

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav klinické imunologie a alergologie**

NÁDOROVÉ BUJENÍ A ZÁNĚTLIVÁ ODPOVĚĎ

MUDr. Dagmar Hlávková

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: lékařská imunologie
Hradec Králové 2008

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Uchazečka: MUDr. Dagmar Hlávková
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze a Fakultní nemocnice
v Hradci Králové

Školitel: Doc. MUDr. Otakar Kopecký, CSc.
Oddělení klinické imunologie a alergologie, Oblastní nemocnice Náchod a.s.
II. interní klinika FN a LF UK Hradec Králové

Oponenti:

Doc. MUDr. Karel Odrážka, PhD.
Komplexní onkologické centrum Pardubického kraje
Katedra radiační onkologie IPVZ Praha

Doc. RNDr. Zuzana Bílková, PhD.
Katedra biologických a biochemických věd,
Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Obhajoba se koná před Komisí pro obhajoby
disertačních prací v doktorském studijním programu
Lékařská imunologie
v pondělí 1. září 2008 od 10.00 hodin,
Ústav klinické imunologie a alergologie ve FN
v HK, budova č. 17, zasedací místnost, 1. podlaží

Stanovisko k disertační práci vypracovala oborová rada Doktorského studijního programu
Lékařská imunologie.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR: NR/8914-4.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové,
University Karlovy v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové

Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Předseda komise pro obhajobu disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíle práce	13
3. Soubor pacientů a použitá metodika	14
3.1. Soubor pacientů	14
3.2. Laboratorní metodika	17
3.3. Statistické hodnocení	17
4. Souhrn výsledků	18
5. Závěr	20
6. Summary	21
7. Použitá literatura	23
8. Publikace uchazečky	25
8.1. Původní vědecké práce přímo se vztahující k tématu disertační práce	25
8.2. Další vědecké práce ve vědeckých časopisech	25
8.3. Abstrakta	25

1. Úvod

Zánětlivý proces je obrannou reakcí organismu na působení škodlivých podnětů z vnějšího i vnitřního prostředí. Na jeho vzniku a rozvoji se podílí řada tělních soustav s ústředním postavením imunitního systému. Zánětlivá reakce je charakterizována postupným zapojováním jednotlivých buněčných typů a její průběh lze rozdělit do tří fází – iniciační, vrcholné a reparační. Cílem zánětlivé reakce je vyloučení škodliviny a reparace poškozené tkáně. Průběh zánětlivé reakce však nemusí být čistě ochranný. V případě její abnormální regulace může být příčinou řady závažných stavů včetně nádorového bujení. Přítomnost zánětlivé reakce v nádorové tkáni je častým nálezem. Buňky zánětlivého infiltrátu nádoru mohou pod vlivem nádorového mikroprostředí ztrácet svoji původní ochrannou protinádorovou funkci a naopak produkcí řady biologicky aktivních látek (cytokinů, chemokinů, růstových faktorů) mohou podporovat růst a šíření nádoru.

Charakteristika zánětlivé reakce

Zánět je komplexní adaptační reakce organismu vyvolaná působením poškozujících faktorů vnějšího či vnitřního prostředí a směřuje k udržení homeostázy a vyloučení vyvolávající noxy. Na rozvoji zánětlivé reakce se rozhodující měrou podílí imunitní systém, ale i systémy jiné jako koagulační a fibrinolytický, neuroendokrinní a další. Zánětlivá reakce je charakterizovaná čtyřmi adaptačními změnami organismu. Přechod od reakcí anabolických ke katabolickým má za cíl získání energie a elementárních stavebních kamenů pro syntézu buněčných i nebuněčných složek účastnicích se zánětlivé reakce. Změna spektra produkovaných bílkovin se odráží v elektroforetickém záznamu. Syntéza některých bílkovin narůstá, jiných klesá. K tzv. pozitivním reaktantům akutní fáze, jejichž produkce v průběhu zánětu vzrůstá, patří: C-reaktivní protein, sérový amyloid A, alfa1-antitrypsin, alfa2-makroglobulin, fibrinogen, ceruloplazmin, haptoglobin, C3 složka komplementu, gama-globuliny. Naopak tzv. negativní reaktanty akutní fáze, jejichž tvorba klesá, jsou: albumin, prealbumin, transferin. Výsledně zaznamenáváme zvýšení frakce alfa1-globulinů podmíněné zejména nárůstem alfa1-antitrypsinu a zvýšení frakce alfa2-globulinů způsobené vzrůstem hladiny haptoglobinu a ceruloplazminu [1]. Zánětlivá reakce je obvykle spojena s nárůstem absolutního počtu leukocytů periferní krve, diferenciální krevní obraz je charakterizován

granulocytózou se zvýšeným zastoupením nezralých forem. Relativní i absolutní lymfocytóza bývá spjata s virovou infekcí, dále do obrazu zánětlivé reakce zapadají trombocytóza, ale i trombocytopenie a anémie. Významný vliv na průběh zánětlivé reakce má rovněž neuroendokrinní systém aktivací osy hypotalamus – hypofýza- nadledviny se zvýšenou produkcí kortikoidů a katecholaminů [2]. Ke klinickým projevům zánětlivé reakce patří zvýšená tělesná teplota, celková únava, nevěle, spavost.

Ústřední postavení v průběhu zánětlivé reakce zaujímá imunitní systém. Nutno říci, že jeho působení není výlučně pozitivní, ale bývá vždy spojeno s jistou mírou poškození vlastních struktur. Imunitní systém v sobě může nést mimořádně poškozující potenciál v případě jeho abnormálních regulací, které se uplatňují v řadě imunopatologických stavů. Kromě všech buněčných a humorálních komponent imunitního systému se zánětlivé reakce bezprostředně účastní i další buněčné typy jako endotelie, fibroblasty, keratinocyty, buňky hladké svaloviny, trombocyty, epitele a další [2]. Významnou roli sehrává rovněž mezibuněčný prostor a jeho struktury. Tento prostor je místem, kde zánětlivá reakce probíhá a kam musí buňky imunitního systému vycestovat z cévního řečiště. Prostup přes cévní endotel je vícestupňový proces. Na počátku dochází ke zpomalení pohybu leukocytů tzv. rollingem, což je otáčivý pohyb leukocytů po endoteliích zprostředkovaný zejména adhezní interakcí typu selektin – cukerný zbytek. Ve druhé fázi je leukocyt pevně připoután k endotelu a to interakcí mezi integrinovými a imunoglobulinovými adhezními molekulami. Poté následuje vstup leukocytu přes cévní endotel [3].

Průběh zánětlivé reakce je charakterizován postupným zapojováním jednotlivých buněčných typů a můžeme ho rozdělit do tří fází – iniciační, vrcholné a reparační.

