

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Klinika onkologie a radioterapie**

**Sledování markerů angiogeneze u nemocných s renálním  
karcinomem a jejich klinické využití**

**MUDr. Šárka Lukešová**

**Disertační práce**

**Hradec Králové- 2008**

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Klinika onkologie a radioterapie**

**Sledování markerů angiogeneze u nemocných s renálním karcinomem  
a jejich klinické využití**

**MUDr. Šárka Lukešová**

**Disertační práce**

**Školitel: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, PhD.**

**Práce vznikla s podporou grantu výzkumného záměru IGA MZ ČR: NR/8914-4.**

**Hradec Králové- 2008**

OBSAH.....	1
PODĚKOVÁNÍ.....	5
ZKRATKY POUŽÍVANÉ V DALŠÍM TEXTU.....	6
CÍLE PRÁCE.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. NÁDOROVÉ BUJENÍ .....	9
2.1. Kancerogeneze.....	9
3. VZTAH IMUNITNÍHO SYSTÉMU A NÁDOROVÉHO BUJENÍ .....	12
3.1. Úloha přirozené imunity.....	12
3.2. Specifická protinádorová imunita.....	13
3.3. NK buňky.....	14
3.4. Interferonový systém .....	14
3.5. Imunitní reakce humorálního typu.....	15
3.6. Příčiny selhání imunitních obranných mechanismů .....	16
4. ANGIOGENEZE A VASKULOGENEZE .....	17
4.1. Fáze angiogeneze.....	18
4.1.1. Iniciační fáze angiogeneze.....	18
Vasodilatace a permeabilita.....	18
Cévní destabilizace a degradace matrix.....	19
Proliferace a migrace endoteliálních buněk.....	19
4.1.2. Konsolidační fáze angiogeneze.....	20
Formování lumen cévy a cévní stabilizace.....	20
4.2. Regulace angiogeneze.....	20
4.2.1. Angiogenní faktory.....	20
Růstový faktor cévních endotelií (VEGF) .....	20
Fibroblastový růstový faktor (FGF).....	23
Angiopoetiny.....	24
Destičkový růstový faktor (PDGF).....	25
Transformující růstový faktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	26
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	27
Angiogenin.....	27
Integriny.....	28

VE-cadherin.....	29
Plateled endothelial cell adhesion molekule 1 (PECAM).....	29
Epidermální růstový faktor (EGF) .....	30
Transformující růstový faktor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) .....	30
Jiné stimulatory angiogeneze.....	30
Matrix metaloproteázy (MMPs).....	31
4.2.2. Angiostatické faktory.....	32
Angiostatin.....	32
Endostatin.....	32
Trombospondin (TSP) .....	33
Pigment epithelium-derived factor (PEDF).....	34
5. NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE.....	34
6. CHEMOKINY.....	37
6.1. Chemokiny a jejich receptory.....	37
6.2. Nomenklatura chemokinů.....	37
6.3. Role chemokinů a jejich receptorů v nádorové biologii, angiogenezi a angiostáze .....	38
6.4. Angiogenní (ELR+) CXC chemokiny.....	39
6.5. Angiostatické (ELR-) CXC chemokiny.....	42
7. KARCINOM LEDVINY .....	45
7.1. Von Hippel-Lindau (VHL) nemoc .....	45
7.2. Angiogeneze u RCC .....	46
7.3. Terapie RCC.....	47
7.3.1. Úloha nefrektomie .....	47
7.3.2. Imunoterapie .....	47
7.3.3. Terapeutické perspektivy.....	50
7.3.4. Antiangiogenní léčba u RCC .....	51
Thalidomid.....	52
Bevacizumab (Avastin).....	53
Erlotinib (Tarceva).....	53
SUI1248 (Sunitinib, Sutent).....	54
BAY 43-9006 (Sorafenib, Nexavar).....	55
AG-013736 (Axitinib).....	56

GW 780604 (Pazopanib).....	57
mTOR inhibitory.....	58
Gefitinib (Irresa) a erlotinib.....	59
Cetuximab (Erbix) .....	59
ABX-epidermal growth factor (ABX-EGF).....	59
CI -1040.....	60
Neovastat (AE-941).....	60
PTK 787/ZK222584 (Vatalanib).....	60
IM 862.....	60
Imatinib (STI-571, Glivec).....	61
TNP-470.....	61
8. SOUBOR NEMOCNÝCH .....	62
9. METODY.....	63
9.1. Metody stanovení angiogenních faktorů obecně.....	63
9.2. Protein array metoda.....	64
9.3. Použitý materiál.....	65
9.4. Příprava vzorků, manipulace s array membránami.....	65
9.5. Vlastní postup.....	66
9.6. Detekce.....	66
9.7. Vyhodnocení a interpretace výsledků.....	67
9.8. Statistické hodnocení dat.....	67
10. VÝSLEDKY.....	67
11. DISKUZE.....	70
11.1. Angiogenin.....	71
11.2. Chemokiny CCL2 (MPC-1) a CCL5 (RANTES) .....	71
11.3. Chemokiny CXCL 1-3 (pan GRO), CXCL 5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8).....	73
11.4. PDGF.....	75
11.5. IL-6.....	76
11.6. EGF rodina .....	77
11.7. TIMP-1 a TIMP-2.....	77
11.8. Leptin.....	79

12. ZÁVĚR.....	80
13. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	82
14. SCHÉMA ÚČINKU IFN- $\alpha$ NA NÁDOROVÉ A IMUNITNÍ BUŇKY (SCHÉMA Č.1.) .....	91
15. SCHÉMA MÍSTA ZÁSAHU CÍLENÉ ANTIANGIOGENNÍ LÉČBY (SCHÉMA Č.2) .....	92
16. SEZNAM GRAFŮ.....	93
17. SEZNAM TABULEK.....	106
18. LITERATURA.....	113
19. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY.....	137

## PODĚKOVÁNÍ

Je pro mě milou povinností upřímně poděkovat všem, kteří mi při vědecké práci, která byla podkladem pro sepsání předkládané disertační práce pomáhali.

V první řadě jsem velmi zavázána Doc. MUDr. Otakaru Kopeckému, CSc., iniciátorovi celé práce, který mi dal možnost podílet se na výzkumném projektu, v rámci něhož práce vznikla. Děkuji mu za jeho odbornou a morální podporu v často nelehkých podmínkách, za veškerou obětavou pomoc při realizaci práce.

Prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D. děkuji za jeho cenné rady při osvojování vědeckých návyků a pronikání do onkologické problematiky.

Děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Peterovi, Ph.D., přednostovi Kliniky onkologie a radioterapie v Hradci Králové, a Prof. MUDr. Stanislavu Filipovi, Ph.D. za vytvoření příznivých podmínek k úspěšnému zvládnutí studia.

Můj dík patří PharmDr. Doris Vokurkové, Ph.D., RNDr. Ctiradu Andryšovi, Ph.D. a Mgr. Vladimíře Vroblové z Ústavu klinické imunologie a alergologie, kteří mi pomáhali s laboratorním zpracováním odebraného materiálu. Děkuji paní Janě Hrdinové za příkladnou pomoc s grafickým zpracováním a dalšími úpravami, RNDr. Evě Čermákové a ing. Petru Součkovi za rady při statistickém hodnocení výsledků a paní Haně Kotlandové za pomoc při vytvoření obrazových příloh.

Zvláštní poděkování patří mým dětem, Kristýně a Petrovi, a mým rodičům za jejich podporu, trpělivost, toleranci a pochopení.

## SEZNAM ZKRATEK

ALK	activin receptor-like kinasa
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	adenosin trifosfát
β-TG	beta-thromboglobulin
BMI	body mass index
CAM	chorioallantoická membrána
CD	clusters of differentiation
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
COMP	cartilage oligometric matrix protein
COX	cyklooxygenáza
CT	computerized tomography
CTAP-III	connective tissue activating protein-III
DC	dendritic cells
dpi	dots per inch
ECM	extracelulární matrix
ECOG	Eastern Cooperative Ecology Group
EGF	epidermal growth factor
ELR	kyselina glutamová (E)- leucin (L) – arginin (R)
ENA-78	epithelial neutrophil activating protein-78
FcγR	receptor pro Fc část IgG
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluoresceinisothiocyanat
5-FU	5-fluorouracil
GAG	glykosaminoglykan
GCP-2	granulocyte chemotactic protein-2
GIT	gastrointestinální trakt
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPCR	G protein-coupled receptor
GRO	growth-related genes
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia-inducible factor
HHV-8	human herpesvirus-8
HRE	hypoxia-response element
HRP	horseradish-peroxidase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IGF	insulin-like growth factor
IFN	interferon
IL	interleukin
IP-10	interferon-γ-inducible protein
I-TAC	INF-inducible T cell alpha chemoattractant
LAP	latency asociated peptid
LAK	lymphokine activated killer
MAPK	mitogen-activated protein kinas
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEF2C	myocyte enhancer binding factor 2C
MIG	monokine induced by interferon-γ
MMP	matrix-metaloproteinázy



MOP3	member of PAS protein3
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
NAP-2	neutrophil activating protein-2
NK	natural killer
NO	oxid dusnatý
NSCLC	non small cell lung cancer
PBC	plateled basic protein
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PDGF	plateled derived growth factor
PECAM	plateled endothelial cell adhesion molekule
PF-4	plateled factor-4
PFS	progression free survival
PIGF	placental growth factor
PKC	proteinkináza C
PMNL	polymorfonukleární leukocyty
PSA	prostatický specifický antigen
RANTES	regulated on activation, normally T cell-expressed and secreted
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RTK	tyrosine kinase receptor
SCCA	squamous cell carcinoma antigen
SCID	severe combined immunodeficiency
SDF-1	stroma cell-derived factor
SWOG	Southwest Oncology Group
TAMs	tumour associated macrophages
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TMB	transmembrane beta-barrel
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
TRAMP	TNF receptor-related apoptosis-mediated protein
TSP	thrombospondin
TTP	time to progression
VCAM-1	vascular adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau gen
VVO	vesikulo-vakuolární organely
UD FDA	United States Food and Drug Administration

## CÍLE PRÁCE:

- 1) Stanovit angiogenní faktory v séru u nemocných s různými stadii renálního karcinomu.
- 2) Použít víceparametrovou analýzu (protein array) k monitorování sérových hladin angiogenních faktorů v průběhu chirurgické léčby nemocných s renálním karcinomem.
- 3) Analyzovat charakter angiogenní stimulace v závislosti na pokročilosti nádoru.
- 4) Ověřit, zda zátěž spojená s operačním výkonem bude provázena změnami hladin angiogenních faktorů v séru.
- 5) Stanovit možnost klinického využití vybraných markerů k hodnocení aktivity onemocnění.

## 1. ÚVOD

Novotvorba cév je proces, který nachází uplatnění jak za fyziologických okolností, tak v patogenezi za různých chorobných stavů. V posledních letech je angiogeneze středem zvýšené pozornosti v onkologii, neboť se jí připisuje významná úloha v patogenezi nádorového procesu a metastazování vůbec. Postupné pozorování mechanismu novotvorby cév umožnilo přinést i přímé důkazy o úloze angiogeneze v nádorovém procesu různými experimenty, studujícími účinky izolovaných angiogenních a antiangiogenních faktorů.

Maligní nádory ledvin představují 1-2% všech maligních tumorů. V 70% se jedná o světlobuněčný renální karcinom. Světlobuněčný renální karcinom patří k bohatě vaskularizovaným a fragilním nádorům. Z tohoto důvodu se jeví zajímavá myšlenka sledovat angiogenní aktivitu u nemocných s touto diagnózou v závislosti na stadiích onemocnění.

## 2. NÁDOROVÉ BUJENÍ

### 2.1. Kancerogeneze

Přeměna normální buňky v nádorovou (kancerogeneze) je mnohastupňový proces postupné akumulace poruch základních regulačních mechanismů somatických buněk - buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Většina nádorů vzniká primární genetickou událostí (mutací) v jedné, kterékoliv somatické buňce, která je zakládající buňkou nádorového klonu. Každá lidská buňka nese velmi složitý a přesně regulovaný genetický program kontrolující buněčný růst, proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt (apoptózu). Nádorový buněčný klon vzniká a vyvíjí se porušením těchto regulačních mechanismů (115)

Vznik a vývoj klonu je obvykle charakterizován několika stadii:

1. Iniciační stadium - představuje mutaci určitého kritického genu. Je časově krátká, nevratná, buňkám přináší růstovou selekční výhodu.
2. Promoční stadium - charakterizováno stimulací latentního iniciovaného buněčného klonu promočními faktory k intenzivnějšímu buněčnému dělení. Promoční faktory samy o sobě nejsou kancerogenní a nejsou schopny vznik nádorového klonu vyvolat. Působení promočních faktorů se v řadě případů překrývá s mutagenní aktivitou, některé podporují přenos mitogenního signálu buňce. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon účinně

stimulován, a naopak jejich odstranění může zpomalit až zabránit dalšímu vývoji klonu.

3. Stadium progrese - v něm dochází k nahromadění mutací dalších genů v buňkách klonu vedoucích ke změně jejich fenotypu, což podmiňuje invazivní růst a metastatickou aktivitu.

Na vzniku a rozvoji nádorového klonu se podílí několik skupin genů, jejichž mutované nebo chybějící produkty podmiňují deregulaci buněčné proliferace, diferenciaci a buněčné smrti.

Je popsáno téměř 100 různých protoonkogenů, které se nachází v každé somatické buňce. Obecný, vitální význam jejich produktů spočívá v normální, regulované stimulaci buněčné proliferace a potlačování buněčné diferenciaci, některé se podílejí na regulaci apoptózy. Jsou to komponenty extra- a intracelulárních cest přenosů signálů.

Fyziologické regulační schopnosti produktů protoonkogenů, tj. stimulace buněčné proliferace a potlačování buněčné diferenciaci, se mohou změnit v kancerogenní potenciál, změni-li se buněčný protoonkogen v onkogen. Následkem je produkce genového produktu v nadbytku nebo v hyperaktivní formě, a tedy hyperstimulace buněčné proliferace a hyperinhibice buněčné diferenciaci. K aktivaci protoonkogenu stačí alterace pouze jedné alely genu, tzv. dominantní mutace, proto se tyto geny označují jako dominantní onkogeny (115, 182)

Aktivace protoonkogenu v onkogen probíhá různými mechanismy:

- virovou transdukcí (onkogen src)
- genovou amplifikací (myc, abl)
- virovou inzercí (myc)
- chromozomální přestavbou (myc, abl)
- mutací (ras)

Zastoupení mutovaných onkogenů u různých malignit se mírně liší, klíčový význam však mají onkogeny rodiny ras. Jsou mutovány u více než 50% všech maligních onemocnění. Mutovaný produkt hraje významnou roli v alteraci několika signalizačních drah. Hyperstimuluje mitogenní proteinkinázovou kaskádu s podporou DNA syntézy a průchodem buňky buněčným cyklem, podílí se na reorganizaci cytoskeletu nádorové buňky (změny

adheze), aktivuje transkripční faktory pro další onkogeny. V průběhu vývoje nádorového klonu se onkogenní produkty potencují (115, 182).

Dále obsahuje lidský genom kolem 30 tumor supresorových genů v každé somatické buňce. Nazývají se recesivní onkogeny, protože musí být mutovány (eliminovány) obě alely, aby se nevytvořil buď žádný, nebo nefunkční produkt. Produkty tumor supresorových genů potlačují buněčnou proliferaci a podporují buněčnou diferenciaci a apoptózu.

K tumor supresorovým genům jsou řazeny geny udržující stabilitu genomu, někdy označované také jako mutátorové geny (35). Produkty těchto genů se uplatňují v DNA hojivých procesech - reparaci mutací. Korigují chyby v procesu replikace DNA a stabilizují DNA. V nádorových buňkách jsou inaktivovány recesivní mutací - mutací (ztrátou) obou alel. Na rozdíl od onkogenů a mutace tumor supresorových genů neposkytují jejich mutace žádnou růstovou výhodu klonu. Jejich mutace mají v tumorigenezi efekt opožděný, nepřímý, spočívající ve zvýšení frekvence mutací onkogenů a tumor supresorových genů (nejsou hojeny). Vyřazení některých mutátorových genů zvyšuje frekvenci mutací až 1000x (115)

Na prodlouženém přežívání nádorových buněk se podílí aktivita telomerázy. Za fyziologických okolností je doba života buňky, resp. maximální počet buněčných dělení, určena zejména postupným zkracováním se koncových tandemově opakovaných telomerických sekvencí chromozomů. Při každém dělení se tandemové repetice zkrátí, postupně až na nulové hodnoty, kdy buňka hyne apoptózou. Telomerické sekvence dosyntetizovává právě enzymatický komplex telomeráza. Je trvale aktivní v opakovaně se dělících buňkách (zárodečných, kmenových, fetálních). Její aktivita je obnovena u 80% malignit (115)

Nezbytnou podmínkou růstu nádoru je vznik nového cévního zásobení, které zajistí dodávku krve nádorovým buňkám. Angiogeneze je přirozeně stimulována hypoxickým prostředím rostoucího nádorového klonu. Hypoxický nádor je geneticky nestabilní. Hypoxie indukuje transkripční faktor (hypoxia-inducible factor-1), který pozitivně stimuluje gen pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (25). Hypoxie současně aktivuje gen p53, jehož produkt inhibuje řadu genů, jejichž produkty se počítají k inhibitorům angiogeneze. Vyřazení, mutace p53 genu, tedy potlačení inhibitorů, angiogenezi podporuje (57).

### 3. VZTAH IMUNITNÍHO SYSTÉMU A NÁDOROVÉHO BUJENÍ

#### 3.1. Úloha přirozené imunity

Rozhodující pro rozvoj specifické, buňkami zprostředkované imunity je návaznost na imunitu přirozenou (182, 190). T lymfocyty rozpoznávají pouze ty antigeny, které byly zpracovány antigen-prezentujícími buňkami, tj. dendritickými buňkami, makrofágy, případně jinými buněčnými typy (273, 356). Lineární antigenní fragmenty jsou prezentovány T lymfocytům po vazbě na molekuly HLA I. a II. třídy, případně na jiné molekuly, např. z klasteru CD1 (44). Takto zprostředkovaný I. signál musí být doplněn vazbou kostimulačních interakcí (II. signál), jinak je T lymfocyt anergizován a usmrcen apoptózou. Při současném obdržení obou signálů se může T lymfocyt aktivovat, klonálně expandovat a vykonat regulační a efektorové funkce (325). Terminálními efektorovými buňkami, odpovědnými za specifickou destrukci nádorové buňky, jsou cytotoxické lymfocyty T (185). Apoptóza cílové buňky je vyvolána dvěma mechanismy (viz. obr. č.1). Vlastní cytotoxická aktivita T lymfocytů je zajišťována prostřednictvím exocytární dráhy, při které jsou uvolněny perforiny a granzymy, jejichž působením je v terčové buňce nastartován proces apoptózy. Druhým mechanismem, který také vede k indukci apoptózy v cílových buňkách, je cesta zahrnující proapoptotické molekuly Apo/Fas a cestu zprostředkovanou  $TNF\alpha$  (278). Existuje velká podobnost v efektorových mechanismech cytotoxicity mezi  $CD8^+$  cytotoxickými T lymfocyty a přirozeně cytotoxickými NK buňkami uvedenými níže (325).

V ohromném repertoáru T lymfocytů nesoucích různé TcR, se nacházejí T lymfocyty schopné rozpoznat nádorové antigeny (66). Neschopnost realizovat imunitní odpověď na přítomné nádorové buňky vyplývá spíše z nedostatečné aktivity složek přirozené imunity.

Nádorové buňky mají na svých površích abnormální mozaiky molekul, které se na normálních buňkách nenachází, a které jsou identifikovány receptory na buňkách přirozené imunity i jejími solubilními složkami. Identifikace těchto nebezpečných vzorů, které mohou vznikat i v průběhu apoptózy nádorových buněk, vede k aktivaci buněk přirozené imunity (371).

Mikroprostředí solidních nádorů je hypoxické. Hypoxie je důvodem pro aktivaci složek přirozené imunity. Hypoxie vede k nekrotickým procesům v nádorové tkáni, čímž je imunitní systém vystaven biologicky aktivním látkám, které stimulují zánětovou reakci. Zánětová reakce však může za určitých okolností poskytnout nádorovému bujení spíše podporu.

### 3.2. Specifická protinádorová imunita

Rozhodující pro rozvoj specifické protinádorové imunity jsou dendritické buňky (26, 44, 55). Je to heterogenní buněčná populace, která se diferencuje jak z lymfoidních, tak z myeloidních prekurzorů. Pro vyžívání dendritických buněk z pluripotentních kmenových buněk krvetvorby je zapotřebí působení GM-CSF a TNF $\alpha$ . Pro diferenciaci dendritických buněk z monocytových elementů periferní krve je zapotřebí působení M-CSF, IL-4 a IL-13.

Dendritické buňky produkují cytokiny důležité pro primární imunitní reakci (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18) (58).

Myeloidní dendritické buňky vstupují do nelymfoidních tkání, kde rozpoznají, pohltí a zpracují antigen a migrují pak eferentními lymfoidními cestami do sekundárních lymfoidních orgánů. Migraci dendritických buněk do lymfatických uzlin regulují chemokiny (5). Po interakci dendritických buněk s T lymfocyty dochází k diferenciaci specifických klonů T lymfocytů a k dalšímu vývoji specifické imunitní reakce.

Lymfoidní dendritické buňky osidlují zejména thymus a další lymfatické orgány. Jejich úloha tkví v indukci tolerance T lymfocytů k vlastním nebo cizím antigenům.

Pro experimentální terapeutické zásahy u nemocných s nádorovými onemocněními lze relativně snadno získávat dendritické buňky odvozené od myeloidních prekurzorů. *In vivo* jsou rozlišovány tři hlavní populace dendritických buněk. Jsou to Langerhansovy buňky, intersticiální dendritické buňky a aktivované zralé dendritické buňky. Nádorové antigeny jsou pohlcovány dendritickými buňkami makropinocytózou a fagocytózou. K zesílení tohoto procesu dochází působením receptorů pro Fc fragment imunoglobulinů IgG (Fc  $\gamma$  RII/CD32, Fc  $\gamma$  RI/CD64) a receptoru pro manózu. Nediferencované dendritické buňky mohou internalizovat i apoptotické buňky prostřednictvím integrinových heterodimerů  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_3$  a vychytávacích receptorů CD36 (190).

V lymfatických uzlinách vytvářejí zralé dendritické buňky shluky s T lymfocyty prostřednictvím adhezních interakcí, zajišťovaných molekulami ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD102), LFA-3 (CD58). Klíčovou roli mají interakce mezi CD80 (B7.1) a CD86 (B7.2) na dendritických buňkách s molekulou CD28 na T lymfocytech, dále interakce mezi CD40 na dendritických buňkách a CD40L (CD154) na T lymfocytech, která vede k produkci IL-12 dendritickými buňkami (329). Ke zvýšené expresi CD40, která je konstitutivně na dendritických buňkách exprimována, dochází v přítomnosti prozánětlivých cytokinů, např. TNF $\alpha$  a GM-CSF. Cytokin IL-12 určuje vyžívání Th0 T lymfocytů do subsetu Th1. Právě subset Th1 je odpovědný za cytotoxickou buněčnou reaktivitu při obranné reakci proti nádorovému bujení (185). Interakce mezi molekulou OX40L na zralých dendritických

buňkách a molekulou OX40 na T lymfocytech vede ke zvýšenému vyžrávání dendritických buněk a k zesílení exprese CD80 a CD86 na straně dendritických buněk, k proliferaci a tvorbě cytokinů na straně T lymfocytů (190).

### 3.3. NK buňky

Další rozhodující součástí protinádorové imunity jsou NK buňky (natural killer, přirozeně cytotoxické buňky), které identifikují nádorové buňky prostřednictvím molekulově velmi rozmanitých receptorů (356). NK buňky se podílejí na obraně proti nádorům regulačně i efektorově (2, 160). Jsou schopny identifikovat nádorové buňky především zhodnocením míry exprese molekul HLA I. třídy (242). Alterovaná exprese HLA I. třídy je běžným znakem nádorově změněných nebo virem infikovaných buněk (222). Identifikovaná nádorová buňka je ničena komplexně cytotoxickými mechanismy, které lze v zásadě rozdělit na dvě hlavní cesty. První cesta je zprostředkována působením biologicky aktivních látek (perforiny, granzymy) obsažených v granulích NK buněk. Druhá cesta je zprostředkována několika receptory, mezi které patří receptor pro  $TNF\alpha$ , membránová molekula Apo/Fas (CD95), receptor TRAMP (TNF receptor-related apoptosis-mediated protein) a receptor TRAIL-1,2 (TNF related apoptosis-inducing ligand) (obr. č.2) (190).

Lze shrnout, že NK buňky vykazují protinádorový efekt tvorbou cytokinů, zvláště  $IFN\gamma$  a  $TNF\alpha$  a přímým cytotoxickým účinkem (161, 189, 225). Zvýšený protinádorový účinek mají NK buňky aktivované působením cytokinů *in vivo* nebo *ex vivo*, které označujeme jako LAK buňky (lymphokine activated killer) (304).

### 3.4. Interferonový systém

Významnou součástí protinádorové imunity je interferonový systém (44). Nádorové buňky a produkty nádorových buněk stimulují především buňky imunitního systému, ale i další jaderné elementy k tvorbě interferonů. Interferony můžeme podle vazby na společný membránový receptor rozdělit na interferony I. typu: interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$  a  $\omega$ , a II. typu: interferon  $\gamma$ , který se váže na odlišný receptor.

Interferony mají antiproliferativní a cytostatický účinek (158, 179). Interferony indukují v buňce, která je naváže na své povrchové receptory, rozklad RNA a interferují s proteosyntézou. Inhibují přechod buněk z klidového stadia (G 0) do proliferace a zpomalují i S-fázi (regulují syntézu enzymů nutných pro přípravu na syntetickou fázi buněčného cyklu) (258).



Na kontrole nádorového růstu se podílí imunomodulační účinky interferonů. Mají je obě třídy interferonů, hlavně však IFN  $\gamma$ . IFN  $\gamma$  indukuje zvýšení exprese buněčných povrchových molekul HLA I. třídy na povrchu nádorových buněk, čímž je zcitliví vůči nádorově specifickým cytotoxickým CD8<sup>+</sup> T lymfocytům (12, 158). Dochází k účinnějšímu zpracování a prezentaci nádorových antigenů, a tím k rozvoji specifické T lymfocytární imunity. IFN $\gamma$  zvyšuje celkovou buněčnou zánětovou aktivitu, namířenou proti nádoru. Stimuluje fagocytární schopnosti makrofágů (ovlivňuje energetické systémy makrofágů a usnadňuje vznik toxických kyslíkových radikálů), aktivuje neutrofile, NK buňky a buňky endotelu, podporuje diferenciaci prekurzorů T lymfocytů do Th1 subsetu, má synergický cytotoxický účinek s TNF (156). Zvyšuje expresi HLA-DR a Fc receptoru, a tím ovlivňuje protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitu. IFN $\gamma$  podporuje dozrávání dendritických buněk, které se stávají nejúčinnější antigen-prezentující buňkou (190).

Interferon  $\alpha$  se může u některých typů buněk podílet na indukci diferenciaci buněčných linií aktivací ne zcela poznaných intracelulárních mechanismů. V experimentálních podmínkách byla pozorována reverze maligního fenotypu nádorových buněk ztrácejících pod vlivem interferonu tumorigenitu a schopnost metastazování (405).

Interferon se podílí spolu s řadou dalších cytokinů (hl. TNF) na spuštění apoptózy (274, 309), jejíž hlavním smyslem je vyřadit z další reprodukce buňky s ireverzibilně poškozenou DNA, resp. s abnormalitami v genomu (42, 258, 385).

Dalším účinkem interferonu je suprese onkogenů obnovující regulaci proliferace fyziologickými mechanismy. Byl pozorován, hlavně u IFN $\beta$ , vliv na hladinu receptorů pro steroidní hormony (zvýšení estrogenových receptorů u karcinomu prsu, progesteronových receptorů u endometriálního karcinomu, androgenních receptorů u karcinomu prostaty) (73, 331).

Hlavní účinky IFN- $\alpha$  na nádorové a imunitní buňky jsou znázorněny na schématu č.1.

### **3.5. Imunitní reakce humorálního typu**

V protinádorové imunitě mají význam i imunitní reakce humorálního typu. Specifické protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, jež dozrály z B lymfocytů po jejich stimulaci antigenem za koordinované účasti pomocných T lymfocytů. Tyto protilátky mohou mít samy o sobě protinádorový účinek. Častěji však indukují cytotoxické působení vazbou a aktivací komplementu (CDC - complement dependent cytotoxicity). V neposlední řadě má význam na protilátce závislá cytotoxicita (ADCC - antibody dependent cell cytotoxicity). Při tomto fenoménu je cytotoxický účinek imunokompetentních buněk zprostředkován vazbou

protilátky, která obalila cílovou nádorovou buňku, na Fc $\gamma$  receptor těchto imunokompetentních buněk (182).

### 3.6. Příčiny selhání imunitních obranných mechanismů

Přes existenci protinádorových mechanismů buněčné i protilátkové imunity může dojít ke vzniku a růstu zhoubného nádoru. Příčiny selhání imunitních obranných mechanismů jsou mnohostranné (190).

Důvodem může být neschopnost k imunitní odpovědi pro genetickou poruchu nebo pro imunitní nedostatečnost buď vrozenou, nebo získanou v důsledku léčby, event. navozenou onemocněním. Uplatnit se může trvalé imunosupresivní působení kancerogenu.

Úloha imunitního systému v komplikovaném procesu nádorového bujení není jednoznačná. Jak již bylo zmíněno výše, některé složky přirozené imunity mohou za určitých okolností poskytnout nádorovému bujení spíše podporu (127). V mikroprostředí zánětu se vytvářejí jednak poškozující faktory (např. vysoce reaktivní produkty O<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>), které mohou v geneticky disponovaném terénu přispět ke genetickému poškození. Lokálně vznikají i biologicky aktivní látky, především cytokiny, jejichž působením se může zvyšovat proliferativní aktivita nádorových buněk, dále faktory odpovědné za procesy angiogeneze. Unikátní postavení zaujímá TNF $\alpha$ . Je hlavním mediátorem zánětlivé reakce, která má jak schopnost poškozovat tkáň, tak zajišťovat tkáňové reparace. Indukuje apoptózu v místě zánětu, ale také stimuluje proliferaci fibroblastů. Ve vysoké koncentraci ničí cévní zásobení nádorové hmoty, v nízké koncentraci však podporuje remodelaci tkání a rozvoj stromatu, které je nezbytné pro růst nádoru a jeho šíření. S nádorem asociované makrofágy mohou někdy paradoxně podpořit růst a metastatický potenciál nádoru, protože tvoří cytokiny, které mají angiogenní potenciál. Dendritické buňky, které jsou asociovány s nádorem, mají obvykle fenotyp nezralých buněk a v důsledku snížené schopnosti stimulovat T lymfocytární imunitní odpověď. Lymfocyty, infiltrující nádor, jsou heterogenní populací lymfoidních buněk. Pokud v nádorech převažuje aktivita subsetu Th2, charakterizovaná tvorbou IL-4 a IL-5, nebo aktivita regulačního subsetu Th3, produkujícího TGF $\beta$  a IL-10, je omezena žádoucí protektivní aktivita subsetu Th1 (s tvorbou IFN $\gamma$ ), který je odpovědný za cytotoxickou aktivitu vůči nádoru. Působením Th2 T lymfocytů je upřednostňována protilátková odpověď s tvorbou cytokinů, které stimuluje rozvoj nádoru, např. svým angiogenním působením (127, 190).

Často tkví příčina selhání imunologické odpovědi přímo v nádorových buňkách. Existuje několik možností. Ztratí-li nádorová buňka antigen MHC-1, blokují se efektorové

mechanismy nutné pro imunitní odpověď a vzniká imunotolerance. Jestliže buňky v nádorové populaci obsahují různé množství nádorových antigenů, může dojít k selekci a proliferaci antigenně chudých klonů, čili uplatňuje se imunoselekcce. Další příčinou může být antigenní ochuzení, kdy nádorové buňky ztratí antigen dříve, než se může rozvinout imunitní reakce. Naopak nadměrné uvolňování antigenu může zabránit cytotoxické reakci vazbou antigenu na receptory T lymfocytů, čímž dojde k jejich oslepení. Antigenní determinanty nádorových buněk mohou být v některých případech obsazeny protilátkami. Buňka s takto maskovaným antigenem není nalezena imunokompetentními lymfocyty, ani je nemůže imunizovat a růst nádoru může být takovými protilátkami naopak urychlen (enhancement). Rovněž imunokomplexy mohou usnadňovat nádorový růst. Tyto komplexy antigenu uvolněného z nádoru a specifické protilátky mohou působit jako blokující protilátky, dále jsou odpovědné za inhibici makrofágů (pokud jsou jimi fagocytovány). Nádorové buňky nemusejí být zpočátku dostatečným podnětem k vyvolání imunitní odpovědi. Po dosažení určité velikosti nádoru (četnosti populace asi  $10^3$  buněk) není již vzniklá imunitní odpověď schopná rozsáhlou nádorovou populaci ovlivnit (proklouznutí nádoru) (190).

#### 4. ANGIOGENEZE A VASKULOGENEZE

Angiogeneze (novotvorba cév) je proces, který má velký význam za fyziologických okolností, jako je hojení ran a zlomenin, vývoj embrya, změny v průběhu menstruačního cyklu v ovariích a v endometriu. Porucha normálního procesu angiogeneze vede k různým chorobným stavům. Uplatňuje se při fibroproliferčních pochodech, v patogenezi revmatoidní artritidy, při vzniku retinopatie, u chronického zánětu a v neposlední řadě má významnou úlohu při metastazování nádorů a v patogenezi nádorového procesu vůbec (182, 183).

Jsou rozlišovány dva mechanismy tvorby nových cév: vaskulogeneze, formování cévní pleteně *de novo*, a angiogeneze, formování nových cév z již preexistujících cév. Oba procesy jsou regulovány citlivou rovnováhou pro- a antiangiogenních faktorů. Za fyziologických podmínek v dospělosti signály angiostatických mediátorů převažují nad proangiogenními vlivy a angiogeneze se nevyskytuje. Za jistých podmínek jako je formování nádoru a hojení poranění, převládnu pozitivní regulátory angiogeneze a dojde k aktivaci endotelia. Angiogeneze je zahajována vasodilatací a zvýšením permeability. Po destabilizaci cévní stěny endoteliální buňky poliferují, migrují a formují trubici, která je nakonec stabilizována pericyty a hladkými svalovými buňkami. Tento několikastupňový proces přísně

kontrolují mnohé solubilní růstové faktory a inhibitory, cytokiny a proteázy, stejně jako proteiny extracelulární matrix a adhezivní molekuly.

Úlohou cévního systému je poskytnout buňkám dostatečnou zásobu živin a kyslíku. Ve 3. týdnu embryogeneze začínají proliferovat endoteliální prekursorové buňky (hemangioblasty), migrovat do avaskulárních oblastí a agregováním formovat primitivní cévní síť. Toto formování primární cévní pleteně *de novo* je nazýváno **vaskulogeneze**. Ještě během vzniku primitivní vaskulární sítě se odehrávají první modifikace. Některé cévy fúzíjí a dávají tak vzniknout cévám o větším průměru, jiné se procesem „pučení“ větví v síť menších cév. Tyto změny remodelují primitivní cévní síť do více komplexní a diferencované sekundární sítě. Pokračujícím pučením se nově tvořené cévy větví z preexistujících struktur v několika stupňovém procesu nazývaném **angiogeneze** (54). Angiogeneze je klíčovým procesem širokého rozsahu, od fyziologických procesů po patologické události. Prudký rozvoj z dob embryogeneze ještě pokračuje s postupně vyhasínající intenzitou v období růstu a je ukončen na konci puberty. Za fyziologických podmínek převažuje v dospělosti vliv angiostatických mediátorů a nedochází k dalšímu růstu cév. Výjimkou jsou endometriální cykly u žen a období gravidity. Angiogeneze hraje důležitou úlohu při tvorbě kolaterálního oběhu např. při aterosklerózou vyvolané ischemii tkání, při hojení ran a zánětlivých procesech. Neoangiogeneze je klíčová pro růst a metastazování nádorů (53, 77).

#### 4.1. Fáze angiogeneze

Angiogeneze je komplexní biologický proces, který vyžaduje přesnou koordinaci četných různých kroků. Všechny z nich jsou regulovány citlivou rovnováhou různých agonistických a antagonistických efektorových molekul. Angiogenezi můžeme rozdělit do dvou plynule navazujících fází. Iniciační fáze zahrnuje zvýšení vaskulární permeability, degradaci bazální membrány, proliferaci a migraci endotelových buněk. Do konsolidační fáze náleží inhibice proliferace a migrace endotelií, obnovení a stabilizace funkční cévní stěny pomocí mezenchymálních buněk diferencujících se v pericyty a buňky hladké svaloviny (123).

##### 4.1.1. Iniciační fáze angiogeneze

###### *Vasodilatace a permeabilita*

První krok angiogeneze je vasodilatace preexistující cévy účinkem NO (54). VEGF (vascular endothelial growth factor) indukuje aktivitu NO syntézy v endoteliálních buňkách.

Výsledné zvýšení intracelulárních hladin NO stimuluje guanyl-cyklázu k syntéze cyklického guanosin monofosfátu (cGMP). Vlivem cGMP dochází následně k relaxaci hladkých svalových buněk. VEGF přispívá k prvním krokům angiogeneze nejen zvýšením regulace tvorby NO, ale také zvýšením permeability stěn endoteliálních buněk. Tato hyperpermeabilita je dosažena formováním vesikulo-vakuolárních organel (VVO) v endoteliálních buňkách. VVO jsou složeny z vesikul a vakuol, které navzájem komunikují pomocí okének. Jednotlivé vesikuly jsou schopné se vzájemně shlukovat a překlenout celou cytoplasmu od luminální do abluminální plasmatické membrány. Během angiogeneze je těmito otvory zajištěn výrazně zvýšený transport plasmatických proteinů jako je fibrinogen a plasminogen z krevního řečiště do okolní tkáně. Tyto plasmatické proteiny potom slouží jako lešení migrujícím endoteliálním buňkám. Extravasace plasmatických proteinů probíhá přes interendoteliální buněčné spoje (85).

### ***Cévní destabilizace a degradace matrix***

Před vycestováním endoteliálních buněk z preexistujících cév se musí mezibuněčné spoje v cévní stěně rozvolnit. Spojení endoteliálních buněk tvořících cévní výstelku musí být rozvolněno a současně musí být remodelováno perivaskulární stroma. Za hlavní regulátory tohoto procesu jsou považovány angiopoetin 2 a proteázy, zahrnující aktivátory plasminogenu, chymázy a matrix-metaloproteázy (MMPs) (246, 257). Které proteázy jsou aktivovány v průběhu angiogeneze, záleží na složení extracelulární matrix, která obklopuje cévy. Např. degradace fibrinových struktur vyžaduje MT-1-MMP, zatímco MMP-2, aktivovaná MT-1-MMP, je velmi důležitá pro degradaci typu I kolagenu (348).

### ***Proliferace a migrace endoteliálních buněk***

V průběhu angiogeneze jsou zesilovány stimuly, které podporují proliferaci endoteliálních buněk, a převáží efekt proangiogenních faktorů. Angiogenní molekuly zahrnují členy VEGF- a FGF- (fibroblast growth factor) rodiny, angiopoetin 1 a 2, angiogenin, EGF (epidermal growth factor), CXC-chemokiny a IGF-1 (insulin-like growth factor). VEGF a angiopoetin jsou považovány za specifické mitogeny endoteliálních buněk, zatímco FGFs, angiogenin, EGF, CXC-chemokiny a IGF-1 indukují proliferaci širokého spektra buněčných typů. Proliferující endoteliální buňky migrují podle gradientu chemotaktických faktorů dezintegrovanou basální membránou do remodelovaného a rozvolněného perivaskulárního prostoru.

## 4.1.2. Konsolidační fáze angiogeneze

### *Formování lumen cévy a cévní stabilizace*

V okamžiku, kdy endoteliální buňky dosáhnou oblasti s redukovanou vaskulární hustotou, vytvoří nejprve jednoduchou vrstvu a následně se formují duté struktury. Jednotlivé isoformy VEGF mají různé efekty na velikost lumen novotvořených cév. VEGF<sub>121</sub> a VEGF<sub>165</sub> působí zvětšení průměru lumen, zatímco VEGF<sub>189</sub> reguluje tvorbu cév o malém průměru. Pro úvodní fázi formování cévních struktur jsou ještě nezbytné integrity  $\alpha_v\beta_3$  a  $\alpha_5$  i transkripční faktor MEF2C (myocyte enhancer binding factor 2C). Trombospondin-1 inhibuje formování lumen. V dalším kroku musí být formující se céva stabilizována nástěnnými buňkami a to tak, že mesenchymální buňky v okolní tkáni proliferují a migrují na abluminální povrch nezralých cév. Poté se mesenchymální buňky diferencují do pericytů, které jsou lokalizovány uvnitř basální membrány, nebo do cévních hladkých svalových buněk, které se nacházejí abluminálně od basální membrány (196). Zapojení mezenchymálních buněk je regulováno PDGF-BB a TGF- $\beta$ . Kontaktem aktivovaných endotelií s mezenchymálními buňkami je aktivován nefunkční TGF- $\beta$  proteolytickým štěpením. Působením TGF- $\beta$  se diferencují mezenchymální buňky v pericyty a buňky hladké svaloviny. Za přispění pericytů a exprese VEGF jsou endotelové buňky stabilizovány. Experimentální práce doložily, že klíčovou roli v aktivaci TGF- $\beta$  má kontakt endotelií a mezenchymálních buněk (65, 137).

## 4.2. Regulace angiogeneze

Angiogenní růst je kontrolován jemnou rovnováhou mezi pro- a antiangiogenními molekulami (54). Na regulaci angiogeneze mají vliv solubilní, stejně jako membránově vázané faktory, interakce buňka-matrix a hemodynamické efekty, jako je porušené laminární proudění a krevní tlak.

### 4.2.1. Angiogenní faktory

#### *Růstový faktor cévních endotelií (VEGF)*

Mezi induktory angiogeneze je VEGF nejlépe charakterizován a pravděpodobně je nejdůležitější molekulou. Narušení jedné alely VEGF u myši způsobuje 50% redukci exprese VEGF, což vede k těžkým defektům vaskulatury a k smrti embryí (54). Kromě toho VEGF má také rozhodující význam v procesu růstu. Blokáda VEGF signalizace prostřednictvím solubilních VEGF receptorů vede k potlačení invaze krevních cév do kostních růstových

šterbin se signifikantním snížením procesu růstu. Použití solubilních Flt-1 receptorů u potkanů zcela zruší angiogenezi corpus luteum, vede k inhibici rozvoje corpus luteum, potlačení syntézy progesteronu a dozrání endometria. Naproti tomu je zajímavé, že nevelké zvýšení VEGF vede ke smrtelné dysplazii myších embryí. Zvýšená aktivita genů kódujících VEGF je spojena s vývojovými poruchami srdce (236).

Výsledkem alternativního spojení segmentů VEGF genu je produkce 6 izoform VEGF (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> a VEGF<sub>206</sub>), které se liší ve svých vlastnostech a funkcích. VEGF<sub>189</sub> a VEGF<sub>206</sub> jsou především přítomny na buněčných membránách nebo v extracelulární matrix prostřednictvím vazby k heparan sulfátům, zatímco VEGF<sub>121</sub> a část VEGF<sub>165</sub> zůstávají v nevázané podobě v extracelulárních tekutinách. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> a VEGF<sub>189</sub> mají navíc opačný vliv na velikost průměru cév při jejich formování.

Všechny VEGF receptory (VEGF-R1, 2, a 3) mají ve své extracelulární části sedm imunoglobulinových domén a intracelulární tyrosin kinázovou doménu. Po navázání ligandu VEGF-R receptory dimerizují a prodělají autofosforylaci. Všechny receptory VEGF-R jsou s vysokou densitou exprimovány v průběhu embryogeneze. V dospělosti jsou VEGF-R1 a VEGF-R2 exprimovány převážně na buňkách krevního cévního systému, zatímco exprese VEGF-R3 je omezena na endotelie lymfatických cév (373). VEGF-R receptory byly dlouho považovány za specifické znaky endoteliálních buněk, ale později byl VEGF-R1 nalezen na monocytech a osteoklastech. VEGF se váže na dva receptory, VEGF-R1 (flt-1) a VEGF-R2 (flt-1/KDR).

Nejvyšší afinitu k VEGF vykazuje receptor VEGF-R1, ale signalizace prostřednictvím VEGF-R1 není jediným stimulem pro normální proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Stimulované endotelové buňky VEGF-R1 knock-outovaných myší vykazují známky aktivace. Na druhou stranu tato zvířata umírají na cévní nedostatečnost, protože u nich selhává tvorba normálních cév (107). Exprese mutovaného VEGF-R1 se ztrátou tyrosin-kinázové domény, ale s intaktní extracelulární doménou, nemá vliv na formování cév a zvířata jsou životaschopná. Vysvětlením je, že VEGF-R1 může hrát v průběhu angiogeneze roli receptoru vyvazujícího volný VEGF. Úplné chybění VEGF-R1 pravděpodobně vede ke zvýšenému vyvazování volného VEGF na VEGF-R2 a jeho nadměrné stimulaci, která je odpovědná za selhání normální cévní tvorby u VEGF-R1 knock-outovaných myší.

U myší s mutací VEGF-R2 zcela chybí krevní cévy a je významně redukován počet prekurzorů endoteliálních buněk (321). *In vitro* se mohou hemangioblasty formovat z kmenových, VEGF-R2 deficientních buněk, ale schopnost těchto hemangioblastů

proliferovat a migrovat je hrubě poškozena. Tato pozorování svědčí pro to, že vliv VEGF na proliferaci a migraci je zprostředkován prostřednictvím VEGF-R2, ale ne cestou VEGF-R1.

VEGF-R3 (flk-4) váže členy VEGF rodiny VEGF-C a VEGF-D. Narušení obou alel VEGF-R3 nemá vliv na formování prvního primitivního cévního plexu v průběhu vaskulogeneze, diferenciaci prekurzorových buněk v endoteliální buňky a pučení cév. U postižených zvířat však neprobíhá remodelace primitivního vaskulárního plexu a myši embrya umírají po 9,5 dnech na kardiovaskulární selhání (80). Zdá se, že během embryogeneze VEGF-R3 reguluje rozvoj krevních i lymfatických cév, ale u dospělých zůstává omezený na lymfatický systém.

Neuropilin je další receptor pro VEGF. Od VEGF-R1-3 se liší chyběním tyrosin-kinázové domény. Tento receptor byl prvotně identifikován jako receptor členů collapsin/semaphorinové rodiny na neuronálních buňkách, ale je také exprimován na endoteliálních buňkách. Neuropilin je isoformně- specifický receptor, který váže VEGF<sub>165</sub>, ale ne VEGF<sub>121</sub>. Zvýšená exprese neuropilinu vede k zvýšené vazbě VEGF<sub>165</sub> k VEGF-R2 a tím ke zvýšení VEGF<sub>165</sub> – mediované chemotaxe. Důležitost neuropilinu v regulaci angiogeneze je dokumentována na pozorování u transgenních a knock-outovaných myší. Zvýšená exprese neuropilinu u myší vede k abnormální vasodilataci a k embryonální smrti 17,5 den. Neuropilin deficientní myši mají narušené krevní cévy a cévní síť se u nich náležitě nevyvíjí (166).

