

Univerzita Karlova  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Monitoring sérových hladin vaskulárního endotelového růstového faktoru, interferonu alfa-2b, matrixmetaloproteinázy 8 a jejich prognostická hodnota pro pacienty s maligním melanomem podstupující léčbu vysokodávkovaným interferonem

Jarmila Prošvicová  
Autoreferát disertační práce  
Doktorský studijní program: Klinická onkologie a radioterapie

Hradec Králové

2018

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a následně kombinovaného studia doktorského studijního programu Klinické onkologie a radioterapie na Ústavu klinické onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Jarmila Prošvicová (roz. Vaňásková), Oddělení klinické onkologie, Oblastní nemocnice Náchod

Školitel: Prof. MUDr. Stanislav Filip, Ph.D, FN a UK Hradec Králové, Klinika onkologie a radioterapie

Oponenti: Prim. MUDr. Ivana Krajsová, Ph.D, Kožní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice Praha

Prim. MUDr. Igor Kiss, Ph.D, Masarykův onkologický ústav, Brno

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení Lékařské fakulty v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38; tel. 495 816 131.

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby dne 7.12.2018

v posluchárně 3. patro Kliniky onkologie a radioterapie FN Hradec Králové od 13 hod.

.....

prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Klinická onkologie a radioterapie

Garant studijního programu

## Obsah

1. Souhrn .....	4
2. Summary .....	5
3. Úvod do problematiky .....	6
4. Cíle disertační práce.....	12
5. Materiál a metodiky .....	13
6. Výsledky .....	15
7. Diskuze .....	21
8. Závěr .....	23
9. Použitá literatura .....	24
10. Přehled publikační činnosti .....	27

## 1. Souhrn

**Úvod** Maligní melanom (MM) je nádorové onemocnění, jehož incidence celosvětově vzrůstá. Řadí se mezi imunogenní a angiogenní nádory. Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), interferony (IFN) a matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou přirozeně se vyskytující působky v lidském těle, které hrají významnou roli jak na poli imunosuprese/stimulace, tak na poli angiogeneze. V poslední době se věnuje zvýšená pozornost komplexnímu propojení procesů angiogeneze a imunomodulace. MM má vysokou mortalitu, která závisí na časnosti zachytu. Oploštění křivek mortality se v rozvinutých zemích v posledních letech dosahuje díky časně diagnostice, všeobecné bdělosti ke kožním lézím, důrazu na primární a sekundární prevenci, ale také díky příchodu nových potentních léků. Základem léčby MM, je-li včas zachycen, je chirurgická léčba. Ta však je bezpečná a dostatečná pouze pokud nádor nedosáhl angiogenního switch a vertikálního růstu. U MM s tloušťkou dle Breslow větší než 1mm nelze s jistotou vyloučit potenciál k metastazování. Rovněž u MM s povrchovou ulcerací či mikrometastázami v uzlinách. Pacienty po resekci MM stadia IIB, IIC, III a IV dle AJCC hodnotíme jako vysoce rizikové. Mají riziko rekurence MM a úmrtí na něj 35-40%. Lokoregionální rekurence po úvodní chirurgické léčbě má prognózu ještě horší. Jsou to klinická stadia, kde je vhodná adjuvantní pooperační zajišťovací onkologická léčba. V případě MM je stále otázkou, jaká adjuvantní léčba je správná.

**Cíl** Naším cílem v této práci bylo zhodnotit antiangiogenní potenciál interferonu alfa-2b ve vysokodávkovaném nitrožilním podání (HDI) a poodkrýt tak komplexnost a provázanost procesů angiogeneze a imunomodulace. Stanovovány byly hladiny sérového VEGF, MMP-8 a IFN před a ke konci HDI u vysoce rizikových pacientů po resekci MM. Hodnoceny byly i klinické výstupy pacientů.

**Materiál a metody** Metodou ELISA byly v prospektivním sledování měřeny sérové hladiny VEGF, MMP-8 a IFN od 29 vysoce rizikových pacientů po resekci MM podstupujících HDI. Vzorky pro měření byly odebírány před zahájením a při ukončení HDI.

**Výsledky** Pro větší přehlednost výsledků jsme pacienty rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvořili pacienti, u nichž došlo k poklesu VEGF během HDI. Je to 66% pacientů, u kterých došlo k dlouhodobé kompletní remisi (CR). Průměrná hodnota sérového VEGF poklesla v této skupině pacientů z 779,4 pg/ml na 446,2 pg/ml. Toto snížení je statisticky signifikantní. V druhé skupině pacientů (34%) nedošlo k poklesu VEGF po podání HDI a tito pacienti neměli klinický benefit z léčby. Průměrná hodnota VEGF byla 408 pg/ml před a 500 pg/ml po léčbě. Výsledky s MMP-8 jsou ambivalentní. IFN prochází příliš rychlým metabolismem na to, aby léčba se mohla řídit monitorací jeho hladin.

**Závěr** Nespecifická imunoterapie IFN snižuje angiogenezi. Naše výsledky jsou v souladu se současným trendem ve výzkumu angiogeneze jakožto imunomodulačního/supresního činitele. Nespecifická imunoterapie IFN interferuje s imunosupresním působením angiogeneze, a to jak přímo, tak i nepřímo. Podporuje rozvoj protinádorové imunitní odpovědi. Interference HDI s procesy aktivace angiogeneze a nádorové progresy může vysvětlovat dobré klinické výstupy pacientů, u kterých při HDI došlo k poklesu VEGF. Výsledky s MMP-8 jsou ambivalentní. Role MMP-8 zůstává nejasná a v našem pozorování nenaplnuje funkci tumor supresoru.

## 2. Summary

**Background** Incidence of malignant melanoma (MM) is rising worldwide. This tumour is immunogenic and angiogenic. Vascular endothelial growth factor (VEGF), interferons and matrix metalloproteinases (MMPs) are natural agents with important role both in immunosuppression/stimulation, and angiogenesis. Interestingly, evidence is currently emerging that activation of angiogenesis leads to immunosuppression both at the local and systemic levels. These are very complex and interconnected processes. Mortality of MM is high and depends very much on early detection. Plateau phase on mortality curves we've seen recently in developed countries thanks to early diagnosis, public awareness of skin pigment lesions, emphasis on primary and secondary prevention, and also thanks to new potent drugs. Cornerstone of treatment in MM is surgery, if the tumour is diagnosed early. We can find surgery sufficient and safe only if the tumour hasn't reached angiogenic switch and vertical growing yet. We cannot exclude trend to create metastasis in tumours with Breslow more than 1mm. The same we can say about ulcerated tumours or nodal metastasis. Patients after surgery for MM stage IIB, IIC and III according to AJCC are thought to be high risk. Their risk of recurrence and death is 35-40%. Loco-regional recurrence after previous surgery has prognosis even worse. These are clinical the stages in which adjuvant oncologic treatment is found to be appropriate. The question is what is the right choice of adjuvant treatment.

**Aim** In this study, our aim was to establish interferon alpha-2b as an anti-angiogenic agent and show the complexity of angiogenesis and immunomodulation through the serum levels of VEGF and MMP-8 in high-risk resected MM before and after adjuvant therapy with high-dose interferon alpha-2b (HDI). Clinical outcomes of patients were also evaluated.

**Material and methods** We prospectively measured serum levels of VEGF and MMP-8 by ELISA in 29 patients with high-risk resected MM receiving adjuvant HDI. Blood samples were collected before and within one week after the end of the treatment.

**Results** To see the results clearly, we divided patients into two groups. The first group of patients, whose VEGF serum level decreased after HDI (66%), showed long-term complete remission. The mean VEGF serum level in these patients decreased from 779.4 pg/ml to 446.2 pg/ml. This downward trend in VEGF was statistically significant. The second group of patients who did not show a decrease in VEGF serum level after HDI (34%) and they had no clinical benefit from the treatment. The mean VEGF serum levels in second group was 408 pg/ml before the treatment and 500 pg/ml after HDI. Results for MMP-8 were ambivalent. Metabolism of interferons is too fast to be administrated according to measured levels.

**Conclusion** Non-specific immunotherapy HDI reduces angiogenesis. Our results are in line with the current research view of complexity of angiogenesis and immunomodulation/suppression. Non-specific immunotherapy HDI disrupts the immunosuppressive effect of angiogenesis on development of immune response against tumours and supports antitumour response in both direct and indirect way. The interference of HDI with activation of angiogenesis and tumour progression can explain good clinical outcomes of patients with decrease in serum VEGF. The outcomes of MMP-8 are inconclusive, its role remains unclear, and MMP-8 does not seem to work as tumour suppressor.

### 3. Úvod do problematiky

MM vychází z maligní proliferace melanocytů. Je nejzávažnější formou kožního nádoru a je to jedna z nejfatálnějších malignit postihujících mladé dospělé. Vzniká buď malignizací již přítomného melanocytárního névu, nebo častěji *de novo*. Tak jako u většiny typů nádorů, současná medicína vnímá etiologii a patogenezu MM jako souhru genotypu, fenotypu a vlivů zevního prostředí. MM tvoří velmi frekventně neoepitopy. Je to nádor s vysokým mutačním loadem a je považován za velmi imunogenní (popisované jsou i spontánní regrese), což tvoří dobrý předpoklad pro příznivý efekt imunoterapie (Srivastava, 2015). Při vývoji nádorového onemocnění není důležitá jen klonální expanze nádorových buněk, ale také přítomnost a spolupráce buněk okolního (mikro)prostředí (buňky imunitního systému, fibroblasty, endoteliální buňky, solubilní faktory a ECM). Nádor je komplexní tkáň (Hanahan, Weinberg, 2000, 2010). Je to v podstatě orgán, ve kterém najdeme stroma s cévními komponentami, podpůrnou mezenchymální tkání, ECM jakožto určitým transportním rezervoárem pro růstové faktory, a samotné nádorové buňky, tvořící parenchym. Nádorové stroma je aktivním spoluhráčem. Ve stromatu probíhají změny, které zahrnují aktivaci angiogeneze aberantní expresi růstových faktorů, změny v kompozici ECM, zvýšenou aktivitu proteáz, přítomnost inflamatorních buněk aj.

#### Charakteristiky MM s prognostickým významem:

1) *Tloušťka nádoru dle Breslowa*

2) *Hloubka invaze dle Clarka*

3) *Ulcerace*

4) *Sentinelová uzlina a zhodnocení kontaktu s buňkami imunitního systému*

5) *Mitotická aktivita*

6) *Změna radiálního růstu na vertikální („angiogenní switch“)*

Stratifikace rizikovosti nádoru dle AJCC dělí pacienty do stadií I-IV dle histopatologické charakteristiky primárního tumoru, stavu regionální lymfatické soustavy a ne/přítomnosti vzdálených metastáz. Jako vysoce rizikový hodnotíme melanom stadia IIB, IIC a III. V těchto stadiích také adjuvantní léčba prokázala maximální benefit ve smyslu zlepšeného přežívání, a je proto v těchto stadiích indikována, jelikož se jedná o pacienty s rizikem rekurence přes 30% (30% u stadia IIB, u stadia IIIC je to až 60%) (Thalanayar et al, 2014).