Iniciační fáze nastupuje bezprostředně po působení škodlivého podnětu. Probíhá řádově v hodinách s dominující přirozenou imunitou. Je rovněž spojena s aktivací koagulačního a fibrinolytického systému, při níž se uvolňuje velké množství biologicky aktivních látek (cytokinů, růstových faktorů, chemokinů). S odstupem 24 hodin od vzniku poškození představují 50% všech buněčných elementů neutrofilní granulocyty, které vycestovaly do místa poškození vlivem chemoatraktantů - trombin, fibrin a fibrin-degradační produkty, štěpné produkty komplementu, leukotrieny, chemoatraktanty exogenního původu (např. N-formyloligopeptidy bakterií), PDGF beta, NAP2, GRO alfa, ENA-78, IL-8 [4]. Na počátku jsou hlavním zdrojem chemokinů aktivované trombocyty, později další buněčné typy. Přibližně za dalších 24 hodin začne počet neutrofilů klesat a následuje zvýšená migrace buněk monocytomakrofágové linie. K hlavním chemokinům této buněčné populace patří RANTES, MIP-1alfa, MIP-1beta, MCP-1, MCP-3. Chemotaxe je rovněž podmíněna změnami adhezních

vlastností migrujících buněk a endotelií vlivem řady cytokinů. Po aktivaci jsou makrofágy hlavním zdrojem růstových faktorů a cytokinů (TGF beta, PDGF, bFGF, TGF alfa, IGF I, IGF II, TNF alfa, IL-1) [3]. Buněčné komponenty přirozené imunity jsou představovány zmíněnými fagocytárními elementy (granulocyty a makrofágy), dále dendritickými buňkami [5], mastocyty (jako významný zdroj prozánětlivých cytokinů, histaminu, proteináz, lipidových mediátorů zánětu) [3] a přirozeně cytotoxickými NK a NKT buňkami [6]. Nejvýznamnější humorální komponentou přirozené imunity je komplementový systém [2]. Humorální a buněčné složky přirozené imunity jsou schopny v místě zánětlivé reakce okamžitě identifikovat nebezpečné podněty exogenního i endogenního původu prostřednictvím solubilních či membránově vázaných receptorů [2]. Výsledkem iniciační fáze zánětlivé reakce je výrazná amplifikace imunitní odpovědi a zesílený přepis genů kódujících prozánětlivé cytokiny (zejména IL-1, IL-6, TNF alfa), chemokiny a bílkoviny regulující buněčný cyklus.

Vrcholná fáze zánětlivé reakce probíhá řádově dny a dominuje při ní specifická imunita. K rozvoji specifické imunity dochází v sekundárních lymfatických orgánech, kam migrují buňky přirozené imunity (hl. dendritické buňky a makrofágy) s navázaným antigenem, který prezentují T lymfocytům za účasti molekul HLA I. a II. třídy [7]. Tato reakce je podmíněna řadou adhezních, akcesorních a kostimulačních interakcí mezi antigen prezentující buňkou a T lymfocytem. K rozvoji specifické buněčné imunity je nezbytné optimální cytokinové mikroprostředí. Současně s aktivací T lymfocytů jsou aktivovány také B lymfocyty s výsledným rozvojem specifické humorální imunity. Zhruba po 14 dnech od poškození se v místě zánětlivé reakce stávají dominantní populací právě lymfocyty, které sem migrují pod vlivem řady chemokinů (IP-10, MCP-1, Mig, MDC) [8, 9, 10]. Výsledkem této fáze zánětu je eliminace škodliviny a vytvoření imunologické paměti. Po dokončení obranné reakce dochází k útlumu proliferace T a B lymfocytů a již nadbytečné buňky specifické i přirozené imunity hynou apoptózou [2].

Poslední fází zánětlivé reakce je reparace, jejímž cílem je obnovení tkáňové integrity. V průběhu zánětlivé reakce pronikají buňky imunitního systému do místa poškození za cenu rozrušení mezibuněčné hmoty. K tomu jim slouží proteolytické enzymy produkované samotnými migrujícími buňkami, ale i fibroblasty a dalšími buněčnými typy [11]. K nejdůležitějším proteolytickým enzymům patří serinové proteinázy, matrixové metaloproteinázy, dále cysteinové a aspartové proteinázy. Biologické účinky proteináz jsou rozsáhlé, proto musí existovat jejich přirozené inhibitory [12]. Rozkladem mezibuněčné hmoty dochází také k uvolnění řady cytokinů, které jsou na strukturu mezibuněčné hmoty

vázány. Na reparaci tkání se podílí jak složky imunitního systému, tak další buněčné elementy, zejména fibroblasty a endotelie. Podstatou reparace je obnova mezibuněčné hmoty a cévního zásobení. Trvání reparační fáze je řádově v týdnech [2, 13].

Mezibuněčná hmota tvoří podpůrnou tkáň pro buněčné elementy, které se k ní poutají prostřednictvím adhezních molekul. Je tvořena rozmanitými makromolekulami, z nichž nejpočetnější je skupina kolagenů a skupina proteoglykanů s navázanými nevětvenými cukernými řetězci označovanými jako glykozaminoglykany. K méně početným patří elastin, lamininy a fibronektin. Hlavním zdrojem molekul mezibuněčné hmoty jsou fibroblasty. Nejdůležitějším cytokinem stimulujičím syntetickou funkci fibroblastů je TGF beta, dále IL-4, PDGF, EGF, trombin. Opačný efekt mají např. interferon gamma či prostaglandin E2, které stimulují degradační aktivity fibroblastů rozkládající molekuly mezibuněčné hmoty [2].

Nedílnou součástí reparace je obnova cévního zásobení v procesu označovaném angiogeneze. Angiogeneze je pozitivně regulována zejména C-X-C chemokiny nesoucími ELR motiv (IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, NAP2), dále VEGF a bFGF. K negativním regulátorům angiogeneze patří většina C-X-C chemokinů nenesoucích ELR motiv [14, 15].

Nádorové bujení a mechanismy protinádorové obrany

Nádorové bujení je podmíněno akumulací genetických poruch v buňce, vedoucí k aktivaci buněčných protoonkogenů a inaktivaci antionkogenů. Samotná struktura DNA je velmi náchylná k poškození. Může docházet ke spontánní dezintegraci (hydrolyzou nukleotidů, deaminací) se vznikem zlomů a provázání uvnitř řetězce, k inzerci či delecí nukleotidů s výslednou změnou smyslu kodonu. Poškození DNA může vyvolávat řada činitelů endogenního či exogenního původu. Z endogenních příčin můžeme jmenovat přítomnost vrozených genetických poruch, dále působení látek vznikajících v průběhu buněčného metabolismu např. reaktivní formy kyslíku. Jedná se o nestabilní molekuly s volnými elektrony, které iniciují oxidaci DNA. Z exogenních příčin je nutno jmenovat vliv ionizujícího záření, vliv chemických kancerogenů a infekčních procesů. Poškození genetické výbavy v průběhu života je relativně častou událostí. Proto je existence řady fylogeneticky vysoce konzervovaných opravných systémů genetické informace nutná. Vyšší etáží protinádorové obrany je potom neporušený dohled imunitního systému. Je patrné, že četnost nádorových onemocnění roste s věkem, kdy se zvyšuje počet genetických poruch a slábnou