VEGF je zapojen v regulaci mnohých kroků angiogeneze (obr. č.3). Kromě zmíněného vlivu na endoteliální buňky (viz. kap. 4.1.1) indukuje VEGF syntézu aktivátorů plasminogenu a MMP-1 v endoteliálních buňkách a tím podporuje remodelaci perivaskulární matrix. VEGF zvyšuje proliferaci endoteliálních buněk *in vitro*, chrání endoteliální buňky před apoptózou a stimuluje migraci endoteliálních buněk (75). Experimenty, které užívají *in vivo* modely angiogeneze, jako je oční rohovka a chorioalantoická membrána, ukazují, že VEGF je také schopen indukovat pučení cév *in vivo*.

Jiní členové VEGF rodiny jsou VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E; sdílejí 16-43% homologii aminokyselin. Tito členové VEGF-rodiny mají také důležité funkce v angiogenezi. Dvě isoformy VEGF-B, VEGF-B<sub>167</sub> a VEGF-B<sub>186</sub>, jsou hlavně vyjádřeny na embryonální a svalové tkáni a v menším množství na různých jiných tkáních. Obě formy aktivují VEGF-R1. VEGF-B<sub>167</sub>, ale ne VEGF-B<sub>186</sub>, byl identifikován jako ligand pro neuropilin. Navíc VEGF-B může ovlivňovat signalizaci VEGF formováním heterodimerů s VEGF<sub>165</sub>. Zajímavé je, že myši s nedostatečností genu VEGF-B se jeví jako zdravé a fertily bez zřetelných morfologických defektů. Detailní studie kardiálního fenotypu ukázaly, že



VEGF-B-/- myši mají redukovanou velikost srdce a jeví klinické symptomy z porušené obnovy experimentálně navozené ischemie. Proto se zdá, že VEGF-B se účastní na rozvoji plně funkční koronární vaskulatury, ale není nezbytný pro embryonální vývoj, protože jiní členové VEGF rodiny mohou pravděpodobně kompenzovat jeho ztrátu (399).

VEGF-C a jeho blízkce příbuzný VEGF-D aktivují VEGF-R2 a VEGF-R3, ale jsou méně účinné než VEGF sám. VEGF-C je schopen stimulovat angiogenezi na modelu myši rohovky a modelu ischemizované tkáně. Na druhou stranu VEGF-C má vysokou afinitu k VEGF-R3 a reguluje růst lymfatických cév na různých experimentálních modelech, což poukazuje na důležitou roli VEGF-C v lymfangiogenezi a v udržování lymfatických cév. VEGF-D je exprimován ve vysoké hladině v plicích během embryogeneze, což dokládá jeho důležitou roli ve vývoji plicní tkáně. Zvýšená exprese VEGF-D kožními keratinocyty je spojena s hyperplazií kožních lymfatických cév.

VEGF-E je protein kódovaný orf virem. VEGF-E je pravděpodobně produkt genetického „driftu“ z VEGF genu získaného orf virem z hostitelkých savčích buněk. VEGF-E zajišťuje stimulační signál, který jde přes VEGF-R2, ale neaktivuje VEGF-R1, a podporuje angiogenezi jak *in vitro*, tak *in vivo* (233).

Důležitou roli v syntéze VEGF hrají onkogeny ras, raf, bcl-2 (25). Zásadní roli v regulaci syntézy VEGF zaujímá proteinkináza C (PKC). Byla popsána aktivační cesta ras onkogenu prostřednictvím PKC. Podobný vliv byl popsán i u P-3 kinázy. Zvýšená produkce VEGF je pozorována u osob s mutací von Hippel-Lindau genu (VHL) - viz kap. 7.2.

Významnými stimuly, které zvyšují produkci VEGF, jsou vedle hypoxie (působení HIF-1) a onkogenů také cytokiny, proangiogenní buněčné růstové faktory (jako bFGF a EGF) a hormony. Význam druhého signálu v regulaci VEGF má cyklooxygenáza (COX)-2 a oxid dusnatý.

### ***Fibroblastový růstový faktor (FGF)***

Až doposud bylo identifikováno 23 odlišných fibroblastových růstových faktorů (FGF 1-23) a 4 odlišné tyrosin-kinázové receptory (FGFR 1-4). FGF-1 (acidický FGF) a FGF-2 (basický FGF) byly mezi prvními růstovými faktory u kterých byla prokázána stimulace angiogeneze. Oba dva (FGF-1 i FGF-2) jsou secernovány různými buněčnými typy a vážou se na všechny čtyři FGF receptory. FGF-1 a FGF-2 mají chemotaktický a mitogenní účinek na endotelové buňky, fibroblasty a řadu dalších buněčných typů. FGF-2 navíc zvyšuje expresi VEGF a proteáz, jako například expresi urokinázového aktivátoru plasminogenu. Zvyšuje expresi  $\alpha_v\beta_3$  integrinových komplexů a dalších adhezivních molekul na endoteliálních

buňkách a podílí se na formování cévního lumen zvýšením syntézy 3-D kolagenu. Kromě toho FGFs indukují angiogenezi *in vivo* v chorioalantoické membráně. Překvapivě ani u FGF-1, ani u FGF-1/FGF-2 knock-outovaných myší se nevyvíjejí cévní abnormality. U FGF-1 knock-outovaných myší probíhá proces hojení poraněných tkání nekomplikovaně. Na druhou stranu u FGF-2 a FGF-1/FGF-2 knock-outovaných myší se poranění hojí opožděně, což naznačuje, že FGF-2 může regulovat pučení nových cév v reparované tkáni (234). Bylo prokázáno, že FGF-4 indukuje v kulturách endoteliálních buněk z umbilikálních vén formování trubic za současně zvýšené produkce MMP-1 a snížených hladin tkáňových inhibitorů matrix metaloproteinázy 1 (TIMP-1). Tyto změny nejsou přímým efektem FGF-4, ale jsou mediovány přes zvýšenou aktivitu VEGF. FGF-3 nezvyšuje hladinu VEGF. Dvě varianty FGF-8, FGF-8a a FGF-8b, jsou schopny stimulovat migraci, proliferaci a formování cévního lumen v kulturách imortalizovaných endotelových buněk, izolovaných z mozkových kapilár myší v podmínkách *in vitro* a stimulovat angiogenezi v CAM assay (227).

### ***Angiopoetiny***

Angiopoetiny 1, 2, 3 a 4 jsou parakrinní růstové faktory, které působí výhradně na endoteliální buňky. Jsou ligandami tyrosin kinázového receptoru Tie 2, ale není prokázáno, zda aktivují úzce příbuzný receptor Tie 1. Angiopoetin 1, který je sekretován periendoteliálními buňkami, jako např. buňkami hladké svaloviny cévní stěny, není schopen v podmínkách *in vitro* indukovat proliferaci endoteliálních buněk a formování cévního lumen, ale podporuje pučení endoteliálních buněk. Myší kmeny s nedostatečnou expresí angiopoetinu 1 nebo Tie 2 vykazují endokardiální nebo myokardiální defekty. U těchto myší se primární vaskulatura vyvíjí normálně, ale vážne stabilizace a remodelace primitivních cév, vedoucí k embryonální smrti 12,5 den. Ultrastrukturální analýza odhalila, že endoteliální buňky byly zakulaceny a vadně asociovány se základní matrix. Tyto výsledky ukazují, že interakce angiopoetinu 1 s Tie 2 na endotelových buňkách jsou nutné pro dozrávání a stabilizaci vyvíjející se vaskulatury a pro její normální remodelaci. Zvýšená exprese angiopoetinu 1 u transgenních myší způsobuje nadměrnou hypervaskularizaci (354).

Účinky angiopoetinu 2 na endoteliální buňky jsou mnohem komplexnější. V závislosti na kostimulačních molekulách může angiopoetin 2 působit jako pro-, tak jako anti-angiogenní faktor. Původně byl angiopoetin 2 považován za antagonistu angiopoetinu 1 vzhledem k tomu, že blokuje angiopoetinem 1 indukovanou autofosforylací Tie-2 na endotelových buňkách. Tato teorie se opírala o experimenty na transgenních myších, u kterých zvýšená exprese angiopoetinu 2 vedla k letálnímu fenotypu shodnému s fenotypem

angiopoetin 1 a Tie-2 knock-outovaných myší. Na druhou stranu je angiopoetin 2 vysoce vyjádřen na místě vaskulární remodelace u dospělých, zejména v reprodukčním traktu žen, a v bohatě vaskularizovaných nádorech (100). Angiopoetin 2 podporuje formování cévního lumen (240). Dalšími studii bylo možné vysvětlit protikladný efekt angiopoetinu 2 na angiogenezi. Bylo prokázáno, že v přítomnosti VEGF aplikace angiopoetinu 2 působí zvýšení kapilárního průměru, indukuje migraci a proliferaci endotelových buněk a stimuluje pučení nových krevních cév. Naproti tomu při absenci VEGF angiopoetin 2 způsobuje apoptózu endotelových buněk a regresi primitivních cév (212).

Role dalších dvou ligandů Tie 2, angiopoetinu 3 a angiopoetinu 4 jsou méně dobře definovány vzhledem k tomu, že experimenty s knock-outovanými kmeny nebyly dosud provedeny. Angiopoetin 3, stejně jako angiopoetin 1, je vyjádřen na široké škále různých tkání, zatímco vyšší hladiny angiopoetinu 4 byly zjištěny jen v plicních kapilárách. Studie odhalila, že angiopoetin 4, ne však angiopoetin 3, je schopen aktivovat Tie 2 (212).

### ***Destičkový růstový faktor (PDGF)***

PDGF byl původně izolován z krevních destiček (132). Ačkoliv PDGF je přítomen hlavně v  $\alpha$  granulích krevních destiček, další studie prokázaly, že je syntetizován i dalšími, například epiteliálními a endoteliálními buňkami a makrofágy (69, 208). PDGF má důležitý vliv na rozvoj a funkci orgánů (279, 282). PDGF se také podílí na vzniku a rozvoji patologických procesů, jako jsou plicní fibróza, glomerulonefritida, ateroskleróza, agresivní fibromatóza (130, 293, 398). Aberantní produkce PDGF a autokrinní stimulace může sehrát důležitou roli v maligní konverzi buněk, které exprimují PDGF receptory (3). PDGF receptory (PDGFRs) náleží do rodiny tyrozin-kinázových receptorů. PDGFRs jsou tvořeny dvěma samostatnými  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotkami a vyskytují se v homo- a heterodimerické podobě. PDGF se vyskytuje ve formě dimeru tvořeného dvěma polypeptidovými řetězci označovanými A, B, C a D. Řetězce jsou spojeny disulfidickou vazbou a tvoří heterodimery PDGF-AB nebo homodimery PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD (131). PDGFR- $\alpha$  vykazuje vysokou afinitu k A, B a C řetězcům, zatímco PDGFR- $\beta$  se váže výlučně s B a D řetězci. Na rozdíl od PDGF-A a B vyžaduje PDGF-C a D před vazbou na PDGFR proteolytickou aktivaci (36, 206). Po vazbě PDGF jsou oba receptory dimerizovány a následně na svém cytoplazmatickém konci prochází autofosforylací receptorových tyrozinových kináz. Aktivovanou tyrozinovou kinázou je fosforylována řada dalších signálních molekul, které iniciují intracelulární signální kaskádu (213).

Endoteliální buňky exprimují jen PDGF- $\beta$  receptory, které interagují s PDGF-BB. Po stimulaci PDGF-BB proliferují a formují cévní trubice. Tento efekt byl potvrzen jak v experimentálních, tak preklinických studiích, kdy zamezení vazby PDGF na jeho receptory vedlo k potlačení neovaskularizace (205). PDGF-BB je navíc mitogenní pro buňky hladké svaloviny a pericyty a indukuje expresi VEGF a VEGF-R2 na kardiálních endoteliálních buňkách. PDGFR se nachází též na mezenchymálních buňkách, pro které je PDGF silným mitogenem a stimulatorem produkce kolagenu (30, 88). Myši s deficitem receptorové podjednotky PDGF-B nebo PDGFR- $\beta$  umírají perinatálně na otok nebo krvácení, způsobené chyběním vaskulárních nástěnných buněk, což ukazuje na nepostradatelnou úlohu PDGF ve stabilizaci cév (76). Vedle proangiogenního účinku má přímý vliv na růst např. mozkových nádorů (gliomy, glioblastomy, meningeomy) a na gastrointestinální stromální nádory (GISTs) (129). PDGF vykazuje chemoatraktivní efekt i vůči neutrofilům a monocytům.

PDGF se zapojuje do regulační sítě modulující imunitní odpověď na nádorové antigeny. TAMs jsou společně s endoteliemi důležitým zdrojem syntézy PDGF, který hraje důležitou úlohu v onkogenezi a protinádorové imunitní odpovědi (205).

### ***Transformující růstový faktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )***

TGF- $\beta$  je multifunkční cytokin zapojený do regulací proliferace, diferenciaci, migrace a přežívání různých buněčných typů (200). Jeho funkce je závislá na kontextu buněčných pochodů. Až dosud byly popsány tři isoformy TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, které vykazují jak podobné, tak odlišné funkce. TGF-  $\beta$  je sekretován ve formě inaktivních prekurzorů, které vyžadují aktivaci proteázami, nízkým pH nebo trombospondinem. Pouze v aktivní formě je schopen se vázat na specifické serin/threonin kinázové receptory T $\beta$ R-I. a T $\beta$ R-II. typu. T $\beta$ R-II je zastoupen dvěma odlišnými typy activin receptor-like kinas (ALK). ALK 1 je exprimována výlučně na endotelových buňkách a ALK5 se nachází na širokém spektru buněk (71, 364. Aktivační signál, přicházející prostřednictvím T $\beta$ R-I, je vnesen z membrány do jádra prostřednictvím efektoru označovaného jako Smad. Aktivace ALK 1 vede k fosforylaci Smad 1, Smad 5, Smad 8, zatímco aktivace ALK 5 zahajuje fosforylaci Smad 2 a Smad 3 (116). Jak endotelové buňky, tak pericyty současně exprimují TGF-  $\beta$  receptory a produkují TGF-  $\beta$ , což svědčí o autokrinní a parakrinní regulaci účinku TGF-  $\beta$ . TGF-  $\beta$  může podobně jako angiopoetin 2 hrát roli jak angiostatického, tak proangiogenního faktoru. Nízké dávky TGF-  $\beta$ 1 (méně než 0,5 ng/ml) stimulují proliferaci endoteliálních buněk a formování cévního lumen *in vitro*, zatímco vyšší dávky mají opačný efekt. Nízké koncentrace TGF-  $\beta$ 2 nestimulují *in vitro* angiogenezi, ale vyšší dávky indukují formování cév. TGF-  $\beta$  redukuje

degradaci perivaskulární extracelulární matrix indukci inhibitorů proteáz nebo snížením syntézy proteáz. Na druhé straně TGF- $\beta$  stimuluje angiogenezi *in vivo* na rohovkovém vaku a po podkožní aplikaci. Pozoruhodné je, že angiogeneze spuštěná TGF- $\beta$  *in vivo* se realizuje prostřednictvím zapojení prozánětlivých buněk, které postupně uvolňují proangiogenní cytokiny, spíše než přes přímý vliv TGF- $\beta$  na endotelové buňky. TGF- $\beta$  je také zapojen do diferenciací endotelových buněk a buněk hladké svaloviny cév (123). Zatímco se zdá, že migrace a proliferace prekursorových buněk není u TGF- $\beta$ -/- myši ovlivněna, diferenciací do zralých endotelových buněk je vážně porušena. To vede k formování nefunkčních cév s nestabilní cévní stěnou (74).

TGF- $\beta$  inhibuje proliferaci většiny buněčných typů, za jistých podmínek působí apoptózu a může hrát roli v udržování chromozomální stability. Tyto funkce mohou být zodpovědné za tumor-supresivní efekt TGF- $\beta$  během časných stadií maligní transformace. Na druhou stranu schopnost TGF- $\beta$  potlačit protinádorovou imunitní odpověď a podporovat angiogenezi umocňuje nádorovou progresi. Navíc TGF- $\beta$  moduluje interakce mezi buňkou a matrix, které jsou rozhodující pro metastatickou invazi, a může indukovat epiteliálně-mesenchymální přeměnu, čili proces, který v karcinogenezi je spojen s dediferenciací a zvyšuje invazivitu. Maligní buňky se často stávají rezistentní vůči inhibičnímu vlivu tohoto cytokinu na růst, získávají schopnost proliferovat pod vlivem TGF- $\beta$  či samy produkují velké množství TGF- $\beta$  (391).

#### ***Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )***

TNF- $\alpha$  je prozánětlivý cytokin, produkovaný monocyto - makrofágy, astrocyty, fibroblasty a buňkami hladké svaloviny. Má stejný efekt na angiogenezi jako TGF- $\beta$ . V nízkých dávkách podporuje proliferaci endotelových buněk a formování cévního lumen, ve vyšších koncentracích má pak naopak inhibiční vliv. Stejně jako TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  indukuje formování nových cév *in vivo* díky jeho všeobecným prozánětlivým vlastnostem. Angiogenní aktivita TNF- $\alpha$  je signifikantně inhibována interferonem- $\gamma$ .

#### ***Angiogenin***

Angiogenin je protein o m.h. 170kDa. Od ostatních členů rodiny ribonukleáz se liší chyběním 4. disulfidické vazby mezi dvěma cysteinovými rezidui. Obě popsané varianty E a K se váží na receptor nacházející se na endoteliálních buňkách a vykazují proangiogenní efekt (363). První důkaz o vlivu angiogeninu na růst cév podal Fett (1985) na kuřecích embryích vystavených vlivu tohoto proteinu (103). Angiogenin je detekován v řadě orgánů

v průběhu embryogeneze (352). Vykazuje antibakteriální efekt a je součástí přirozené imunity (140). Angiogenin je polypeptid enzymatické povahy, který stimuluje endotelové buňky k produkci prostacyklinu (aktivuje fosfolipázu C a fosfolipázu A<sub>2</sub>), omezuje produkci adhezních molekul (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1). Podobně jako například FGF, EGF, ELR+ CXC-chemokiny a insulin-like growth factor typ 1, indukuje proliferaci širokého spektra buněk, včetně endoteliálních (363). Angiogenin je dalším faktorem, který může podporovat adhezi endotelových buněk svou schopností vázat součásti extracelulární matrix. Nebyl prokázán jeho vliv na migraci a proliferaci endotelových buněk. Přestože zesiluje angiogenezi v chorioalantoické tkáni, v embryogenní tkáni je naopak jeho hladina velmi nízká. U zdravých osob se koncentrace angiogeninu v plazmě pohybuje v rozmezí 250 – 360 ug/L (126). Zvýšení sérové hladiny je pozorováno u reparačních pochodů a u neoplastických procesů (383, 384).

U mnohých solidních nádorů byla nalezena zvýšená hladina angiogeninu, nemocní s vyšší hladinou angiogeninu měli horší prognózu. Dosavadní zkušenosti s jeho využitím v klinické praxi však nejsou jednoznačné (101, 139, 374). Například dvě studie týkající se karcinomu prsu vykazovaly protichůdné výsledky pokud jde o prognózu; zvýšená hladina angiogeninu byla spojena s dobrou prognózou v jedné studii (322) a špatnou prognózou ve studii druhé (95).

Angiogenin je jeden z velmi účinných angiogenních faktorů a zdá se, že má roli v normálním vývoji a poruchách, kde je angiogeneze zapojena. Relativně vysoké hladiny u normálních jedinců naznačují důležitou fyziologickou roli této molekuly.

### ***Integriny***

Integriny jsou rodinou heterodimerických proteinů, které se skládají z různých isoform  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců. Slouží jako adhezivní receptory pro proteiny, které jsou vyjádřeny na povrchu jiných buněk, a pro proteiny extracelulární matrix, jako je kolagen, fibronectin, elastin a laminin. Růstové faktory včetně VEGF a FGF-2 zvyšují expresi řady molekul integrinové rodiny na endotelových buňkách (340). Experimenty s blokujícími protilátkami a antagonisty proti integrinu  $\alpha_v\beta_3$  vedou k hypotéze, že integriny mohou mít různé funkce v angiogenezi. Antagonisté proti integrinu  $\alpha_v\beta_3$  inhibují proangiogenní efekt VEGF a phorbol esterů, ale nemají vliv na FGF-2 signalizaci. Angiogeneze indukovaná VEGF je také dramaticky snížena protilátkami proti  $\alpha_1\beta_1$  a  $\alpha_2\beta_1$  integrinům (319). Na druhou stranu

protilátky proti integrinům  $\alpha_v\beta_3$  inhibují pučení nových cév vyvolané stimulací FGF-2 a TNF- $\alpha$ , ale ovlivňují jen částečně odpověď endoteliálních buněk k VEGF. Ovlivňování protilátek proti integrinům  $\alpha_v\beta_3$  indukuje apoptózu v angiogenních, ale ne v klidových endotelových buňkách, což ukazuje, že je inhibováno jen pučení nových cév bez efektu na preexistující cévy. Aplikace protilátek proti integrinům  $\alpha_v\beta_3$  u křepelčích embryí vede k vývoji defektní cévní sítě s inkompletním formováním cévního lumen. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  také vykazuje zvýšení proliferace endotelových buněk. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  je navíc exprimován ve vyšších hladinách na výběžcích pučících cév v průběhu reparace poraněné tkáně. Vzhledem k tomu, že aktivní forma MMP-2 je vázána s integrinovou molekulou  $\alpha_v\beta_3$ , je prostřednictvím exprese integrinů zajištěna zvýšená koncentrace MMP-2 v čele pučících cév, kde pak může degradovat extracelulární matrix a razit cestu pro nové krevní cévy (78).

### ***VE-cadherin***

Cadheriny jsou superrodinou  $Ca^{2+}$  vázajících transmembránových molekul, které jsou zakotveny v intracelulárním cytoskeletonu a zapojeny do různých mezibuněčných interakcí (9). Funkce cadherinů je modulována cateniny, které se vážou přímo ( $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin, a p120-catenin) nebo jsou spojeny nepřímo ( $\alpha$ -catenin) s intracelulárním koncem cadherinů (68). VE-cadherin, cadherin specifický pro endotelové buňky, je výhradně lokalizován v intercelulárních adhezních junkcích. Po stimulaci VEGF se  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin a p120-catenin stávají vysoce fosforylovanými. Tato modifikace vede k destabilizaci mezibuněčných spojů, což umožňuje buňkám proliferovat (370). V okamžiku, kdy se buňky opět spojí a navodí stav kontaktní inhibice, fosforylace cateninů se dramaticky sníží a mezibuněčné spoje se stabilizují. Tímto VE-cadherin přispívá k udržování stabilní jednoduché vrstvy endoteliálních buněk v cévní stěně. Intracelulárně štěpený VE-cadherin se stává nefunkčním; stále však umožňuje formování primitivní cévní sítě během vaskulogeneze, zatímco následná stadia vývoje cév jsou těžce narušena. Za této situace nedochází k znovunastolení mezibuněčných spojů endotelových buněk, což způsobuje instabilitu cévní stěny. Primitivní kapilární plexus není dostatečně modifikován, aby formoval komplex definitivní cévní sítě. Důsledkem chybění funkčního cadherinu je regrese primitivních cév a necitlivost endotelií k anti-apoptotickým signálům VEGF.

### ***Plateled endothelial cell adhesion molekule 1 (PECAM)***

PECAMs jsou členy Ig superrodiny. PECAM-1 (CD 31) je vyjádřen na destičkách, leukocytech a endotelových buňkách, kde se podílí na zesílení intercelulárních spojů. Exprese

PECAM-1 má podíl na migraci neutrofilů do místa tkáňového poškození, T buněčné aktivaci, agregaci destiček a angiogenezi (284). Podobně jako VE-cadherin, PECAM-1 mediované mezibuněčné interakce jsou v podmínkách *in vitro* nezbytné pro organizaci endotelových buněk v tubulární útvary. Injekce PECAM-1 specifických protilátek myším vedou k nápadnému zvýšení prostupnosti stěn krevních cév. Důležitost PECAM-1 pro angiogenezi byla podpořena pozorováním, že blokující protilátky namířené proti PECAM-1 zrušily cytokiny a nádorem indukovanou angiogenezi *in vivo* (51).

### ***Epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )***

Jak epidermal growth factor (EGF), tak transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) se váží na EGF-receptor (EGFR). EGFR patří k erb-B rodině receptorů tyrosinových kináz. Aktivace EGFR signální cesty v nádorových buňkách je spojena se zvýšením buněčné proliferace, angiogeneze, metastazováním a se snížením apoptózy (27). EGF signalizace je nezbytná k fyziologické angiogenezi. Po EGF stimulaci na různých liniích buněk rakoviny prostaty dochází k zvýšení VEGF závislému na dávce EGF (291). Vedle tohoto nepřímého efektu mají EGF a TGF- $\alpha$  přímé mitogenní vlivy na endotelové buňky a vykazují podporu angiogeneze *in vivo* při biologických zkouškách u křečků. Aplikace blokujících protilátek vede ke snížení vaskulární denzity a zvýšení apoptózy endotelových buněk (169).

### ***Jiné stimulatory angiogeneze***

Role řady dalších molekul, které jsou spojeny s angiogenezí, není detailně charakterizována nebo jejich vliv na angiogenezi není tak jednoznačný a nezbytný jako u faktorů diskutovaných výše. G-CSF a GM-CSF podporuje růst prekurzorových buněk a diferenciaci angioblastů v endotelové buňky. Oba mají vliv i na proliferaci zralých endotelových buněk a jejich migraci.

Angiotropin není pro endotelové buňky mitogenní, ale podporuje formování cévního lumen a stimuluje angiogenezi v chorioalantoické membráně a rohovce zvířat.

Insulin-like-growth-factor (IGF) stimuluje syntézu VEGF a urokinázového aktivátoru plasminogenu na buňkách linií karcinomu prsu (264). Přenesení buněk karcinomu tlustého střeva se zkráceným, dominantně negativním IGF-receptorem snižuje u Nu/Nu myši expresi VEGF a snižuje novotvorbu cévní sítě. Při jeho úplné absenci je signifikantně sníženo i množství pericytů (292).

Hepatocyte growth factor (HGF) byl původně izolován jako hepatocytární mitogen, ale později byl popsán jeho stimulační vliv na další buněčné typy. V endotelových buňkách a



buňkách hladké svaloviny cév indukuje HGF migraci, proliferaci a chrání buňky před apoptózou. Velmi zajímavého výsledku bylo dosaženo vnesením HGF genů do endotelí plicní artérie. Došlo k indukci angiogeneze v plicích potkana a ke zvýšení kapilární denzity a krevní perfuze *in vivo* (266).

Tkáňový faktor a faktor V se také podílejí formování nových cév. Myší embrya s chyběním nebo funkční poruchou těchto proteinů umírají v důsledku nedostatečné vaskularizace žloutkového vaku.

Erythropoietin stimuluje v *in vitro* podmínkách proliferaci endotelových buněk a formování lumen novotvořených cév (15). Aplikace solubilního erythropoietinového receptoru nebo protilátky proti erythropoietinu do nádorů vycházejících z ženských reprodukčních orgánů indukuje apoptózu nádorových a endotelových buněk. Konečným výsledkem je výrazný pokles kapilární denzity v nádorové tkáni (404).

### ***Matrix metaloproteázy (MMPs)***

MMPs patří do rodiny nejméně 21 lidských zinek-dependentních, vysoce konzervovaných endopeptidáz, schopných degradace komponent extracelulární matrix (ECM). Degradace ECM je důležitá při fyziologických procesech, jako je hojení tkání či růst orgánů během vývoje. Důležitou roli však také hrají pro nádorovou invazivitu a metastazování (63).

Na základě své substrátové specifity a struktury jsou MMP klasifikovány do pěti podskupin: kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinázy (MMP-2, MMP-9), stromelysiny (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metaloelastázy (MMP-12), membránově typové MMPs (MT1-MMP-MT5-MMP) a jiné MMPs (MMP-19, MMP-20). Substrátová specifita odlišných MMPs je dána jejich schopností *in vitro* degradovat různé komponenty ECM. Většina MMP je sekretována ve formě neaktivních zymogenů (pro MMPs), které jsou extracelulárně proteolyticky aktivovány (s výjimkou MMP-11 a MT1-MMP neboli MMP-14, které jsou aktivovány primárně sekrecí furin-like proteázami asociovanými s Golgiho aparátem).

Aktivita MMPs je kontrolována rodinou přirozených inhibitorů- tkáňovými inhibitory matrix metaloproteináz (TIMPs). Dosud byly popsány čtyři členové této rodiny. Ačkoliv tyto inhibitory vykazují velmi podobné inhibiční aktivity vůči proteinům MMP rodiny, liší se v mnohých aspektech (např. interakce s proMMP, solubilita, regulace exprese a tkáňově-specifická exprese). Zatímco se předpokládá, že většina biologických efektů TIMPs je

zprostředkována nepřímo inhibicí MMPs, u TIMP-2 byl prokázán podporující i inhibující vliv na růst. TIMP-3 je zapojena v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci a stárnutí (45).

Zvýšená exprese MMPs je zjišťována u různých lidských karcinomů, jako je karcinom žaludku, plic, prostaty a prsu. Klinickopatologické studie vykazují korelace mezi produkcí TIMP a MMP, maligní progresí a kratším přežíváním u různých nádorových typů.

#### 4.2.2. Angiostatické faktory

##### *Angiostatin*

Angiostatin je cirkulující inhibitor angiogeneze, který je odvozený od plasminogenu. Plasminogen sám o sobě nevykazuje angiostatický efekt. Proteolytickým odštěpením prvních čtyř domén vzniká angiostatin, který inhibuje angiogenezi. Angiostatin byl původně izolován z moči a séra myších modelů pro Lewis(ús) plicní karcinom. Angiostatin vzniká z cirkulujícího plasminogenu působením proteáz MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-12 (283). Tímto způsobem mohou mít MMPs opačný efekt na angiogenezi. Na jedné straně podporují cévní pučení degradací perivaskulární extracelulární matrix, na druhé straně přispívají k uvolnění angiostatinu, účinného inhibitoru angiogeneze. Angiostatin blokuje proliferaci, migraci, diferenciaci a formování trubicových struktur endotelovými buňkami v *in vitro* podmínkách. Přerušením přechodu G2/M fáze buněčného cyklu inhibuje migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny stimulovanou hepatocyte-growth faktorem. Navíc systémové podání angiostatinu pevně blokuje neovaskularizaci a růst nádorových metastáz. Mechanismus účinku není přesně znám. Jedním z uvažovaných mechanismů je vazba angiostatinu na podjednotky ATP syntetázy přítomné na buněčném povrchu endotelových buněk, která zablokuje energetický přísun aktivovaným buňkám a inhibuje tak jejich proliferaci a migraci. Angiostatin může také působit prostřednictvím vazby na integrin  $\alpha_v\beta_3$ , čímž naruší  $\alpha_v\beta_3$ -mediovanou signální transdukcí, která může být nezbytná pro angiogenezi (361). Kromě toho jako kompetitivní antagonistu inhibuje angiostatin odpovědi endotelových buněk a hladkých svalových buněk na stimulaci hepatocyte growth faktorem, zatímco nemá vliv na VEGF- nebo bFGF-indukované signální dráhy (380).

##### *Endostatin*

Endostatin je jiným příkladem inhibitoru angiogeneze, který vzniká proteolytickým štěpením neaktivního prekurzoru. Bylo prokázáno, že elastáza a cathepsin L, ne však MMPs, mohou vytvářet endostatin z kolagenu XVIII (102). Endostatin byl poprvé izolován z buněčné

linie hemangioendoteliomu jako silný inhibitor angiogeneze a nádorového růstu *in vivo*. Endostatin také blokuje migraci a proliferaci endotelových buněk a zvyšuje jejich apoptózu. Kromě toho redukuje angiogenezi indukovanou FGF-2 a VEGF, snižuje syntézu VEGF v nádorových buňkách. Současné podání endostatinu s tropomyosinem vede k narušení integrity buněčných mikrofilament, jehož důsledkem je ztráta buněčné motility (221). Další důkaz pro angiostatický vliv endostatinu přinesl experiment na zvířecím modelu, ve kterém myši s poraněním kůže v celé tloušťce byl systémově aplikován endostatin. Na tomto modelu nebyla makroskopicky změněna cévní denzita a nebyly pozorovány abnormality v hojení poranění. Mikroskopická analýza však odhalila těžké abnormality v nově formovaných i reparovaných poraněných cévách, které byly zúženy nebo uzavřeny s nepravidelným povrchem lumen a rozpadem cévní stěny (40).

### ***Trombospondin (TSP)***

Trombospondiny jsou glykosylované proteiny extracelulární matrix, které se účastní interakcí buňka-buňka a buňka-matrix. Do rodiny TSP náleží pět členů, TSP 1-4 a TSP-5, který je také znám jako cartilage oligometric matrix protein (COMP) (199). Dva členové TSP rodiny, TSP-1 a TSP-2, vykazují výrazné angiostatické vlastnosti. TSP-1 je velmi efektivní inhibitor angiogeneze, který může zabránit neovaskularizaci rohovky již v koncentracích nižších než  $10^{-9}$  molů/litr. *In vitro* TSP-1 inhibuje migraci a proliferaci endotelových buněk, indukuje jejich apoptózu a blokuje formování cévních trubic (157). Kromě toho se endotelové buňky působením TSP-1 stávají refrakterními ke stimulaci VEGF a FGF-2. Angiostatický efekt a indukce apoptózy vyžaduje následující kroky: vazbu TSP-1 na transmembránový receptor CD36, na jehož cytoplazmatické části je aktivovaná kináza p59<sup>fyn</sup> z Src rodiny, následnou aktivaci kaspázy-3 a kinázy MAPKs (mitogen-activated protein kinasise). Zajímavá je *in vivo* aktivace angiogenní molekuly TGF- $\beta$ 1 vazbou TSP-1 s LAP (latency associated peptid), nacházejícím se uvnitř prekurzorového komplexu TGF- $\beta$ . Tato vazba indukuje konformační změny, usnadňující proteolýzu TGF- $\beta$  prekurzorové molekuly, vedoucí k uvolnění aktivního TGF- $\beta$  (259). Navzdory vysoké strukturální podobnosti TSP-1 a TSP-2 jsou jejich vlivy na angiogenezi rozdílné. Transfekce TSP-2 do buněk lidského skvamózního karcinomu vedla po jejich vpravení do kůže *nude* myši k významně výraznější inhibici růstu nádoru než v případě transfekce TSP-1. Ačkoliv exprese VEGF nádorovými buňkami zůstala beze změny, nižší cévní denzita a menší průměr nádorových cév byly významné. Naproti tomu v jiném pokusu se TSP-1 jevil jako účinnější než TSP-2 v inhibici angiogeneze na potkaních rohovkách (377).

### ***Pigment epithelium-derived factor (PEDF)***

Nedávno byl identifikován další účinný angiostatický faktor, pigment epithelium-derived factor (PEDF), který reguluje růst krevních cév sítnice. PEDF byl izolován z buněčné kultury retinálních pigmentových epitelových buněk. PEDF byl považován za neurotropní faktor, který inhibuje proliferaci gliových buněk. Následně byl prokázán jeho inhibiční vliv na migraci a proliferaci endotelových buněk. Podobně jako TSP-1 působí v koncentracích  $<10^{-9}$  molů/litr. Mechanismus jeho účinku není přesně znám; inhibuje angiogenezi indukovanou růstovými faktory jako VEGF a FGF-2 a patrně inhibuje cytokiny indukovanou neovaskularizaci v potkaní rohovce. Zablokování účinku PEDF aplikací PEDF neutralizujících protilátek na potkaní rohovku je provázeno tvorbou a vrůstáním cév do rohovky dokonce i bez přítomnosti exogenních stimulů (67).

## **5. NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE**

Angiogeneze je důležitým procesem doprovázejícím růst nádorů. Nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout nejvýše rozměru 1-2 mm<sup>3</sup> (obr.č.4). V průběhu avaskulárního stadia je dodávání kyslíku a výživných látek zajišťováno difúzí. Jakmile velikost nádoru přesáhne průměru 0,5 mm, je nutrice zajišťovaná difúzí nedostatečná (360). Hypoxický nádor je geneticky nestabilní (57). Vznikají mutace - např. mutace genu p53, a tím potlačení antiangiogenního trombospondinu. Objevuje se nový genotyp se zvýšenou produkcí angiogenních faktorů (VEGF a další). Tato změna, označovaná jako angiogenní „switch“, zahajuje proces angiogeneze (obr.5). V nádorové populaci vznikne angiogenní klon. Humorální podněty z nádorových angiogenních buněk indukují migraci endotelií směrem k nádorovému ložisku. Dochází k rozrušení bazální membrány vlivem proteolytických enzymů produkovaných nádorovými buňkami, vlivem kolagenázy IV. typu, aktivátoru plasminogenu a stromelyzinu produkovaných endoteliemi a stromálními buňkami. Rozrušení bazální membrány usnadňuje migraci endotelií, ale i migraci nádorových buněk a jejich metastazování. Z cév uniká fibrinogen a plasminogen. Vlivem tkáňových aktivátorů vznikají extravaskulární depozita fibrinu, vytvářející podpůrnou matici pro růst novotvořené cévy. Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho perfuzi a další růst (obr.6). Nádorové buňky a endotelie se vzájemně parakrinně ovlivňují. Endotelie produkují větší počet mitogenů a motogenů (působků ovlivňujících motilitu). Je to zejména bFGF, PDGF, IGF-1 a IGF-2 (184).

V průběhu vaskulárního stadia nádorové angiogeneze probíhá těchto šest fází (25):

1. změny v poměru angiogenních a antiangiogenních faktorů,
2. morfologické změny endoteliálních buněk,
3. uvolnění proteolytických enzymů,
4. migrace endoteliálních buněk a kapilární morfogeneze,
5. reprodukce endoteliálních buněk,
6. mikrovaskulární diferenciaci.

Mezi cévami zdravých tkání a cévami zásobujících nádory jsou signifikantní rozdíly, týkající se endoteliálních buněk, cévní stěny a basální membrány. Mnohé endotelové buňky nádorových cév jsou v mitóze a ztratily některé strukturální charakteristiky normálních endoteliálních buněk. Basální membrána novotvořených nádorových cév je tenčí než u normálních cév. Nádorové cévy mají větší propustnost, většinou není pozorováno vyzrávání novotvořených kapilár. Svalové a nervové komponenty, odpovědné za systolickou a diastolickou reaktivitu vůči vasoaktivním podnětům, se na nádorových cévách nenacházejí (106, 228). Nádorové cévy se klikatí, mají nedostatek pericytů.

Mezi normálním a nádorovým endotelem se nacházejí i další rozdíly (39, 46, 92, 171, 323). Fenotyp nádorového endotelu může být různý uvnitř jednoho tumoru. Signifikantně je zvýšena exprese integrinů  $\alpha_v\beta_3$  a  $\alpha_v\beta_5$  (111, 351). U karcinomu prsu byla prokázána zvýšená exprese  $\alpha_v\beta_3$  jako markeru aktivace endotelia (275). Na aktivovaném endotelu jsou deregulovány E-selectin, endoglin, glykoproteiny jako PSA (prostatický antigen), ED-B doména fibronektinu a různé proteázy.

Molekuly s rozdílnou expresí na endotelu nádorových a normálních cév jsou (25):

1. VEGF receptory,
2. integriny:  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,
3. peptidy,
4. adhezní molekuly: E-selektin, endoglin,
5. glykoproteiny: PSA,
6. proteázy.

Nádorové buňky mohou exprimovat proangiogenní a/nebo antiangiogenní faktory. Za fyziologických okolností je angiogeneze kontrolována vyvážeností těchto faktorů. Tato rovnováha je porušena u malignit. Výsledkem je podpora angiogeneze. Ke zvýšené expresi

angiogenních faktorů dochází na podkladě různých stimulů. Nejvíce studovaným podnětem je hypoxie (203, 381), která vede ke zvýšené expresi VEGF i dalších angiogenních faktorů (203, 255). Hypoxii je možno nazvat klíčem k angiogenezi. Hypoxií indukované faktory (HIF-1 a HIF-2) jsou heterodimerické transkripční faktory skládající se z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek (155, 310, 381). Tumory HIF-1<sup>-/-</sup> mají sníženou hypoxií indukovanou expresi VEGF a jsou méně vaskularizovány, ale mají akcelerovaný růst *in vivo* ve srovnání s tumory HIF-1<sup>+/+</sup> díky poklesu hypoxií indukované apoptózy (52). Cytokiny a růstové faktory jako IGF-1, EGF, IL-1 mohou zvýšenou regulací VEGF indukovat angiogenezi (6).

Existuje úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz. Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je riziko metastáz větší a prognóza nádorového onemocnění horší. Expanze nádorových cév vede ke zvýšení pravděpodobnosti průniku nádorových buněk do cirkulace a formování metastáz ve vzdálených orgánech. Tato hypotéza, resp. závislost mezi intenzitou cévní novotvorby a frekvencí vzniku metastáz, byla ověřena mnohými klinickými studiemi (386, 409). Uvedený poznatek má své praktické důsledky, neboť stupeň angiogeneze může posloužit jako užitečný prognostický faktor. Mnohé studie dokazují prognosticky významný význam exprese VEGF (151, 153, 262, 267, 313, 336, 359, 397, 410). Vysoká hladina exprese VEGF koreluje s hustotou cévní sítě, zvyšuje pravděpodobnost recidivy a zkrácení přežívání u některých nádorů. Některé studie u renálního karcinomu neprokázaly závislost mezi sérovou hladinou VEGF a prognózou tumoru (32), jiné neprokázaly rozdíl mezi sérovou hladinou VEGF u solitárního renálního karcinomu a metastazujícího renálního karcinomu (24). Poslední studie prokazují závislost mezi expresí VEGF a stupněm infiltrace tumoru T lymfocyty (358). Mnohé studie dokumentují zvýšené plasmatické koncentrace VEGF u pacientů s nádorovým onemocněním na rozdíl od zdravých lidí. Ki Hak Song a kol. porovnávali, co je v případě renálního karcinomu lepším prognostickým faktorem - zda hustota cévní sítě či hladina VEGF v séru nemocných. Výsledek zněl - hustota cévní sítě (341).

Stanovení cirkulující hladiny VEGF-A má význam pro odhad prognózy onemocnění (211, 272, 314). Ve studii Paradise a kol. (272) byla prokázána korelace mezi expresí VEGF u konvenčního renálního (ne u papilárního) karcinomu, buněčným gradingem a velikostí nádoru, mezi VEGF expresí a stupněm mikrovaskularizace. Přežití pacientů, u nichž byla prokázána vysoká exprese VEGF, bylo nižší než u druhé skupiny. Naopak studie Beeckena a kol. (32) neprokázala význam stanovení sérové hladiny VEGF pro odhad prognózy a terapeutického efektu. Sung-Goo Chang a kol. sledovali hladinu VEGF v moči u pacientů

s renálním karcinomem, která byla zvýšena, ale zvýšení nekorelovalo s angiogenní aktivitou (146).

Stále je diskutováno, zda generace novotvořených cév zásobujících tumor vzniká na podkladě angiogeneze (tj. je tvořena zralými endoteliálními buňkami) nebo vaskulogeneze (progenitorové buňky). Mnohé preklinické modely ukazují, že některé tumory mohou být závislé na vaskulogenezi (lymfomy, nediferencovaný karcinom prostaty), zatímco jiné jsou spojeny s angiogenezí (kožní tumory, diferencovaný karcinom prostaty).

## **6. CHEMOKINY**

### **6.1. Chemokiny a jejich receptory**

Ačkoliv chemokiny jsou především leukocytární atraktanty, vzrůstající množství důkazů ukazuje, že také přispívají k množství procesů spojených s nádorem, jako je růst nádorových buněk, angiogeneze/angiostáza, lokální invaze a metastazování. Chemokiny reprezentují rodiny molekul chemotaktických cytokinů s malou molekulovou vahou (8-14kDa), které se vážou na receptory asociované s G-proteinem. Strukturálně jsou chemokiny rozděleny do čtyř velkých podrodin (CXC, CC, CX3C, a C) podle uspořádání čtyř na cystein bohatých proteinových zbytků nacházejících se v N-terminální oblasti. Mezi prvními dvěma cysteinovými molekulami mají CC, CXC a CX3C chemokiny žádné, jeden, nebo tři nekonzervované aminokyselinové zbytky. V případě CC chemokinů chybí první a třetí ze čtyř uchovaných zbytků. V současnosti je známo přibližně 50 členů chemokinové rodiny, CC a CXC chemokiny tvoří většinu. Každý receptor váže ligandy pouze jedné ze čtyř strukturálních výše popsaných podrodin, a proto jsou receptory také rozděleny do čtyř podrodin (375).

### **6.2. Nomenklatura chemokinů**

Názvosloví chemokinů zpočátku vycházelo z názvů, kterými byly chemokiny pojmenovány v různých laboratořích, které je identifikovaly a/nebo charakterizovaly. V důsledku toho měly jednotlivé chemokiny mnoho synonym, které byly zdrojem řady nejasností. Z toho důvodu byl před několika lety formulován nový nomenklaturní systém. V názvu chemokinů za strukturálním kódem (CXC, CC, CX3C, nebo C) následují písmena „L“ (ligand) pro každý chemokin (např. CXCL1), nebo písmeno „R“ (receptor) pro každý receptor (např. CXCR1) (413). Tento jednoduchý číselný systém byl aplikován pro téměř 50 chemokinů a 20 receptorů. I tak je často těžké, dokonce i pro ty, kteří aktivně pracují v této

oblasti, korelovat poněkud nepopisné číselné kódy se známými chemokiny a jejich receptory. Proto se stále v literatuře objevují i původně zavedené termíny. Přehled chemokinů a jejich receptorů ukazuje tabulka č.1.

Chemokiny mohou být také klasifikovány do velkých skupin na podkladě jejich funkce a charakteru exprese na zánětové a regulační zajišťující homeostázu. Prozánětlivé chemokiny nejsou konstitutivně exprimovány, ale jsou indukovány a zvýšeně regulovány zánětlivými stimuly, což následně vede ke vstupu leukocytů do místa zánětu. Jejich exprese je pod přísnou kontrolou lokálních prozánětlivých cytokinů. Naopak homeostatické chemokiny jsou konstitutivně vyjádřeny na různých typech buněk a tkání, a hrají podstatnou roli v rozvoji a udržení homeostázy hemopoetického a imunitního systému. Tyto chemokiny jsou často nazývány lymfoidní chemokiny, protože působí preferenčně na lymfocyty, ačkoli některé z nich působí také na dendritické buňky. Funkční klasifikace na zánětlivé a homeostatické je jednoduchá a velmi užitečná pro pochopení biologického významu každého chemokinu. Zůstalo však několik chemokinů, které nepatří do žádné z těchto skupin, ale spíše sdílejí vlastnosti obou. Proto se nazývají „dvoufunkční chemokiny“ (245). Jsou zvýšeně regulovány po expozici zánětlivými stimuly a hrají důležitou roli ve vstupu různých lymfocytárních subsetů do odpovídajících tkání v průběhu imunitních odpovědí. Charakteristickým znakem dvoufunkčních a homeostatických chemokinů je vazba těchto chemokinů na jediný receptor, exprimovaný hlavně na lymfoidních buňkách, zatímco zánětlivé chemokiny se vážou k četným receptorům. Platí též, že receptory pro zánětlivé chemokiny vážou různé chemokiny (receptorová promiskuita).

### **6.3. Role chemokinů a jejich receptorů v nádorové biologii, angiogenezi a angiostáze**

Ačkoliv chemokiny byly původně charakterizovány jako atraktanty leukocytů, nyní je obecně známo, že každý buněčný typ může exprimovat chemokiny nebo chemokinové receptory. Pozornost přitahuje jejich exprese na nádorových buňkách. Je nepochybné, že chemokiny se podílí na invazi a metastazování maligních buněk. Stále přibývá dokladů, že důležitější než role chemoatraktantů pro leukocyty je vliv na růst nádorů, progresi a metastazování (288).