#### Léčba

Základem léčby MM, je-li včas zachycen, je chirurgická léčba. Ta však je bezpečná a dostatečná pouze pokud nádor nedosáhl angiogenního switch a vertikálního růstu. U MM s Breslow více než 1 mm nelze s jistotou vyloučit potenciál k metastazování. Rovněž tak u MM s povrchovou ulcerací či mikrometastázami v uzlinách. Vysoce riziková pacienta stadia IIB, IIC, III mají riziko rekurence a úmrtí 35-40%. Fáze lokoregionální rekurence po úvodní chirurgické léčbě má prognózu ještě horší. Ve stadiu IIIA je pětileté přežívání 70 %, zatímco ve stadiu IIIC 39% (Balch et al, 2009). Úspěšná adjuvantní léčba může změnit průběh choroby, podchytit časné diseminované nádorové buňky či reziduální mikrometastázy, a prodloužit tak RFS a OS.

## Adjuvantní léčba MM

Adjuvantní terapie si klade za cíl eradikaci mikrometastáz. K adjuvantní léčbě jsou indikováni pacienti stadia IIb, IIIa a IIIb (s tloušťkou dle Breslowa > 2 mm, úrovní invaze dle Clarka > III, s přítomností in-transitních metastáz - regionální metastázy v kůži lokalizované od 2 cm od primárního ložiska do první drénující uzliny), tj. pT3N0M0 (1,5-4mm), pT4NOMO, s pozitivní sentinelovou uzlinou nebo pTxN1-2M0 s klinicky zjevnými metastázami do uzlin, s rekurencí do uzlin nebo s postiženými uzlinami a neznámým primárním ložiskem (Balch et al, 2009).

V adjuvantní léčbě MM byla zkoušena imunoterapie (nespecifické cytokiny, specifické protilátky, vakcíny a kombinovaná schémata), chemoterapie, biochemoterapie, radioterapie a malé molekuly mutačních inhibitorů.

NCCTG a ECOG studie E1684 byla první randomizované studie, která hledala přínos adjuvantní léčby interferony pro pacienty s odoperovaným vysoce rizikovým melanomem. Tento trial užil vysokodávkovaného režimu interferonů (dále jen HDI) podávaného intravenózně 20 MIU/m<sup>2</sup> 5 po sobě jdoucích dní po 4 týdny – jakožto indukční fázi, následovanou subkutánním podáváním 10 MU/m<sup>2</sup> třikrát týdně, po dobu 48 týdnů – jakožto udržovací fázi – “Kirkwoodovo schéma”. Byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v RFS a OS ve prospěch HDI ve srovnání s observačním ramenem; 5-ti letý RFS 37% vs. 26%; 5-ti letý OS 46% a 37%; medián OS byl 3,82 vs. 2,78 roku (P = 0,0237); HR = 0,67 (P = 0,01). Největší dopad na celkové přežívání byl popsán u pacientů s postižením uzlin (Kirkwood et al, 1996; Kirkwood et al 2001). Tato studie vedla ke schválení HDI FDA v Americe v roce 1995.

Mnoho dalších studií zkoumalo interferony v jiném dávkování. Tyto studie se nedají úplně dobře srovnávat - nalezneme v nich značné rozdílnosti vstupních kritérií, dávkových schémat, časování a délky podávání interferonů. Vyskytují se i crossovery, které však v původní Kirkwoodově studii nebyly. Parametr trvání léčby se jeví důležitější než dávka. Byly prokázány lepší klinické výsledky pacientů, kteří podstoupili udržovací léčbu, a to v parametru RFS i OS. Meta-analýzy potvrdily, že není důvodu odchylovat se od původního ročního Kirkwoodova schématu (Eigentler et al, 2016; Mocellin et al, 2010). V roce 2008 Ascierto a Kirkwood potvrdili statisticky signifikantní benefit IFN na OS, který se promítá do absolutního benefitu alespoň 3% (1-5%) v 5 letech.

## Růst MM, angiogeneze a paradoxní fungování imunitního systému

Růst nádoru se velmi podobá tkáňovému poškození a reakce imunitního systému (dále jen IS) na něj je stejná. Jedná se o komplexní reakci, ve které jsou zavzaty mj. neutrofilů a makrofágů. Ty mají remodelační schopnosti, díky matrixmetaloproteinázám a angiogenním působkům (VEGF, TGF, PDGF), které produkují. Těmito působky jsou aktivovány fibroblasty a ty syntetizují nové ECM. Z nádoru se uvolňují složky, které působí nejen lokálně, v místě růstu nádoru, ale systémově. Reprogramují kostní dřeň a vedou k expanzi myelopoézy (De Vita, Cancer 9<sup>th</sup>, 2001). Dochází k leukocytóze neutrofilů, ale také k zvýšenému uvolňování nezralých granulocytárních progenitorů z kostní dřeně. Ty se kumulují v cirkulaci i nádorovém mikroprostředí. Tam nedojde k jejich správné a plné aktivaci k zabíjení nádorových buněk, ale naopak získají paradoxní funkce (Qian et al, 2009). Podporují progresi nádoru, stimulují angiogenezi a remodelaci stromatu.

Při růstu většího objemu nádorové masy dochází v určitých lokalitách k hypoxii. Hypoxie je hnacím motorem angiogeneze. Vznik transkripčního faktoru HIF (hypoxia inducible factor) je

důsledkem adaptace tkáně hypoxii. Hypoxie je zásadní faktor mikroprostředí, který stimuluje rozvoj adaptačních mechanismů, které umožní nádorovým buňkám přežít. Zahrnují: **alteraci metabolismu, pH regulaci** (Peppicelli et al, 2013), **epitelo-mezenchymální tranzici, angiogenezi, migraci/invazivitu, sníženou odpověď imunitním buňkám a rezistenci k chemoterapii a radioterapii**. Hypoxie dále vede k infiltraci **myeloidních supresorů** z kostní dřevě (**MDSCs**), **T regulačních lymfocytů (Tregs)** a **makrofágů asociovaných s nádorem (TAMs)**, a také stimuluje expresi **PD-L1** na nádorových buňkách. Hypoxie v mikroprostředí představuje faktor, který podmiňuje výhodu pro nádorové buňky a legalizuje jejich genotyp, neb dědičný fenotyp může být získán epigenetickými mechanismy. Transkripční faktor HIF svým působením může ovlivnit stabilitu genomu (Eischen et al, 2016; Branca et al, 2016).

Hypoxie indukuje tvorbu **VEGF** nádorovými buňkami, stromálními buňkami i normálními somatickými buňkami. Vysoké hladiny VEGF korelují s úrovní hypoxie v nádoru a oba parametry významně přetváří mikroprostředí nádoru. To má imunosupresivní důsledek nejen lokálně, ale i ve vzdálených místech, jako je kostní dřevě. Hypoxie významně přispívá k heterogenitě uvnitř nádoru (McDonald et al, 2016). Navázání VEGF na VEGFR-2 spouští signalizační kaskádu, ve které jsou zahrnuty procesy proliferace, migrace a přežívání endotelií, a zvýšená cévní permeabilita.

Angiogeneze je komplexní proces. VEGF je považován za zásadní přímo působící proangiogenní faktor, ale neméně významnou roli představují mechanismy a komunikační systémy nezávislé na VEGF – fibroblasty (CAFs, FGF-2), PDGF, ligandy rodiny Delta/Jagged (Delta 1-like ligand 4) navazující se na Notch receptor, signální systém angiopoetinů, proteolytické systémy v ECM (MMPs, plasminogen a aktivátory plasminogenu), integriny, adhezní molekuly (kadheriny) aj. Monocyty/makrofágy a polymorfonukleáry hrají významnou roli v angiogenezi, a to zejména pro svou produkci angiogenních faktorů, jako IL-8 a VEGF. Vcestovalé zánětlivé buňky mohou v nádorovém mikroprostředí působit protichůdně – ve většině nádorových lezí jsme schopni detekovat buňky imunitního systému, které s nádorem bojují, i ty, které jeho růst podporují (Bussard et al, 2016).

Imunitní dysfunkci v nádorovém mikroprostředí zapříčiňují tři hlavní činitelé – **MDSCs, Tregs a TAMs**. MDSCs působí imunosupresně jak vůči T buňkám, tak vůči NK buňkám. Hypoxie a HIF-1 $\alpha$  se podílí na rozšíření imunosupresního arzenálu MDSCs. TAMs představují největší populaci stromálních buněk v rostoucím nádoru. Jsou to buňky disponující vysokým stupněm plasticity fenotypu. Mohou se polarizovat klasicky - aktivovaný M1 tumoricidní fenotyp či alternativně - M2 imunosupresní fenotyp. Bylo popsáno snížení hladin cirkulujících Tregs po podání HDI (Mozillo et al, 2012).

Působení VEGF-A nasměruje nezralé imunitní buňky v jejich diferenciaci směrem k Treg, a zároveň přímo indukuje proliferaci Tregů . A z druhé strany, Tregy dokáží přímo podporovat angiogenezi. Hypoxie v nádoru láká Tregy prostřednictvím upregulace CCL28, což je následně provázeno růstem nádoru. Dráha VEGF signalizace moduluje mikroprostředí nádoru a ovlivňuje i expresi chemokinů a infiltraci lymfocyty (Reinmuth et al, 2015).

VEGF stimuluje endotelové nádorové buňky (TECs) zpětně tzv. *autokrinní VEGF-A řízenou kličkou*. Vytváří pozitivní zpětnou vazbu prostřednictvím aktivace VEGFR na nádorových buňkách. Proto je VEGF-A považován za primární, přímo-působící proangiogenní růstový faktor, který podporuje růst a invazivitu MM. Existuje také přímá VEGF suprese TNF- $\alpha$ -indukované genové exprese prostřednictvím negativního zkříženého mechanismu s NF- $\kappa$ B-signalní cestou. Díky ní dochází k časnému poklesu exprese IFN regulačního faktoru 1 (IRF-1) (Huang et al, 2015).



Pacienti s nádorovým onemocněním mají znatelně vyšší sérové hladiny VEGF než zdraví jedinci (Kwon et al, 2010). Vysoká exprese VEGF ve tkáních i vysoká hladina v séru je spojena se špatnou prognózou pacientů (Brychtova et al, 2008). Exprese VEGF vzrůstá s rostoucí agresivitou onemocnění. Je vyšší u metastazujících nádorů v porovnání s nemetastazujícími (Demirkesen et al, 2006). VEGFR-3/Flt-4 exprese korelovala s léčebnou odpovědí a jeho vyšší hladina byla nalezena u pacientů s velkou tumorovou náloží a u pacientů neodpovídajících na léčbu. Isoformy a receptory VEGF zahrnuté v lymfangiogenezi hrají také důležitou roli v osudu pacienta (Mouawad et al, 2009). Fontanini prospektivně hodnotil výpovědní hodnotu VEGF jakožto prognostického indikátoru angiogeneze ve vztahu k celkovému přežívání (Fontanini et al, 1997).

