

ANGIOGENEZE U RENÁLNÍHO KARCINOMU

MUDr. Šárka Lukešová¹, MUDr. Otakar Kopecký, CSc.¹, MUDr. Josef Dvořák², MUDr. Dagmar Hlávková¹

¹Ústav klinické imunologie a alergologie LF a FN, Hradec Králové

²Klinika onkologie a radioterapie LF a FN, Hradec Králové

Angiogeneze představuje základní krok v nádorové proliferaci, expanzi a metastazování. Renální karcinom (renal cell carcinoma, RCC) je vysoce vaskularizovaný nádor. Dysbalance mezi angiogenními a antiangiogenními faktory, angiogenní „switch“, inaktivace von Hippel-Lindau tumor supresorového genu hrají významnou roli v patogenezi renálního karcinomu. V článku je podán také přehled základních antiangiogenních léků zkoušených v klinických studiích při léčbě renálního karcinomu.

Klíčová slova: angiogeneze, renální karcinom, von Hippel-Lindau gen, vaskulární endoteliální růstový faktor.

ANGIOGENESIS IN RENAL CELL CARCINOMA

Angiogenesis represents an essential step in tumour proliferation, expansion, and metastasis. Renal cell carcinoma (RCC) is known to be a well-vascularized tumour. The angiogenic response, also known as the „angiogenic switch“, is initiated when the balance between the positive and the negative regulators of angiogenesis is disrupted in favor of the proangiogenic factors. The role of inactivation of the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene in the regulation of proangiogenic factors and the antiangiogenic agents tested in the treatment of RCC is described.

Keywords: angiogenesis, renal cell carcinoma, von Hippel-Lindau gene, vascular endothelial growth factor.

Interní Med. 2007; 1: 21–27

Úvod

Karcinom ledviny je nejčastějším nádorem ledviny. Může se vyskytnout v kterémkoliv věku, nejčastěji bývá diagnostikován mezi 4.–6. dekádou, častěji u mužů kuřáků. V posledních letech se incidence karcinomu ledviny zvyšuje. Karcinom ledviny vychází z epitelu ledvinových kanálků a vyskytuje se v různých histologických variantách. Nejčastější (asi 70 %) je karcinom z jasných buněk, méně častý je papilární (chromofilní) karcinom (7–15 %) a chromofobní karcinom (5–9 %). Ve 4–5 % se vyskytuje neklasifikovaný karcinom (sarkomatoidní, hlenotvorný z nedefinovaných buněk) a v 1 % karcinom ze sběrných (Belliniho) kanálků.

Karcinom ledviny je zpravidla bohatě vaskularizovaný, prorůstá do preformovaných dutin, tj. do odvodných močových cest, do renálních žil a do vena cava. Často metastazuje do plic, kostí a CNS hematogenní cestou (46).

Nádorová angiogeneze u RCC

Důležitým procesem doprovázejícím růst nádoru je angiogeneze. Nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout nejvýše rozměru 1–2 mm³. V průběhu avaskulárního stadia je zásobování kyslíkem a výživnými látkami zajišťováno difúzí. Jakmile velikost nádoru přesáhne průměr 0,5 mm, je proces difuze nedostačující (92). Hypoxický nádor je geneticky nestabilní (9). Vznikají mutace – např. mutace genu p53, a tím potlačení antiangiogenního trombospondinu. Objevuje se nový genotyp se zvýšenou produkcí angiogenních faktorů (VEGF a další). Tato změna, označovaná jako angiogenní „switch“, zahajuje proces angiogeneze (72). V nádorové populaci vznikne angiogenní klon. Humorální podněty

z nádorových angiogenních buněk indukují migraci endotelií směrem k nádorovému ložisku. Dochází k rozrušení bazální membrány vlivem proteolytických enzymů secernovaných nádorovými buňkami, vlivem kolagenázy IV. typu, aktivátoru plazminogenu a stromelyzinu produkovaných endoteliemi a stromálními buňkami. Rozrušení bazální membrány usnadňuje migraci endotelií, ale i migraci nádorových buněk a jejich metastazování. Z cév uniká fibrinogen a plazminogen. Vlivem tkáňových aktivátorů vznikají extravaskulární depozita fibrinu, vytvářející podpůrnou matici pro růst novotvořené cévy. Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho perfuzi a další růst. Nádorové buňky a endotelie se vzájemně parakrině ovlivňují. Endotelie produkují větší počet mitogenů a motogenů (působků ovlivňujících motilitu). Je to zejména bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) a IGF-2 (insulin-like growth factor-2) (47, 79).

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 (2).

Nádorové buňky mohou exprimovat proangiogenní a/nebo antiangiogenní faktory. Za fyziologických okolností je angiogeneze kontrolována vyvážeností těchto faktorů. Tato rovnováha je porušena u nádorových tkání. Výsledkem je podpora angiogeneze. Ke zvýšené expresi angiogenních faktorů dochází na podkladě různých stimulů. Nejvíce studovaným podnětem je hypoxie (52, 97), která vede

ke zvýšené expresi VEGF i dalších angiogenních faktorů (52, 64). Hypoxie je možno nazvat klíčem k angiogenezi.

Citlivost buněk k hypoxickým stavům a transkripce angiogenních faktorů se zvyšuje při mutaci VHL (von Hippel-Lindau gen) genu (43, 64).

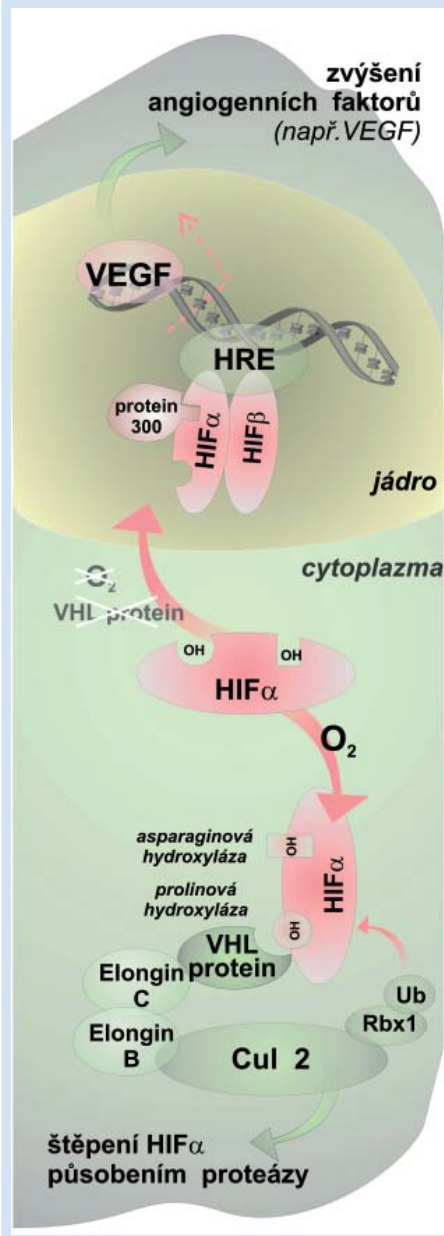
U sporadických renálních karcinomů byla delece alely VHL genu prokázána v 84–98 % (32, 69, 76). Tento gen řadíme mezi tumor-suprimující geny. Je tvořen 3 exony a nachází se na chromozomu 3p25–26. Mnozí autoři prokázali mutaci zbývající alely (pozorována u 34 až 57 % světlobuněčných renálních karcinomů) (76, 78). Inaktivace genu VHL může být způsobena i metylací cytosinu a guaninu v DNA. VHL gen je metylován u 5 až 19 % světlobuněčných renálních karcinomů. VHL protein je tvořen 213 aminokyselinami.