Nově nalézané důkazy dokládají, že chemokiny se přímo podílejí na transformaci, přežívání a růstu nádorových buněk. Některé chemokiny, včetně CXCL1/Gro $\alpha$ /MGS $\alpha$  a CXCL8/IL-8, se vážou nejen na přirozený receptor CXCR2, ale také na receptory asociované s G-proteinem (GPCR) kódované tumorigenními viry, jako je například s Kaposiho



sarkomem asociovaný herpes virus-8 (HHV-8). Transgenní exprese HHV8-kódovaného receptoru vede u myši k rozvoji angioproliferativních lezí, podobných Kaposiho sarkomu (402), což ukazuje na to, že chronická a nadměrná signalizace přes CXCR2-podobné GPCR podporuje onkogenní buněčnou transformaci.

CXCR2 přenáší autokrinní buněčný růstový signál v několika typech nádorových buněk. Několik prokázaných linií melanomových buněk produkuje CXCL1/Gro $\alpha$ /MGS $\alpha$  (277) a CXCL8/IL-8 a konstitutivně exprimuje jejich přirozený receptor CXCR2. Zablokování buď ligandů nebo jejich receptorů vede k inhibici buněčného růstu (277, 372). Obdobná pozorování byla uskutečněna u jiných typů nádorových buněk (14). Tyto výsledky ukazují, že chemokiny produkované nádorovými buňkami mohou za jistých podmínek fungovat jako autokrinní a /nebo parakrinní růstové faktory.

V některých situacích poskytují chemokiny signály k přežití nádorových buněk. Například CXCL12/SDF-1 $\alpha$  a CXCL9/MIG mohou zvýšit přežívání CXCR4 a CXCR3-exprimujících buněk, respektive růst v suboptimálních podmínkách, jako je nízká sérová koncentrace růstových faktorů (165, 411).

Chemokiny mohou ovlivňovat růst nádoru nejen přímo, ale také nepřímo podporou nebo inhibicí angiogeneze.

CXC chemokiny jsou proteiny, které obsahují čtyři vysoce konzervované cysteinové aminokyselinové zbytky, z nichž první dvě cysteinové molekuly jsou odděleny jedním nekonzervovaným aminokyselinovým zbytkem. CXC motiv rozlišuje tuto rodinu od ostatních chemokinových rodin, druhá strukturální doména určuje jejich angiogenní aktivitu. NH<sub>2</sub> konec většiny CXC chemokinů obsahuje ELR motiv tvořený třemi aminokyselinami (Glu-Leu-Arg), který předchází první cysteinovou molekulu v primární struktuře těchto chemokinů. Členové rodiny, která obsahuje ELR motiv (ELR<sup>+</sup>) silně podporují angiogenezi. Naproti tomu chemokiny indukované interferony, které nemají ELR motiv (ELR<sup>-</sup>), jsou silnými inhibitory angiogeneze. Členové CXC chemokinové rodiny mohou buď podporovat nebo inhibovat angiogenezi a nerovnováha lokální exprese těchto chemokinů je jednou z důležitých faktorů angiogeneze jak za fyziologických, tak i patologických podmínek (414).

#### **6.4. Angiogenní (ELR<sup>+</sup>) CXC chemokiny**

Do CXC chemokinové rodiny, která vykazuje angiogenní vlastnosti, je zahrnován interleukin-8 (IL-8), epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78), growth-related genes (GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2), NH<sub>2</sub>-koncově zkrácený plateled basic protein (PBP), connective tissue activating protein-III (CTAP-III), beta-

thromboglobulin ( $\beta$ -TG) a neutrophil activating protein-2 (NAP-2). ELR<sup>+</sup> CXC chemokiny přímo indukují *in vitro* chemotaktické a proliferační aktivity endotelových buněk a angiogenezi (4). Jejich biologické účinky se projevují i bez přítomnosti dalších, prozánětlivých faktorů. Angiogenní aktivita ELR<sup>+</sup> CXC chemokinů je odlišná od jejich schopnosti indukovat zánět.

Angiogenní účinek všech chemokinů je zprostředkován prostřednictvím specifických CXC chemokinových receptorů. Za kandidátní ELR<sup>+</sup>CXC chemokinové receptory byly považovány CXCR1 a CXCR2. Pouze IL-8 a GCP-2 se specificky vážou na oba receptory, zatímco všechny ostatní ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny se vážou k CXCR2. Následné studie potvrdily, že CXCR2 receptor je klíčový pro zprostředkování angiogenní aktivity ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů (128). Je vysoce pravděpodobné, že exprese CXCR2 na endotelových buňkách za přítomnosti trvalé autokrinní (endotelium), juxtakrinní (endotelium) a parakrinní (nádorové buňky nebo jiné stromální buňky) stimulace ELR<sup>+</sup> CXC chemokiny má zásadní dopad na podporu angiogeneze. Na základě těchto pozorování je CXCR2 považován za klíčový chemokinový receptor zprostředkovávající ELR<sup>+</sup>CXC angiogenní aktivity (168).

ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny jsou důležitými mediátory tumorigeneze a s nádory spojené angiogeneze. Ve studii, ve které GRO- $\beta$  vykazoval inhibující efekt na angiogenezi, byla použita 1000 krát vyšší koncentrace (1-10 $\mu$ M) chemokinů, než u jaké byla prokázána angiogenní aktivita (1-10nM). Uvedený nálezn by mohl nasvědčovat tomu, že nefyziologicky zvýšená koncentrace GRO- $\beta$  může snižovat angiogenní odpověď. Kromě toho výsledky studií melanomových buněk dokládají, že GRO hraje významnou roli v regulaci tumorigeneze jak přímými mitogenními, tak angiogenními aktivitami. GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , a - $\gamma$  jsou vysoce exprimovány na buňkách lidského melanomu (217). Přenesení genů kódujících GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , a - $\gamma$  do immortalizovaných myších melanocytů vedlo k trvalé expresi GRO v těchto buňkách s transformací jejich genotypu vykazující *in vitro* růst nezávislý na mezibuněčných spojeních. Přenesení těchto buněk do *Nu/Nu* myší a SCID myší bylo provázeno tvorbou nádorových uzlů. Nádory byly vysoce vaskularizovány podobně jako v případě kontrolních B16 melanomových buněk (217). Je-li exprese GRO redukována nebo chybí-li zcela, je patrná výrazná redukce angiogeneze následovaná inhibicí nádorového růstu. GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , a - $\gamma$  a patrně i ostatní ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny mají schopnost se uplatňovat jako autokrinní růstové faktory pro melanom i jako účinné parakrinní mediátory angiogeneze podporující tumorigenezi a metastazování (34).

Progrese a růst ovariálního karcinomu je také závislý na angiogenezi. Důležitá role mediování angiogeneze a tumorigeneze lidského ovariálního karcinomu je přisuzována IL-8.

Buněčné linie vycházející z ovariálních nádorů exprimují podobné hladiny bFGF, ale liší se v expresi IL-8 a VEGF (406). Peritoneální implantace buněk s vysokou expresí IL-8 *Nu/Nu* myším byla spojena s časným úhynem zvířat. Expresie IL-8 byla v přímé korelaci s neovaskularizací a v inverzní korelaci s přežitím zvířat. Naproti tomu exprese VEGF byla pouze v korelaci s tvorbou ascitu. U VEGF a bFGF nebyla potvrzena žádná korelace s nádorovou neovaskularizací ani s délkou přežití (406). Experimentální nálezy byly doloženy i klinickými pozorováními u nemocných s ovariálními nádory, kdy ascitická tekutina vykazovala angiogenní aktivitu závislou na IL-8. Tyto nálezy podporují představu, že v mediování angiogeneze spojené s ovariálním karcinomem hrají angiogenní ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny důležitější roli než bFGF a VEGF.

Aktivita IL-8 je nápadně zvýšena i u nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) a přispívá k podpoře angiogeneze spojené s nádorem (147). Neutralizace CXCL specifickými protilátkami ruší na nádorech závislou angiogenní aktivitu (338) a růst nádoru u myši se SCID (350), což podporuje hypotézu, že angiogenní chemokiny hrají roli v podpoře nádorového růstu *in vivo*. V experimentu na zvířecím modelu bylo dokázáno, že hladina nádorem produkovaného IL-8 přímo koreluje s tumorigenezí. Zablokování IL-8 bylo spojeno s více jak 40% redukcí nádorového růstu a snížením frekvence spontánních metastáz. Potlačení růstu nádoru a jeho metastazování přímo korelovalo s redukcí angiogeneze. Tyto nálezy byly dále potvrzeny studiem několika lidských NSCLC linií buněk na *Nu/Nu* myších. NSCLC buněčné linie, které konstitutivně exprimují IL-8, vykazují větší tumorigenicitu, která přímo koreluje s angiogenezí.

Kromě IL8 byla u NSCLC pozorována korelace CXC chemokinu ENA-78 s nádorovou angiogenezí (10). V imunohistochemickém stanovení korelovala exprese ENA-78 s mikrokapilární denzitou v nádoru. U myšího modelu SCID s přeneseným lidským NSCLC korelovala exprese ENA 78 s nádorovým růstem. Zablokování ENA-78 vedlo u SCID myši nesoucích NSCLC ke zpomalení růstu nádoru a signifikantně byl potlačen i rozvoj metastáz. U inhibice angiogeneze je pozorována zvýšená apoptóza nádorových buněk. Přítomnost ENA-78 neovlivnila proliferaci NSCLC buněk jak v *in vivo*, tak v *in vitro* podmínkách. Deplece ENA-78 nezastavila úplně nádorový růst. Tato pozorování nasvědčují tomu, že angiogenní aktivita NSCLC, ale pravděpodobně i dalších nádorů, je regulována působením většího počtu překrývajících se a možná nadbytečně produkovaných faktorů působících současně (281, 389).

Tumorigeneze a metastazování karcinomu prostaty je též závislé na angiogenezi. U pacientů s karcinomem prostaty byly nalezeny zvýšené sérové hladiny IL-8 (175). Hladiny

IL-8 nápadně koreluje se stadiem choroby, ale nezávisí na změnách poměru volného a celkového specifického prostatického antigenu. Ve skutečnosti kombinace poměru volný/totální PSA a hladiny IL-8 měla vyšší výpovědní hodnotu v rozlišení karcinomu prostaty od benigní hypertrofie prostaty. Testování biologických vlastností různých linií buněk lidského karcinomu prostaty prokázalo konstitutivní produkci angiogenních faktorů z rodiny ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů (241). Bylo doloženo, že tumorigeneze linie buněk lidského karcinomu prostaty, PC-3, je závislá na IL-8. Zablokování endogenního IL-8 inhibuje nádorový růst buněk PC-3 linie. Jiná linie buněk lidského karcinomu prostaty, Du145, vyžaduje přítomnost GRO- $\alpha$ . Konsumpce endogenního GRO- $\alpha$ , ale ne IL-8, redukuje nádorový růst, který přímo souvisí s angiogenní aktivitou nádoru. A tak různé linie buněk karcinomu prostaty mohou vyžadovat odlišné CXC chemokiny k mediování jejich tumorigenního potenciálu. Podobné nálezy byly učiněny u karcinomu žaludku (180).

U karcinomu prostaty byly signifikantní hladiny CXCL8 pozorovány v nádorových buňkách, ale ne v normálních nebo benigních hyperplastických buňkách. Sérová koncentrace CXCL8 a hladiny CXCL8mRNA ve vzorcích po radikální prostatektomii pozitivně koreluje s pokročilostí patologického stadia (369). Zajímavé je, že anti-CXCL8 protilátky efektivně inhibují tumorigenezi a s nádorem spojenou angiogenezi u buněčné linie PC-3 karcinomu prostaty produkujících CXCL8 u myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID). Naproti tomu anti-CXCL1 protilátky inhibují růst CXCL1 pozitivních buněk nádorové linie Du145 karcinomu prostaty (241).

### **6.5. Angiostatické (ELR-) CXC chemokiny**

Do skupiny angiostatických CXC chemokinů náleží PF-4 (platelet factor-4), MIG (monokine induced by interferon- $\gamma$ ), interferon- $\gamma$ -inducible protein (IP-10) a stroma cell-derived factor (SDF-1). Mechanismus jejich účinku není zcela znám.

U SDF-1 není jednoznačné, zda blokuje nebo za určitých podmínek podporuje angiogenezi. Je známo, že SDF-1 indukuje *in vitro* migraci endotelových buněk lidské pupeční vény (311). V myším modelu zvířata s mutací SDF-1 genu perinatálně hynou pro cévní anomálie a srdeční komorové septální defekty. Je pravděpodobné, že se v případě SDF-1 jedná o multifaktoriální regulační protein, který se navíc podílí na lymfopoéze a myelopoéze. Mutace CXCR4, receptoru pro SDF-1, vede k poruchám vaskularizace gastrointestinálního traktu, hematopoézy a vývoje CNS. SDF-1 může sehrát i opačnou roli, může tlumit angiogenní aktivitu ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů, bFGF nebo VEGF (34). Působení

SDF-1 na angiogenezi u nádorových a chronických lymfoproliferativních onemocněními není dosud detailně objasněno.

Všechny tři interferony (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ) stimulují expresi IP-10. Monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG) je indukován pouze IFN- $\gamma$ . Nedávno byl naklonován nový člen CXC chemokinové rodiny, INF-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), který je indukován především IFN- $\gamma$ . I-TAC, podobně jako IP-10 a MIG inhibují vaskularizaci na myši rohovce po působení ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů nebo VEGF. Tyto nálezy ukazují, že všechny interferonem indukované ELR-CXC chemokiny mohou působit jako silný inhibitor angiogeneze. Protože syntéza IFN- $\gamma$  je regulována IL-18 a IL-12, regulují tyto cytokiny prostřednictvím IFN- $\gamma$  i funkce ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů a jejich receptorů. Indukcí IFN- $\gamma$  uplatňují IL-12 a IL-18 důležitý vliv na produkci IP-10, MIG, a I-TAC. Následná exprese ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů představuje zakončení regulační dráhy, která směřuje k inhibici angiogeneze indukované interferony. Protože se všechny tři interferonem-indukované ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny specificky vážou na receptor CXCR3 a exprese CXCR3 mRNA je asociována s endotelovými buňkami, je CXCR3 považován za hlavní receptor inhibice angiogeneze mediované ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny (343).

Biologický účinek chemokinu PF4 inhibovat angiogenezi je dán schopností vázat se na glykosaminoglykany (GAG; heparin a heparan sulfát). PF4 inhibuje migraci a proliferaci endotelových buněk *in vivo* stimulovaných bFGF a VEGF. Systémově injikovaný fluoresceinisothiocyanatem (FITC)-značený PF4 se selektivně váže k endotelu pouze v místě s aktivní angiogenezí (124). Tento nálezy dokládá, že tvorba mikrovaskulatury je hlavní biologický účinek u PF4 v průběhu angiogeneze. Ukázalo se, že PF4 inhibuje bFGF a VEGF<sub>165</sub> kompetitivní vazbou na jejich receptory. Jiným mechanismem je tvorba heterodimerů PF4-bFGF a PF4-VEGF<sub>165</sub>. Před funkční vazbou na receptor musí bFGF projít dimerizací za přítomnosti endogenního heparinu. PF4 se váže k bFGF a brání tak bFGF dimerizaci a následné vazbě na receptor. Schopnost vázat heparin má i VEGF<sub>165</sub>. PF4 blokuje VEGF<sub>165</sub> vazbu na endoteliální VEGFR podobným mechanismem, který je popsán u bFGF. Schopnost PF4 tvořit heterodimery s bFGF a VEGF<sub>165</sub>, které pak nejsou schopny se vázat na příslušné receptory, je jedním z možných mechanismů inhibice jejich biologické aktivity. Nelze vyloučit, že PF4 může inhibovat angiogenezi dalšími mechanismy (159).

Inhibiční efekt PF4 popsáný u VEGF<sub>165</sub> není pozorován u VEGF<sub>121</sub>. VEGF<sub>121</sub> nepatří na rozdíl od VEGF<sub>165</sub> k heparin-vázajícím proteinům. PF4 ani nevytváří heterodimery s VEGF<sub>121</sub>, ani kompetitivně neinterferuje s vazbou na VEGF<sub>121</sub> receptoru. Přesto PF4 přímo inhibuje VEGF<sub>121</sub>-indukovanou proliferaci endotelových buněk. Tyto nálezy nasvědčují

tomu, že musí existovat další mechanismy, kterými je dosaženo PF4 mediované inhibice mitogenní stimulace endotelových buněk. Ačkoliv dosud nebyl objeven specifický receptor pro PF4, působením PF4 dochází k zastavení buněčného cyklu endoteliálních buněk v přechodu G1 do S fáze (120). PF4 může inhibovat různé mitogeny endotelových buněk a uplatňovat svůj vliv různými mechanismy (112). Lze předpokládat, že podobnými mechanismy budou působit i ostatní ELR<sup>-</sup>CXC chemokiny, protože například IP-10 vykazuje kompetici ve vazbě s PF4 s inhibicí proliferace endotelových buněk. To podporuje představu, že interferonem-indukované ELR<sup>-</sup>CXC chemokiny mohou mít stejný nebo podobný mechanismus zpětnovazebné regulace pro bFGF, VEGF, EGF a ELR<sup>+</sup>CXC chemokiny.

ELR<sup>-</sup>CXC chemokiny mají na rozdíl od ELR<sup>+</sup>CXC chemokinů angiostatické vlastnosti. Zesílená exprese IP-10 a MIG byla nalezena v nádorech, které vykazovaly spontánní regresí a korelovala s insuficientní angiogenezí. V pokusu na *Nu/Nu* myších blokovaly jak IP-10, tak MIG růst Burkittova lymfomu po intratumorální inokulaci. Podobně jako u většiny solidních nádorů je neoangiogeneze nezbytnou podmínkou růstu lymfomů. Oba chemokiny vedly po intratumorální aplikaci k výrazné redukci nádorové angiogeneze, projevující se kapilárním poškozením a nádorovou nekrózou (320). Ačkoliv oba aplikované chemokiny, IP-10 a MIG, zároveň indukovaly vstup mononukleárních buněk prostřednictvím CXCR3, schopnost IP-10 a MIG blokovat nádorovou angiogenezi a navodit regresí nádoru je proces nezávislý na T lymfocytární odpovědi (244).

Expresí IP-10 ve vzorku NSCLC byla v porovnání se zdravou plicní tkání signifikantně vyšší (11). Zvýšení IP-10 u lidského NSCLC je způsobeno vyšší hladinou IP-10 u squamosního buněčného karcinomu (SCCA) ve srovnání s adenokarcinomem. Rozdíl v sérových hladinách a expresi IP-10 u SCCA a adenokarcinomu je z klinického i patofyziologického hlediska zajímavý a vysvětluje odlišné biologické chování těchto dvou typů NSCLC. Délka přežití je kratší, metastatický potenciál vyšší a angiogeneze intenzivnější u adenokarcinomu ve srovnání s SCCA plic. Tato klinická pozorování byla ověřena i na myším modelu, kdy SCID myším byly inokulovány buňky buď adenokarcinomové nebo SCCA linie. Produkce IP-10 buňkami adenokarcinomu a SCCA korelovala inverzně s nádorovým růstem (11). Sérové hladiny IP-10 byly u SCCA signifikantně vyšší oproti adenokarcinomu a u zvířat s adenokarcinomem vznikaly spontánní metastázy. V navazujícím pokusu byly SCID myši s SCCA léčeny neutralizujícími anti-IP-10 protilátkami, které vedly k akceleraci růstu nádoru. Naproti tomu u zvířat s implantovanými adenokarcinomovými buňkami došlo po intratumorálním podání IP-10 k redukci jak velikosti primárního ložiska, tak snížení počtu metastáz. Uvedené změny nekorelovaly s infiltrací neutrofilů nebo

mononukleárními buňkami (makrofágy a NK buňkami) a lze je přímo přisoudit inhibici angiogeneze asociované s nádorem (34).

## **7. KARCINOM LEDVINY**

Maligní nádory ledvin představují 1-2% všech maligních tumorů. V 85% se jedná o renální karcinom, který je vysoce vaskularizovaným nádorem. Je typický tím, že časným stadiím tohoto nádoru chybí varující klinické příznaky. V okamžiku stanovení diagnózy jsou přítomny vzdálené metastázy u 20-30% pacientů. Po nefrektomii se metastázy objevují až ve 30% do 2 let (především stadia T3a, b, c). Pouze 10% nemocných s diseminovaným onemocněním má šanci na pětileté přežití (49, 83, 408).

Základem je léčba chirurgická - provedení nefrektomie, parciální resekce ledviny či enukleace tumoru, chirurgické odnětí resektabilních metastáz. Karcinom ledviny neodpovídá dobře na tradiční systémovou léčbu, je chemo- a radiorezistentní. Sporadicky pozorovaná regrese metastáz vedla k zavedení imunoterapie karcinomu ledviny, při které jsou využívány interferon alfa a interleukin-2. Oba preparáty vykazují nízkou, ale přesto reprodukovatelnou odpověď na léčbu u 10-20% pacientů s tím, že dlouhodobá odpověď je pozorována méně než u 5% pacientů (379).

### **7.1. Von Hippel-Lindau (VHL) nemoc**

Je autosomálně dominantní onemocnění, které je asociováno s různými tumory a cystami v CNS a viscerálních orgánech (hemangioblastomy retiny a CNS, pheochromocytom, renální karcinom, renální cysty a pankreatický cystadenom) (226, 324). Hlavní příčinou rozvoje onemocnění je inaktivace VHL tumor - suprimujícího proteinu a ztráta funkce VHL a Elongin BC (VBC) komplexu, z čehož vyplývá ztráta odbourávání HIF (hypoxia-inducible factor). Hromadění HIF je důležitým krokem v rozvoji angiogenních tumorů.

Jméno VHL nemoc je odvozeno od autorů dvou článků. První byl publikován v r. 1911 (autor Hippel), druhý v roce 1926 (autor Lindau). Melmon a Rosen vyslovili myšlenku o VHL nemoci v roce 1964. Genetický výzkum provedl Latif a kol. Odpovědný gen byl identifikován jako VHL tumor - suprimující gen v roce 1993. Je lokalizován na 3p25-26 chromozomu (202).

Klinicky se rozlišuje typ bez (typ-1) a s přítomností pheochromocytomu (typ-2) (324). Typ-2 se dělí ještě do 3 kategorií: typ 2A s přítomností pheochromocytomu a dalších CNS hemangioblastomů, bez přítomnosti renálního karcinomu a typ 2B, u kterého jsou přítomny

hemangioblastom, renální karcinom a jiné CNS tumory. Nedávná myšlenka je typ 2C, který představuje přítomnost pouze pheochromocytomu.

## 7.2. Angiogeneze u RCC

Citlivost buněk k hypoxickým stavům a transkripce angiogenních faktorů se zvyšuje při mutaci VHL (von Hippel-Lindau gen) genu (176, 255).

U sporadických renálních karcinomů byla delece alely VHL genu prokázána v 84-98% (148, 271, 398). Tento gen řadíme mezi tumor-suprimující geny. Je tvořen 3 exony a nachází se na chromozomu 3p25-26. Mnozí autoři prokázali mutaci zbývající alely (pozorována u 34 až 57% světlobuněčných renálních karcinomů) (43, 110, 186, 296, 299, 327). Inaktivace genu VHL může být způsobena i metylací cytosinu a guaninu v DNA. VHL gen je metylován u 5 až 19% světlobuněčných renálních karcinomů. VHL protein je tvořen 213 aminokyselinami.

Za fyziologických podmínek váže VHL protein HIF- $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) přímo a destabilizuje je, podporuje jeho odbourávání a destrukci. Ztráta funkčního VHL proteinu vede ve svém důsledku k hromadění HIF- $\alpha$  (164, 176). Hypoxií indukované faktory HIF jsou heterodimerické transkripční faktory, které přepisují důležité proteiny za hypoxických podmínek. Skládají se z  $\alpha$  a  $\beta$  neboli ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) podjednotek (118, 155, 310, 381). Každá podjednotka má tři isoformy. Skupina HIF- $\alpha$  zahrnuje HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  a HIF-3 $\alpha$ . HIF- $\beta$  isoformy zahrnují ARNT, ARNT2 a MOP3 (member of PAS protein3); nejvíce rozšířená v tkáních je ARNT. Aktivita HIF je regulována  $\alpha$  podjednotkou,  $\beta$  podjednotka je konstitučně vyjádřena v jádře. HIF jsou přítomny ve všech tkáních, jsou degradovány VHL a Elongin BC komplexem za normálního tlaku kyslíku, ale ne v hypoxických podmínkách. Inaktivace VHL tumor-suprimujícího proteinu, ztráta funkce uvedeného komplexu a z toho plynoucí ztráta odbourávání a následné hromadění HIF- $\alpha$  vede k rozvoji vaskularizace tumorů (191, 324). Důsledkem je vysoká hladina neodbouraného HIF- $\alpha$ , která je příčinou zvyšování transkripce VEGF, PDGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  a  $\beta$  (195) (obr.č.7). Tím se vysvětluje bohatá mikrovaskulární síť a akcelerovaný růst renálního karcinomu a dalších nádorů spojených s mutací VHL (např. hemangioblastom a pheochromocytom).

HIF- $\alpha$  je klíčovým regulátorem hypoxické odpovědi mnohobuněčných organismů (57). Za normoxických podmínek je HIF- $\alpha$  hydroxylován na dvou prolinových koncích prolinovou hydroxylázou a na asparaginovém konci asparaginovou hydroxylázou. Rozsah



závisí na tenzi kyslíku. Hydroxylace zajistí vazbu HIF- $\alpha$  s VHL proteinem, což podpoří odbourání HIF- $\alpha$  působením proteáz. VHL protein se váže prostřednictvím Elongin B a C na Cul 2 protein (protein z rodiny cullinových ligáz). RING-box protein Rbx1 pak slouží jako ubiquitin transferáza pro VHL skp-cullin-F-box protein (SCF komplex) (56, 164).

Hydroxylace asparaginovou hydroxylázou blokuje vazbu HIF- $\alpha$  s transkripčním koaktivátorem p300.

Chybění VHL proteinu a hypoxie vedou ve svém důsledku ke stejnému efektu - zvýšení VEGF. V případě chybění VHL proteinu se hromadí HIF- $\alpha$ , přechází do jádra, vytváří heterodimery s HIF- $\beta$  a aktivuje transkripci HREs (hypoxia-response elements), které jsou součástí genů kódujících např. VEGF. Za hypoxických podmínek není HIF- $\alpha$  hydroxylován, nemůže vázat VHL protein a opět se v buňkách hromadí (obr.č.8).

### **7.3. Terapie RCC**

#### **7.3.1. Úloha nefrektomie**

Benefit nefrektomie provedené před imunoterapií byl prokázán v randomizované studii SWOG (105). Pacienti s operabilním metastazujícím renálním karcinomem byli randomizováni do dvou ramen: s okamžitou léčbou IFN- $\alpha$  nebo provedení radikální nefrektomie s následnou léčbou IFN- $\alpha$ . Mezi lednem 1991 a říjnem 1998 bylo zařazeno 246 pacientů. Medián přežití byl signifikantně zvýšen v rameni s provedením nefrektomie, ale procento odpovědí na podání IFN- $\alpha$  bylo nízké, okolo 4% v obou ramenech. To spíše napovídalo, že delší přežití bylo spíše díky odejmutí nádorové masy, ne vlivem chirurgického zákroku na léčbu IFN- $\alpha$ .

#### **7.3.2. Imunoterapie**

Primární farmakologickou léčbu pro pacienty s metastazujícím karcinomem ledviny představovala dosud imunoterapie (20, 60, 349). Vedle interleukinu-2, jehož účinek je zprostředkován aktivací buněk imunitního systému (214), se k léčbě metastatického karcinomu ledviny užívá interferon-alfa.

Vhodnou dávkou IFN- $\alpha$  s maximálním efektem a nízkou toxicitou se jeví dávka 5-20x10<sup>6</sup> IU/den (253).

Monoterapie IFN byla užitá asi v 50 klinických studiích v rámci léčby metastazujícího RCC. Míra odpovědí u těchto pokusů byla mezi 0% a 50%, v průměru přibližně 15% pro

IFN- $\alpha$  a 10% pro IFN- $\gamma$ . Nebyl prokázán rozdíl v odpovědi na léčbu metastazujícího RCC mezi rIFN- $\alpha$ 2a nebo rIFN- $\alpha$ 2b (315). Různá schémata podávání (každodenní dávky méně než 5, 5-10 a více než 20 milionů jednotek denně) neprokazovala statisticky významné rozdíly ve výsledcích. Retrospektivní analýza prognostických znaků v odpovědích nasvědčovala, že provedení nefrektomie před zahájením léčby a generalizace pouze do plicního parenchymu byl znakem pro lepší výsledek. Celkový výkonnostní stav je jinak důležitým prognostickým faktorem odpovědi na léčbu (152).

Mnohé randomizované studie byly publikovány s cílem kvantifikovat benefit léčby IFN- $\alpha$  u RCC. „Medical Research Council Renal Cancer Collaborators“ randomizovali 350 pacientů s RCC mezi IFN- $\alpha$ 2b a medroxyprogesteronacetátem. Předběžná analýza v době, kdy byly k dispozici údaje o času do progresu u 335 pacientů, ukazovala statisticky signifikantní zlepšení mediánu přežití ve skupině léčené IFN- $\alpha$  (152).

Mnohé studie se pokoušely zlepšit efekt IFN- $\alpha$  kombinací s jinými preparáty.

Pyrhonen a kol. prospektivně randomizovali 160 pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím RCC mezi samotným vinblastinem a kombinací vinblastinu s IFN- $\alpha$ 2a po 12 měsících nebo do progresu choroby (286). Míra odpovědi i medián přežití byly lepší ve skupině pacientů léčených IFN- $\alpha$ .

Na podkladě preklinických dat potenciace antiproliferativního účinku a efektu diferenciací přidáním 13-cis-retinové kyseliny k IFN- $\alpha$  byla prováděna studie s 320 pacienty (1), randomizovanými do dvou skupin. První skupina byla léčena monoterapií IFN- $\alpha$  v dávce 9 mil. IU denně, u druhé skupiny byly přidány retinoidy v dávce 1mg/kg/den. Pacienti byli léčeni do progresu choroby nebo rozvoje toxicity. Tato studie prokázala minimální signifikantní zlepšení v celkovém přežití (17,3 měsíců v rameni s kombinovanou léčbou oproti 13,2 měsíců v rameni s monoterapií IFN- $\alpha$ ). Další dvě studie však neukazují prodloužení přežití v rameni s kombinovanou léčbou (19, 250). Studie Motzera a kol. randomizovala 284 pacientů do dvou skupin, užívajících buď IFN- $\alpha$  nebo IFN- $\alpha$  s retinoidy. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v počtu odpovědí na léčbu, doby do progresu ani přežití. Pacienti léčení retinoidy však zaznamenali delší trvání odpovědi na léčbu (33 oproti 22 měsícům) (250).

Kombinace IFN- $\alpha$  a IL-2 byla intenzivně studována u pacientů s metastazujícím RCC. Fáze I a II studií vykazovaly míru odpovědi v průměru 20%, s 5% kompletních remisí (48). Schéma léčby, dávky cytokinů, kritéria pro výběr pacientů a kritéria odpovědi se mezi studii liší.

Atkins a kol. ve fázi II studie rozdělil pacienty na skupinu, která dostávala pouze IL-2 a skupinu léčenou IL-2 i IFN- $\alpha$ . Po 28 pacientech vstoupilo do každého ramene, ale rameno kombinované léčby bylo uzavřeno pro neúspěch vyhovět očekávaným výsledkům léčby. Dodatečně bylo do ramene monoterapie IL-2 zařazeno 43 pacientů. Odpověď byla u 3 z 28 pacientů (11%) na IL-2/IFN- $\alpha$  a u 12 z 71 (17%) pacientů na samostatném IL-2 (17).

Francouzská skupina (Negrier a kol.) randomizovala 425 pacientů s metastazujícím RCC na skupinu léčenou kontinuální infuzí IL-2, s.c. injekcemi IFN- $\alpha$ 2a, nebo obojím (260). U pacientů s kombinací obou léků bylo významně vyšší procento (18,6%) odpovědí na léčbu než u monoterapií (u IL-2 6,5%, u IFN- $\alpha$  7,5%). Ale míra přežití se významně nelišila. Také další studie probíhaly k porovnání efektu monoterapie či kombinované terapie vytokány (41, 135, 154, 210, 219). Protože mnohé další studie neprokázaly výhodu v přežití na kombinované léčbě cytokiny, nelze ji doporučit jako standardní léčbu.

Ceněna je kombinace IFN- $\alpha$ , IL-2 a 5-FU u metastazujícího RCC. *In vitro* studie dokazují zlepšení účinnosti 5-FU, když je podáván v kombinaci s IFN- $\alpha$  (143, 243). V řadě dalších studií bylo celkové procento odpovědi přibližně 30% (48, 84, 94, 114, 138, 265, 317, 318). Některé monocentrické studie uváděly odpověď na léčbu až u více než 40% pacientů, multicentrická studie SWOG zjistila odpověď pouze u 9% pacientů (93).

Negrier a kol. randomizovali 131 pacientů mezi IL-2, IFN- $\alpha$  a IL-2, IFN- $\alpha$  a 5-FU, a nezjistili signifikantní rozdíl mezi oběma léčebnými rameny (260). Atzpodien a kol. randomizovali pacienty mezi skupinu léčenou Tamoxifenem a skupinu léčenou IL-2, IFN- $\alpha$  a i.v. 5-FU. Našli vysoce signifikantní zlepšení v míře odpovědi a přežití v kombinovaném rameni (18). V další studii porovnávali ramena se s.c. podáním IFN- $\alpha$ 2a, IL-2 a i.v. 5-FU, rameno v němž byla navíc podávána p.o.kyselina cis-retinová a rameno léčené kombinací IFN- $\alpha$ 2a a vinblastinu (19). Výsledky Atzpodiény studie jsou povzbudivé, ale vzhledem k absenci potvrzujících studií, jsou nedostatečné ke stanovení IL-2, IFN- $\alpha$  a 5-FU jako standardní léčby RCC.

Výhodnější farmakokinetický profil nabízejí pegylované interferony. Po subkutánním podání vykazují prodlouženou absorpci a prodloužený biologický poločas. Motzer a kol. sledoval efektivnost, toxicitu a farmakokinetický profil peginterferonu- $\alpha$  2a u pacientů s pokročilým renálním karcinomem. Efektivnost a tolerance byla kvalitativně stejná jako u standardního IFN- $\alpha$  a nežádoucí účinky byly většinou mírné intenzity (251).

Pro adjuvantně podávaný IFN- $\alpha$  u pacientů po nefrektomii s vysokým rizikem vzniku recidivy onemocnění (např. invaze dolní duté žíly, regionální lymfatické metastázy) nebyl

zatím prokázán pozitivní efekt ve smyslu delšího přežití, takže v současné době není adjuvantní imunoterapie po nefrektomii indikována a standardním postupem jsou opakovaná vyšetření umožňující časný záchyt progresu RCC.

### 7.3.3. Terapeutické perspektivy

Angiogeneze je vysoce koordinovaný proces, který je regulován mnohočetnými interakcemi angiogenních a angiostatických faktorů. Experimenty na transgenních a knock-autovaných myších dokázaly, že alterace jednoho z těchto regulačních mechanismů ústí do letálního fenotypu. Na druhou stranu zaměření pro- a anti-angiogenních molekul nabízí také velký potenciál pro léčebné snahy, např. léčebná angiogeneze pro formování kolaterálních cév při léčbě ischemické cévní nemoci. Velká očekávání jsou vkládána do antiangiogenní léčby u chorob s nežádoucí novotvorbou a zvýšeným formováním cév (224).

V preklinických a klinických studiích je testováno několik strategií, jak indukovat angiogenezi (117, 125). Mnohé z těchto studií jsou založeny na vnesení informace pro angiogenní faktor, hlavně VEGF, do postižené tkáně. S přihlédnutím ke komplexitě angiogenního procesu je nepravděpodobné, že transgenně zvýšená exprese jednoho samostatného faktoru, VEGF nebo jiného, je schopna dostatečně intenzivně indukovat formování nové funkční cévní sítě u ischemických nemocí. Tato teorie je navíc podporována nedávnými studiemi systémové sklerózy (sclerodermie). U pacientů s touto nemocí jsou hladiny VEGF ve srovnání se zdravými jedinci signifikantně zvýšeny. Navzdory zvýšenému regulačnímu tlaku tohoto silného stimulantu angiogeneze nedochází k dostatečnému formování nových cév (77). Navíc není známo, zda léčebná aplikace angiogenních molekul může podporovat přechod in situ nádorů v nekontrolovaně rostoucí proces nebo akcelarovat aterosklerózu cév (53, 54).

Pro léčebnou inhibici angiogeneze existují dva základní rozdílné přístupy. Cílem může být potlačení syntézy angiogenních faktorů a následné snížení exprese jejich molekul nebo terapeutické využití inhibitorů angiogeneze (344). Antiangiogenní léčbě jako nové léčebné modalitě nádorových onemocnění jsou věnovány první klinické studie. Bohužel, výsledkem mnohých těchto studií je pouze parciální, ne kompletní remise s redukcí nádorové hmoty. Z pohledu dlouhodobé prognózy je tento výsledek nedostačující vzhledem k riziku relapsu nádoru i z malého počtu reziduálních buněk. Kromě toho mnohé nádory produkují široké spektrum angiogenních molekul. Z toho důvodu může nádor kompenzovat inhibici jedné molekuly zvýšenou regulací jiných angiogenních faktorů (53, 54, 62).

### 7.3.4. Antiangiogenní léčba u RCC

Vzhledem k základnímu faktu, že světlobuněčný karcinom ledviny je vysoce vaskularizovaný tumor, charakterizovaný deregulací HIF-1 $\alpha$ , VEGF a dalších angiogenních růstových faktorů (134, 149, 153, 262, 314, 336, 390, 397, 410), je antiangiogenní léčba u tohoto nádoru považována za perspektivní (86).

Antiangiogenní léky obecně zahrnují velkou skupinu molekul s různým mechanismem účinku. Mohou být rozděleny do dvou základních skupin: na přímé a nepřímé inhibitory angiogeneze. Přímé inhibitory angiogeneze blokují cestu angiogeneze, zatímco nepřímé inhibitory většinou antagonizují biologickou aktivitu angiogenních faktorů, interferují s jejich produkcí či biologickou aktivitou, nebo aktivitou jejich receptorů (136, 287).

Příkladem jiné klasifikace je dělení na pět rozdílných typů (25):

1. inhibitory angiogenních faktorů (bevacizumab; interferon- $\alpha$ )
2. inhibitory proteáz, které ovlivňují remodelaci extracelulární matrix (MMP inhibitory)
3. inhibitory proliferace aktivovaných endotelií (endostatin, thalidomid, TNP-470)
4. inhibitory adhezivních molekul (SCH221153)
5. látky interferující s generací angiogenních molekul nebo s receptorovou aktivitou (SU5416)

Mnohá klasická cytostatika mají rovněž antiangiogenní efekt, který byl pravděpodobně roky využíván, aniž bychom si ho byli vědomi (287). Mezi klasická cytostatika s působením proti endotelových buňkám, která jsou využívána u renálního karcinomu, patří z alkaloidů vinblastin, z antimetabolitů 5-fluorouracil (5-FU).

Důležitým lékem, který je využíván v léčbě renálního karcinomu a u něhož je využívána vedle antiproliferačních vlastností (zvláště na nádorové buňky) též schopnost regulace buněčného růstu, diferenciace, tumorigenicita a inhibice mnohých kroků angiogeneze, je interferon- $\alpha$ .

Interferony patří mezi nejznámější endogenní inhibitory angiogeneze (108). Interferon- $\alpha$  a  $\beta$  se dělí o společný receptor (typ I interferonového receptoru) a vyvolávají obdobnou buněčnou odpověď. Některé buněčné reakce však mohou být stimulovány jen IFN- $\beta$  (interferon- $\beta$ ), pravděpodobně fosforylací s receptorem asociovaného proteinu, který reaguje výhradně s IFN- $\beta$ .

IFN- $\alpha$  zastavuje proliferaci endotelu indukovanou FGF (334). IFN- $\gamma$  rovněž inhibuje proliferaci endotelu. Oba vykazují cytostatický efekt k endotelovým buňkám drobných kožních cév, endoteliím lidských kapilár. Systémové podání rekombinantních interferonů

vykazuje antiangiogenní působení u vaskularizovaných nádorů (hemangiomy, Kaposiho sarkom, karcinom močového měchýře) (104). Tyto nádory rovněž vykazují vysokou hladinu bFGF, kterou lze detekovat v moči či krvi pacientů. IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ , ale ne IFN- $\gamma$ , snižují transkripci bFGF mRNA a expresi proteinů na lidských karcinomových buňkách (104).

V případě renálních karcinomů jsou v klinických studiích zkoušeny níže uvedené antiangiogenní léky. Místa jejich zásahu jsou znázorněny na schématu č.2.

### ***Thalidomid***

Údaje o výzkumu thalidomidu prezentovali D'Amato, Figg a Dreicer. Byla vyslovena hypotéza, že teratogenní efekt této látky spočívá v antiangiogenním působení, které lze prokázat *in vitro* (64). Thalidomid přerušuje procesy mediované bFGF a VEGF (92) a indukuje apoptózu v existujících novotvořených cévách, snižuje expresi TNF- $\alpha$  a IL-10 (interleukin-10) (25). Byly popsány odpovědi při jeho podání u renálního karcinomu, ovšem následné studie prokázaly procento objektivní odpovědi jen pod 5% (97, 251). Klinické studie zaměřené na to, zda thalidomid je schopen zmenšit progresi renálního karcinomu, ještě nebyly dokončeny. Mezi nežádoucí účinky patří zácpa, únava, neutropenie a tromboembolické komplikace (8, 90, 298).

Probíhá několik studií s kombinovanou léčbou (8). D'Amato prezentoval poznatky o léčbě pacientů s renálním karcinomem trojkombinací interferonu- $\alpha$ , capecitabinu a thalidomidu. V malé studii bylo pozorováno 5 parciálních odpovědí mezi 27 pacienty. Odpověď byla lepší než při léčbě interferonem- $\alpha$  v monoterapii. Kombinovaná léčba nesla vyšší riziko tromboembolických komplikací (u pěti pacientů vznikla hluboká žilní trombóza). Studie, zahrnující léčbu gemcitabinem, 5-FU a thalidomidem, prokázala 43% hlubokých žilních trombóz a plicních embolizací (72).

U renálního karcinomu je též zkoušena léčba dvojkombinací interferonu a thalidomidu (91). Vychází se ze zkušeností s léčbou interferonem- $\alpha$  a z poznatku, že nízcí dávkovaný interferon inhibuje bFGF na preklinických modelech.

Dále se u pacientů s renálním karcinomem zkouší dvojkombinace interleukinu-2 a thalidomidu (170, 173). Využívá se zde spíše vlivu thalidomidu na imunitní funkce než antiangiogenní efekt. Budou nutné další studie, které by potvrdily či vyvrátily tato pozorování.

### ***Bevacizumab (Avastin)*** (223, 299, 296, 400)

Bevacizumab je humanizovaná monoklonální protilátka zkoušená rovněž u renálního karcinomu, zaměřená proti všem subtypům VEGF s vyhovujícím poločasem rozpadu 2-3 týdny. Randomizovaná studie u pacientů refrakterních vůči léčbě IL-2 prokázala signifikantní prodloužení času do progresu (401). V této dvojité slepé randomizované studii bylo podáváno placebo, nízké dávky (3mg/kg) a vysoké dávky (10mg/kg) bevacizumabu. Čtyři z 38 pacientů ve vysokodávkovaném rameni měli objektivní odpověď, žádná nebyla pozorována u zbývajících dvou větví. Medián do progresu ve vysokodávkovaném rameni byl 6 měsíců, v placebovém rameni 3 měsíce. Hlavními nežádoucími účinky jsou hypertenze a asymptomatická proteinurie.

V randomizované klinické studii fáze III AVOREN, do které bylo celkem zařazeno 649 pacientů, byla porovnávána léčba samotným IFN- $\alpha$  a léčba kombinací IFN- $\alpha$  s bevacizumabem. Výsledky vyzněly ve prospěch ramene s kombinovanou léčbou jak v délce období do progresu, tak v počtu objektivních léčebných odpovědí. Rozdíly v celkové době přežití nebyly v době analýzy signifikantní (96).

Bevacizumab je indikován v kombinaci s IFN- $\alpha$  jako léčba první linie u pacientů s pokročilým nebo metastatickým karcinomem ledviny s dobrou a střední prognózou dle MSKCC kritérií.

Bevacizumab je v současnosti dále užíván v léčbě karcinomu prsu, nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu kolorekta.

### ***Erlotinib (Tarceva)***

S ohledem na efekt této látky a zvýšenou expresi VEGF, TGF- $\alpha$  a PDGF- $\beta$  u světlobuněčného renálního karcinomu, byla provedena multicentrická studie fáze II kombinující anti-VEGF monoklonální protilátku bevacizumab s orálním EGFR inhibitorem erlotinibem (122, 209). Kritériem zařazení do této studie byla přítomnost metastazujícího RCC (s nejméně 75% světlobuněčnou komponentou) a maximálně jedna předchozí systémová terapie. Léčba sestávala z intravenózně podávaného bevacizumabu 10mg/kg každé 2 týdny a erlotinibu 150mg denně orálně. Zařazeno bylo 63 pacientů. 92% pacientů dostávalo léčbu alespoň 2 měsíce.

25% z 59 hodnotitelných pacientů mělo objektivní odpověď (jedna kompletní odpověď, 14 parciálních odpovědí) dle RECIST; dalších 36 pacientů (61%) mělo stabilní chorobu a 13 pacientů (22%) se stabilní chorobou vykazovalo objektivní regresi nádoru, ale nespĺnilo RECIST podmínky pro parciální odpověď. Při 15 měsíčním follow up byl medián

přežití bez progresu (PFS) 11 měsíců. V pokračujícím sledování byl 12 a 18 měsíční PFS 43% a 26% nemocných. Medián celkového přežití více než 20 měsíců vychází lépe v porovnání s mediánem celkového přežití 13 měsíců u IFN- $\alpha$  v první linii u 463 pacientů, shromážděných několika klinickými studii (248). Toxicita 3 a 4 stupně zahrnovala rash (13%), průjem (13%), nauseu/zvracení (10%), hypertenzi (8%) a krvácení (6%). Výsledky poskytují důkazy, že cílená léčba proti oběma VEGF a EGFR může být efektivní strategií u RCC. Randomizovaná fáze II studie s bevacizumabem a erlotinibem nebo placebem se dokončuje. Předběžné odhady ukazují, že přidání Tarcevy k Avastinu vede v PFS a stupni odpovědi k podobným výsledkům dosaženým při podání samotného Avastinu (376).

Erlotinib je v současné době dále užíván v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu pankreatu.

### ***SU11248 (Sunitinib, Sutent)***

SU11248 je malá molekula inhibitoru tyrozinové kinázy (13, 296, 299). Vykazuje protinádorový a antiangiogenní efekt zablokováním tyrozinových kináz asociovaných s VEGFR-2, PDGFR- $\beta$ , KIT, RET a FLT3 (230, 335). Tyto receptorové kinázy aktivují vazbou příslušného ligandu na jejich transmembránový konec několik intracelulárních procesů, vedoucích k proliferaci, diferenciaci a inhibici apoptózy. Preklinické studie ukázaly, že jednorázové podání této látky vede k 16-ti hodinové inhibici kinázové aktivity (263).

Ve dvou nezávislých ramenech multicentrických studií fáze II Motzer a kol. ukázali výsledky podávání SU11248, 50mg denně u pacientů s metastazujícím RCC, u kterých selhala cytokinová léčba IL-2 nebo IFN (249). Pacienti s dobrou nebo střední prognózou dostali léčbu v 6-týdenních cyklech, se 4 týdny léčby a 2 týdny bez léčby. Do studie bylo od ledna do června 2003 zařazeno 63 pacientů a od února do listopadu 2004 dalších 106 pacientů.