VEGF jakožto markeru angiogeneze ve vztahu k progresi a metastazování MM se věnovala 2 obsáhlá review (Basu et al, 2009; Streit et al, 2003). Zdůraznily především význam lymfangiogeneze spojené s nádorem jakožto cesty šíření nádorových buněk do lymfatických uzlin, a její implikaci do prognózy a léčby MM.

Hladina VEGF v séru (v panelu dalších cytokinů a růstových faktorů) může sloužit jako užitečný biomarker časné diagnózy, prognózy a také monitorace onemocnění v čase a odpovědi na terapii. Yurkovetsky, Kirkwood a kol. ve své práci zaznamenali hladiny VEGF u zdravé kontroly v průměru 76,6 pg/ml (34,9-151,5), ale u pacientů s MM 215,0 pg/ml (192,1-783,1). V jejich sledování terapie HDI dosahuje poklesu hladin VEGF (Yurkovetsky et al, 2007).

### **Posun v imunitní odpovědi navozený antiangiogenními preparáty**

V poslední době se stále více hovoří o imunomodulačních vlastnostech antiangiogenních preparátů, o odstranění “imunosupresivního mikroprostředí” díky antiangiogenní léčbě. Antiangiogenní preparáty mají potenciál modulovat nádorové mikroprostředí a zlepšit tak účinnost imunoterapie. Snižují množství imunosupresivních buněk (nezralých DCs, MDSCs a Tregů), které jsou schopny zabránit rozvoji efektivní imunitní reakce. Normalizují cévy, čímž umožňují homogenní distribuci léčiva nádorem, jeho lepší prostoupení T buňkami, snížení hypoxie a polarizaci TAMs směrem k M1, elevaci CXCL9 exprese na M1-TAMs, což dále podporuje infiltraci T-buňkami. Cílení VEGF snižuje také hladiny Tregů díky inhibici akumulace MDSCs a nezralých dendritických buněk v nádorovém mikroprostředí, anebo přímo inhibicí dráhy VEGF/VEGFR. Antiangiogenní molekuly mají vliv i na konvenční T lymfocyty (procentuální zvýšení CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-buněk intratumorálně). Blokáda VEGF-A/VEGFR2 při adoptivním transferu zlepšuje infiltraci adoptovaných T ly do nádoru a jeho regresi (Biswas et al, 2010; Yuhui, Jianping et al, 2012; Barbay et al, 2015). Protilátky anti-VEGF i mutační inhibitory signifikantně zlepšují zránění DC a redukuje množství MDSCs (Corzo et al, 2010).

### **Interferony**

Protinádorové působení IFN- $\alpha$  jde v zásadě třemi cestami: **přímé působení** na nádorové buňky, **nepřímé protinádorové působení**, ve smyslu **imunomodulace** a **antiangiogenní působení** (které však v širším kontextu patří do imunomodulačních mechanismů).

Interferony představují důležité komunikační spojení mezi přirozenou a adaptivní imunitou, a v tom tkví jejich imunomodulační funkce. Jsou tak možná tím kýženým mostem k potenciaci vrozené imunity, kterou současné moderní imunoterapeutické postupy neumí aktivovat. IFN $\alpha$ 2b významně ovlivňuje hostitelskou imunitní odpověď a expresi nádorových antigenů.

IFN- $\alpha$  redukuje expresi FGF2 a transkripci VEGF genu, čímž inhibuje tumorovou angiogenezi (Fuertes et al, 2011).

Obsazením IFN receptoru a fosforylací STAT1 a STAT2 vzniká komplex interferonem stimulovaných genů a genových faktorů (ISGs) a interferonem regulovaný transkripční faktor, který aktivuje transkripci ISGs a dochází k inhibici VEGF (Tarhini, 2015). Zde se na genové úrovni potkává přímé supresní působení VEGF s působením interferonů.

IFN přitahují Th1 do oblasti nádoru, snižují Tregy, mění hladiny cytokinů v cirkulaci i nádorovém mikroprostředí (Mozillo et al, 2012). Interferony typu I, včetně rodiny leukocytárních IFN- $\alpha$  a fibroblastových IFN- $\beta$ , jsou známy svým imunomodulačním protivirovým působením i antiproliferativní a antiangiogenní aktivitou (Bender et al, 2016). Na jaterních metastázách kolorektálního karcinomu byl prokázán přímý antiangiogenní vliv lidského rekombinantního IFN- $\alpha$ 2a a IFN- $\beta$  na endotelie ve smyslu inhibice jejich motility, migrace, organizace struktury kapilár, přežívání; dále inhibice bFGF, IL-8 a matrix metaloproteinázy, tedy působků zahrnutých v angiogenezi (Ozawa et al, 2001). Interferon alfa-2b výrazně inhibuje VEGF a bFGF (Raig et al, 2008).

Účinnost interferonů v adjuvantní léčbě MM byla hodnocena mj. čtyřmi velkými multicentrickými randomizovanými ECOG a Intergroup studiemi (E1684, E1690, E1694, E2696), kterých se od roku 1980 zúčastnilo více než 20 000 pacientů (E1684 n=5287; E1690 n=5642; E1694 n=5880). Ve všech prokázal interferon snížení rizika rekurence onemocnění (z 38 % na 24 %), avšak dlouhodobý efekt na RFS a OS je popisován pouze u vysokodávkovaného podání E1684, E1690 a E1694 pro vysoce rizikové pacienty s resekováním MM stadia IIB a III. Tento efekt je připisován jak jeho působení imunomodulačnímu a indukujícímu diferenciaci, tak antiproliferačnímu, proapoptotickému a antiangiogennímu. IFN-alfa podporuje nádorovou imunogenicitu, polarizaci a maturaci DC a tím jejich odpověď vůči nádoru a antigenní prezentaci. Podporuje posun k Th1 typu hostitelské imunitní odpovědi (nezralé myeloidní buňky v přítomnosti interferonu alfa polarizují spíše Th1 směrem). Dochází k povzbuzení i přirozené imunity. Byla pozorována zvýšená intratumorální akumulace CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, která stimuluje specifickou CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď vůči antigenům nádoru (Davar, Kirkwood, 2016).

Meta-analýzy adjuvantních studií prokázaly, že z HDI profituje 7% pacientů, které neumíme přesně dopředu definovat, ale zdá se, že nejvíce profitují pacienti s mikrometastázami v SN (IIIa) a pacienti s ulcerovaným primárním nádorem. Ač názory na vysokodávkovaný režim se různí, data konzistentně potvrzují prodloužení doby do relapsu onemocnění a Wheatleyho meta-analýza popisuje i mírný benefit pro OS, konkrétně 3-5% zvýšení 5-letého přežívání (Mocellin et al, 2010; Wheatley et al, 2003).

## **MMPs**

MMPs jsou na kalcium závislé endopeptidázy obsahující zinek, které se podílí na rozkládání extracelulární matrix (ECM) a to ve fyziologických i patologických dějích. Jsou to enzymy schopné degradovat všechny typy proteinů ECM. Také jsou schopny zpracovávat řadu bioaktivních molekul - štěpí receptory na buněčných površích, či uvolňují apoptotické ligandy. Spoluhrají také v procesech inaktivace cytokinů/chemokinů. Angiogenní faktory mohou indukovat expresi MMPs. MMPs pak najdeme v membránových vakuolách. Angiogenní stimul v podobě bFGF a VEGF způsobí uvolnění z těchto vakuol. Popisuje se rovněž jejich účast v procesech buněčné proliferace, migrace, diferenciaci a angiogeneze. Role a fungování MMP je zřejmě dána celkovým nastavením nádorového mikroprostředí. Dynamické změny v aktivitě matrixmetaloproteináz v průběhu invaze melanomových buněk mohou být zásadní. Umožňují

nádorovým buňkám modifikovat extracelulární matrix. Remodelace ECM kolagenolytickými enzymy je potřebná pro invazi a novotvorbu cév (Stetler-Stevenson et al, 1999).

U MMP-8 se hovoří o protinádorovém a imunoregulačním účinku. Rozsáhlá genomická analýza odhalila, že geny kódující MMP jsou u nádorů mutované, či epigeneticky tlumené. Zvýšená hladina MMP byla řadou autorů asociována se špatnou prognózou (Korpi et al, 2011; Kohrmann et al, 2009).

Prognostický význam hladin MMP-8 hodnotila práce Lempinen s pacienty s hepatocelulárním karcinomem, kdy nízké hladiny MMP-8 korelovali s delším celkovým přežíváním (Lempinen et al, 2013). V práci Väyrynen stanovovali hladinu MMP-8 u pacientů s kolorektálním karcinomem a dle jejich výsledků MMP-8 má protinádorové působení, které se projevuje ovlivněním imunitní odpovědi vedoucí k nekróze nádorové tkáně (Väyrynen et al, 2012). Vihinen et al. stanovovali hladinu MMP-8 a její výpovědní hodnotu ve smyslu predikce odpovědi na adjuvantní léčbu interferonem u pacientů operovaných pro vysoce rizikový kožní melanom stadia IIB-IIIC. V séru 460 pacientů před začátkem adjuvantní léčby stanovovali hladinu MMP-8, a prokázali, že ve skupině, která měla vysoké předléčebné hladiny MMP-8 adjuvantní léčba signifikantně prodloužila RFS.

Léčebné strategie cílící angiogenezi se rovněž zaměřují na MMPs, které jsou pod vlivem angiogenních stimulů (zejména bFGF a VEGF) produkovány buňkami endotelu a remodelují extracelulární matrix. Výsledky těchto prací jsou však rozporuplné, jelikož některé MMPs, jako právě např. MMP8, byly identifikovány jako tumor supresor.

Role MMP v angiogenezi je pravděpodobně komplexnější než jen remodelace ECM. MMPs mohou aktivně procesu angiogeneze napomáhat oddělováním pericytů, uvolňováním proangiogenních faktorů sekvestrovaných v ECM, zpracováváním některých povrchových receptorů, integrinů a štěpením adhezních spojů buněk endotelií. MMPs zahrnuté v procesu angiogeneze mohou vznikat v buňkách imunitních, nádorových, stromálních i v endoteliích (Rundhaug et al, 2005).