Za fyziologických podmínek váže VHL protein HIF- α (hypoxia-inducible factor) přímo a destabilizuje je, podporuje jeho odbourávání a destrukci. Ztráta funkčního VHL proteinu vede ve svém důsledku k hromadění HIF- α (38, 43). Hypoxií indukované faktory HIF jsou heterodimerické transkripční faktory, které přepisují důležité proteiny za hypoxických podmínek. Skládají se z α a β neboli ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) podjednotek (27, 37, 80, 97). Každá podjednotka má tři izoformy. Skupina HIF- α zahrnuje HIF-1 α , HIF-2 α a HIF-3 α . HIF- β izoformy zahrnují ARNT, ARNT2 a MOP3 (member of PAS protein3); nejvíce rozšířená v tkáních je ARNT. Aktivita HIF je regulována α podjednotkou, β podjednotka je konstitučně vyjádřena v jádře. HIF jsou přítomny ve všech tkáních, jsou degradovány VHL a Elongin BC komplexem za normálního tlaku kyslíku, ale ne

v hypoxických podmínkách. Inaktivace VHL tumor-suprimujícího proteinu, ztráta funkce uvedeného komplexu a z toho plynoucí ztráta odbourávání a následné hromadění HIF- α vede k rozvoji vaskularizace tumorů (48, 82). V důsledku tedy je vysoká hladina neobouraného HIF- α příčinou zvyšování

Obrázek 1. Role HIF a VHL proteinu v nádorové angiogenezi u renálního karcinomu

Za fyziologických podmínek je HIF- α hydroxylován asparaginovou a prolinovou hydroxylázou. Přes hydroxylovaný prolinový konec se váže s VHL proteinem. VHL protein s Elongin C a B proteinem váže Cul2 protein. RING-box protein Rbx1 slouží jako transferáza. Po vytvoření tohoto komplexu dochází k degradaci HIF- α působením proteázy. Hydroxylace asparaginového konce brání vazbě s transkripčním koaktivátorem p300. Za hypoxických podmínek, kdy nedochází k hydroxylaci HIF- α , nebo v případě chybění funkčního VHL proteinu, dochází k hromadění HIF- α , přemístění do jádra, tvorbě heterodimeru HIF- α /HIF- β (ARNT), k vazbě transkripčního koaktivátoru p300 a k aktivaci transkripce HRE (hypoxia response elements), které jsou součástí genů kódujících angiogenní faktory (např. VEGF).



transkripce VEGF, PDGF- β , TGF- α a β (49). Tím se vysvětluje bohatá mikrovaskulární síť a akcelerovaný růst renálního karcinomu a dalších nádorů spojených s mutací VHL (např. hemangioblastom a feochromocytom).

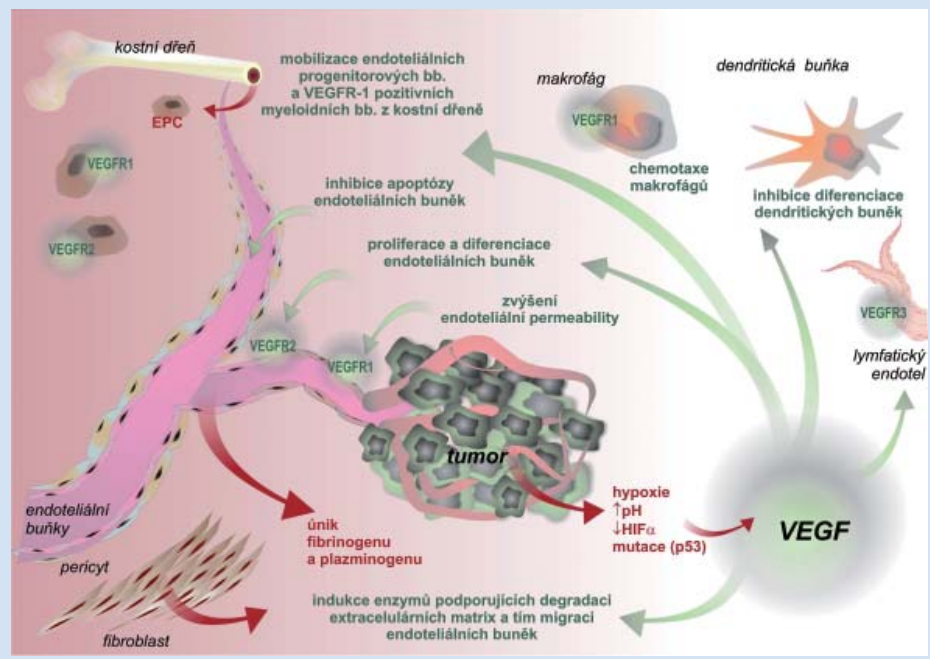
HIF- α je klíčovým regulátorem hypoxické odpovědi mnohobuněčných organismů (9). Za normoxických podmínek je HIF- α hydroxylován na dvou prolinových koncích prolinovou hydroxylázou a na asparaginovém konci asparaginovou hydroxylázou. Rozsah závisí na tenzi kyslíku. Hydroxylace zajistí vazbu HIF- α s VHL proteinem, což podpoří odbourání HIF- α působením proteáz. VHL protein se váže prostřednictvím Elongin B a C na Cul 2 protein (protein z rodiny cullinových ligáz). RING-box protein Rbx1 pak slouží jako ubiquitin transferáza pro VHL skp-cullin-F-box protein (SCF komplex) (8, 38).

Hydroxylace asparaginovou hydroxylázou blokuje vazbu HIF- α s transkripčním koaktivátorem p300.

Chybění VHL proteinu a hypoxie vedou ve svém důsledku ke stejnému efektu – zvýšení VEGF. V případě chybění VHL proteinu se hromadí HIF- α , přechází do jádra, vytváří heterodimery s HIF- β a aktivuje transkripci HREs (hypoxia-response elements), které jsou součástí genů kódujících např. VEGF. Za hypoxických podmínek není HIF- α hydroxylován, nemůže vázat VHL protein a opět se v buňkách hromadí (obrázek 1).

