

**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**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program  
KLINICKÁ ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE**

**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**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program  
KLINICKÁ ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE**

**Hradec Králové  
2008**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorském studijním programu Klinická onkologie a radioterapie na Klinice onkologie a radioterapie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: MUDr. Šárka Lukešová  
Klinika onkologie a radioterapie  
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové  
a Fakultní nemocnice v Hradci Králové  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.  
Klinika onkologie a radioterapie  
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové  
a Fakultní nemocnice v Hradci Králové  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Oponenti: Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.  
Ústav radiobiologie a imunologie FVZ UO  
Třebešská 1575, 500 02 Hradec Králové

Doc. MUDr. Bohuslav Konopásek, CSc.  
Onkologická klinika 1.LF a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Disertační práce byla vypracována s podporou grantu výzkumného záměru IGA MZ ČR: NR/8914-4.

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

Prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském programu  
Klinická onkologie a radioterapie

## OBSAH

1. Úvod .....	4
2. Cíle práce .....	4
3. Soubor nemocných .....	4
4. Metoda .....	4
5. Statistické hodnocení dat .....	5
6. Výsledky .....	5
6.1. Tabulky .....	8
6.2. Grafy .....	13
7. Diskuze .....	25
8. Závěr .....	30
9. Souhrn .....	31
10. Summary .....	31
11. Použitá literatura .....	32
12. Přehled publikační aktivity .....	36
12.1. Kapitoly v monografiích .....	36
12.2. Původní články a statě ve sbornících .....	36
12.3. Přehledové články .....	37
12.4. Abstrakta .....	37
12.5. Přednášky a postery .....	38

## 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 (RCC) 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. 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 prováděna změnami hladin angiogenních faktorů v séru.
- 5) Stanovit možnost klinického využití vybraných markerů k hodnocení aktivity onemocnění.

## 3. SOUBOR NEMOCNÝCH

Světlobuněčný renální karcinom byl diagnostikován u 32 pacientů (11 žen a 21 mužů,  $\bar{X}$  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. stadium, 2 pacienti II. stadium 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,  $\bar{X}$  věk 56,3 roky medián (50,8 - 72,4) a 6 žen,  $\bar{X}$  věk 53,7 roků medián (47,9 - 69,8)

## 4. METODA

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.

Pro stanovení hladiny angiogenních faktorů byla použita metoda protein arrays firmy RayBiotech (USA), RayBio Human Angiogenesis Antibody Array I. Podstatou je nitrocelulózová membrána (Hybond, Amersham Biosciences) 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 (ENA)-78, basic fibroblast growth factor (bFGF), pan-gene related oncogene (pan-GRO), interferon (IFN) $\gamma$ , insulin-like growth factor (IGF)-1, interleukin (IL)-6, interleukin (IL)-8, leptin, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, placenta growth factor (PIGF), regulated upon activation normal T expressed and secreted (RANTES), transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2, thrombopoetin, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-D. Detekce uvedených proteinů byla provedena podle Use manual (revised May 28,2004) RayBio Human Cytokine Antibody Array ([www.raybiotech.com](http://www.raybiotech.com)) Po celou dobu analýzy, tj. navazování primárních a sekundárních biotinem konjugovaných protilátek, stejně tak jako promývání bylo prováděno v 8-mi komorových miskách. Použity byly originální blokující a promývací roztoky, biotinované sekundární protilátky a streptavidin konjugovaný peroxidázou. Po nanesení neředěných vzorků se analyzované proteiny navážou na membránu v místě příslušné specifické protilátky (spot). Po odstranění séra a trojím promytí byla aplikována směs protilátek proti měřeným proteinům značená biotinem. Vzniklé imunokomplexy fixované v oblasti příslušných spotů byly vizualizovány streptavidinem konjugovaným peroxidázou. Výsledkem je membrána s viditelnými skvrnami o různé intenzitě. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny hodnocené densitometricky. 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.

## 5. STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT

Ke statistickému porovnání naměřených hodnot bylo použito programu NCSS 2007, Statistica. Byla provedena analýza rozptylu s opakovanými měřeními s následným vícenásobným porovnáním pomocí Fischerova LSD testu. K porovnání byl použit dvouvýběrový t-test, případně neparametrický Mann-Whitney test, Kolmogorov-Smirnov test. Za statisticky významné jsou považovány výsledky, kdy  $p < 0,05$ .

## 6. 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. 1, 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. 2, 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. 3, 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. 4 a 5, 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. 6 a 7, 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. 8, 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.9, 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. 10, 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. 11, 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. 12 a 13, 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 operaci ( $p=0,035$ ) a 8.týden operaci ( $p<0,001$ ). 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. 14 a 15, graf č. 12 a, b, c).



anglogenin	tab.č.1				kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II					
vzorek	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.
před operaci									
7 dní po operaci	48,50 ± 5,36	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							

MCP-1	tab.č.2				kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II					
vzorek	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
před operaci									
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 ± 7,65	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							

RANTES	tab.č.3				kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II					
vzorek	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
před operaci									
7 dní po operaci	40,5 ± 7,44	42,66 ± 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		35,06 ± 3,25							

ENA-78	tab.č.4		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
	stadium I+II	stadium IV								
vzorek před operací	9,77 ± 3,34	14,25 ± 2,92	6,77 ± 3,28	p < 0,001	p = 0,012	p = 0,009	n.s.	n.s.	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	n.s.	n.s.	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 = 0,040	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola		3,19 ± 1,44								

GRO	tab.č.5		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
	stadium I+II	stadium IV								
vzorek před operací	23,96 ± 7,41	30,69 ± 5,44	25,54 ± 5,69	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,041	n.s.	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	n.s.	n.s.	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 = 0,004	n.s.	n.s.	p = 0,018	n.s.	n.s.
kontrola		9,53 ± 2,87								

IL-8	tab.č.6		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
	stadium I+II	stadium IV								
vzorek 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.	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.	n.s.
8 týdnů po operaci	1,96 ± 2,41	2,85 ± 2,03	1,63 ± 2,39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola		2,78 ± 2,24								

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

PDGF	tab.č.8		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
vzorek										
před operaci	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								

PDGF	tab.č.9		stadium III	stadium IV
vzorek				
před operaci				
versus 7. den po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
před operaci				
versus 8. týden po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,012
7. den versus 8. týden po operaci	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

IL-6	tab.č.10	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
vzorek										
před operaci		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							