#### 4. Cíle disertační práce

- Cíle:
- 1) Stanovit antiangiogenní potenciál IFN- $\alpha$ -2b: prokázat pokles hladiny VEGF-A po léčbě vysokodávkovaným interferonem alfa-2b, a popsat terapeutickou signifikanci tohoto poklesu. Podotázkou v této oblasti je, zda lze říci, že hladiny určité VEGF predikují terapeutickou odpověď na léčbu HDI?
  - 2) Popsat změny hladin MMP 8 po léčbě vysokodávkovaným interferonem alfa-2b, a terapeutickou signifikanci těchto změn.
  - 3) Monitorovat dosažené hladiny interferonu alfa-2b – podotázkou této oblasti je, zda by se léčba, tedy i dávkové schéma dalo řídit dosahovanými sérovými hladinami a předejít tak eventuálně rozvoji některých nežádoucích účinků či naopak poddávkování.

## 5. Materiál a metodiky

### Charakteristika souboru pacientů

V období mezi lednem 2010 a lednem 2014 byla studována skupina 29 pacientů, kteří podstoupili adjuvantní léčbu MM HDI na Klinice onkologie a radioterapie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Soubor byl tvořen 16 muži a 13 ženami ve věkovém rozmezí 26 – 72 let (průměr 56,6 roku). Byli to pacienti indikováni ke standardní adjuvantní léčbě HDI s MM stadia IIb, IIIa a IIIb, pacienti s rekurencí do uzlin nebo s postiženými uzlinami a neznámým primárním ložiskem.

### Podaná léčba

Pacientům byl v adjuvantní léčbě podáván intravenózně vysokodávkovaný interferon alfa-2b, v dávce **20MIU/m<sup>2</sup> 5 dní v týdnu první 4 týdny**, pak udržovací schéma subkutánní **10MIU/m<sup>2</sup> do celkové doby 1 roku**. Adjuvantní léčbu zahájili do 6 týdnů od radikální operace MM, či disekce uzlin. Po dobu léčby byl kladen důraz na dostatečnou hydrataci (min.2l/den, optimálně pomalá parenterální hydratace přes noc), kontrolu hematologických a biochemických parametrů, zejména jaterních funkcí, a profylaxi antidepresivem. Ve shodě s doporučením psychiatrů dobré zkušenosti byly se sertralinem. Podávání bylo zahájeno ještě před zahájením adjuvantní léčby, a dávka sertralinu byla postupně navýšena až na 200mg/den.

Hladiny interferonu alfa-2b uvedené v příloze představují naměřené dosahované hladiny na konci 1. týdne intravenózního podávání a na konci 3. týdne podávání. Tento rozvrh odběrů má za cíl umožnit případnou úpravu dávky dle naměřených hodnot.

Hladiny VEGF a MMP-8 zaznamenané v příloze představují naměřené dosahované hladiny u pacienta před zahájením léčby HDI v den přijetí k léčbě (čili v rozsahu 4-6 týdnů od chirurgického výkonu) a hladiny naměřené při ukončení léčby (1-7 dní od ukončení podávání).

### Rozdělení souboru pacientů

Pro větší přehlednost výsledků jsem pacienty rozdělila do dvou skupin:

- 1) pacienti, u nichž došlo k poklesu hladiny VEGF po vysokodávkovaném podání interferonu alfa- 2b
- 2) pacienti, u nichž nedošlo k poklesu hladiny VEGF po vysokodávkovaném podání interferonu alfa- 2b

### Charakteristika laboratorní metody

Monitorovány byly hladiny VEGF, interferonu alfa-2b a MMP-8 před zahájením HDI, po jeho skončení. Vzorky byly uchovávány na katedře Humorální imunologie Kliniky alergologie a imunologie.

Hladiny lidského VEGF a MMP-8 byly stanoveny pomocí komerčních ELISA souprav R&D Systems (USA) Quantikine Human VEGF Immunoassay a Quantikine Human Total MMP-8 ELISA Kit. V obou případech se jednalo o sandwichovou ELISA techniku. V jamkách mikrotitračních destiček se příslušný cytokin nebo matrixová metaloproteináza váže na specifickou protilátku. Tento komplex je následně označen druhou protilátkou konjugovanou s enzymem křenová peroxidáza. Po přidání substrátu TMB dojde k barevné změně, která je úměrná koncentraci příslušného analytu. Pro měření barevné změny (absorbance) byl použit u

všech měřených parametrů ELISA reader Multiscan a software Genesis od firmy Thermo Fisher Scientific (USA). Koncentrace VEGF a MMP-8 byly vypočteny z kalibračních křivek. Měřicí rozsah pro VEGF byl 15 – 1000 pg/ml a pro MMP-8 5 – 1000 pg/ml. Vzorky mimo rozsah měření byly ředěny 20x.

Hodnoty interferonu-alfa 2b byly měřeny metodou ELISA, komerční soupravou VeriKine Human IFN Alpha od firmy PBL Assay Science (USA). Metoda pracuje na principu sandwichové imunoanalýzy. Měřicí rozsah metody je 1 – 10 000 pg/ml. Interferon alfa ze vzorku je po navázání na specifickou protilátku zakotvenou v jamkách ELISA destičky označen druhou protilátkou spojenou s biotinem. Pomocí vazby další složky, streptavidinu, je vzniklý komplex označen enzymaticky křenovou peroxidázou. Koncentrace interferonu alfa je úměrná zbarvení produktu enzymové reakce se substrátem TMB. Metoda je kalibrována pomocí referenčního mezinárodního standardu IFN alfa. Při analýze bylo postupováno dle doporučení výrobce. Pro měření barevné změny (absorbance) byl použit ELISA reader Multiscan a software Genesis od firmy Thermo Fisher Scientific (USA). Koncentrace interferonu beta byly vypočteny z kalibrační křivky.

### **Statistická analýza**

Statistická analýza byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 6. Ve statistickém souhrnu výsledků jsou vždy uvedeny medián, 25. až 75. percentil, rozsah hodnot, průměr, směrodatná odchylka, standardní chyba průměru a 95% interval spolehlivosti pro průměrnou hodnotu. Před výběrem vhodného statistického testu bylo rozložení sledovaných veličin porovnáváno s normálním rozložením pomocí D'Agostino & Pearson omnibus testu. Pokud se rozložení lišilo od normálního rozložení, bylo porovnání výsledků zjištěných před léčbou a po léčbě vysokodávkovaným interferonem alfa-2b provedeno pomocí párového Wilcoxonova testu. K porovnání výsledků mezi skupinami nemocných byl zvolen neparametrický nepárový test Mann-Whitney. Pokud hodnocená veličina měla normální rozložení (např. intraindividuální změny hodnot v důsledku léčby), byly rozdíly mezi výsledky dosaženými v různých skupinách nemocných posuzovány nepárovým t-testem. Časové závislosti pravděpodobnosti přežití a přežití bez příznaků nemoci (DFS) byly hodnoceny metodou podle Kaplana-Meiera. Diagnostický přínos testu byl posuzován s využitím ROC analýzy, např. zda intraindividuální difference hodnoty VEGF (VEGF po léčbě - VEGF před léčbou vysokodávkovaným interferonem alfa-2b) předpovídá setrvání nemocného v remisi trvající alespoň 12 měsíců. Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

## 6. Výsledky

### Cíl 1: prokázat pokles hladiny VEGF-A po léčbě vysokodávkovaným interferonem alfa-2b

Statistická analýza provedená s využitím Wilcoxonova párového testu v celém souboru 29 nemocných s MM ukázala, že koncentrace VEGF vyšetřená před léčbou a po léčbě se statisticky významně neliší ( $P=0,18$ ). Mediány koncentrace VEGF jsou zcela srovnatelné (456 a 457 pg/ml). Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací VEGF vyšetřenou po léčbě a před léčbou činí -67 pg/ml (v procentech odpovídá střední hodnota rozdílu 15 % koncentrace VEGF před léčbou). Jde o velmi malý pokles koncentrace, který nedosáhl statistické významnosti. Rozdíly koncentrací korelují s koncentrací před léčbou - větší pokles je z vyšší koncentrace VEGF před léčbou.

Terapeutické výsledky jsou mnohem lepší u nemocných, u kterých se koncentrace VEGF po léčbě HDI snížila, než u nemocných, u kterých došlo k nárůstu koncentrace. Tuto skutečnost dobře dokládá Kaplan-Meierova křivka přežití a křivka DFS. Procenta nemocných v daném čase žijících a procenta nemocných bez příznaků onemocnění jsou zásadně a statisticky velmi významně vyšší ve skupině s poklesem koncentrace VEGF v důsledku léčby interferonem alfa. Ve skupině se zvýšením koncentrace VEGF činil medián přežití 16 měsíců a medián přežití bez příznaků nemoci 9 měsíců. Ve skupině s poklesem koncentrace VEGF oba mediány nebyly na konci období sledování dosaženy, tj. jsou delší než 72 měsíců.

### Pacienti, u nichž došlo k poklesu hladiny VEGF po vysokodávkovaném podání interferonu alfa- 2b (tab. 1)

Po podání vysokodávkovaného interferonu došlo k poklesu hladiny sérového VEGF u 19 z 29 pacientů (66%). Dva z nich zemřeli, u 17 došlo k dosažení dlouhodobé kompletní remise (2 roky od ukončení léčby bez známek choroby). Oba pacienti, kteří zemřeli, byli bez ulcerace primárního ložiska, měli postižené uzliny, ale primární nádor nebyl nikterak velký (v jednom případě dokonce pT1a). 90% pacientů, kteří zareagují na HDI poklesem sVEGF-A, má dlouhodobou dobrou terapeutickou odpověď. Tři pacienti z uvedených 19 nedokončili léčebné schéma kvůli projevům toxicity.