Obrázek 2. Role VEGF v nádorové angiogenezi

VEGF produkovaný nádorovými buňkami nebo stromálními buňkami stimuluje prostřednictvím svých receptorů endotelové buňky cév, buňky lymfatického endotelu nebo hemopoetické buňky. Stimulace VEGFR-1 a VEGFR-2 na endotelích aktivuje proliferaci a diferenciaci endotelových buněk, zvyšuje permeabilitu endotelů a inhibuje jejich apoptózu. VEGF indukuje tvorbu enzymů podporujících degradaci extracelulární matrix, a tím migraci endotelových buněk. VEGF mobilizuje endotelové progenitorové buňky a VEGFR-1 pozitivní myeloidní buňky z kostní dřeně, inhibuje diferenciaci dendritických buněk.



Základní angiogenní růstové faktory

Mezi angiogenní růstové faktory patří následující:

VEGF (vascular endothelial growth factor)

– endotelální růstový faktor, někdy označovaný VPF (vascular permeability factor), který má klíčovou úlohu v procesu angiogeneze (29, 45, 55, 70, 81). Je to homodimerický heparin vázající glykoprotein o molekulové hmotnosti 34–42 kDa, který existuje v několika izoformách (VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈) (2, 3, 94). Má mitogenní účinky na endotelie, zvyšuje cévní permeabilitu a stimuluje produkci proteolytických enzymů. Působí přímo na endotelové buňky prostřednictvím dvou vysoce afinních receptorů aktivujících tyrozínové kinázy (Flt-1 neboli VEGFR-1, Flk-1/KDR neboli VEGFR-2) a nedávno objeveného Flt-4 (VEGFR-3), (obrázek 2). Každý z těchto receptorů obsahuje sedm extracelulárních imunoglobulinových homologních domén, které tvoří místo pro navázání ligandu, krátkou transmembránovou sekvenci a cytoplazmatický konec, který obsahuje tyrozinkinázovou doménu podobnou doméně c-kit nebo PDGF-receptoru.

VEGFR-1 a VEGFR-2 je u dospělých omezeně exprimován na vaskulárním endotelu, monocytech (VEGFR-1), primitivních hematopoetických prekurzorech (VEGFR-2), zatímco VEGFR-3 je omezen na endotel lymfatických cév. VEGF-A a VEGFR-2 jsou nezbytné pro embryonální vaskulogenezi a ko-

nečnou hematopoézu. Studie *in vitro* prokázaly, že stimulace VEGF-A přes VEGFR-2 je odpovědná za proliferaci a diferenciaci endotelií, zatímco VEGFR-1 je odpovědný za aktivaci endoteliální permeability. Na receptor VEGFR-3 se vážou VEGF-C a VEGF-D, které společně řídí lyfngiogenezi. Mechanismus účinku dalších členů VEGF rodiny zatím není podrobně znám. K uvolnění angiogenního signálu dochází po vazbě VEGF na receptor endotelových buněk blízko tumoru. Po vazbě VEGF dojde k dimerizaci a autofosforylaci dvou receptorů tyrozinových kináz. Výsledkem autofosforylace těchto receptorů je zakotvení cytoplazmatických signálních molekul.

Důležitou roli v syntéze VEGF hrají onkogenní ras, raf, bcl-2 (2). Zásadní roli v regulaci syntézy VEGF zaujímá proteinkináza C (PKC). Byla popsána aktivační cesta ras onkogenu prostřednictvím PKC. Podobný vliv byl popsán i u P-3 kinázy. Zvýšená produkce VEGF je pozorována u osob s mutací von Hippel-Lindau genu (VHL).

Významnými stimuly, které zvyšují produkci VEGF, jsou vedle hypoxie (působení HIF-1) a onkogenů také cytokiny, proangiogenní buněčné růstové faktory (jako bFGF a EGF) a hormony. Význam druhého signálu v regulaci VEGF má cyklooxygenáza (COX)-2 a oxid dusnatý.

Stanovení cirkulující hladiny VEGF-A má význam pro odhad prognózy onemocnění (53, 70, 81). Ve studii Paradise a kol. (70) byla prokázána korelace mezi expresí VEGF u konvenčního renálního (ne u papilárního) karcinomu, buněčným gradíngem a velikostí nádoru, mezi VEGF expresí a stupněm mikrovaskularizace. Přežití pacientů, u nichž byla prokázána vysoká exprese VEGF, bylo nižší než u druhé skupiny. Naopak studie Beeckena a kol. (6) neprokázala význam stanovení sérové hladiny VEGF pro odhad prognózy a terapeutického efektu. Sung-Goo Chang a kol. sledovali VEGF v moči u pacientů s renálním karcinomem, která byla zvýšena, ale zvýšení nekorelovalo s angiogenní aktivitou (31).

FGF (fibroblast growth factor) – růstový faktor pro fibroblasty se vyskytuje ve dvou formách, acidické (aFGF) i bazické (bFGF). Obě jsou výraznými mitogeny endotelových buněk, zvyšují expresi proteinu bcl-2, a blokují tak apoptózu endotelií. Mají silnou afinitu k heparinu, což vysvětluje jejich vazbu na heparansulfát proteoglykanu bazální membrány cévy. FGF se uvolňuje z aktivovaných T-lymfocytů, makrofágů a nádorových buněk. Je sekretován i autokrinně vlastními endotelovými buňkami (74). Bazický FGF snižuje citlivost nádorových buněk k léčbě cytostatiky. Popsány byly zvýšené sérové hladiny bFGF u nemocných s renálním karcinomem v porovnání se zdravými lidmi, u nemocných s metastazujícím renálním karcinomem v porovnání s nemocnými bez metastáz (75).

Angiogenin je polypeptid enzymatické povahy, který stimuluje endotelové buňky k produkci prostacyklinu (aktivuje fosfolipázu C a fosfolipázu A₂), omezuje produkci adhezních molekul (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1).

Angiopoetin 1 usnadňuje vzájemné kontakty endotelií a jejich vazbu k buněčné membráně, atrahuje pericyty, stabilizující nově vytvořenou cévu.

Angiopoetin 2 je transmembránový receptor s tyrozinokinázovou aktivitou exprimovaný na endoteliích během angiogeneze. Je důležitý pro účinek jiných angiogenních faktorů, např. VEGF.

TNF-α (tumor necrosis factor) – faktor nekrotizující nádory se uplatňuje v průběhu angiogeneze při degradaci bazální membrány jako aktivátor MMP (matrix metalloproteases). Stimuluje produkci některých cytokinů (IL-1, interleukin-1) a adhezních molekul (ICAM-1). Uvolňován je z aktivovaných monocytů a makrofágů. Při vyšší koncentraci může mít paradoxní účinek. Indukuje intravaskulární koagulaci a může způsobit i uzávěr cévy a nekrozu nádoru.