V prvním rameni (studie 1) (63 nemocných) byla parciální léčebná odpověď v souladu s RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 40%. Signifikantní počet pacientů (27%) mělo stabilní chorobu více než 3 měsíce a 33% mělo buď progresi nebo stabilní chorobu méně než 3 měsíce trvání (nebo nebylo hodnotitelné) jako jejich nejlepší odpověď. U 25 odpovídajících pacientů byl medián trvání odpovědi 12,5 měsíce (rozsah 2,3-19,4 měsíců), osm částečných odpovědí bylo bez progresu více než 21-24 měsíců od začátku léčby. Medián času do progresu (TTP- time to progression) byl 8,7 měsíců, medián přežití 16,4 měsíce. Nežádoucí účinky byly stupně 1 a 2 a zahrnovaly únavu, nauseu, průjem a stomatitidu. Tři pacienti byli vyřazeni z léčby pro více než 20% pokles ejekční frakce levé komory. Nebylo



zaznamenáno žádné krvácení či rozvoj hypertenze. Přibližně u 1/3 pacientů byla zredukována dávka z důvodu elevace pankreatických enzymů, ovšem bez klinického dosahu (252, 368).

Ve druhém rameni (studie 2) bylo zařazeno 106 pacientů; 44 (42%) pacientů dosáhlo parciální odpovědi v souladu s RECIST, včetně jedné kompletní odpovědi. Celková kontrola nádorového růstu (kompletní odpověď + parciální odpověď + stabilní choroba) se vyskytovala u 66% pacientů, 24% pacientů mělo stabilní chorobu více než 3 měsíce. Kolem 30% pacientů mělo stabilní chorobu kratší než 3 měsíce nebo progresi. Čas odpovědi byl 2,3 měsíce a medián trvání odpovědi se pohyboval mezi 9,9 a 12,5 měsíci.

Toxicita stupně 2 a 3 byla stejná jako ve studii 1. Únava, průjem, nevolnost a stomatitida byly nejčastější nežádoucí vedlejší účinky. Neutropenie 3. a 4. stupně komplikovala léčbu u 15-20% pacientů.

Tato dvě ramena pokračující studie fáze II, zahrnující v obou ramenech celkem 169 pacientů, ukázala, že SU11248 má značnou protinádorovou aktivitu jako léčba druhé linie u pacientů s metastazujícím RCC. Procento odpovědi je 40-42%, medián přežití bez progresse (PFS) 8,2 měsíců a medián přežití 16,4 měsíce.

Inhibice VEGFR- (a PDGFR)- mediované signalizace se jeví jako slibný terapeutický postup u refrakterního RCC. Fáze III mezinárodní randomizované studie první linie léčby u 690 pacientů s metastazující chorobou porovnávala IFN- $\alpha$  s SU11248. Na základě těchto mimořádných výsledků United States Food and Drug Administration (US FDA) schválila přijetí tohoto léku pro léčbu RCC v lednu 2006. Je plánována studie o adjuvantním podání u vysoce rizikových pacientů po nefrektomii .

Na ASCO 2006 byly publikovány výsledky studie R.J.Motzera a kol. se 750 pacienty , kteří byli randomizováni na skupinu léčenou IFN- $\alpha$  (v dávkování 3x týdně 9 MIU s.c. v 6-týdenních cyklech) a skupinu léčenou sunitinibem (50mg p.o. 1x denně 4 týdny, 2 týdny pauza). Ve skupině léčené sunitinibem byl medián do progresse choroby 11 měsíců, objektivní odpověď byla zaznamenána u 35,7 % pacientů, zatímco ve skupině léčené IFN- $\alpha$  byl medián do progresse choroby 5 měsíců a objektivní odpověď byla zaznamenána u 8,8 % pacientů.

Sunitinib je v současné době dále užíván v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru.

### ***BAY 43-9006 (Sorafenib, Nexavar)***

BAY 43-9006 je orální lék, který byl navržen jako inhibitor c-Raf a b-Raf kináz. Signální cesta Ras/Raf je mediátorem proliferace nádorových buněk a angiogeneze. Bylo však

prokázáno, že Sorafenib inhibuje mnohé RTK, které zahrnují VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$ , Flt3 a c-KIT (295, 299, 392, 393).

V r. 2005 ukázaly konečné výsledky přerušené studie u 202 pacientů s podáváním Sorafenibu 400mg 2x denně, že 71% pacientů mělo alespoň 25 %ní redukci nebo stabilizaci choroby v prvních 12týdnech léčby, 8 (4%) pacientů mělo parciální odpověď. Stabilizovaní pacienti byli poté randomizováni a dostávali Sorafenib nebo placebo dalších 12 týdnů; 50% mělo interval bez progresu 24 týdnů ve srovnání s 18% u skupiny užívající placebo. PFS byl 24 týdnů a 6 týdnů pro pacienty užívající Sorafenib resp. placebo.

Nejčastějším nežádoucím účinkem byly projevy kožní toxicity, dále únava a průjem. Hand-foot syndrom byl nejčastěji 3.stupně toxicity, ale jeho incidence byla méně než 15%. Hypertenze 3.stupně byla pozorována u méně než 25% pacientů a byla zvládnutelná p.o. léčbou. U 16 pacientů (8%) byla léčba pro nežádoucí účinky přerušena (290).

Povzbudivé výsledky studie se Sorafenibem vedly k III fázi randomizované studie, nazvané TARGET (Treatment Approaches in RCC Global Evaluation Trial) (98). Bylo zařazeno 905 pacientů se světlobuněčným RCC, u kterých selhala primární systémová léčba v posledních 8 měsících, s dobrou nebo střední prognózou, ECOG performance status 0-1. Primárním cílem studie bylo stanovit interval přežití a sekundárním cílem PFS. Sorafenib u 80% pacientů signifikantně prodloužil PFS ve srovnání s placebem. Medián přežití byl 5,5 měsíců v porovnání s 2,2 měsíci u skupiny užívající placebo.

K predikci účinnosti léčby byla použita Dopplerovská ultrasonografie s perfuzním softwarem. Snížení vaskularizace nádoru korelovalo s odpovědí na CT scanech 6.týden. Tato cenná neinvazivní metoda se zkoumá (197). Plánovaná je II.fáze studie porovnávací podávání Sorafenibu v kombinaci s cytokiny v první linii léčby. Tento výzkum představuje dosud největší randomizovanou studii u pokročilého RCC. Follow –up je dosud krátké, ale toxicita je zvládnutelná. US FDA podpořil schválení tohoto léku v druhé linii léčby u RCC v 2005. Nejsou zatím shromážděna data u pacientů se špatnou prognózou. Připravovány jsou studie s kombinovaným podáváním s interferonem, IL-2, bevacizumabem a chemoterapií (287).

Sorafenib je v současné době užíván v léčbě inoperabilního nebo metastazujícího hepatocelulárního karcinomu.

### ***AG-013736 (Axitinib)***

AG-013736 je orální mnohacílový inhibitor receptorů tyrosinových kináz se silným efektem, hlavně proti VEGF receptorům 1 a 2 a PDGF- $\beta$  receptoru. Aktivitu AG-013736

popsal Rugo a kol. (307) a Rini a kol. (297) ve fázi I/II studií u solidních tumorů a metastazujícího RCC rezistentního k cytokinové léčbě.

Ve studii Rini a kol. byli pacienti léčeni v opakovaných 4-týdenních cyklech (5mg 2x denně). Z 52 zařazených pacientů dosáhlo 24 (46%) parciální odpovědi dle RECIST. V 18 měsíčním follow up u 16 (31%) pacientů došlo k progresi a 6(12%) pacientů přerušilo léčbu pro nežádoucí účinky, a 21 ze 24 odpovídajících pacientů zůstalo s odpovědí nebo stabilní chorobou. Medián času do progresu nebyl dosažen a jen 3 pacienti s částečnou odpovědí zrelabovaly po více než 232 dnech po léčbě. U 15% pacientů byl pozorován 3. a 4. stupeň hypertenze. Nevyskytla se neutropenie nebo trombocytopenie vyšší než 1 stupeň.

Na 13 pacientech (25%) byla prováděna doplňková studie monitorující průtok nádorem (kvalitativními a kvantitativními CT scany) s cílem vyhodnotit efekt antiangiogenní léčby na sérových biologických parametrech (detekce VEFR, VEGFR-1 a VEGFR-2 pomocí ELISA) (302). Snížení perfuze nádoru bylo pozorováno u všech pacientů odpovídajících na léčbu, a u pacientů se stabilizací nebo progresí choroby redukce průtoku nádorem těsně korelovala s klinickým zlepšením.

Údaje ze studie ukazují, že AG-013736 má značnou objektivní a biologickou aktivitu. Léčba je dobře tolerována a toxicita je zvládnutelná. Další studie s AG-013736 pokračují v kombinaci a u refrakterního RCC.

Publikovány byly výsledky studie fáze II s axitinibem u nemocných se sorafenib-refrakterním renálním karcinomem. Všichni nemocní byli předléčeni sorafenibem a 9 z 62 nemocných bylo léčeno též sunitinibem. Parciální léčebné odpovědi bylo dosaženo u 14% nemocných a 36% pacientů dosáhlo stabilizace choroby (300).

### ***GW 780604 (Pazopanib)***

GW 780604 je zkoumán v léčbě mnoha nádorových typů včetně RCC. Pazopanib je mnohacílový inhibitor VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  a c-KIT. Nejčastějšími nežádoucími účinky léku jsou hypertenze, průjem, nevolnost, únava, anorexie, zvracení a depigmentace vlasů. Redukce nádoru (parciální odpověď nebo minimální odpověď) byla pozorována u šesti ze sedmi pacientů s RCC léčených více než 800mg denně (347).

Dvě velké studie jsou prováděny u pacientů s pokročilým nebo metastazujícím RCC. Randomizovaná fáze II je navrhována do počtu 160-230 pacientů. Pacienti s objektivní odpovědí na konci 12.týdne budou pokračovat v léčbě Pazopanibem. Pacienti s progresí budou vyřazeni ze studie. Pacienti se stabilní chorobou po 12 týdnech budou randomizováni

do ramene s Pazopanibem či placebem. Tito pacienti budou sledováni dalších 16 týdnů a bude posouzena progresa choroby konečnou analýzou.

VEG105192 studie je randomizovaná, dvojitě slepá, placebem kontrolovaná, multicentrická mezinárodní studie III fáze s cílem ohodnotit účinnost a bezpečnost Pazopanibu u pacientů s lokálně pokročilým a/nebo metastazujícím RCC, u kterých buď selhala 1.linie léčby cytokiny nebo tuto léčbu netolerovali. Pozměňovací návrh povolil vstoupit i pacientům, kteří neměli prvotně léčbu cytokiny. Sledován byl PFS a celkové přežití. Bylo zahrnuto přibližně 350 schopných pacientů a randomizováno v poměru 2:1 do skupiny užívající 800mg denně Pazopanibu a placebo. Studie byla zahájena v dubnu 2006. V současnosti byla ukončena a očekává se vyhodnocení výsledků.

### ***mTOR inhibitory***

***Temsirolimus (CCI-779)*** je rapamycinový analog, který inhibuje mTOR (mammalian target of rapamycin) kinázu, regulátor HIF-1 $\alpha$ , působící zastavení G1 buněčného cyklu (31). Na 110 pacientech s refrakterním RCC byla provedena fáze II dávkově vystupňované studie samostatného Temsirolimu s cílem vyhodnotit dávky 25-250mg. Celková kontrola nádorového růstu byla 70% a čas do progresa byl 6 měsíců. Minimálně 15 pacientů zůstalo ve studii déle než 1 rok (16). Další studií bylo podání Temsirolimu v kombinaci s IFN- $\alpha$ . Šlo o dávkově vystupňovanou studii u pokročilých pacientů, kteří nedostali více než dvě primární systémové léčby. Zařazeno bylo 72 pacientů; 96% podstoupilo primární nefrektomii a 55% mělo primární imunoterapii. Maximální tolerovaná dávka byla 15mg Temsirolimu týdně v kombinaci s 6MIU IFN- $\alpha$  subkutánně 3x týdně. Mezi projevy toxicity byla stomatitida, nauzea a zvracení. Bylo pozorováno osm (11%) parciálních odpovědí a u 21 (30%) pacientů došlo ke stabilizaci choroby. Medián času do progresa byl 9,1 měsíců (339). V klinické studii fáze III byl temsirolimus testován u pacientů dosud neléčených se špatnou prognózou metastazujícího RCC samostatně v porovnání s kombinací s IFN- $\alpha$  nebo s IFN- $\alpha$  samostatným. Celkem bylo zařazeno 626 nemocných. Medián doby do progresa a medián doby přežití mezi ramenem s monoterapií temsirolimem a monoterapií interferonem- $\alpha$  byl statisticky signifikantní. Kombinace temsirolimu a IFN- $\alpha$  nevedla k signifikantnímu prodloužení přežití při srovnání se samotným IFN- $\alpha$  a její podávání bylo spojeno s nárůstem nežádoucích účinků (145).

Temsirolimus je v současné době dle FDA povolen v první linii systémové léčby metastazujícího renálního karcinomu u nemocných se třemi a více nepříznivými prognostickými faktory dle MSKCC.

**Everolimus (RAD-001)** a další mTOR inhibitor **AP23573** jsou potencionálními víceúčelovými léky u RCC. Ve dvou posledních fázích I studií s těmito léky, bylo pozorováno 12 měsíční trvání odpovědi (301, 357). V současnosti je everolimus porovnáván s placebem v mezinárodní klinické studii fáze III u nemocných s metastazujícím renálním karcinomem po selhání léčby sorafenibem, sunitinibem nebo oběma.

### **Gefitinib (Irresa)**

Gefitinib, malomolekulární tyrosinkinázový inhibitor, který je relativně vyvinut do klinického užívání, inhibuje EGFR v nanomolekulární koncentraci. Ve 2 studiích fáze II (IDEAL 1 a IDEAL 2) u předléčených pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (NSCLC), léčba monoterapií gefitinibem vedla k objektivní míře odpovědi 18,5 %, resp. 10% (109, 192). Gefitinib je nyní zkoušen v mnohých zemích ve třetí linii léčby u pokročilého NSCLC po selhání chemoterapeutických režimů. Užití gefitinibu v malé studii fáze II u pokročilého RCC selhal- nebyla žádná objektivní odpověď, a u 75% pacientů došlo k progresi do 4 měsíců (79).

Studie fáze II Beerama o kol. (33) s užitím **erlotinibu**, alternativního EGFR tyrozinkinázového inhibitoru, vedla jen k jedné objektivní odpovědi ze skupiny 40 pacientů. Ačkoliv tyto výsledky by ukazovaly na nedostatečnou aktivitu látek mířených proti EGFR u RCC, studie nebyly adekvátně postaveny. Nutné jsou další kombinované studie.

### **Cetuximab (Erbitux)**

Cetuximab je chimerická myší/lidská monoklonální protilátka, která váže EGFR, čímž ruší buněčný cyklus a inhibuje nádorem indukovanou angiogenezi. Ačkoliv studie *in vivo* na myších xenograftových modelech se jevíly slibně (285), při užití cetuximabu u 55 pacientů s metastazujícím RCC nebyla pozorována žádná kompletní nebo částečná odpověď na jednoduchém rameni studie fáze II (247). To vedlo k přerušení dalšího zkoumání užití cetuximabu v monoterapii u léčby RCC, ačkoliv je cetuximab zkoušen v léčbě pokročilých stadií RCC.

Cetuximab je v současné době užíván v léčbě karcinomu kolorekta a v léčbě lokálně pokročilých spinocelulárních karcinomů hlavy a krku.

### **ABX-epidermal growth factor (ABX-EGF)**

ABX-epidermal growth factor je vysoce afinní lidská monoklonální protilátka, která váže EGFR na extracelulární doméně a brání vazbě EGF a TGF- $\alpha$  na receptor. Možná

protinádorová aktivita jako samostatného agens byla prokázána *in vivo* a v kombinaci s chemoterapeutiky u více nádorových typů zahrnujících karcinom pankreatu, karcinom prostaty, karcinom prsu, hlavy a krku a RCC (220). Fáze I/II studie na 88 vhodných pacientech s metastazujícím RCC, monoterapie ABX-EGF (týdně i.v. infuze přes 8týdnů) vedla k odpovědím u 5 nádorů a ke stabilizaci u 44 pacientů (305). Je registrována studie pokračující.

#### ***CI-1040***

Ve vývoji jsou také léčebné postupy cílené vůči MEK. Jedním orálním agens je CI-1040, který brání MEK fosforylaci a přenosu proliferačního signálu skrz cestu Raf/MEK/ERK. Fáze I studie se zvyšujícími se dávkami ukázala, že jednotlivá dávka CI-1040 je dobře tolerována na všech testovaných hladinách, se stabilizací choroby u 30% pacientů (215). Cílená terapeutická plasmatická koncentrace postavená na *in vivo* modelu byla dosažena po jednotlivé dávce 800mg.

#### ***Neovastat (AE-941) (223)***

Neovastat je přírodní látka získaná homogenizací a purifikací ze žraločích chrupavek. Bylo pozorováno, že inhibuje některé procesy závislé na VEGF díky kompetici ve vazbě na VEGFR-2, ale také podporuje apoptózu endotelu. Ačkoliv se výsledky v 2. fázi zkoušek zdály slibné (28, 29), nebyl ve 3. fázi zkoušek na souboru 300 pacientů refrakterních k imunoterapii prokázán benefit v prodloužení přežití (97, 99).

#### ***PTK 787/ZK222584 (Vatalanib)***

PTK 787 je orální selektivní inhibitor VEGF-1, VEGF-2 a PDGFR- $\beta$  tyrozinových kináz. Neinhibuje jiné kinázy, včetně EGF a FGF (394). Preklinická data dokazují, že PTK 787 inhibuje proliferaci, přežívání a migraci entotelových buněk (296). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nauzea, únava a zvracení. Maximální tolerovaná denní dávka je 1500 mg/den. Ve studii se 37 pacienty s renálním karcinomem byla u 1 pacienta pozorována parciální odpověď, u 6 pacientů minimální odpověď, stabilizace choroby byla popsána u 46% pacientů. Jednoleté přežití bylo 63,7% (113).

#### ***IM862 (70)***

Jedná se o dipeptid s imunomodulačními a antiangiogenními vlastnostmi. Zkouší se jeho využití v kombinaci s chemoterapií. Samostatné podávání nepřineslo žádnou objektivní

odpověď u pacientů s metastazujícím karcinomě ledviny, ale snížení hladiny VEGF bylo prokázáno.

### ***Imatinib (STI-571, Glivec)***

Imatinib, užívaný u chronické lymfatické leukémie a gastrointestinálních stromálních tumorů díky specifickému účinku na Bcr-Abl kinázu a c-kit, rovněž inhibuje PDGFR tyrozinkinázu, a tak se zkouší v kombinaci s pegylovaným interferonem u RCC (326).

### ***TNP-470***

Tento lék je analogem fumagillinu, který inhibuje růst endotelových buněk (150). Předpokládaným cílem fumagillinu i TNP-470 je typ II metionin aminopeptidáza, která je přítomna v endoteliálních buňkách (333). Bylo sledováno 33 pacientů s metastazujícím renálním karcinomě (345). Zaznamenána byla pouze jedna parciální odpověď, navíc byla pozorována mozková a neuropsychiatrická toxicita a únava. U šesti pacientů bylo zaznamenáno prodloužení periody do progresu onemocnění, ale není jisté, zda se jednalo o efekt léčby.

Omezení v aplikaci antiangiogenní léčby u nádorových onemocnění je dáno mimo jiné heterogenitou endotelových a nádorových buněk a nádorovým mikroprostředím.

Dnes je akceptována teorie, že endoteliální buňky intratumorálních cév (aktivované endotelie) jsou fenotypově (a pravděpodobně i genotypově) odlišné od normálních endotelií. Výzkum VEGF receptorů a jejich regulace prokázal, že jsou velké fenotypové rozdíly mezi vyzrálými cévami v klidovém stadiu a mezi nově formovanými. Tyto rozdíly mohou být důvodem, proč jsou uchráněny normální cévy a přitom dosaženo terapeutického efektu.

Invazivní nádory mají obvykle vyjádřeny mnohé angiogenní faktory, z nichž některé jsou ve vztahu k příslušné tkáni specifické. Genetická nestabilita nádoru však může vyústit ve změnu počtu i typu proangiogenního faktoru. To pak může vést následně k selekci klonu rezistentního vůči podávanému antiangiogennímu faktoru. Produkce stejného proangiogenního faktoru negarantuje stejnou odpověď vůči antiangiogenní léčbě. Např. Wilmsův tumor i neuroblastom přednostně produkují VEGF. Přímá monoklonální protilátka proti VEGF zastavuje růst prvního nádoru, zatímco neuroblastom vykazuje rezistenci (174). Mechanismus popsané skutečnosti (resp. rezistence) zatím není znám. Bylo prokázáno, že porucha p53 v nádorových buňkách snižuje senzitivitu vůči antiangiogenní léčbě (172). Dále bylo prokázáno, že chronická hypoxie selektuje p53 mutované nádorové buňky rezistentní

vůči hypoxii-indukované apoptóze. Antiangiogenní léčba předpokládá závislost angiogeneze a odpovědi na hypoxii, hypoglykémii a akumulaci odpadových produktů. Různorodost v citlivosti vůči hormonálním změnám, cytostatické léčbě a ionizujícímu záření je důvodem pro selhávání této léčby. Ve více jak polovině všech nádorových cév dochází k cyklické hypoxii. Následkem toho nádorové buňky rozvíjejí mechanismy rezistence. Některé nádorové buňky jsou pak schopny přežít prodlouženou periodu hypoxie (81, 82).

Nádorové mikroprostředí chrání endotelovou složku. Pericyty obklopují zralé cévy a zajišťují signalizaci důležitou k přežití endotelových buněk. Rozdílné působení pericytů v různých nádorech obvykle vede k vyzrávání cév, přežívání a citlivosti vůči antiangiogenní terapii (87). Pericyty mohou být odpovědné za VEGF-nezávislé přežívání zralých cév. Extracelulární matrix obsahuje nebo uvolňuje mnohé pro- a antiangiogenní faktory. Z tohoto důvodu se očekává různá senzitivita. Například léčba inhibítorem MMP batimastatem má různý efekt na nádorovou progresi a růst v závislosti na umístění metastáz (216).

Nádorové mikroprostředí také ovlivňuje průnik léku (280). Například přirozené inhibitory angiogeneze, angiostatin a endostatin, jsou rychleji odstraněny z cirkulace při intravenózním bolusovém podání (268, 269). Pravděpodobně nejúčinnější bude podávání v kontinuální infuzi. Na vliv mikroprostředí nádoru ukazují také smíšené odpovědi, které byly pozorovány u klinických studií (např. regrese plicních metastáz a růst jaterních metastáz u jednoho pacienta) (235, 342, 365).

## **8. SOUBOR NEMOCNÝCH**

Světlobuněčný renální karcinom byl diagnostikován u 32 pacientů (11 žen a 21 mužů, Ø věk 65,9 roků, SD 10,8, median (57,0 - 74,5) v období od října 2005 do září 2006. U všech nemocných byl odstraněn primární nádor ledviny, 8krát byla provedena parciální resekce, 24krát nefrektomie (11x vpravo, 13x vlevo). Diagnóza renálního karcinomu byla potvrzena histologicky (u všech pacientů se jednalo o světlobuněčný karcinom ledviny), 13 pacientů mělo v době operace I. stádium, 2 pacienti II. stádium choroby, 8 pacientů bylo ve III. stadiu choroby a 9 pacientů ve IV. stadiu choroby. Buněčný grading dle Fuhrmanové byl u jednoho pacienta I., u 5 pacientů I-II, u 13 pacientů II, u dvou pacientů II-III, u osmi pacientů III, u třech pacientů III-IV (AJCC staging, 6th Edition, 2002). Nemocní s RCC byli rozděleni do tří skupin podle stadií choroby. První skupina zahrnovala 15 pacientů v I. a II. stadiu choroby, druhá skupina 8 pacientů ve III. stadiu choroby a třetí skupina 9 pacientů ve IV. stadiu choroby. Charakteristika souboru je uvedena v tabulce č.2. Follow up byl 3 měsíce. Kontrolní



soubor tvořilo 14 zdravých dobrovolníků, 8 mužů, Ø věk 56,3 roky medián (50,8 -72,4) a 6 žen, Ø věk 53,7 roků medián (47,9 – 69,8)

## 9. METODY

### 9.1. Metody stanovení angiogenních faktorů

Mezi běžně stanovované pro- a anti-angiogenní faktory patří celá řada cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Jejich koncentrace v séru, plasmě, případně v dalších tělních tekutinách se pohybují většinou v pg/ml až ng/ml. Pro tyto hladiny jsou nejvhodnější imunochemické metody s tzv. následnou detekcí, kdy je pro stanovení použita specifická protilátka (často monoklonální) a vzniklý imunokomplex je potom detekován po označení enzymem, radionuklidem nebo fluorescenční (luminiscenční) značkou. Nejrozšířenější je metoda ELISA s použitím dvou specifických protilátek proti měřenému faktoru. Jedna z nich je často již označena vhodným enzymem (nejčastěji křenuvová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Komerčně jsou pro většinu těchto faktorů dostupné hotové kity pro ELISA stanovení v séru, plasmě nebo supernatantech buněčných kultur.

Další možnou alternativou stanovení pro- a anti-angiogenních faktorů je použití některé multiplexové metody, která umožní současné stanovení celé škály cytokinů, chemokinů aj. v jednom vzorku při jedné analýze. K takovým metodám patří např. tzv. proteinové arraye (protein, antibody arrays). Podstatou je membrána pokrytá spoty (skvrnami, oblastmi), kde jsou navázány specifické protilátky proti jednotlivým faktorům. Po aplikaci vzorku se analyzované proteiny navážou na příslušné protilátky. V dalším kroku je aplikována směs protilátek proti měřeným proteinům značená vhodným enzymem a vzniklé imunokomplexy fixované v oblasti příslušných spotů jsou vizualizovány vhodnou barevnou reakcí. Výsledkem je membrána s viditelnými skvrnami o různé intenzitě. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny.

Jinou možnou alternativou multiplexové metody je analýza s využitím mikročastic. Nejrozšířenější verzí je použití tzv. Luminex technologie používající mikrosféry o různé intenzitě fluorescence. Na tyto mikrosféry jsou navázány protilátky proti příslušným proteinům. Ke vzorku séra, plasmy je přidána taková směs mikrosfér, která odpovídá zvolenému spektru vyšetřovaných proteinů. V dalším kroku jsou navázané proteiny označeny další protilátkou konjugovanou s vhodným fluorescenčním barvivem a mikrosféry jsou analyzovány ve speciálním zařízení, které je schopno detekovat současně oba typy fluorescence a vyhodnotit koncentraci měřených faktorů.

Obecně lze říci, že multiplexové metody se hodí spíše pro screening (vytipování) vhodných faktorů z nějaké širší skupiny a techniky ELISA, které se vyznačují větší přesností a reprodukovatelností než multiplexy, pro následné kvantitativní sledování již vytypovaných faktorů.

## 9.2. Protein array metoda

RayBio® Human Cytokine Array je první komerčně dostupný proteinový array systém. Umožňuje rychle, přesně a levně identifikovat expresi mnoha cytokinů během několika hodin.

Pracuje na principu jednoduchého array formátu, vysoce citlivého systému určeného k simultánní detekci exprese hladin mnoha cytokinů z upraveného media, pacientova séra a jiných zdrojů. Arraye označené I, III, IV jsou určeny především pro sérum a plasmu. Arraye 1.1, 3.1., 4.1 a 5.1. jsou specificky upraveny pro buněčné a tkáňové lyzáty.

Cytokiny jsou tradičně detekovány metodou ELISA, nicméně přístup RayBiotech má oproti ELISA metodám několik výhod. První a nejdůležitější je, že lze detekovat zároveň několik cytokinů najednou. Druhou výhodou je jeho značně vyšší senzitivita. Použitím protein array metody může být detekováno méně než 4 pg/ml MCP-1, metodou ELISA lze stanovit hladiny od 40 pg/ml MCP-1. Navíc, detekční rozsah (rozmezí) array metody je mnohem větší než u ELISA technik. Například RayBiotech technologie je schopna měřit hladiny IL-2 v rozsahu od 25 do 25000 pg/ml, zatímco ELISA má rozsah stanovení 10 - 100x menší.

Pro analýzu angiogenních faktorů byla použita souprava *RayBio Human Angiogenesis Antibody Array 1* od firmy RayBiotech, Inc. USA. Použitá nitrocelulósová membrána (Hybond, Amersham Biosciences) je pokrytá spoty (místy), kde jsou navázány specifické protilátky proti jednotlivým vyšetřovaným faktorům. Membrána obsahuje pozitivní kontroly (3x2 spoty), negativní kontroly (2x2 spoty) a 20x2 spoty pro stanovení angiogeninu, endothelial growth factor (EGF), epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78), basic fibroblast growth factor (bFGF), pan-gene related oncogene (pan-GRO), interferon (IFN $\gamma$ ), insulin-like growth factor (IGF-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), leptin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), platelet-derived growth factor (PDGF-BB), placental growth factor (PIGF), RANTES (regulated on activation, normally T cell-expressed and – secreted), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2), thrombopoetin, vascular endothelial growth factor (VEGF, VEGF-D) (viz. tab. č.3).

### 9.3. Použitý materiál

Array membrány a blokující pufrы musí být uloženy při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Všechny další komponenty mají být uskladněny při  $4^{\circ}\text{C}$ .

- RayBio@Human Cytokine Array membrány (2/4/8 membrán v balení)
- protilátky proti cytokinům značené biotinem (směs)
- koncentrovaný HRP-konjugovaný streptavidin (24 $\mu\text{l}$ )
- blokující pufr (15/25ml)
- promývací pufr I (10/20ml)
- promývací pufr II (10/20ml)
- substrát TMB
- osmikomorové misky pro inkubaci membrán
- manuál

### Další potřebný materiál

- okružní třepačka
- plastová adhezní folie
- digitální scanner s rozlišením cca 300x300 dpi
- software pro vyhodnocování array metody

### 9.4. Příprava vzorků, manipulace s array membránami

- Séra od pacientů byla získána opakovanými odběry periferní žilní krve provedenými v den operace, v období 7. dne po operaci a 8 týdnů po operaci.
- Hodinu po odběru byl každý odebraný vzorek krve 10 minut centrifugován při 3000 rpm. Následně byla séra rozdělena do dvou alikvotů a skladována při  $-20^{\circ}\text{C}$  do zpracování.
- Kontrolní séra byla získána od 14 zdravých dárců krve podobného věkového složení.
- Manipulace s membránami: nedoporučuje dotýkat se povrchu membrán, vždy je třeba použít měkkou pinzetu a uchopit membránu za okraj. Membrána také nesmí během práce vyschnout, je třeba provádět inkubace v přiložené destičce s 8 jamkami.

## 9.5. Vlastní postup

1. Umístili jsme membrány do 8-komorových destiček a přidali 2 ml blokovacího pufru tak, aby membrány byly zcela ponořeny. Misky jsme zakryli víčky pro zabránění vysušení membrán.
2. Následovala inkubace za pokojové teploty 30min na třepačce. Rychlost třepání je třeba zvolit tak, aby nedošlo k pění kapaliny v jamkách.
3. Slili jsme a odsáli blokuující pufr z každé jamky a inkubovali membrány s 1ml vzorku sér za pokojové teploty od 1 do 2 hodin za třepání.
4. Slili jsme vzorky ze všech jamek, odsáli a promyli membrány 3x s 2ml promývacího pufru I za pokojové teploty s třepáním. Promývali jsme á 5 min. Dále jsme promyli membrány 2x s 2ml promývacího pufru II rovněž za pokojové teploty při třepání opět po 5 minutách.
5. Připravili jsme pracovní roztok detekčních protilátek tak, že jsme přidali odpovídající množství ředícího pufru do nádoby s koncentrovanou směsí biotinem značených protilátek proti měřeným cytokinům a faktorům.
6. Přidali jsme po 1ml takto naředěných protilátek na každou membránu. Inkubovali jsme membrány při pokojové teplotě 1-2 hodiny za třepání.
7. Promyli jsme stejně, jak je uvedeno v kroku 4.
8. Přidali jsme 2ml ředěného streptavidinu konjugovaného s HRP na každou membránu.
9. Inkubovali jsme při pokojové teplotě 2 hod za třepání.
10. Promyli jsme stejně, jako je popsáno v kroku 4.

## 9.6. Detekce

1. Membrány se nesmí nechat během detekce vyschnout. Detekce musí být dokončena během 40 minut.
2. K membránám jsme přidali 2 ml předem připraveného substrátu (TMB) a nechali za třepání inkubovat 30 minut. Během této doby je již možno sledovat vývoj zbarvení jednotlivých spotů.

3. Po ukončení inkubace jsme membrány promyli 5x 2 ml destilované vody. Tomuto promytí je třeba věnovat maximální pečlivost. Po promytí jsme membrány nechali uschnout a uchovali na tmavém místě do vyhodnocení.

### **9.7. Vyhodnocení a interpretace výsledků**

1. Obraz skvrn (spotů) na membránách jsme převedli do digitální podoby na vhodném scanneru s rozlišením min. 300x300 dpi.
2. Vzniklé obrázky ve formátu bmp (bitová mapa) jsme načetli do vyhodnocovacího software ARES , který vyhodnotil relativní denzity jednotlivých skvrn (spotů) vzhledem k pozitivní a negativní kontrole. Porovnáním intenzit signálů mohou být stanoveny relativní exprese hladin cytokinů. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny hodnocené denzitometricky. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software ARES ARay Evaluation System (Baria, Czech Republic). Výsledná koncentrace jednotlivých proteinů je vyjádřena jako relativní intenzita (hodnota) zbarvení spotů vzhledem ke kontrolám.

### **9.8. Statistické hodnocení dat**

Statistické porovnání naměřených hodnot bylo provedeno pomocí programu NCSS 2007, Statistica. K porovnání všech souborů pacientů a kontrolního souboru bylo použito dvouvýběrového t-testu, případně Kolmogorov-Smirnov testu. Pro porovnání vývoje parametrů v čase a mezi skupinami byla použita jednofaktorová analýza rozptylu s opakovanými měřeními s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem. Za statisticky významné jsou považovány výsledky, kdy  $p < 0,05$ .

## **10. VÝSLEDKY**

Nemocní s RCC, 11 žen a 21 mužů, Ø věk 65,9 roků, byli rozděleni do tří skupin podle TNM klasifikace (10. revize z roku 2002). První skupina zahrnovala 15 pacientů v I. a II. stadiu choroby, druhá skupina 8 pacientů ve III. stadiu choroby a třetí skupina 9 pacientů ve IV. stadiu choroby. Tabulky č. 4-18 ukazují porovnání hladin angiogeninu, MCP-1, RANTES, GRO, ENA-78, IL-8, PDGF, IL-6, EGF, TIMP-1, TIMP-2 a leptinu v den operace, týden po operaci a 8 týdnů po odstranění tumoru.

Sérové hladiny angiogeninu byly před operací významně vyšší u nemocných všech stadií s RCC oproti zdravým dárčům krve ( $47,57 \pm 3,73$ ,  $p=0,003$  u pacientů IV. stadia,  $48,13 \pm 5,12$ ,  $p<0,001$  u pacientů I.-II.,  $51,94 \pm 3,39$  u III.stadia) a přetrvávaly ještě 7. den ( $p=0,002$  u pacientů I.-II. stadia,  $p<0,001$  u pacientů III. a IV. stadia) a dokonce i 8. týden ( $p<0,001$ ) po odstranění tumoru. Nebyly však prokázány signifikantní rozdíly hladin angiogeninu mezi jednotlivými stadii choroby (viz. tab. č. 4, graf č. 1a, b, c).

MCP-1 bylo v porovnání s kontrolním souborem zvýšeno u pacientů s I.+II. ( $p=0,002$  předoperačně, 7 dní a 8 týdnů po operaci ( $p<0,001$ )) a III. stadiem ( $p<0,001$ ) RCC, zatímco nemocní s pokročilým RCC (IV. stadium) neměli oproti zdravým kontrolám odlišné sérové hodnoty MCP s výjimkou období 7 dní po operaci, kdy  $p=0,034$ . Navíc jsme zaznamenali signifikantně nižší hodnoty MCP-1 u IV. stadia ( $13,43 \pm 5,58$ ) oproti III. stadiu ( $23,06 \pm 5,69$ ) předoperačně ( $p=0,025$ ). Významné snížení MCP-1 bylo zjištěno i 7. den ( $p=0,006$  I.+II.st.,  $p=0,019$  III.st.) a 8. týden ( $p<0,001$ ) po operaci u pacientů s IV. stadiem oproti nemocným stadia I.+II. a III. (viz. tab. č. 5, graf č. 2 a, b, c).

Hladina RANTES jevila největší statisticky významný rozdíl oproti hodnotám u zdravých osob 8 týdnů po operaci ( $p<0,001$ ) u pacientů I.+II. a III.stadia. U těchto skupin pacientů byly nalezeny statisticky významné rozdíly již 7 dní po operaci ( $p=0,039$  u I.+II. stadia,  $p=0,019$  u III.stadia), v případě pacientů III.stadia již předoperačně ( $p=0,022$ ). Pacienti s pokročilou chorobou nejevili staticky významný rozdíl v hladinách RANTES proti skupině zdravých osob. Nemocní s pokročilým nádorem (IV. stadium) měli signifikantně nižší hodnoty RANTES oproti nemocným I. až III. stadia před operací a 8 týdnů po operaci. Vlivem operační zátěže došlo u pacientů IV. stadia ke zvýšení hladiny RANTES a 7.den po operaci nebyly zjištěny signifikantní rozdíly oproti pacientům ze skupiny I.+II. a III. stadia (viz. tab. č. 6, graf č. 3 a, b, c).

Hladiny ELR<sup>+</sup> CXC chemokinů (ENA-78, GRO) v séru nemocných s RCC všech stadií byly předoperačně významně zvýšené oproti skupině zdravých osob ( u GRO  $p<0,001$ , u ENA-78 u pacientů I.+ II. a III.stadia též  $p<0,001$ , u pacientů IV. stadia  $p=0,012$ ). Podobně jako u angiogeninu 8. týden po odstranění tumoru nedošlo u pacientů všech stadií k signifikantnímu snížení hladin ENA-78 a GRO. Nemocní s pokročilým RCC (IV. stadium) měli nižší sérové hodnoty ENA-78 a GRO, které však nedosahovaly hladiny statistické významnosti (viz. tab. č. 7 a 8, grafy č. 4 a, b, c, 5 a, b, c).

Na rozdíl od prací sledujících produkci IL-8 u jiných malignit, jsme našli při porovnání skupiny zdravých osob a nemocných s RCC statisticky významné rozdíly v hladinách před operací u pacientů III.( $p=0,040$ ) a IV. stadia ( $p=0,017$ ). Pooperačně došlo

k signifikantnímu poklesu hladin IL-8 u všech skupin pacientů již 7.den po operaci (viz. tab. č. 9 a 10, graf č. 6 a, b, c).

Hladiny PDGF v séru nemocných s RCC I.-III.stadia byly významně zvýšené oproti skupině zdravých osob ( $p=0,017$  u I.+II.stadia,  $p=0,029$  u III.stadia). U pacientů IV. stadia byla předoperační hodnota PDGF signifikantně nižší oproti kontrolnímu souboru ( $35,49 \pm 3,95$ ,  $p=0,032$ ). V průběhu sledování byl zaznamenán u pacientů IV. stadia vzestup PDGF, který 8. týden dosáhl statistické významnosti ( $p=0,003$ ). V předoperačních odběrech jsme zaznamenali signifikantně nižší hladiny PDGF u nemocných IV. stadia ( $35,49 \pm 3,96$ ) oproti stadiu I.+II. ( $p<0,001$ ) a III. ( $p=0,005$ ). Statisticky významný rozdíl mezi pacienty I.+II. a IV. stadií přetrvával i 7. den ( $p=0,046$ ) (viz. tab. č. 11, graf č. 7 a, b, c). U pacientů IV. stadia se hladina PDGF signifikantně zvýšila 8.týden po operaci oproti předoperační hodnotě (viz. tab. č.12, graf č. 7 a, b, c).

V hladinách IL-6 jsme nenalezli statisticky významný rozdíl mezi kontrolami a pacienty s různými stadii RCC jak předoperačně, tak pooperačně (viz. tab. č. 13, graf č. 8 a, b, c).

Naměřené hladiny EGF nevykazovaly statisticky významné rozdíly mezi nemocnými a zdravými osobami ani předoperačně (s výjimkou pacientů s I.+II. a III.stadiem choroby, kde  $p=0,044$  u I.+II.stadia, resp. $p=0,004$  u III.stadia), ani pooperačně. Po celou dobu sledování nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách EGF mezi jednotlivými stadii choroby (viz. tab. č. 14, graf č. 9 a, b, c).

Rovněž hladiny TIMP-1 a TIMP-2 u pacientů s pokročilým RCC (stadium IV.) nejevily statisticky významný rozdíl oproti skupině zdravých osob ani předoperačně, ani po operaci. Statisticky významné rozdíly vůči kontrolnímu souboru byly shledány v případě hladin TIMP-1 a TIMP-2 u pacientů s I.+II. a III.stadiem choroby jak předoperačně, tak pooperačně (s výjimkou TIMP-2 u I.+II.stadia přepočetně, kde nebyl nalezen statisticky významný rozdíl). Pacienti s pokročilým nádorem (stadium IV) vykazovali před operací a 8.týden po operaci signifikantně nižší hladiny TIMP-1 a TIMP-2 v porovnání s nemocnými I.+II. a III.stadia (viz. tab. č. 15 a 16, graf č. 10 a, b,c, 11 a, b, c).

Hladiny leptinu u pacientů I.+II. a III.stadia pooperačně stoupaly. U pacientů I.+II.stadia dosáhla hladina leptinu statistické významnosti oproti kontrolní skupině 7. den po operaci ( $p=0,011$ ) a 8.týden po operaci ( $p<0,001$ ). U pacientů III.stadia byl prokázán statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu souboru až 8.týden po operaci ( $p=0,003$ ). Ve skupině pacientů I+II.stadia oproti pacientům IV. stadia byly sérové hladiny leptinu signifikantně vyšší jak před operací ( $p=0,022$ ), tak 7.den operací ( $p=0,035$ ) a 8.týden operací

( $p < 0,001$ ). Hladina leptinu u nemocných IV. stadia byla signifikantně nižší 8.týden po operaci oproti nemocným III.stadia ( $p < 0,001$ ). Hladina leptinu se signifikantně zvýšila u pacientů I.+II. a III.stadia 8.týden po operaci (viz. tab. č. 17 a 18, graf č. 12 a, b, c).

## 11. DISKUZE

Použitá metoda proteinové arraye umožnila detekovat sérové hladiny angiogeninu, pan-GRO, ENA-78, IL8, MCP-1, PDGF, RANTES, IL-6, TIMP-1, TIMP-2, leptin a EGF, zatímco jiné analyty, jako např. VEGF, VEGF-D, bFGF, TGF  $\beta$ 1, IGF-1, PIGF, trombopoetin a IFN- $\gamma$  nebyly použitou metodou detekovány. Přestože firma Ray Bio uvádí u Human Angiogenesis Antibody Array I (1.1. Map) senzitivitu a specificitu srovnatelnou s ELISA testy, ve skutečnosti bude senzitivita testu nižší, nedovolující stanovení některých analytů v nízkých koncentracích (144, 308). V praxi to znamená, že reálně hodnotitelný počet analytů (proteinů) je nižší, než je nanesený počet proteinových stop (trace proteins) na membránu (59). Podobně je tomu i v naší studii, ve které jsme z dvaceti možných faktorů stanovili 12 parametrů. Senzitivita metody ale pravděpodobně nebude jedinou příčinou, proč v séru nemocných s RCC nebyly detekovány některé angiogenní faktory.

Práce Wechsela (384) nepotvrdila u nemocných s RCC korelaci mezi kapilární (vaskulární) denzitou v nádorové tkáni a sérovými hladinami VEGF, FGF- $\beta$  a angiogeninu. Klatte a kol. porovnávali hladiny VEGF, PDGF-BB a TGF- $\beta$  v krvi z renální žíly a v periferní krvi v období po nefrektomii ve vztahu k prognóze (30-měsíční follow-up). Korelace byla prokázána jen u VEGF (181). V jiných studiích se u nemocných s RCC sérové hladiny VEGF a FGF- $\beta$  signifikantně nelišily od hodnot u zdravých dárců krve, nebyla shledána ani korelace mezi jejich sérovými hladinami a stadiem choroby, buněčným gradingem a prognózou onemocnění (32, 89). Uvedené nálezy i výsledky naší práce mohou být způsobeny ohraničením produkce angiogenních faktorů na ložisko nádoru, které zůstává bez systémové odpovědi (383). Díky větší vnímavosti endoteliálních buněk nádorových cév k angiogenním stimulům postačí již nepatrné zvýšení proangiogenních faktorů, které vede k jejich stimulaci, zatímco endotelové buňky normálních cév zůstávají neovlivněny (32). Jiné vysvětlení nízkých hladin nebo chybění angiogenních faktorů v séru lze vysvětlit produkcí inhibičních faktorů, neutralizujících systémovou odpověď. K neutralizaci může dojít cestou kompetitivní vazby na specifický solubilní receptor nebo proteolytickým štěpením. Příkladem je situace u Lewis(ova) plicního nádoru, kde je pozorována intenzivní stimulace angiogeneze v místě primárního tumoru, zatímco růst vzdálených metastáz je blokován enzymatickým štěpením



plazminogenu na angiostatin, který je účinným inhibítozem angiogeneze (269). Na výsledcích studií nádorové angiogeneze se podílí i labilita některých faktorů, která během zamražení a v průběhu skladování vede ke ztrátě biologických aktivit.

Dalším vysvětlením nízkých hladin některých angiogenních faktorů v séru jsou rozdíly v regulačních mechanismech fyziologické a nádorové angiogeneze. Nádor není tvořen pouze nádorovými buňkami; stroma nádoru je z velké části tvořena tumour associated macrophages (TAMs). Je prokázáno, že přítomnost TAMs koreluje s nádorovým růstem a metastazováním prostřednictvím nově tvořených cév (61). Nádorové kapiláry se od normálních liší svým nepravidelným upořádáním, které neumožňuje laminární proudění. Stěny cév mají nedostatečně vyvinutou hladkou svalovinu, vznikají výdutě, které trombotizují a jsou zdrojem krvácení do nádoru. Je nepochybné, že právě přítomnost monocyto-makrofágů se podílí na vytváření odlišného proangiogenního prostředí v nádoru oproti angiogenezi v období embryogeneze. Takto lze vysvětlit normální hladiny VEGF v séru i selhání léčby bevacizumabem u nemocných s metastazujícím RCC. Přesto jsou u nemocných s různými nádory popisována zvýšení některých angiogenních faktorů v séru (194).

### **11.1. Angiogenin**

V našem souboru bylo nalezeno zvýšení angiogeninu oproti kontrolnímu souboru jak u nemocných s I. a II. stadiem RCC ( $p < 0,001$ ), tak s pokročilým (stadium III) ( $p < 0,001$ ) nebo metastazujícím tumorem (stadium IV) ( $p = 0,003$ ). Navíc zvýšení přetrvávalo ještě po celých dalších následujících 8 týdnech po nefrektomii. Porovnání hladin angiogeninu před operací a týden po operaci vykazovalo nesignifikantní zvýšení, které je možné vysvětlit nástupem hojení operační rány, jehož součástí je i novotvorba kapilár. Signifikantní zvýšení angiogeninu oproti zdravým dárcům ale přetrvávalo ještě 8 týdnů po odstranění nádoru jak u nemocných s metastazujícím RCC ( $p < 0,001$ ), tak nemocných s I. a II. stadiem ( $p < 0,001$ ) bez prokázaných metastáz. Dlouhodobé zvýšení angiogenních faktorů je popisováno u hojení ran komplikovaných chronickými infekcemi nebo u nemocných např. s diabetes mellitus, revmatoidní artritidou, astma bronchiale atd. (332, 388). U našich nemocných byla hojení operačních ran nekomplikovaná a žádný z našich pacientů netrpěl chronickým zánětlivým onemocněním nebo endokrinopatií v době operace.

