

## 44 Sledování hladin angiogenu, EAN-78, GRO, IL-8 v séru nemocných s renálním karcinomem v průběhu léčby.

Kopecký O.<sup>1,5</sup>, Lukešová Š.<sup>1,5</sup>, Vroblová V.<sup>2</sup>, Andrýs C.<sup>2</sup>, Morávek P.<sup>3</sup>, Podhola M.<sup>4</sup>, Vokurková D.<sup>2</sup>, Šafránek H.<sup>3</sup>

1) Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2. interní klinika

2) Ústav klinické imunologie a alergologie

3) Urologická klinika

4) Fingerlandův ústav patologické anatomie

5) Oblastní nemocnice Náchod, Onkologické oddělení

### Úvod

Neovaskularizace je důležitá pro růst a metastazování solidních tumorů. Je prokázáno, že u řady tumorů „microvessel density“ koreluje s maligním potenciálem. Maligní buňky jsou během nádorové expanze vystaveny hypoxii, která je hlavním stimulem syntézy peptidů podporujících neovaskularizaci. Za fyziologické situace je tento dynamický vztah mezi proangienními a antiangienními stimuly vyvážený. V případě neoplastických procesů převažuje vliv proangienních faktorů. Solidní tumory nejsou tvořeny pouze nádorovými buňkami, ale v nádorové tkáni se nachází i stromální buňky. Nádorové buňky společně se stromálními buňkami vytváří cytokinové a chemokinové mikroprostředí, které má zásadní vliv na růst nádoru a protinádorovou imunitní odpověď. „Tumor-associated macrophages“ (TAMs) jsou hlavní komponentou stroma. Aktivované TAMs jsou schopny přímo zabít nádorové buňky, ale také produkují TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, proteinázy a metabolity kyseliny arachidonové. Působením angienních faktorů, produkovaných nádorovými buňkami, TAMs exprimují VEGF-C (Vascular endothelial growth factor), VEGF-D, a VEGFR-3 (VEGF receptor-3), které se podílí na lymfangiogenezi a šíření metastáz lymfatickými cévami. Řada studií dokládá významnou korelaci mezi TAMs a „tumor vessel density“ a jejich negativní vliv na přežití pacientů. TAMs se diferencují z monocytů, které vstupují do nádorové tkáně působením chemoatraktivních peptidů, chemokinů. VEGF byl považován za hlavní proangienní mediátor. Výsledky fáze II klinické studie, hodnotící klinický efekt humanizované monoklonální protilátky anti VEGF (bevacizumab), tuto představu nepotvrdily. Proto je nutné hledat další faktory zasahující do regulace angiogeneze. ELR+ CXC chemokiny výrazně zesilují angiogenezi u různých typů nádorů. Growth-related oncogene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (GRO- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (CXCL1, CXCL2, CXCL3 chemokine) byl prokázán na melanomových buňkách a potencoval jejich proliferaci. U nemocných s non-small cell lung carcinoma potencoval nádorový růst, vaskularizaci a metastazování epithelial-neutrophil-activating peptid 78 (ENA-78) (CXCL5 chemokine) a IL-8 (CXCL8 chemokine). Tyto nálezy opravňují k vyslovení domněnky, že ELR+ CXC chemokiny jsou důležitým faktorem malignity i u dalších nádorů, jako je například karcinom ledviny.

### 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  $-20^{\circ}\text{C}$  do zpracování. Kontrolní séra byla získána od 14 zdravých dárců krve podobného věkového složení.

### Metoda

Pro stanovení hladiny angienních 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 Evaluati-

**MONITOROVÁNÍ A PREDIKCE V ONKOLOGII**

on System (Baria, Czech Republic). Výsledná koncentrace jednotlivých proteinů je vyjádřena jako relativní hodnota zbarvení spotů vzhledem ke kontrolám. Statistické porovnání naměřených hodnot bylo provedeno pomocí programu Sigmatat.

**Výsledky**

Nemocní s RCC, 11 žen a 21 mužů, průměrný věk 65,9 roků, byli rozděleni do tří skupin podle TNM klasifikace (10. revize z roku 2002), stádia choroby I – IV., metastatická postižení ve skupině 9 nemocných RCC IV. stadia jsou uvedeny v tabulce. č. 1. Výsledky měření jsou uvedeny tabulce č. 2.