funkce imunitního systému [16]. Dříve se předpokládalo, že ústřední úlohu v protinádorové imunitě hraje specifická buněčná cytotoxická reaktivita. Z dnešních poznatků však vyplývá, že nezastupitelnou roli má rovněž imunita přirozená. Nádorové buňky nesou na svých površích abnormálně sestavené mozaiky molekul, které jsou rozpoznávány receptory buněk přirozené imunity a solubilními složkami přirozené imunity [17]. Nádorové antigeny jsou v buňkách přirozené imunity (zejména dendritických) zpracovány a poté předkládány ve vazbě na HLA molekuly ve vhodném cytokinovém mikroprostředí a za účasti kostimulačních a adhezních interakcí specifickým T lymfocytům [5, 18, 19]. Tyto interakce potom vedou k preferenčnímu vyžívání naivních TH0 T lymfocytů, které se dosud neseťkaly s antigenem, do subpopulace TH1 T lymfocytů, která je odpovědná za cytotoxickou specifickou buněčnou reaktivitu namířenou proti nádoru. Subpopulace TH1 T lymfocytů vykazují přímou nádor likvidující aktivitu prostřednictvím produkce perforinů a granzymů, indukci apoptózy. Produkci určitého spektra cytokinů (interferon gamma, TNF alfa, IL-18, IP-10) tlumí aktivitu nádorového bujení např. cestou inhibice angiogeneze. Za selhávající protinádorovou imunitou stojí nedostatečnost jak složek přirozené tak i specifické imunity [2]. Významnou součástí protinádorové imunity jsou NK buňky (přirozené cytotoxické buňky), které identifikují nádorové buňky prostřednictvím rozmanitých receptorů. Přirozené cytotoxické buňky se podílejí na obraně proti nádorům regulačně i efektorově. Nádorové buňky jsou schopny identifikovat především zhodnocením míry exprese molekul HLA I. třídy. Změněná exprese HLA I. třídy je běžným znakem nádorových buněk [20]. Nádorová buňka je zničena cytotoxickými mechanismy (perforiny, granzymy, indukci apoptózy). Přirozené cytotoxické buňky jsou navíc významným zdrojem cytokinů s protinádorovým efektem (interferon gamma, TNF alfa) [21]. Interferony (hlavně interferon gamma) jsou molekuly produkované většinou jaderných buněk a mají antiproliferativní, cytostatický a významný imunomodulační účinek. Zvyšují expresi HLA I. třídy na nádorových buňkách a tím je zcitlivují k působení specifických cytotoxických T lymfocytů, podporují účinnější zpracování a prezentaci nádorových antigenů, zvyšují celkovou zánětlivou aktivitu namířenou proti nádoru, stimuluji fagocytární schopnosti makrofágů, neutrofilů, NK buňky, stimuluji vyžívání T lymfocytů do subpopulace TH1 a vyžívání dendritických buněk. Interferony se podílí společně s řadou dalších cytokinů na indukci apoptózy [22, 23]. V protinádorové imunitě se uplatňuje i vliv humorální specifické imunity a to buď přímým protinádorovým účinkem protilátek, či zprostředkovaně např. mechanismem na protilátce závislé cytotoxicity – protilátka obaluje nádorovou buňku a přes receptor pro Fc fragment imunoglobulinu ji poutá k efektorové buňce s cytotoxickou reaktivitou [24, 25].

Selhání těchto mechanismů může vést ke vzniku a rozvoji nádoru.

Podíl zánětlivé reakce na vzniku a rozvoji nádorového procesu

Přítomnost zánětlivé reakce v nádorovém prostředí je častým nálezem. Zánětlivá reakce může nádorovému procesu předcházet a významně se podílet na jeho vzniku a rozvoji nebo je přítomností nádoru vyvolána. Při chronickém zánětlivém procesu je uvolňována řada biologicky aktivních látek s genotoxickým a proliferaci stimulujícím účinkem – např. reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály, cyklooxygenázy, cytokiny, chemokiny, růstové faktory [26, 27]. Etiologie chronického zánětu může být infekční i neinfekční. Je udáváno, že až 15% všech tumorů vzniká na podkladě infekce [28]. Přímá souvislost mezi chronickou infekcí a následnou malignizací je prokázána např. u infekce HIV, *H. pylori*, infekce některými herpetickými viry, hepatotropními viry [29]. Pozoruhodné je, že úspěšnou eradikací infekce *Helicobacter pylori* dochází k regresi MALT B-NHL lymfomu ji vyvolaného. Existuje řada dalších neinfekčních činitelů (chemické, fyzikální faktory, autoimunitní procesy), které indukují chronický zánět s možností nádorové transformace. Typickým příkladem jsou nespecifické střevní záněty či chronická bronchitida při chronické expozici tabákovému kouři [28]. Pro vlastní nádorové mikroprostředí je charakteristická hypoxie, která je významným stimulem pro tvorbu prozánětlivých cytokinů (TNF alfa, IL-1, IL-6) a chemokinů nádorovými i stromálními buňkami. Pod vlivem chemokinů pronikají buňky imunitního systému do nádoru.

V současnosti získané poznatky o vzájemném působení nádorových buněk a imunitního systému překvapivě ukazují, že imunitní systém sehrává v protinádorové obraně protichůdné úlohy. Za určitých okolností může zánětlivá reakce, na které se imunitní systém významnou měrou podílí, podporovat růst a invazivitu nádoru [30]. Dominující leukocytární populací v nádoru jsou s nádorem asociované makrofágy, které pocházejí z cirkulujících monocytárních prekurzorů a do nádoru vstupují vlivem chemokinů, zejména MCP-1 [3]. Optimálně aktivované makrofágy (zejména interleukinem-2, interferonem, interleukinem-12) [3] by měly vykazovat cytotoxickou reaktivitu vůči nádorovým buňkám. Za určitých okolností však dochází k opačnému efektu, kdy makrofágy produkované cytokiny podporují růst nádoru, mají angiogenní potenciál a usnadňují metastatické šíření. Mikroprostředí nádoru na druhé straně prodlužuje životnost makrofágů zejména produkcí cytokinů typu kolonie stimulujících faktorů [28]. Další buněčnou populací, kterou nalézáme v zánětlivém infiltrátu

