

Sledování hladiny angiogeninu, PDGF a MCP-I u nemocných s renálním karcinomem.

Lukešová Š.^{1,4}, Kopecký O.^{1,4}, Vrobllová V.², Andrýs C.², Morávek P.³, Šafránek H.³

1) *II. interní klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové*

2) *Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové*

3) *Urologická klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové*

4) *Onkologické oddělení Oblastní nemocnice Náchod, a.s.*

Úvod

Důležitým procesem doprovázejícím růst nádorů je angiogeneze. Za fyziologických okolností je angiogeneze kontrolována vyvážeností proangiogenních a antiangiogenních faktorů. Tato rovnováha je u nádorových tkání porušena. Výsledkem je podpo-

ra angiogeneze. Ke zvýšené expresi angiogenních faktorů dochází na podkladě různých stimulů (6). Nejvíce studovaným podnětem je hypoxie, která vede ke zvýšené expresi VEGF (vascular endothelial growth factor) i dalších angiogenních faktorů (7). Citlivost buněk k hypoxickým stavům a transkripce angiogenních faktorů se zvyšuje při mutaci VHL (von Hippel-Lindau gen) genu (4, 7).

V průběhu vaskulárního stadia nádorové angiogeneze dochází ke změnám v poměru angiogenních a antiangiogenních faktorů, k morfologickým změnám endotelových buněk, k uvolnění proteolytických enzymů, k migraci endotelií a kapilární morfogenezi, k reprodukci endotelií a k mikrovaskulární diferenciaci (1).

Jednotlivé fáze procesu angiogeneze mohou být shrnuty následovně:

1. Vasodilatace preexistujících cév a formování vesiculo- vakuolárních organel v endoteliálních buňkách. Nejdůležitější pro tento krok je VEGF. 2. Cévní destabilizace a degradace matrix s remodelací perivaskulárního stromatu. Tohoto kroku se účastní angiopoietin 2 a proteázy (jako chymázy a matrix metallo-proteázy). 3. Proliferace endoteliálních buněk a migrace podél gradientu chemotaktických agens skrz desintegrovanou basální membránu do remodelovaného, měkkého perivaskulárního prostoru. Specifickými mitogeny endoteliálních buněk v této fázi jsou VEGF a angiopoietin, ostatní molekuly jako angiogenin a FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), CXC-chemokiny a insulin-like growth factor typ 1 indukují proliferaci širokého spektra buněk. 4. Formování lumen a stabilizace cévy; díky migraci endoteliálních buněk nejprve formující jednoduchou vrstvu, později dutou cévu s okolními mesenchymálními buňkami a cévními buňkami hladké svaloviny. Do této fáze jsou zapojeny různé formy VEGF a integrinů (10).

Analýzy chemoatraktantů a angiogenních faktorů jsou důležité za účelem determinovat maligní potenciál renálního karcinomu. V rámci našeho výzkumného záměru jsme sledovali hladiny angiogeninu, PDGF (platelet-derived growth factor) a MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1).

Soubor pacientů

Světlobuněčný renální karcinom byl diagnostikován u 32 pacientů v období od října 2005 do září 2006. U všech nemocných byl odstraněn primární nádor ledviny, 8krát byla provedena záchovná operace, 24krát nefrektomie. Diagnóza renálního karcinomu byla potvrzena histologicky a ve všech případech byl stanoven buněčný grading dle Fuhrmanové. Séra od pacientů byla získána opakovanými odběry periferní žilní krve provedenými v den operace, v období 5.-7. dne po operaci a 8 týdnů po operaci. Hodinu po odběru byl každý odebraný vzorek krve 10 minut centrifugován při 3000 rpm. Séra pak byla rozdělena do dvou alikvotů a skladována při -20°C do zpracování. Kontrolní séra byla získána od 14 zdravých dárců krve podobného věkového složení.

Metoda

Pro stanovení hladiny angiogenních faktorů byla použita metoda protein arrays firmy RayBiotech (USA), RayBio Human Angiogenesis Antibody Array I. Podstatou je membrána pokrytá spoty (skvrnami, oblastmi), kde jsou navázány specifické protilátky proti jednotlivým vyšetřovaným faktorům. Po aplikaci vzorku se analyzované proteiny naváží na příslušné protilátky. V dalším kroku je aplikována směs protilátek proti měřeným proteinům značená enzymem. Vzniklé imunokomplexy fixované v oblasti příslušných spotů jsou vizualizovány vhodnou barevnou reakcí. Výsledkem je membrána s viditelnými skvrnami o různé intenzitě. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny. Membrána obsahuje kromě měřených parametrů ještě negativní a pozitivní kontroly. 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. Statistické porovnání naměřených hodnot bylo provedeno pomocí programu Sigmatat.

Výsledky

Nemocní s RCC, 11 žen a 21 mužů, Ř 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. Tabulka ukazuje porovnání hladin angiogeninu, PDGF a MCP-1 v den operace, týden po operaci a 8 týdnů po odstranění tumoru.

Diskuse

Angiogenin je polypeptid enzymatické povahy, který stimuluje endotelové buňky k produkci prostacyklinu (aktivuje fosfolipázu C a fosfolipázu A_2), omezuje produkci adhezních molekul (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular adhesion molecule-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 (8). 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 (9) a špatnou prognózou ve studii druhé (3).