### **11.2. Chemokiny CCL2 (MCP-1) a CCL5 (RANTES)**

Pro nádorovou angiogenezi je charakteristická významná účast buněk přirozené imunity, makrofágů a dendritických buněk (330). U nemocných s nádorovým onemocněním

je CCL2 (MCP-1), člen CC chemokinové rodiny, produkován hlavně nádorovými buňkami. V závislosti na přítomnosti dalších chemokinů a cytokinů určujících charakter nádorového mikroprostředí reguluje vstup monocytů do nádoru (133).

Zatímco produkce VEGF, angiogeninu, bFGF a PDGF se za hypoxických podmínek zvyšuje, v případě MCP-1 je tomu naopak (61, 133, 261). Signifikantně nižší hladiny MCP-1 u našich nemocných s pokročilým RCC mohou být způsobeny lokální hypoxií nádorové tkáně, která je často vystupňována až k centrální nekróze tumoru. V imunohistochemických stanoveních objemných nádorů i bez centrální nekrózy jsou TAMs popisovány pouze na rozhraní zdravé a nádorové tkáně, v centru nádoru TAMs chybí (330). K hypoxii tkání přispívá i sekundární anemie. Nedostačující cévní zásobení nádoru a sekundární anemie u nemocných s pokročilým metastazujícím RCC je pravděpodobně hlavní příčinou signifikantního snížení sérové hladiny MCP-1 u pacientů IV. stadia. U nemocných s chorobou ve stadiu I+II a III přetrvávalo oproti kontrolám zvýšení sérových hladin MCP-1 ještě 7. den ( $p < 0,001$ ) a 8. týden ( $p < 0,001$ ) po odstranění primárního tumoru. Naopak 8. týden po nefrektomii u nemocných s IV. stadiem RCC sérová hladina MCP-1 poklesla, ačkoliv byly přítomny vzdálené metastázy a hodnoty angiogeninu přetrvávaly zvýšené. Zdá se, že ve fázi pokročilé choroby nízká hladina MCP-1 potvrzuje nedostatečné zapojení buněk monocyto-makrofágové řady. Stimulace a správná funkce dendritických buněk a monocyto-makrofágů je nezbytná pro účinnou protinádorovou cytotoxickou odpověď. Stav imunologické neodpovídatosti vůči nádorovým antigenům při poruše nespecifické buněčné imunity nejsou schopny prolomit ani v onkologické praxi používané imunomodulační postupy (204).

Do rodiny CC chemokinů je řazen i CCL5 (RANTES - regulated upon activation normal T expressed and secreted) asociovaný s T lymfocytární aktivací a odpovědí. CCL5 je podobně jako CCL2 chemoatraktant pro monocyty a polymorfonukleární fagocyty. Předpokládalo se, že zvýšená produkce RANTES u nemocných s tumory vyplývá právě z amplifikace protinádorové imunitní odpovědi zprostředkované TIL. Produkce CCL5 dalšími normálními i nádorovými buňkami byla popsána následně. Studie sledující genovou expresi RANTES v normální a nádorové tkáni prokázaly signifikantně vyšší hladinu v nádorové tkáni (187, 303). U nádoru prsu exprese CCL2 (MCP-1) a CCL5 (RANTES) koreluje se zánětlivou infiltrací nádoru TAMs. Z klinických pozorování je známo, že tento buněčný fenotyp u nádoru prsu je asociován s agresivnějším růstem nádoru, častějším zakládáním vzdálených metastáz a horší prognózou choroby (218). Kondo a kol. popsali, že u většiny pacientů s RCC vykazujících zvýšené hladiny RANTES spolu s IP-10, I-TAC, MIG, MIP-1 $\beta$ , nedošlo po chirurgické léčbě k exacerbaci choroby (188). Z těchto pozorování je patrné, že CCL5 není

určujícím faktorem charakteru zánětové reakce. Koreluje s její intenzitou a odráží dynamiku procesu. U našich nemocných byly oproti kontrolnímu souboru sérové hladiny RANTES zvýšeny u nemocných s RCC všech stadií. Sérové hodnoty CCL5 zůstaly po celé osmitýdenní období sledování nezměněny. Metastazující nádory jsou spojeny s různě závažnou sekundární imunodeficiencí. Z nálezů nižších hodnot u nemocných IV. stadia oproti nemocným I.- III. stadia se je možné domnívat, že podíl zánětové reakce na celkové hladině CCL5 je významný.

### **11.3. Chemokiny CXCL 1-3 (pan GRO), CXCL 5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8)**

S objevy na poli regulace buněčného růstu přibývá stále více dokladů o ambivalentním vztahu mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami. Buňky imunitního systému infiltrující tumor produkují řadu cytokinů a chemokinů, kterými se zapojují do stimulace (např. IL-4, IL-10, IL-13, TGF $\beta$ ) nebo inhibice (např. INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-18, IP-10) nádorové angiogeneze. Naproti tomu solubilní faktory, jako např. IL-6 a CSF-1, derivované neoplastickými buňkami, diferencují prekurzorové myeloidní buňky v macrophage-like phenotype cells a v dendritické buňky (DCs). DCs infiltrující tumor jsou převážně nezralé a jejich stimulační signály pro cytotoxické T lymfocyty jsou nedostatečné. TAMs stimulované IL-2 a IL-12 mohou navodit cytolýzu nádorových buněk. TAMs ale také produkují řadu cytokinů, proteáz, angiogenních a lymfangiogenních růstových faktorů, které potencují nádorový růst. Jak TAMs, tak nádorové buňky produkují IL-10, který účinně blokuje odpověď cytotoxických T lymfocytů na nádorové antigeny (254).

Vstup monocytů a lymfocytů do nádoru je regulován chemokiny. Existuje řada experimentálních i klinických pozorování, která dokládají složitost těchto regulací. Příkladem jsou chemokiny CXC rodiny. Rozdílný účinek CXC chemokinů je dán sekvencí tří aminokyselin Glu-Leu-Arg (ELR) na N konci (N terminus) (232). ELR+ CXC chemokiny (i.e. CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8) vykazují proangiogenní vlastnosti, zatímco ELR- CXC chemokiny (i.e. CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) blokují novotvorbu kapilár (337). U nemocných s metastazujícím RCC byly nalezeny vyšší sérové hladiny CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8 v porovnání se zdravými dárci (232). Suyama a kol. našli u většiny pacientů s RCC zvýšenou expresi angiogenních cytokinů IL-8, ENA-78 a Gro- $\alpha$  (355).

V naší studii jsme našli zvýšení pan-GRO (CXCL1-3) a ENA-78 (CXCL5) jak u nemocných s nádorem ohraničeným na ledvinu (stadium I a II), tak s pokročilým a metastazujícím RCC (stadium III a IV). Navíc před operací nemocní III. stadia měli oproti nemocným I.+II. stadia signifikantně vyšší hodnoty GRO ( $p = 0,041$ ) i ENA-78 ( $p = 0,009$ )

Chemokiny CXCL1-3 přitahují monocyty a napomáhají jejich vstupu do nádorové tkáně. Monocyty se diferencují v makrofágy – TAMs a v dendritické buňky (mocyte-derive dendritic cells)(moDCs). Tyto buňky jsou nejučinnějšími antigen prezentujícími buňkami a produkují prozánětlivé cytokiny TNF $\alpha$ , IL-1. Kromě toho indukují prostřednictvím chemokinů CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7, CXCL8 chemotaxi polymorfonukleárních leukocytů (PMNL) (412). Touto stimulací dochází na membráně PMNL k zesílení exprese adhezivních molekul a jejich ligand na cévním endotelu (328). PMNL uvolňují velké množství enzymů štěpících mezibuněčnou hmotu (316). Záleží na dalších faktorech nádorového mikroprostředí, zda převáží protinádorová imunitní odpověď nebo angiogenní efekt. Pouhou přítomnost DCs ve stromatu nádoru nelze považovat za projev účinné protinádorové odpovědi. DCs mohou přímo produkovat proangiogenní faktory a regulují další složky přirozené i získané imunitní odpovědi zapojující se do angiogeneze.

Pooperační zvýšení chemokinů pan-GRO a ENA-78, související pravděpodobně s reparačními pochody, bylo nesignifikantní ve vzorcích odebraných 7. den po odstranění nádoru. Tato představa je v souladu s pracemi Wu F.P. a Riese (294, 395). Operační výkony v břišní dutině byly bezprostředně po laparotomii provázeny vzestupem IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF a MCP-1 v peritoneální dutině bez nebo s nevýznamnou systémovou odpovědí. U těchto nemocných byla zánětová pooperační reakce kompartmentalizována s nejvyšší koncentrací cytokinů a chemokinů v místě tkáňového poškození (332). Tato pozorování vysvětlují naše nálezy sérových hladin GRO, ENA-78 a IL-8 v pooperačním období, které se již nezvyšovaly ani v průběhu hojení rozsáhlých operačních ran. Překvapivějším nálezem však bylo přetrvávající zvýšení jak ELR<sup>+</sup>chemokinů, tak dalších angiogenních faktorů, a to i ve skupině nemocných s RCC I. a II. stadia ještě 8. týden po nefrektomii, enukleaci tumoru nebo resekci pólu ledviny. Wetzler prokázal na myším modelu diabetu mellitu I. typu dlouhodobě přetrvávající přítomnost neutrofilů a monocytů v jizvě korelující s produkcí CC a CXC chemokinů (388). U našich nemocných se diabetes ani jiné endokrinopatie nevyskytovaly.

Přetrvávající zvýšení chemokinů v séru je též popisováno v průběhu hojení popálenin, zvláště v případech infekčních komplikací (21). Nikdo z našich nemocných netrpěl na chronické infekční onemocnění. Dlouhodobé zvýšení zánětlivých cytokinů, chemokinů a stresových hormonů pozoroval Kimura u nemocných s orgánovou dysfunkcí po parciálních resekcích jater (178). Zvýšení prozánětlivých cytokinů u pacientů s kolorektálním karcinomem bez metastáz pozorovala Kaminska ještě 6 týdnů po operaci (163). Vliv operační zátěže a predikce pooperačních komplikací jsou stále předmětem zájmu experimentálních i klinických studií.

IL-8 byl předoperačně signifikantně zvýšen u nemocných stadia III a IV RCC; zvýšení u stadia I+II bylo nesignifikantní, stejně jako rozdíly v sérových hladinách mezi jednotlivými stadii. IL-8 je významným chemoatraktantem neutrofilů. Zajímavým pozorováním byl pooperační pokles CXCL8 (IL-8) jak u nemocných stadia I+II a III RCC s radikálním chirurgickým výkonem, tak u nemocných IV. stadia RCC, u kterých bylo provedeno odstranění nebo pouze zmenšení primárního ložiska. Možným vysvětlením našich nálezů je pravděpodobnost, že metastatická ložiska mají odlišnou angiogenní aktivitu než primární tumor (269). Tuto představu potvrzují i klinická pozorování, kdy po odstranění primárního RCC bylo pozorováno zpomalení růstu nebo dokonce regrese metastáz. Vzhledem k poklesu IL-8 v séru již 7. den po operaci je možné CXCL8 považovat za faktor spojený s nádorem, který vypovídá o velikosti a možná i růstové aktivitě RCC.

Vzhledem k tomu, že chemokiny hrají důležitou roli v mnoha krocích nádorové progresi a metastazování, jsou chemokiny a jejich receptory považovány za atraktivní molekulární cíle pro léčbu maligních nádorů. Obzvláště monoklonální protilátky proti chemokinovým receptorům působí inhibicí růstu a/nebo šíření buněk maligních nádorů v experimentálním prostředí. Například anti CXCR4 monoklonální protilátka signifikantně inhibuje metastazování buněk lidského karcinomu prsu do lymfatických uzlin u SCID myši (256). Předléčení buněk non-Hodgkinova lymfomu anti CXCR4 monoklonální protilátkou také zastavuje následný růst buněk u imunodeficientních myši. V experimentálních studiích s liniemi buněk non-Hodgkinova lymfomu v *in vitro* a *in vivo* podmínkách vede neutralizace CXCR4 receptoru k následné inhibici transendoteliální a stromální migrace, zesiluje apoptózu nádorových buněk, potlačuje jejich proliferaci a inhibuje pučení nově tvořených cév (37).

Je pravděpodobné, že chemokinové receptory budou předmětem terapeutického zájmu. Specifický antagonist CXCR4, AMD3100, který je také silným blokátorem buněčného vstupu HIV, vykazuje inhibici růstu nádoru mozku indukci apoptotické buněčné smrti v buňkách nádoru (306). Ke klinické aplikaci inhibitorů CXCR4 musí být přikročeno s extrémní opatrností, protože interakce chemokinů s jejich receptory jsou klíčová pro udržení homeostázy; např. vazba CXCL12-CXCR4 hraje důležitou roli v migraci hemopoetických kmenových buněk, primitivních zárodečných buněk, a neurálních prekursorů (23).

#### 11.4. PDGF

Na novotvorbě cév se prostřednictvím solubilních faktorů podílejí i krevní destičky. PDGF je syntetizován nejen trombocyty, ale i dalšími buňkami, například endoteliálními buňkami a makrofágy (69, 208). PDGF vykazuje chemoatraktivní efekt vůči neutrofilům a

monocytům. Tím se zapojuje do regulační sítě modulující funkci makrofágů. PDGF je důležitým faktorem při formování lumen novotvořených cév (76, 205, 270, 346).

Klatte a kol. pozorovali u skupiny 33 pacientů krátce po operaci sníženou hladinu PDGF v periferní krvi, v renální venózní krvi odebrané peroperačně byla hladina vyšší (181). Naši nemocní se IV. stadiem RCC měli předoperačně signifikantně nižší sérové hladiny PDGF v porovnání s nemocnými se stadiem I+II ( $p<0,001$ ) a III ( $p=0,005$ ) RCC. Porovnáním hodnot kontrolního souboru s nemocnými s RCC IV. stadia byly předoperačně zjištěny statisticky nižší hodnoty PDGF ( $p=0,032$ ). V porovnání s kontrolním souborem došlo 8. týden po operačním výkonu u nemocných IV. stadia k signifikantnímu vzestupu PDGF ( $p=0,003$ ).

Tento jev může mít řadu příčin. Pooperační vzestup může být vyvolán operační zátěží a s ní spojenou stimulací imunitního systému. Jinou příčinou může být paraneoplastická koagulopatie spojená se zvýšenou tvorbou cévních uzávěrů, při které dochází k aktivaci a zapojení krevních destiček. Popsané nálezy snížených hodnot PDGF u nemocných IV. stadia RCC oproti nemocným s I.+II. a III. stadiem lze považovat za další doklad poruchy mechanismů nespecifické buněčné imunity, kdy při nádorové progresi je alterována funkce monocyto-makrofágových buněk, zatímco produkce jiných angiogenních faktorů, např. angiogeninu, a tím i angiogeneze zůstávají zachovány. Makrofágy, které se tak v počáteční fázi rozvoje nádoru podílejí nežádoucím způsobem na novotvorbě cév, nejsou u pokročilých stadií tumoru schopny nejen zajistit cytotoxickou protinádorovou odpověď, ale snižuje se i jejich role při neovaskularizaci. V této fázi onemocnění je růst nádorových cév pod regulačním vlivem jiných proangiogenních signálů (53).

### 11.5. IL-6

TNF $\alpha$  a IL-1 jsou účinnými induktory interleukinu-6. Hlavními producenty IL-6 jsou makrofágy a T lymfocyty. IL-6 může být produkován dále kterýmikoliv normálními i nádorovými buňkami včetně buněk gastrointestinálního traktu. IL-6 je typický pleiotropní cytokin. V případě karcinomu žaludku působí jako růstový faktor, u jiných nádorů IL-6 inhibuje růst (362). Uplatňuje se i jako protizánětlivý faktor při tkáňovém poškození, kdy zvyšuje produkci solubilní TNFRs a IL-1ra, na které se váže TNF $\alpha$  a IL-1. IL-6 společně s TNF $\alpha$  a IL-1 prohlubuje přímým působením nádorovou kachexii (207). V klinických studiích byla popsána zvýšená hladina IL-6 u pacientů s různými tumory (289). U renálního karcinomu je IL-6 příkladem autokrinní regulace; na buňky renálního karcinomu působí jako mitogen a současně vykazuje imunosupresivní efekt (7, 50, 231, 367). Guida a kol. sledovali basální cytokinový profil u pacientů s metastazujícím renálním karcinomem. V jejich souboru

pacienti s vyšší basální hladinou cytokinů (IL-6 a IL-8) měli horší prognózu přežití (119). Při tkáňovém poškození je IL-6 detekovatelný v cirkulaci do 60 minut od jeho začátku a dosahuje maximálních hodnot mezi 4. až 6. hodinou. Podobně jako CRP nebo sérový amyloid je řazen mezi reaktanty akutní zánětlivé fáze. Jeho hodnota v séru závisí více na rozsahu tkáňového poškození než na délce jeho trvání. U našich nemocných jsme neprokázali signifikantní zvýšení IL-6 oproti kontrolnímu souboru ani rozdíly mezi jednotlivými stadii. Nízká úroveň aktivačních signálů provázející nádorový růst, délka jejich trvání a kompartmentalizace procesu jsou pravděpodobně zodpovědné za chybění systémové odpovědi. U pacientů jsme nezaznamenali ani zvýšení IL-6 v séru v čase, protože 2. odběr byl proveden až 7. den po operaci a pooperační průběh byl bez komplikací (396).

### **11.6. EGF rodina**

EGF a TGF- $\alpha$  se vážou na EGFR. Oba mohou stimulovat růst linií buněk renálního karcinomu, blokující protilátky proti EGFR mohou inhibovat růstovou stimulaci. Bylo však zjištěno, že různé linie buněk RCC a endoteliální buňky asociované s těmito nádory mají různou expresi EGF, TGF- $\alpha$  a EGFR (22).

Některé práce ukazují, že zvýšená exprese EGFR u renálního karcinomu, nebo jeho aberantní funkce mohou vést ke zvýšení nádorové proliferace, invazivnímu růstu, neoangiogenezi a tím nepříznivě ovlivňují prognózu onemocnění (312, 353, 382, 387, 403, 407).

Moch a kol. zjistili, že pacienti s EGFR-negativním tumorem měli lepší prognózu než pacienti s EGFR-pozitivním RCC, ale rozdíl nevykazoval statistickou významnost (239). V našem souboru jsme sledovali vztah mezi sérovou hladinou EGF a různými stadii RCC. Nalezli jsme pouze předoperační zvýšení EGF u nemocných s I.+II. a III. stadiem RCC a kontrolním souborem. Další signifikantní rozdíly v sérové hladině EGF mezi nemocnými a zdravými jedinci a nemocnými s různými stadii renálního karcinomu jsme v průběhu sledování nezaznamenali.

### **11.7. TIMP-1 a TIMP-2**

Námi použitá metoda detekce solubilních faktorů nám umožnila stanovit též hladiny tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) -1 a TIMP-2. Matrix metaloproteázy (MMPs) degradují komponenty extracelulární matrix a podmiňují remodelaci tkání a nádorovou infiltraci. TIMP 1, 2, 3 a 4 jsou inhibitory enzymů náležících do MMP rodiny a za fyziologické situace se nacházejí ve vyváženém vztahu. U nádorových onemocnění chrání integritu

stromatu a brání nádorové migraci. Není mnoho studií, které by sledovaly expresi MMP a TIMP na buňkách světlobuněčného RCC, a navíc výsledky v publikovaných pracech jsou nejednotné (38, 237).

Hagemann a kol. uveřejnili zjištění, že deregulovaná exprese MMPs a TIMPs u RCC se liší v závislosti na histologickém typu, gradingu, velikosti nádoru a cytogenetických charakteristikách. Vzorky nádorové tkáně analyzovali pomocí metody RT-PCR (reverze transcriptase-polymerase chain reaction). Vyslovili hypotézu, že exprese MMP a TIMP hraje důležitou roli v histomorfologických vlastnostech subtypů RCC a rozdílech jejich biologického chování (121). Kawata a kol. sledovali mimo jiné expresi TIMP-2 a MMP-9 u 120 pacientů s RCC imonohistochemicky na vzorcích nádorové tkáně a potvrdili jejich prognostický význam (167). Miyata a kol. vyšetřovali imunohistochemicky expresi MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 na vzorcích RCC od 91 pacientů. Nádory s pozitivní expresí MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 vykazovaly větší proliferaci. Exprese TIMP-1 korelovala se stadiem pT a predikovala délku přežití (238). Kugler a kol. zjistili metodou RT-PCR u 17 nemocných s RCC různý poměr transkripce MMP:TIMP u normální tkáně, lokalizovaného tumoru a metastatického onemocnění (193). Naproti tomu Lein a kol. našli zvýšení sérové hladiny MMP9 u RCC, ale nezjistili korelaci mezi typem nádoru, mitotickou aktivitou a stadiem choroby (201). Kallakury a kol. zjistili korelaci mezi zvýšenou expresí TIMP-1 a TIMP-2 na vzorcích nádorové tkáně (imunohistochemicky) a horší prognózou u pacientů s RCC, včetně kratšího intervalu přežití (162). Námi použitá celulósová membrána proteinové arraye Angiogenesis I neumožňuje stanovení matrix metaloproteináz.

Membránový typ 1 MMP (MT1-MMP) je považován za klíčový enzym v procesu nádorové angiogeneze a metastazování. MT1-MMP je přirozeným aktivátorem pro-MMP2 zvýšeně produkované u nádorů. Aktivace pro-MMP2 MT1-MMP umožňuje vznik komplexu MT1-MMP/TIMP2/pro-MMP2 na povrchu buněk a za přítomnosti volných TIMP2 následně hydrolýzu MMP2. Kromě toho komplex MT1-MMP/TIMP2 blokuje autokatalytickou změnu MT1-MMP, což vede k zesílení exprese aktivní formy MT1-MMP. Tento příklad interakcí svědčí o možném duálním efektu některých TIMP (366). Dosud nejsou přesně popsány všechny regulační vztahy, a proto není vyloučen ani přímý vliv TIMPs na buněčný růst. V našem souboru nemocní I. + II. a III. stadia měli oproti zdravým kontrolám signifikantně vyšší hladiny TIMP1 a TIMP2, které se neměnily v průběhu léčby. Hladiny TIMP 1 a TIMP 2 v séru nemocných se IV. stadiem RCC a kontrolního souboru se nelišily. Interpretace nálezů těchto dvou izolovaných proteinů není vzhledem k neúplným znalostem a komplikovaným



regulačním vztahům možná. Přesto experimentální pokusy s terapeutickým ovlivněním biologických aktivit enzymů se jeví jako nadějná (362).

### 11.8. Leptin

Leptin, z adipocytů odvozený cytokin, který je úzce spjat s obezitou, má vliv na karcinogenezi, vykazuje mitogenní aktivitu, chrání nádorové buňky před apoptózou a stimuluje nádorovou angiogenezi (378). Hladina sérového leptinu pozitivně koreluje s BMI (body mass index). Protože obezita je jedním z rizikových faktorů renálního karcinomu, sledovali Horiguchi a kol. vztah mezi leptinem a rozvojem renálního karcinomu (141). Ve své práci (u 57 pacientů) zjistili, že sérová hladina leptinu byla signifikantně vyšší u pacientů s prokázanou venózní invazí. Nemocní s RCC bez uzlinových a vzdálených metastáz s vyšší sérovou hladinou leptinu měli kratší interval přežití do progresu než pacienti s nižší hladinou leptinu. Horiguchi a kol. sledovali efekt leptinu rovněž na buňkách myšního renálního karcinomu. Zjistili, že leptin podporuje invazivitu myších renálních karcinomových buněk (142).

Produkce sérového leptinu adipocyty prudce klesá během hladovění. Dosud není jasné, zda leptin spolu s dalšími cytokiny hraje regulační roli v akutní fázi zánětu vedoucímu ke hladovění a malnutrici, nebo zda je známkou tukového a hmotnostního úbytku spojeného s nádorovým onemocněním. Zdá se, že deregulace hladiny leptinu u pacientů s nádorovým onemocněním nesouvisí s nádorovou anorexií (289). Sérové hodnoty leptinu u zdravých kontrol i nemocných s RCC vykazovaly velké individuální rozpětí a směrodatné odchylky v hodnocených skupinách dosahovaly až 50% průměrných hodnot. Předoperační hodnoty leptinu se u nemocných s RCC I. až IV. stadia nelišily od zdravých kontrol. V období pooperační rekonvalescence se u nemocných s RCC I.+II. a III. stadia zvyšovaly a dosáhly statistické významnosti 8. týden u stadia I.+II. a 7. den a 8. týden u stadia III. Nemocní s metastazujícím RCC měli oproti nemocným s I.+ II. stadiem signifikantně nižší hodnoty leptinu jak v předoperačních, tak pooperačních odběrech. U nemocných IV. stadia byl váhový úbytek související s metastazující chorobou. U nemocných III. stadia RCC převažovaly předoperačně katabolické procesy. Odstranění nádoru vedlo k jejich zastavení a navození anabolických regulací. Tento vývoj se odrazil i v signifikantním zvýšení leptinu mezi nemocnými s RCC I.+II. a III. stadia 8. týden po operaci.

## 12. ZÁVĚR

Multiparametrovou analýzou s provedenou komerční soupravou *RayBio Human Angiogenesis Antibody Array 1* od firmy RayBiotech, Inc. USA. jsme stanovili sérové hladiny angiogenních faktorů u nemocných s různými stadii RCC. V průběhu osmi týdnů jsme provedli 3 odběry (před, 7. den a 8. týden po operaci) a monitorovali dynamiku změn sérových hladin angiogeninu, MCP-1, RANTES, pan GRO, ENA-78, IL-8, PDGF, IL-6, EGF, TIMP-1, TIMP-2 a leptinu u pacientů s různými stadii RCC. Zvolená metoda umožňuje s dostatečnou citlivostí monitorovat dynamiku změn sérových hladin těchto parametrů. Víceparametrová analýza je jediným možným přístupem, umožňujícím detailní analýzu chemokinových a cytokinových interakcí regulační sítě angiogeneze. Zablokování jedné signální cesty nestačí inhibovat nádorovou angiogenezi. Dosavadní klinické zkušenosti s bevacizumabem ukázaly, že ani inhibice VEGF, považovaného za hlavní angiogenní faktor, nezabrání nádorové progresi. Novou nadějnou možností se jeví kombinace inhibice více faktorů, například anti VEGF a anti PDGF (47, 177, 198, 229, 276). Proto je nezbytné pokračovat ve vývoji dalších multiparametrových testů.

Prokázali jsme zvýšené předoperační sérové hodnoty angiogeninu, PDGF, ENA-78, pan GRO u nemocných všech stadií RCC oproti hodnotám naměřeným u zdravých osob. Angiogenní faktory MCP-1, TIMP1, TIMP2 a RANTES byly u nemocných IV. stadia signifikantně nižší oproti nemocným I.+II. a III. stadia a statistická významnost s výjimkou MCP-1 nebyla u těchto faktorů zjištěna v odběrech 7. den po operaci. Interleukin 6 nevykazoval u nemocných s RCC statistické odchylky od kontrolního souboru a v průběhu sledování nebyly zjištěny signifikantní změny.

Zajímavým parametrem se zdá IL-8. Jeho sérová hodnota před operací ve skupině nemocných s RCC I.+ II. stadia (pouze 2 nemocní z 15 měli stadium II.) nebyla oproti kontrolní skupině zvýšena. Ve skupinách nemocných s RCC III. a IV. stadia byly hodnoty IL-8 oproti kontrolám signifikantně zvýšeny. Ve všech třech sledovaných skupinách (I+II, III, IV) došlo po odstranění primárního nádoru k signifikantnímu snížení již 7. den po operaci. Zdá se, že IL-8 nejlépe odrážel přítomnost a pokročilost renálního karcinomu.

Jiným klinicky zajímavým parametrem u nemocných s RCC byl leptin. Jeho předoperační hodnoty nebyly oproti hodnotám kontrolního souboru signifikantně zvýšeny. Signifikantní rozdíl předoperačních hodnot mezi skupinou nemocných I. + II. stadia a IV. stadia odrážel aktuální metabolické pochody (váhový úbytek u nemocných s pokročilou chorobou). Po odstranění primárního tumoru došlo u nemocných I.+II. stadia a III. stadia

v období rekonvalescence k vzestupu sérových hladin leptinu, u nemocných IV. stadia choroby došlo po odstranění tumoru 8. týden po operaci k prohloubení poklesu.

Teprve detailní poznání mikroprostředí, které rozhoduje o charakteru výsledné imunitní odpovědi, nám pomůže účinně zasahovat do interakcí buněk imunitního systému a ovlivnit výsledky léčby nádorových onemocnění.

### 13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č.1. Expanze T lymfocytů

Obr. č.2. Interakce NK buňky

Obr. č.3. Role VEGF v nádorové angiogenezi

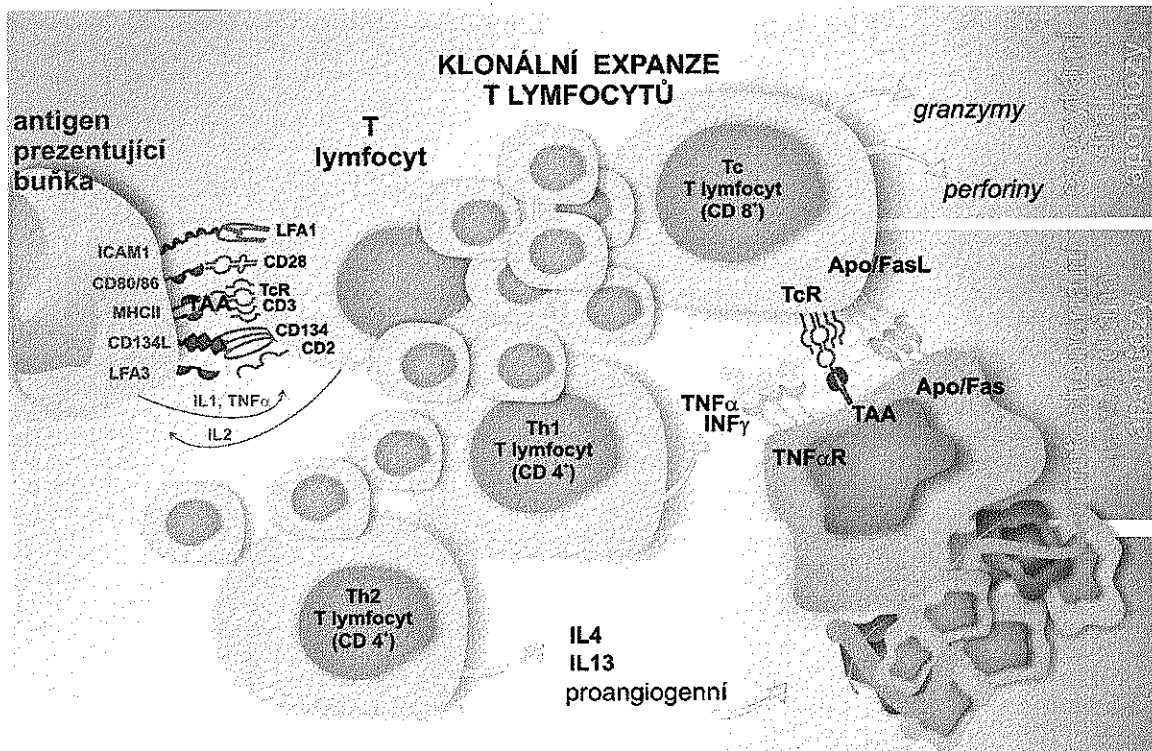
Obr. č.4. Avaskulární stadium vývoje tumoru

Obr. č.5. Angiogenní switch

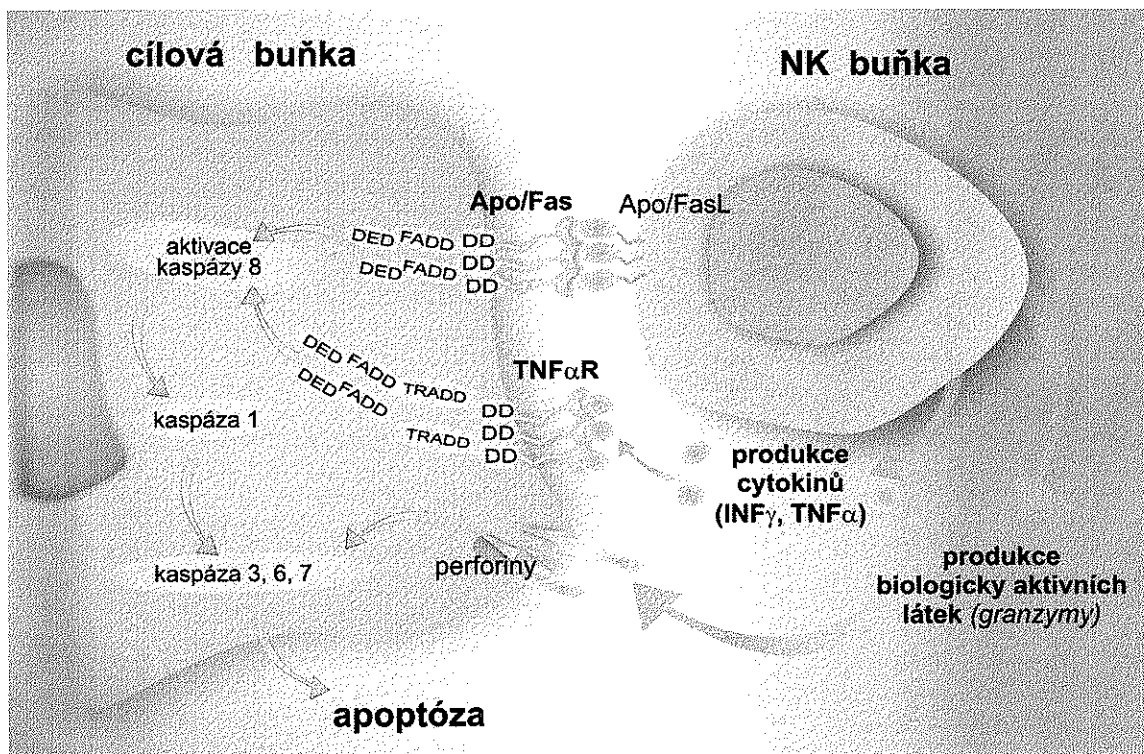
Obr. č.6. Vaskularizace a perfuze tumoru

Obr. č.7. Účinek HIF- $\alpha$

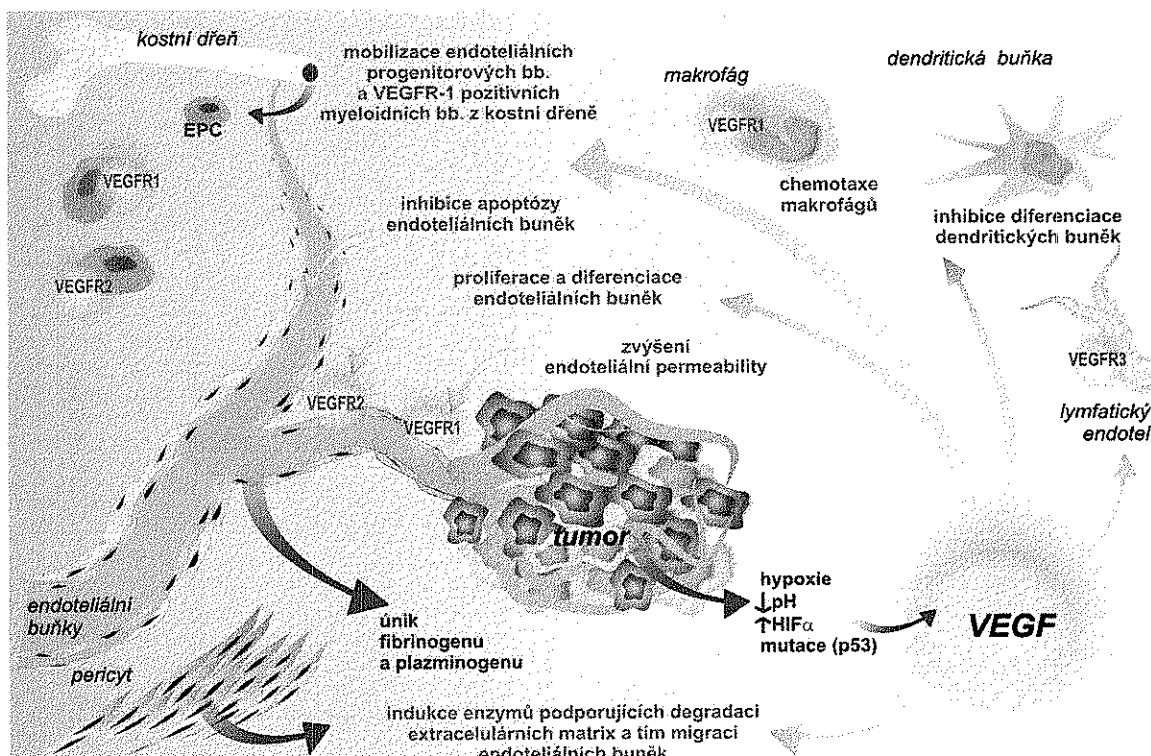
Obr. č.8. Efekt hypoxie a mutace VHL genu



Obr. č.1. Expanze T lymfocytů

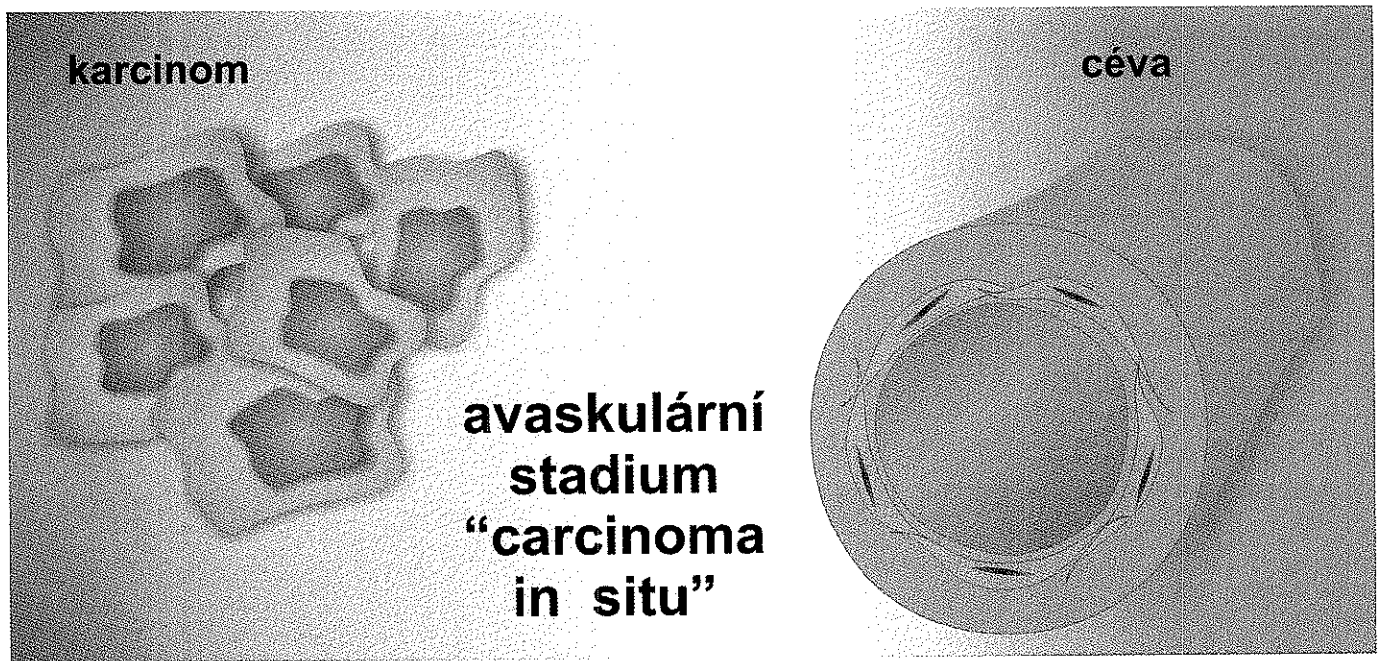


Obr. č.2. Interakce NK buňky



Obr. č.3. Role VEGF v nádorové angiogenezi

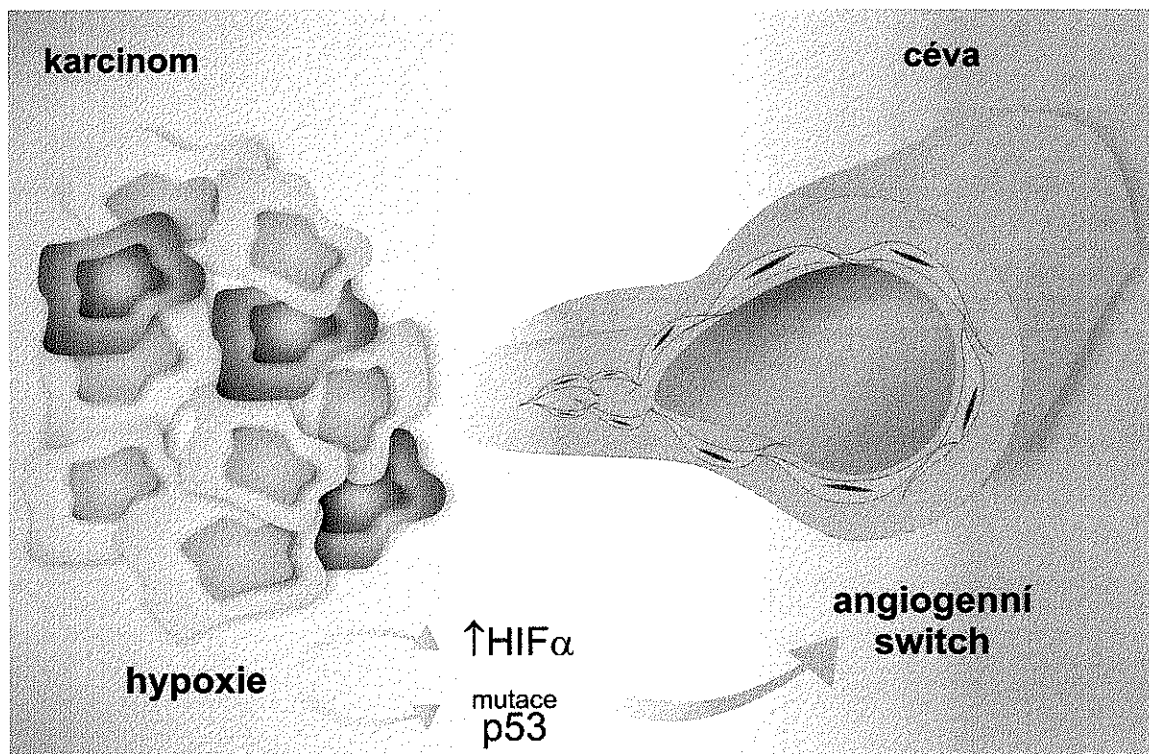
VEGF produkovaný nádorovými buňkami nebo stromálními buňkami stimuluje prostřednictvím svých receptorů endotelové buňky cév, buňky lymfatického endotelu nebo hemopoetické buňky. Stimulace VEGFR-1 a VEGFR-2 na endoteliích aktivuje proliferaci a diferenciaci endotelových buněk, zvyšuje permeabilitu endotelií a inhibuje jejich apoptózu. VEGF indukuje tvorbu enzymů podporujících degradaci extracelulární matrix a tím migraci endotelových buněk. VEGF mobilizuje endotelové progenitorové buňky a VEGFR-1 pozitivní myeloidní buňky z kostní dřeně, inhibuje diferenciaci dendritických buněk.



Obr. č.4. Avaskulární stadium vývoje tumoru

Avaskulární stadium „carcinoma in situ“ bez vlastního cévního zásobení, dodávka živin a kyslíku nádorovým buňkám je zajišťována difúzí.

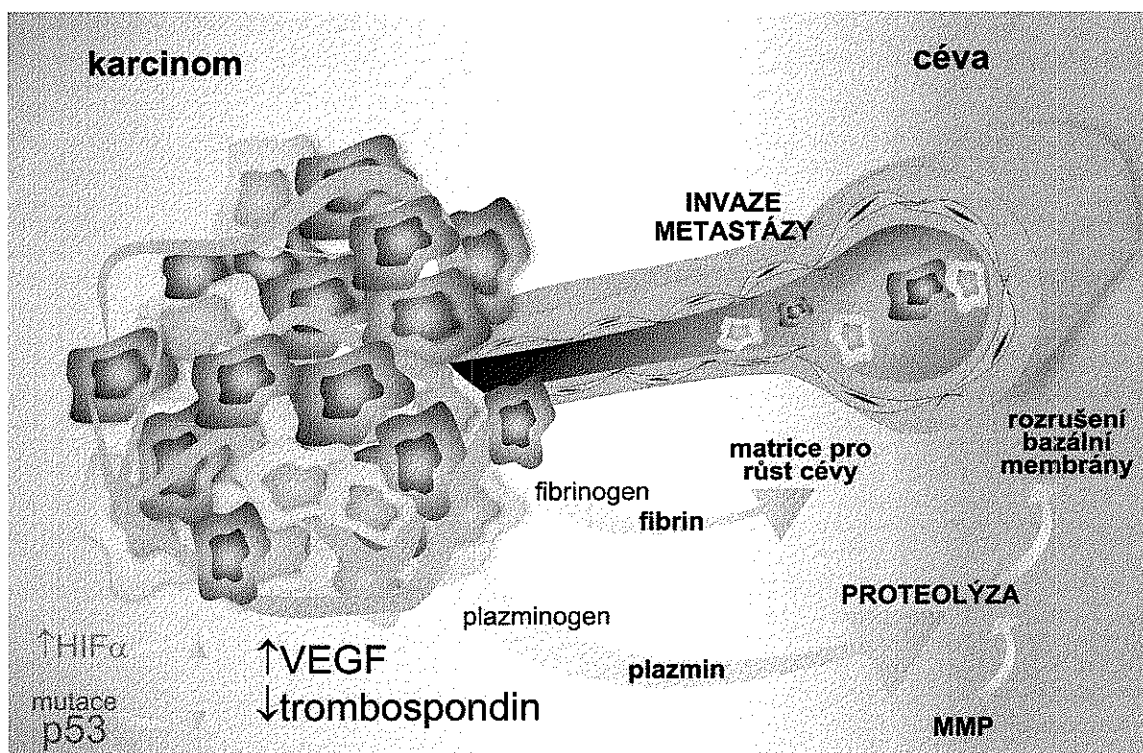




Obr. č.5. Angiogenní switch

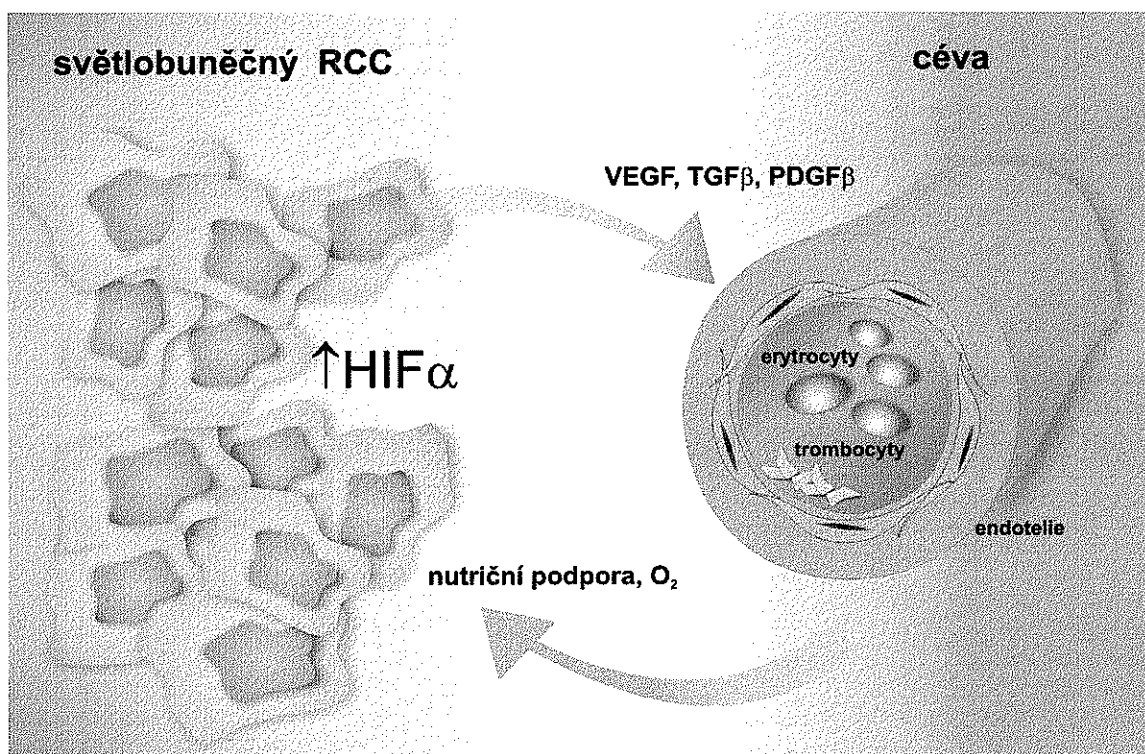
Angiogenní „switch“ – změna zahajující proces angiogeneze.

