

## ANGIOGENEZE A ANTI-ANGIOGENNÍ TERAPIE U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ SE ZAMĚŘENÍM NA CIRKULUJÍCÍ VASKULÁRNÍ ENDOTELIÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR (VEGF)

## ANGIOGENESIS AND ANTI-ANGIOGENIC THERAPY IN MALIGNANT DISEASES WITH RESPECT TO CIRCULATING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

ŠIMÍČKOVÁ M., DUBSKÁ L., KOCÁKOVÁ I., NEKULOVÁ M., NENUTIL R., DEMLOVÁ R., VALÍK D.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

### Souhrn

Po desetiletích, kdy je známo, že angiogeneze je zásadním krokem pro progresi růstu nádorů, se inhibitory angiogeneze stávají součástí léčby maligních onemocnění. Jedním z prvních testovaných angiostatik je bevacizumab (Avastin), protilátka proti VEGF, tj. vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru. VEGF, jeden z hlavních iniciátorů angiogeneze, který je produkován nádorovými buňkami, indukuje vaskularizaci tumoru endoteliemi okolní tkáně nádoru a prekurzory endoteliálních buněk z kostní dřeně. Snaha nalézt vhodný prediktivní parametr pro ověření účinnosti anti-angiogenní terapie vedla k otázce, zda by tímto faktorem mohla být hladina VEGF v cirkulaci nebo nádorové tkáni, ev. výskyt endoteliálních buněk v periferní krvi. V této práci jsou shrnuty současné poznatky o angiogenezi při maligním procesu se zaměřením na VEGF, jeho vlastnosti a možnosti stanovení především v cirkulaci ve vztahu k efektu anti-angiogenní terapie.

**Klíčová slova:** angiogeneze, VEGF, stanovení VEGF v cirkulaci, anti-angiogenní terapie

### Summary

After decades of observation that angiogenesis plays a key role in tumor progression, inhibitors of angiogenesis are becoming a part of therapy of malignant diseases. One of the first tested angiostatic substances is bevacizumab (Avastin), an antibody against VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF, one of the most important initiators of angiogenesis, is produced by tumor cells, and induces vascularization of the tumor via endothelial cells of the tumor tissue and endothelial precursor cells from the bone marrow. An effort to find suitable prognostic and predictive markers for the anti-angiogenic therapy monitoring is focusing also on VEGF in circulation, or on presence of circulating endothelial cells in peripheral blood. In this study we summarize recent knowledge on angiogenesis in the malignant process, with special regard to VEGF, its characteristics, and possibilities of its determination predominantly in blood in connection with anti-angiogenic therapy.

**Key words:** angiogenesis, VEGF, determination in circulation, anti-angiogenic therapy.

### ANGIOGENEZE A VEGF.

Angiogeneze, tvorba nového cévního zásobení, je klíčovým krokem v mnoha fyziologických a patologických procesech (review 1-4). Prvním stupněm procesu tvorby krevního řečiště během ontogeneze je vaskulogeneze, tj. in situ diferenciace endoteliálních prekurzorových buněk a tvorba primitivní cévní sítě (1). Normální vaskulatura v dospělosti je pak tvořena z této sítě expanzí a remodelováním, tj. větvením a vzájemným propojováním. Tvorba cévního zásobení je nutná především v embryogenezi, kdy se vytváří primární vaskulatura nutná k růstu a vývoji orgánů. Angiogeneze jako proces se vyskytuje i v některých krocích postnatálního fyziologického vývoje, jako v ovariálním reprodukčním cyklu, v procesech spojených s vývojem retiny, ev. při hojení ran. Jedním z hlavních iniciátorů tohoto procesu je VEGF (review 4-6).

Vlastní angiogeneze je řízena celým souborem regulátorů,

z nichž mnohé vykazují *proangiogenní efekt, jiné zase anti-angiogenní působení* (tab.1) (4, 7). Za fyziologického stavu jsou obě skupiny faktorů v rovnováze.

Poznání molekulárních mechanismů angiogeneze umožnilo rozlišit dvě třídy chorob spojených s těmito procesy (4, 5). Do první skupiny patří poruchy, kdy terapeutické *navození angiogeneze* může opravit původní poškození tkáně (arterioskleróza, infarkt myokardu, ischemie dolních končetin). Druhou skupinu představují choroby, kdy potlačení *patologicky zvýšené angiogeneze* může vést k léčbě choroby či zpomalení její progresi (retinopatie, benigní a maligní choroby a progresse maligních nádorů).

Nádorem indukovaná angiogeneze je proces, který umožňuje dostatečný přísun kyslíku a živin nádorovým buňkám (1, 5). Je známo, že růst nádoru zásobovaném prostou difuzí nepřekročí velikost 1-2 mm v průměru, další vývoj je možný pouze

po vytvoření nového cévního zásobení. Nádory mohou vytvořit svou vlastní vaskulaturu buď z již existujících kapilár, nebo se na tomto procesu mohou podílet cirkulující prekurzorové endoteliální buňky odvozené z kostní dřeně. Nádorem indukované cévní sítě slouží k přísunu metabolitů nutných pro růst nádorů a ultrastrukturálně vykazují výrazné abnormality (5). Mezi nejdéle studované proangiogenní faktory patří VEGF, na jehož roli při aktivaci endoteliálních buněk se zaměřil vývoj anti-angiogenní protinádorové terapie (1, 8-12).