Tabulka. 1.: Pacienti, u kterých došlo k poklesu hladiny VEGF po podání HDI

TNM	Histologie	Průběh léčby	Hladiny IFN (pg/ml)	Hladiny VEGF (pg/ml)	Hladiny MMP8 (pg/ml)	Efekt léčby	
pT2apN0pM0 2007, LND 2010	Nodul. Cl IV, Br 2	Dokončil	4,85 – 5,36	352,3 135,6	– –	39,5 – 9,9	Bez choroby 6 let
pT3bpN0M0	Nodul. Cl IV, Br 2,3	Dokončil s red. o ¼	9,9 – 29,9	325,6 245,3	– –	52,9 – 2,1	Bez choroby 1 rok
pT2bpN0M0	Nodul Cl III, Br 2	17/20 trombopenie	24,8 – 29,9	651,5 442,8	– –	8,5 – 6,8	Bez choroby 3 roky

pT2apN0M0	Nodul Cl IV, Br 2	Neutropenie trombopenie red.o ½ dokončil	55800 – 41200	856,4 – 798,6	8,8 – 7,8	Bez choroby 18 M
pT3apN0M0	Nodul Cl III, Br 3,7	Dokončil	0,9 – 7,5	545,5 – 469,8	2,5 – 1,1	Bez choroby 8 M
pT3apN1M0	Amelanot. Nodul. Cl IV, Br 4,2	Neutropenie red. o 1/3 dokončil	70,9 – 62	556,8 – 416	17,4 – 9,2	Bez choroby 2 roky
Meta MM v podkoží	Primum ignotum	Dokončil	29,9 – 24,8	1272,7 – 780,9	27,9 – 1,5	Bez choroby 3 roky
Meta v axile 2011	Primum ignotum	Dokončil alerg.reakce při posl.apl.	190,9 – 159,8	1598,6 – 843,5	78,8 – 42,9	Bez choroby 3 roky
pT2apN1M0	Nodul. Cl IV, Br 1,9	Dokončil	98 – 64,4	725,6 – 658,3	94,6 – 1,2	Exitus 20M po HDI
pT2bpN0M0	Nodul Cl III, Br 2,5	Dokončil deprese	56,56 – 6,11	511,3 – 405,6	29,8 – 18,1	Bez choroby 3 roky
pT2apN0M0; LND násl.	Nodul Cl IV, Br 1,4	Dokončil	117,8 – 126,3	325,4 – 278,1	10,9 – 24,2	Bez choroby 3 roky
pT3aN0M0	Nodul Cl IV, Br 2,2	Dokončil	22,3 – 9,5	245,3 – 204,5	21,9 – 10,9	Bez choroby 18M
pT1apN3M0	SSM, Cl II, Br 0,2	Neutropenie red.o 1/3	284,7 – 450,5	612,5 – 586,3	11,2 – 14,5	Exitus 18M po HDI
pT4apN1M0	Nodul Cl III, Br 5,5	Dokončil	172,7 – 67,8	653,4 – 326,1	124,5 – 16,1	Bez choroby 4 roky
Sliznice dutiny nosní	Exulc.	Dokončil	2102 – 2824	1125,3 – 945,3	7,6 – 25,4	Bez choroby 4 roky
Meta MM v podkoží	Primum ignotum	Dokončil	129,4 – 88,2	654,3 – 546,3	29,6 – 41,1	Bez choroby 2 roky



Exenterace axily	Primum ignotum	Ukončeno pro deprese 10 podání	111,5 59,8	–	348,5 125,3	–	65 – 20,7	Bez choroby 20M
pT2apNxM1a satelity v podkoží	Nodul ClIV, Br 1,2	Dokončil	117,5 62,5	–	289,1 – 84,6		20,7 – 1,1	Bez choroby 3 roky
pT1apN0M0, násl. meta v jizvě	SSM, ClIII, Br 1,35	Elevace JT 5 podání	1004 948,5	–	270 – 185,4		19,8 – 15,4	Bez choroby 18M

Červeně vyznačeny hladiny VEGF a zvýraznění pacienti s velmi nízkým vstupním stadiem. Tučně vyznačeno b stadium ulcerace; Br – Breslow, CL - Clark

### Pacienti, u nichž nedošlo k poklesu hladiny VEGF po vysokodávkovaném podání interferonu alfa- 2b (tab. 2)

U 10 pacientů z 29 nedošlo po podání HDI k poklesu ale ke zvýšení sérového VEGF (34%). Osm pacientů zemřelo (80%), přičemž pouze dva měli ulcerovaný primární melanom. Dva nemocní dosahují dlouhodobé kompletní remise. Tři pacienti z 10 nedokončili léčebné schéma v důsledku projevů toxicity.

Tab. 2.: Pacienti, u kterých nedošlo k poklesu VEGF po podání HDI.

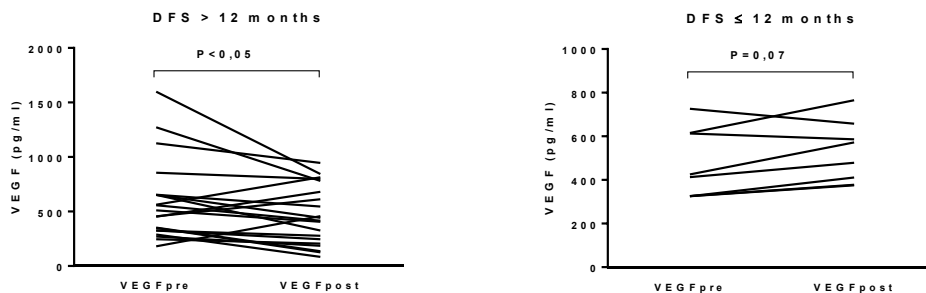
TNM	Histologie	Průběh léčby	Hladiny IFN (pg/ml)	Hladiny VEGF (pg/ml)	Hladiny MMP8 (pg/ml)	Efekt léčby
pT3apN2M0	Nodul Cl IV, Br 2,9	10 podání elevace JT	19,7 45,9	– 456,3 612,3	46,4 – 17,8	Bez choroby 15M
pT1apN0M0 2003, LND 2011	Cl II, Br 1	Dokončil	56,65 74,21	– 425,3 572,3	19,5 – 1,5	Exitus 10M po HDI
pT4bN1M0, násl.recidiva uzlin	Cl IV, Br 1,6	Dokončil	194,97 67,68	– 325,6 378,4	59,6 – 11,1	Exitus 3M po HDI
pT1apN0M0 násl.recidiva uzlin	Nodul Cl II, Br 0,6	Dokončil	39,37 22,3	– 453,2 680,5	27,1 – 65,1	Exitus 18M po HDI
pT2apN1M0	SSM, Cl IV, Br 2	Dokončil	1877 2507	– 325,4 411,3	33,1 – 20,7	Resekce plíce pro rec.12M po HDI
pT4apN1M0	Nodul Cl V, Br 2,2	Dokončil Elevace JT	25300 25700	– 179,6 456,9	32,9 – 4,2	Exitus 24M po HDI
Incipient.MM, LND po 6 letech	Neostážován	9 podání hepatotox.	5385 7374	– 412,8 478,5	34,1 – 17,9	Recidiva po 6 M ipilimumab

pT2bN0M0, recidiva po 2 letech	Exulc.MM	10 podání parkinson.	528,6 – 526,7	563,4 – 814,2	41,9 – 9,6	Bez choroby 4 roky
pT4bpN1M0	Nodul. Br 90	Dokončil	10425 – 13812	615,2 – 765,2	15,8 – 4,2	Exitus 7M po HDI
pT3bN0M0; za rok reexcize	Nodul. Br 3,1, Cl IV	Dokončil	60,5 – 59,2	325,4 – 375,2	32,3 – 50,9	Exitus 8M po HDI

Červeně vyznačeny hladiny VEGF a zvýraznění pacienti s velmi nízkým vstupním stadiem. Tučně vyznačeno b stadium ulcerace; Br – Breslow, CL - Clark

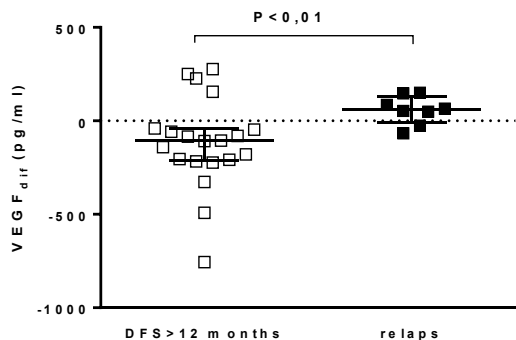
Koncentrace VEGF před léčbou byly v podskupinách remise a relaps srovnatelné ( $P=0,72$ , párový test Mann-Whitney).

Rozdíly koncentrací VEGF (po léčbě – před léčbou) souvisejí s výsledkem léčby (obr. 1.). Ve skupině nemocných setrvávajících v remisi déle než 12 měsíců došlo po léčbě HDI k poklesu koncentrace VEGF průměrně o 118 pg/ml (směrodatná odchylka 244 pg/ml). Rozdíl koncentrací se liší od nuly (párový t-test,  $P<0,05$ ). Jedná se o statisticky významné snížení koncentrace VEGF. Studentův t-test s větší statistickou silou mohl být použit, protože rozložení diferencí se neliší od normálního rozložení. Ve skupině s relapsem rozdíl koncentrací VEGF činil 57 pg/ml (SD 76). Toto zvýšení je hraničně signifikantní (t-test,  $P=0,07$ ).



Obr. 1.: Změny koncentrace VEGFv důsledku léčby interferonem ve skupině s kompletní remisí trávající déle než 12 měsíců a ve skupině s relapsem onemocnění do 12 měsíců.

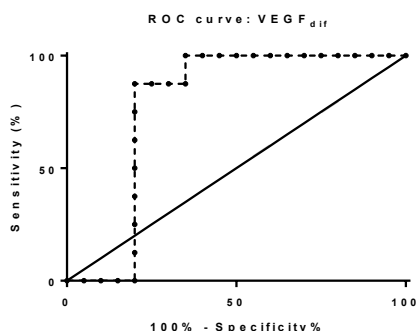
Porovnání změn koncentrace VEGF (po léčbě – před léčbou) mezi podskupinami s relapsem do 12 měsíců, a remisí delší než 12 měsíců, dovoluje obrázek 2. V první skupině došlo u 16 z 20 nemocných k poklesu koncentrace VEGF, zatímco ve druhé u 6 z 8 k nárůstu a pouze u 2 k poklesu VEGF. Diference koncentrací VEGF, ke kterým došlo v souvislosti s podáním interferonu, se v obou podskupinách statisticky signifikantně lišily ( $P<0,01$ ).



Obr. 2.: Rozdíly mezi hodnotou koncentrace VEGF po léčbě a před léčbou v podskupinách nemocných s remisí trvající déle než 12 měsíců a s relapsem do 12 měsíců.

Změna koncentrace VEGF by mohla být významným prognostickým parametrem úspěšnosti léčby pro následující 12-ti měsíčním období. Tato hypotéza vyžaduje další ověření ve větších studiích.

Pomocí analýzy ROC křivky (obr. 3.) pro rozdíl koncentrace VEGF jsme hledali optimální hraniční hodnotou rozdílu koncentrace oddělující obě skupiny s odlišným výsledkem léčby. Analýza ukázala, že změna VEGF po léčbě interferonem má schopnost diagnostického testu, umožňujícího identifikovat nemocné s remisí trvající minimálně 12 měsíců od ukončení léčby. Optimální hraniční hodnota v testu je - 34 pg/ml (snížení o 34) a při jejím použití má test citlivost 87,5%, a specificitu 80%.



Obr. 3. ROC analýza diagnostické schopnosti změny koncentrace VEGF (hodnota po léčbě – hodnota před léčbou interferonem) předpovědět setrvání nemocného v remisí trvající 12 měsíců nebo déle (plocha pod křivkou 0,78,  $P=0,022$ ).

Hodnota koncentrace VEGF před léčbou interferonem neumožňuje odlišit pacienty setrvávající v remisí od pacientů s relapsem do 12 měsíců. Takovou schopnost má ale poléčebná změna koncentrace VEGF, kterou je možné využít jako diagnostický test k identifikaci nemocných s předpokladem DFS minimálně 12 měsíců od ukončení léčby. Optimální hraniční hodnota změny koncentrace je - 34 pg/ml.