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

ž – žena m - muž

**Tab. č. 1:**  
Charakteristika souboru nemocných

**angiogenin**

	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.
odběr r 1	40,44 ± 1,67	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.
odběr r 2		48,50 ± 6,36	50,25 ± 4,11	52,14 ± 4,19	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,002	n.s.	n.s.
odběr r 3		48,34 ± 5,10	50,67 ± 2,46	48,90 ± 4,75	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.

**EAN-78**

	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.
odběr r 1	3,20 ± 1,44	9,77 ± 3,34	14,25 ± 2,92	6,78 ± 3,28	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p = 0,009	n.s.	p < 0,001
odběr r 2		11,54 ± 4,74	15,06 ± 5,34	10,22 ± 4,18	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,036	n.s.	n.s.	n.s.
odběr r 3		12,36 ± 4,23	12,68 ± 4,99	8,85 ± 2,21	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,04	n.s.	n.s.	n.s.

**GRO**

	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.
odběr r 1	9,53 ± 2,87	23,96 ± 7,41	30,69 ± 5,44	25,54 ± 5,59	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
odběr r 2		31,23 ± 7,72	31,88 ± 7,14	26,51 ± 7,94	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
odběr r 3		31,23 ± 7,72	28,36 ± 7,22	21,61 ± 9,12	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,004	n.s.	n.s.	p < 0,001

**IL-8**

	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.
odběr r 1	2,78 ± 2,24	4,06 ± 2,43	6,44 ± 3,54	6,72 ± 4,61	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr r 2		2,03 ± 2,06	2,44 ± 1,80	6,72 ± 4,61	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr r 3		1,96 ± 2,00	2,85 ± 2,20	1,53 ± 1,69	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tab. č. 2:**  
Porovnání sérových hladin angiogeninu, EAN-78, GRO, IL-8 u nemocných s RCC v průběhu léčby

**MONITOROVÁNÍ A PREDIKCE V ONKOLOGII****Závěr**

- 1) Sérové hladiny angiogeninu byly před operací významně vyšší u nemocných s RCC oproti zdravým dárčům 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 ELR+ CXC chemokinů (ENA-78, GRO) v séru nemocných s RCC byly významně zvýšené oproti skupině zdravých osob. Na rozdíl od angiogeninu, 8. týden po odstranění tumoru došlo ke snížení hladin ENA-78 a GRO. Oba chemokiny jsou produkovány nádor infiltrujícími monocyty a dendritickými buňkami a podporují vstup polymorfonukleárních leukocytů do nádoru. Zdá se, že oba CXC chemokiny lépe odrážejí intenzitu jak protinádorové imunitní odpovědi, tak neoangiogeneze.
- 3) Nemocní s pokročilým RCC (IV. stádium) měli nižší sérové hodnoty ENA-78 a GRO. Tento náález je možné považovat za projev imunitní nedostatečnosti při pokročilém nádorovém onemocnění (nutriční poruchy, změny vnitřního prostředí, faktory produkované nádorovými buňkami).
- 4) Na rozdíl od prací sledujících produkci IL-8 u jiných malignit, nenalezli jsme porovnáním skupiny zdravých osob a nemocných s RCC rozdíly v jeho hladinách. Je však třeba ověřit, zda tento závěr není ovlivněn volbou metody detekce, a vyšetření zopakovat s využitím standardní ELISA metody.

*Literatura*

1. Smith D.F., Galkina E., Ley K., Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *AJP-Heart Circ Physiol*, 76: 1976-1984, 2005
2. Scimone M.L., Lutzky V.P., Zittermann S.I., Maffia P., Jancic C., Buzzola F., Issekutz A.C., Chuluyan H.E. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 114: 375-385, 2005
3. Mestas J., Burdick M.D., Reckamp K., Pantuck A., Figlin R.A., Strieter R.M. The role of CXC2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J.Immunol.* 175: 5351-5357, 2005
4. Tello-Montoliu A., Patel J.V., Lip G.Y.H. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. 4: 1864-1874, 2006