**Tabulka č.1.:** Nejdůležitější pro-angiogenní a anti-angiogenní látky (podle 4, 7)

A. Pro-angiogenní				
Růstové faktory *)	Cytokiny	Chemokiny	Hormony	Matrix proteiny
Ang-1	IL-1b	PBSF	androgen	fibrin
EGF	IL-6		estrogen	trombin
FGF1-9	IL-8		leptin	CYR61
IGF-1,2	TNF-alfa			CTGF
PDGF				
PIGF				
VEGF				

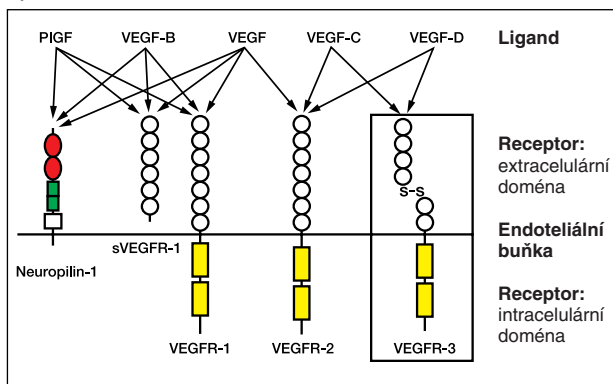
  

B. Anti-angiogenní			
Růstové faktory	Cytokiny	Proteinázy	Inhibitory proteináz
Ang-2	IFN alfa, beta	antitrombin-III	TIMP-1
TGF-beta	PF-4	endostatin	maspin
	IL-12	angiostatin	PAI-1
	IL-18	protrombin F1-2	

\*) Ang-1,2: angiopoietin, EGF: epidermal growth factor, FGF: fibroblast growth factor, IGF-1,2: insulin-like growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, PIGF: placental growth factor, TNF-alfa: tumor necrosis factor, PBSF: pre B-cell stimulating growth factor, CYR61: Cystein-rich, angiogenic inducer 61, CTGF: connective tissue growth factor, TGF-beta: transforming growth factor, IFN: interferon, PF-4: platelet factor 4, TIMP-1: inhibitor matrixmetalo-proteináz, PAI-1: inhibitor plazminogenového aktivátoru

## VEGF - STRUKTURA, VLASTNOSTI, FUNKCE.

**VEGF - struktura.** VEGF patří mezi specifické cytokiny (*třída cytokinů č.XI*), které mají silné angiogenní účinky a projevují se in vitro i in vivo mnoha efekty. U savců byly prokázány VEGF-A (nazývaný rovněž pouze VEGF), dále VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E (tzv. virální faktor) (1, 10). Dále do této skupiny patří placental growth factor (PIGF) a platelet-derived growth factor (PDGF) (10). Jednotlivé molekuly se liší molekulovou hmotností a typem dimerizace (homo-, heterodimery). Homologické oblasti uvedených molekul jsou zachovány obzvláště v centrální doméně. Rozpustná izoforma VEGF-A je dimerický glykoprotein o velikosti 36-46 kDa, který váže heparin. Nejčastější formou ve tkáni je VEGF<sub>165</sub>, 183, 189, 206, zatímco v cirkulaci nacházíme jak VEGF<sub>121</sub> tak i VEGF<sub>165</sub>. **Lidský gen pro VEGF-A** je organizován v 8 exonech oddělených 7 introny a je lokalizován na chromozomu 6p21.3. Je známo alespoň 6 izoform proteinů, které vznikají alternativním sestřihem z VEGF genu s rozdílným počtem obsahem aminokyselin v každém monomeru.



**Obr. 1.:** Typy receptorů VEGF a jejich ligandů (podle 10)

**Receptory VEGF:** VEGF se mohou vázat na tři specifické tyrozinkináznové receptory: VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (KDR/flk1) a VEGF-R3 (flt-4) (1, 8), lokalizované především na endoteliálních buňkách (obr. 1). Receptory R1 a R2 jsou tvořeny sedmi Ig-podobnými doménami lokalizovanými extracelulárně, mají jednoduchou transmembránovou oblast, uvnitř buňky je tyrozinkináznová doména. Expresce receptorů je zvýšena u migrujících nebo proliferujících endoteliálních buněk. Receptor typu VEGF-R1 váže přednostně VEGF-A a B, zatímco receptor VEGF-R2 váže především VEGF-C a D, vyskytující se převážně v endoteliu lymfatických cév (1) (obr. 1). Dále se mohou VEGF vázat rovněž na koreceptory neutropiliny (1). Rozpustná varianta VEGF-R1 (sVEGFR-1), která nemá transmembránovou a tyrozinkináznovou doménu, může sice vázat ligandy, ale nespouští proces signalizace (obr. 1).