V námi studované populaci došlo po podání HDI k poklesu hladiny VEGF-A ve více než polovině léčených případů (66 %), nehledě na vstupní stadium. Navzdory tomu, že pracujeme s malými čísly a nedosahujeme statistické signifikance, pokles hladiny VEGF-A po léčbě se jeví prognosticky pozitivně (90 % pacientů, u nichž došlo k poklesu hladiny VEGF-A po podání vysokodávkovaného interferonu, dosáhlo dlouhodobé kompletní remise).

Medián celkového přežívání u pacientů s poklesem VEGF zůstává nedosažen, u pacientů s nárůstem hladiny VEGF činí 16 měsíců; medián DFS u pacientů s poklesem VEGF rovněž zůstává nedosažen, u pacientů s nárůstem hladiny VEGF činí 9 měsíců.

Zaznamenali jsme antiangiogenní potenciál interferonu alfa-2b, při jeho vysokodávkovaném podání. Jedná se o soubor pacientů léčených povětšinou před érou léčby mutačními inhibitory či blokátory imunologických checkpointů.

## **Cíl 2: Popsat změny hladin MMP 8 po léčbě vysokodávkovaným interferonem alfa-2b, a terapeutickou signifikanci těchto změn.**

MMP8 klesají po podání HDI v 76%, což je rozdíl vysoce signifikantní ( $P < 0,002$ ). Nicméně nelze popsat terapeutický a klinický dopad tohoto poklesu, neb k němu došlo rovnoměrně u pacientů s dobrými i špatnými klinickými výsledky.

Ve skupině pacientů, kteří na léčbu HDI zareagovali poklesem VEGF, tento pokles v 80% korespondoval s poklesem hladin MMP-8, což nenaplnuje představu tumor supresního působení MMP - 8. Ve skupině pacientů, kde hladina VEGF rostla po podání HDI, nebyla pozorována žádná asociace mezi hladinami VEGF a MMP-8.

Průměrné hodnoty MMP-8 v úvodu léčby v naší studované populaci byly 34,9 pg/ml a na konci léčby 16,4 pg/ml. Rozdíly koncentrací MMP-8 nesouvisejí s výsledkem léčby. V obou skupinách nemocných došlo ke snížení MMP-8, ale ve skupině 8 nemocných s relapsem rozdíl nedosáhl statistické významnosti (vliv nízkého počtu nemocných) a je možné hovořit pouze o trendu ke snížení MMP-8.

Rozdíl koncentrací MMP-8 před léčbou a po léčbě nemá výpovědní hodnotu ve vztahu k výsledku léčby a nedovoluje nám tudíž odlišit nemocné s relapsem v následujících 12 měs. od nemocných s remisí po dobu 12 měs. a delší. Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v pravděpodobnosti přežití mezi skupinami, křivky přežívání se signifikantně neliší.

Vztah mezi předléčebnými a poléčebnými hodnotami koncentrací MMP-8 a VEGF nekoreluje.

## **Cíl 3: Monitorovat dosažené hladiny interferonu alfa-2b**

Ze získaných hodnot hladin interferonů se jeví nepravděpodobné v klinice dávku modifikovat dle naměřených dosahovaných sérových hladin, proto tyto hodnoty nebyly postupovány žádnému statistickému hodnocení. Interferon je proteinové léčivo s molekulovou hmotností nižší než 50 000 daltonů a vydrží *in vivo* v cirkulaci velmi krátce, jeho biologický poločas v cirkulaci je odhadován na 5–20 min. Monitorování a modifikování dávky dle hladin IFN není možné. Kromě rychlého metabolismu interferonů mohly přispět k nesourodým hodnotám hladin IFN i aspekty plynoucí z klinického provozu, které nelze vyloučit, jako okamžik odběru krve na stanovení hladiny (při podání infuze s interferony, v průběhu aplikace, po aplikaci).

## 7. Diskuze

Angiogeneze a imunomodulace jsou komplexní a provázané procesy. Imunomodulační efekt antiangiogenních preparátů je významný (Reinmuth et al, 2015). VEGF a interferony působí na obou sférách. VEGF je faktor angiogenní a imunosupresivní, který reguluje novotvorbu cév působením na endotelie ve smyslu jejich aktivace, podpory přežívání, proliferace, migrace, invaze a ovlivňuje také jejich funkci a průtok – vazodilatací a zvýšenou permeabilitou. Ovlivňuje negativním způsobem imunitní odpověď, snižuje migraci, zrání a přežívání buněk IS a působí chemotaxi supresních progenitorů z kostní dřeně. Interferony působí antiangiogenně a prolamují imunitoleranci. Je jim připisováno i přímé protinádorové působení. Dokáží inhibovat sekreci VEGF (Raig et al, 2008).

Maligní melanom dokáže integrovat hostitelskou vaskulaturu. Aktivace VEGFR-2 navázáním VEGF-A je zásadním mechanismem, jak nádorové buňky podporují angiogenní switch nádoru (Basu et al, 2009). VEGF-A je považován za primární, přímo-působící proangiogenní růstový faktor, který si je tumor schopen secernovat k podpoře růstu a invazivity. Autokrinní VEGF-A řízená zpětná klička aktivuje VEGFR-1 na nádorových buňkách (De Vita, Cancer 9<sup>th</sup>, 2001). Tumor rostoucí s přispěním hostitelské vaskulatury by měl být od počátku považován za systémové onemocnění.

Vysoké hladiny VEGF korelují s úrovní hypoxie v nádoru, avšak indukce nebo zvýšení exprese VEGF není způsobena jen hypoxií. Může je vyvolat řada jiných environmentálních (epigenetických) faktorů, nízké pH, chronických zánět apod. Kyselé extracelulární pH podporuje expresi VEGF-C na buňkách MM prostřednictvím transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Peppicelli et al, 2013; Huang et al, 2015). Obsazením IFN receptoru a fosforylací STAT1 a STAT2 vzniká komplex interferonem stimulovaných genů a genových faktorů (ISGs) a interferonem regulovaný transkripční faktor, který aktivuje transkripci ISGs a dochází k inhibici VEGF (Tarhini, 2015). Zde se na genové úrovni potkává přímé supresní působení VEGF s působením interferonů. Hlubší pochopení vzájemné interakce angiogeneze a regulace imunitních funkcí nám může poukázat nové možnosti kombinovaných protinádorových léčebných postupů i nové biomarkery.

Ve shodě s našimi výsledky najdeme práce, které prokazují, že hladiny VEGF popisují léčebnou odpověď a mají klinický význam, a to jak u MM, tak u jiných nádorů (Kwon et al, 2010). Demirkesen popsal korelaci mezi angiogenezí a metastazováním a klinický význam poklesu VEGF ve shodě s touto korelací. VEGF podporuje angiogenezi a s rozvojem angiogeneze jde ruku v ruce metastazování. Byla pozorována rovněž korelace hladin VEGF s rozvojem mikrometastáz. Fontanini prospektivně hodnotil výpovědní hodnotu VEGF jakožto prognostického indikátoru angiogeneze ve vztahu k celkovému přežívání (Fontanini et al, 1997).

Yurkovetsky, Kirkwood a kol. ve své práci z roku 2007 zaznamenali hladiny VEGF u zdravé kontroly v průměru 76,6 pg/ml (34,9-151,5), u pacientů s MM 215 pg/ml (192,1-783,1). V jejich sledování terapie HDI snižuje hladiny VEGF. V naší skupině adjuvantně léčených pacientů byla průměrná hladina VEGF vyšší, změna koncentrace VEGF po podání HDI napříč souborem nedosáhla statistické významnosti. Rozdíly koncentrací (pre-post) korelují s hodnotou před léčbou (větší pokles je z vyšší koncentrace VEGF před léčbou). Nicméně, ve skupině nemocných setrvávajících v remisi déle než 12 měsíců došlo k statisticky významnému snížení koncentrace VEGF. Ve skupině pacientů s relapsem onemocnění byl zaznamenán hraničně signifikantní rozdíl koncentrací VEGF.

Změna koncentrace VEGF by mohla být významným prognostickým parametrem úspěšnosti léčby pro období 12-ti měsíců následujících po ukončení vysokodávkovaného podání (s opatrností vzhledem k nízkému počtu nemocných – závěr vyžaduje další ověřování). V našem pozorování se tento pokles hladiny VEGF v reakci na HDI (zřejmě je odrazem „interferování“ interferonů do procesu angiogeneze a progresu choroby) jeví pro pacienty prognosticky významnější než samotná vstupní hodnota VEGF. Navzdory tomu, že pracujeme s malými čísly, pokles hladiny VEGF-A po léčbě se jeví prognosticky pozitivní. Vysvětlení tohoto terapeutického úspěchu vnímáme v komplexnosti role VEGF v progresi nádorového onemocnění, kterou podání vysokodávkovaného interferonu naruší. VEGF hraje zřejmě zásadní roli v supresi imunitní odpovědi, a modulaci nastavení nádorového mikroprostředí, proto se inhibice VEGF jeví jako atraktivní partner nových imunoterapeutických postupů (ipilimumab a bevacizumab, kombinace s blokátory angioproteinů aj.).

V adjuvantní léčbě MM se užívá interferonů již skoro 30 let. Ze souhrnných dat studií E1684, E1690, E1694, EORTC 18952, a EORTC 18991 vychází, že HDI zlepšuje RFS o zhruba 33%, s o něco menším procentem ovlivňuje OS (Kirkwood et al, 2001). Jeho efekt je mírný, ale konzistentní a reprodukovatelný. Doloženo bylo nepřímé imunostimulační i přímé protinádorové působení (Tarhini, 2015; Kirkwood et al, 1996). Důkazy jsou i o antiangiogenním působení (Raig et al, 2008). Nejvýznamnější pokles hladiny VEGF po podání interferonů je popisován u pacientů s renálním karcinomem, kde je nadprodukce VEGF dána genetickým defektem. Antiangiogenní působení IFN u ostatních malignit jde cestou aktivace Janus-kinase-STAT signální dráhy a pokles VEGF je spojen s jeho sníženou produkcí nádorovými buňkami. Narušuje imunotoleranci nádoru zvýšením jeho imunogenicity, upreguluje STAT1, snižuje hladiny cirkulujících Tregs (Mozzillo et al, 2012; Tarhini et al, 2015). Hladiny cirkulujících cytokinů korelují s infiltrací nádoru buňkami imunitního systému. Raig a kol. popisuje, že interferon inhibuje VEGF. V souladu s tímto je také naše pozorování. Zaznamenali jsme antiangiogenní potenciál interferonu alfa-2b při vysokodávkovaném podání. I v naší práci se potvrdilo, že sekrece VEGF může být inhibována IFN- $\alpha$ , a že pacienti, kteří na léčbu HDI odpoví poklesem hladiny VEGF, mají dlouhý DFS.