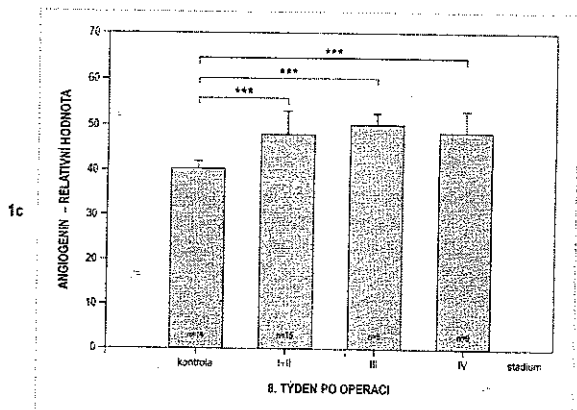
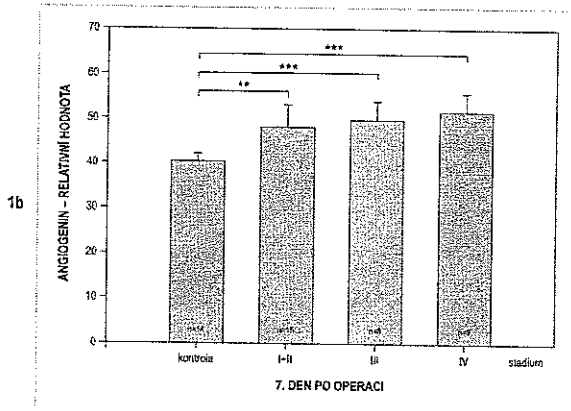
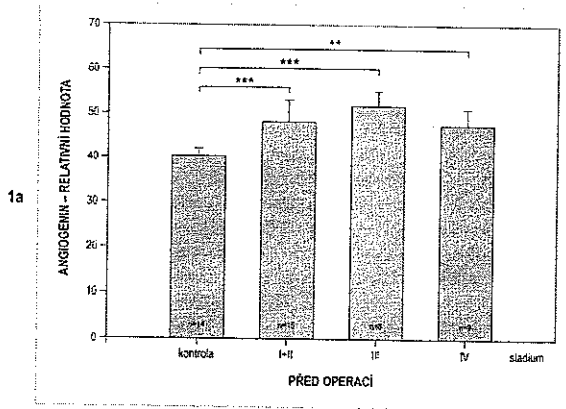
EGF	tab.č.11	stadium I+II	stadium III	stadium IV	kontrola v.s. I+II	kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
vzorek										
před operaci		40,60 ± 8,88	41,81 ± 6,25	35,66 ± 7,27	p = 0,044	p = 0,004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
7 dní po operaci		41,23 ± 12,32	37,75 ± 13,17	38,66 ± 14,23	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8 týdnů po operaci		38,36 ± 10,46	36,61 ± 6,43	33,25 ± 10,21	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
kontrola			34,11 ± 2,36							

TIMP-1	tab.č.12	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
vzorek										
před operaci		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							

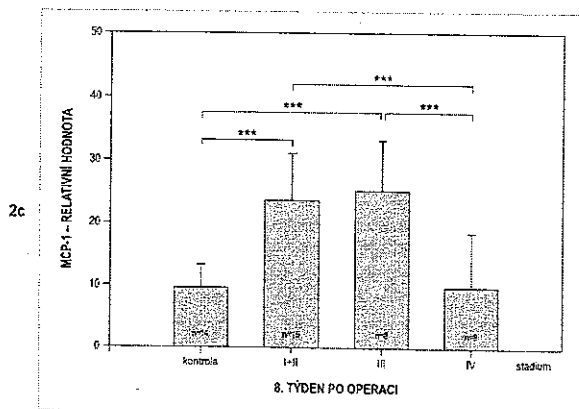
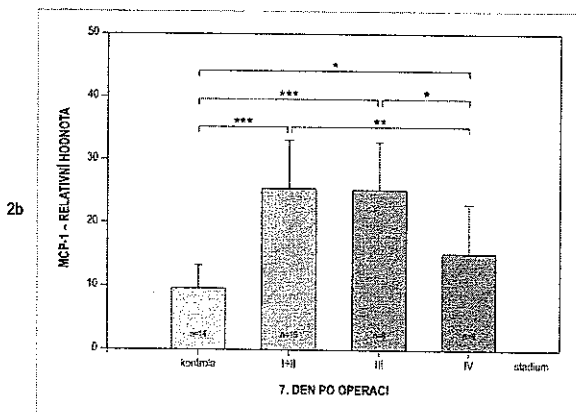
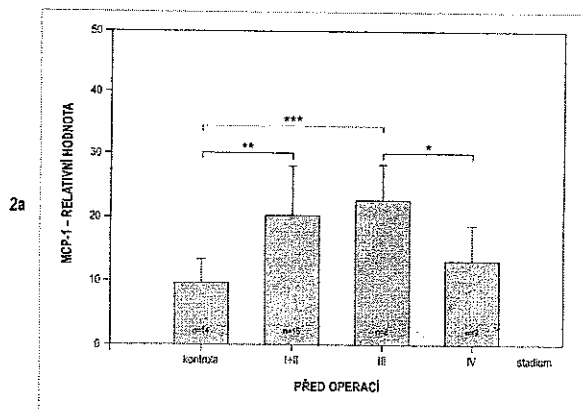
TIMP-2	tab.č.13		stadium III	stadium IV	kontrola v.s.		kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
	stadium I+II	kontrola v.s. III			kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV				
vzorek před operací	40,97 ± 10,36	41,44 ± 1,55	31,25 ± 7,83	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.	p = 0,020	n.s.	p = 0,040
7 dní po operaci	42,17 ± 6,68	41,00 ± 1,13	35,63 ± 7,84	p = 0,010	p<0,001	n.s.	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	n.s.	p = 0,019
kontrola		34,28 ± 3,18								

Leptin	tab.č.14		stadium III	stadium IV	kontrola v.s.		kontrola v.s. IV	I+II v.s. III	I+II v.s. IV	III v.s. IV
	stadium I+II	kontrola v.s. III			kontrola v.s. III	kontrola v.s. IV				
vzorek 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.	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.	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	n.s.	p<0,001
kontrola		23,81 ± 11,24								