Přestože původní studie svědčily o přítomnosti těchto receptorů pouze na endoteliálních buňkách, byla v poslední době prokázána exprese VEGF-R1 přímo na nádorových buňkách, např. na buněčných liniích odvozených z karcinomu pankreatu, plic, ovaria a kolorekta (12). Aktivace těchto buněk prostřednictvím VEGF vede k procesům spojeným s fenotypovými změnami asociovanými s nádorovou progresí a metastazováním (12). Je tedy možné, že anti-angiogenní terapie, která blokuje účinek VEGF, má nejen vliv na endoteliální buňky, ale i přímý efekt na potlačení proliferativního potenciálu nádorových buněk. Naskytla se otázka, zda exprese receptorů VEGF v primární nádorové tkáni by nebyla vhodným prediktivním faktorem pro sledování efektu anti-VEGF-terapie (12).

**Regulace exprese VEGF.** Tvorba VEGF je indukována různými mechanismy, z nich nejdůležitější a experimentálně potvrzené jsou hypoxie, vliv různých růstových faktorů (TGF-alfa, beta, IGF-1, PDGF) a cytokinů (IL-1 a IL-6). K dalším regulatorům syntézy patří i některé hormony. K indukci exprese dochází i onkogenními mutacemi či amplifikacemi různými onkogeny (H-ras, HER-2/neu) (1).

Vlastní **molekulární mechanismus účinku VEGF** spočívá v jeho vazbě na receptor (obvykle na endoteliální buňce), čímž se spouští signalizační VEGF kaskáda. Ta začíná autofosforylací tyrozinkinázy, pak následuje aktivace dalších proteinů této řady. Receptor VEGF-R2 je odpovědný za udržení mikrovaskulární permeability, za rychlý vzrůst koncentrace kalciových iontů a za následnou *proliferaci endoteliálních buněk* a migraci. Signalizační cesty VEGF-R1 jsou dosud méně prostudovány (1, 10). VEGF se tedy podílí na udržení *viability endoteliálních buněk* prostřednictvím *proliferace* a *inhibice jejich apoptózy*. Dále má přímý vliv na *vaskulární permeabilitu* - jeho působením dochází k jejímu zvýšení (dříve byl VEGF nazýván vaskulární permeabilitní faktor) (1). VEGF *stimuluje tvorbu vaskulární sítě*, umožňující zásobení tumoru kyslíkem a živinami nutnými pro jeho růst. VEGF se rovněž podílí na *tvorbě lymfatických cév* nutných k metastazování. Jistou roli hraje v *potlačení imunitní odpovědi na nádorový proces*: VEGF má vliv na maturaci dendritických buněk, nutnou pro buněčnou imunitní odpověď a zřejmě se podílí i na chemotaxi monocytů (13).

Další molekuly této skupiny, tj. VEGF-B, C, D, E a PIGF, jsou dosud předmětem studia. Předpokládá se, že PIGF působí na podobné úrovni jako VEGF-A. VEGF-B není zřejmě bezpodmínečně nutný pro embryonální vývoj obecně, hraje však roli v kardiovaskulárním vývoji. VEGF-C a VEGF-D se spolupodílejí na tvorbě endotelia lymfatických cév (1).

## PROTINÁDOROVÁ TERAPIE ZAMĚŘENÁ NA ANGIOGENEZU.

Hypotéza o možném zablokování růstu nádorů inhibicí angiogeneze byla vyslovena již před více než 30 lety (Folkman 14, Weidner 15, viz review 1). Anti-angiogenní terapie studovaná na experimentálních modelech různých nádorových linií se projevuje několika základními mechanismy: indukuje apoptózu endoteliálních buněk, inhibuje růst nádorových buněk a indukuje jejich nekrózu. Použití tohoto typu terapie u nemocných s malými nádory (16) se jeví být velice nadějně.

Jeden z prvních testovaných inhibitorů angiogeneze, protilátka proti VEGF-A (A.4.6.1), byla následně humanizována a užitá pro klinické účely (bevacizumab, Avastin) (17-24). Bylo prokázáno, že je účinná u metastatických kolorektálních karcinomů i dalších typů solidních tumorů. Principem jejího účinku je zabránění interakce ligandu s povrchovými doménami receptorů (18). Mechanismus potenciace účinku souběžně užitých cytotoxických chemoterapeutik při podání anti-VEGF protilátky není dosud detailně objasněn. Lze předpokládat, že anti-VEGF terapie se může podílet na „normalizaci“ původně chaotické vaskulatury nádorů, čímž se sníží intratumorální tlak a především zlepší přísun terapeutických cytostatik do nádoru (18-22). Klinické výsledky prokazují významný posun v mediánu celkového přežití tam, kde je anti-VEGF terapie bevacizumabem použita, a to obvykle v kombinaci s jiným chemoterapeutikem (24). Aktuální snahy o blokádu angiogeneze jsou však vedeny i dalšími směry (na takto orientovaný výzkum je zaměřeno přes sto firem!) (tab.2). Jsou testovány procesy inhibice angiogeneze prostřednictvím modifikace receptoru i inhibiči katalytického místa tyrozinkinázové domény VEGF receptorů. Ve fázi II a III klinického testování jsou inhibitory ZD6474, PTK787 a SU11248, které specificky blokují VEGF-R1 a VEGF-R2. Přímo inhibiči proliferace endotelálních buněk mohou působit i další látky, jako např. thalidomid, angiostatin; studovány jsou i inhibitory aktivity integrinu (19, 21, 22, 23).