nádoru, jsou dendritické buňky. Tyto jsou obvykle nezralého fenotypu a mají tudíž sníženou schopnost stimulovat specifickou buňkami zprostředkovanou imunitu. Tato nezralost je způsobena nedostatkem maturačních signálů či produkci maturačních inhibitorů v nádorovém prostředí [28]. Pro účinnou protinádorovou obranu je důležitá specifická cytotoxická reaktivita zprostředkovaná subpopulací TH1 T lymfocytů. Subpopulace TH1 T lymfocytů vykazuje přímou protinádorovou aktivitu a navíc produkuje spektrum cytokinů inhibujících angiogenezu (interferon gamma, TNF alfa, IL-18, IP-10). U většiny studovaných nádorů však lokálně převládá aktivita subpopulace TH2 T lymfocytů, která vychyluje imunitní reakci k humorální odpovědi a k produkci spektra proangiogenních cytokinů (IL-4, IL-13), či aktivita subpopulace regulačních Tr T lymfocytů, která produkuje zejména cytokiny TGF beta a IL-10. Obě tyto subpopulace (TH2 a Tr) tlumí žádoucí protinádorovou aktivitu subpopulace TH1 T lymfocytů. Na vychýlení imunitní reakce směrem k TH2 reaktivitě se podílejí rovněž s nádorem asociované makrofágy vysokou spontánní produkcí IL-10 a TGF beta [2]. Zastoupení neutrofilních granulocytů v zánětlivém infiltrátu je zanedbatelné, obdobné platí i pro NK buňky. Účinek jednoho z nejvýznamnějších prozánětlivých cytokinů TNF alfa není rovněž jednoznačně protektivní v protinádorové obraně. Vysoké lokální koncentrace TNF alfa sice ničí cévní zásobení nádoru, ovšem chronická produkce nízkých hladin TNF alfa stimuluje remodelaci a proliferaci stromatu, která je nezbytná pro růst a šíření nádoru. TNF alfa je produkován opět jak nádorovými, tak stromálními a zánětlivými buňkami [2]. U dalších pluripotentních prozánětlivých cytokinů byl nalezen jejich podpůrný vliv pro růst nádorových buněk – např. IL-6 je růstovým faktorem pro hematologické malignity, IL-1 pro karcinom žaludku [28].

Růst a šíření nádoru jsou spojeny s pronikáním nádorových buněk mezibuněčnými prostory. Proliferující nádorové buňky narušují normální architekturu tkáně. Na rozdíl od normálních zdravých buněk, které jsou udržovány ve své přirozené tkáni prostřednictvím membránových interakcí a lokálním působením cytokinů, se nádorové buňky z těchto kontaktů vymaňují. Pro nádorové buňky je typické, že ztráta adheze k molekulám mezibuněčné hmoty v nich nevyvolává apoptózu v takové míře, jako je tomu u buněk nenádorových. Molekuly mezibuněčné hmoty jsou rozkládány proteolytickými enzymy (hlavně matrixovými metaloproteinázami, serinovými proteinázami), jejichž zdrojem jsou samotné nádorové buňky, ale také buňky nádorového stromatu a zánětlivého infiltrátu. Významným stimulem produkce proteináz jsou tumor nekrotizující faktory a CC chemokiny [28]. Rozkladem mezibuněčné hmoty na rozhraní nádoru a zdravé tkáně dochází k uvolnění řady cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, podporujících růst a šíření nádoru.

Charakteristickým rysem maligních nádorů je schopnost metastazovat do vzdálených orgánů. Nádorové buňky využívají pro migraci stejné molekulové nástroje (adhezni molekuly, cytokiny, chemokiny, chemokinové receptory) a cesty jako leukocyty [28]. Podstatou metastatického šíření nádorových buněk je opuštění stromatu primárního nádoru, vstup prostřednictvím adhezni interakcí s cévním endotelem do krevního či lymfatického řečiště a následné zachycení v cílovém orgánu. Pohyblivost nádorových buněk je dána jejich citlivostí k různým chemotaktickým látkám, které působí přes chemokinové receptory na nádorových buňkách, a dále určitým uspořádáním cytoskeletu, které rovněž podléhá vlivu některých chemokinů. Určité typy nádorů vykazují specifitu cílových orgánů, do kterých metastazují. Tato specifita je dána vyšší citlivostí vůči chemokinům a růstovým faktorům, které produkuje daný cílový orgán, zvýšenou schopností nádorových buněk adherovat k mikrovaskulárním endotelovým buňkám cílového orgánu [31].

Základní podmínkou růstu nádoru je zajištění dostatečného cévního zásobení novotvorbou cév v procesu zvaném angiogeneze. Přítomnost a intenzita angiogeneze je nezávislým negativním prognostickým faktorem většiny solidních nádorů [25]. Neovaskularizace solidních nádorů je stimulována prozánětlivými cytokiny zánětlivého infiltrátu (TNF alfa, IL-1, IL-6), jejichž prostřednictvím je zvyšována tvorba angiogenních faktorů jako VEGF či TGF alfa. Významný angiogenní potenciál mají také některé chemokiny (IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, ENA-78). U některých solidních nádorů je možné zjistit zvýšené plazmatické hladiny angiogenních růstových faktorů (TGF alfa, VEGF, PDGF beta, bFGF) [13, 32, 33, 34].

U pacientů s nádorem nacházíme navíc často abnormality v systémové zánětlivé odpovědi, vyplývající ze dvou odlišných nádorem zprostředkovaných mechanismů. Prvním mechanismem je porucha regulace produkce protizánětlivých cytokinů, druhým je znečitlivění receptorů vysokou koncentrací produkovaných cytokinů a chemokinů, které v důsledku vede k oslabení systémové imunitní odpovědi [2].

Seznam použitých zkratek:

EGF	Epithelial Growth Factor
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating-78
FGF	Fibroblast Growth Factor
GRO	Growth Related Oncogene
IGF	insuline-like-Growth Factor
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma Inducible Protein
MCP	Macrophage Chemoattractant Protein
MDC	Macrophage-Derived Chemokine
Mig	Monokine-induced by Interferon gama
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NAP	Neutrophil Activating Protein
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
TGF	Transforming-Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2. Cíle práce

V průběhu naší výzkumné práce jsme posuzovali sérové koncentrace deseti vybraných cytokinů, v převážné většině chemokinů s angiogenním potenciálem, v souboru pacientů s nově diagnostikovaným renálním adenokarcinomem. Sledovanými cytokiny byly: angiogenin, MCP-1 (CCL2), GRO alfa (CXCL1), interleukin-8 (CXCL8), ENA-78 (CXCL5), endoglin (CD105), interleukin-6, TGF-beta1, VEGF a bFGF. Sérové hladiny sledovaných cytokinů byly stanoveny opakovaně v přesně daných časových intervalech. První odběr byl uskutečněn před započítím terapie (v den operace před jejím zahájením), druhý odběr s odstupem 7 dnů, třetí, čtvrtý a pátý odběr byly provedeny s odstupem 3, 6 a 12 měsíců od operace. Současně byla shromážděna a hodnocena některá klinická data (věk, pohlaví, histopatologický grading tumoru, progresse onemocnění, smrt v průběhu sledování, přítomnost nádorové duplicity). Sledovaný soubor pacientů byl rozdělen do 3 skupin dle pokročilosti primárního tumoru na základě TNM klasifikace: 1. skupina – klinické stádium I+II, 2. skupina – klinické stádium III, 3. skupina – klinické stádium IV.

Hlavní cíle práce:

- posouzení sérové koncentrace vybraných cytokinů před zahájením terapie
- posouzení vývoje sérové koncentrace cytokinů v čase
- posouzení meziskupinových rozdílů v sérových koncentracích jednotlivých cytokinů
- posouzení meziskupinových rozdílů ve vybraných klinických parametrech
- posouzení vztahu mezi vybranými klinickými parametry a sérovou koncentrací vybraných cytokinů.