PDGF (platelet-derived growth factor) je mitogen stimulující proliferaci fibroblastů a produkci kolagenu. Má význam pro formování nového lumen cévy. Zvyšuje syntézu kolagenu a působí jako chemoatraktant pro endotelové buňky. Původně byl izo-

MONITOROVÁNÍ A PREDIKCE V ONKOLOGII

lován z destiček, ale také ho exprimují za různých podmínek fibroblasty, keratinocyty a různé další buněčné typy. PDGF a jeho receptory jsou homo- a heterodimerické proteiny o dvou samostatných α a β podjednotkách. Endoteliální buňky exprimují jen PDGF- β receptor. PDGF má nepostradatelnou úlohu ve stabilizaci cév (2).

MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) je chemokin, který má různé role v nádorovém růstu a progresi. Vedle chemotaktické aktivity vykazuje také indukci angiogeneze. Je členem CC chemokinové rodiny a hraje důležitou úlohu v aktivaci monocytů v průběhu akutního zánětu. Dále ovlivňuje i NK buňky, basofily a T lymfocyty, které všechny exprimují chemokinové receptory, predominantně CC-chemokinový receptor 2.

S nádorem asociované makrofágy jsou komponentou stromatu a hrají v nádoru duální roli. S nádorem asociované makrofágy mohou produkovat množství angiogenních faktorů, cytokinů a proteáz, které podporují nádorovou progresi. Mnohé studie ukazují, že infiltrace nádoru makrofágy má negativní efekt na přežívání pacientů. Je také prokázáno, že s nádorem asociované makrofágy mohou být tumoricidní a mohou vyvolat IL-2, IL-12, a IFN- γ mediovanou destruktivní reakci (5).

Tabulka: Porovnání sérových hladin angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s RCC v průběhu léčby

	kontrola (n 14)	I.+ II.stadium	III. stadium	IV. stadium	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.
angiogenin										
odběr 1	40,44 $\pm$ 1,67	48,13 $\pm$ 5,12	51,94 $\pm$ 3,39	47,57 $\pm$ 3,73	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 2		48,50 $\pm$ 6,36	50,25 $\pm$ 4,11	52,14 $\pm$ 4,19	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,002	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		48,34 $\pm$ 5,10	50,67 $\pm$ 2,46	48,90 $\pm$ 4,75	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
PDGF										
odběr 1	39,11 $\pm$ 2,46	44,08 $\pm$ 5,37	42,94 $\pm$ 3,99	35,49 $\pm$ 3,96	p = 0,002	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,025
odběr 2		46,93 $\pm$ 4,76	44,87 $\pm$ 2,63	41,34 $\pm$ 7,58	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		45,89 $\pm$ 4,76	44,01 $\pm$ 2,40	43,56 $\pm$ 2,53	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p < 0,001	n.s.	p < 0,001
MCP-1										
odběr 1	9,78 $\pm$ 3,66	20,57 $\pm$ 7,81	23,06 $\pm$ 5,69	13,43 $\pm$ 5,58	p = 0,002	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,025
odběr 2		25,57 $\pm$ 7,85	25,44 $\pm$ 7,65	17,33 $\pm$ 7,89	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		23,86 $\pm$ 7,55	25,49 $\pm$ 8,01	9,83 $\pm$ 5,33	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p < 0,001	n.s.	p < 0,001

Závěr

- 1) Sérové hladiny angiogeninu byly před operací významně vyšší u nemocných s RCC oproti zdravým dárcům krve a přetrvávaly ještě 5.-7. den a dokonce i 8. týden po odstranění tumoru. Nebyly však prokázány signifikantní rozdíly hladin angiogeninu mezi jednotlivými stádii choroby.
- 2) Hladiny MCP i PDGF v séru nemocných s RCC I.-III. stadia byly významně zvýšené oproti skupině zdravých osob.
- 3) U pacientů IV. stadia jeví ze třech sledovaných parametrů pouze angiogenin předoperačně i pooperačně statisticky významně zvýšenou hladinu v porovnání s hladinou u zdravých osob.
- 4) Nemocní s pokročilým RCC (IV. stádium) měli nižší sérové hodnoty MCP i PDGF. Tento náález je možné považovat za projev imunitní nedostatečnosti na základě nutriční poruchy, poruchy vnitřního prostředí, faktorů produkovaných nádorovými buňkami.

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu výzkumného záměru IGA MZ ČR: NR/8914-4.

Literatura

1. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. Eur J Int Med 2003; 14: 459-469.
2. Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factor in the molecular control of angiogenesis. Nucl Med 2003; 47: 149-61.
3. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmidt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S. 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.
4. Kim W, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. Curr Opin Genetics Develop 2003; 13: 55-60.
5. Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. Clin Cancer Res 2005; 11 (21): 7629-7636.
6. Lukešová Š, Kopecký O, Dvořák J, Hlávková D, Vroblová V. Nádorová angiogeneze. Vnitřní lékařství 2006; 52: 797-800.
7. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. Seminars Cancer Biol 2004; 14: 123-130.

MONITOROVÁNÍ A PREDIKCE V ONKOLOGII

8. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Loteta B, Quartarone E, Gangemi D, Massara E, Calabro L. Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications. Eur J Haematol 2004; 72: 416-19.
9. Sheen-Chen SM, Eng HL, Chen WJ, Chou FF, Chen HS. Serum level of angiogenin in breast cancer. Anticancer Res 2000; 20: 4769-71.
10. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GYH Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. J of Tromb and Haem 2006; 4: 1864-1874.