**Tabulka č.2.:** Inhibitory angiogeneze v experimentálním i klinickém testování (podle 21)

Třída inhibitoru	Typ	Látka	Cíl působení
A. působící na VEGF	Protilátky	Bevacizumab	VEGF-A
		HuMV833	VEGF
	Rozpuštěný receptor	VEGF- Trap	VEGF a PIGF
B. působící na VEGFR	Protilátky	IMC-1121b	VEGFR-2
		Sumitib (SU11248)	VEGFR-2, PDGFR, c-kit
	Inhibitory -malé molekuly	Vatalanib (PTK787 /ZK222584)	VEGFR-1/2/3, PDGFR, c-kit
		ZD6474	VEGFR-2, EGFR, FGFR-1
		CP574, CP632	VEGFR-2, FGFR
		AZD 2171	VEGFR-1/2/3
		GW 786034	VEGFR-1/2/3
		Sorafenib (BAY 43-9006)	VEGFR-2/3, RAF kináza
	Ribozymy	Angiozym	VEGFR
	C. jiné	Inhibitory proliferace endotelii	ABT-510
Angiostatin			různý
Thalidomid			TNF-alfa
Inhibitory aktivity integrinů		Medi-522	integriny
		Cilengitide (EMD12194)	integriny
Inhibitory vaskulární		Combretastatin A	endotelální tubulin
		AVE8062A	endotelální tubulin
	ZD6126	endotelální tubulin	
	AS1404 (DMXAA)	indukce TNF-alfa	

## MOŽNOSTI MONITOROVÁNÍ ANTI-ANGIOGENNÍ TERAPIE SE ZAMĚŘENÍM NA VEGF

Jako standardní prognostický ukazatel pro predikci vzniku metastáz i bezpříznakového a celkového přežití nadále patří zhodnocení nádorové angiogeneze prostřednictvím vyšetření mikrovaskulární denzity (15, 25). Snaha najít vhodný prediktivní kvantitativní marker vázaný k angiogenezi pro sledování účinku anti-angiogenní terapie nepřinesla dosud jednoznačné výsledky. Mnoho navržených metod má stále určitá omezení a nejsou tedy hodnoceny jako optimální: byla testována exprese různých angiogenních faktorů ve tkáni primárních nádorů, ev. jejich sérových, plazmatických či močových hladin, jako VEGF, bFGF, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) a matrix metaloproteináz. Dále byly pro tyto účely navrženy různé bioptické postupy, radiologické metody nebo metody průkazu a kvantifikace cirkulujících endotelálních buněk apod.

## VEGF V CIRKULACI.

Stanovení cirkulujícího VEGF. Optimalizace stanovení cirkulujícího VEGF je stále diskutovaným problémem ve vztahu k různým frakcím krve. Je totiž známo, že sérum obsahuje vyšší koncentraci VEGF než EDTA či citrátová plazma. Je to způsobeno tím, že VEGF se uvolňuje při aktivaci destiček, do

určité míry i z leukocytů (26-33). Ve srovnání s plazmou jsou sérové hladiny až pětinasobně vyšší o množství VEGF získané aktivací koagulační kaskády, s následným uvolněním VEGF během agregace destiček (33-35).

Je známo, že nádorové buňky se podílejí na aktivaci koagulačního systému, a to především produkcí prokoagulačních a fibrinolytických faktorů a cytokinů (35). Neméně důležité jsou však interakce mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a trombocyty, endotelijními buňkami a monocytami-makrofágy (35). Tyto interakce byly prokázány i in vivo experimenty, kdy aplikace nádorových buněk pokusným zvířatům vedla k agregaci trombocytů. Z dosavadních experimentů je vyvozováno, že trombocyty jako rezervoár VEGF mohou hrát významnou roli při tumorigenezi a jejich aktivace při adhezi nádorových buněk se může projevit zvýšenou permeabilitou nádorových buněk (33, 34).

Nemocní s pokročilým nádorovým onemocněním mají často abnormality v procesu koagulace a zvýšený metabolický obrát trombocytů (27, 32, 35). Trombocyty vyskytující se po chemoterapii či jako důsledek hematopoetické regenerace jsou obvykle větší velikosti než ty, které jsou produkovány během myelopoese v normálním stavu, zároveň obsahují i vyšší množství VEGF. Korelace mezi sérovým VEGF a počtem trombocytů nebyla vždy jednoznačně prokázána (30, 34).

Optimální krevní frakce pro vyšetřování cirkulujícího VEGF při rozlišení skupiny zdravých a nemocných s kolorektálním karcinomem byla testována na přesně definovaných frakcích krve. Bylo analyzováno sérum, plazma (citrátová nebo heparinová), plazma chudá na trombocyty (P-PP), tj. odebraná v přítomnosti inhibitorů degranulace trombocytů (CTAD plazma = citát sodný, theofylin, adenosin a dipyrindamol), a dále plazma obohacená aktivovanými trombocyty (P-APR). Vysoce signifikantní diference mezi zdravými kontrolami a nemocnými s kolorektálním karcinomem vykazoval model odběru plazmy obohacené o trombocyty (P-APR) (26, 36, 37). Dosavadní výsledky dosud nejsou uzavřeny: stanovení v plazmě je v nízkých hladinách zatíženo vyšší analytickou chybou (36), pro vyšetření VEGF v séru je třeba zabezpečit maximální koagulaci a hodnotu VEGF je doporučeno vztáhnout na počet trombocytů.