MMP (matrix metalloproteases) – matrix metalloproteázy jsou enzymy, které svým proteolytickým působením na bazální membránu endotelií, extracelulární matrix a intersticiální stroma vytvářejí prostor pro nově vznikající cévu, podporují mobilitu endotelií a invazi buněk nádoru do cév (28, 51, 58). Patří sem matrilysin, kolagenázy, stromelyzin, gelatinázy.

PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) – endoteliální destičkový faktor byl izolován z krevních destiček v roce 1987 (59). Jedná se o thymidin fosforylázu (61) s afinitou k endotelu, která má chemotaktické účinky a usnadňuje migraci endotelií. Jeho angiogenní potenciál byl prokázán u mnohých lidských malignit, jako je např. karcinom prsu (24) a tlustého střeva (90, 91), renální karcinom (30, 34, 44, 60, 89, 96). Zvýšeně je exprimován na stromálních, ne nádorových buňkách, zvláště na makrofázích, a může být regulován cytokiny (TNF-α, IL-1, IFN-γ – interferon-γ). Mechanismus účinku není zcela přesně znám, ale předpokládá se, že patří mezi nepřímé angiogenní faktory.

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.

HGF (hepatocyte growth factor, scattered factor) je produkovan buňkami mezodermálního původu (fibroblasty, makrofágy, endotelie). Je to polyfunkční růstový faktor, který stimuluje proliferaci hepatocytů, keratinocytů a endotelií. Indukuje expresi aktivátoru plazminogenu.

TGF-α (transforming growth factor) a EGF (epidermal growth factor) aktivují proteinkinázy

a stimuluji proliferaci endotelií. Stimulují výdej VEGF a FGF.

TGF-β (transforming growth factor-β) je multifunkční cytokin ovlivňující regulaci, proliferaci, diferenciaci, migraci a přežívání různých typů buněk, působí na buňky hladké svaloviny, na buňky cévního endotelu a buňky pojiva (7, 50). Tlumí odpovědi imunitního systému a snižuje tvorbu superoxidových radikálů. *In vitro* i *in vivo* bylo prokázáno, že má inhibiční i stimulující vliv na angiogenezi v závislosti na experimentálních podmínkách. V průběhu nádorového vývoje může uplatnit oba vlivy. Během časného stadia působí jako inhibitor proliferace. Jakmile však nádorové buňky uniknou antimitotické odpovědi vůči TGF-β, pak podporuje buněčnou invazi, metastazování a nepřímo vytváří vhodné prostředí podporou neovaskularizace.

U savců jsou známy tři izoformy: TGF-β1, TGF-β2 a TGF-β3. TGF-β je sekretován v latentní formě. Před vazbou na své specifické receptory (typ I a II serin/threonin kinázové receptory) musí být aktivován proteázami nebo trombospondinem. Na zprostředkování signálu TGF-β se účastní jeden TGF-β II receptor (TβR-II) a dva rozdílné TGF-β typy I receptory, tj. activin receptor-like kinasa-1 (ALK-1) omezený na endotel a široce rozšířený ALK5. Po vazbě ligandu a aktivaci I. typu receptorů jsou signály přenášeny do jádra prostřednictvím intracelulárních efektorů, nazývaných Smad. Zatímco aktivace ALK1 indukuje fosforylaci Smad1, Smad5 a Smad8, ALK5 podporuje fosforylaci Smad2 a Smad3.

Komponentou receptorového komplexu TGF-β je homodimerický membránový glykoprotein endoglin (CD105). Endoglin byl poprvé popsán Harutou v r. 1986 na leukemických buňkách a byl považován za molekulu asociovanou s nádorovým bujením. Vyskytuje se však i na normálních endotelových buňkách. Jeho exprese je velmi silná na endotelu vaskularizovaných nádorů, popsán byl i na stromálních buňkách solidních nádorů. Byly popsány dvě izoformy endoglinu L a S, lišící se v počtu aminokyselin a délce cytoplazmatických částí. L endoglin se skládá z 633 aminokyselin, z nichž 47 tvoří cytoplazmatický konec. S endoglin je tvořen sekvencí 60 aminokyselin, ze kterých 14 se nachází v cytoplazmě. Kromě formy vázané na membránu (vyskytuje se i na chondrocytech placentárních buněk, monocytech, prekurzorech erytrocytů a subpopulaci krevních kmenových buněk) se vyskytuje i v solubilní formě.

Na angiogenezi se podílí řada cytokinů. IL-1 stimuluje mitogenezi a expresi endotelových aktivačních markerů, IL-6 (interleukin-6) má vliv na migraci nádorových buněk, IL-8 (interleukin-8) usnadňuje migraci endotelií, interferon-γ zvyšuje sekreci TNF-α, IL-1 a IL-8 a GM-CSF podporuje angiogenezi nepřímo stimulací makrofágů k výdeji angiogenních faktorů.

Antiangienní léčba u RCC

Vzhledem k základnímu faktu, že světlobuněčný karcinom ledviny je vysoce vaskularizovaný tumor, charakterizovaný deregulací HIF-1 α , VEGF a dalších angienních růstových faktorů (29, 33, 36, 65, 81, 86, 98, 100, 102), je antiangienní léčba u tohoto nádoru považována za perspektivní (16).

Antiangienní léky obecně zahrnují velkou skupinu molekul s různým mechanismem účinku. Mohou být rozděleny do dvou základních skupin: na přímé a nepřímé inhibitory angiogeneze. Přímé inhibitory angiogeneze blokují cestu angiogeneze, zatímco nepřímé inhibitory většinou antagonizují biologickou aktivitu angienních faktorů, interferují s jejich produkcí či biologickou aktivitou, nebo aktivitou jejich receptorů (73).

Příkladem jiné klasifikace je dělení na pět rozdílných typů (2):

1. inhibitory angienních faktorů (bevacizumab; IFN- α , interferon- α)
2. inhibitory proteáz, které ovlivňují remodelaci extracelulární matrix (MMP inhibitory)
3. inhibitory proliferace aktivovaných endotelií (endostatin, thalidomid, TNP-470)
4. inhibitory adhezivních molekul (SCH22153)
5. látky interferující s generací angienních molekul nebo s receptorovou aktivitou (SU5416).

Mnohá klasická cytostatika mají rovněž antiangienní efekt, který byl pravděpodobně roky využíván, aniž bychom si ho byli vědomi (73). Mezi klasická cytostatika s působením proti endotelových buňkám, která jsou využívána u renálního karcinomu, patří z alkaloidů vinblastin, z antimetabolitů 5-fluorouracil (5-FU).