3. Soubor pacientů a použitá metodika

3.1. Soubor pacientů

Soubor pacientů byl tvořen 54 osobami, které byly hospitalizovány na Urologické klinice FN Hradec Králové z důvodu chirurgického řešení nově diagnostikovaného adenokarcinomu ledviny (C64) v období od února 2005 do února 2007. Průměrný věk pacientů činil 64 let (muži 63.1 let, ženy 65.8 let), mužů v souboru bylo 34 (63%), žen 20 (37%). Dle histopatologického vyšetření byl adenokarcinom ledviny zastoupen ve 49 případech světlobuněčným (konvenčním) typem, ve 3 případech papilárním typem, po jednom případě chromofóbním a sarkomatoidním typem. Dle TNM klasifikace bylo stanoveno klinické stádium onemocnění. Do stádia I spadalo 23 pacientů, do stádia II 2 pacienti, do stádia III 16 pacientů a do stádia IV 13 pacientů. Na základě klinického stádia byli pacienti rozděleni do 3 hodnocených skupin: v první skupině pacienti se stádiem I a II, ve 2. skupině pacienti stádia III a ve 3. skupině pacienti stádia IV. Další charakteristiky souboru (histopatologický grading, přítomnost nádorové duplicity, nástup progresse eventuelně smrt pacienta v průběhu sledování, podávaná adjuvantní terapie) jsou uvedeny v následujících tabulkách (č. 1, 2, 3).

Tabulka č. 1: Klinické charakteristiky – 1. skupina pacientů

Klinické charakteristiky - 1. skupina (klinické stádium I-II)												
Č.	Pohlaví	Věk	Histologie	Stádium	T	N	M	Grading	Progrese	Smrt	Duplicita	Adjuvantní terapie
1	Ž	78	1	I	1a	0	0	II	0	0	1	
2	Ž	73	1	I	1a	0	0	II	0	1	0	
3	M	57	1	I	1a	0	0	III	0	0	0	
5	Ž	53	1	II	2	0	0	II	0	0	0	
8	M	56	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
14	Ž	76	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
16	Ž	70	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
23	M	61	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
25	M	65	2	I	1b	0	0	II	0	0	0	
26	Ž	74	1	I	1b	0	0	III	1	0	0	interferon alfa
30	M	55	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
31	M	76	1	I	1a	0	0	II	0	0	1	
32	M	66	1	I	1b	0	0	II	0	0	0	
34	M	58	1	I	1b	0	0	II	0	0	0	
36	M	73	1	I	1b	0	0	II	0	0	1	
38	M	62	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	
39	M	50	1	I	1b	0	0	III	0	0	0	
41	M	78	1	I	1b	0	0	II	0	0	0	
43	M	58	1	I	1b	0	0	III	0	0	0	
48	Ž	62	1	I	1b	0	0	II	0	0	0	
56	Ž	63	1	II	2	0	0	III-IV	0	0	0	
60	Ž	66	1	I	1b	0	0	III	0	0	0	
61	M	63	1	I	1a	0	0	II	0	0	1	
63	M	73	1	I	1a	0	0	I	0	0	0	
67	Ž	74	1	I	1a	0	0	II	0	0	0	

Ž - žena
M - muž

1 světlob.
2 papilární
3 chromof.
4 sarkomat.

0 ne
1 ano
0 ne
1 ano
0 ne
1 ano

Tabulka č. 2: Klinické charakteristiky – 2. skupina pacientů

Klinické charakteristiky - 2. skupina (klinické stádium III)												
Č.	Pohlaví	Věk	Histologie	Stádium	T	N	M	Grading	Progrese	Smrt	Duplicita	Adjuvantní terapie
4	M	66	1	III	3b	0	0	II	0	0	0	
11	M	76	1	III	3a	0	0	III	0	0	0	
13	M	57	1	III	3a	0	0	III	0	0	1	
15	Ž	31	3	III	3a	0	0	I	0	0	0	
35	Ž	76	1	III	3a	0	0	III-IV	0	0	0	
42	Ž	66	1	III	3a	0	0	II	0	0	0	
44	Ž	73	1	III	3b	0	0	III	0	0	0	
45	M	75	1	III	3a	0	0	II	0	0	0	
51	Ž	46	1	III	3a	0	0	I	0	0	0	
54	Ž	82	1	III	3a	0	0	III	0	0	0	
55	M	64	1	III	3b	0	0	II	0	0	0	
57	M	56	1	III	3a	0	0	III	1	0	0	interferon alfa
62	Ž	50	1	III	3a	0	0	II	0	0	0	
65	M	40	1	III	3a	0	0	II	0	0	0	
68	M	71	1	III	3a	0	0	III-IV	0	0	0	
71	M	65	1	III	3a	0	0	III	1	0	0	
Ž - žena			1 světlob.						0 ne	0 ne	0 ne	
M - muž			2 papilární						1 ano	1 ano	1 ano	
			3 chromof.									
			4 sarkomat.									

Tabulka č. 3: Klinické charakteristiky – 3. skupina pacientů

Klinické charakteristiky - 3. skupina (klinické stádium IV)												
Č.	Pohlaví	Věk	Histologie	Stádium	T	N	M	Grading	Progrese	Smrt	Duplicita	Adjuvantní terapie
9	M	64	1	IV	3a	2	1	III	1	1	0	
10	M	74	1	IV	4	0	1	III-IV	0	0	0	interferon alfa, bevacizumab, sunitinib
20	M	56	1	IV	3b	0	1	II	1	1	0	
28	Ž	71	4	IV	3a	0	1	III	1	1	0	interferon alfa
29	Ž	69	1	IV	3b	2	0	III-IV	0	0	1	
33	M	53	2	IV	3a	2	0	III	1	1	0	interferon alfa
40	M	77	1	IV	3a	X	1	III	1	1	0	
47	M	72	1	IV	3a	1	1	III	1	1	0	
49	Ž	62	1	IV	1a	0	1	II	1	1	0	
53	M	44	1	IV	3c	0	1	III-IV	1	1	0	
59	M	68	2	IV	3a	X	1	III	0	0	0	interferon alfa, vinblastin
64	M	51	1	IV	3b	1	1	III	1	0	0	interferon alfa, sorafenib, medroxyprogesteron acetat
73	M	64	1	IV	1a	0	1	II	0	0	0	
Ž - žena			1 světlob.						0 ne	0 ne	0 ne	
M - muž			2 papilární						1 ano	1 ano	1 ano	
			3 chromof.									
			4 sarkomat.									