Metody stanovení VEGF v cirkulaci, falešná pozitivita v cirkulaci. Pro kvantitativní detekci solubilní formy VEGF existují komerční ELISA techniky, detekující izoformu typu VEGF<sub>121</sub> a VEGF<sub>165</sub>; mezi oběma systémy nebyly nalezeny signifikantní diference v hladině cirkulujícího VEGF. V poslední době se objevila technika zvaná RELIDA - **RE**ceptor **L**igand **D**etection **A**ssay, která je založena na kvantifikaci biologicky aktivní formy VEGF vazbou na solubilní VEGFR1. Hladiny cirkulujícího VEGF nekolísají během menstruačního cyklu (31). Falešná pozitivita VEGF v cirkulaci může být způsobena interferencí léčiv, např. acylpyrimem, nesteroidními protizánětlivými látkami, dále chronickým zánětem, diabetem, ischemickou chorobou atd.

## VEGF - VYUŽITÍ V ONKOLOGICKÉ PRAXI.

Lokalizace VEGF ve tkáni: VEGF je slabě exprimován v mnoha lidských i zvířecích normálních tkáních, vysoká produkce je charakteristická pro lokality, kde je angiogeneze nutnou podporou vývoje tkáně (fetální tkáň, placenta). Zvýšená exprese VEGF byla prokázána rovněž v mnoha maligních nádorech (tab.3) (38). Zvýšený výskyt koreluje obvykle s prognózou onemocnění, definovanou jak agresivitou růstu, tak i metastazováním a kratším přežitím. V metastatických ložiscích kolorektálního karcinomu byla imunohistochemicky prokázána výrazná exprese VEGF jako negativní prognostický faktor, která rovněž korelovala se stupněm mikrovaskulární denzity především pro nemocné stadia Dukes B (39-41). Prognostický význam VEGF však nebyl prokázán v některých studiích pro karcinomy prsu, ať už při vyšetřování imunohistochemicky či kvantitativně z cytozolu (42), podobně i pro thyroideální léze (43). Vzájemná korelace byla nalezena i mezi koncentrací VEGF v plazmě a jeho průkazem ve tkáni (39). Bylo zjištěno, že koncentrace VEGF

stanovená v mezenterických nádorových vénách u metastazujících kolorektálních nádorů je výrazně zvýšena proti nemetastazujícím nádorům s nižším gradíngem (44).

**Tabulka č. 3.:** Expres VEGF v maligních nádorech a jeho prognostický význam (podle 38)

Typ tumoru	Expres VEGF % nádorů	Prognostický význam prokázán pro:
kolorektální ca	45-60	návrat choroby, přežití
mammární ca	30-60	přežití
nemalobuněčný ca plic	45-90	návrat choroby, přežití
ca ledvin	30-100	staging, gradíng
ca pankreatu	75-90	přežití
ca prostaty	30-80	bezpříznakové přežití
glioblastom	65-85	přežití

Na in vitro modelu bylo ověřeno, že expres VEGF v nádoru může způsobovat biologicky agresivní fenotyp nádorů exprimujících vyšší HER-2/neu (45, 46). Her-2/neu signalizace může působit ve smyslu produkce VEGF a tedy neovaskularizace. Prognostický význam VEGF i HER-2/neu v cytozolu primárního nádoru byl potvrzen: Kaplan-Meierovy křivky přežití byly významně horší pro nádory, kde byly silně exprimovány oba parametry. Naskýtá se tedy otázka, zda by nebylo vhodné kombinovat specificky cílenou terapii protilátkami proti oběma antigenům.

Prognostický význam cirkulujícího VEGF nemocných s maligními nádory byl zhodnocen ve skupině nemocných s kolorektálním karcinomem (26, 47-49), u karcinomu prsu (50, 51), u karcinomu plic (52-54), u karcinomu cervixu (55), u melanomu (56), karcinomu ledvin (57), u dětských malignit - osteosarkomů, neuroblastomů a Ewingova sarkomu (58) a u lymfoproliferativních onemocnění (59, 60).

Mezi stupněm nádorové vaskularizace, prognózou onemocnění a hladinou cirkulujícího VEGF byla prokázána korelace u většiny prací. Preoperativní zvýšené koncentrace korelovaly obvykle s kratším intervalem bezpříznakového období a kratším celkovým přežitím. Hladina VEGF byla nezávislým prognostickým ukazatelem i podle hodnocení multivariační analýzou, obvykle korelovala se stadiem onemocnění. Dosud však otázka optimální frakce krve jako materiálu pro hodnocení prognózy pomocí vyšetření VEGF nebyla rozřešena (47-58).