Interferon je proteinové léčivo s molekulovou hmotností nižší než 50 000 daltonů a vydrží *in vivo* v cirkulaci velmi krátce (biologický poločas v cirkulaci je 5–20 min). Monitorování a modifikování dávky dle hladin IFN není v běžné klinické praxi možné.

Některými autory je MMP8 vnímána jako tumor supresor, jiné práce naopak popisují, že nízké hladiny MMP-8 korelují s delším celkovým přežíváním (Vayrynen et al, 2012). Väyrynen a kol. stanovovali hladinu MMP-8 a dle jejich výsledků MMP-8 má protinádorové působení, které se projevuje ovlivněním imunitní odpovědi vedoucí k nekróze nádorové tkáně. Obdobně postavenou studii jako naše kohorta publikoval nedávno Vihinen et al. MMP-8 měřil jako prediktor odpovědi na adjuvantní léčbu interferonem u pacientů operovaných pro vysoce rizikový kožní melanom stadia IIB-IIIc. U pacientů s vysokými předléčebnými hladinami MMP-8 adjuvantní léčba signifikantně prodloužila RFS (36,8 vs. 10,6 měsíce) (Vihinen et al, 2015). V naší práci MMP8 poklesá po podání HDI vysoce signifikantně. Nicméně nelze v ní popsat terapeutický a klinický dopad tohoto poklesu, neb k němu došlo rovnoměrně u pacientů s dobrými i špatnými klinickými výsledky. Vztah mezi předléčebnými a poléčebnými hodnotami koncentrací MMP-8 a VEGF nekoreluje.

Naše výsledky s MMP tak jen dokládají, že ještě mnoho preklinické práce je potřeba vykonat na poli MMP i jejich inhibitorů, protože *in vivo* není jasné, na které straně hrají, zda pro/antiangiogenní, zda růst nádoru inhibují, nebo podporují. Je třeba dalších, obsáhlejších a

komplexnějších sledování k popsání vztahu MMP a VEGF, a k plnému porozumění jejich role v procesu angiogeneze, imunomodulace, progresu a metastazování.

Před příchodem přelomových imunoterapeutických preparátů byla angiogeneze jednou z nejsledovanějších cest v patogenezi MM – od neoplastických fází, přes progresi a metastazování tohoto nádoru. Nyní za skoro 10 let s cílenými a imunoterapeutickými preparáty se ukázaly i jejich limity, a prostor pro zkoumání angiogeneze, a zejména kombinace s imunoterapií a její role v resistenci na imunoterapii, se opět navrácí (v adjuvantní i paliativní léčbě).

## **8. Závěr**

Ve skupině nemocných setrvávajících v remisi déle než 12 měsíců došlo k statisticky významnému snížení koncentrace VEGF.

Změna koncentrace VEGF by mohla být významným prognostickým parametrem úspěšnosti léčby pro následující období 12 měsíců (s opatrností vzhledem k nízkému počtu nemocných – závěr vyžaduje další ověření).

Poléčebná změna koncentrace VEGF jako diagnostický test umožňuje identifikovat nemocné s DFS minimálně 12 měsíců od ukončení léčby. Jako hraniční prokazuje hodnotu - 34 pg/ml.

Zaznamenali jsme antiangiogenní potenciál vysokodávkovaného interferonu alfa-2b.

MMP8 poklesají po podání HDI vysoce signifikantně. Nelze však popsat terapeutický a klinický dopad tohoto poklesu, neb k němu došlo rovnoměrně u pacientů s dobrými i špatnými klinickými výsledky, což nepotvrzuje roli MMP-8 jako tumor supresoru. Je třeba dalších, obsáhlejších a komplexnějších sledování k popsání vztahu MMP a VEGF, a k plnému porozumění jejich role v procesu angiogeneze, imunomodulace, progresu choroby a metastazování.

Vztah mezi předléčebnými a poléčebnými hodnotami koncentrací MMP-8 a VEGF nekoreluje.

I incipientní stadia maligního melanomu mohou být fatální. Klíčem není TNM stadium, ale (angiogenní) potenciál nádoru státi se systémovou chorobou. I v našem souboru najdeme pacienty s časně zachyceným, přesto fatálním onemocněním, které je od samého začátku řízeno mechanismy, které neznáme a neumíme podchytit, ani vstupně tyto pacienty odlišit.

Monitorování a modifikování terapeutické dávky dle hladin IFN není v běžném klinickém provozu smysluplné.

Změny nastavení nádorového mikroprostředí mohou podpořit nebo naopak inhibovat angiogenezi a růst samotného nádoru.

Působení IFNs (komunikačních proteinů IS) na VEGF (angiogenního a imunosupresního činitele) a dobré terapeutické výsledky pacientů, u kterých se toto působení projevilo poklesem VEGF, dávají naše výsledky do kontextu se současným trendem, že angiogeneze jde ruku v ruce s imunosupresí. Kombinace antiangiogenní léčby s imunoterapeutickými metodami je možnou cestou k překonání jejich současných limitů.

Interferony si hledají své místo v imunoterapii či kombinovaných léčebných schématech léčby MM. Optimální léčebné režimy hledáme, jelikož v posledních letech se zásadně změnila a trvale mění léčebná schémata i výhledy pacientů s maligním melanomem.

## **Použitá literatura:**

- ASCIERTO P, KIRKWOOD JM. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med.* 2008; 6: 62.
- BALCH CM, GERSHENWALD JE, SOONG SJ, THOMPSON JF, ATKINS MB, BYRD DR, BUZAID AC, COCHRAN AJ, COIT DG, DING S, EGGERMONT AM, FLAHERTY KT, GIMOTTY PA, KIRKWOOD JM, MCMASTERS KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
- BASU B, BISWAS S, WRIGLEY J, SIROHI B, CORRIE P. Angiogenesis in cutaneous malignant melanoma and potential therapeutic strategie. *Expert Rev Anticancer Ther*; 2009; 11: 1583-98.
- BARBAY V, HOUSSARI M, MEKKI M, BANQUET S, EDWARDS-LÉVY F, HENRY JP, DUMESNIL A, ADRIOUCH S, THUILLEZ C, RICHARD V, BRAKENHIELM E. Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. *Angiogenesis.* 2015 Apr;18(2):191-200.
- BENDER J, HASSEL JC, ENK A. Immunotherapy of Melanoma. *Oncol Res Treat* 2016;39:369–76.
- BISWAS SK, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010 Oct; 11(10):889-96.
- BRANCA MA. Rekindling cancer vaccines. *Nature Biotechnology* 2016; 34: 1019-24.
- BRYCHTOVA S, BEZDEKOVA M, BRYCHTA T, TICHY M. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma.* 2008; 55(4):273-9.
- BUSSARD KM, MUTKUS L, STUMPF K, GOMEZ-MANZANO C, MARINI FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016 Aug 11;18(1):84.
- CORZO CA, CONDAMINE T, LU L, COTTER MJ, YOUN JI, CHENG P, CHO HI, CELIS E, QUICENO DG, PADHYA T, McCAFFREY TV, McCAFFREY JC, GABRILOVICH DI. HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2010 Oct 25; 207(11):2439-53.
- DAVAR D, KIRKWOOD JM. Adjuvant Therapy of Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016;167:181-208.
- DE VITA VT, LAWRENCE TS, ROSENBERG SA. *Cancer. Principles and Practise of Oncology.* 9<sup>th</sup> edition. ISBN133: 978-1-4511-0545-2. p 101; p 103; p 105.
- EIGENTLER TK, GUTZMER R, HAUSCHILD A, HEINZERLING L, SCHADENDORF D, NASHAN D, HÖLZLE E, KIECKER F, BECKER J, SUNDERKÖTTER C, MOLL I, RICHTIG E, PÖNITZSCH I, PEHAMBERGER H, KAUFMANN R, PFÖHLER C, VOGT T, BERKING C, PRAXMARER M, GARBE C; Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). Adjuvant treatment with pegylated interferon  $\alpha$ -2a versus low-dose interferon  $\alpha$ -2a in patients with high-risk melanoma: a randomized phase III DeCOG trial. *Ann Oncol.* 2016 Aug;27(8):1625-32.
- DEMIRKESEN C, BUYUKPINARBASIL N, RAMAZANOGLU R, OGUZ O, MANDEL NM, KANER G. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. *Pathology* 2006 (38): 132-37.
- EISCHEN CM. Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Jun 1;6(6).
- FONTANINI G, LUCCHI M, VIGNATI S, MUSSI A, CIARDIELLO F, DE LAURENTIIS M, DE PLACIDO S, BASOLO F, ANGELETI CA, BEVILACQUA G. Angiogenesis as a



prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:881–6.

FUERTES M, MURPHY M, GAJEWSKI T. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8<sub>1</sub> T cell responses through CD8<sub>al</sub> DCs. *J Exp Med* 2011 Sep 26;208:2005-16.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

HUANG H, LANGENKAMP E, GEORGANAKI M, LOSKOG A, FUCHS P F, DIETERICH LC, KREUGER J, DIMBERG A. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF-κB-induced endothelial activation. *FASEB J.* 2015 Jan;29(1):227-38.

KIRKWOOD JM, STRAWDERMAN MH, ERNSTOFF MS, SMITH TJ, BORDEN EC, BLUM RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996;14:7-17.

KIRKWOOD JM, IBRAHIM JG, SOSMAN JA, SONDAK VK, AGARWALA SS, ERNSTOFF MS, RAO U. High-dose interferon alfa 2-b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol.* 2001;19:2370–80.

KIRKWOOD JM, STRAWDERMAN MH, ERNSTOFF MS, SMITH TJ, BORDEN EC, BLUM RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996;14:7-17.

KOHRMANN A, KAMMERER U, KAPP M, DIETL J, ANACKER. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *JBMC Cancer.* 2009 Jun 16;9:188.

KORPI JT, HAGSTROM J, LEHTONEN N, PARKKINEN J, SORSA T, SALO T, LAITINEN M. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma. *Surg Oncol.* 2011 Mar;20(1):e18-22.

KWON KA, KIM SH, OH SY, LEE S, HAN JY, KIM KH, GOH RY, CHOI HJ, PARK KJ, ROH MS, KIM HJ, KWON HC, LEE JH. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010, 10:203.

LEMPINEN M, LYYTINEN I, NORDIN A, TERVAHARTIALA T, MAKISALO H, SORSA T, ISONIEMI H. Prognostic value of serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Med.* 2013 Nov;45(7):482-7.

McDONALD PC, CHAFE SC, DEDHAR S. Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 27.

MOCELLIN S, PASQUALI S, ROSSI CR, NITTI D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Apr 7;102(7):493-501.

MOUAWAD R, SPANO JP, COMPERAT E, CAPRON F, KHAYAT D. Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. *Eur J Cancer.* 2009 May;45(8):1407-14.

MOZZILLO N, ASCIERTO P. Reduction of circulating regulatory T cells by intravenous high-dose interferon alfa-2b treatment in melanoma patients. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Oct;29(7):801-5.