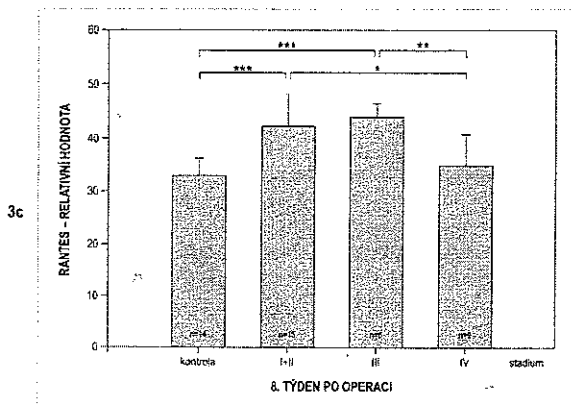
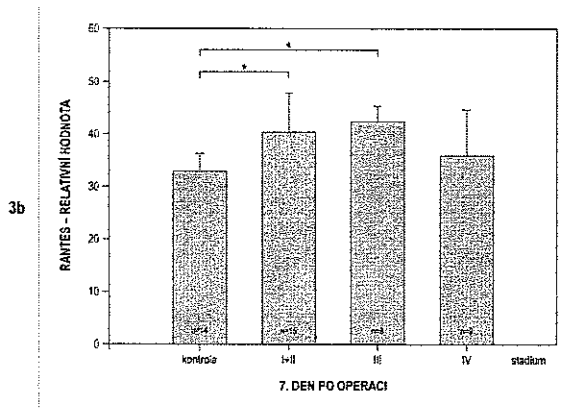
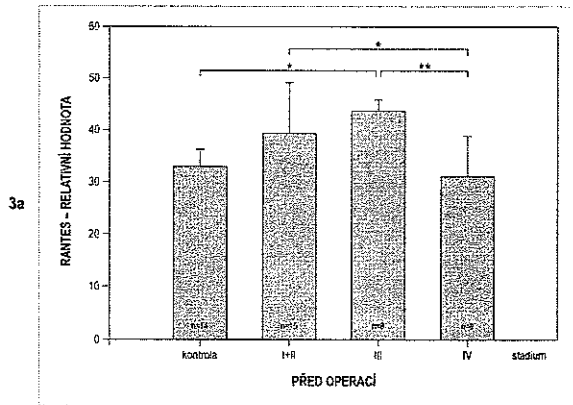
Graf 1 a, b, c: Sérové hladiny angiogeninu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



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

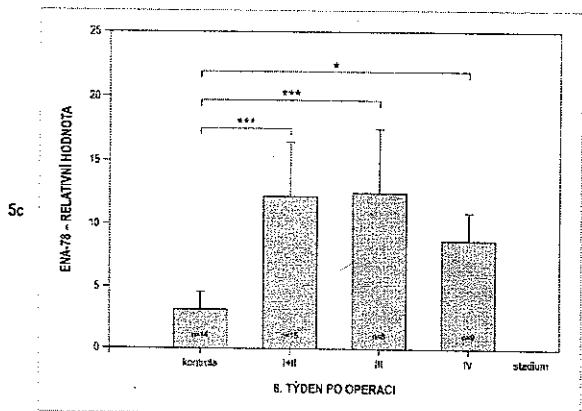
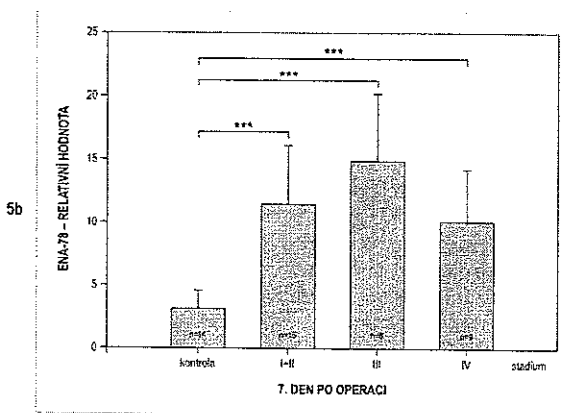
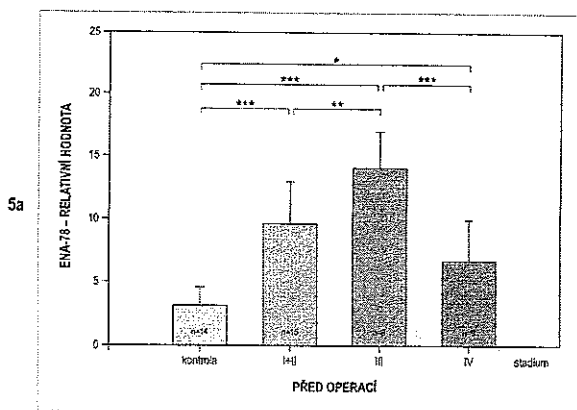


Graf 3 a, b, c: Sérové hladiny RANTES před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

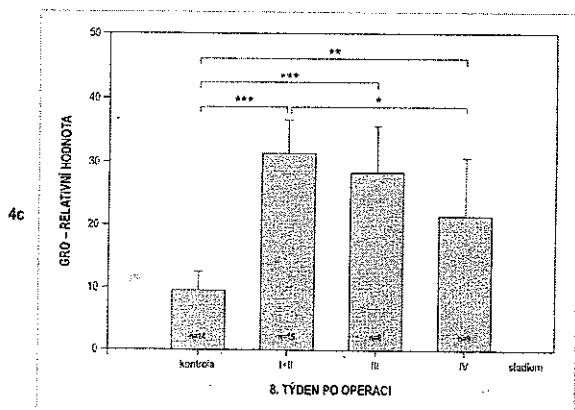
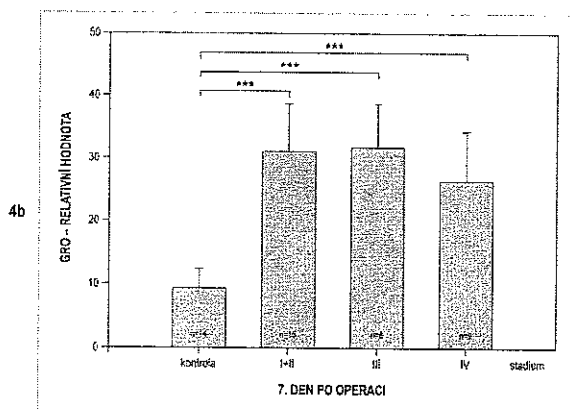
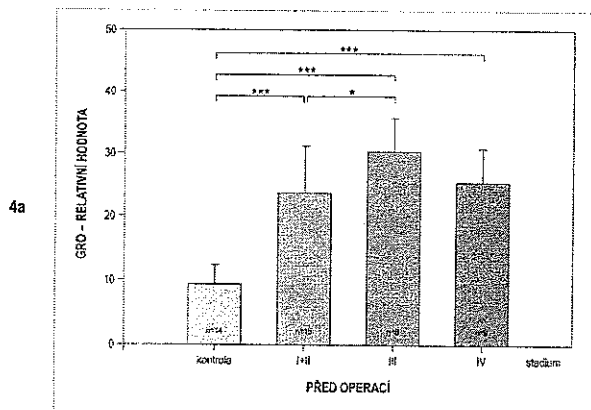