V důsledku hypoxie dochází ke genetické nestabilitě, vznikají mutace, např. mutace genu p53, která vede k potlačení antiangiogenního trombospondinu, kumuluje se HIF- $\alpha$  (hypoxia inducible factor  $\alpha$ ), jehož hromadění vede v konečném důsledku ke zvýšení hladiny proangiogenních růstových faktorů.



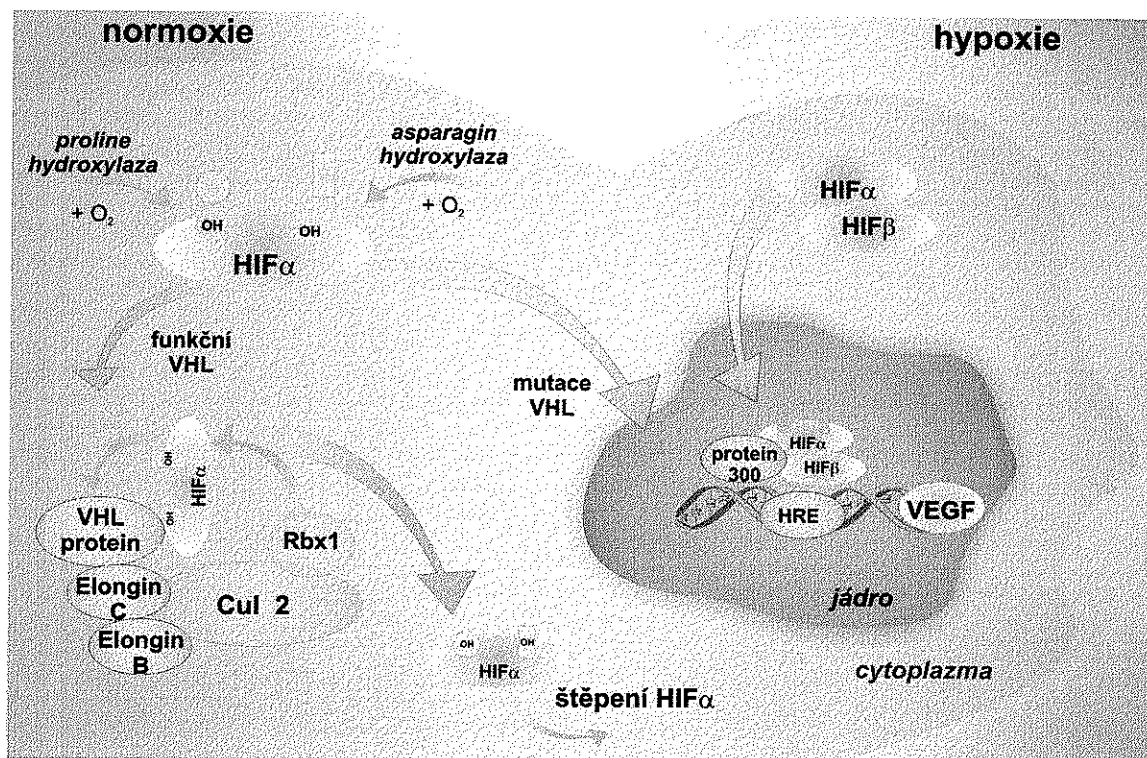
Obr. č.6. Vaskularizace a perfuze tumoru

Vlivem proteolytických enzymů produkovaných nádorovými buňkami, vlivem kolagenázy IV. typu, aktivátoru plasminogenu a stromelyzinu produkovaných epitelii a stromálními buňkami dochází k rozrušení bazální membrány, což usnadňuje migraci endotelií i migraci nádorových buněk a jejich metastazování. Z cév uniká fibrinogen a plasminogen. Vlivem tkáňových aktivátorů vznikající extravaskulární depozita fibrinu vytvářejí podpůrnou matrici pro růst novotvořené cévy. Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho perfuzi a další růst.



Obr. č.7. Účinek HIF- $\alpha$

Buňky rostoucího renálního karcinomu vystavené hypoxii produkují HIF- $\alpha$  (hypoxia inducible factor- $\alpha$ ) tvořící heterodimer s HIF- $\beta$  (hypoxia inducible factor- $\beta$ ), který zesiluje přepis genů kódujících angiogenní faktory TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF- $\beta$  (platelet-derived growth factor). Novotvořené kapiláry zajišťují proliferujícím nádorovým buňkám přísun živin a kyslíku, a podílejí se tak na dalším růstu nádoru.



Obr. č.8. Efekt hypoxie a mutace VHL genu

Za fyziologických podmínek je HIF- $\alpha$  hydroxylován asparaginovou a prolinovou hydroxylázou. Přes hydroxylovaný prolinový konec se váže s VHL proteinem. VHL protein s Elongin C a B proteinem váže cul2 protein. RING-box protein Rbx1 slouží jako transferáza. Po vytvoření tohoto komplexu dochází k degradaci HIF- $\alpha$  působením proteázy. Hydroxylace asparaginového konce brání vazbě s transkripčním koaktivátorem p300.

Za hypoxických podmínek, kdy nedochází k hydroxylaci HIF- $\alpha$ , nebo v případě chybění funkčního VHL proteinu, dochází k hromadění HIF- $\alpha$ , přemístění do jádra, tvorbě heterodimeru HIF- $\alpha$ /HIF- $\beta$  (ARNT), k vazbě transkripčního koaktivátoru p300 a k aktivaci transkripce HRE (hypoxia response elements), které jsou součástí genů kódujících angiogenní faktory (např. VEGF).

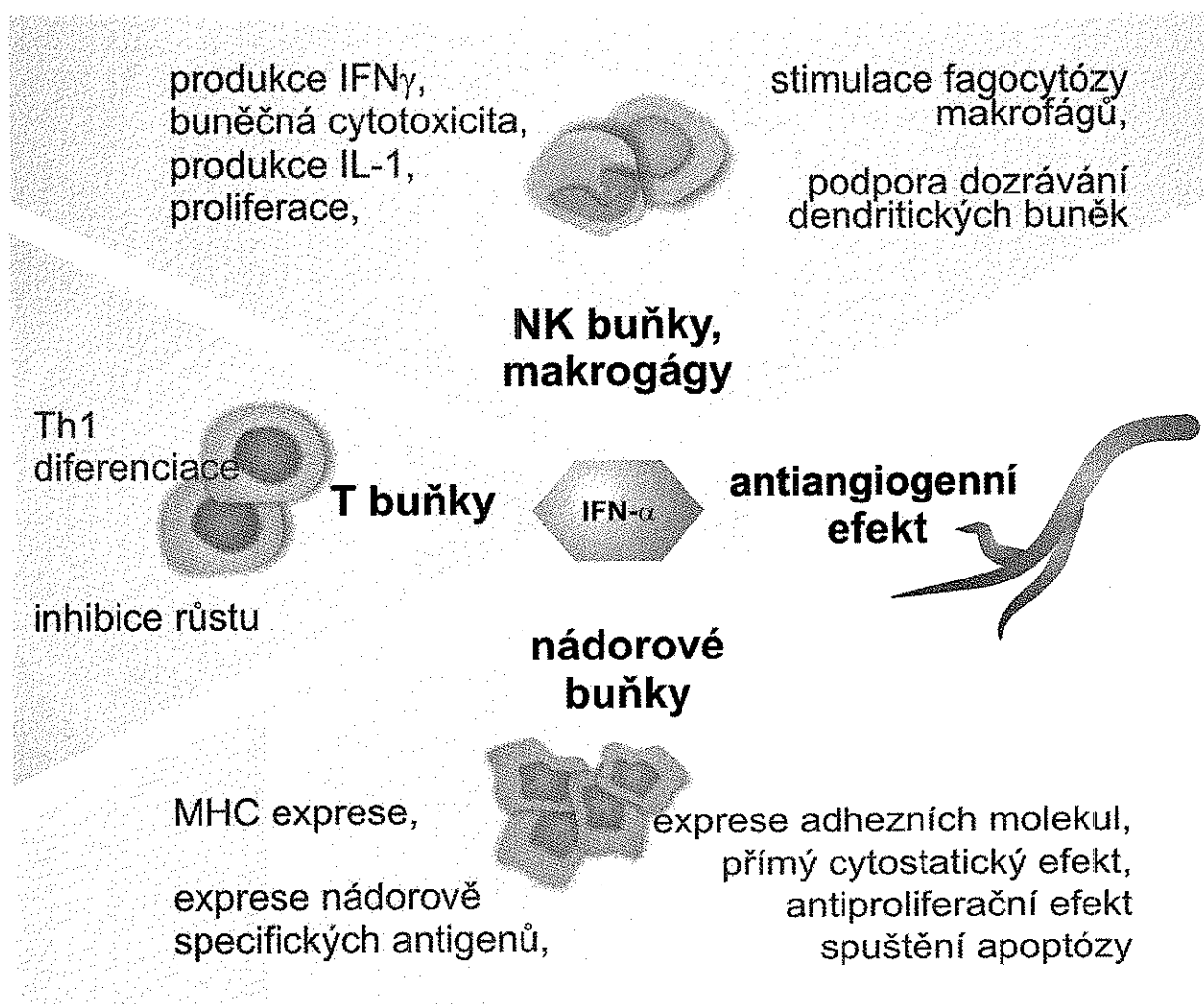


Schéma č.1: Účinek  $IFN-\alpha$  na nádorové a imunitní buňky

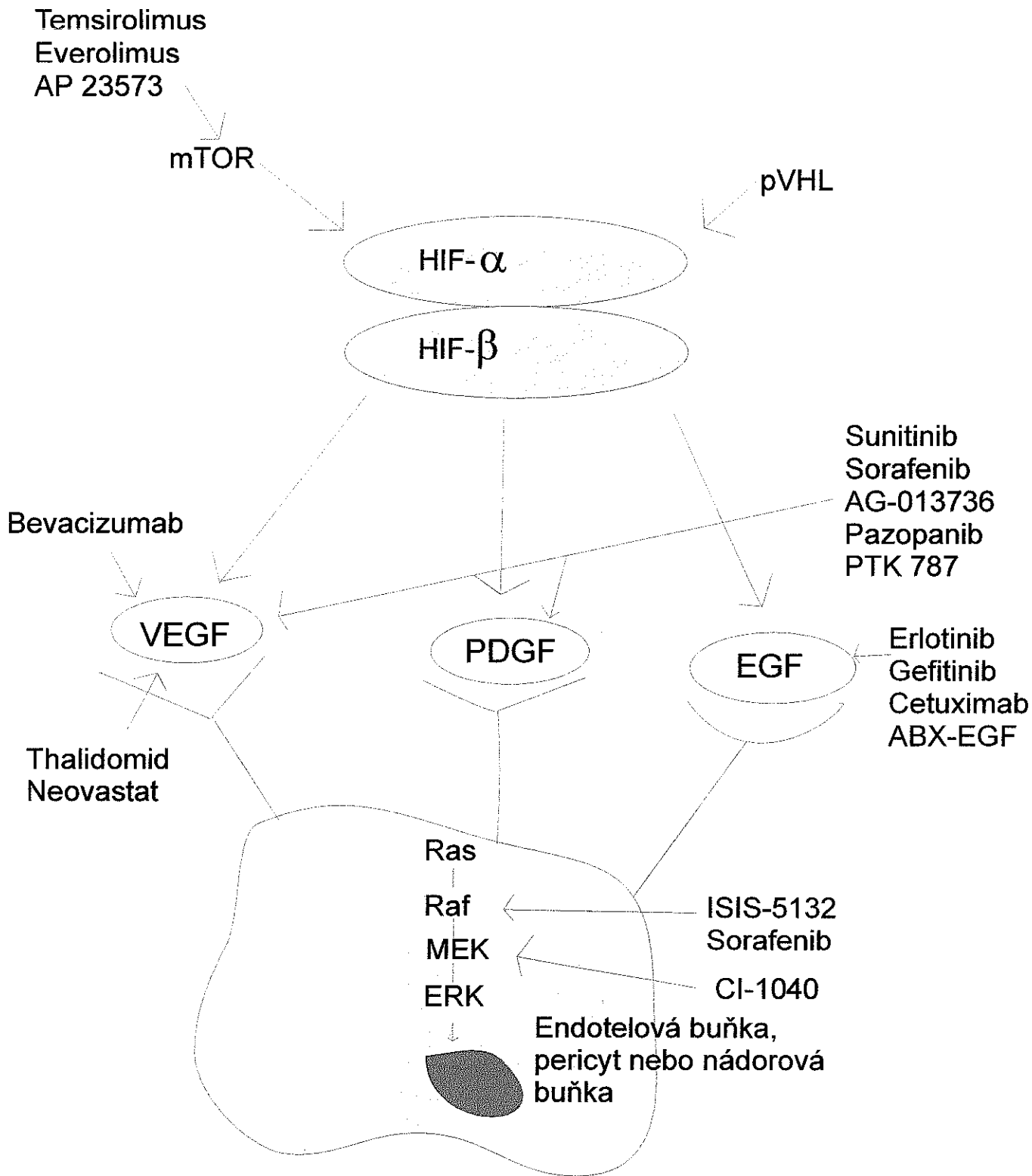


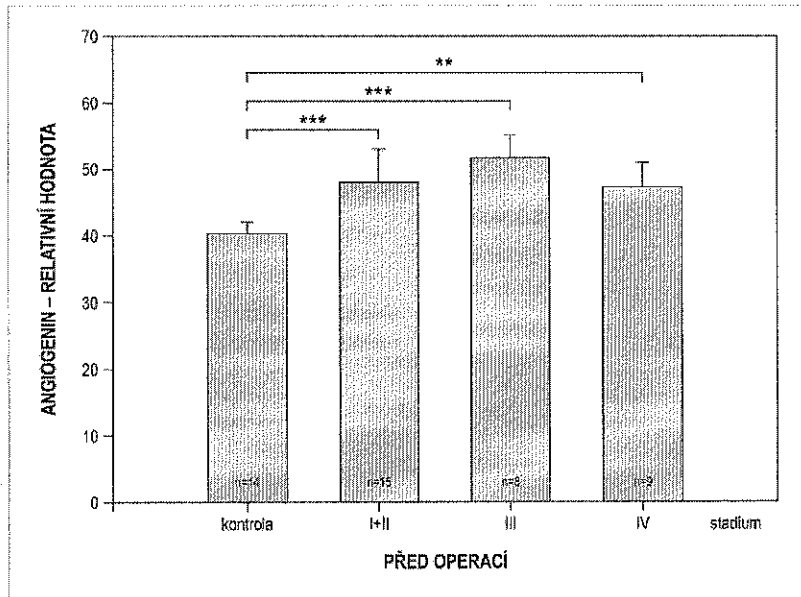
Schéma č.2: Místa zásahu cílené antiangiogenní léčby

## 16. SEZNAM GRAFŮ

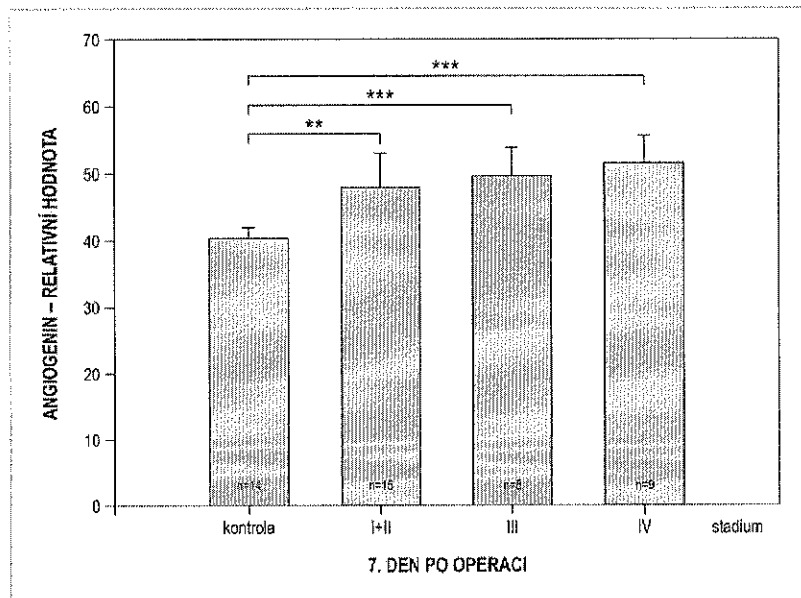
- Graf 1 a,b,c: Sérové hladiny angiogeninu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 2 a,b,c: Sérové hladiny MCP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 3 a,b,c: Sérové hladiny RANTES před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 4 a,b,c: Sérové hladiny pan GRO před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 5 a,b,c: Sérové hladiny ENA-78 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 6 a,b,c: Sérové hladiny IL-8 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 7 a,b,c: Sérové hladiny PDGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 8 a,b,c: Sérové hladiny IL-6 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 9 a,b,c: Sérové hladiny EGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 10 a,b,c: Sérové hladiny TIMP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 11 a,b,c: Sérové hladiny TIMP-2 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci
- Graf 12 a,b,c: Sérové hladiny leptinu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Graf 1 a, b, c: Sérové hladiny angiogeninu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

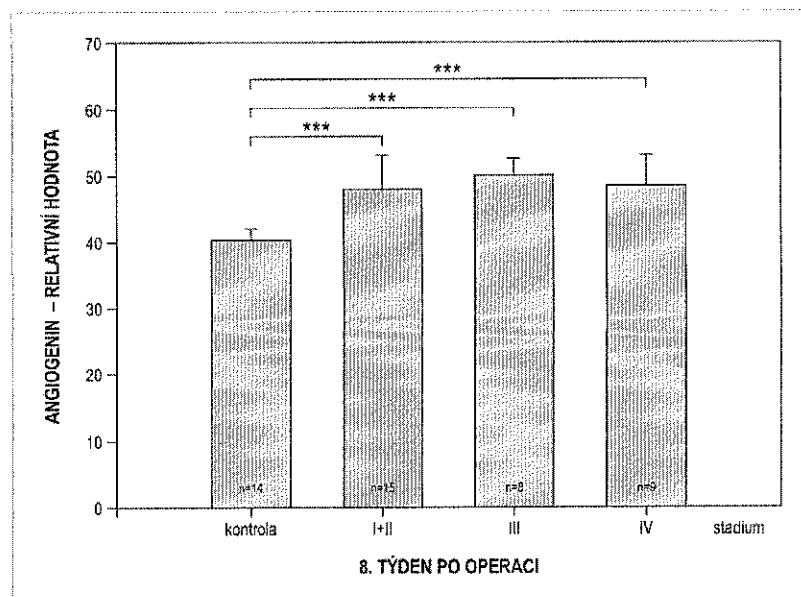
1a



1b



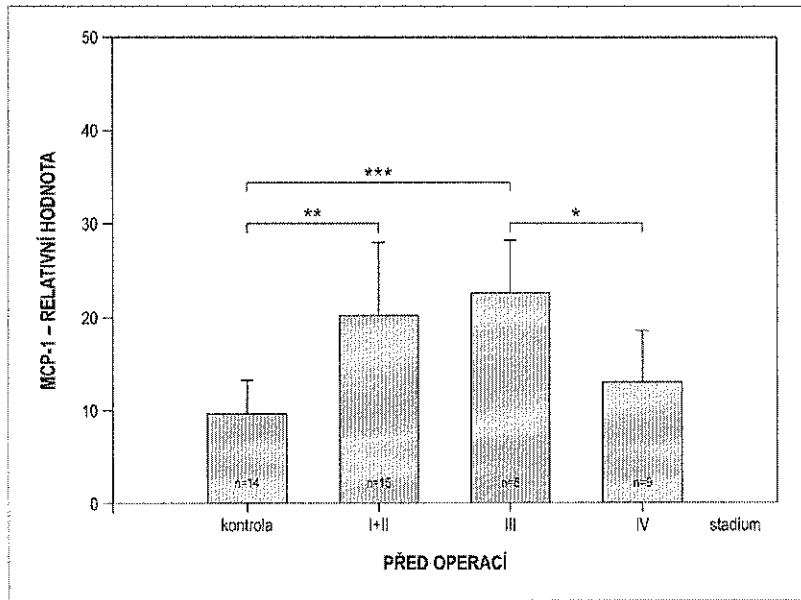
1c



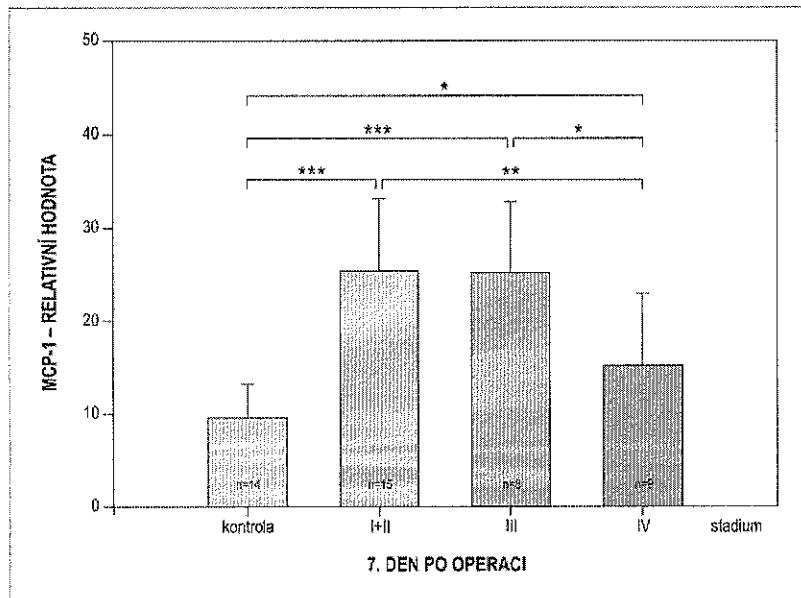


Graf 2 a, b, c: Sérové hladiny MCP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

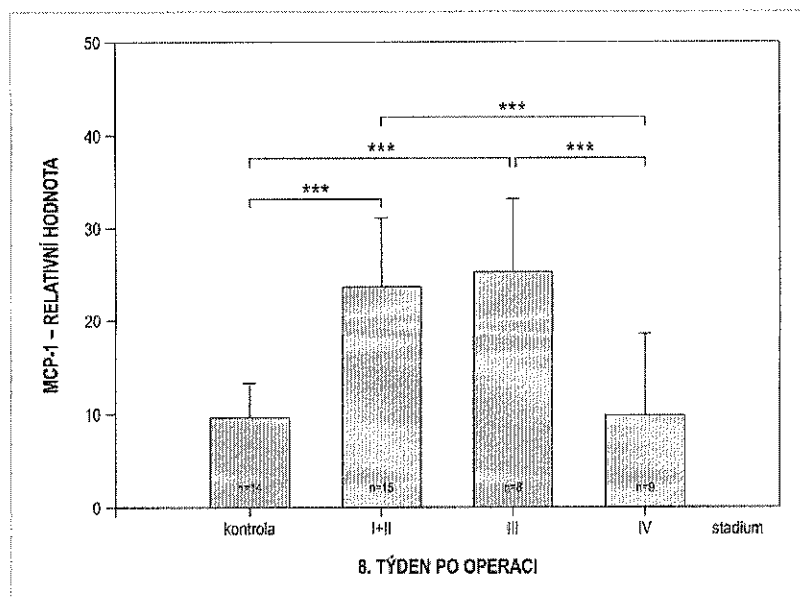
2a



2b

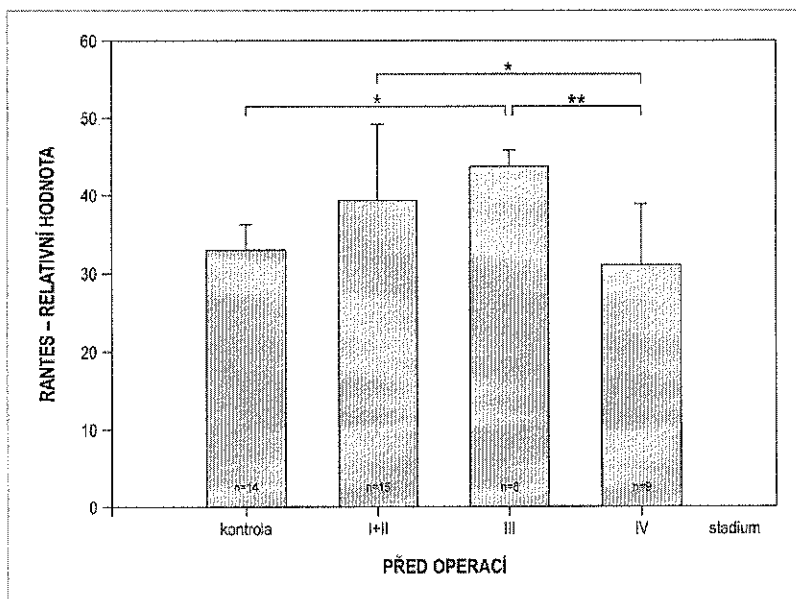


2c

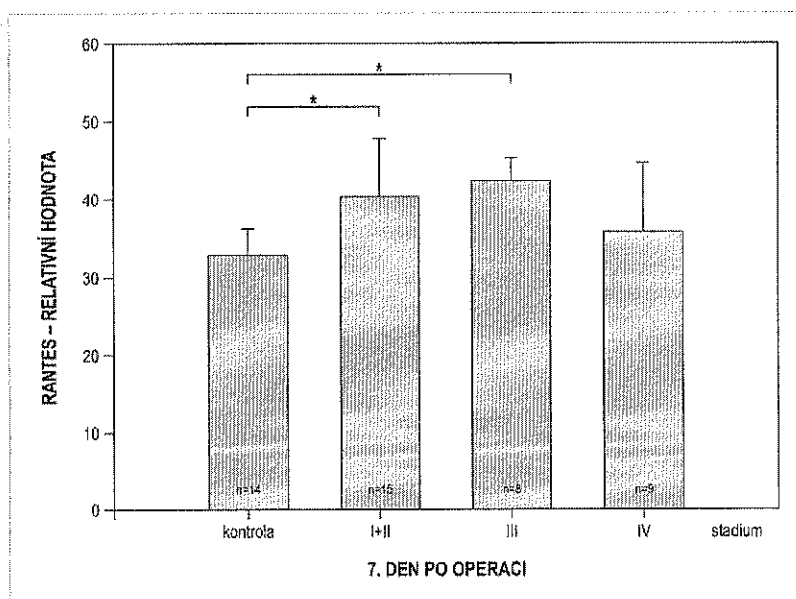


Graf 3 a, b, c: Sérové hladiny RANTES před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

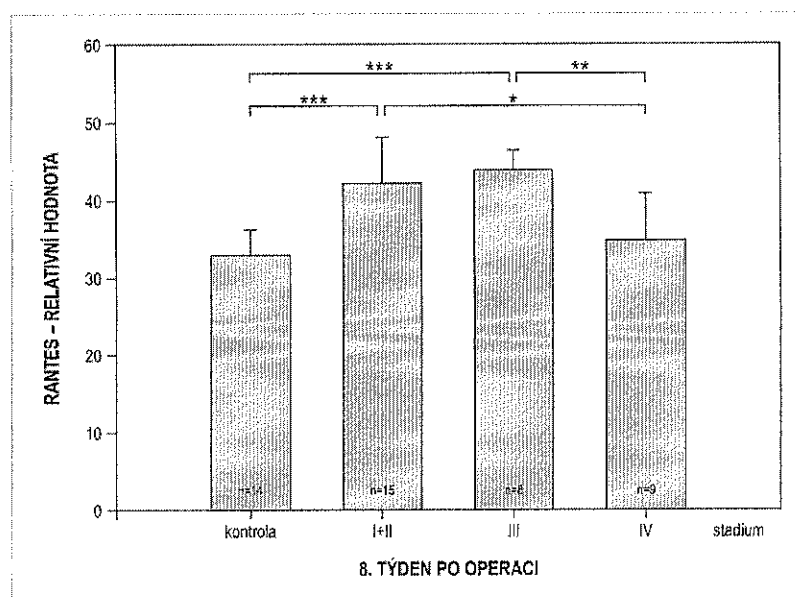
3a



3b

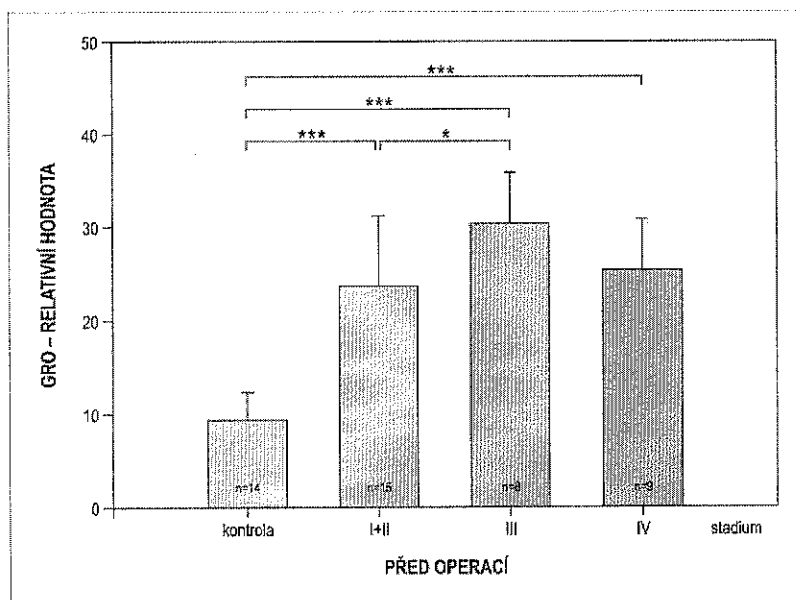


3c

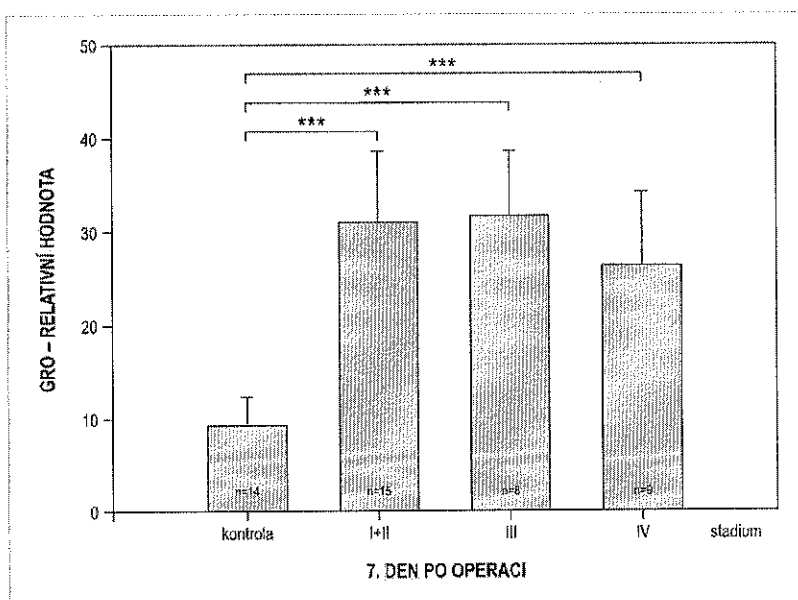


Graf 4 a, b, c: Sérové hladiny GRO před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

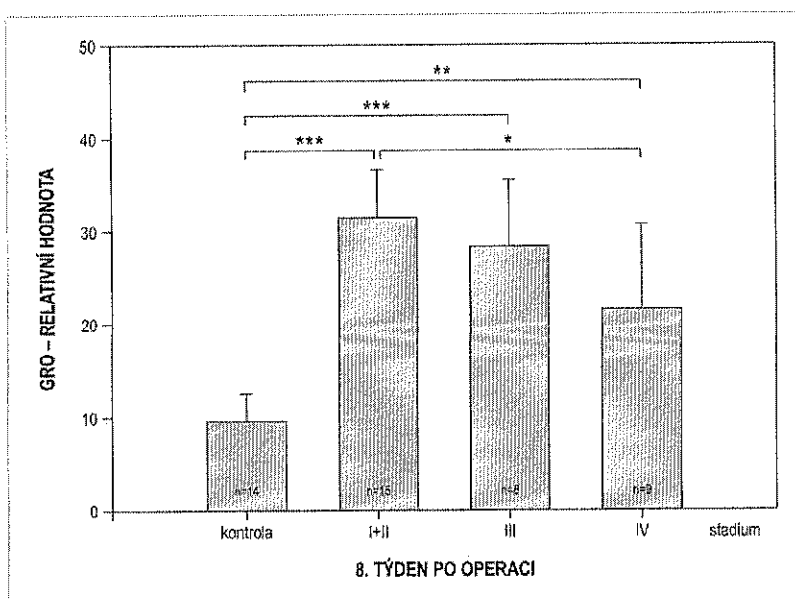
4a



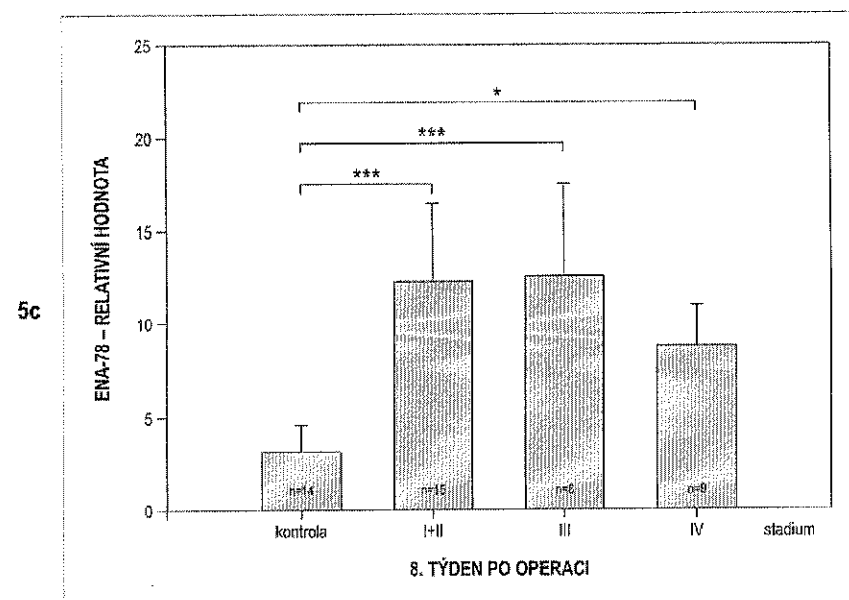
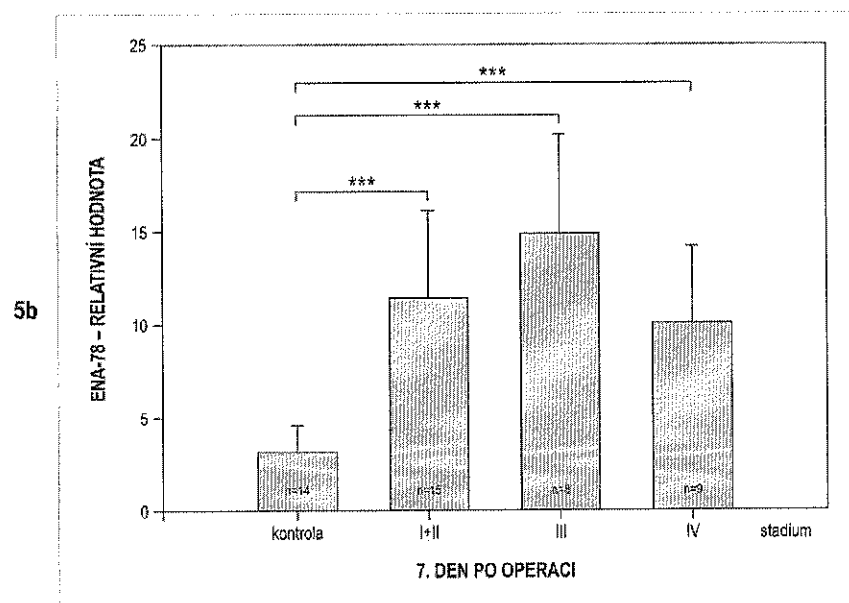
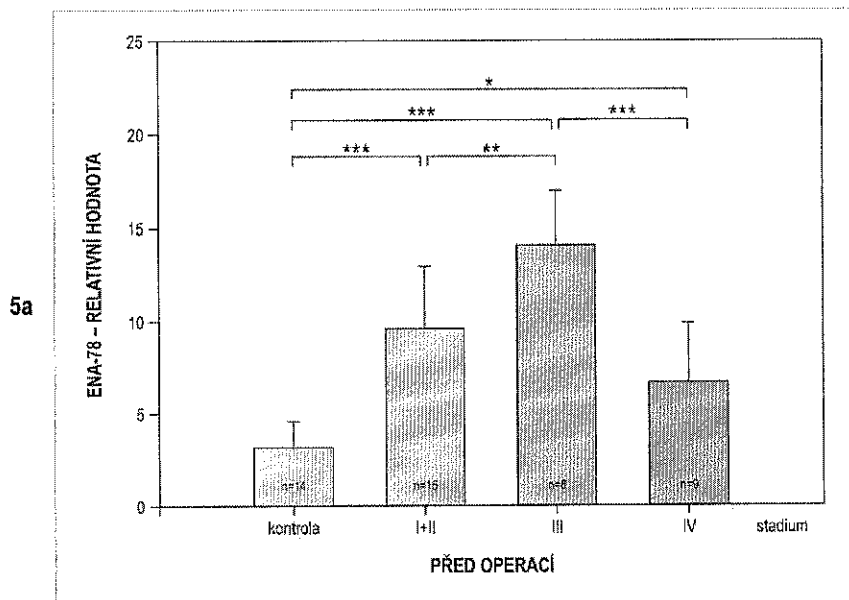
4b



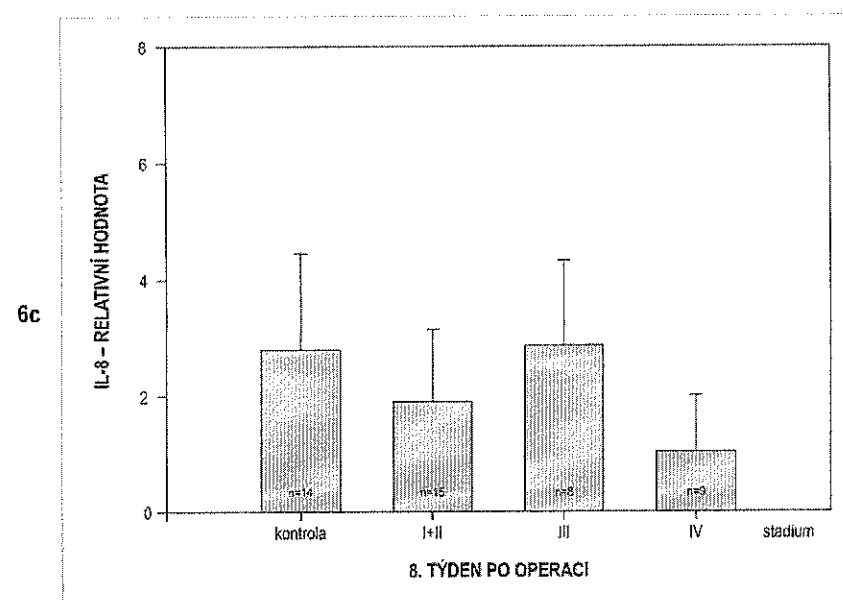
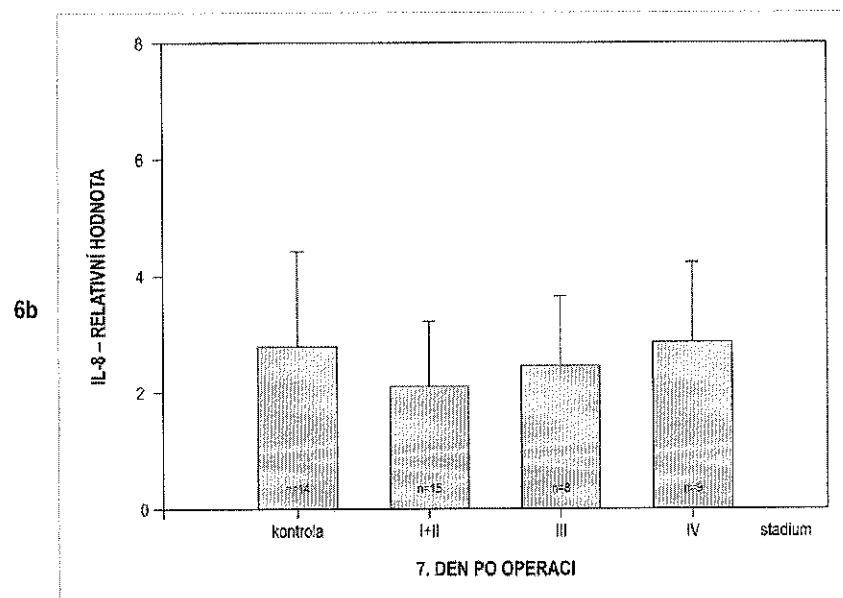
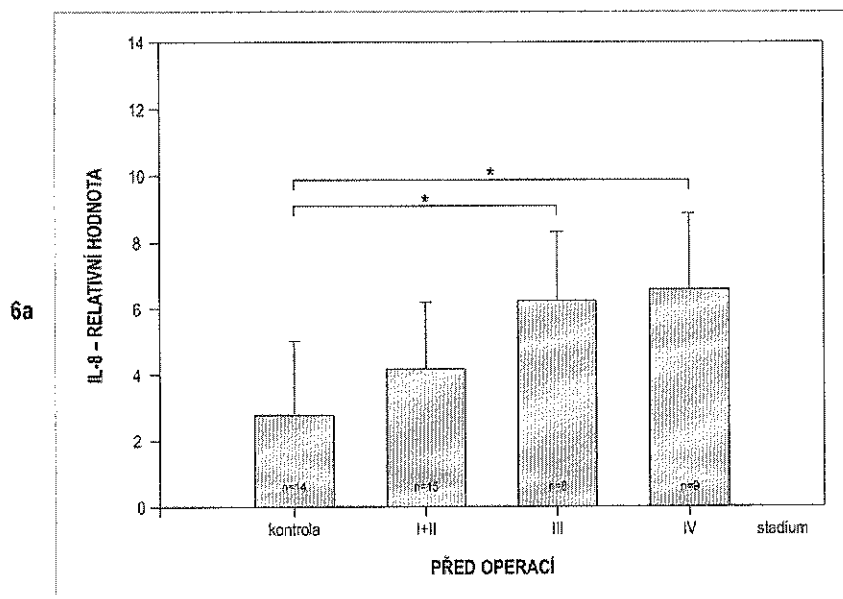
4c



Graf 5 a, b, c: Sérové hladiny ENA-78 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

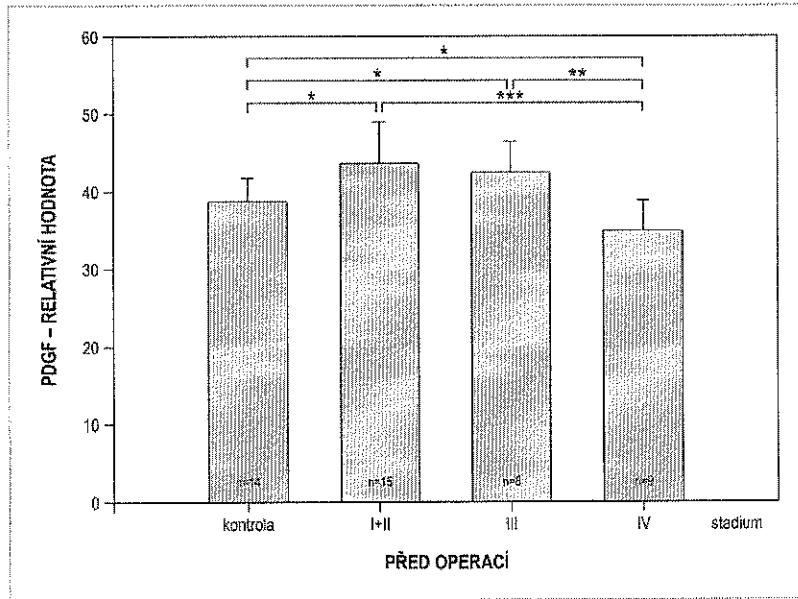


Graf 6 a, b, c: Sérové hladiny IL-8 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

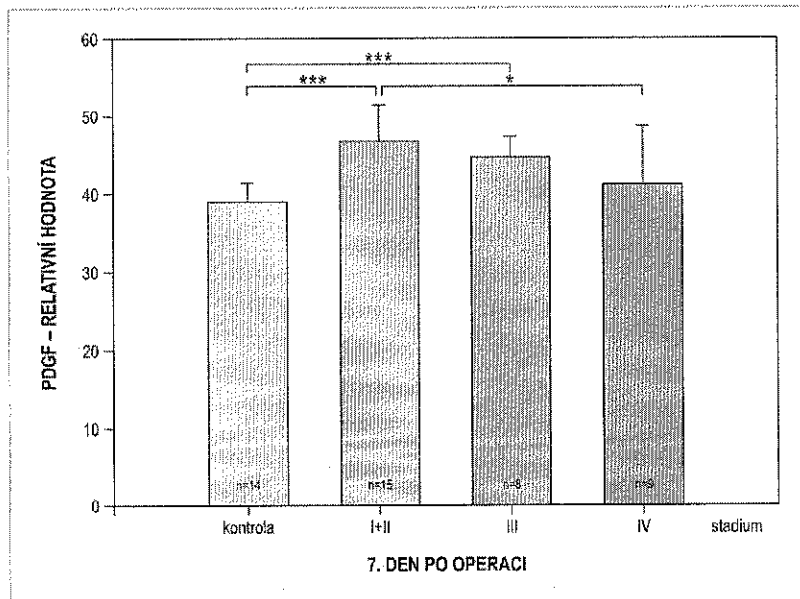


Graf 7 a, b, c: Sérové hladiny PDGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