Důležitým lékem, který je využíván v léčbě renálního karcinomu a u něhož je využívána vedle antiproliferačních vlastností (zvláště na nádorové buňky) též schopnost regulace buněčného růstu, diferenciace, tumorigenicita a inhibice mnohých kroků angiogeneze, je interferon- α .

Interferony patří mezi nejznámější endogenní inhibitory angiogeneze (25). Interferon- α a β se dělí o společný receptor (typ I interferonového receptoru) a vyvolávají obdobnou buněčnou odpověď. Některé buněčné reakce však mohou být stimulovány jen IFN- β (interferon- β), pravděpodobně fosforylací s receptorem asociovaného proteinu, který reaguje výhradně k IFN- β .

IFN- α zastavuje proliferaci endotelu indukovanou FGF (84). IFN- γ rovněž inhibuje proliferaci endotelu. Oba vykazují cytostatický efekt k endotelovým buňkám drobných kožních cév, endoteliím lidských kapilár. Systémové podání rekombinantních interferonů vykazuje antiangienní působení u vaskularizovaných nádorů (hemangiomy, Kaposiho sar-

kom, karcinom močového měchýře) (23). Tyto nádory rovněž vykazují vysokou hladinu bFGF, kterou lze detekovat v moči či krvi pacientů. IFN- α a IFN- β , ale ne IFN- γ snižují transkripci bFGF mRNA a expresi proteinů na lidských karcinomových buňkách (23).

V případě renálních karcinomů jsou v klinických studiích zkoušeny níže uvedené antiangienní léky.

Thalidomid

Údaje o výzkumu thalidomidu prezentovali D'Amato, Figg a Dreicer. Byla vyslovena hypotéza, že teratogenní efekt této látky spočívá v antiangienním působení, které lze prokázat *in vitro* (10), přerušuje procesy mediované bFGF a VEGF (20) a indukuje apoptózu v existujících novotvořených cévách, snižuje expresi TNF- α a IL-10 (interleukin-10) (2). Byly popsány odpovědi při jeho podání u renálního karcinomu, ovšem následné studie prokázaly procento objektivní odpovědi jen pod 5 % (21, 62). Klinické studie zaměřené na to, zda thalidomid je schopen zmenšit progresi renálního karcinomu, ještě nebyly dokončeny. Mezi nežádoucí účinky patří zácpa, únava, neutropenie a tromboembolické komplikace (1, 18, 76).

Probíhá několik studií s kombinovanou léčbou (1). D'Amato prezentoval poznatky o léčbě pacientů s renálním karcinomem trojkombinací interferonu- α , capecitabinu a thalidomidu. V malé studii bylo pozorováno 5 parciálních odpovědí mezi 27 pacienty. Odpověď byla lepší než při léčbě interferonem- α v monoterapii. Kombinovaná léčba nesla vyšší riziko tromboembolických komplikací (u pěti pacientů vznikla hluboká žilní trombóza). Studie, zahrnující léčbu gemcitabinem, 5-FU a thalidomidem, prokázala 43 % hlubokých žilních trombóz a plicních embolizací (13).

U renálního karcinomu je též zkoušena léčba dvojkombinací interferonu a thalidomidu (19). Vychází se ze zkušeností s léčbou interferonem- α a z poznatku, že nízké dávkovaný interferon inhibuje bFGF na preklinických modelech.

Dále se u pacientů s renálním karcinomem zkouší dvojkombinace interleukinu-2 a thalidomidu (39, 41). Využívá se zde spíše vlivu thalidomidu na imunitní funkce než antiangienní efekt. Budou nutné další studie, které by potvrdily či vyvrátily tato pozorování.

Neovastat (AE-941) (55)

Neovastat je přírodní látka získaná homogenizací a purifikací ze žraločích chrupavek. Bylo pozorováno, že inhibuje některé procesy závislé na VEGF díky kompetici ve vazbě na VEGFR-2, ale také podporuje apoptózu endotelu. Ačkoliv se výsledky v 2. fázi zkoušek zdály slibné (4, 5), nebyl ve 3. fázi zkoušek na souboru 300 pacientů refrakterních k imunoterapii prokázán benefit v prodloužení přežití (21, 22).

Bevacizumab (55, 77)

Bevacizumab je humanizovaná monoklonální protilátka zkoušená rovněž u renálního karcinomu, zaměřená proti všem subtypům VEGF s vyhovujícím poločasem rozpadu 2–3 týdny. Randomizovaná studie u pacientů refrakterních vůči léčbě IL-2 prokázala signifikantní prodloužení času do progresu (101). V této dvojité slepé randomizované studii bylo podáváno placebo, nízké dávky (3 mg/kg) a vysoké dávky (10 mg/kg) bevacizumabu. Čtyři z 38 pacientů ve vysokodávkovaném rameni měli objektivní odpověď, žádná nebyla pozorována u zbývajících dvou větví. Medián do progresu ve vysokodávkovaném rameni byl 6 měsíců, v placebovém rameni 3 měsíce. Hlavními nežádoucími účinky jsou hypertenze a asymptomatická proteinurie.

SU11248

SU11248 (sunitinib) je malá molekula inhibitoru tyrozinové kinázy (77). Vykazuje protinádorový a antiangienní efekt zablokováním tyrozinových kináz asociovaných s VEGFR, PDGFR, KIT, RET a FLT3 (56, 85). Tyto receptorové kinázy aktivují vazbu příslušného ligandu na jejich transmembránový konec několik intracelulárních procesů, vedoucích k proliferaci, diferenciaci a inhibici apoptózy. Preklinické studie ukázaly, že jednorázové podání této látky vede k 16hodinové inhibici kinázové aktivity (66). Ve studii na 63 pacientech s renálním karcinomem bylo pozorováno 33 % odpovědí. 37 % pacientů vykazovalo více jak tříměsíční stabilizaci choroby. Mezi nejčastěji pozorované nežádoucí účinky léčby patří únava, průjem, nauzea, dyspepsie, stomatitidy a změny krevního obrazu (lymfopenie, neutropenie, anémie) (63, 95).

Na ASCO 2006 byly publikovány výsledky studie R. J. Motzera a kol. se 750 pacienty, kteří byli randomizováni na skupinu léčenou IFN- α (v dávkování 3x týdně 9 MIU s.c. v 6týdenních cyklech), a skupinu léčenou sunitinibem (50 mg p.o. 1x denně 4 týdny, 2 týdny pauza). Ve skupině léčené sunitinibem byl medián do progresu choroby 11 měsíců, objektivní odpověď byla zaznamenána u 35,7 % pacientů, zatímco ve skupině léčené IFN- α byl medián do progresu choroby 5 měsíců a objektivní odpověď byla zaznamenána u 8,8 % pacientů.