3.2. Laboratorní metodika

K stanovení sérových koncentrací vyšetřovaných markerů a jejich hodnocení v čase byli pacienti podrobeni opakovaným odběrům venózní krve z periferní žíly v přesně stanovených časových intervalech. 1. odběr byl proveden v den operace před jejím zahájením, druhý odběr s odstupem 1 týden, třetí odběr s odstupem 3 měsíců, čtvrtý odběr s odstupem 6 měsíců a pátý odběr s odstupem 12 měsíců. Odebrané vzorky krve byly po 1 hodině zcentrifugovány při 3000 rpm po dobu 10 minut, séra zmražena při -20°C a takto uchována až do doby jejich zpracování. Stejným způsobem byly zpracovány a uchovány kontrolní vzorky 15 dárců krve. Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě. Stanovení koncentrací vybraných cytokinů (Angiogenin, MCP-1 (CCL2), GRO alfa (CXCL1), IL-8 (CXCL8), ENA-78 (CXCL5), Endoglin (CD105), IL-6, TGF-beta1, VEGF, bFGF) bylo provedeno metodou ELISA s využitím reagensí firmy R&DSystems. Výsledné hodnoty byly odečteny na spektrofotometru při vlnové délce doporučené výrobcem.

3.3. Statistické hodnocení

Ke statistickému zhodnocení výsledků byl použit statistický software Statistica 7. Aplikovány byly následující metody:

- nepárový t-test
- Fisherův exaktní test
- Mann-Whitneyův test
- Kolmogorov-Smirnovův test
- Friedmanova ANOVA
- Wilcoxonův párový test
- Kruskal-Wallisova ANOVA
- při vícenásobném porovnání byla výsledná p hodnota upravena Bonferroniho korekcí.

4. Souhrn výsledků

Cílem této práce bylo posouzení sérové koncentrace deseti vybraných cytokinů u pacientů s diagnózou renálního adenokarcinomu (C64). Sledovány byly tyto cytokiny: angiogenin, MCP-1 (CCL2), GROalfa (CXCL1), interleukin-8 (CXCL8), ENA-78 (CXCL5), endoglin (CD105), interleukin-6, TGF-beta1, VEGF a bFGF. Prvním úkolem bylo stanovení sérových koncentrací těchto cytokinů před zahájením léčby. Poté nás zajímal vývoj sérových koncentrací těchto cytokinů v čase v závislosti na provedeném operačním výkonu, na hojení pooperační rány a na dalším průběhu onemocnění. Rozdělením pacientů do 3 skupin dle klinického stádia onemocnění jsme chtěli posoudit vliv velikosti tumoru na hladinu sledovaných cytokinů. V neposlední řadě jsme se pokusili zhodnotit některá klinická data jako věk, pohlaví, histopatologický grading tumoru, přítomnost nádorové duplicity, progresi onemocnění a případnou smrt pacienta.

Vliv přítomnosti tumoru na hladinu sledovaných cytokinů jsme hodnotili v 1. odběru před zahájením léčby. Naměřené sérové koncentrace cytokinů byly srovnány s hodnotami získanými od skupiny zdravých dárců krve. Hodnocení bylo provedeno zvlášť pro jednotlivé skupiny pacientů. Statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině zdravých dárců jsme našli u následujících cytokinů: zvýšení sérových koncentrací bylo patrné u angiogeninu (v 1. skupině), u ENA-78 (v 1. skupině), u IL-6 (v 1., 2. i 3. skupině), u VEGF (ve 3. skupině), naopak snížení sérových koncentrací jsme pozorovali u IL-8 (v 1., 2. i 3. skupině), endoglinu (v 1., 2. a hraničně i ve 3. skupině) a hraničně u TGF-beta1 (ve 2. a 3. skupině).

Pooperační vývoj hladin cytokinů byl sledován v následujících 4 odběrech, provedených s odstupy 1 týdně, 3 měsíců, 6 měsíců a 12 měsíců od operace. Porovnání hladin cytokinů v čase bylo možné pouze v rámci 1. skupiny pacientů, neboť u 2. a 3. skupiny nebyl dostatečný počet vzorků pro statistické zhodnocení. Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali pouze u 3 hodnocených cytokinů. U GRO alfa došlo k statisticky významnému vzestupu hladiny v odběru 2 ve srovnání s odběrem 1, u IL-6 obdobně statisticky významný vzestup hladiny ve 2. odběru ve srovnání s 1. odběrem, u bFGF statisticky významné zvýšení hladiny ve 2. odběru a snížení ve 4. a 5. odběru ve srovnání s 1. odběrem.

Vedle těchto statisticky významných rozdílů byly však patrné určité vývojové tendence prakticky u všech ostatních cytokinů (angiogeninu, MCP-1, ENA-78, endoglinu, TGF-beta1, VEGF) a to nejenom u 1. skupiny pacientů, ale většinou i u 2. a 3. skupiny.

Meziskupinovým srovnáním sérových hladin cytokinů jsme chtěli odhalit souvislost mezi rozsahem primárního tumoru a hladinou těchto cytokinů. Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali převážně mezi 1. a 3. skupinou pacientů. Statisticky významně zvýšeny byly: MCP-1, GRO alfa, VEGF u 3. skupiny v odběru 5, dále IL-6, IL-8, VEGF, bFGF u 3. skupiny v odběru 1, dále IL-8 u 3. skupiny v odběru 2, vše ve srovnání s 1. skupinou. Statisticky významný rozdíl mezi skupinou 2 a 3 jsme zaznamenali u VEGF, kde hodnota 1. odběru byla u 3. skupiny statisticky významně vyšší než u 2. skupiny. Naopak statisticky významně sníženou hodnotu u 3. skupiny ve srovnání s 1. skupinou jsme našli u ENA-78 ve 4. odběru.

Dle našeho pozorování by pokročilejší stádia renálního adenokarcinomu mohla být spojena s vyššími hladinami MCP-1, GRO alfa, VEGF, IL-6, IL-8, bFGF.

Klinická data byla zhodnocena jednak ve vztahu ke klinickému stádiu onemocnění a vybrané klinické parametry (progrese onemocnění, smrt pacienta v průběhu sledování, histopatologický grading tumoru) také ve vztahu k vybraným laboratorním datům. Statisticky významné meziskupinové rozdíly jsme neprokázali u věku, pohlaví a výskytu nádorové duplicity, naopak statisticky významné rozdíly jsme dle očekávání našli u progrese a smrti mezi 1. a 3. skupinou a mezi 2. a 3. skupinou pacientů. 1. a 3. skupina pacientů se statisticky významně lišily také v zastoupení jednotlivých stupňů histopatologického gradingu.

K porovnání klinických dat s daty laboratorními byly vybrány pouze ty parametry, u kterých jsme dříve zjistili statisticky významné meziskupinové rozdíly. Z klinických dat se jednalo o progresi onemocnění, smrt pacient a histopatologický grading, z laboratorních parametrů byly meziskupinové rozdíly přítomny u MCP-1, GRO alfa, interleukinu-8, ENA-78, interleukinu-6, VEGF a bFGF. Pacienti, u kterých došlo v průběhu sledování k progresi onemocnění, měli předoperačně vyšší hladiny GRO alfa, IL-8, IL-6, VEGF a bFGF. Pacienti, kteří v průběhu sledování zemřeli, měli předoperačně vyšší hladiny GRO alfa, IL-6 a VEGF. Se 4. stupněm HPG byly spojeny vyšší hladiny GRO alfa (ve srovnání s 1., 2. i 3. stupněm) a IL-6 (ve srovnání se stupni 1 a 2). 3. stupeň HPG byl spojen s nižší sérovou hladinou ENA-78 (ve srovnání s 2. stupněm).