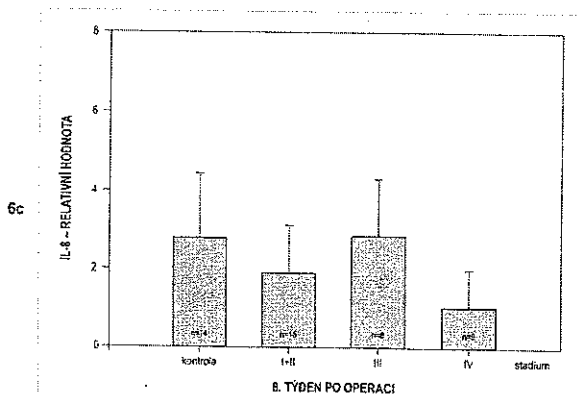
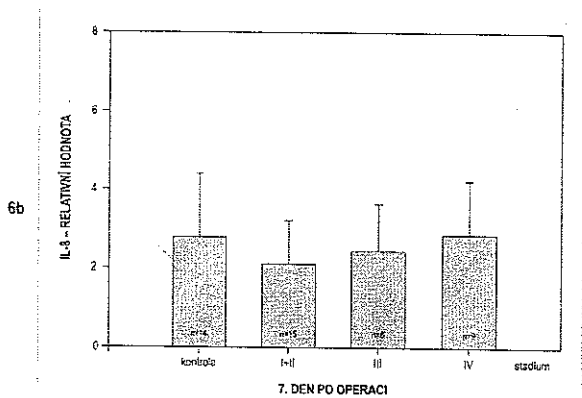
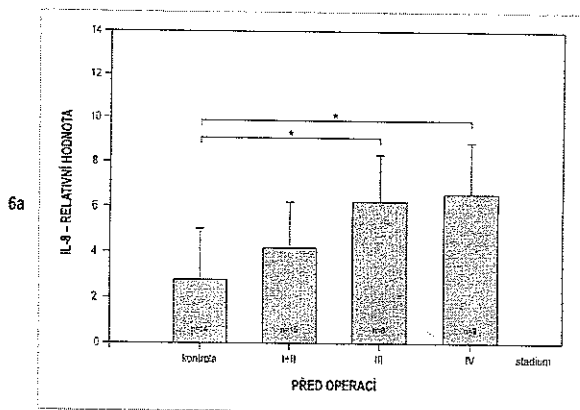
Graf 5 a, b, c: Sérové hladiny ENA-78 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



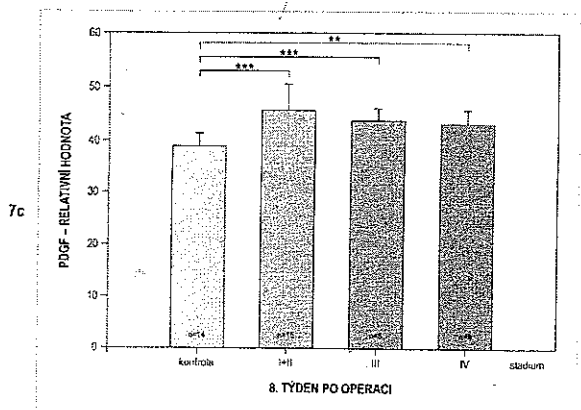
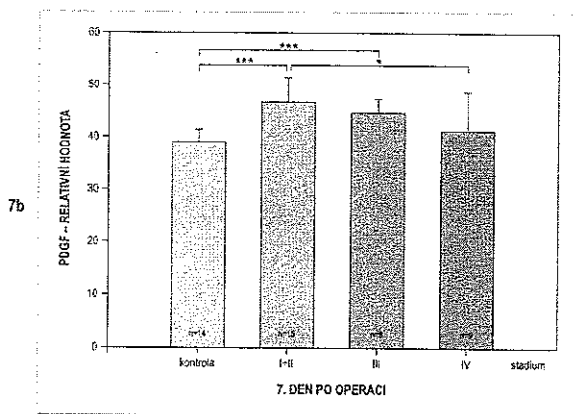
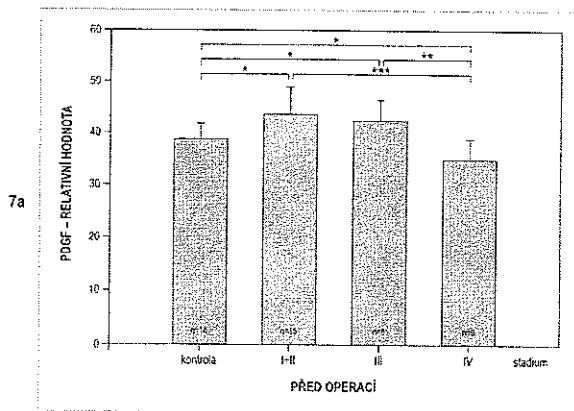
Graf 4 a, b, c: Sérové hladiny GRO před operací, 7 dni a 8 týdnů po operaci