PTK 787/ZK222584

Je orální selektivní inhibitor VEGF-1, VEGF-2 a PDGFR- β tyrozinových kináz. Neinhibuje jiné kinázy, včetně EGF a FGF (99). Preklinická data dokazují, že PTK inhibuje proliferaci, přežívání a migraci entotelových buněk (78). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nauzea, únava a zvracení. Maximální tolerovaná denní dávka je 1500 mg/den. Ve studii se 42 pacienty s renálním karcinomem byla u 2 pacien-

tů pozorována parciální odpověď, u 6 pacientů (15%) minimální odpověď (25–50% zmenšení) a u 60% stabilizace choroby. Medián do progresu byl 5,3 měsíce, medián přežití 21,5 měsíce a jednoleté přežití 67% (26).

IM862 (12)

Jedná se o dipeptid s imunomodulačními a antiangiogenními vlastnostmi. Zkouší se jeho využití v kombinaci s chemoterapií. Samostatné podávání nepřineslo žádnou objektivní odpověď u pacientů s metastazujícím karcinomem ledviny, ale snížení hladiny VEGF bylo prokázáno.

TNP-470

Tento lék je analogem fumagillinu, který inhibuje růst endotelových buněk (35). Předpokládaným cílem fumagillinu i TNP-470 je typ II metionin aminopeptidáza, která je přítomna v endoteliálních buňkách (83). Bylo sledováno 33 pacientů s metastazujícím renálním karcinomem (88). Zaznamenána byla pouze jedna parciální odpověď, navíc byla pozorována mozková a neuropsychiatrická toxicita a únavy. U šesti pacientů bylo zaznamenáno prodloužení periody do progresu onemocnění, ale není jisté, zda se jednalo o efekt léčby.

BAY 43-9006

Je inhibítor Raf-1, člena RAF/MEK/ERK signální cesty (77). Navíc vykazuje *in vitro* i *in vivo* působení proti několika receptorům tyrozinových kináz, včetně VEGFR-2, VEGFR-3, PDGF receptoru β , Flt-3 a c-Kit. Nežádoucí účinky (hypertenze, otoky, průjem, rash a alopecie) prokázané studiemi ve 2. fázi zkoušek byly zvládnutelné. V současnosti se zkouší efekt u renálního karcinomu, progredujícího po šestiměsíční imunoterapii. Přípravovány jsou studie s kombinovaným podáváním s interferonem, IL-2, bevacizumabem a chemoterapií (73).

Omezení v aplikaci antiangiogenní léčby u nádorových onemocnění je dáno mimo jiné heterogenitou endotelových a nádorových buněk a nádorovým mikroprostředím.

Dnes je akceptována teorie, že endoteliální buňky intratumorálních cév (aktivované endotelie) jsou fenotypově (a pravděpodobně i genotypově) odlišné od normálních endotelií. Výzkum VEGF receptorů a jejich regulace prokázal, že jsou velké fenotypové rozdíly mezi vyzrálými cévami v klidovém stadiu a mezi nově formovanými. Tyto rozdíly mohou být důvodem, proč jsou uchráněny normální cévy, a přitom je dosaženo terapeutického efektu.

Invazivní nádory mají obvykle vyjádřeny mnohé angiogenní faktory, z nichž některé jsou ve vztahu k příslušné tkáni specifické. Genetická nestabilita

nádoru však může vyústit ve změnu počtu i typu proangiogenního faktoru. To pak může vést následně k selekci klonu rezistentního vůči podávanému antiangiogennímu faktoru. Produkce stejného proangiogenního faktoru negarantuje stejnou odpověď vůči antiangiogenní léčbě. Např. Wilmsův tumor i neuroblastom přednostně produkují VEGF. Přímá monoklonální protilátka proti VEGF zastavuje růst prvního nádoru, zatímco neuroblastom vykazuje rezistenci (42). Mechanismus popsané skutečnosti (resp. rezistence) zatím není znám. Bylo prokázáno, že porucha p53 v nádorových buňkách snižuje senzitivitu vůči antiangiogenní léčbě (40). Dále bylo prokázáno, že chronická hypoxie selektuje p53 mutované nádorové buňky rezistentní vůči hypoxií indukované apoptóze. Antiangiogenní léčba předpokládá závislost angiogeneze a odpovědi na hypoxii, hypoglykemii a akumulaci odpadových produktů. Různorodost v citlivosti vůči hormonálním změnám, cytostatické léčbě a ionizujícímu záření je důvodem pro selhávání této léčby. Ve více než polovině všech nádorových cév dochází k cyklické hypoxii. Následkem toho nádorové buňky rozvíjejí mechanismy rezistence. Některé nádorové buňky jsou pak schopny přežívat prolouhovanou periodu hypoxie (14, 15).

Nádorové mikroprostředí chrání endotelovou složku. Pericyty obklopují zralé cévy a zajišťují signalizaci důležitou k přežití endotelových buněk. Rozdílné působení pericytů v různých nádozech obvykle vede k vyžrávání cév, přežívání a citlivosti vůči antiangiogenní terapii (17). Pericyty mohou být odpovědné za VEGF – nezávislé přežívání zralých cév. Extracelulární matrix obsahuje nebo uvolňuje mnohé pro- a antiangiogenní faktory. Z tohoto důvodu se očekává různá senzitivita. Například léčba inhibítor MMX batimastatem má různý efekt na nádorovou progresi a růst v závislosti na umístění metastáz (54).

Nádorové mikroprostředí také ovlivňuje průnik léku (71). Například přirozené inhibitory angiogeneze, angiotatin a endostatin, jsou rychleji odstraněny z cirkulace při intravenózním bolusovém podání (67, 68). Pravděpodobně neúčinnější bude podávání v kontinuální infuzi. Na vliv mikroprostředí nádoru ukazují také smíšené odpovědi, které byly pozorovány u klinických studií (např. regrese plicních metastáz a růst jaterních metastáz u jednoho pacienta) (57, 87, 93).

Závěr

Nádorová angiogeneze je komplexní proces ovlivňovaný řadou faktorů jak ze strany hostitelského organismu, tak ze strany nádoru. U mnoha nádorových onemocnění je zvýšená angiogeneze považována za negativní prognostický faktor, kte-

rý znamená zvýšenou agresivitu nádoru a riziko metastáz. V posledním desetiletí je angiogeneze středem zvýšené pozornosti v onkologii, přibývá klinických studií využívajících antiangiogenní léky. Jedná se o poměrně nový a perspektivní způsob léčby. Antiangiogenní působky účinkují pomaleji než klasické cytotoxické léky, jsou ale obecně lépe tolerovány. Působí především tumoristaticky, nikoli tumoricidně, proto budou muset být pravděpodobně ve většině případů kombinovány s klasickou cytostatickou léčbou.