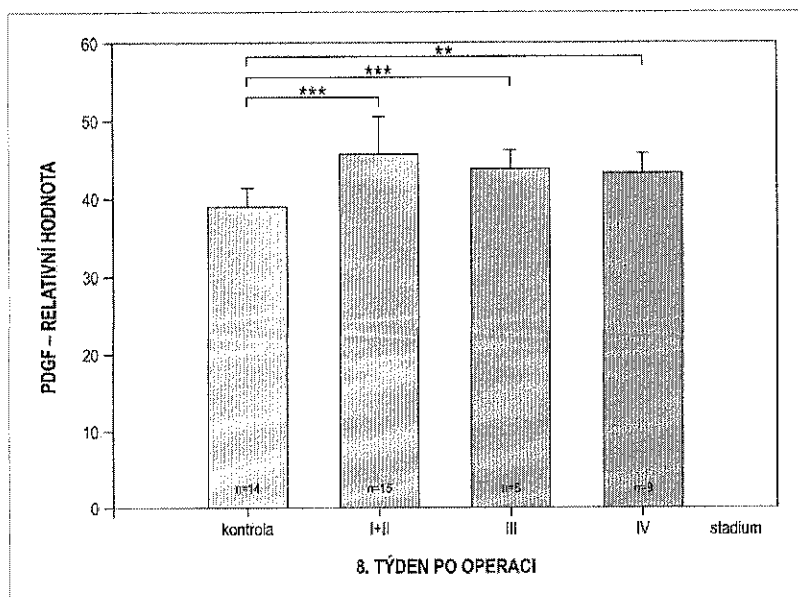
7a



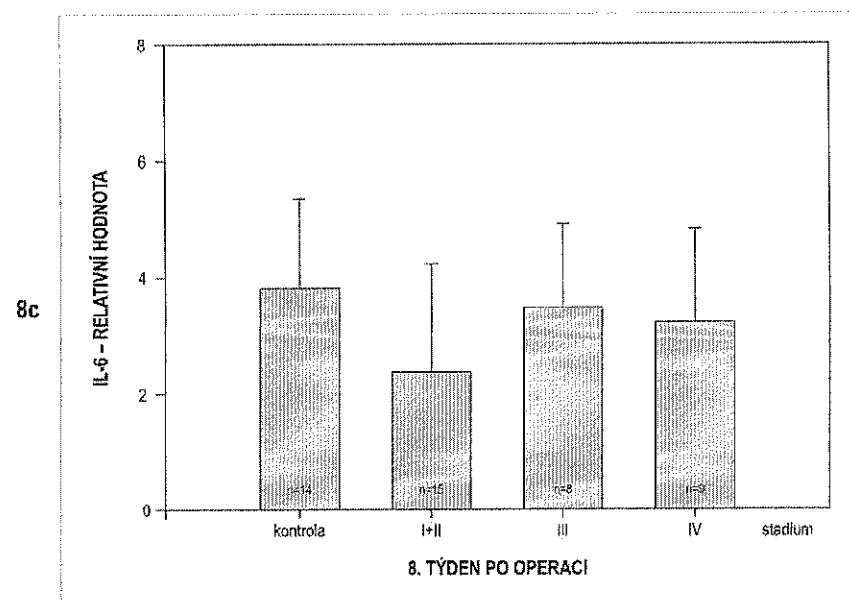
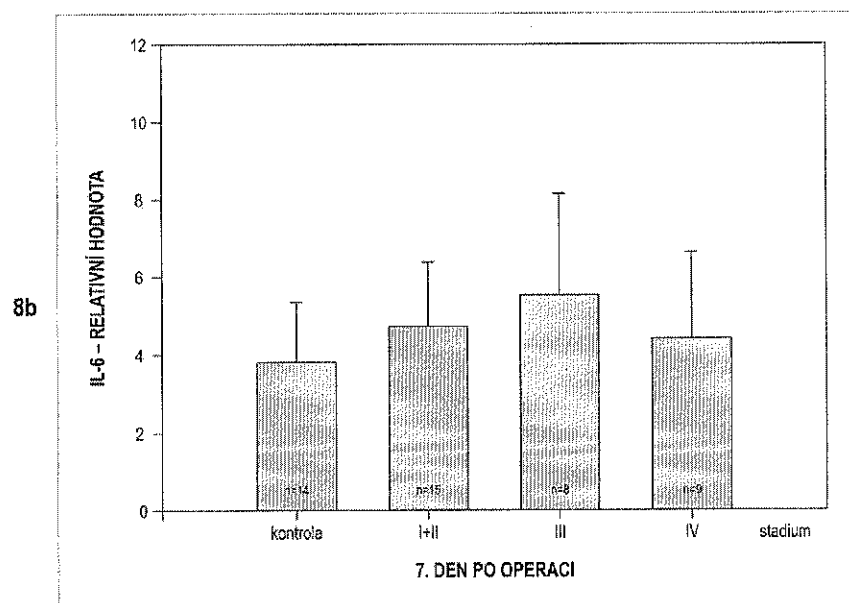
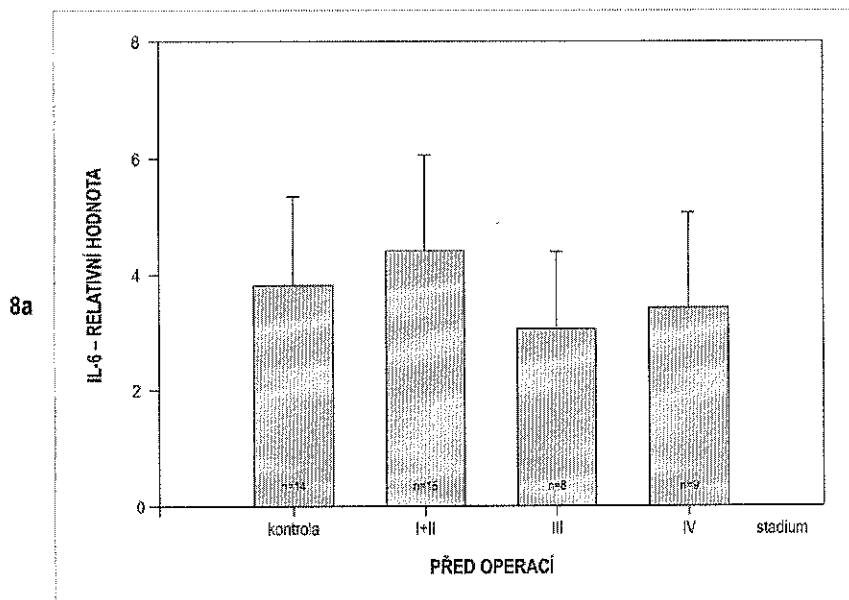
7b



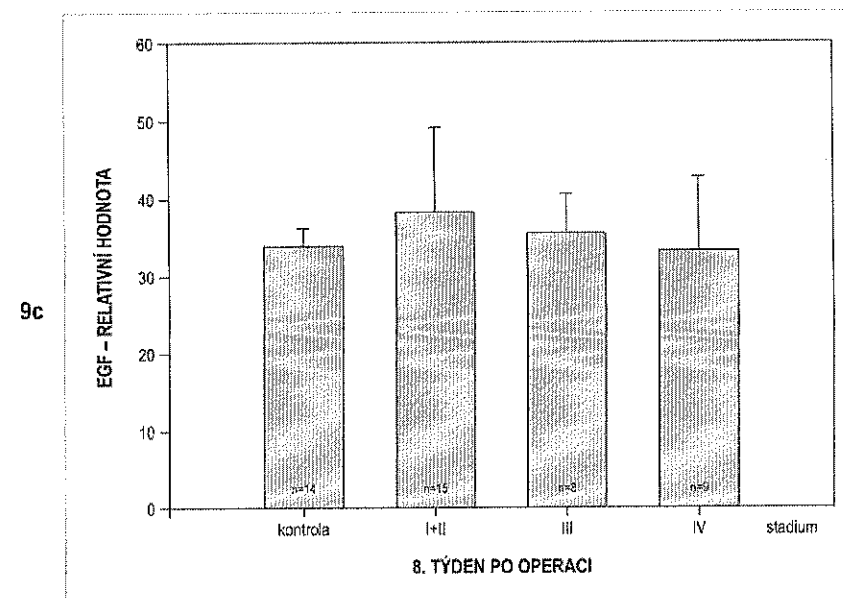
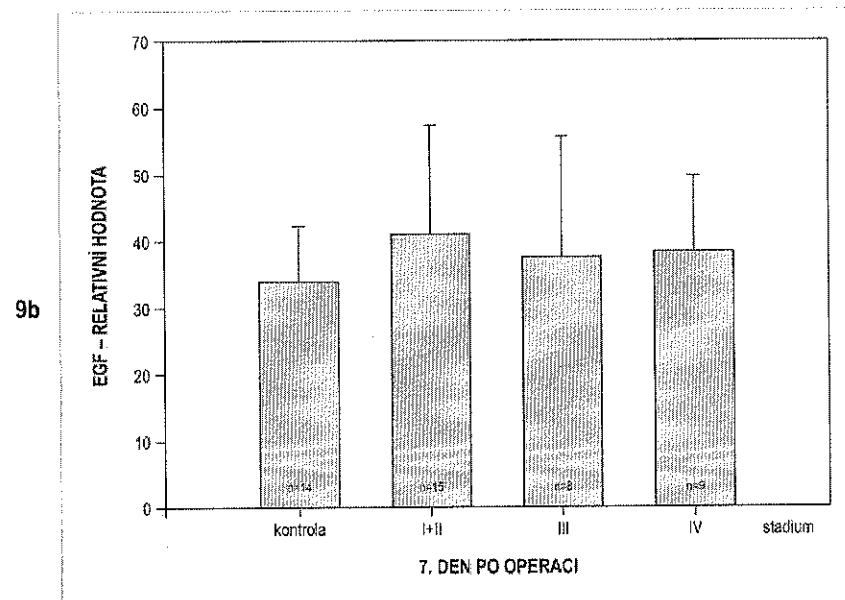
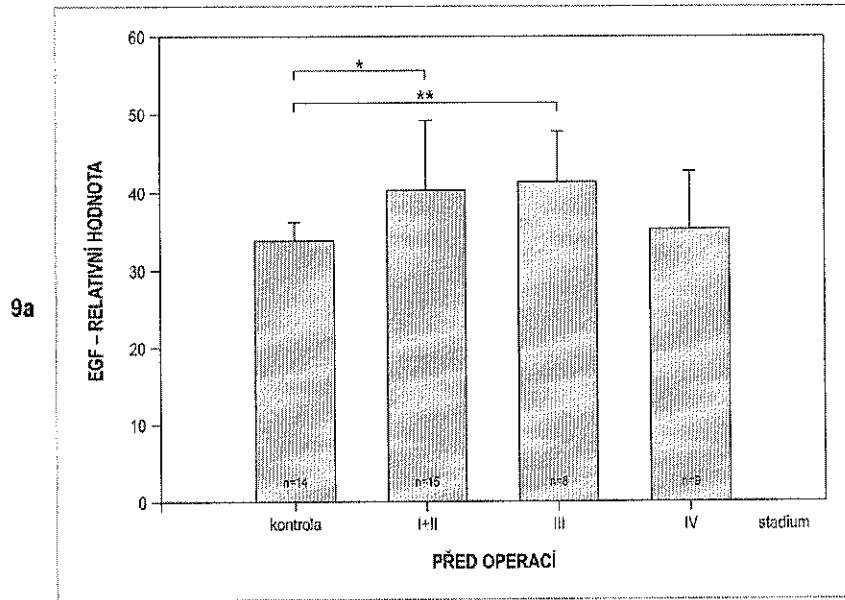
7c



Graf 8 a, b, c: Sérové hladiny IL-6 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

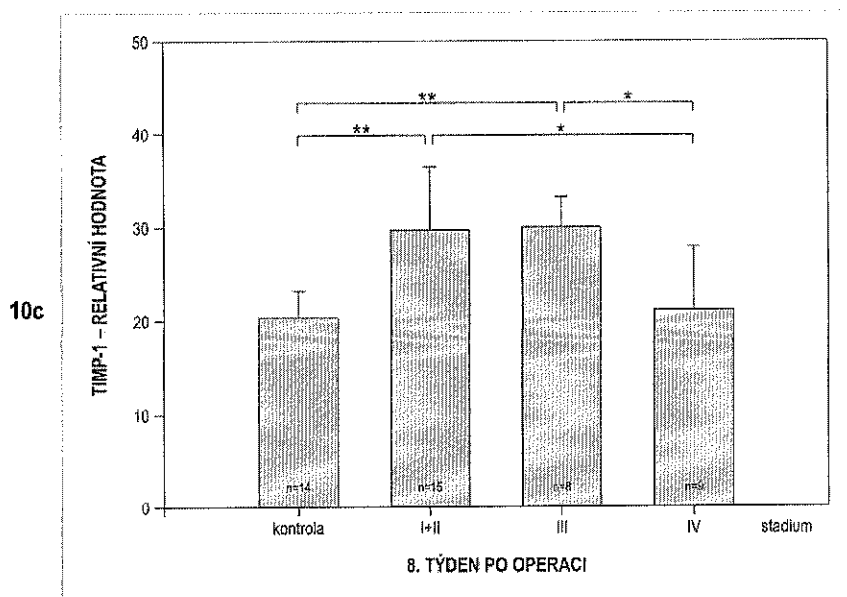
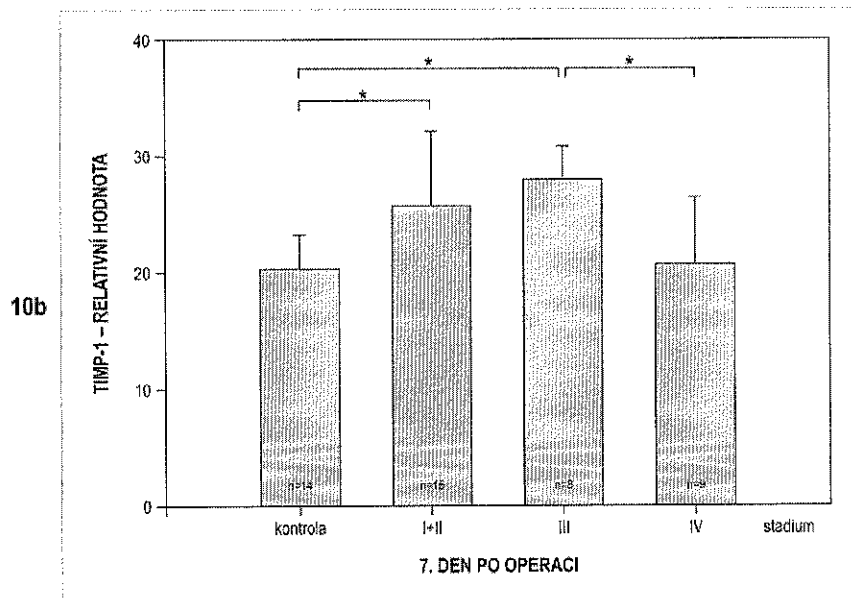
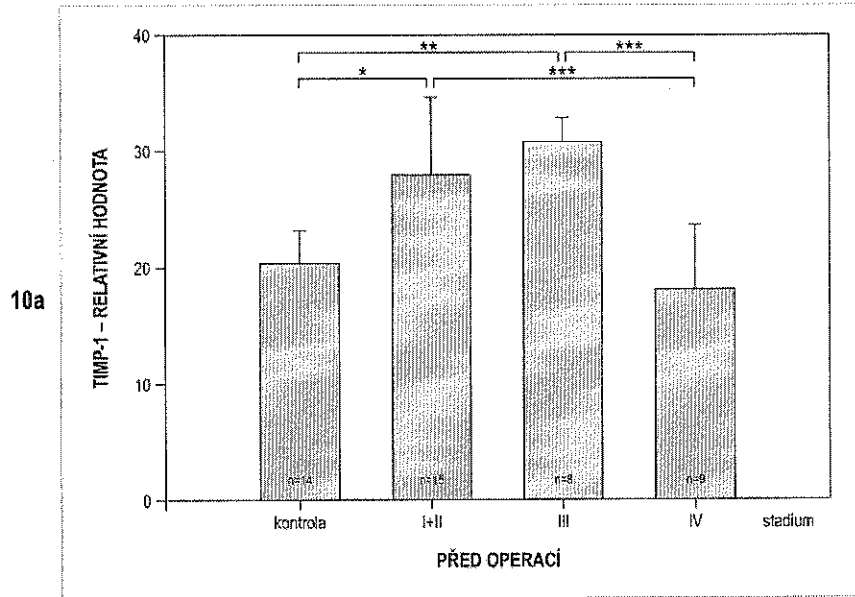


Graf 9 a, b, c: Sérové hladiny EGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



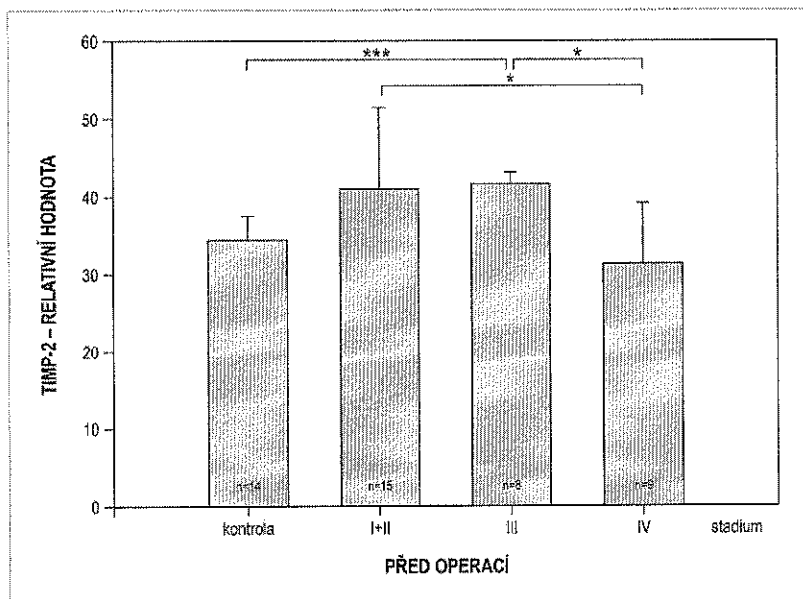


Graf 10a, b, c: Sérové hladiny TIMP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

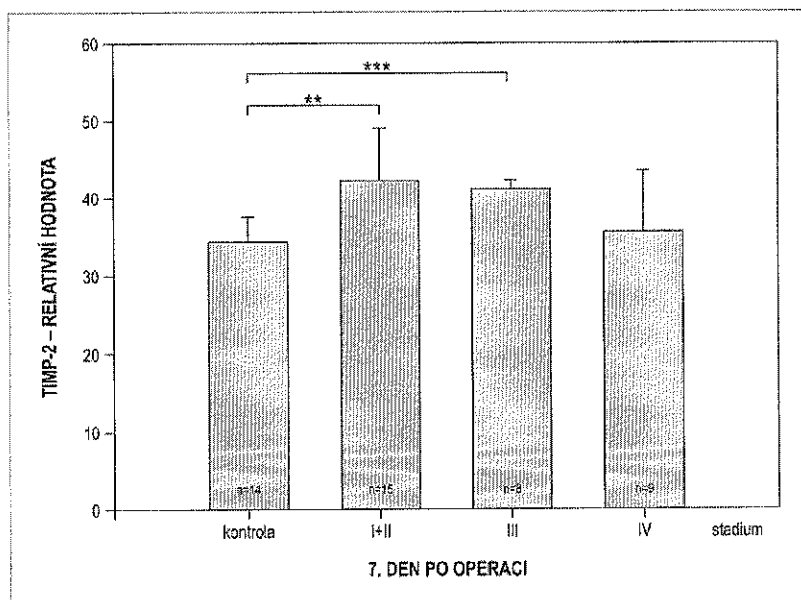


Graf 11 a, b, c: Sérové hladiny TIMP-2 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

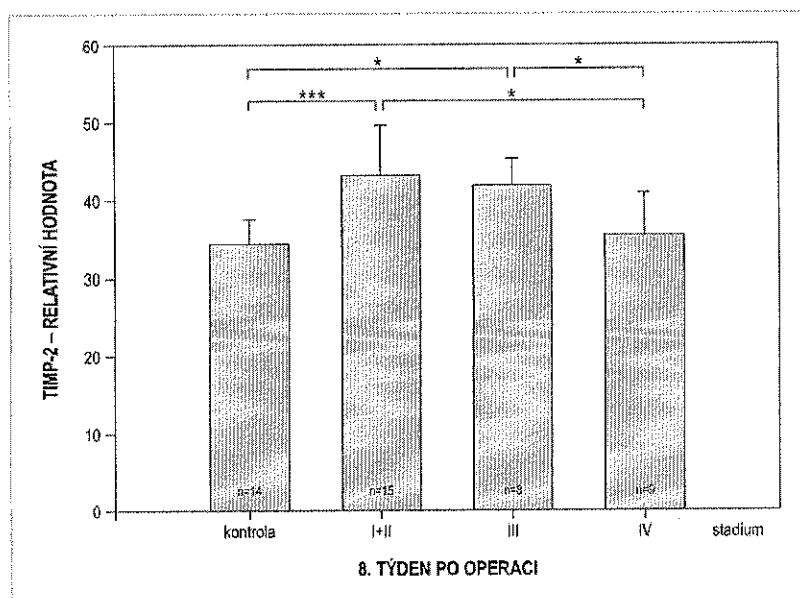
11a



11b

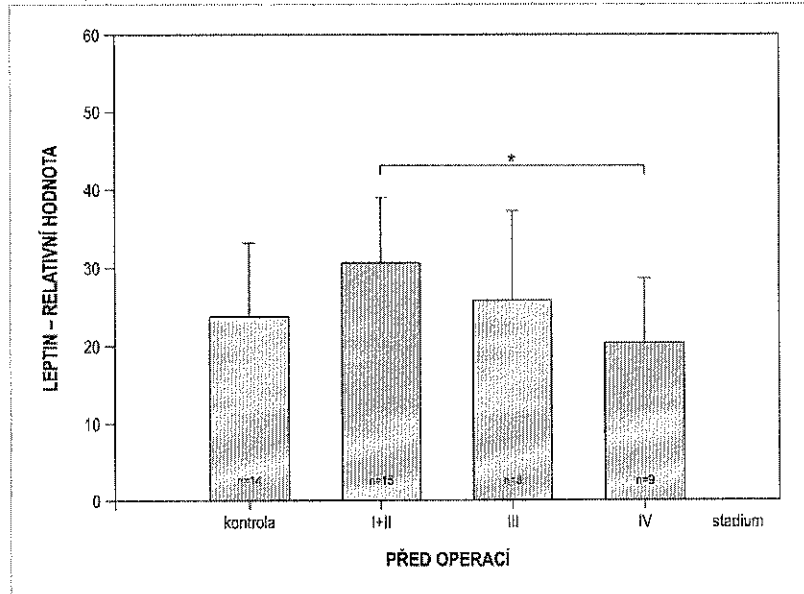


11c

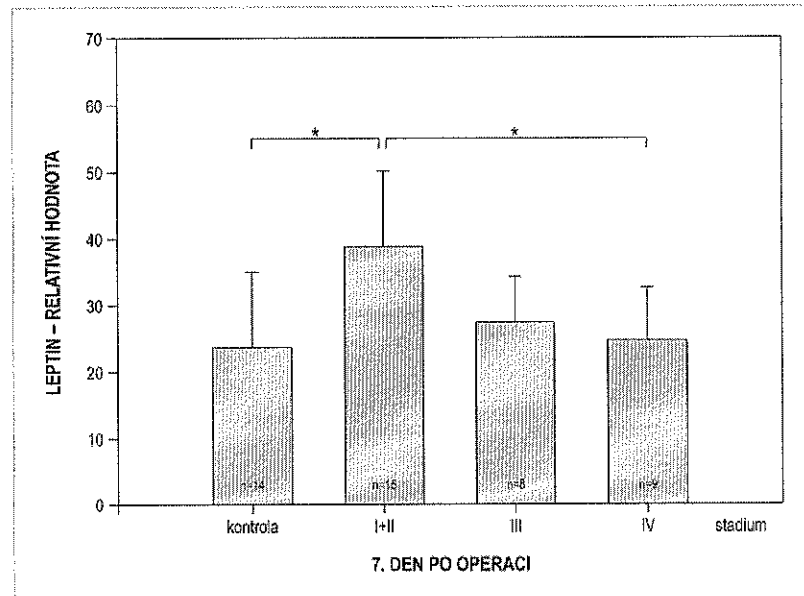


Graf 12 a, b, c: Sérové hladiny leptinu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

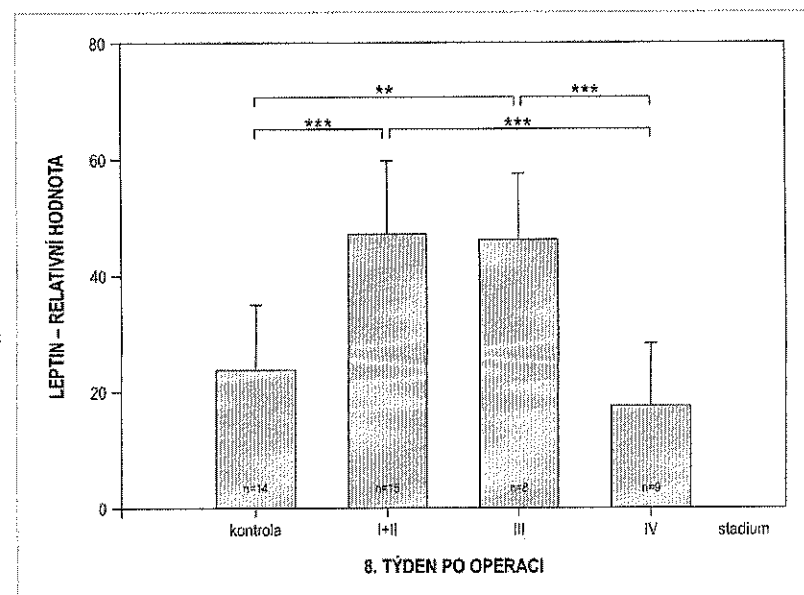
12a



12b



12c



## 17. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Chemokiny a jejich receptory

Tabulka 2: Charakteristika souboru nemocných

Tabulka 3: Mapa proteinové array

Tabulka 4: Sérové hladiny angiogeninu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 5: Sérové hladiny MCP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 6: Sérové hladiny RANTES před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 7: Sérové hladiny pan GRO před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 8: Sérové hladiny ENA-78 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 9: Sérové hladiny IL-8 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 10: Změny hladiny IL-8 sedmý den a 8.týden po operaci (statistická významnost)

Tabulka 11: Sérové hladiny PDGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 12: Změny hladiny PDGF sedmý den a 8.týden po operaci (statistická významnost)

Tabulka 13: Sérové hladiny IL-6 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 14: Sérové hladiny EGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 15: Sérové hladiny TIMP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 16: Sérové hladiny TIMP-2 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 17: Sérové hladiny leptinu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

Tabulka 18: Změny hladiny leptinu sedmý den a 8.týden po operaci (statistická významnost)

Tab.č.1. Chemokiny a jejich receptory

Systematický název	Název původní	Chemokinový receptor	P/M
<b>CXC chemokiny</b>			
<i>ELR+ chemokiny</i>			
CXCL1	MGSA- $\alpha$ /GRO- $\alpha$	CXCR2 > CXCR1	P
CXCL2	MGSA- $\beta$ /GRO- $\beta$	CXCR2	P
CXCL3	MGSA- $\gamma$ /GRO- $\gamma$	CXCR2	P
CXCL4	PF4	neznámý	A
CXCL5	ENA-78	CXCR2	P
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	P
CXCL7	NAP-2	CXCR2	P
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	P
<i>ELR- chemokiny</i>			
CXCL9	Mig	CXCR3	A
CXCL10	IP-10	CXCR3	A
CXCL11	I-TAC	CXCR3	A
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4, CXCR7	M,P
CXCL13	BCA1	CXCR5	
CXCL14	BRAK/Bolekine	neznámý	P
CXCL16	SR-PSOX	CXCR6	
<b>CC chemokiny</b>			
CCL1	I-309	CCR3	P
CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2	P
CCL3	MIP1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	CCR1, 5	P
CCL3L1	LD78 $\beta$	CCR1,5	
CCL4	MIP1 $\beta$	CCR5	P
CCL5	RANTES	CCR1,3, 5	P
(CCL6)	neznámý(u myši C10/MRP1)	neznámý	
CCL7	MCP-3	CCR1,2, 3	P
CCL8	MCP-2	CCR3, 5	P
(CCL9/10)	neznámý(u myši MRP2/CCF18/MIP1 $\gamma$ )	CCR1	
CCL11	Eotaxin	CCR3	P
(CCL12)	neznámý(u myši MCP5)	CCR3	
CCL13	MCP-4	CCR2, 3	
CCL14	HCC-1	CCR1, 5	
CCL15	HCC-2/LKN-1/MIP1 $\delta$ /MIP5	CCR1, 3	P
CCL16	HCC-4/LEC/LCC1	CCR1, 2	P
CCL17	TARC	CCR4	
CCL18	DC-CK1/PARC/AMAC1	neznámý	P
CCL19	MIP3 $\beta$ /ELC/Exodus-3	CCR7	P
CCL20	MIP3 $\alpha$ /LARC/Exodus-1	CCR6	P
CCL21	6Ckine/SLC/Exodus-2	CCR7	P,metastázy do LU
CCL22	MDC/STCP1	CCR4	
CCL23	MPIF1/CK $\beta$ 8/CK $\beta$ 8-1	CCR1	P/M
CCL24	TECK	CCR9	
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	
CCL27	CTACK/ILC	CCR10	
CCL28	MEC	CCR3,10	
<b>C chemokiny</b>			
XCL1	Lymphotactin/SCM1 $\alpha$ /ATAC	XCR1	
<b>CX<sub>3</sub>CL1 chemokiny</b>			
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1	P/M

P-progrese nádoru; M-metastazování; A –angiostatický efekt; LU-lymfatická uzlina

Tab. č. 2: Charakteristika souboru nemocných

Pacient	Pohlaví	věk	Stadium	Tumor	Uzliny	Metastázy	Grade	Lokalizace metastáz (počet)
1	ž	78	I	T1a	N0	M0	II	žádné
2	m	74	I	T1b	N0	M0	II	žádné
3	m	80	I	T1b	N0	M0	II	žádné
4	m	55	I	T1b	N0	M0	I-II	žádné
5	m	55	I	T1a	N0	M0	II	žádné
6	m	59	I	T1b	N0	M0	II	žádné
7	m	51	I	T1b	N0	M0	III	žádné
8	m	78	I	T1b	N0	M0	II	žádné
9	m	58	I	T1a	N0	M0	III	žádné
10	ž	72	I	T1b	N0	M0	I-II	žádné
11	ž	46	I	T1a	N0	M0	I	žádné
12	m	50	II	T2	N0	M0	II	žádné
13	m	66	II	T2	N0	M0	II	žádné
14	m	54	I	T1a	N0	M0	III	žádné
15	m	78	I	T1a	N0	M0	II	žádné
16	ž	83	III	T3a	N0	M0	I-II	nadledvina
17	m	66	III	T3b	N0	M0	II	renální žíla
18	ž	73	III	T3b	Nx	M0	III	renální žíla
19	m	64	III	T3b	N0	M0	II	renální žíla
20	m	57	III	T3a	N0	M0	II-III	oboustranný TU, renální žíla
21	ž	66	III	T3a	N0	M0	II	nadledvina
22	ž	77	III	T3a	N0	M0	II-III	nadledvina
23	m	75	III	T3a	N0	M0	I-II	nadledvina
24	m	77	IV	T3a	Nx	M1	III	játra (1)
25	m	74	IV	T4	N0	M1	III-IV	skelet, játra, plíce (3)
26	ž	70	IV	T3b	N2	M0	III-IV	abdominální uzliny (1)
27	ž	71	IV	T3a	N0	M1	sarkomat.	játra, peritoneum (2)
28	ž	62	IV	T1b	N0	M1	I-II	lymf. uzliny - mediastinum (1)
29	m	44	IV	T3b	N0	M1	III-IV	játra, plíce (2)
30	ž	74	IV	T1b	Nx	M1	III	plíce (1)
31	m	57	IV	T3b	N0	M1	II	vícečetné kostní (3)
32	m	65	IV	T1b	N1	M1	III	páteř, plíce (2)

ž – žena m - muž

Tab.č.3.

### RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array I and 1.1 Map

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
2	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
3	GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
4	GRO	IFN- $\gamma$	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
5	PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
6	PIGF	RANTES	TGF- $\beta$ 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
7	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
8	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

Tabulka 4: Sérové hladiny angiogeninu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

ANGIOGENIN									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	48,13 ± 5,12	51,94 ± 3,39	47,57 ± 3,73	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	n.s.
7 dní po operaci	48,50 ± 6,36	50,25 ± 4,11	52,14 ± 4,19	p = 0,002	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	48,32 ± 5,10	50,67 ± 2,46	48,90 ± 4,75	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	40,44 ± 1,67								

Tabulka 5: Sérové hladiny MCP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

MCP-1									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	20,57 ± 7,81	23,06 ± 5,69	13,43 ± 5,58	p = 0,002	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,025
7 dní po operaci	25,57 ± 7,85	25,44 ± 7,65	14,85 ± 4,99	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,034	n.s.	p = 0,006	p = 0,019
8 týdnů po operaci	23,86 ± 7,55	25,49 ± 8,01	9,83 ± 5,33	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	p < 0,001	p < 0,001
kontrola	9,78 ± 3,66								

Tabulka 6: Sérové hladiny RATNES před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

RANTES									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	39,43 ± 9,84	43,81 ± 2,14	31,09 ± 7,87	n.s.	p = 0,022	n.s.	n.s.	p = 0,047	p = 0,005
7 dní po operaci	40,5 ± 7,44	42,56 ± 2,90	35,97 ± 8,86	p = 0,039	p = 0,019	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	42,36 ± 5,91	44,00 ± 2,52	34,87 ± 5,98	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	p = 0,016	p = 0,007
kontrola	33,06 ± 3,25								

Tabulka 7: Sérové hladiny GRO před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

GRO									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	23,96 ± 7,41	30,69 ± 5,44	25,54 ± 5,59	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,041	n.s.	n.s.
7 dní po operaci	31,23 ± 7,72	31,88 ± 7,14	26,51 ± 7,94	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	31,41 ± 5,19	28,36 ± 7,22	21,61 ± 9,12	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,004	n.s.	p = 0,018	n.s.
kontrola	9,53 ± 2,87								

Tabulka 8: Sérové hladiny ENA-78 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

ENA-78									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	9,77 ± 3,34	14,25 ± 2,92	6,77 ± 3,28	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,012	p = 0,009	n.s.	p < 0,001
7 dní po operaci	11,54 ± 4,74	15,06 ± 5,34	10,22 ± 4,18	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	12,39 ± 4,23	12,68 ± 4,99	8,85 ± 2,21	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,040	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	3,19 ± 1,44								



Tabulka 9: Sérové hladiny IL-8 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

IL-8									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	4,16 ± 2,04	6,25 ± 2,98	6,57 ± 3,21	n.s.	p = 0,040	p = 0,017	n.s.	n.s.	n.s.
7 dní po operaci	2,10 ± 1,11	2,44 ± 1,80	2,86 ± 1,96	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	1,96 ± 2,41	2,85 ± 2,03	1,53 ± 2,39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	2,78 ± 2,24								

Tabulka 10: Změny hladiny IL-8 7. den a 8. týden po operaci (statistická významnost)

IL-8				
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	
před operací versus 7. den po operaci	p = 0,015	p = 0,010	p = 0,010	
před operací versus 8. týden po operaci	p = 0,010	p = 0,021	p = 0,004	
7. den versus 8. týden po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	

Tabulka 11: Sérové hladiny PDGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

PDGF									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	44,08 ± 5,37	42,94 ± 3,99	35,45 ± 3,95	p = 0,017	p = 0,029	p = 0,032	n.s.	p < 0,001	p = 0,005
7 dní po operaci	46,93 ± 4,76	44,87 ± 2,63	41,34 ± 7,58	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	p = 0,046	n.s.
8 týdnů po operaci	45,89 ± 4,75	44,01 ± 2,40	43,56 ± 2,53	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	39,11 ± 2,45								

Tabulka 12: Změny hladiny PDGF 7. den a 8. týden po operaci (statistická významnost)

PDGF				
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	
před operací versus 7. den po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	
před operací versus 8. týden po operaci	n.s.	n.s.	p = 0,012	
7. den versus 8. týden po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	

Tabulka 13: Sérové hladiny IL-6 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

IL-6									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	4,43 ± 1,64	3,08 ± 1,34	3,43 ± 1,66	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
7 dní po operaci	4,74 ± 1,64	5,54 ± 2,62	4,43 ± 2,20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	2,38 ± 1,85	3,49 ± 1,43	3,20 ± 1,62	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	3,83 ± 1,52								

Tabulka 14: Sérové hladiny EGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

EGF									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	40,60 ± 8,86	41,81 ± 6,25	35,66 ± 7,27	p = 0,044	p = 0,004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
7 dní po operaci	41,23 ± 12,32	37,75 ± 13,17	38,66 ± 14,23	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	38,36 ± 10,46	35,61 ± 5,43	33,25 ± 10,21	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola	34,11 ± 2,36								

Tabulka 15: Sérové hladiny TIMP-1 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

TIMP-1									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	28,00 ± 6,71	30,88 ± 2,05	18,15 ± 7,62	p = 0,016	p = 0,003	n.s.	n.s.	p < 0,001	p < 0,001
7 dní po operaci	25,80 ± 6,42	28,06 ± 2,86	20,80 ± 5,68	p = 0,027	p = 0,018	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,042
8 týdnů po operaci	29,68 ± 6,82	30,06 ± 3,23	21,12 ± 6,72	p = 0,002	p = 0,005	n.s.	n.s.	p = 0,014	p = 0,022
kontrola	20,39 ± 2,86								

Tabulka 16: Sérové hladiny TIMP-2 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

TIMP-2									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	40,97 ± 10,36	41,44 ± 1,55	31,25 ± 7,83	n.s.	p < 0,001	n.s.	n.s.	p = 0,020	p = 0,040
7 dní po operaci	42,17 ± 6,68	41,00 ± 1,13	35,83 ± 7,84	p = 0,010	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci	43,14 ± 6,31	41,71 ± 3,47	35,33 ± 5,36	p < 0,001	p = 0,022	n.s.	n.s.	p = 0,015	p = 0,019
kontrola	34,28 ± 3,18								

Tabulka 17: Sérové hladiny leptinu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

LEPTIN									
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
před operací	30,63 ± 9,66	25,88 ± 13,86	20,38 ± 10,29	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,022	n.s.
7 dní po operaci	38,93 ± 11,44	27,43 ± 6,91	24,70 ± 8,02	p = 0,011	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,035	n.s.
8 týdnů po operaci	47,11 ± 12,75	46,24 ± 11,35	17,50 ± 10,71	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	p < 0,001	p < 0,001
kontrola	23,81 ± 11,24								

Tabulka 18: Změny hladiny leptinu 7. den a 8. týden po operaci (statistická významnost)

Leptin			
vzorek	stadium I+II	stadium III	stadium IV
před operací versus 7. den po operaci	n.s.	n.s.	n.s.
před operací versus 8. týden po operaci	p < 0,001	p = 0,005	n.s.
7. den versus 8. týden po operaci	n.s.	p = 0,011	n.s.

## 18. LITERATURA

1. Aass N, De Mulder PH, Mickisch GH, et al. Randomized phase II/III trial of interferon alfa-2a with and without 13-cis-retinoic acid in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group (EORTC 30951). *J Clin Oncol* 2005; 23: 4172-4178.
2. Adam Ch, King S, Allgeier T, et al. DC-NK cell cross talk as a novel CD4 T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005; 106: 338-344.
3. Adams EF, Todo T, Schrell UM, et al. Autocrine control of human meningioma proliferation: secretion of platelet-derived growth-factor-like molecules. *Int J Cancer* 1991; 49: 398-402.
4. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR(+)CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000; 165(9): 5269-77.
5. 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.
6. Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-growth factor-I. *Cancer Res* 1998; 58: 4008-14.
7. Alberti K, Thomachot MC, Bachelot T, et al. IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004; 111: 653-661.
8. Amato RJ. Thalidomide therapy for renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46: S59-S65.
9. Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001; 114: 629-41.
10. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, et al. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J Clin Invest* 1998; 102: 465-472.
11. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, et al. Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 1996; 184: 981-992.
12. Arnaud P. The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects. *Rev Med Interne* 2002; 23 Suppl. 4: 449s-458s.
13. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 971-979.
14. Arya M, Patel HR, Williamson M. Chemokines: key players in cancer. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 557-64.
15. Ashley RA, Dubuque SH, Dvorak B, et al. Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 2002; 51: 472-8.
16. Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 909-918.

17. Atkins MB, Sparano J, Fisher RI, et al. Randomized phase II trial of high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2b in advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 661-670.
18. Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ, et al. IL-2 in combination with IFN alfa and FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: Long term results of a controlled randomized clinical trial. *Br J Cancer* 2001; 85: 1130-1136.
19. Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, et al. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a prospectively randomized trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol* 2004; 22: 1188-1194.
20. Autenrieth M, Heidenreich A, Gschwend JE. Systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Urologe* 2006; 45: 594-599.
21. Avniel S, Arik Z, Maly A, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol* 2006; 16: 468-476.
22. Baker CH, Kedar D, McCarty MF, et al. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling on tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of human carcinomas. *Am J Pathol* 2002; 161(3): 929-938.
23. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 540-50.
24. Baltaci S, Orhan D, Gögüs C, et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in renal cell carcinoma and their relationship with multifocality. *Eur Urol* 2003; 44: 76-81.
25. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Int Med*, 2003; 14: 459-469.
26. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
27. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002; 7(Suppl 4): 2-8.
28. Batist G, Champagne P, Hariton C, et al. Dose-survival relationship in a phase II study of neovastat in refractory renal cell carcinoma patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: A-1907.
29. Batist G, Patenaude F, Champagne P, et al. Neovastat (AE-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels. *Ann Oncol* 2002; 13: 1259-63.
30. Battagay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, et al. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF  $\beta$ -receptors. *J Cell Biol* 1994; 125(4): 917-928.
31. Bayes M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28: 3163.
32. Beecken WD, Bentas W, Glienke W, et al. Serum angiogenic activity: diagnostic relevance in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2002; 42: 364-369.
33. Beeram M, Rowinsky EK, Weiss GR, et al. A phase II, pharmacokinetic (PK) and biological correlative study of OSI-774 (Tarceva) in patients with advanced renal cell carcinoma, with FDG-PET imaging: evidence of durable stable disease and antitumor activity (abstract 369). *Eur J Cancer Suppl.* 2005; 2: 111.
34. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
35. Beňa F, Brázdová Z, Čadová L, et al. *Onkologická rizika*. 1. vydání, Masarykův onkologický ústav, Brno, 2001; 96 s. ISBN 80-238-7620-1.

36. Bergsten E, Uutela M, Li X, et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 512-516.
37. Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3106-12.
38. Bhuvaramurthy V, Kristiansen GO, Johannsen M, et al. In situ gene expression and localization of metalloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 15(5): 1379-84.
39. Bischoff J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 69-73.
40. Bloch W, Huggel K, Sasaki T, et al. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J* 2000; 14: 2373-6.
41. Boccardo F, Rubagotti A, Canobbio L, et al. Interleukin-2, interferon-alpha and interleukin-2 plus interferon-alpha in renal cell carcinoma. A randomized phase II trial. *Tumori* 1998; 84: 534-539.
42. Borden EC. Review: Milstein award lecture: interferons and cancer: where from here? *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(9): 511-27.
43. Brauch H, Weirich G, Brieger J, et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000; 60: 1942-1948.
44. Bremers AJA, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 1-25.
45. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitor of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-283.
46. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenreid M, et al. Integrin avb3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-64.
47. Brugarolas J. Renal cell carcinoma - molecular pathways and therapies. *N Engl J Med* 2007; 356(2): 185-187.
48. Bukowski RM. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer* 1997; 80: 1198-1220.
49. Bukowski RM, Negrier S, Elson P. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma: development of an international kidney cancer working group. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 2): 6310S-6314S.
50. Cabillic F, Bouet-Toussaint F, Toutirais O, et al. Interleukin-6 and vascular endothelial growth factor release by renal cell carcinoma cells impedes lymphocyte-dendritic cell cross-talk. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 518-523.
51. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, et al. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C1181-90.
52. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-90.
53. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 6801: 249-57.

54. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
55. Caux C, Liu YJ, Banchereau J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol Today* 1995; 16: 2-4.
56. Clifford SC, Astuti D, Hooper L, et al. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: Molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1 $\alpha$  in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 5067-5074.
57. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2477-90.
58. Colaco CA. Why are dendritic cells central to cancer immunotherapy? *Mol Med Today* 1999; 5: 14-7.
59. Copeland S, Siddiqui J, Remick D. Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines. *J Immunol Methods* 2004; 284(1-2): 99-106.
60. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, et al. Immunotherapy for advanced renal cell cancer (Review). *The Cochrane Collaboration, John Wiley & Sons, Ltd.*, 2006; 1-66.
61. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
62. Cristofanilli M, Charnsangavej C, Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 415-26.
63. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-308.
64. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082-5.
65. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, et al. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol* 2003; 264: 275-88.
66. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 523-44.
67. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285: 245-8.
68. Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 2001; 86: 308-15.
69. Demayo F, Minoo P, Plopper CG, et al. Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 28: L510-L517.
70. Deplanque G, Madhusudan S, Jones PH, et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent IM862 in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 1645-1650.
71. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-84.
72. Desai AA, Vogelzang NJ, Rini BI, et al. A multi-institutional phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil and daily thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma associated with high rate of venous thromboembolism. *Cancer* 2002; 95: 1629-36.
73. Di Martino L, Demontis B, Saccani Iotti G, et al. In vivo effect induced by interferon beta on steroid receptor status, cell kinetics and DNA ploidy in operable breast cancer patients. *Anticancer Res* 1995; 15(2): 537-41.

74. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, et al. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 1995; 121: 1845-54.
75. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2000; 477: 258-62.
76. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, et al. Angiogenic and angiostatic factor in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47: 149-61.
77. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002; 4: R11.
78. Distler O, Neidhart M, Gay RE, et al. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 33-49.
79. Drucker BJ, Schwarz L, Maroin S, et al. Phase II trial of ZD1839(Ireassa), an EGF receptor inhibitor, in patients with advanced renal cell carcinoma (abstract 270). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 182.
80. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-9.
81. Durand RE, Raleigh JA. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res* 1998; 58: 3547-50.
82. Durand RE, Sham E. The lifetime of hypoxic human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 711-5.
83. Dušek P, Kawaciuk I, Hyršl L. Imunoterapie zhoubných nádorů uropoetického traktu. *Urologie* 2000; 22: 7.
84. Dutcher J, Logan T, Gordon M, et al. 5FU + subcutaneous (SC) interleukin-2 (IL2) plus SC Intron (IFN) in metastatic renal cell cancer (RCC) patients (pts). A CWG study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996: 272a.
85. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.
86. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-80.
87. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000; 60: 1388-93.
88. Edelberg JM, Aird WC, Wu W, et al. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest* 1998; 102(4): 837-843.
89. Edgren M, Lennermas B, Larson A, et al. Angiogenic factors: vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (b-FGF) are not necessarily elevated in patients with advanced renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 1423-9.
90. Eisen T. Phase II results of a phase II/III study comparing thalidomide with medoxyprogesterone in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 400. Abstract 1606.
91. Eleutherakis-Papaiakovou V, Bamias A, Dimopoulos MA. Thalidomide in cancer medicine. *Annals Oncol* 2004; 15: 1151-1160.