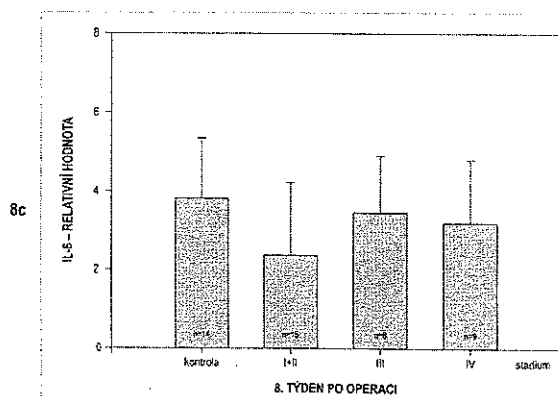
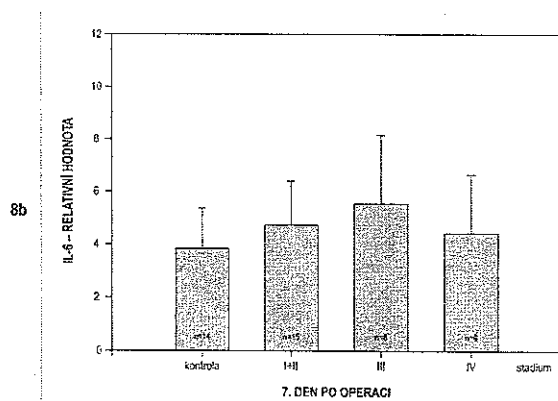
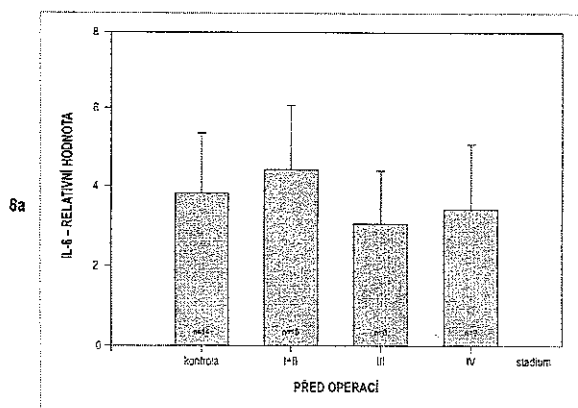
Graf 6 a, b, c: Sérové hladiny IL-8 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



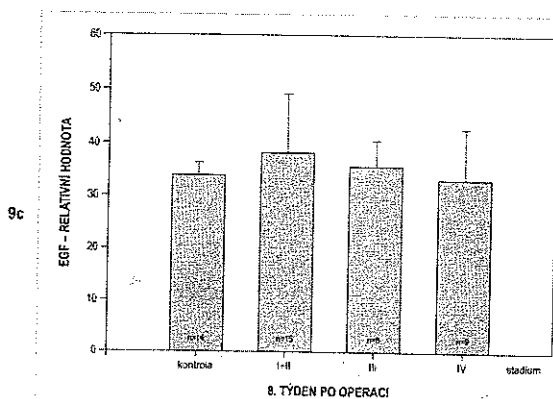
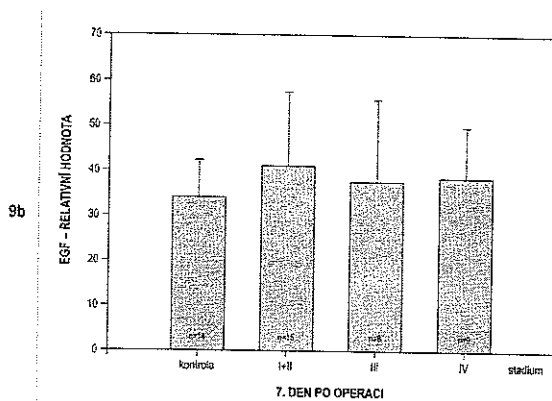
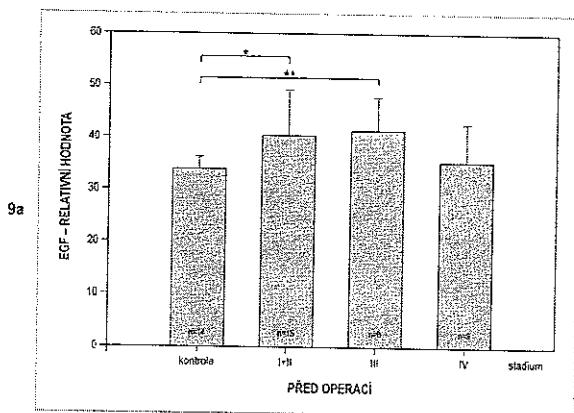
Graf 7 a, b, c: Sérové hladiny PDGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



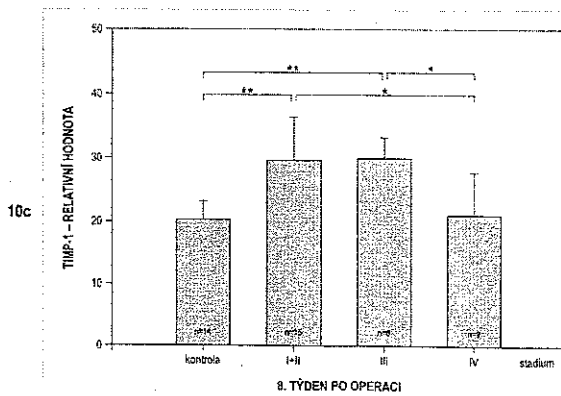
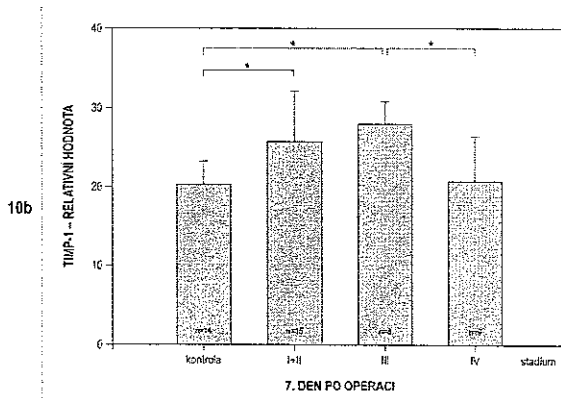
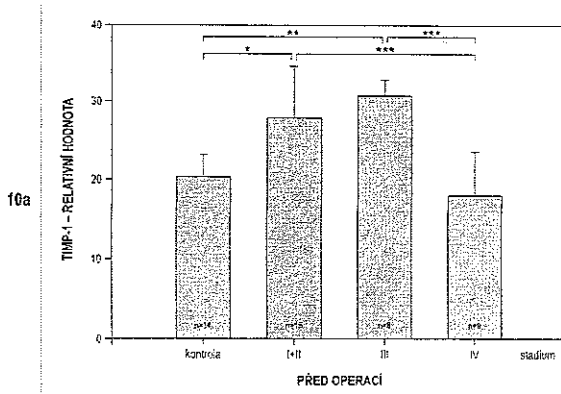
Graf 8 a, b, c: Sérové hladiny IL-6 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