Důležitý bude správný výběr pacientů čili cílená terapie u pacientů s prokázaným specifickým molekulárním fenotypem. Např. zatímco VEGF je důležitou, snad až nezbytnou složkou při novotvorbě cév mnohých nádorů, jsou lidské nádory, které ho neexprimují, a anti-VEGF léčba je pak neúčinná. Cílená léčba vyžaduje přítomnost specifických cílových molekul. Ideální je, když umíme tyto cílové molekuly stanovit a jejich expresi korelovat s klinickým efektem. Příkladem takových cílových molekul jsou estrogenový receptor nebo HER-2 neu u karcinomu prsu, c-kit u gastrointestinálních stromálních tumorů a bcr-abl u chronické myeloidní leukemie. Na druhé straně nedostatečná selekce vhodných pacientů může být příčinou negativních výsledků v nedávné studii s užitím EGFR tyrozinkinázových inhibitorů (11).

Výběr vhodných pacientů vyžaduje senzitivní, specifické, rychlé a reprodukovatelné testy. Solubilní angiogenní faktory, jako např. VEGF, PDGF, TGF- β , jsou měřitelné metodou ELISA, multiplexovými analýzami (proteinové arraye) či detekcí s využitím mikrokřistic (např. Luminex technologie). Pomocí imunohistochemických vyšetření je možné prokazovat angiogenní molekuly a jejich receptory na buňkách ve vzorcích biopsicky nebo peroperačně odebraných tkání.

Použité zkratky

aFGF	acidický růstový faktor pro fibroblasty
ALK	activin receptor-like kinasa
ARNT	arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
bFGF	bazický růstový faktor pro fibroblasty
CD	clusters of differentiation
CNS	centrální nervový systém
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzymo-imunoanalýza
EPC	endoteliální progenitorová buňka (endothelial dendritic cell)
ERK	extracellular signal-related kinase
FGF	růstový faktor pro fibroblasty (fibroblast growth factor)

FLT3 fetal liver tyrosine kinase receptor 3
 GM-CSF faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
 HGF hepatocyte growth factor
 HIF hypoxia inducible factor
 HRE hypoxia response elements
 ICAM molekula zprostředkující mezibuněčnou adhezi (intracellular adhesion molecule)
 IFN interferon
 IGF-1 insulin-like growth factor-1
 IGF-2 insulin-like growth factor-2
 IL-1 interleukin-1
 MEK mitogen extracellular kinase
 MMP matrix metaloproteázy (matrix metalloproteases)
 MOP3 member of PAS protein3

PD-ECGF endoteliální destičkový faktor (platelet-derived endothelial cell growth factor)
 PDGF destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
 PKC proteinkináza C
 RCC renální karcinom (renal cell carcinoma)
 SCF skp-cullin-F-box protein
 TGF transformující růstový faktor (transforming growth factor)
 TNF faktor nekrotizující tumory (tumor necrosis factor)
 VCAM vaskulární cytoadhezivní molekula (vascular adhesion molecule)
 VEGF endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
 VEGFR receptor pro endotelový růstový faktor

VHL von Hippel-Lindau gen
 VPF vascular permeability factor
 5-FU 5-fluorouracil (antimetabolit)

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

MUDr. Šárka Lukešová
 Ústav klinické imunologie a alergologie FN
 Sokolská tř. 581, 500 05 Hradec Králové
 e-mail: lukesova@fnhk.cz

Literatura

- Amato RJ. Thalidomide therapy for renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46: S59–S65.
- Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Int Med* 2003; 14: 459–469.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF₁₆₅b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Research* 2002; 62: 4123–4131.
- Batist G, Champagne P, Hariton C, Dupont E. Dose-survival relationship in a phase II study of neovastat in refractory renal cell carcinoma patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: A-1907.
- Batist G, Patenaude F, Champagne P, et al. Neovastat (AE-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels. *Ann Oncol* 2002; 13: 1259–1263.
- Beecken WD, Bantas W, Glienke W, et al. Serum angiogenic activity: diagnostic relevance in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2002; 42: 364–369.
- Bredow S, Lewin M, Hofmann B, et al. Imaging of tumour neovasculation by targeting the TGF- β binding receptor endoglin. *Eur J Cancer* 2000; 36: 675–681.
- Clifford SC, Astuti D, Hooper L, et al. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: Molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1 α in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 5067–5074.
- Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2477–2490.
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082–4085.
- Dancey JE, Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor are we missing the mark? *Lancet* 2003; 362(9377): 62–64.
- Deplanque G, Madhusudan S, Jones PH, et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent IM862 in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 1645–1650.
- Desai AA, Vogelzang NJ, Rini BI, et al. A multi-institutional phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil and daily thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma associated with high rate of venous thromboembolism. *Cancer* 2002; 95: 1629–1636.
- Durand RE, Raleigh JA. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res* 1998; 58: 3547–3550.
- Durand RE, Sham E. The lifetime of hypoxic human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 711–715.
- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368–4380.
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000; 60: 1388–1393.
- Eisen T. Phase II results of a phase II/III study comparing thalidomide with medoxyprogesterone in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 400. Abstract 1606.
- Eleutherakis-Papaikovou V, Bamias A, Dimopoulos MA. Thalidomide in cancer medicine. *Annals Oncol* 2004; 15: 1151–1160.
- Eleutherakis-Papaikovou V, Karali M, Kokkonouzis I, Tiliakos I, Dimopoulos MA. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma: clinical significance and therapeutic approach. *Leuk Lymphoma* 2003; 44 (6): 937–948.
- Escudier B, Lassau N, Couanet D, et al. Phase II trial of thalidomide in renal-cell carcinoma. *Annals Oncol* 2002; 13: 1029–1035.
- Escudier B, Venner P, Stern L, et al. Prognostic factors in metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: lessons from a large phase III trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. *J Clin Oncol* 2004; 22 (Suppl. 14S): 4547.