OZAWA S, SHINOHARA H, KANAYAMA HO, BRUNS CJ, BUCANA CD, ELLIS LM, DAVIS DW, FIDLER IJ. Suppression of angiogenesis and therapy of human colon cancer

liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. *Neoplasia*. 2001 Mar-Apr;3(2):154-64.

PEPPICELLI S, BIANCHINI F, CONTENNA C, TOMBACCINI D, CALORINI L. Acidic pH via NF- $\kappa$ B favours VEGF-C expression in human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Dec;30(8):957-67.

QIAN B, DENG Y, IM JH, MUSCHEL RJ, ZOU Y, LI J, LANG RA, POLLARD JW. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One*. 2009 Aug 10;4(8):e6562.

RAIG ET, JONES NB, VARKER KA, BENNIGER K, GO MR, BIBER JL, LESINSKI GB, CARSON. VEGF Secretion is Inhibited by Interferon-Alpha in Several Melanoma Cell Lines. *J Interferon Cytokine Res*. 2008 Sep; 28(9): 553–61.

REINMUTH N, HEIGENER D, RECK M. Novel angiogenesis inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2015 Mar;27(2):79-86.

RUNDHAUG JE. MMP and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005 (9)2: 267-85.

SRIVASTAVA PK. Neopeptides of Cancers: Looking Back, Looking Ahead. *Cancer Immunol Res*. 2015 Sep;3(9):969-77.

STETLER-STEVENSON W: Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999, 103:1237-41.

STREIT M, DETMAR M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3172-9.

TARHINI AA. Neoadjuvant therapy for melanoma: a promising therapeutic approach and an ideal platform in drug development. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e535-42.

THALANAYAR PM, AGARWALA SS, TARHINI AA. Melanoma adjuvant therapy. *Chin Clin Oncol*. 2014 Sep;3(3):26.

VAYRYNEN JP, VORNANEN J, TERVAHARTIALA T, SORSA T, BLOIGU R, SALO T, TUOMISTO A, MAKINEN MJ. Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *Int J Cancer*. 2012 Aug 15;131(4):463-74.

VIHINEN P, TERVAHARTIALA T, SORSA T, HANSSON J, BASTHOLT L, AAMDAL S, STIERNER U, PYRHONEN S, SYRJANEN K, LUNDIN J, HERNBERG M. Benefit of adjuvant interferon alfa-2b (IFN- $\alpha$ ) therapy in melanoma patients with high serum MMP-8 levels. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Feb;64(2):173-80.

YUHUI H, JIANPING Y, ELDA R, WALID SK, ANCUKIEWICZ M, MEZIVAR J, MARTIN JD, MARTIN RM, VIANELLO F, LEBLANC P, MUNN LL, HUNAG P, DUDA DG, FUKUMURA D, JAIN RK, POZNANSKY MC. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23; 109(43): 17561–66.

YURKOVETSKY ZR, KIRKWOOD JM, EDINGTON HD, MARRANGONI AM, VELIKOKHATNAYA L, WINANS MT, GORELIK E, LOKSHIN AE. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alfa2b. *Clin Cancer Res* 2007;13(8) 2422-28.

WHEATLEY K, IVES N, HANCOCK B, GORE M, EGGERMONT A, SUCIU S: Does adjuvant interferon-alpha for highrisk melanoma provide a worthwhile benefit? A metaanalysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 241–52.

## **Přehled publikační činnosti:**

### **a/ původní vědecké práce v impaktovaném časopise**

Prošvicová J, Grim J, Kopecký J, Priester P, Slánská I, Trojanová P, Paulík A, Jílková V, Filip S, Lukešová Š, Prošvic P, Knížek J, Andrýs C. Non-specific immunotherapy inhibits angiogenesis - results of the monitoring of serum levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 8 in patients with malignant melanoma receiving adjuvant high-dose interferon therapy. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2017 Winter;66(1):15-23.

IF 0,500

Priester P, Kopecký J, Prošvicová J, Petera J, Zoul Z, Slováček L. Cutaneous recurrence of malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis: a rare case report. *Onkologie*. 2012;35(1-2):46-8.

IF 1,522

### **b/ ostatní práce v impaktovaném časopise**

Prošvicova J, Lukesova S, Kopecky J, Grim J, Papik Z, Kolarova R, Navratilova B, Dubreuil P, Agopian J, Mansfield C, Moussy A, Hermine O. Rapid and clinically significant response to masitinib in the treatment of mucosal primary esophageal melanoma with somatic KIT exon 11 mutation involving brain metastases: A case report. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015 Dec;159(4):695-7.

IF 0,894

Slovacek L, Slovackova B, Slanska I, Priester P, Petera J, Kopecky J, Vanaskova J. Cancer and depression: a prospective study. *Neoplasma*. 2009;56(3):187-93.

IF 1,871

### **c/ původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise**

Prošvicová J, Grim J, Kopecký J, Priester P, Priester I, Trojanová P, Jílková V, Paulík A, Lukešová Š, Filip S. Zhodnocení výskytu a charakteru neurologických/neuropsychiatrických komplikací v souboru pacientů s maligním melanomem léčených adjuvantně vysokodávkovaným interferonem. *Klin Onkol*. 2018;31 (5): přijato k publikaci

### **d/ ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise**

Vanásková J, Grim J, Kopecký J, Kubala E, Filip S. High-dose interferon alpha in treatment of patients with malignant melanoma, monitoring of predictive and prognostic biomarkers. *Klin Onkol*. 2011;24(3):180-6.

Prošvicová J, Kubala E, Petera J. The year 2011 is the year of melanoma: Melanoma Forum, Frankfurt, 19 May 2011. *Klin Onkol*. 2011;24(4):308-11. Czech.

Prošvic P, Prošvicová J. A new way of thinking about cancer. (Comments on ESMO 2011). *Klin Onkol*. 2011;24(6):480. Czech.

Prošvicová J, Kubala E. Kompletní remise po léčbě ipilimumabem u dvou pacientů s metastatickým maligním melanomem. Farmakoterapie 2012;8(2):155-7.

Prošvicová J, Kubala E. Přetrvávající kompletní remise po léčbě ipilimumabem u dvou pacientů s metastatickým maligním melanomem. Farmakoterapie 2013;9(6):550-600.

#### **e/ publikovaná abstrakta**

Prošvicová (Vaňásková) J, Nekvindová J, Hrabcová V, Kohout A. Porovnání mutačního statusu B-raf v primárních a metastatických ložiscích maligního melanomu, BOD, 2012, abstrakt 063.

Prošvicová (Vaňásková) J, Kubala E, Grim J, Andrýs C, Knížek J. Podávání vysokodávkovaného interferonu alfa 2b v adjuvantní léčbě maligního melanomu a sledování jeho antiangiogenního působení. BOD 2014, abstrakt 005.

Prošvicová (Vaňásková) J, Kolářová R, Grim J, Kopecký J, Lukešová Š, Papík Z, Navrátilová B. Rychlá klinická odpověď generalizovaného jícnového melanomu na léčbu c-kit inhibítorem – kazuistika a obecné poznatky, BOD 2015, abstrakt XIV/ 324.

#### **f/ monografie**

Prošvicová J. Angličtina pro překladatele. C-Press, 2011, ISBN 978-80-251-3614-0

Prošvicová J. Nádorová angiogeneze – antiangiogenní léčba ve světle moderní imunoterapie, v tisku pro nakladatelství Maxdorf Jesenius

#### **g/ přeložené knižní tituly**

Fuller, Geraint. Neurologické vyšetření snadno a rychle. Translated by Jarmila Vaňásková. 1. české vyd. Praha: Grada, 2008. 253 s. ISBN 978-80-24719146.

Andrew T. Raftery, Eric Lim. Diferenciální diagnóza Do kapsy. Překladatelky: MUDr. Jarmila Vaňásková, MUDr. Eva Štěpánová. 1. české vyd. Praha: Grada, 2010. 520 s. ISBN 978-80-247-2356-3.

#### **h/ kapitoly v učebnicích a sbornících**

Prošvicová J, Prošvic P. Synchronní nádorová triplicita: karcinom ledviny, prostaty a maligní melanom. Vybrané otázky onkologie XIV, str. 58, Galén, ISBN 978-80-7262-708-0

#### **i/ přednášky**

Vaňásková J, Grim J, Kopecký J. Onkologická léčba maligního melanomu. Kožní klinika FNHK, 17.3.2010

Prošvicová J. Imunoterapie urologických malignit. Urologický seminář, Náchod, 9.9.2011

Prošvicová J. Nádorová imunologie. Náchodské mezioborové dny, 10.11.2011

Prošvicová J. Imunoterapie v onkologii. Náchodské mezioborové dny, 10.11.2011

Prošvicová J, Nekvindová J, Kohout A, Straka V. Porovnání mutačního stavu B-raf v primárních a metastatických ložiscích maligního melanomu. BOD, 20.4.2012

Prošvicová J. Klasická chemoterapie versus cílená léčba. Náchodské mezioborové dny, 16.11.2012

Prošvicová J, Kubala E, Kopecký J, Grim J. Imunoterapie maligního melanomu. Kožní klinika, 13.2.2013

Prošvicová J, Kubala E. Novinky v onkologické léčbě. 7. konference všeobecných sester a radiologických asistentů, Hradec Králové, 15.3.2013

Prošvicová J. Mechanismy resistance – zaměřeno na imunobiologii. Náchodské mezioborové dny, 17.11.2013

Prošvicová J; Kubala E; Grim J; Andrýs C; Knížek J. Podávání vysokodávkovaného interferonu alfa 2b v adjuvantní léčbě maligního melanomu a sledování jeho antiangiogenního působení. BOD 2014.

Prošvicová J, Filip S, Grim J, Kopecký J, Trojanová P, Knížek J, Andrýs C. Administration of interferon alpha-2b in adjuvant treatment of malignant melanoma and monitoring of its antiangiogenic potential. Konference DSP studentů, LF HK, 2014

Prošvicová J, Lukešová Š, Kopecký J, Grim J, Papík Z, Kolářová R, Navrátilová B. Rychlá klinická odpověď generalizovaného melanomu na léčbu c-kit inhibitorem – kasuistika a obecné poznatky. Náchodské mezioborové dny, 14.11.2014

Prošvicová J; Kolářová R; Grim J; Kopecký J; Lukešová Š; Papík Z; Navrátilová B. Rychlá klinická odpověď generalizovaného jícnového melanomu na léčbu c-kit inhibitorem – kasuistika a obecné poznatky. BOD 2015.

Prošvicová J, Lukešová Š. Karcinom prsu u muže „Rare but there“. Náchodské mezioborové dny, 19.11.2015

#### **j/ plakátová sdělení na odborných setkáních**

Prošvicová J, Prošvic P. Synchronní nádorová triplicita; Uro-onkologická symposia, Praha, 24.-26.11.2010; Dny prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 1.-3.12.2010