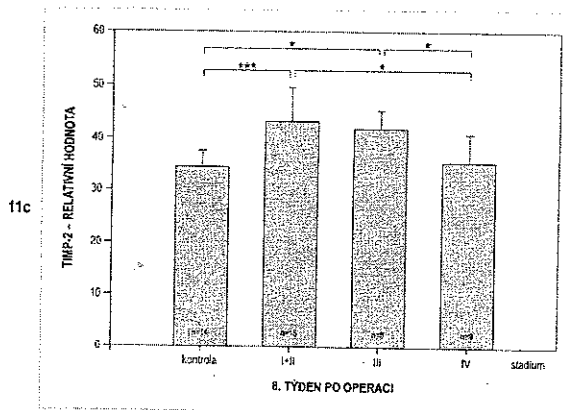
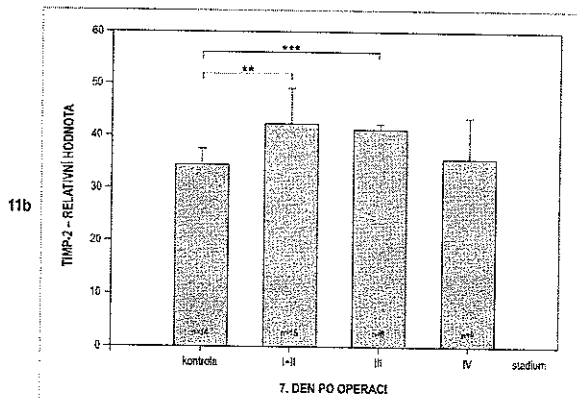
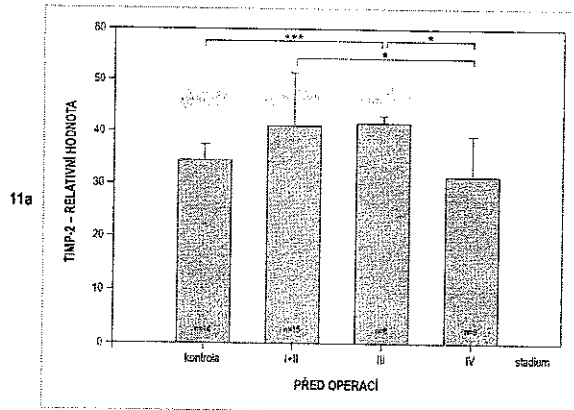
Graf 9 a, b, c: Sérové hladiny EGF před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



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



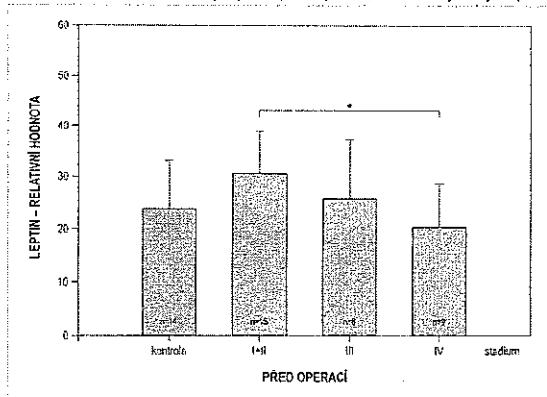
Graf 11 a, b, c: Sérové hladiny TIMP-2 před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci



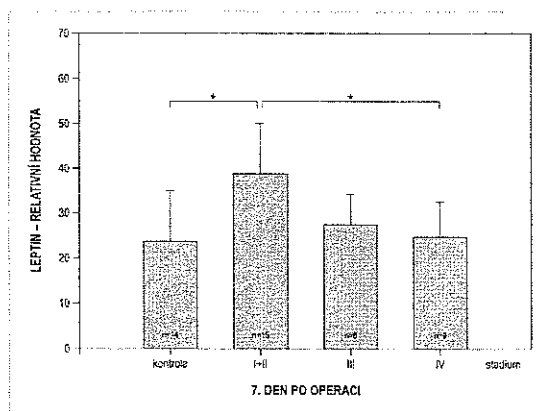


Graf 12 a, b, c: Sérové hladiny leptinu před operací, 7 dní a 8 týdnů po operaci

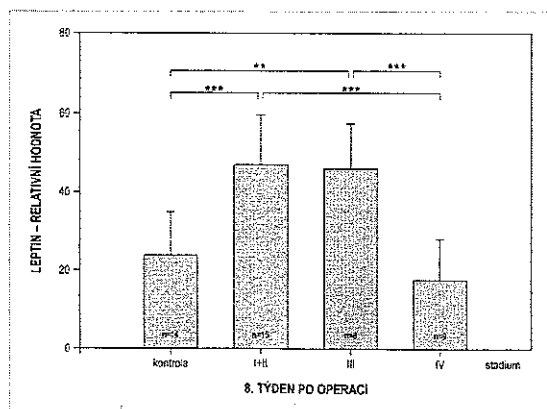
12a



12b



12c



## 7. DISKUZE

**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, intracelulární adhesion moleculule-1; VCAM-1, vascular adhesion moleculule-1). Angiogenin může být uvolňován nádorovými buňkami a má úzký vztah k růstu nádoru, jeho progresi a agresivnosti. U mnohých solidních nádorů byla nalezena zvýšená hladina angiogeninu, nemocní s vyšší hladinou angiogeninu měli horší prognózu. V některých případech dochází k poklesu hladiny angiogeninu u nádorů po léčbě a zvýšení při recidivě (39). Z tohoto důvodu by mohl být angiogenin užitečný při monitorování léčby nádorů a detekci recidivy nádoru. Tyto výsledky však nejsou jednoznačné. Například dvě studie týkající se karcinomu prsu vykazovaly opačné výsledky pokud jde o prognózu; zvýšená hladina angiogeninu byla spojena s dobrou prognózou v jedné studii (49) a špatnou prognózou ve studii druhé (11).

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. (52, 64). U našich nemocných byla hojení operačních ran nekomplikovaná a žádný z našich pacientů netrpěl chronickým zánětlivým onemocněním nebo endokrinopatií v době operace.

Pro nádorovou angiogenezi je charakteristická významná účast buněk přirozené imunity, makrofágů a dendritických buněk (51). 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 nádorů (14).