92. Eleutherakis-Papaiakovou V, Karali M, Kokkonouzis I, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma: clinical significance and therapeutic approach. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(6): 937-48.
93. Elias L, Lew D, Figlin RA, et al. Infusional interleukin-2 and 5-fluorouracil with subcutaneous interferon-alpha for the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma: a southwest oncology group Phase II study. *Cancer* 2000; 89: 597-603.
94. Ellerhorst JA, Sella A, Amato RJ, et al. Phase II trial of 5-fluorouracil, interferon-alpha and continuous infusion interleukin-2 for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 2128-2132.
95. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppi JM, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently devone high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3129-36.
96. Escudier B, Koralewski P, Pluzanska A, et al. A randomized, controlled, double-blind phase III study (AVOREN) of bevacizumab/interferon- $\alpha$ 2a as first-line therapy in metastatic renal cell carcinoma (abstrakt 3). *J Clin Oncol* 2007; 25(18S):2s.
97. Escudier B, Lassau N, Couanet D, et al. Phase II trial of thalidomide in renal-cell carcinoma. *Annals Oncol* 2002; 13: 1029-1035.
98. Escudier B, Szczylik C, Eisen T, et al. Randomized phase III trial of Raf kinase and VEGFR inhibitor Sorafenib (BAY 43-9006) in patiens with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 3: 226(abstrakt 794).
99. Escudier B, Venner P, Stern L, et al. Prognostic factors in metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: lessons from a large phase III trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. *J Clin Oncol* 2004; 22(Suppl. 14S): 4547.
100. Etoh T, Inoue H, Tanaka S, et al. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61: 2145-53.
101. Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, et al. Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9): 3545-51.
102. Felbor U, Dreier L, Biyant RA, et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBOJ* 2000; 19: 1187-94.
103. Fett JB, Strydom DJ, Lobb RR, et al. Isolation and characterisation of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985; 24: 5480-5486.
104. Fidler IJ, Kerbel RS, Ellis LM. Biology of cancer angiogenesis. In: DeVita, Hellman, Rosenberg (Eds.), *Cancer Principles and Practice of Oncology*, sixth ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001.
105. Flanigan RC, Blumenstein BA, Salmon SE, et al. Cytoreduction nephrectomy in metastatic renal cancer: the results of Southwest Oncology Group Trial 8949. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000: 3.
106. Folkman, J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, editors. *The Molecular Basis or Cancer*. Philadelphia: Saunders, 1995; pp. 206-32.
107. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.



108. Friesel R, Kamoriya A, Maciag T. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol* 1987; 104: 689.
109. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246.
110. Gallou C, Joly D, Mejean A, et al. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999; 13: 464-475.
111. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2625-34.
112. Gentiliny G, Kirschbaum NE, Augustine JA, et al. Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cipl1/WAF1). *Blood* 1999; 93: 25-33.
113. George D, Michaelson D, Oh WK, et al. Phase I study of PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK) in metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 385 (abstract 1548).
114. Gitlitz B, Dolan N, Pierce W, et al. Fluoropyrimidines plus interleukin-2 and interferon- $\alpha$  in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: the UCLA Kidney Cancer Program. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996: 248a.
115. Goetz P, Krutílková V. Kancerogeneze. [www.postgradmed.cz](http://www.postgradmed.cz). (8/2007)
116. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J* 2002; 21: 1743-53.
117. Grossman JD, Grossman W. Angiogenesis. *Rev Cardiovasc Med* 2002; 3: 38-44.
118. Gruber M, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 169-174.
119. Guida M, Casamassima A, Monticelli G, et al. Basal cytokines profile in metastatic renal cell carcinoma patients treated with subcutaneous IL-2 therapy compared with that of healthy donors. *J Transl Med* 2007; 5: 51.
120. Gupta SK, Singh JP. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 1994; 127: 1121-1127.
121. Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, et al. mRNA expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur J Cancer* 2001; 37(15): 1839-46.
122. Hainsworth JD, Sosman JA, Spigel DR, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7889-7896.
123. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-64.
124. Hansell P, Maione TE, Borgstrom P. Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo. *Am J Physiol* 1995; 269: H829-H836.
125. Harjai KJ, Chowdhury P, Grines CL. Therapeutic angiogenesis: a fantastic new adventure. *J Interv Cardiol* 2002; 15: 223-9.
126. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, et al. Hypoxia induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1999; 59: 1578-83.

127. Hatina J. Imunologie nádorů-současný stav a poznatky z 1. Mezinárodní konference základní a klinické imunogenetiky. Část I- Interakce nádoru a imunitního systému. *Klin onkol* 2005; 4: 119-125.
128. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003; 278(10): 8508-15.
129. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stroma tumors. *Science* 2003; 299: 708-710.
130. Heinrich MC, McArthur GA, Demetri GD, et al. Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J Clin Oncol* 2006; 24: 1195-1203.
131. Heldin CH. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS Lett* 1997; 410:17-12.
132. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3722-3726.
133. Hemmerlein B, Johanns U, Kugler A, et al. Quantification and in situ localization of MCP-1 mRNA and its relation to the immune response of renal cell carcinoma. *Cytokine* 2001; 13(4): 227-233.
134. Hemmerlein B, Kugler A, Özisik R, et al. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439: 645-652.
135. Henriksson R, Nilsson S, Colleen S, et al. Survival in renal cell carcinoma—a randomized evaluation of tamoxifen vs interleukin 2, alpha-interferon (leucocyte) and tamoxifen. *Br J Cancer* 1998; 77: 1311-1317.
136. Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 2002; 25: 511-518.
137. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF- $\beta$ , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998; 141: 805-14.
138. Hofmockel G, Langer W, Theiss M, et al. Immunochemotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regimen of interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil. *J Urol* 1996; 156: 18-21.
139. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002; 27(1):32-7.
140. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; 4(3): 269-73.
141. Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Increased serum leptin levels and over expression of leptin receptors are associated with the invasion and progression of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; 176(4Pt1): 1631-1635.
142. Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Leptin promotes invasiveness of murine renal cancer cells via extracellular signal-regulated kinases and rho dependent pathway. *J Urol* 2006; 176(4Pt1): 1636-1641.
143. Houghton JA, Morton CL, Adkins DA, et al. Locus of the interaction among 5 fluorouracil, leucovorin, and interferon-alpha 2a in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1993; 53: 4243-4250.

144. Huang RP, Huang R, Fan Y, et al. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem* 2001; 294: 55-62.
145. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2271-2281.
146. Chang SG, Jeon SH, Lee SJ, et al. Clinical significance of urinary vascular endothelial growth factor and microvessel density in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2001; 58: 904-908.
147. Chen JJ, Yao PI, Yuan A, et al. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 729-37.
148. Igarashi H, Esumi M, Ishida H, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 47-53.
149. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10595-9.
150. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348: 555-7.
151. Inoue K, Kamada M, Slaton JW, et al. The prognostic value of angiogenesis and metastasis-related genes for progression of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1863-1870.
152. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet* 1999; 353: 14-17.
153. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU International* 2004; 93: 297-302.
154. Jayson GC, Middleton M, Lee SM, et al. A randomized phase II trial of interleukin 2 and interleukin 2- interferon alpha in advanced renal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 366-369.
155. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al. Induction of HIF-1 in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15: 1312-4.
156. Jewett A, Bonavida B. Interferon-alpha activates cytotoxic function but inhibits interleukin-2-mediated proliferation and tumor necrosis factor-alpha secretion by immature human natural killer cells. *J Clin Immunol* 1995; 15(1): 35-44.
157. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000; 6: 41-8.
158. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6: 34-55.
159. Jouan V, Canron X, Alemany M, et al. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* 1999; 94: 984-993.

160. Kalinski P, Giermasz A, Nakamura Y, et al. Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells. *Mol Immunol* 2005; 42(4): 535-9.
161. Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, et al. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(10): 1303-15.
162. Kallakury BVS, Karikehalli S, Haholu A, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Can Res* 2001; 7: 3113-3119.
163. Kaminska J, Kowalska MM, Nowacki MP, et al. CRP, TNF $\alpha$ , IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-10 in blood serum of colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2000; 6(1): 38-41.
164. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Develop* 2004; 18: 3055-3065.
165. Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, et al. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res* 2004; 64: 4010-7.
166. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126: 4895-902.
167. Kawata N, Nagane Y, Hirakata H, et al. Significant Relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2007; 69(6): 1049-1053.
168. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, et al. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol* 2004; 172(5): 2853-60.
169. Kedar D, Baker CH, Killion JJ, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3592-600.
170. Kedar I, Mermershtain W, Ivgi H. Thalidomide reduces serum C-reactive protein and interleukin-6 and induces response to IL-2 in a fraction of metastatic renal cell cancer patients who failed IL-2-based therapy. *Int J Cancer* 2004; 110: 260-265.
171. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727-39.
172. Kerbel RS. Clinical trials of antiangiogenic drugs: opportunities, problems, and assessment of initial results. *J Clin Oncol* 2001; 19(Suppl. 18): 45S-51.
173. Kerst JM, Bex A, Mallo H, et al. Prolonged low dose IL-2 and thalidomide in progressive metastatic renal cell carcinoma with concurrent radiotherapy to bone and/or soft tissue metastasis: a phase II study. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 926-931.
174. Kim E, Moore J, Huang J, et al. All angiogenesis is not the same: distinct patterns of response to antiangiogenic therapy in experimental neuroblastoma and Wilms' tumor. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 287-90.
175. Kim SJ, Uehara H, Karashima T, et al. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia* 2001; 3(1): 33-42.

176. Kim W, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genetics Develop* 2003; 13: 55-60.
177. Kim WY, Kaelin WG Jr. Molecular pathways in renal cell carcinoma-rationale for targeted treatment. *Semin Oncol* 2006; 33(5): 588-95.
178. Kimura F, Shimizu H, Yoshidomem H, et al. Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. *J Surgical Res* 2006; 133: 102-112.
179. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* 2002; 29(3 Suppl. 7): 18-26.
180. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 1998; 152: 93-100.
181. Klatter T, Bohm M, Neliu T, et al. Evaluation of peri-operative peripheral and renal venous levels of pro- and anti-angiogenic factors and their relevance in patients with renal cell carcinoma. *BJU International* 2007; 100(1): 209-214.
182. Klener P. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha, Galén 2002; 11-71.
183. Klener P. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia* 2002; 12(1): 2-8.
184. Klener P. Význam angiogeneze u nádorových onemocnění a možnosti jejího ovlivnění. *Forum Medicinæ* 1999; 2: 54-61.
185. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 721-728.
186. Kondo K, Yao M, Yoshida M, et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 58-68.
187. Kondo T, Ito F, Nakazawa H, et al. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171(6Pt1): 2171-2175.
188. Kondo T, Nakazawa H, Ito F, et al. Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associates with a Th-1 type immune response. *Cancer Sci* 2006; 97(8): 780-786.
189. Kos FJ. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol Res* 1998; 17: 303-12.
190. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Nucleus HK, 2004; 968.
191. Krieg M, Haas R, Brauch H, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 2000; 19: 5435-5443.
192. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2003; 290: 2149-2158.
193. Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, et al. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *J Urol* 1998; 160: 1914-1918.
194. Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10355-62.
195. Kurban G, Hudon V, Duplan E, et al. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1313-9.

196. Kurz H. Physiology of angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50: 17-35.
197. Lamuraglia M, Lassau N, Chami L, et al. Doppler ultrasonography with perfusion software and contrast agent injection as a tool for early evaluation of metastatic renal cancers treated with the Raf kinase and VEGFR inhibitor: a prospective study. *J Clin Oncol* 2005; 23(PtI,Supp D): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 3069).
198. Larkin JM, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60(3): 216-26.
199. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 634-40.
200. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, et al. TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. *Cardio Res* 2005; 65: 599-608.
201. Lein M, Jung K, Laube C, et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue in patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85: 801-804.
202. Leung SK, Ohh M. Playing tag with HIF: the VHL Story. *J Biomed Biotechnol* 2002; 2: 131-135.
203. Levy AP, Levy NS, Wegner S, et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333-40.
204. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66: 605-612.
205. Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology. *Radiation Oncol* 2007; 2(5): 1-9.
206. Li X, Ponten A, Aase K, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF-C alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 302-309.
207. Lin E, Calvado SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127: 117-126.
208. Lindroos PM, Coin PG, Badgett A, et al. Alveolar macrophages stimulated with titanium dioxide, chrysotile asbestos, and residual oil fly ash upregulate the PDGF receptor-alpha on lung fibroblasts through an IL-1beta-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 283-292.
209. Lindsey H. Bevacizumab and elrotinib show promise for kidney cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 15.
210. Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, et al. A randomized study of low-dose interleukin-2 subcutaneous immunotherapy versus interleukin-2 plus interferon-alpha as first line therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Tumori* 1993; 79: 397-400.
211. Ljungberg B, Jacobsen J, Häggström-Rudolfsson S, et al. Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. *Urol Res* 2003; 31: 335-340.
212. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11205-10.
213. Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 3729-3735.

214. Lopez Hanninen E, Kirchner H, Atzpodien J. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J Urol* 1996; 155: 19-25.
215. LoRusso PP, Adjei AA, Meyer MB, et al. A phase I clinical and pharmacokinetic evaluation of the oral MEK inhibitor, CI-1040, administered for 21 consecutive days, repeated every 4 weeks in patients with advanced cancer (abstract 321). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 79.
216. Low JA, Johnson MD, Bone EA, et al. The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1207-14.
217. Luan J, Shattuck-Brand R, Haghnegahdar H, et al. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 588-597.
218. Luboshits G, Shina S, Kaplan O. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advance breast carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 4681-4687.
219. Lummen G, Goepel M, Mollhoff S, et al. Phase II study of interferon-gamma versus interleukin-2 and interferon-alpha 2b in metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1996; 155: 455-458.
220. Lynch DH, Yang XD. Therapeutic potential of ABX-EGF: a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer treatment. *Semin Oncol* 2002; 29: 47-50.
221. MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, et al. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 25190-6.
222. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003; 171: 2366-2373.
223. Malik AK, Gerber HP. Targeting VEGF ligands and receptors in cancer. *Targets* 2003; 2(2): 48-57.
224. Mancuso A, Sternberg CN. What's new in the treatment of metastatic kidney cancer? *BJU Int* 2005; 95: 1170-1180.
225. Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, et al. Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunol* 2005; 117(1): 38-46.
226. Martel CL, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 177-190.
227. Mattila MM, Ruohola JK, Valve EM, et al. FGF-8b increases angiogenic capacity and tumor growth of androgen-regulated S115 breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 2791-804.
228. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5(Suppl. 1): 3-10.
229. Mellado B, Gascon P. Molecular biology of renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2006; 8(10): 706-10.
230. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327-37.

231. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92: 4778-91.
232. Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, et al. The role of CXC2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 175: 5351-5357.
233. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999; 18: 363-74.
234. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, et al. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2260-8.
235. Miller K, Haney L, Pribluda V, et al. A phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 2-methoxyestradiol in patients with refractory metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 43a (abstract 170).
236. Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000; 127: 3941-6.
237. Miyake H, Hara I, Gohji K, et al. Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential. *Clin Cancer Research* 1999; 5: 2824-2829.
238. Miyata Y, Kanda S, Nomata K, et al. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 2004; 63(3): 602-608.
239. Moch H, Sauter G, Buchholz N, et al. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Human Pathol* 1997; 28(11): 1255-1259.
240. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, et al. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 2002; 115: 175-83.
241. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, et al. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol* 1999; 154: 1503-1512.
242. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619-48.
243. Morita T, Tokue A. Biomodulation of 5-fluorouracil by interferon-alpha in human renal carcinoma cells: relationship to the expression of thymidine phosphorylase. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 91-96.
244. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2(2): 123-8.
245. Moser B, Wolf M, Walz A, et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; 25: 75-84.
246. Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997; 15: 180-9.
247. Motzer RJ, Amato R, Todd M, et al. Phase II trial of anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal carcinoma. *Invest New Drugs* 2003; 21: 99-101.



248. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al. Interferon-alfa as a komparative treatment for clinical trials for new therapy against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 20: 289-296.
249. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor in patiens with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 16-24.
250. Motzer RJ, Murphy BA, Bacik J, et al. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2972-2980.
251. Motzer RJ, Rakhit A, Thompson J, et al. Phase II trial of branched peginterferon-alpha 2a (40 kDa) for patients with advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1799-1805.
252. Motzer RJ, Rini BI, Michaelson MD, et al. SU011248, a novel tyrosine kinase inhibitor, shows antitumor activity in second-line therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase 2 trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. *J Clin Oncol* 2004; 22(Suppl. 14S): 4500.
253. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2000; 163: 408-417.
254. MU W, Ouyang X, Agarwal A, et al. IL-10 Suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3651-3660.
255. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Seminars Cancer Biol* 2004; 14: 123-130.
256. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-6.
257. Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, et al. Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model. *J Biol Chem* 2000; 275: 5545-52.
258. Murata M, Nabeshima S, Kikuchi K, et al. A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine* 2006; 33(3): 121-8.
259. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 59-69.
260. Negrier S, Escudier B, Lasset C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie*. *N Engl J Med* 1998; 338: 1272-1278.
261. Negus RPM, Turner L, Burke F, et al. Hypoxia down-regulates MCP-1 expression: implications for macrophage distribution in tumors. *J Leukoc Biol* 1998; 63(6): 758-65.
262. O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper D, et al. Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. *Lancet* 1999; 353: 1494-1495.
263. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 2003; 101: 3597-605.

264. Oh JS, Kucab JE, Bushe PR, et al. Insulin-like growth factor-1 inscribes a gene expression profile for angiogenic factors and cancer progression in breast epithelial cells. *Neoplasia* 2002; 4: 204-17.
265. Olencki T, Bukowski R, Budd G, et al. Phase I/II trial of simultaneously administered rIL-2/rHuIFN $\alpha$ 2a and 5-FU in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996: 263.
266. Ono M, Sawa Y, Matsumoto K, et al. In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. *Circulation* 2002; 106: 1264-9.
267. Or R, Feferman R, Shoshan S. Thalidomide reduces vascular density in granulation tissue of subcutaneously implanted polyvinyl alcohol sponges in guinea pigs. *Exp Hematol* 1998; 26: 217-21.
268. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996; 2: 689-92.
269. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-28.
270. Ostman A, Heldin CH. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. *Adv Cancer Res* 2001; 80: 1-38.
271. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, et al. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 27509-12.
272. Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 436: 351-356.
273. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4<sup>+</sup> T cell responses in antitumor immunity. *Curr Op Immunol* 1998; 10: 588-94.
274. Park SY, Seol JW, Lee YJ, et al. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem* 2004; 271(21): 4222-8.
275. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380: 364-6.
276. Patel PH, Chagani RSK, Motzer RJ. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 614-619.
277. Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 915-22.
278. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *PNAS* 2003; 100(14): 8372-8377.
279. Pinzani M, Milani S, Herbst H, et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* 1996; 148: 785-800.
280. Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, et al. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial versus subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4628-33.
281. Pold M, Zhu LX, Sharma S, et al. Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC ligant (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64(5): 1853-60.

282. Ponten A, Li X, Toren P, et al. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2003; 163: 673-682.
283. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, et al. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2202-7.
284. Prager E, Staffier G, Majdic O, et al. Induction of hyporesponsiveness and impaired T lymphocyte activation by the CD31 receptor/ligand pathway in T cells. *J Immunol* 2001; 166: 2364-71.
285. Prewett M, Rothman M, Waksal H, et al. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2957-2966.
286. Pyrhonen S, Salminen E, Ruutu M, et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2859-2867.
287. Raia V, Mancuso P, Bertolini F. Antiangiogenesis therapy in the treatment of cancer. *Enhancer Biother Cancer* 2005; 3(1): 2-8.
288. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, et al. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters* 2007; 256: 137-165.
289. Ramos EJB, Suzuki S, Marks D, et al. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 427-434.
290. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, et al. Final findings from a phase II, placebo controlled, randomized discontinuation trial (RTD) of Sorafenib (BAY43-9006) in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol* 2005; 23(Pt I,Suppl): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 4544).
291. Ravindranath N, Wion D, Brachet P, et al. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001; 22: 432-43.
292. Reinmuth N, Fan F, Liu W, et al. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 2002; 82: 1377-89.
293. Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, et al. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am J Pathol* 1999; 155: 213-221.
294. Riese J, Schoolmann S, Beyer A, et al. Production of IL-6 and MCP-1 by the human peritoneum in vivo during major abdominal surgery. *Shock* 2000; 14(2): 91-4.
295. Rini BI. Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 453-461.
296. Rini BI. VEGF-Targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Oncologist* 2005; 10: 191-197.
297. Rini B, Rixe O, Bukovski R, et al. AG-013736, a multitarget tyrosine kinase receptor inhibitor, demonstrates antitumor activity in a phase 2 study of cytokine-refractory, metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(Pt I, Suppl): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 4509).
298. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(5): 1028-1043.

299. Rini BI, Sosman JA, Motzer RJ. Therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: biology, clinical results and future development. *BJU Int* 2005; 96: 286-290.
300. Rini BI, Wilding GT, Hudes G, et al. Axitinib (AG-013736;AG) in patients (pts) with metastatic renal cell cancer (RCC) refractory to sorafenib (abstrakt 5032). *J Clin Oncol* 2007; 25 (18S): 242s.
301. Rivera VM, Kreisberg JJ, Mita MM, et al. Pharmacodynamic study of skin biopsy specimens in patients (pts) with refractory or advanced malignancies following administration of AP23573, an mTOR inhibitor. *J Clin Oncol* 2005; 23(Pt I, Suppl): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 3033).
302. Rixe O, Meric J, Bloch J, et al. Surrogate markers of activity of AG-013736, a multitarget tyrosine kinase receptor inhibitor, in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(Pt I,Suppl): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 3003).
303. Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, et al. Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2006; 68(4): 303-10.
304. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst USA*, 1993; 85: 622-32.
305. Rowinsky EK, Schwarz GH, Gollob JA, et al. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3003-3015.
306. Rubin JB, Kung AL, Klejn RS, et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13513-8.
307. Rugo HS, Herbst RS, Liu G, et al. Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5474-5483.
308. Sack RA, Conradi L, Krumholz D, et al. Membrane array characterization of 80 chemokines, cytokines, and growth factors in open- and closed-eye tears: angiogenin and other defense system constituents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(4): 1228-38.
309. Saidi RF, Williams F, Ng J, et al. Interferon receptors and the caspase cascade regulate the antitumor effects of interferons on human pancreatic cancer cell lines. *Am J Surg* 2006; 191(3): 358-63.
310. Salceda S, Cam J. Hypoxia-inducible factor I (HIF-I) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
311. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-1135.
312. Sargent ER, Gomella EG, Belldegrun A, et al. Epidermal growth factor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma. *J Urol* 1989; 142: 1364-1368.

313. Sasaki H, Yukiue H, Kobayashi Y, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor levels in patients with thymic epithelial neoplasms. *Surg Today* 2001; 31: 1038-1040.
314. Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 874-879.
315. Savage PD, Muss HB. Renal cell cancer. In: De Vita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Biologic Therapy of Cancer* Second Ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1995; 373-387.
316. Scimone ML, Lutzky VP, Zittermann SI, et al. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 2005; 114: 375-385.
317. Sella A, Kilbourn RG, Gray I, et al. Phase I study of interleukin-2 combined with interferon-alpha and 5-fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer. *Cancer Biother* 1994; 9: 103-111.
318. Sella A, Zukowski A, Robinson E, et al. Interleukin-2 (IL-2) with interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) and 5-fluorouracil (5-FU) in patients (pts) with metastatic renal cell cancer (RCC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994: 237a.
319. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, et al. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13612-7.
320. Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, et al. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13791-6.
321. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.
322. Sheen-Chen SM, Eng HL, Chen WJ, et al. Serum level of angiogenin in breast cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4769-71.
323. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, et al. Mechanisms of neovascularization. *Lab Invest* 1984; 51(6): 624-34.
324. Shuin T, Yamazaki I, Tamura K, et al. Recent advances in ideas on the molecular pathology and clinical aspects of von Hippel-Lindau disease. *Int J Clin Oncol* 2004; 9: 283-287.
325. Schnurr M, Scholz Ch, Rothenfusser S, et al. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and  $\gamma\delta$  T cells. *Cancer Research* 2002; 62: 2347-2352.
326. Schöffski P, Dumez H, Clement P, et al. Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. *Annals of Oncol* 2006; 17: 1185-1196.
327. Schrami P, Struckmann K, Hatz F, et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002; 196: 186-193.
328. Schröder A, von der Ohe M, Kolling U, et al. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology* 2006; 119: 317-327.
329. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, et al. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140(1): 53-72.

330. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, et al. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42(6): 717-27.
331. Sica G, Iacopino F, Lama G, et al. Natural interferon-beta treatment and steroid hormone receptors in primary endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 50(2): 185-90.
332. Sido B, Teklote JR, Hartel M, et al. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18: 439-459.
333. Sin N, Meng L, Wang MQ, et al. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6099-103.
334. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, et al. Interferons alpha and beta downregulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4562.
335. Sistla A, Sunga A, Phung K, et al. Powder-in-bottle formulation of SU011248. Enabling rapid progression into human clinical trials. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 19-25.
336. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158(2): 735-743.
337. Smith DF, Galkina E, Ley K, et al. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *AJP-Heart Circ Physiol* 2005; 76: 1976-1984.
338. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med* 1994; 179: 1409-15.
339. Smith JW, Yo K-J, Dutcher J, et al. Update of a phase I study of intravenous CCI-779 given in combination with interferon-a to patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(Suppl): (2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), abstract 4513).
340. Smyth SS, Patterson C. Tiny dancers: the integrin-growth factor nexus in angiogenic signaling. *J Cell Biol* 2002; 158: 17-21.
341. Song KH, Song J, Jeong GB, et al. Vascular endothelial growth factor – its relation to neovascularization and their significance as prognostic factors in renal cell carcinoma. *Yonsei Med J* 2001; 42(5): 539-546.
342. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001; 158: 1279-88.
343. Soto H, Wang W, Strieter RM, et al. The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8205-8210.
344. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 2323-2333.
345. Stadler WM. RMJ: development of target-based anti-neoplastic agents. *Invest New Drugs* 2000; 18: 7-16.
346. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104(11): 2323-2333.
347. Sternberg CN. Pazopanib (GW 780604): phase 1 and clinical development. *First European International Kidney Cancer Symposium*; April 2006; Madrid.
348. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 1237-41.

349. Stolz J, Novák J. Léčba metastazujícího karcinomu ledviny. *Čs Urologie* 2004; 1: 25-28.
350. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, et al. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *T Leukoc Biol* 1995; 57: 752-62.
351. Stromblad S, Cheresch DA. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 462-7.
352. Strydom DJ. The angiogenin. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 811-824.
353. Stumm G, Eberwein S, Rostock-Wolf S, et al. Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasi. *Int J Cancer* 1996; 69: 17-22.
354. Suri C, McClain J, Thurston G, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998; 282: 468-71.
355. Suyama T, Furuya M, Nishiyama M, et al. Up-regulation of the interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-inducible chemokines IFN-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant and monokine induced by IFN- $\gamma$  and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103(2): 258-267.
356. Swann J, Crowe NY, Hayakawa Y, et al. Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 323-331.
357. Taberero J, Rojo F, Burris H, et al. Phase I study with tumor molecular pharmacodynamic (MPD) evaluation of dose and schedule of the oral mTOR-inhibitor Everolimus(RAD001) in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23(Pt I, Suppl): (2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, abstract 3007).
358. Takayashi Y, Bucana CD, Lu W, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1146-51.
359. Takayashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 72: 319-24.
360. Talač R, Žaloudík J, Pačovský Z, et al. Neovaskularizace u solidních nádorů. *Klin Onkol* 1995; 6: 165-167.
361. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin  $\alpha(v)\beta(3)$  in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 39562-8.
362. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. *Eur J Pharmacol* 2007; doi: 10.1016/j.ejphar.2007.10.049.
363. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GY. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1864-1874.
364. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-73.
365. Thomas J, Schiller J, Lee F, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 70a (abstract 274).
366. Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (membrane type-1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 41415-41423.
367. Toutirais O, Chartier P, Dubios D, et al. Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of

- immune escape in human ovaria carcinoma. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 246-255.
368. Tuma RS. Three molecularly targeted drugs tested in kidney cancer clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1270-1.
369. Uehara H, Troncoso P, Johnston D, et al. Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *Prostate* 2005; 64: 40-9.
370. Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, et al. SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem* 2000; 275: 5983-6.
371. van den Hove LE, van Gool SW, van Poppel H, et al. Identification of an enriched CD4+ CD8alpha++ CD8beta+ T-cell subset among tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 178.
372. Varney ML, Li A, Dave BJ, et al. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 723-31.
373. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-12.
374. Verstovsek S, Kantarjian H, Aguayo T, et al. Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2001; 114(2): 290-5.
375. Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 143-54.
376. Vogelzang NJ. Treatment options in metastatic renal carcinoma: an embarrassment of riches. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1-3.
377. Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, et al. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 326-32.
378. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14: 189-206.
379. Wagle DG, Scal DR. Renal cell carcinoma-a review of 256 cases. *J Surg Oncol* 1970; 2: 23-32.
380. Wajih N, Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood* 2003; 101: 1857-63.
381. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor I is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
382. Weber KL, Dpucet M, Price JE, et al. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res* 2003; 63: 2940-2947.
383. Wechsel HW, Bichler KH, Feil G, et al. Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res* 1999; 19: 1537-1540.
384. Wechsel HW, Feil G, Eichler KH, et al. Serologic angiogenesis factors and microvascular density in renal cell carcinoma: two independent parameters. *Anticancer Res* 2000; 20: 5117-5120.



385. Wei J, Sun Z, Chen Q, et al. Serum deprivation induced apoptosis in macrophage is mediated by autocrine secretion of type I IFNs. *Apoptosis* 2006; 11(4): 545-54.
386. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
387. Weidner U, Peter S, Strohmeier T, et al. Inverse relationship of epidermal growth factor receptor and Her/2neu gene expression in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 4504-4509.
388. Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, et al. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: Prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 245-253.
389. White ES, Flaherty KR, Carskadon S, et al. Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 853-60.
390. Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in clear cell renal carcinomas. *Cancer Research* 2001; 61: 5215-522.
391. Wieser R. The transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in tumorigenesis. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 70-77.
392. Wilhelm S, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum antitumor activity and targets RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.
393. Wilhelm S, Housley T, Rong H, et al. The novel Raf inhibitor BAY 43-90060 blocks signaling and proliferation in BRAF mutant and wildtype melanoma and colorectal tumor cell lines (abstract 106609). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2003; 44: 164.
394. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000; 60: 2178-89.
395. Wu FP, Sietses C, von Blomberg BM, et al. Systemic and peritoneal angiogenic response after laparoscopic or conventional colon resection in cancer patients: a prospective, randomized trial. *Dis Colon Rectum* 2003; 47(10): 1670-4.
396. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is a antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311-320.
397. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, et al. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003; 10: 220-227.
398. Yagi M, Kato S, Kobayashi Y, et al. Beneficial effects of a novel inhibitor of platelet-derived growth factor receptor autophosphorylation in the rat with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 765-773.
399. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.
400. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an antivascular endothelial growth factor antipody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 427-434.

401. Yang JC, Haworth L, Steinberg SM, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab (anti-VEGF antibody) demonstrating a prolongation in time to progression in patients with metastatic renal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 15 (abstract).
402. Yang TY, Chen SC, Leach MW, et al. Transgenic expression of the chemo-kine receptor encoded by human herpesvirus 8. induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2000; 191: 445-54.
403. Yao M, Shuin T, Misaki H, et al. Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 6753-6757.
404. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, et al. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1797-805.
405. Yim JH, Ro SH, Lowney JK, et al. The role of interferon regulatory factor-1 and interferon regulatory factor-2 in IFN-gamma growth inhibition of human breast carcinoma cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23(9): 501-11.
406. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, et al. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 447-454.
407. Yoshida K, Tosaka A, Takeuchi S, et al. Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 1913-1918.
408. Zacheval R, Urban M, Heráček J, et al. Současný pohled na metastazující karcinom ledviny z hlediska přežití v závislosti na druhu terapie. *Urologie pro praxi* 2003; 5: 190-192.
409. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203-13.
410. Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, et al. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002; 9: 509-514.
411. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, et al. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* 2002; 277: 49481-7.
412. 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.
413. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Imunity* 2000; 12: 121-7.
414. Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 181-5.

## 19. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

### Kapitoly v monografiích

1. Kopecký, O., Andrýs, C., Budayová, E., Drahošová, M., Havlasová, J., Krejsek, J., Lukešová, Š., Vokurková, D.: Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii. Garamon, s.r.o., Hradec Králové, 2004. ISBN 80-86472-17-5.

### Původní články a statě ve sbornících

1. Kopecký, O., Lukešová, Š., Hlávková, D., Slezák, R.: Diagnostické a léčebné možnosti klinické imunologie. *Folia Parodontologica Bohemica*, 2005; 1(0): 12-13.
2. Lukešová, Š., Krčmová, I., Kopecký, O.: Alergie na latex – dva kazuistické případy. *ČLČ*, 2005; 144(9): 641-643.
3. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Porovnání v zastoupení lymfocytárních populací u světlobuněčného karcinomu ledviny (v nádorové tkáni, renální žíle a periferní krvi). Edukační sborník. (XXX. Brněnské onkologické dny s XX. Konferencí pro sestry a laboranty, 11.-13.5.2006). Ed.: Žaloudík, J., et al., vyd. Masarykův onkol. ústav, Brno, 2006; 307-309. ISBN 80-86793-06-0.
4. Kopecký, O., Lukešová, Š., Horáček, J., Pařízková, R.: *Campylobacter* sepsis with multiple organ failure in IgG subclass deficiency. *Folia Microbiol.*, 2006; 51(6): 604-608. **IF 1,034**
5. Kopecký, O., Lukešová, Š., Koblížek, V., Vroblová, V., Novotný, J.: Pozdní komplikace chronických zánětů respiračního traktu u nemocných s běžnou variabilní imunodeficiencí. *Vnitřní lékařství*, 2006; 52(11): 1021-1029.
6. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Sledování protinádorové imunitní odpovědi u nemocných s renálním karcinomem. 60-64. Ed.: Abrahámová, J. In: *Vybrané otázky onkologie X*. Galen, Praha, 2006, 142 s. ISBN 80-7262-457-1.
7. Kopecký, 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 Hradec Králové*, 2007; 50(3):207-212.
8. Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Špriňar, Z., Hlávková, D.: IFN $\alpha$  v léčbě solidních nádorů (renálního karcinomu a melanomu). *Farmakoterapie*. 2007; 2: 167-176.
9. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Šafránek, H.: Sledování hladiny angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s renálním karcinomem. In: Edukační sborník z XXXI. Brněnských onkologických dnů s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, 23.-25.4.2007. Ed.: Žaloudík, J., et al., vyd. Masarykův onkologický ústav, Brno, 2007; 78-81. ISBN 978-9780-86793-09-2.
10. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Podhola, M., Vokurková, D., Šafránek, H.: Sledování hladin angiogeninu, ENA-78, GRO, IL-8 v séru nemocných a renálním karcinomem v průběhu léčby. In: Edukační sborník z XXXI. Brněnských onkologických dnů s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, 23.-25.4.2007. Ed.: Žaloudík, J., et al., vyd. Masarykův onkologický ústav, Brno, 2007; 81-83. ISBN 978-9780-86793-09-2.

11. Lukešová, Š., Vroblová, V., Hlávková, D., Kopecký, O., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Charakteristika a porovnání tumor-infiltrujících lymfocytů a periferních lymfocytů u pacientů s renálním karcinomem. *Vnitřní lékařství* 2008; 54(2): 139-145.
12. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Andrýs, 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.
13. Melichar, B., Fridrichová, P., Lukešová, Š., Mergancová, J., Urminská, H., Ryška, A., Foretová, L.: Pathological complete response after primary chemotherapy in a mother and daughter with hereditary breast carcinoma: two case reports. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(2):188-90. **IF 0,652**
14. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Alergie na latex. *Medicína po promoci* (v tisku).
15. Lukešová, Š., Kopecký, O., Horáček, J., Pařízková, E.: Imunodeficiencie a rozvoj autoimunitních onemocnění. *Medicína po promoci* (v tisku).
16. Lukešová, Š., Kopecký, 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.* (v tisku) **IF 0,351**

#### Přehledové články

1. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Bakteriální imunomodulátory. *Praktický lékař*, 2005; 85(8): 437-440.
2. Kopecký, O., Lukešová, Š.: Gene defects in common variable immunodeficiency. *International Journal of Immunogenetics* 2007; 34: 1-5. **IF 1.333**
3. Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Hlávková, D., Vroblová, V.: Nádorová angiogeneze. *Vnitřní lékařství*, 2006; 52(9): 797-800.
4. Lukešová, Š., Kopecký, O., Fridrichová, P., Hlávková, D.: Nádorové bujení – genetický základ a imunitní odpověď. *Medicína po promoci*, 2006; 7(6): 65-70.
5. Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Špriňar, Z., Hlávková, D.: Interferon alfa v léčbě metastazujícího renálního karcinomu. *Interní Medicína pro praxi*, 2006; 10: 432-438.
6. Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Morávek, P., Šafránek, H., Fridrichová, P., Hlávková, D.: Význam genetických mutací a podstata poruchy angiogeneze u světlobuněčného karcinomu ledviny. *Klinická onkologie*, 2006; 19(6): 290-292.
7. Lukešová, Š., Kopecký, O., Dvořák, J., Hlávková, D.: Angiogeneze u renálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi*. 2007; 1: 21-27.
8. Lukešová, Š., Kopecký, O., Hlávková, D., Vroblová, V.: Protinádorová imunitní odpověď. *Alergie* 2007; 3:241-244.

#### Abstrakta

1. Lukešová, Š., Ettlerová, K., Dostálová, J., Burešová, E.: Maligní melanom úspěšně léčený interferonem alfa. *Klinická imunologie a alergologie*, 1999; 3: 46-48.
2. Kopecký, O., Andrýs, C., Burešová, E., Ettlerová, K., Krejsek, J., Lukešová, Š., Vokurková, D.: Deficit produkce cytokinů u pacientů s CVID. *Abstrakt. Alergie*, 2002; 4(Supl.3): 78.

3. Kopecký, O., Krejsek, J., Lukešová, Š., Burešová, E.: Imunoterapeutické postupy u metastazujícího karcinomu ledviny a maligního melanomu. Abstrakt. *Alergie*, 2004; 6(Suppl;2): 44-45.
4. Lukešová, Š., Kopecký, O., Krejsek, J., Vobořil, Z., Melichar, B., Holík, J.: Využití rekombinantního interferonu  $\alpha$  k lokální léčbě metastázy karcinomu ledviny. Abstrakt. *Alergie*, 2004; 6(Suppl.2): 45.
5. Dvořák, J., Lukešová, Š., Veselý, P., Melichar, B., Petera, J., Doležel, M., Burešová, E., Kopecký, O., Šimková, M., Jandová, E.: Radiotherapy of brain metastases from cutaneous melanoma. 6<sup>th</sup> World Congress on Melanoma. Vancouver, Kanada, 6.-10.9.2005. Abstract book, Vancouver, 2005: 151.
6. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Charakteristika tumor-infiltrujících lymfocytů u pacientů s renálním karcinomem. Abstrakt. *Alergie*, 2006; 8(Suppl.2): 42-43.
7. Lukešová, Š., Kopecký, O., Morávek, P., Šafránek, H., Vroblová, V., Vokurková, D.: Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating and peripheral lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. Poster. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology – 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Paříž, 6.-9.9.2006. Book of abstracts, Paris, 2006: 586.
8. Kopecký, O., Lukešová, Š., Andrýs, C., Vokurková, D., Vroblová, V.: The reduction of circulating memory B cells in patients with common variable immunodeficiency is associated with significant decrease of serum IgG, IgM and natural antibodies production. Poster. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology – 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Paříž, 6.-9.9.2006. Book of abstracts, Paris, 2006: 343.
9. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Podhola, M., Vokurková, D., Šafránek, H.: Serum levels of CXC ELR+ chemokines in patients with renal cell carcinoma. Abstrakt. *Acta Medica Hradec Králové*, 2007; 50(1):72-73.
10. Lukešová, Š., Kopecký, 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**
11. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, 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**

#### Přednášky a postery

1. Lukešová, Š., Ettlrová, K., Dostálová, J., Burešová, E.: Maligní melanom úspěšně léčený interferonem alfa. Abstrakt. 16. Zjazd českých a slovenských alergológov a klinických imunológov, Nitra, 3.-6.10.1999.
2. Kopecký, O., Krejsek, J., Navrátilová, J., Toušková, M., Lukešová, Š., Burešová, E., Melichar, B.: Imunoterapie metastazujícího Grawitzova tumoru. Pracovní schůze ČSAKI na téma „Imunologie v onkologii“. Praha, 11.11.1999.
3. Krejsek, J., Kopecký, O., Ettlrová, K., Burešová, E., Lukešová, Š.: Běžná variabilní imunodeficience. IV. pediatrický kongres s mezinárodní účastí. Hradec Králové, 8.9.2000.

4. Kopecký, O., Lukešová, Š.: Imunoterapie nádorů ledvin. Seminář „Imunoterapie v urologii – základy, využití a klinické zkušenosti“. Hradec Králové, 22.10.2001.
5. Kopecký, O., Andrýs, C., Burešová, E., Ettlerová, K., Krejsek, J., Lukešová, Š., Vokurková, D.: Deficit produkce cytokinů u pacientů s COVID. XIX. Sjezd ČSAKI a SSAKI. Karlovy Vary, 9.-12.10.2002.
6. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Klinické nálezy u pacientů s protilátkovou imunodeficiencí diagnostikovanou v dospělosti. Seminář „Primární imunodeficience“. Hradec Králové, 21.11.2002.
7. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Výhody imunomodulace. Seminář pro praktické lékaře. Turnov, 3.9.2003.
8. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Výhody imunomodulace. Seminář pro praktické lékaře, pediatri a ORL. Jičín, 8.10.2003
9. Lukešová, Š.: Hypergamaglobulinémie. Seminář „Kazuistická sdělení z klinické praxe“. Hradec Králové, 29.1.2004.
10. Kopecký, O., Krejsek, J., Lukešová, Š.: Pozdní následky protilátkových imunodeficiencí. Tradiční regionální seminář. Hradec Králové, 23.9.2004.
11. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Výhody imunomodulace bakteriálními imunomodulancii. Regionální seminář pro praktické a dětské lékaře. Trutnov, 2.11.2004.
12. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Bakteriální imunomodulancia při recidivujících infektech horních cest dýchacích. Seminář pro praktické a ORL lékaře. Hradec Králové, 22.11.2004.
13. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Latexová alergie jako příčina anafylaxe. Seminář „Kazuistická sdělení z klinické praxe“. Hradec Králové, 20.1.2005.
14. Kopecký, O., Lukešová, Š., Hlávková, D., Slezák, R.: Diagnostické a léčebné možnosti klinické imunologie. Seminář České parodontologické společnosti a Stomatologické kliniky FN HK. Litomyšl, 13.-14.5.2005.
15. Dvořák, J., Lukešová, Š., Veselý, P., Melichar, B., Petera, J., Doležel, M., Burešová, E., Kopecký, O., Šimková, M., Jandová, E.: Radiotherapy of brain metastases from cutaneous melanoma. 6<sup>th</sup> World Congress on Melanoma. Vancouver, Kanada, 6.-10.9.2005.
16. Lukešová, Š., Kopecký, O., Horáček, J., Pařízková, R., Kolbabová, J.: Campylobacterová sepe při multiorgánovém autoimunním onemocnění. Seminář „Kazuistická sdělení z klinické praxe“, Hradec Králové, 26.1.2006.
17. Lukešová, Š., Imlaufová, J., Kopecký, O.: Anafylaktická reakce po prick testu na radiokontrastní látku. Seminář pro lékárníky FaF UK HK. Hradec Králové, 25.3.2006.
18. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Vakcinace. Seminář pro lékárníky FaF UK HK. Hradec Králové, 25.3.2006.
19. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Bakteriální imunomodulancia v klinické praxi. Seminář pro lékárníky FaF UK HK. Hradec Králové, 25.3.2006.
20. Kopecký, O., Lukešová, Š.: Alergická onemocnění, alergie po léčích a zásahy lékárníka při anafylaktických reakcích. Seminář pro lékárníky FaF UK HK. Hradec Králové, 25.3.2006.
21. Kopecký, O., Lukešová, Š.: Imunologické defekty, perorální vakcinace a nejčastěji indikované injekční vakcíny při imunodeficiencích. Seminář pro lékárníky FaF UK HK. Hradec Králové, 25.3.2006.
22. Lukešová, Š.: Bakteriální imunomodulancia. X. Diabetologický seminář. Lanškroun, 28.4.2006.
23. Lukešová, Š.: Očkování. X. Diabetologický seminář. Lanškroun, 28.4.2006.

24. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Porovnání v zastoupení lymfocytárních populací u světlobuněčného karcinomu ledviny (v nádorové tkáni, renální žíle a periferní krvi). XXX. Brněnské onkologické dny s XX. Konferencí pro sestry a laboranty. Brno, 11.5.-13.5.2006.
25. Lukešová, Š., Kopecký, O., Morávek, P., Šafránek, H., Vroblová, V., Vokurková, D.: Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating and peripheral lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. Poster. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology – 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Paříž, 6.-9.9.2006.
26. Kopecký, O., Lukešová, Š., Andrýs, C., Vokurková, D., Vroblová, V.: The reduction of circulating memory B cells in patients with common variable immunodeficiency is associated with significant decrease of serum IgG, IgM and natural antibodies production. Poster. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology – 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology. Paříž, 6.-9.9.2006.
27. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Vokurková, D., Morávek, P., Šafránek, H., Souček, P.: Charakteristika tumor-infiltrujících lymfocytů u pacientů s renálním karcinomem. XXIII. Sjezd ČSAKI a SSAKI a XI. kongres ČIS a SIS. Hradec Králové, 25.-28.10.2006.
28. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Morávek, P., Šafránek, H., Vokurková, D.: Sledování protinádorové imunitní odpovědi u nemocných s renálním karcinomem. Onkologická sympozia. Praha, 29.11.-1.12.2006.
29. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Úloha IFN $\alpha$  v léčbě melanomu. Konference plastických chirurgů. Hradec Králové, 6.12.2006.
30. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Podhola, M., Vokurková, D., Šafránek, H.: Serum levels of CXC ELR+ chemokines in patients with renal cell carcinoma. XI. Vědecká konference. Hradec Králové, 23.1.2007.
31. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Šafránek, H.: Sledování hladiny angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s renálním karcinomem. XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty. Brno, 23.-25.4.2007.
32. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, C., Morávek, P., Podhola, M., Vokurková, D., Šafránek, H.: Sledování hladin angiogeninu, ENA-78, GRO, IL-8 v séru nemocných a renálním karcinomem v průběhu léčby. XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, Brno, 23.-25.4.2007.
33. Lukešová, Š., Kopecký, 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. ECCO XIV. The European Cancer Conference. Barcelona, 23.-27.9.2007.
34. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Andrýs, 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. ECCO XIV. The European Cancer Conference. Barcelona, 23.-27.9.2007.
35. Kopecký, O., Lukešová, Š., Vroblová, V., Vokurková, D., Andrýs, C., Morávek, P., Podhola, M., Šafránek, H.: Compartmentalization of anti-tumour cell-mediated response in patients with renal cell carcinoma. Vědecká konference. Hradec Králové, 22.1.2008.
36. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vroblová, V., Andrýs, C., Hlávková, D., Morávek, P., Šafránek, H.: Sledování hladiny IL-8, PDGF a leptinu u nemocných s renálním karcinomem v průběhu chirurgické léčby. XXXII. Brněnské onkologické dny s XXII. Konferencí pro sestry a laboranty, 17.-19.4.2008