- Fidler IJ, Kerbel RS, Ellis LM. Biology of cancer angiogenesis, in: DeVita, Hellman, Rosenberg (Eds.), *Cancer Principles and Practice of Oncology*, sixth ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001.
- Fox SB, Westwood M, Moghaddam A, et al. The angiogenic platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is upregulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer* 1996; 73: 275–280.
- Friesel R, Kamoriya A, Maciag T. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol* 1987; 104: 689.
- George D, Michaelson D, Oh WK, et al. Phase I study of PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK) in metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 385 (abstract 1548).
- Gruber M, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 169–174.
- Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, et al. mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1839–1846.
- Hemmerlein B, Kugler A, Özisik R, et al. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439: 645–652.
- Hirano Y, Takayama T, Kageyama S, et al. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma: relationship between histological parameters and chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Eur Urol* 2003; 43: 45–52.
- Chang SG, Jeon SH, Lee SJ, et al. Clinical significance of urinary vascular endothelial growth factor and microvessel density in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2001; 58: 904–908.
- Igarashi H, Esumi M, Ishida H, Okada K. Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 47–53.
- Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10595–10599.
- Imazono Y, Takebayashi Y, Nishiyama K, et al. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2570–2578.
- Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348: 555–557.
- Jacobsen J, Grankvist K, Rasmussen T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU International*, 2004; 93: 297–302.
- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al. Induction of HIF-1 in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15: 1312–1314.
- Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Develop* 2004; 18: 3055–3065.
- Kedar I, Mermershtain W, Ivgi H. Thalidomide reduces serum C-reactive protein and interleukin-6 and induces response to IL-2 in a fraction of metastatic renal cell cancer patients who failed IL-2-based therapy. *Int J Cancer* 2004; 110: 260–265.
- Kerbel RS. Clinical trials of antiangiogenic drugs: opportunities, problems, and assessment of initial results. *J Clin Oncol* 2001; 19 (Suppl. 18): 45S–51S.
- Kerst JM, Bex A, Mallo H, et al. Prolonged low dose IL-2 and thalidomide in progressive metastatic renal cell carcinoma with concurrent radiotherapy to bone and/or soft tissue metastasis: a phase II study. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 926–931.
- Kim E, Moore J, Huang J, et al. All angiogenesis is not the same: distinct patterns of response to antiangiogenic therapy in experimental neuroblastoma and Wilms' tumor. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 287–290.
- 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.
- Kinsui H, Ueda T, Suzuki H, et al. Expression of thymidine phosphorylase in primary human renal cell carcinoma by ELISA method. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 340–345.

45. Klenner P. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia* 2002; 12 (1): 2–8.
46. Klenner P. Klinická onkologie. Galén 2002; 66–71.
47. Klenner P. Význam angiogeneze u nádorových onemocnění a možnosti jejího ovlivnění. *Forum Medicinæ* 1999; 2: 54–61.
48. Krieg M, Haas R, Brauch H, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 2000; 19: 5435–5443.
49. Kurban G, Hudon V, Duplan E, et al. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66 (3): 1313–1319.
50. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005; 65 (3): 599–608.
51. Lein M, Jung K, Laube Ch, et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85: 801–804.
52. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333–13340.
53. Ljungberg B, Jacobsen J, Häggström-Rudolfsson S, et al. Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. *Urol Res* 2003; 31: 335–340.
54. Low JA, Johnson MD, Bone EA, et al. The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1207–1214.
55. Malik AK, Gerber HP. Targeting VEGF ligands and receptors in cancer. *Targets* 2003; 2(2): 48–57.
56. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327–337.
57. Miller K, Haney L, Pribluda V, et al. A phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 2-methoxyestradiol in patients with refractory metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 43a (abstract 170).
58. Miyata Y, Kanda S, Nomata K, et al. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urol* 2004; 63: 602–608.
59. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, et al. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem* 1987; 262: 4098–4103.
60. Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, et al. The significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 730–736.
61. Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia Coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* 1992; 31: 12141–12146.
62. Motzer RJ, Berg W, Ginsberg M, et al. Phase II trial of thalidomide for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 302–306.
63. Motzer RJ, Rini BI, Michaelson MD, et al. SU011248, a novel tyrosine kinase inhibitor, shows antitumor activity in second-line therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase 2 trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. *J Clin Oncol* 2004; 22 (Suppl. 14S): 4500.
64. 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.
65. O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper D, et al. Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. *Lancet* 1999; 353: 1494–1495.
66. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 2003; 101: 3597–3605.
67. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996; 2: 689–692.
68. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315–328.
69. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 27509–27512.
70. Paradis V, Lagha NB, Zeimour L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 436: 351–356.
71. Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, et al. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial versus subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4628–4633.
72. Pour L, Hájek R, Buchler T, et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50 (12): 930–938.
73. Raia V, Mancuso P, Bertolini F. Antiangiogenesis therapy in the treatment of cancer. *Enhancer Biother. Cancer* 2005; 3 (1): 2–8.
74. Ramp U, Reinecke P, Gabbert HE, Gerharz CD. Differential response to transforming growth factor (TGF)- α and fibroblast growth factor (FGF) in human renal cell carcinomas of the clear cell and papillary types. *Eur J Cancer* 2000; 36: 932–941.
75. Rasmussen T, Grankvist K, Jacobsen J, Ljungberg B. Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2199–2203.
76. Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23 (5): 1028–1043.
77. Rini BI, Sosman JA, Motzer RJ. Therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: biology, clinical results and future development. *BJU Int* 2005; 96: 286–290.
78. Rini BI. VEGF-Targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Oncologist* 2005; 10: 191–197.
79. Ryška A. Angiogeneze v nádorech. Část I.: Úloha v určování biologických vlastností nádoru; faktory ovlivňující vznik a vývoj angiogeneze. *Čes-Slov Patol* 2000; 36 (1): 26–31.
80. Salceda S, Cam J. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642–22647.
81. Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 874–879.
82. Shuin T, Yamazaki I, Tamura K, et al. Recent advances in ideas on the molecular pathology and clinical aspects of von Hippel-Lindau disease. *Int J Clin Oncol* 2004; 9: 283–287.
83. Sin N, Meng L, Wang MQ, et al. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6099–6103.
84. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, et al. Interferons alpha and beta downregulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4562.
85. Sistla A, Sunga A, Phung K, et al. Powder-in-bottle formulation of SU011248. Enabling rapid progression into human clinical trials. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 19–25.
86. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158 (2): 735–743.
87. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001; 158: 1279–1288.
88. Stadler WM. RMJ: development of target-based anti-neoplastic agents. *Invest New Drugs* 2000; 18: 7–16.
89. Suzuki K, Morita T, Hashimoto S, Tokue A. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) associated with prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2001; 29: 7–12.
90. Takayashi Y, Bucana CD, Lu W, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1146–1151.
91. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1110–1117.
92. Talač R, Žaloudík J, Pačovský Z, Fait V. Neovaskularizace u solidních nádorů. *Klin Onkol* 1995; 6: 165–167.
93. Thomas J, Schiller J, Lee F, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 70a (abstract 274).
94. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1999; 35 (1): 133–137.
95. Tuma RS. Three molecularly targeted drugs tested in kidney cancer clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1270–1271.
96. Wada S, Yoshimura R, Naganuma T, et al. Thymidine phosphorylase levels as a prognostic factor in renal cell carcinoma. *BJU International* 2003; 91: 105–108.
97. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix -loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510–5514.
98. Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer Research* 2001; 61: 5215–5222.
99. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000; 60: 2178–2189.
100. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, Nemoto N. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003; 10: 220–227.
101. Yang JC, Haworth L, Steinberg SM, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab (anti-VEGF antibody) demonstrating a prolongation in time to progression in patients with metastatic renal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 15 (abstract).
102. Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002; 9: 509–514.