Zatímco produkce VEGF, angiogeninu, bFGF a PDGF se za hypoxických podmínek zvyšuje, v případě MCP-1 je tomu naopak (8, 14, 40). 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 (51). K hypoxii tkáni 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, ačkoli byly přítomny vzdálené metastázy a hodnoty angiogeninu přetrvávaly zvýšené. Zdá se, že ve fázi pokročilé choroby nízká hladina MCP-1 potvrzuje nedostatečné zapojení buněk monocytomakrofágové řady. Stimulace a správná funkce dendritických buněk a monocytomakrofágů je nezbytná pro účinnou protinádorovou cytotoxickou odpověď. Stav imunologické neodpovědi vůči nádorovým antigenům při poruše nespecifické buněčné imunity nejsou schopny prolomit ani v onkologické praxi používané imunomodulační postupy (28).

Do rodiny CC chemokinů je řazen i CCL5 (RANTES) asociovaný s T lymfocytární aktivací a odpovědí. CCL5 je podobně jako CCL2 (MCP-1) 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 (57). Studie sledující genovou expresi RANTES v normální a nádorové tkáni prokázaly signifikantně vyšší hladinu v nádorové tkáni (23, 46). 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 (32). 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 (24). 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 osmítýdenní 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.

Chemokiny je regulován vstup monocytů a lymfocytů do nádoru. 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) (35). 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 kapiolár (53). U nemocných s metastazujícím RCC byly nalezeny vyšší sérové hladiny CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8 v porovnání se zdravými dárči (35). Suyama a kol. našli u většiny pacientů s RCC zvýšenou expresi angiogenních cytokinů IL-8, ENA-78 a Gro- $\alpha$  (56).

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) (69). Touto stimulací dochází na membráně PMNL k zesílení exprese adhezivních molekul a jejich ligand na cévním endotelu (50). PMNL uvolňují velké množství enzymů štěpících mezibuněčnou hmotu (48). Záleží na dalších faktorech nádorového mikroprostředí, zda převládá protinádorová imunitní odpověď nebo angiogenní efekt. Pouhou přítomností dendritických buněk (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. (2003) a Riese (2000) (65, 45).

Operační výkony v břišní dutině byly bezprostředně po laparotomii prováděny vzestupem IL-1, IL-6, IL-8, G-CFS a MPC-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 (52). 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 resekcii 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 (64). U našich nemocných se diabetes ani jiné endokrinopatie nevykytovaly.

Přetrvávající zvýšení chemokinů v séru je též popisováno v průběhu hojení popálenin, zvláště v případech infekčních komplikací (2). Nikdo z našich nemocných netrpěl na chronické infekční onemocnění. Dlouhodobé zvýšení zánětových cytokinů, chemokinů a stresových hormonů pozoroval Kimura u nemocných s orgánovou dysfunkcí po parciálních resekcích jater (21). Zvýšení prozánětových cytokinů u pacientů s kolorektálním karcinómem bez metastáz pozorovala Kaminska ještě 6 týdnů po operaci (18). 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 (41). 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 možné i růstové aktivitě RCC.

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 (9, 31). 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 (10, 29, 42, 54).

Klatte a kol. pozorovali u skupiny 33 pacientů krátce po operaci sníženou hladinu PDGF v periferní krvi, v renální venózní krvi odebrané pooperačně byla hladina vyšší (22). 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 (7).

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 (58). 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 (30). V klinických studiích byla popsána zvýšená hladina IL-6 u pacientů s různými tumory (44). U renálního karcinomu je IL-6 příkladem autokrinní regulace; na buňky renálního karcinomu působí jako mitogen a současně vykazuje imunosupresivní efekt (1, 6, 34, 60). 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 (12). 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 rozdíl mezi jednotlivými stadii. Nízká úroveň aktivačních signálů provázející nádorový růst, délka jejich trvání a kompartmentalizace procesu jsou pravděpodobně zodpovědné za chybní 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 (66).

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 (3).

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 (47, 55, 62, 63, 67, 68).

Moch a kol. zjistili, že pacienti s EGFR-negativním tumorem měli lepší prognózu než pacienti s EGFR-positivním RCC, ale rozdíl nevykazoval statistickou významnost (38). 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.

Námi použitá metoda detekce solubilních faktorů nám umožnila stanovit též hladiny tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) -1 a TIMP-2. Matrix metaloproteinázy (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 pracích jsou nejednotné (4, 36).

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 (12). Kawata a kol. sledovali mimo jiné expresi TIMP-2 a MMP-9 u 120 pacientů s RCC imunohistochemicky na vzorcích nádorové tkáně a potvrdili jejich prognostický význam (19). 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 (37). 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 (25). Naproti tomu Lein a kol. našli zvýšení sérové hladiny MMP9 u RCC, ale nezjistili korelaci mezi typem nádoru, mitotickou aktivitou a stadiem choroby (27). 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 (17). Námi použitá celulózová 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 zvýšené 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 hydrolyzu 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 (59). 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 (58).

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 (61). 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 (15). 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 myšího renálního karcinomu. Zjistili, že leptin podporuje invazivitu myších renálních karcinomových buněk (16).

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 (44). 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. Nemocní IV. stadia měli váhový úbytek. 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.

## 8. 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 (5, 20, 26, 33, 43). 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, u nemocných stadia I. + II. 8. týden po operaci, u nemocných III. a IV. stadia již dokonce 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.

## 9. SOUHRN

Angiogeneze představuje základní krok v nádorové proliferaci, expanzi a metastazování. Renální karcinom (RCC) náleží mezi vysoce vaskularizované nádory. Dysbalance mezi angiogenními a antiangiogenními faktory a angiogenní „switch“ hrají významnou roli v patogenezi renálního karcinomu. Angiogeneze je regulována řadou angiogenních a antiangiogenních faktorů. Významným stimulem k sekreci mnoha angiogenních faktorů je hypoxie. U řady nádorů je hustota cévního zásobení známkou nepříznivé prognózy onemocnění a koreluje se zvýšenou agresivitou nádorového růstu a rizikem zakládání vzdálených metastáz.

Předkládaná práce vyhodnocuje na souboru 32 pacientů (a kontrolním souboru 14 zdravých dobrovolníků) sérové hladiny 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, stanovených metodou protein-array analýzy. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin dle stadia choroby (I+II, III a IV), skupiny statisticky porovnávány se skupinou zdravých dobrovolníků, navzájem a v čase.