Přestože byl prognostický charakter VEGF v cirkulaci nemocných s různými lokalizacemi zhoubných nádorů prokázán, zůstává stále otázkou, zda je VEGF vhodný prediktivní marker pro sledování účinku terapie protilátkou proti VEGF, bevacizumabem (61). I když je koncentrace cirkulujícího VEGF zvýšena u velkého procenta nemocných s metastatickým postižením, studie analyzující jejich význam pro monitorování tera-

pie dosud nebyly publikovány. Vyšetření VEGF v průběhu terapie protilátkou proti VEGF není technicky jednoduché - při analýze dostupnou komerční ELISA technikou interferuje protilátka bevacizumab s vlastním stanovením VEGF. Význam jeho předterapeutických hladin, které by se mohly na predikci úspěšnosti terapie podílet, nebyl dosud testován.

## CIRKULUJÍCÍ ENDOTELIÁLNÍ BUŇKY.

Na neovaskularizaci se podílejí nejen již existující kapiláry v okolí nádoru, ale také prekursor endoteliálních buněk, které se působením angiogenních faktorů exprimovaných ischemickým nádorem uvolňují z kostní dřevě. V krevním oběhu se tedy vyskytují různé typy endoteliálních buněk (EC); jako **CEC (cirkulující endoteliální buňky)** se zpravidla označují diferencované endoteliální buňky bez proliferčního potenciálu, které se do cirkulace dostaly odloučením z místa aktivované nebo narušené vaskularizace (62), zatímco **CEP (progenitor endoteliálních buněk)** jsou nediferencované prekursor s vysokou proliferční aktivitou mobilizované působením pro-angiogenních cytokinů z kostní dřevě (63, 64). Zvýšená hladina obou typů endoteliálních buněk v periferní krvi tedy nejenže koreluje s výskytem nádorového onemocnění a jeho progresí (65, 66), ale zdá se, že může sloužit také jako prediktivní marker úspěšnosti anti-angiogenní terapie (67). První studie ukazují, že anti-VEGF protilátka snižuje počet CEC v periferní krvi (68) a že míra snížení hladiny CEC u pacientů s metastatickým karcinomem prsu po prvních třech týdnech anti-angiogenní léčby (bevacizumab + erlotinib) je významným prediktorem odpovědi na terapii (69).

Nicméně než bude možné využít míru zastoupení endoteliálních buněk v cirkulaci jako faktor monitorující úspěšnost anti-angiogenní terapie, popř. jako jeden z faktorů limitující přínos této terapie pacienta, je třeba vyvinout spolehlivou a reprodukovatelnou metodu pro detekci těchto buněk. Zastoupení CEC a CEP v periferní krvi je hodnoceno pomocí průtokové cytometrie, ale zatím neexistuje žádná obecně používaná technika k jejich detekci.

**ZÁVĚREM** je možno shrnout: VEGF rodina růstových faktorů hraje důležitou roli ve fyziologické i patologické angiogenezi. Pro účely ovlivnění tohoto procesu je vyvíjeno několik skupin inhibitorů, z nichž některé, např. monoklonální protilátka bevacizumab (Avastin), jsou zaváděny do klinické praxe. Roli cirkulujícího VEGF i dalších potenciálních markerů pro monitorování této terapie, jako např. cirkulujících endoteliálních buněk, je třeba ověřit dalšími experimenty.

Práce byla podpořena VZ MZd č 00020980501-5.

## Literatura.

- Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Nat Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 391-400.
- Folkman J.: Fundamental concepts of angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 2003, 3, 643-651.
- Hurwitz H.: Angiogenic strategies in advanced colorectal cancer. *Cancer biology: Tumor angiogenesis and use of vascular endothelial growth factors.* In: [www.medscape.com/viewarticle/461038\\_42](http://www.medscape.com/viewarticle/461038_42)
- Timar J., Dome B., Fazekas K., Janovics A., Paku S.: Angiogenesis-dependent disease and angiogenesis therapy. *Pathol.Oncol.Res.* 2004, 7, 85-95.
- Papetti M., Herman I.M.: Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am.J.Cell Physiol.* 2002, 282, C947-C970.
- Jain R.K.: Molecular regulation of vessel formation. *Nature Medicine* 2001, 6, 685-694.
- Masopust J.: Patobiochemie buňky. UK Praha, 2003, 102-104.
- Nicosia R.F.: What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am.J.Pathol.* 1998, 153, 11-16.
- Veikkola T., Karkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factors. *Cancer Res.* 2000, 60, 203-212
- Charnock-Jones D.S.: Vascular endothelial growth factors (VEGFs), their receptors and their inhibitors. *Celltransmission* 2005, 21, 1-5.

- Motl S.: Bevacizumab in combination chemotherapy for colorectal and other cancers. *Am. J. Health-Syst.Pharm.* 2005, 62, 1021-1031.
- Fan F., Wey J.S., McCarty M.F., Belcheva A., Liu W., Bauer T.W., Somcio R.J., Wu J., Hooper A., Hicklin D.J., Ellis L.M.: Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cells. *Oncogene* 2005, 24, 2647-2653.
- [www.anti-vegf.com](http://www.anti-vegf.com)
- Folkman J., Shing J.: Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 1992, 267, 10931-10934.
- Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J.: Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.med.* 1991, 324, 1-8.
- Ellis L.M.: Understanding the mode of action of anti-angiogenic therapy. In: <http://www.anti-vegf.com/portal/eipt/pb/avastin/Anti-VEGF/vegfre-source/library>
- Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New Engl.J.Med.* 2004, 350, 2335-2342.
- Gerber H.P., Ferrara N.: Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005, 65, 671-680.