5. Závěr

Zjištěné statisticky významné rozdíly v sérových koncentracích některých cytokinů je třeba interpretovat s velkou obezřetností. Poměrně nízký počet hodnocených vzorků a tím i volba slabších neparametrických testů ke statistickému zpracování nám neumožňuje zobecňovat dosažené výsledky. K jejich potvrzení by bylo třeba rozšířit vyšetřovaný soubor pacientů.

6. Summary

Introduction

An inflammatory process is a defence reaction of an organism on various external and internal injurants. Many body systems take place in this formation and development, but the immune system plays the central role. The inflammatory reaction is characterised by the sequent connecting of various cell types. There are three distinct phases – initiatory, high and reparation. The aim of the inflammatory reaction is the removal of the injurant and the reparation of damaged tissue. The effect of the inflammatory reaction needn't be protective. Should there be an abnormal regulation this may be a cause of many pathological states, including a tumorous process. The presence of an inflammatory reaction in the tumorous environment is a common finding. The cells of the inflammatory infiltrate can loose their original protective antitumorous role. By contrast they may support the growth and progression of the tumor by the production of many biological substances (cytokines, chemokines, growth factors).

Patients and Methods

Renal cell carcinoma was diagnosed in 54 patients during the period from February 2005 till February 2007. In all the patients the primary renal tumor was removed at the Department of Urology of University Hospital in Hradec Králové. The clinical specifications e.g. age (an average age of 64 years – 63.1 years in men, 65.8 years in women), sex (34 men – 63 per cent, 20 women – 37 per cent), histopathological type and cellular grading of the tumor, disease stage based on TNM classification, presence of the tumor duplicity, appearance of the tumor progression and death during the course of our observation and adjuvant therapy, are summarized in Table 1, 2, 3. According to disease stage patients were divided into three groups: in the first group patients of stages I+II, in the second group patients of stage III, in the third group patients of stage IV.

Patient sera were obtained by repeated peripheral venous blood collections, which were carried out on the day of surgery as well as on day 7 and then after 3, 6 and 12 months post-surgery. One hour after blood collection, each blood sample was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Sera were subsequently stored at a temperature of -20°C till the time of processing. Control sera were obtained from 15 healthy blood donors. In order to determine the serum level of the evaluated cytokines, the ELISA method of the R&D Systems kits, was used.

Statistical analysis was performed with Statistica 7 software. Probability values of <0.05 were considered statistically significant.

Aim of the study

The aim of this study was an examination of the serum concentration of ten cytokines in renal cell carcinoma patients (C64). The following cytokines were observed: angiogenin, MCP-1 (CCL2), GRO alfa (CXCL1), interleukin-8 (CXCL8), ENA-78 (CXCL5), endoglin (CD105), interleukin-6, TGF-beta1, VEGF a bFGF. The first objective was to measure the serum concentrations of the cytokines before the commencement of therapy. The second objective was to examine the development of the cytokines' serum concentrations, depending on surgery, the healing of postoperative wound and subsequent course of the disease. Patients were divided into three groups according to clinical stage of the disease in order to examine the influence of the size of the tumor on cytokine serum levels. Finally, we evaluated clinical data, such as age, gender, grading of the tumor, presence of the tumor duplicity, progression of the disease and the death of patient.

Results

The effect of the tumor presence on the serum levels of the cytokines was assessed in the first sample, which was collected before surgery. The acquired values were compared with others gained from healthy blood donors. Statistically significant differences, in comparison with the group of healthy blood donors, were found in the following cytokines: an increase of serum concentrations was observed in angiogenin (in the first group of patients), in ENA-78 (in the first group of patients), in interleukin-6 (in the first, second and third group of patients), in VEGF (in the third group of patients). By contrast, a decrease of serum concentrations was observed in interleukin-8 (in the first, second and third group of patients), in endoglin (in the first and second group, the

third group reached a statistical borderline) and in TGF-beta1 (the second and third group of patients reached a statistical borderline).

The postoperative development of the cytokine levels was assessed in the following four samples, which were collected one week, 3 months, 6 months and 12 months after surgery. The comparison of the serum concentrations of cytokines during the experiment was only possible in the first group of patients, because there was not a sufficient number of samples in the second and third group of patients. Statistically significant differences were observed in only 3 cytokines. A statistically significant increase in the second sample (one week after surgery) was observed in comparison with the preoperative level in GRO alfa and interleukin-6. In bFGF a significant increase in the second sample was found as well as a significant decrease in the fourth and fifth samples in comparison with the first.

Aside from these significant differences, certain trends of development of serum levels were seen in practically all other cytokines (angiogenin, MCP-1, ENA-78, endoglin, TGF-beta1, VEGF), in all groups.

In comparing cytokine serum concentrations among groups of patients, we wanted to detect the relationship between the size of the prime tumor and the cytokine level. Statistically significant differences were found mainly between the first and the third group of patients. MCP-1, GRO alfa and VEGF were statistically significantly increased in the fifth sample, interleukin-6, interleukin-8, VEGF and bFGF in the first sample and interleukin-8 also in the second sample; all in the third group in comparison with the first group. A statistically significant increase of VEGF was seen in sample 1 in the third group in comparison with the second group. A decreased level of ENA-78 was found in the fourth sample of the third group in comparison with the first group.

According to our observations, the latter stages of renal cell carcinoma may be connected with higher levels of MCP-1, GRO alfa, VEGF, IL-6, IL-8, bFGF.

The clinical data was evaluated in relation to clinical stages of the disease. Additionally, a selection of data (progression of the disease, the death of patients and histopathological grading of the tumor) was evaluated also in relation to some laboratory data. In age, gender and tumor duplicity we did not prove any difference amongst groups of patients. However, we did find significant differences in the progression and death rates between the first and third group and between the second and third group. The first and the third group of patients also displayed various grades of the histopathological grading.

In order to compare clinical and laboratory data we chose only those which differed among the groups of patients – progression of the disease, the death, histopathological grading, MCP-1, GRO alfa, interleukin-8, ENA-78, interleukin-6, VEGF and bFGF. The patients, who showed a progression of the disease, had higher preoperative levels of GRO alfa, IL-8, IL-6, VEGF and bFGF. The patients, who died, had higher preoperative levels of GRO alfa, IL-6 and VEGF. The fourth grade of histopathological grading was connected with higher levels of GRO alfa (in comparison with the first, second and third grade) and IL-6 (in comparison with the first and second grade). The third grade of histopathological grading was connected with a lower level of ENA-78 (in comparison with the second grade).

Conclusion

The obtained statistically significant differences must be interpreted very carefully. The relatively low number of evaluated samples and the subsequent choice of weaker nonparametric statistical tests make generalization difficult. A far greater number of patients would be required for a more statistically accurate confirmation of our results.