Prokázali jsme zvýšené předoperační sérové hodnoty angiogeninu, ENA-78 a panGRO u nemocných všech stadií RCC oproti hodnotám naměřeným u zdravých osob. Angiogenní faktory PDGF, MCP-1, TIMP1, TIMP2 a RANTES a EGF byly zvýšeny u nemocných I+II. a III. stadia RCC. Sérové hladiny PDGF, RANTES, TIMP-1 a TIMP-2 u nemocných IV. stadia byly signifikantně nižší oproti nemocným I.+II. a III. stadia. Interleukin 6 nevykazoval u nemocných s RCC statisticky významné odchylky od kontrolního souboru a v průběhu sledování nebyly zjištěny signifikantní změny jeho hladin.

Zajímavými parametry, které jevíly statisticky signifikantně významné změny v průběhu sledování a korelovaly s odstraněním primárního tumoru, byly IL-8 a leptin.

Metoda protein-array analýzy umožňuje stanovit několik parametrů během jedné analýzy. Zdá se, že sérové hladiny některých angiogenních faktorů mohou odrážet stadium choroby.

## 10. SUMMARY

Angiogenesis represents an essential step in tumour proliferation, expansion, and metastasis. Renal cell carcinoma (RCC) is known to be a well-vascularized tumour. The angiogenic response, also known as the „angiogenic switch“, is initiated when the balance between the positive and the negative regulators of angiogenesis is disrupted in favor of the proangiogenic factors. Angiogenesis is regulated by numerous angiogenic and anti-angiogenic factors. Hypoxia is a crucial stimulus for angiogenesis. For many cancers, the extent of vascularisation is a negative prognostic indicator associated with aggressive cancer proliferation and increased risk of development of distant metastasis.

We identified serum levels of angiogenin, MCP-1, RANTES, GRO, ENA-78, IL-8, PDGF, IL-6, EGF, TIMP-1, TIMP-2 and leptin in serum of 32 patients with RCC, and 14 healthy volunteers by means of protein array analysis. The patients were divided into three groups according to their disease stages (I+II, III, and IV). We discovered significant differences between the donors and patients with RCC. The pre-operative levels of angiogenin, ENA-78 and panGRO were higher in patients of all stages of RCC. The other angiogenic factors such as PDGF, MCP-1, TIMP1, TIMP2, RANTES and EGF were significantly lower in patients with stage IV (with distant metastases) compared to patients with RCC stages I-III (without distant metastases).

IL-6 did not show any significant differences during the follow-up while IL-8 and leptin showed significant changes in serum levels during the study and correlated with tumour removal.

Multiplex protein array is a method which enables us to determine more than one parameter in one analysis. It seems that the serum levels of some angiogenic factors in patients with RCC can reflect the advanced stage of the disease.



## 11. POUŽITÁ LITERATURA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Brugarolas J. Renal cell carcinoma - molecular pathways and therapies. *N Engl J Med* 2007; 356(2): 185-187.
6. 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.
7. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
8. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
9. 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.
10. 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.
11. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently devolve high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3129-36.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Kallakury BVS, Karikhalli 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 Cancer Research* 2001; 7: 3113-3119.

18. 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.
19. 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.
20. Kim WY, Kaelin WG Jr. Molecular pathways in renal cell carcinoma-rationale for targeted treatment. *Semin Oncol* 2006; 33(5): 588-95.
21. 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.
22. Klatte 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Larkin JM, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60(3): 216-26.
27. 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.
28. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66: 605-612.
29. Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology. *Radiation Oncol* 2007; 2(5): 1-9.
30. Lin E, Calvado SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127: 117-126.
31. 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.
32. Luboshits G, Shina S, Kaplan O. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 4681-4687.
33. Mellado B, Gascon P. Molecular biology of renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2006; 8(10): 706-10.
34. 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.
35. Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, et al. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 175: 5351-5357.

36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, et al. Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications. *Eur J Haematol* 2004; 72: 416-19.
40. 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.
41. 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.
42. Ostman A, Heldin CH. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. *Adv Cancer Res* 2001; 80: 1-38.
43. Patel PH, Chagani RSK, Motzer RJ. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 614-619.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Scimone ML, Lutzky VP, Zittermann SI, et al. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 2005; 114: 375-385.
49. Sheen-Chen SM, Eng HL, Chen WJ, et al. Serum level of angiogenin in breast cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4769-71.
50. 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.
51. 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.
52. Sido B, Teklote JR, Hartel M, et al. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18: 439-459.
53. 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.

54. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104(11): 2323-2333.
55. 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.
56. 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.
57. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, et al. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96(6): 317-322.
58. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. *Eur J Pharmacol* 2007; doi: 10.1016/j.ejphar.2007.10.049.
59. 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.
60. 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.
61. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, parane, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14: 189-206.
62. 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.
63. Weidner U, Peter S, Strohmeyer 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.
64. 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.
65. 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.
66. Xing Z, Gaudie 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.
67. 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.
68. Yoshida K, Tosaka A, Takeuchi S, et al. Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 1913-1918.
69. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* 2006; 107: 317-327.

## 12. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

### 12.1. 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.

### 12.2. 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., Krémová, 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 světlouňčného 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 s 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 karcinómem. *Vnitřní lékařství* 2008; 54(2): 139-145.

12. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vrobllová, V., Andrýs, C., Hlávková, D., Morávek, P., Šafránek, H.: Sledování hladiny IL-8, PDGF a leptinu u nemocných s renálním karcinómem 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., Urmínská, 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.: Imunodeficiency a rozvoj autoimunitních onemocnění. *Medicína po promoci* (v tisku).
16. Lukešová, Š., Kopecký, O., Vrobllová, V., Hlávková, D., Andrýs, C., Morávek, P., Šafránek, H.: Serum levels of angiogenin, PDGF and MCP-1 after surgery renal cell carcinoma. *Folia biologica.* (v tisku) **IF 0,351**

### 12.3. 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., Vrobllová, 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., Vrobllová, V.: Protinádorová imunitní odpověď. *Alergie* 2007; 3:241-244.

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

## 12.5. Přednášky a posterý

1. Lukešová, Š., Ettlerová, 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., Ettlerová, 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., Krejssek, 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, pediatriy a ORL. Jičín, 8.10.2003
9. Lukešová, Š.: Hypergamaglobulinémie. Seminář „Kazuistická sdělení z klinické praxe“. Hradec Králové, 29.1.2004.
10. Kopecký, O., Krejssek, J., Lukešová, Š.: Pozdní následky protilátkových imunodeficiencí. Tradiční regionální seminář. Hradec Králové, 23.9.2004.
11. Lukešová, Š., Kopecký, O.: Výhody imunomodulace bakteriálními imunomodulacii. 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 vakciny 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