19. Klenner P.: Protiňádorová chemoterapie pro 21. století. *Klin.onkol.* 2003, 16, 243-247.
20. Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature.: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005, 307, 58-62 .
21. Iqbal S., Lenz H.-J.: Angiogenesis inhibitors and treatment of colorectal cancer. *Sem. in Oncology* 2004, 31 (supl.17), 10-16.
22. Wiedmann M.W., Caca K.: Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer. *Curr.Cancer Drug Targets* 2005, 5, 171- 193
23. Venook A.: Critical evaluation of current treatment in metastatic colorectal cancer. *The Oncologist*, 2005, 10, 250-261.
24. Kocáková I., Demlová R., Blažková S., Kocák I., Šefr R., Pacal M.: Bevacizumab v kombinaci s chemoterapií FOLFOX4 v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. *Klin.onkol.*, 2006, 19, 30-32.
25. Ryska A., Hovorkova E., Skrabkova Z.: Angiogeneze v karcinomu prsu. *Imunohistochemická studie 142 případů. Česk.patol.* 2001, 37, 91-98.
26. Ranieri G., Coviello M., Chiriati A., Stea B., Monteruro S., Quaranta M., Dittadi R., Paradiso A.: Vascular endothelial growth factor assessment in different blood fractions of gastrointestinal cancer patients and healthy controls. *Oncology Rep.* 2004, 11, 435-439.
27. Salven P., Orpana A., Joensuu H.: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.*, 1999, 5, 487-491.
28. Gunsilius E., Petzer A.L., Gastl G.: Correspondence re: P.Salven et al., Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.*, 1999, 5, 2978-2979.
29. Lee J.K., Hong Y.J., Han C.J.: Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients. Which is the optimal specimen? *Int.J.Oncol.* 2000, 17, 149-152.
30. George M.L., Eccles S.A., Tutton M.G.: Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelets count in colorectal cancer. Clinical evidence of platelet scavenging? *Clin.Cancer Res.*, 2000, 6, 3147-3152.
31. Kusumanto Z.H., Hospers G.A.P., Sluiter W.J., Dam W.A., Meier C., Mulder N.H.: Circulating vascular endothelial growth factor during the normal menstrual cycle. *Anticancer Res.*, 2004, 24, 4237-4242.
32. Hornbrey E., Gillespie P., Turner K., Han C., Roberts A., McGrouther D., Harris A.L.: A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: Is current literature meaningful? *Clin.Exp.Metastasis* 2002, 19, 654-663.
33. Maloney J.P., Silliman C.C., Ambruso D.R., Wang J., Tuder R.M., Voelkel N.F.: In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am.J.Physiol.* 1998, 44, H1054-H1061.
34. Banks R.E., Forbes M.A., Kinsey S.E., Stanley A., Ingham E., Walters C., Selby P.J.: Release of angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br.J.Cancer* 1998, 77, 956-964.
35. Caine G.J., Stonelake P.S., Lip G.Y.H., Kehoe S.T.: The hypercoagulable state of malignancy: Pathogenesis and current debate. *Neoplasia* 2002, 4, 465-473.
36. Adams J., Carder P.J., Downey S., Forbes M.A., MacLennan K., Allgar V., Kaufman S., Hallam S., Bicknell R., Walker J.J., Cairnduff F., Selby P., Perren T.J., Lansdown M., Banks R.E.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: Comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effect of tamoxifen. *Cancer Res.*, 2000, 60, 2898-2905.
37. Ranieri G., Coviello M., Patruno R., Valerio P., Martino D., Milella P., Catalano V., Scotto F., De Ceglie A., Quaranta M., Ribatti D., Pelecchia A.: Vascular endothelial growth factor concentrations in the plasma-activated platelets rich (P-APR) of healthy control and colorectal cancer. *Oncology Rep.* 2004, 12, 817-820.
38. <http://www.anti-vegfg.com/portal/eipf/pb/avastin/Anti-VEGF/vegfgandcancerprognosis>
39. Minagawa N., Nakayama Y., Hirata K., Imitsuka K., Inoue Y., Nagata N., Itoh H.: Correlation of plasma level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in patients with advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002, 22, 2957-2963.
40. Cascinu S., Staccioli M.P., Gasparini G., Giordani P., Catalano V., Ghiselli R., Rossi C., Baldelli A.M., Graziano F., Saba V., Muretto P., Catalano G.: Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 2803-2807.
41. Boxer G.M., Tsiompanou E., Levine T., Watson R., Begent R.H.: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2005, 26, 1-8.
42. Meo S., Dittadi R., Pelosos L., Gion M.: The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node negative breast cancer. *Int.J.Biol.Markers* 2004, 19, 282-288.
43. Pikner R., Ludvíková M., Ryska A., Kholova I., Holubec L., Jr., Topolcan O., Pecen L., Finek J.: TPS, Thymidine kinase, VEGF and endostatin in cytosol of thyroid samples. *Anticancer Res.* 2005, 25, 1517-1521.
44. Gunsilius E., Tschmelitsch J., Eberwein M., Schwelberger H., Spizzo G., Kahler C.M., Stockhammer G., Lang A., Petzer A.L., Gastl G.: In vivo release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinomas. *Oncology* 2002, 62, 313-317.