7. Použitá literatura

1. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic response to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-454.
2. Krejsk J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK 2004; 385-405, 541-566.
3. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
4. Scimone ML, Lutzki VP, Zittermann SI et al. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunol* 2005; 114: 375-385.
5. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
6. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 129-135.
7. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A et al. Chemokines and dendritic cell traffic. *J Clin Immunol* 2000; 20: 151-160.
8. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713-7.
9. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and T helper 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 875-883.
10. Tang H, Cyster J. Chemokine upregulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999; 284: 819-822.
11. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* 2006; 107: 317-327.
12. Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 149-159.
13. Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M et al. Angiogenic end angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47: 149-161.
14. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
15. Klener P. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén 2002; 223-230.
16. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374.
17. Soloski MJ. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 154-162.
18. Caux C, Liu YJ, Banchereau J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol Today* 1995; 16: 2-4.
19. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 588-94.
20. Moretta A, Bortino C, Vitale M et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619-48.
21. Kos FJ. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol Res* 1998; 17: 303-12.
22. Bukowski RM, Rayman P, Molto L et al. Interferon- γ and CXC Chemokine Induction By Interleukin 12 in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2780-2789.
23. Tsung K, Dolan JP, Tsung YL et al. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res* 2002; 62: 5069-75.
24. Lukešová Š, Kopecký O. Protinádorová imunitní odpověď. *Alergie* 2007; 3: 241-244.
25. Wang JM, Su S, Gong W et al. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28: 83-90.
26. Hofseth LJ. Inflammation, Cancer and Targets of Ginseng. *J Nutr* 2007; 137: 183-185.
27. O'Byrne KJ, Dalgleish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Brit J Cancer* 2001; 85(4): 473-483.
28. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
29. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Int Med* 2000; 248: 171-183.
30. Wang JM, Deng X, Gong W et al. Chemokines and their role in tumor growth and metastasi. *J Immunol Methods* 1998; 220: 1-17.
31. Schoppman SF, Birner P, Stöckl J et al. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 16: 947-956.
32. Mudroch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious disease. *Blood* 2000; 95: 3032-3043.
33. O'Byrne KJ, Dalgleish AG, Browning MJ et al. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000; 36: 151-169.

34. Raman D, Baugher PJ, Thu YM et al. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters* 2007; 256: 137-165.

8. Publikace uchazečky

8.1. Původní vědecké práce

Kopecný O., Lukešová Š., Hlávková D., Slezák R.: Diagnostické a léčebné možnosti klinické imunologie. Folia Parodontologica Bohemica 2005; 1(0): 12-13.

Lukešová Š., Kopecný O., Dvořák J., Špriňar Z., Hlávková D.: Interferon alfa v léčbě metastazujícího renálního karcinomu. Interní Medicína 2006; 10: 432-438.

Kopecný O., Lukešová Š., Vroblová V., Vokurková D., Morávek P., Šafránek H., Hlávková D., Souček P.: Phenotype analysis of tumour – infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma. Acta Medica HK 2007; 50(3):207-212.

Lukešová Š., Kopecný O., Dvořák J., Špriňar Z., Hlávková D.: IFNa v léčbě solidních nádorů (renálního karcinomu a melanomu). Farmakoterapie 2007; 2: 167-176.

Hlávková D., Kopecný O., Lukešová Š.: Zánětlivá reakce a její význam v průběhu tumorózního procesu. Vnitřní lékařství (přijato do tisku).

Hlávková D., Kopecný O., Lukešová Š., Vroblová V., Andrýs C., Morávek P., Podhola M., Vokurková D., Šafránek H.: Monitoring of serum levels of angiogenin, ENA-78 and GRO chemokines in patients with renal cell carcinoma (RCC) in the course of the treatment. Acta Medica (Hradec Králové) (upraveno dle požadavků recenzentů).

Lukešová Š., Vroblová V., Hlávková D., Kopecný O., Vokurková D., Morávek P., Šafránek H., Souček P.: Sledování protinádorové buněčné imunitní odpovědi u nemocných s renálním karcinomem, porucha proliferace T-lymfocytů. Vnitřní lékařství 2008; 54(2): 139-145.

Lukešová Š., Kopecný O., Vroblová V., Hlávková D., Andrýs C., Morávek P., Šafránek H.: Angiogenin, PDGF and MCP-1 serum levels in patients with RCC after the surgical removal. Folia Biologica (přijato do tisku) IF=0,351.

8.2. Přehledové práce

Prausová D., Krejsek J., Žák P., Voglová J., Belada D.: Význam imunofenotypového vyšetření v diagnostice B-lymfoproliferativních onemocnění. Vnitřní lékařství 2004; 1: 45-53.

Lukešová Š., Kopecný O., Dvořák J., Hlávková D., Vroblová V.: Nádorová angiogeneze. Vnitřní lékařství 2006; 52(9): 797-800.

Lukešová Š., Kopecný O., Fridrichová P., Hlávková D.: Nádorové bujení – genetický základ a imunitní odpověď. Medicína pro promoci 2006; 7(6): 65-70.

Lukešová Š., Kopecný O., Dvořák J., Hlávková D.: Angiogeneze u renálního karcinomu. Interní medicína pro praxi 2007; 1: 21-27.

Lukešová Š., Kopecný O., Hlávková D., Vroblová V.: Protinádorová imunitní odpověď. Alergie 2007; 3: 241-244.

8.3. Abstrakta

Lukešová Š., Kopecný O., Vroblová V., Andrýs C., Hlávková D.: Monitoring of serum levels of angiogenin, PDGF and MCP-1 in patients with renal cell carcinoma in the course of the treatment. Poster. ECCO XIV. The

European Cancer Conference. Barcelona, 23.-27.9.2007. EJC Supplements, 2007; 5(4). Abstrakt book, Barcelona, 2007; 310. ISSN 1359-6349. IF 4,167

Kopecký O., Lukešová Š., Vroblová V., Andrys C., Morávek P., **Hlávková D.**, Podhola M., Vokurková D., Šafránek H.: Serum levels of angiogenin, ENA-78 and GRO chemokines in patients with renal carcinoma in the course of the treatment. Poster. ECCO XIV. The European Cancer Conference. Barcelona, 23.-27.9.2007. EJC Supplements, 2007; 5(4). Abstrakt book, Barcelona, 2007; 310. ISSN 1359-6349. IF 4,167

Lukešová Š., Kopecký O., Vroblová V., Andrys C., **Hlávková D.**, Morávek P., Šafránek H.: Sledování hladiny IL-8, PDGF a leptinu u nemocných s renálním karcinomem v průběhu chirurgické léčby. In: Edukační sborník z XXXII. Brněnských onkologických dnů s XXII. Konferencí pro sestry a laboranty, 17.-19.4.2008. Ed.: Žaloudík, J., et al., vyd. Masarykův onkologický ústav, Brno, 2008; 92-94. ISBN 978-9780-86793-11-5.