećenje DNA, uzrokovano unutarnjim i vanjskim čimbenicima, može pridonijeti razvoju tumora. Kada dođe do oštećenja DNA, stanice aktiviraju mehanizme popravka DNA kako bi održale genomsku stabilnost. Međutim, ako se oštećenje ne popravi ispravno, mutacije se mogu akumulirati i povećati rizik od nastanka tumora. Stanični signalni putovi kontroliraju različite stanične procese, uključujući stanični rast, diferencijaciju i preživljavanje. Promjene u tim signalnim putovima mogu potaknuti razvoj tumora. Na primjer, mutacije u RAS signalnom putu često se opažaju u mnogim vrstama raka, što dovodi do nekontroliranog rasta stanica.

Tumorima je potrebna opskrba krvlju kako bi održali svoj rast i metastaze. Angiogeneza je stvaranje novih krvnih žila iz već postojećih. Tumorske stanice mogu inducirati angiogenezu otpuštanjem proangiogenih čimbenika, kao što je faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF), koji potiče rast krvnih žila prema tumoru. Apoptoza je programirani proces stanične smrti koji eliminira oštećene ili abnormalne stanice. Tumorske stanice mogu steći mutacije koje ometaju normalne apoptotičke putove, što im omogućuje da izbjegnu smrt stanice. Ovo izbjegavanje apoptoze omogućuje preživljavanje i proliferaciju stanica raka. Tumorske stanice mogu prodrijeti u susjedna tkiva i proširiti se na udaljena mjesta u procesu koji se naziva metastaza. To uključuje degradaciju komponenti izvanstaničnog matriksa i molekula stanične adhezije, omogućujući tumorskim stanicama da se odvoje od primarnog tumora, uđu u krvotok ili limfni sustav i uspostave sekundarne tumore u drugim dijelovima tijela. Imunološki sustav igra ključnu ulogu u prepoznavanju i uklanjanju stanica raka. Međutim, tumorske stanice mogu razviti mehanizme za izbjegavanje imunološke detekcije i uništenja. Oni mogu smanjiti ekspresiju molekula za imunološko prepoznavanje, aktivirati imunosupresivne puteve ili regrutirati imunosupresivne stanice u mikrookruženje tumora.



## 9. LITERATURA

- [1] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. D. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, "Cell Communities: Tissues, Stem Cells and Cancer." *Essential Cell Biology* (2014), 712-724.
- [2] <https://www.Mechanisms of tumor development> (15.6.2023.)
- [3] T. Sinha, Tumors: benign and malignant, *Cancer Therapy & Oncology International Journal*, **10.3** (2018), 52-54.
- [4] A. Patel, Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol.* **6.9** (2020), 1488.
- [5] <https://doctorfly.co.uk/what-are-the-differences-between-benign-and-cancerous-tumors/> (14.6.2023.)
- [6] I. Damjanov, S. Jukić, M. Nola, *Patologija*, 3. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.
- [7] <http://mikromed.uniri.hr/atlas/novotvorine.html> (14.6.2023.)
- [8] D. Hanahan i R. A. Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." *cell* **144** (2011), 646-674.
- [9] S. Rashid, *Cancer and chemoprevention: An overview*. Sinapore: Springer, 2017.
- [10] <https://blog.cellsignal.com/hallmarks-of-cancer-evading-growth-suppressors> (1.8.2023.)
- [11] <https://blog.cellsignal.com/hallmarks-of-cancer-resisting-cell-death> (1.8.2023.)
- [12] <https://blog.cellsignal.com/hallmarks-of-cancer-enabling-replicative-immortality> (2.8.2023.)
- [13] [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/wcr\\_2008\\_5.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/wcr_2008_5.pdf) (4.8.2023.)
- [14] H. C. Pitot, The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. **72** (1993), 962-970.
- [15] U. A. Bommer, K. L. Vine. "Cancer biology: molecular and genetic basis." (2014).
- [16] P. Hainaut, M. Hollstein, p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* **77** (2000), 81-137.
- [17] P. E. Jackson, S. Y. Kuang, J. B. Wang, P. T. Strickland, A. Muñoz, T. W. Kensler, G. S. Qian, J. D., Groopman Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis*, **24** (2003), 1657-1663.

- [18] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1620716/> (30.8.2023.)
- [19] J. C. Barrett, Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*, **100** (1993), 9-20.
- [20] J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, K. D. Tew, Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, **38** (2020), 167-197.
- [21] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32649885/> (7.8.2023.)
- [22] J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis, B. A. Hocevar, Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*, **38** (2010), 96-109.
- [23] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet#what-is-angiogenesis> (17.6.2023.)
- [24] <https://www.novusbio.com/research-areas/cancer/angiogenesis> (3.7.2023.)
- [25] S. Quintero-Fabián, R. Arreola, E. Becerril-Villanueva, J. C. Torres-Romero, V. Arana-Argáez, J. Lara-Riegos, M. A. Ramirez-Camacho, M. E. Alvarez-Sanchez, "Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer." *Frontiers in oncology* **9** (2019), 1370.
- [26] <https://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,3f85dd3739e1ad69,72fe0af97b0393c7.html> (8.8.2023.)
- [27] A. Harlozinska, Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis, *Anticancer research* **25.5** (2005), 3327-3333.