45. Konecny G.E., Meng Y.G., Untch M., Wang H.-J., Bauerfindl I., Epstein M., Stieber P., Vernes J.-M., Gutierrez J., Hong K., Beryt M., Hepp H., Slamon D.J., Pegram M.D.: Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.*, 2004, 10, 1706-1716.
46. Pegram M.D., Reese D.M.: Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Seminars in Oncol.* 2002, 29, 29-37.
47. Werther K., Christensen H., Nielsen H., and Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group: Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 2002, 86, 417-432.
48. Celen O., Kahraman I., Yildirim E., Berberoglu U.: Correlation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CEA with clinicopathological variables in colorectal cancer patients. *Neoplasma* 2004, 51, 293-299.
49. DeVita F., Orditura M., Lieto E., Infusino S., Morgillo F., Martinielli E., Castellano P., Romano C., Ciardiello F., Catalano G., Pignatelli P., Galizia G.: Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer.* 2004, 100, 270-278.
50. Granato A.M., Nanni O., Falcini F., Folli S., Mosconi G., DePaola F., Medri L., Amadori D., Volpi A.: Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? *Breast Cancer.* 2004, 6, R38-R45
51. Labropoulos S.V., Fountzilias G., Papadopoulos S., Karina M., Xylouri M., Doudoulakakis A., Chalkidou S., Razis E.D.: Study of serum EGFR, HER-2/neu, VEGF in metastatic breast cancer treated with taxanes. *J.Clin.Oncol.*, 2004, 22, 757-762.
52. Hagesawa Y., Takanashi S., Okudera K., Kumagi M., Hayashi A., Morimoto T., Okumura K.: Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients. *Int.Med.* 2005, 44, 26-34.
53. Matsuyama V., Hashiguchi T., Mizoguchi A., Iwami F., Kawabata M., Arimura K., Osame M.: Serum level of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000, 118, 948-951.
54. Shimanuki Y., Takahashi K., Cui R., Hori S., Takahashi F., Miyamoto H., Fukuch Y.: Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005, 113, 29-42.
55. Mitsuhashi A., Suzuka K., Yamazawa K., Matsui H., Katsuyoshi S., Sekiya S.: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005, 103, 724-730.
56. Ascierto P.A., Leonardi E., Ottaviano A., Napolitano M., Scala S., Castello G.: Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients: A pilot study. *Anticancer Res.* 2004, 24, 4255-4258 .
57. Jacobsen J., Rasmuson T., Grankvist K., Ljunberg B.: Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J.Urol.* 2000, 163, 347-347.
58. El-Houseini M.E., Abdel-Fatah-Abdel-Azim S., El-Desouky G.I., Abdel-Hady S., El-Hamad M.F., Kamel A.M.: Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. *J. Eg.Nat.Cancer Inst.*, 2004, 16, 57-61.
59. Smolej L., Andrys C., Maisnar V., Pour L., Maly J.: Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005, 48, 57-58.
60. Smolej L., Andrys C., Žák P., Belada D., Široký O., Hrudková M., Novosád J., Krejssek J., Malý J.: Angiogenní cytokiny u chronické B-lymfocytární leukémie.: Souvislost s moderními prognostickými faktory. 2.konference Spol.rad. onkol., biol. a fyziky. Hradec Králové 3.-4.3.2006, 249-250.
61. Schneider M., Tjwa M., Carmeliet M.: A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell* 2005, 7, 3-4.
62. Chang Y. S., di Tomaso E., Mc Donald D. m., Jones R., Jain R. K. Munn L.L.: Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 14608-14613.
63. Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chatburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R. g., Moore M.A., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S.: Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 2001, 7, 1194-1201.
64. Rafii S., Heissig B., Hattori K.: Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther.* 2002, 9, 631-641.
65. Beerpoort L.V., Mehra N., Vermaat J.S., Zonnenberg B.A., Gebbink M.F., Voest E.E.: Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann. Oncol.* 2004, 15, 139-145.
66. Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F.: Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001, 97, 3658-3661.
67. Mancuso P., Calleri A., Cassi C., Gobbi A., Capillo M., Pruneri G., Martinelli G., Bertolini F.: Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 552, 83-97.
68. Willett c. G., Boucher Y., Di Tomaso E., Duda D.G., Munn L.L., Tong R.T., Chung D.C., Sahani D.V., Kalva S.P., Kozin S.V., Mino M., Cohen K.S., Scadden D.T., Hartford A.C., Fischman A.J., Clark J.W., Ryan D.P., Zhu A.X., Blaszkowsky L.S., Chen H.X., Shellito P.C., Lauwers G.Y., Jain R.K.: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antitumor effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* 2004, 10, 145-147.
69. Rugo H. S., Dickler M. N., Moore D. H., Melisko M., Yeh B. M., Caravelli J., Brogi E., Hudis C., Park J. W.: Change in Circulating endothelial cells (CEC) and tumor cells (CTC) in patients (pts) receiving bevacizumab and erlotinib for metastatic breast cancer (MBC) predicts stable disease at first evaluation. 2005 ASCO Annual Meeting abstract No. 525. [www.asco.org/ac/1,1003,12-002629,00asp](http://www.asco.org/ac/1,1003,12-002629,00asp).